

**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

**LICHTMIKROSKOPISCHE, ULTRASTRUKTURELLE,
GLYKOHISTOCHEMISCHE UND
IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN
AM HODEN
DES NICHT-GESCHLECHTSREIFEN UND DES
GESCHLECHTSREIFEN KANINCHENS
(*ORYCTOLAGUS CUNICULUS F.DOM*)**

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

von Silke Gebendorfer

aus Würzburg

München 2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Sabine André

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-------------|--|----|
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| II. | LITERATURÜBERSICHT | |
| 1. | Makroskopische Anatomie des Kaninchenhodens | 2 |
| 2. | Pubertät und Geschlechtsreife des männlichen Kaninchens | 2 |
| 3. | Mikroskopische Anatomie des Hodens | 4 |
| 3.1. | Hodenkapsel..... | 4 |
| 3.2. | Septulae testis und Lobuli testis..... | 5 |
| 3.3 | Tubuli seminiferi contorti..... | 5 |
| 3.3.1. | Lamina propria..... | 6 |
| 3.3.2. | Keimepithel..... | 8 |
| 3.3.2.1. | Sertoli-Zellen und primitive Stützzellen..... | 8 |
| 3.3.2.1.1. | Zellkern und Zellorganellen der Sertoli-Zellen..... | 9 |
| 3.3.2.1.2. | Primitive Stützzellen..... | 10 |
| 3.3.2.1.3. | Funktion der primitiven Stützzellen und der Sertoli-Zellen..... | 11 |
| 3.3.2.2. | Blut-Hoden-Schranke..... | 12 |
| 3.3.2.3. | Keimzellen und Spermatogenese..... | 15 |
| 3.3.2.3.1. | Spermatozytogenese und Spermatogonien..... | 15 |
| 3.3.2.3.2. | Meiose und Spermatozyten..... | 16 |
| 3.3.2.3.3. | Spermiogenese und Spermiden/Spermien..... | 17 |
| 3.3.2.3.4. | Spermiation und Transport der Spermien..... | 20 |
| 3.3.2.3.5. | Entwicklung der Keimzellen..... | 20 |
| 3.3.2.3.6. | Kinetik der Spermatogenese und Keimepithelzyklus..... | 21 |
| 3.4. | Intratestikuläre samenableitende Wege..... | 22 |
| 3.4.1. | Terminalsegment..... | 23 |
| 3.4.2. | Tubuli recti..... | 24 |
| 3.4.3. | Rete testis und Mediastinum testis..... | 25 |
| 3.5. | Interstitium..... | 27 |
| 3.5.1. | Leydig-Zellen..... | 28 |
| 4. | Glykohistochemie | 31 |
| 5. | Immunhistochemie | 33 |
| 5.1. | Das Zytoskelett in immunhistochemische Untersuchungen..... | 33 |
| 5.1.1. | α -SMA ("alpha-smooth muscle actin")..... | 34 |
| 5.1.2 | Intermediärfilamente..... | 35 |
| 5.1.2.1. | Zytokeratine..... | 36 |
| 5.1.2.2 | Vimentin..... | 38 |
| 5.2. | Progesteronrezeptoren in immunhistochemischen Untersuchungen..... | 39 |
| III. | MATERIAL UND METHODEN | 42 |
| 1. | Untersuchungsmaterial | 42 |
| 2. | Materialvorbereitung | 44 |
| 3. | Histologische Routinefärbungen | 45 |
| 3.1. | Vor- und Nachbehandlung der Schnitte..... | 45 |
| 3.2. | Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)..... | 46 |
| 3.3. | Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 und pH 1,0..... | 46 |
| 3.4. | Trichromfärbung nach Masson-Goldner..... | 46 |
| 3.5. | Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung..... | 47 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.6. | Perjodsäure-Schiff Reaktion (PAS-Färbung) nach McManus ohne und nach Amylase-Verdau..... | 47 |
| 3.7. | Sirius Red-Färbung..... | 48 |
| 3.8. | Auswertung..... | 48 |
| 4. | Glykohistochemische Untersuchungen..... | 49 |
| 4.1. | Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierte Lektine..... | 50 |
| 4.2. | Biotinylierte Lektine..... | 51 |
| 4.3. | Hemmzucker..... | 52 |
| 4.4. | Positivkontrollen..... | 53 |
| 4.5. | Negativkontrollen..... | 53 |
| 4.6. | Auswertung..... | 53 |
| 5. | Immunhistochemische Untersuchungen..... | 54 |
| 5.1. | Avidin-Biotin-Complex-Methode..... | 54 |
| 5.2. | Positivkontrollen..... | 57 |
| 5.3. | Negativkontrollen..... | 57 |
| 5.4. | Auswertung..... | 58 |
| 6. | Elektronenmikroskopische Untersuchungen..... | 58 |
| 7. | Histometrie und Parameter für Hodenentwicklung..... | 59 |
| 7.1. | Messung der Dicke der Hodenkapsel..... | 59 |
| 7.2. | Messung der Höhe des Keimepithels..... | 59 |
| 7.3. | Messung der Durchmesser der Tubuli seminiferi contorti..... | 59 |
| 7.4. | Berechnung des Prozentsatzes der Tubuli mit begonnener/abgeschlossener Lumenbildung..... | 60 |
| 7.5. | Berechnung des Prozentsatzes der Tubuli mit Spermatozyten, Spermatiden und Spermien..... | 60 |
| IV. | ERGEBNISSE..... | 61 |
| 1. | Ergebnisse der makroskopischen Untersuchungen..... | 61 |
| 2. | Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen..... | 61 |
| 2.1. | Hodenkapsel..... | 61 |
| 2.2. | Septulae testis und Lobuli testis..... | 65 |
| 2.3. | Tubuli seminiferi contorti..... | 67 |
| 2.3.1. | Lamina propria..... | 72 |
| 2.3.2. | Keimepithel..... | 74 |
| 2.3.2.1. | Sertoli-Zellen und primitive Stützzellen..... | 75 |
| 2.3.2.2. | Keimzellen und Keimepithelzyklus..... | 78 |
| 2.4. | Intratestikuläre samenableitende Wege..... | 91 |
| 2.4.1. | Terminalsegment..... | 91 |
| 2.4.2. | Tubuli recti..... | 94 |
| 2.4.3. | Mediastinum testis und Rete testis..... | 97 |
| 2.5. | Interstitium..... | 101 |
| 3. | Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen..... | 104 |
| 3.1. | Tubuli seminiferi contorti..... | 104 |
| 3.1.1. | Lamina propria..... | 104 |
| 3.1.2. | Keimepithel..... | 106 |
| 3.1.2.1. | Sertoli-Zellen und primitive Stützzellen..... | 106 |
| 3.1.2.2. | Keimzellen..... | 109 |
| 3.2. | Interstitium..... | 124 |
| 4. | Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen..... | 127 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.1. | D-Glukose bzw. D-Mannose bindende Lektine der Gruppe I..... | 128 |
| 4.1.1. | Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem <i>Canavalia ensiformis</i> Agglutinin (ConA)..... | 128 |
| 4.1.2. | Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem <i>Lens culinaris</i> Agglutinin (LCA)..... | 132 |
| 4.1.3. | Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem <i>Pisum sativum</i> Agglutinin (PSA)..... | 136 |
| 4.2. | D-Galaktose bindende Lektine der Gruppe II..... | 141 |
| 4.2.1. | Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem <i>Ricinus communis</i> Agglutinin I (RCA-I)..... | 141 |
| 4.2.2. | Untersuchung der Bindung von biotinyliertem <i>Viscum album</i> Agglutinin (VAA)..... | 144 |
| 4.2.3. | Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem Peanut Agglutinin (PNA)..... | 146 |
| 4.3. | N-Acetyl-D-glukosamin/N-Acetyl-Neuraminsäure bindende Lektine der Gruppe III..... | 149 |
| 4.3.1. | Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem <i>Triticum vulgare</i> Agglutinin (WGA)..... | 149 |
| 4.3.2. | Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem succinyliertem <i>Triticum vulgare</i> Agglutinin (WGAs)..... | 154 |
| 4.4. | N-Acetyl-D-galaktosamin/D-Galaktose bindende Lektine der Gruppe IV..... | 158 |
| 4.4.1. | Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem <i>Dolichos biflorus</i> Agglutinin (DBA)..... | 158 |
| 4.4.2. | Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem Soybean Agglutinin (SBA)..... | 158 |
| 4.4.3. | Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem <i>Sophora japonica</i> Agglutinin (SJA)..... | 158 |
| 4.4.4. | Untersuchung der Bindung von biotinyliertem <i>Sambucus nigra</i> Agglutinin (SNA)..... | 161 |
| 4.4.5. | Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem <i>Griffonia simplicifolia</i> Agglutinin (GSL-I)..... | 162 |
| 4.5. | L-Fukose bindende Lektine der Gruppe V..... | 165 |
| 4.5.1. | Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem <i>Ulex europaeus</i> Agglutinin (UEA-I)..... | 165 |
| 4.6. | Lektine mit Bindungsstellen für Oligosaccharide der Gruppe VI..... | 166 |
| 4.6.1. | Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem <i>Phaseolus vulgaris</i> erythroagglutinin (PHA-E)..... | 166 |
| 4.6.2. | Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem <i>Phaseolus vulgaris</i> leukoagglutinin (PHA-L)..... | 168 |
| 5. | Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen..... | 170 |
| 5.1. | Expression von " α -smooth muscle actin" (α -SMA)..... | 170 |
| 5.2. | Expression von Zytokeratin 5 (CK 5)..... | 177 |
| 5.3. | Expression von Zytokeratin 8 (CK 8)..... | 182 |
| 5.4. | Expression von Zytokeratin 14 (CK 14)..... | 182 |
| 5.5. | Expression von Zytokeratin 18 (CK 18)..... | 184 |
| 5.6. | Expression von Panzytokeratin..... | 187 |
| 5.7. | Expression von Vimentin..... | 190 |
| 5.8. | Expression von Progesteronrezeptoren..... | 197 |
| V. | DISKUSSION..... | 200 |
| 1. | Diskussion der Ergebnisse der makroskopischen Untersuchungen..... | 200 |

| | | |
|--------------|--|-----|
| 2. | Diskussion der Ergebnisse der licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen | 200 |
| 2.1. | Hodenkapsel..... | 202 |
| 2.2. | Septulae testis und Lobuli testis..... | 206 |
| 2.3 | Tubuli seminiferi contorti..... | 206 |
| 2.3.1. | Lamina propria..... | 210 |
| 2.3.2. | Keimepithel..... | 211 |
| 2.3.2.1. | Primitive Stützzellen und Sertoli-Zellen..... | 211 |
| 2.3.2.2. | Keimzellen und Keimepithelzyklus..... | 214 |
| 2.4. | Intratestikuläre samenableitende Wege..... | 218 |
| 2.4.1. | Terminalsegment..... | 218 |
| 2.4.2. | Tubuli recti..... | 220 |
| 2.4.3. | Mediastinum testis und Rete testis..... | 221 |
| 2.5. | Interstitium..... | 223 |
| 3. | Diskussion der Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen | 228 |
| 4. | Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen | 235 |
| 4.1. | " α -smooth muscle actin" (α -SMA)..... | 236 |
| 4.2. | Zytokeratin 5,8,14 und 18 sowie Panzytokeratin..... | 239 |
| 4.3. | Vimentin..... | 241 |
| 4.4. | Progesteronrezeptoren..... | 244 |
| VI. | ZUSAMMENFASSUNG | 246 |
| VII. | SUMMARY | 250 |
| VIII. | VERZEICHNISSE | 253 |
| 1. | Literaturverzeichnis | 253 |
| 2. | Tabellenverzeichnis | 276 |
| 3. | Bilderverzeichnis | 279 |
| IX. | ANHANG | 284 |
| X. | DANKSAGUNG | 288 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|---|
| A: Akrosom | IGF: Insulin like growth factor |
| ABC-Methode: Avidin-Biotin- Complex-Methode | k.A.: keine Angabe |
| ABP: Androgenbindendes Hormon | KEZ: Keimepithelzyklus |
| aG: akrosomales Granulum | kF: kollagene Fasern |
| AK: Antikörper | L: leptotäne Spermatozyten |
| AMH: Anti-Müller Hormon | Lb: Lamina basalis |
| Aqua dest.: Aqua destillata | LCA: Lens culinaris Agglutinin |
| AS: akrosomales System | LG: Lymphgefäß |
| aV: akrosomale Vakuole | Lp: Lamina propria |
| BG: Blutgefäß | LZ: Leydig-Zellen |
| BGW: Bindegewebe | M: Mediastinum |
| CK: Zytokeratin | MCEMP: mast cell expressed membrane protein |
| ConA: Canavalia ensiformis Agglutinin | mSZ: modifizierte Sertoli-Zellen |
| CR: Chordae retis | MT: Mitochondrien |
| CRF: Corticotropin-releasing factor | mZ: myoide Zellen |
| DAB: 3, 3-Diaminobenzidin | Ncl: Nukleolus |
| DBA: Dolichlorus biflorus Agglutinin | ODF: Outer dense fibres |
| DNS: Deoxyribonukleinsäure | P: pachytäne Spermatozyten |
| eSpd: elongierte Spermatozyten | PAS: Perjodsäure-Schiff-Reaktion |
| eISpd: elongierende Spermatozyten | PBS: Phosphate buffered saline solution |
| ER: Endoplasmatisches Retikulum | p.c.: post coitum |
| F: Fibroblasten | PHA-E: Phaseolus vulgaris erythroagglutinin |
| F-Aktin: Filamentäres Aktin | PHA-L: Phaseolus vulgaris leukoagglutinin |
| FITC: Fluoresceinisothiocyanat | PNA: Arachis hypogea Agglutinin |
| GA: Golgi-Apparat | POMC-mRNA: Proopiomelanocortin- messenger Ribonucleinsäure |
| G-Aktin: Globuläres Aktin | p.p.: post partum |
| GSL-I: Griffonia simplicifolia Agglutinin | pR: perinukleärer Ring |
| HE: Hämalaun-Eosin | PSA: Pisum sativum Agglutinin |
| HK: Hodenkapsel | |
| I: Interstitium | |

| | |
|--|--|
| <p>pZ: proximales Zentriol</p> <p>rSpd: runde Spermide</p> <p>RCA: Ricinus communis</p> <p>RE: Rete testis-Epithel</p> <p>RT: Rete testis</p> <p>s: Standardabweichung</p> <p>s.Tab.: siehe Tabelle</p> <p>SB: Scalebar</p> <p>SBA: Glycine max Agglutinin</p> <p>sER: glattes Endoplasmatisches Retikulum</p> <p>SJA: Sophora japonica Agglutinin</p> <p>SK: synaptonematische Komplexe</p> <p>SMA: Smooth muscle actin</p> <p>SNA: Sambucus nigra Agglutinin</p> | <p>Spg: Spermatogonien</p> <p>Spm: Spermien</p> <p>Spz: Spermatozyten</p> <p>Stz: Stützzellen</p> <p>Sz: Sertoli-Zelle</p> <p>TEM: Transelektronenmikroskop</p> <p>TGF: Transforming growth factor</p> <p>TNF-α: Tumor necrosis factor alpha</p> <p>TR: Tubulus rectus</p> <p>Ts: Tubulus seminifer contortus</p> <p>TS: Terminalsegment</p> <p>UEA-I: Ulex europaeus Agglutinin</p> <p>V: Vakuole</p> <p>VAA: Viscum album Agglutinin</p> <p>WGA: Triticum vulgare Agglutinin</p> <p>WGAs: Triticum vulgare succlinyliert Agglutinin</p> <p>Z: zygotäne Spermatozyten</p> |
|--|--|

I. EINLEITUNG

Alle Kaninchen stammen vom Europäischen Wildkaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) ab. Seit seiner Domestikation im frühen Mittelalter hat das Kaninchen große Bedeutung erlangt (Benecke, 2001). Als Haustier gewann das Kaninchen in den letzten Jahren immer mehr an Beliebtheit: es liegt auf Platz zwei der beliebtesten Heimtiere (Aretz, 2008). Als Masttier ist das Kaninchen weltweit, unter anderem in europäischen Ländern wie Italien und Frankreich, von großer Wichtigkeit (Winkelmann & Lammers, 1996). Als Wolllieferant ist das Angorakaninchen besonders in China weit verbreitet (Winkelmann & Lammers, 1996). Als Versuchstier nimmt das Kaninchen hinter Ratten, Mäusen, Fischen und Vögeln den fünften Platz ein (Tierschutzbericht der Bundesregierung 2011). Trotz der Bedeutung des Kaninchens für die Landwirtschaft und die tierexperimentelle Forschung existiert keine vollständige Darstellung der männlichen Geschlechtsdrüsen des nicht-geschlechtsreifen und geschlechtsreifen Tieres. In den bisherigen histologischen Arbeiten am Kaninchen wurden lediglich Teilaspekte, wie Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen oder myoide Zellen, beleuchtet. In der vorliegenden Arbeit möchte ich mit Hilfe licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine umfassende Beschreibung des Hodens des nicht-geschlechtsreifen sowie des geschlechtsreifen Kaninchens geben und somit die bereits vorliegenden Kenntnisse über die Histologie der Keimdrüsen bei dieser Spezies ergänzen. Darüber hinaus soll mit Hilfe glykohistochemischer Methoden die Charakterisierung und Verteilung von Kohlenhydratstrukturen im geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchenhoden näher beleuchtet werden. Weiter wird mit immunhistochemischen Untersuchungen die Expression von Zytokeratinen, Vimentin, „ α -smooth muscle actin“ (α -SMA) und Progesteronrezeptor beschrieben.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Makroskopische Anatomie des Kaninchenhodens

Die männlichen Geschlechtsorgane bestehen aus den Hoden, den samenreifenden Nebenhoden, den samenführenden Samenleiter, den akzessorischen Geschlechtsdrüsen sowie dem Begattungsorgan (Grau & Walter, 1967). Die Hoden sind paarig angelegt und haben sowohl exokrine wie auch endokrine Aufgaben inne: neben der Vermehrung und Differenzierung von Samenzellen produzieren die Keimdrüsen auch Androgene und verschiedene andere Hormone wie zum Beispiel Inhibin (Aughe & Frye, 2001; Sinowatz, 2001). Die Hoden der Kaninchen befinden sich in der Leistengegend kranial des Penis. Diese Lage weist eine Besonderheit auf, da bei den meisten Tierarten die Hoden kaudal des Begattungsorgan gelegen sind (Hatt & Isenbügel, 2001).



Bild 1: Ein Vertreter der Kaninchenrasse „Grauer Wiener“

2. Pubertät und Geschlechtsreife es männlichen Kaninchens

Der Begriff „Pubertät“ wird in der Literatur unterschiedlich definiert. Aus diesem Grunde divergieren auch die Angaben zum Einsetzen der Pubertät beim Kaninchen zwischen 40 Tagen und 17 Wochen: Autoren wie Mann und Parsons (1947) oder Donovan und van der Werff ten Bosch (1965) verstehen unter Pubertät den Zeitpunkt, an dem die endokrine Aktivität der Hoden eines Tieres erkennbar wird, wie zum Beispiel die Zunahme des Testosteronspiegel im Hoden

und im Blut (Berger et al., 1982). Die Sekretion dieses Hormons setzt etwa ab dem 40. Lebensstag mit dem Auftreten der ausdifferenzierten Leydig-Zellen ein (Chubb et al., 1978; Berger et al., 1982). Andere Wissenschaftler hingegen orientieren sich bei ihrer Definition an der Vermehrung und Differenzierung der Keimzellen: Chemes (2001) sieht den Beginn der Pubertät in einer starken Vermehrung der Spermatogonien und dem Erscheinen der ersten primären Spermatozyten. Die mittelgroße Kaninchenrasse „Weiße Neuseeländer“ zeigen in ihrem histologischen Bild ab der 7. Woche Typ A-Spermatogonien; die ersten präleptotänen Spermatozyten sind ab der 8. Lebenswoche nachzuweisen (Chubb et al., 1978). Asdell (1946) sowie Ewuola und Egbunike (2010) legen den Beginn der Pubertät mit dem Auftreten von Spermien im Ejakulat fest. Bei der kleinen Kaninchenrasse der „Holländer“ ist dies mit 17 Wochen der Fall (Tsunenari & Kast, 1992). Unter dem Begriff „Geschlechtsreife“ verstehen May und Simpson (1975) den Zeitpunkt, an dem ausreichend reife Spermien gebildet werden, um eine Eizelle befruchten zu können. Für große Kaninchenrassen wird als Zeitpunkt der Geschlechtsreife 5-8 Monate angegeben, für mittelgroße Kaninchenrassen 4-6 Monate und für kleine Rassen 4-5 Monaten (Patton, 1994). Allerdings wird die Geschlechtsreife von vielen Faktoren beeinflusst: Ernährung, Licht und Jahreszeit der Geburt (Löhle, 2003) sollen eine nicht unwichtige Rolle spielen: Tiere, die unter Mangelernährung leiden, erreichen die Geschlechtsreife später als Tiere, die optimal mit Nährstoffen versorgt werden; Tiere, die im Frühjahr geboren werden, werden später geschlechtsreif als diejenigen, die im Herbst geboren wurden (Löhle, 2003; García-Tomás et al., 2009a). Piles et al. (2004) führen den Entwicklungsunterschied darauf zurück, dass im heißen Sommer weniger gefressen wird und deshalb die Wachstumsraten bzw. Gewichtszunahmen verringert sind. Quesenberry und Carpenter (2004) geben deshalb an, dass für die Geschlechtsreife weniger das Alter als vielmehr das Gewicht des Tiers ausschlaggebend ist. Laut Frame et al. (1994) existiert keine signifikante Korrelation zwischen Körpergewicht und Reifegrad des Kaninchenhodens. Sie heben jedoch eine starke Korrelation zwischen dem Gewicht des Hodens und dem Entwicklungsstands des Hodens hervor. Dies deckt sich mit Ergebnissen bei anderen Tierarten wie beim Schwein (Schinckel et al., 1983), beim Rind (Curtis & Amann, 1981; Aponte et al., 2005) sowie beim Mensch (Chemes, 2001). Diese Verbindung zwischen dem Gewicht der Keimdrüse und dem Entwicklungsstand konnten aber García-Tomás et al. (2009b) in ihrer Arbeit mit Kaninchen nicht

bestätigen. Neben makroskopischen Messgrößen wie Körpergewicht und Hodengewicht werden auch histologische Parameter zur Beurteilung des Entwicklungsstandes des Hodens herangezogen. Als Kenngrößen dienen dabei der Zeitpunkt der Lumenbildung in den Tubuli seminiferi contorti, das Erscheinen von elongierten Spermatiden sowie Spermien in den Tubuli, die Durchmesser der Tubuli sowie die Anzahl bzw. Größe der Zellen im Interstitium. Die Ergebnisse dieser Arbeiten werden im Rahmen der Besprechung der einzelnen Strukturen des Hodens vorgestellt.

3. Mikroskopische Anatomie des Hodens

3.1. Hodenkapsel

Hoden (sive Testis, Orchis, Didymis) und Nebenhoden der Säuger werden vollständig von einer Organkapsel umgeben. Diese sog. Hodenkapsel besteht aus drei Schichten, nämlich aus der Tunica visceralis, der Tunica albuginea sowie der Tunica vasculosa (Arenas et al., 1997). Die Tunica visceralis (sive Epiorchium), die den inneren Teil der Tunica vaginalis repräsentiert, stellt die äußerste Schicht dar. Sie besteht aus einer einfachen Schicht von mesothelialen Zellen (Leeson & Cookson, 1974). Die mittlere Schicht wird als Tunica albuginea (sive Tunica fibrosa) bezeichnet. Sie kann eine erhebliche Dicke erreichen (Smollich & Michael, 1992) und stellt daher die prominenteste Lage der Organkapsel dar; deshalb wird oftmals die gesamte Hodenkapsel als Tunica albuginea bezeichnet (Davis et al., 1970). Als straffe, bindegewebige Kapsel besteht sie vornehmlich aus kollagenen Fasern mit einigen elastischen Fasern (Wrobel, 1990). Bei sehr vielen Tierarten, unter anderem beim Hund, bei der Katze, der Ratte (Gorgas & Böck, 1974; Leeson & Cookson, 1974), beim Schwein, beim Pferd (Chacon-Arellano & Wooley, 1980) sowie beim Mensch (Langford & Heller, 1973) befinden sich in dieser Schicht kontraktile Zellen in Form von glatten Muskelzellen (Langford & Heller, 1973) und/oder Myofibroblasten (Leeson & Forman, 1981). Auch beim Kaninchen sind hier glatte Muskelzellen lokalisiert (Holstein, 1967; Holstein & Weiss, 1967). Diese sind in zwei Schichten angeordnet, wobei die beiden Lagen senkrecht zueinander verlaufen (Holstein, 1967; Davis et al., 1970). Die dritte Schicht heißt Tunica vasculosa; diese besteht aus lockerem Bindegewebe und führt größere Blutgefäße (Leeson & Cookson, 1974) sowie eine Vielzahl von Lymphgefäßen (Middendorff et al., 2002) und

Nerven (Banks et al., 2006). Sie ist je nach Tierart unterschiedlich ausgebildet: beim Menschen (Arenas et al., 1997), beim Hund und beim Schaf (Banks, 1981) ist sie parenchymseitig lokalisiert; beim Pferd und beim Schwein hingegen ist sie zentral in der Mitte der Tunica albuginea gelegen (Chacon-Arellano & Wooley, 1980).

3.2. Septulae testis und Lobuli testis

Von der Hodenkapsel aus ziehen sog. Septulae testis (sive Trabeculae testis) konvergierend zum Mediastinum (Wrobel, 1990). Sie bestehen vor allem aus kollagenen Fasern (Dellmann & Wrobel, 1987) und enthalten Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven (Montkowski, 1992). Die Septen variieren je nach Tierart in ihrer Dicke und Vollständigkeit: beim Hund und beim Schwein sind die Septen dick und komplett, während sie beim Wiederkäuer und bei der Katze als unauffällig und nicht vollständig beschrieben werden (Dellmann & Wrobel, 1987). Beim Kaninchen verlaufen lediglich dünne Septen in Richtung Mediastinum (Davis et al., 1970). Laut Wrobel (1990) halten die Septulae testis im Zusammenspiel mit der Hodenkapsel und dem Mediastinum das Parenchym des Hodens unter Druck. Die Septen unterteilen auf diese Weise, je nach Tierart mehr oder weniger deutlich, das Hodenparenchym in Läppchen. Diese sog. Lobuli testis sind pyramidenförmig, wobei ihre Spitzen zum Mediastinum hinweisen und ihre Basis an der Hodenkapsel zu finden sind (Wrobel, 1990). Der Mensch besitzt rund 350 Läppchen je Hoden (Welsch, 2010). Die Lobuli testis enthalten ca. ein bis fünf Tubuli seminiferi sowie das intertubuläre Kompartiment (Wrobel, 1990).

3.3. Tubuli seminiferi contorti

Die Tubuli seminiferi contorti (sive gewundene Samenkanälchen, Hodenkanälchen) stellen den exokrinen Teil des Hodens dar: in ihren Wänden erfolgt die Produktion von Spermien (Weyrauch & Smollich, 1998). Die gewundenen Samenkanälchen weisen beim adulten Haustier eine durchschnittliche Länge von 30-80 cm auf. Für den reifen Bullen wird für beide Hoden eine Tubulusgesamtlänge von 7000-8000 m angegeben (Smollich & Michael, 1992). Es lassen sich am Tubulus seminifer contortus zwei Bestandteile, nämlich das Keimepithel und die Lamina propria, unterscheiden. Im Keimepithel wiederum können Sertoli-Zellen und Keimzellen identifiziert werden (Junqueira & Carneiro, 1984). Das gesamte Keimepithel ist avaskulär, so dass die dort

benötigten Wachstumsfaktoren, Nährstoffe oder Hormone per diffusionem in die Hodenkanälchen gelangen oder dort produziert werden müssen (Lejeune et al., 1992). Im Gegensatz zum Lumen des Tubulus rectus weisen die Tubuli seminiferi contorti zum Zeitpunkt der Geburt noch keine Lumina auf (Wrobel et al., 1986). Beim Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ beginnt die Lumenbildung ab der 9. Lebenswoche mit Auftreten der ersten Woche mit Auftreten der ersten Spermatozyten (Gondos et al., 1973).

3.3.1. Lamina propria

Die äußere Umhüllung der Hodenkanälchen wird in der Literatur als Lamina propria (Bustos-Obregón & Holstein, 1973; Wrobel et al., 1979; Dym, 1994; Pinart et al., 2001b; Bergmann, 2005), Tunica propria (Fawcett et al., 1969), Lamina limitans (Liebich, 1993) oder peritubuläres Gewebe (De Kretser et al., 1975; Haider et al., 1999) bezeichnet. Der Aufbau der Lamina propria ist für den adulten Menschen (Bustos-Obregón & Holstein, 1973; De Kretser et al., 1975; Hermo et al., 1977; Davidoff et al., 1990) sowie für verschiedene Tierarten wie Ratte (Clermont, 1958; Lacy & Rotblat, 1960; Leeson & Leeson, 1963), Kaninchen (Leeson & Forman, 1981), Maus (Ross, 1967), Rind (Wrobel et al., 1979), Schaf (Bustos-Obregón & Courrot, 1974), Schwein (Pinart et al., 2001b) sowie Hund (Egger & Witter, 2009) beschrieben worden. Das prinzipielle Organisationsschema ist bei allen Säugern gleich, allerdings tritt je nach Tierart eine Anzahl von Modifikationen auf (Wrobel et al., 1979). Die Lamina propria besteht aus vier aufeinanderfolgenden zellulären und azellulären Schichten (Lacy & Rotblat, 1960; Leeson & Leeson, 1963; Leeson & Forman, 1981). Die Basallamina (sive Lamina basalis) repräsentiert die innerste Schicht. Beim Rind besteht die Basallamina aus sechs bis acht Schichten (Wrobel et al., 1979). Ihr schließt sich als weitere Schicht eine mehr (Ratte: Dym, 1994) oder weniger (Mensch: Hermo et al., 1977) schmale Zone von kollagenen Fasern an. Bei der Maus (Brissie et al., 1975), beim Rind (Wrobel et al., 1979), beim Menschen und beim Rhesus-Affen (Hermo et al., 1977) wurden auch elastische Fasern nachgewiesen. Die oben genannten Schichten werden nach Lacy und Rotblat (1960) zur inneren azellulären Schicht zusammengefasst. Darauf folgt das Stratum myoideum. Nach Lacy und Rotblat (1960) handelt es sich hierbei um die innere zelluläre Schicht. Diese besteht aus einer oder mehreren Lagen von peritubulären Zellen, die bei adulten Säugern, bei Vögeln und bei Reptilien kontraktile

Eigenschaften besitzen (Wrobel et al., 1979). Beim Rind (Wrobel et al., 1979; Wrobel et al., 1988) und beim Menschen (Böck et al., 1972; Holstein et al., 1996) wurden Myofibroblasten identifiziert. Andere Autoren (Fawcett et al., 1969) sprechen von „myoide Zellen“. Das Stratum myoideum kann je nach Tierart aus einer unterschiedlichen Anzahl von kontraktile peritubulären Zellen aufgebaut sein (Maekawa et al., 1996). Dem Stratum myoideum schließt sich eine Lage von kollagenen Fasern an, die nach Lacy und Rotblat (1960) die äußere azelluläre Schicht bilden. Als letzte Schicht folgen ein bis zwei Lagen Fibroblasten, die an das Stroma des intertubulären Kompartiments grenzen. Sie bilden die äußere zelluläre Schicht (Lacy & Rotblat, 1960). Bei der Ratte findet sich eine Lage von Endothelzellen, die die Lymphsinusoide begrenzen (Dym, 1994). Die Lamina propria umgibt nicht nur die gewundenen Hodenkanälchen, sondern auch die Terminalsegmente sowie die Tubuli recti. Der Aufbau folgt hier demselben Prinzip wie am Tubulus seminifer contortus (Wrobel et al., 1979). Die Lamina propria in ihrer Gesamtheit bietet dem Keimepithel eine mechanische Stütze (Leeson & Leeson, 1963). Die Funktionen der myoiden peritubulären Zellen der Lamina propria sind vielfältig. Sie spielen bei einigen Tierarten, unter anderem bei der Ratte, eine wenn auch untergeordnete Rolle in der Blut-Hoden-Schranke: so hält die Schicht von myoiden Zellen größere Moleküle ab, in die Tubuli seminiferi contorti zu gelangen (Dym & Fawcett, 1970; Yazama et al., 1997). Ferner sollen myoide Zellen eine wichtige Aufgabe in dem Weitertransport von Spermien übernehmen: bei Experimenten wurden peristaltische Wellen der Tubuli seminiferi beobachtet (Roosen-Runge, 1951), die die noch immotilen Keimzellen aus dem Tubulus seminifer contortus in Richtung Rete testis weiterbefördern sollen (Clermont, 1958; Lacy & Rotblat, 1960; Leeson & Leeson, 1963; Ross, 1967; Maekawa et al., 1996). Egger und Witter (2009) allerdings sehen weniger den Weitertransport von Spermien als vielmehr das Aufrechterhalten eines bestimmten Hodendrucks als Aufgabe der peritubulären Zellen an. Überdies sollen peritubuläre Zellen der Ratte in vitro in der Lage sein, Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin sowie Typ I- und IV-Kollagen (Skinner et al., 1985) zu produzieren. Ferner deuten in vitro-Versuche mit Ratten darauf hin, dass peritubuläre Zellen im Stande sind, parakrin wirkende Faktoren wie den „peritubular factor that modulates Sertoli cell function“ (P-Mod-S) (Norton & Skinner, 1989) und autokrin wirkende Faktoren wie den „transforming growth factor alpha“ (TGF- α) und den „transforming growth factor beta“ (TGF- β)

herzustellen (Skinner & Moses, 1989; Skinner et al., 1989).

3.3.2 Keimepithel

Das Keimepithel (sive Epithelium spermatogenicum) setzt sich aus den Keimzellen und den Sertoli-Zellen zusammen (Weyrauch & Smollich, 1998).

3.3.2.1. Sertoli-Zellen und primitive Stützzellen

Die Sertoli-Zellen (sive Epitheliocyti sustentantes, Stützzellen, Fußzellen, Nährzellen, Ammenzellen) stellen bei allen Säugetieren den somatischen Zellanteil des Keimepithels dar (Ekstedt et al., 1986). Beim Menschen besteht eine beträchtliche Spannbreite bei der Gesamtanzahl der Sertoli-Zellen (Johnson et al., 1984). Curtis und Amann (1981) geben für einen Stier der Rasse „Holstein“ eine Gesamtzahl von bis zu 9×10^9 Sertoli-Zellen pro Hoden an. Als hochprismatische Epithelzelle durchzieht die Ammenzelle beim adulten Tier das gesamte Keimepithel von der Lamina basalis bis hin zum Tubuluslumen (Jégou, 1992; Welsch, 2010). Sie erreicht eine Höhe von 70-80 μm (Liebich, 1993) und ist damit die größte Zelle des Keimepithels. Sie sitzt der Innenfläche der Lamina basalis der Lamina propria breitbasig auf und verjüngt sich zum Lumen hin (Liebich, 1993). Die Ammenzelle zeigt daher ein pyramidenförmiges Aussehen (Junqueira & Carneiro, 1984). Sie besitzt seitlich und apikal taschenförmige Einbuchtungen, in denen die Keimzellen liegen. Ferner entsendet die Ammenzelle filigrane Zytoplasmafortsätze (Welsch, 2010), die sich zwischen alle Keimzellen schieben und diese meist vollständig umhüllen. Eine Ausnahme bilden Spermatogonien, die der Basalmembran aufsitzen (Sinowatz, 2001). Diese räumliche Anordnung ermöglicht es der Sertoli-Zelle, strukturell bzw. chemisch mit umliegenden Keimzellen zu kommunizieren (Jégou, 1992). Die Nährzelle ändert beständig ihre Form, um sich den Veränderungen und der Wanderung der Keimzellen anzupassen (Russell, 1980). Die adulte Ammenzelle zeigt eine hohe Widerstandskraft gegenüber Hitze und verschiedenen toxischen Stoffe (Dellmann, 1971; Bloom & Fawcett, 1986). Nach der Differenzierung der primitiven Stützzelle zur adulten Sertoli-Zelle proliferiert diese in der Regel nicht mehr (Clermont & Perey, 1957; Steinberger & Steinberger, 1971; Nistal et al., 1982; Sharpe et al., 2003). Unbeantwortet bleibt laut Steinberger und Steinberger (1971) die Frage, ob unter bestimmten Umständen doch eine Teilung einsetzen kann: so wurden beim Rind im fortgeschrittenen Alter Mitosen der Sertoli-Zellen

beobachtet (Wrobel & Sinowatz, 1982).

3.3.2.1.1. Zellkern und Zellorganellen der Sertoli-Zellen

Der Kern einer Sertoli-Zelle liegt meist basal im Epithel (Banks, 1981; Jégou, 1992). Er ist unregelmäßig geformt und von großer Gestalt (Jégou, 1992). Ferner weist er viel Euchromatin auf (Jégou, 1992). Kennzeichnend für den Kern ist der große, auffallende Nukleolus (Ramos & Dym, 1979; Bielańska-Osuchowska & Sysa, 1981). Beim Wiederkäuer handelt es sich dabei um ein vesikuläres Kernkörperchen (Wrobel, 1990). Die deutliche Kernmembran weist mehrere Invaginationen auf (Smollich & Michael, 1992). Beim Rind nehmen die Zellorganellen 30-35% des Zellvolumens ein (Wrobel & Schimmel, 1989). Es kann dabei eine ungleiche Verteilung der Zellorganellen im Zytoplasma beobachtet werden: grundsätzlich liegen im basalen Teil der Sertoli-Zelle eine größere Anzahl von Organellen als in derer verästelten apikalen Anteilen (Junqueira & Carneiro, 1984; De Kretser & Kerr, 1988). Der Golgi-Apparat kann laut Junqueira und Carneiro (1984) sowie Welsch (2010) beim Mensch als umfangreich bezeichnet werden, während er bei Haussäugetieren nach Wrobel und Sinowatz (1982) sowie Smollich und Michael (1992) nur mäßig entwickelt ist. Ferner ist im Zytoplasma eine große Anzahl von Mitochondrien lokalisiert (Dellmann & Wrobel, 1987). Bei sämtlichen Tierarten ist im Zytoplasma eine große Menge von glatten Endoplasmatischem Retikulum (ER) eingelagert. Bei Menschen (Junqueira & Carneiro, 1984), Schweinen (Liebich, 1993) und Rindern (Wrobel & Sinowatz, 1982; Abd-Elmaksoud, 2005) ist auch raues ER in größerer Menge vorhanden (Liebich, 1993). Das Vorhandensein von glattem ER wird als Hinweis gedeutet, dass Sertoli-Zellen Steroide produzieren oder modifizieren können (Dellmann, 1971). Als weitere Organellen befinden sich gut ausgebildete Lysosomen im Zytoplasma der Sertoli-Zelle (Jégou, 1982; Junqueira & Carneiro, 1984). Des Weiteren enthält das Zytoplasma Einschlüsse wie Glykogen (Mensch: Schulze, 1974), Lipidtröpfchen (Makake: Dym, 1973; Ratte: Jégou, 1982; Kerr et al., 1984; Mensch: Nagano, 1966), und Liposofuscin (Hamster: Junqueira & Carneiro, 1984; Mensch: Nagano, 1966). Beim Menschen (Schulze, 1974; Junqueira & Carneiro, 1984) sind im Zytoplasma der Sertoli-Zelle sog. Charcot-Böttcher-Kristalle lokalisiert. Ihre Funktion ist unbekannt (Welsch, 2010).

3.3.2.1.2. Primitive Stützzellen

Die primitiven Stützzellen des fetalen Hodens gehen aus den somatischen Blastemzellen (Strangzellen) hervor (Schnorr & Kressin, 2001). Wie ultrastrukturelle Untersuchungen am postnatalen Hodens zeigten, unterscheiden sich die unreifen Stützzellen von den adulten Sertoli-Zellen (Mensch: Nistal et al., 1982; Ratte: Ramos & Dym, 1979; Rind: Sinowatz & Amselgruber, 1986): der Kern der primitiven Stützzelle des Kalbes weist einen runden bis ovalen Kern auf (Sinowatz & Amselgruber, 1986). Ferner verfügt die undifferenzierte Stützzelle über eine große Menge an rauem ER sowie über einen gut entwickelten Golgi-Apparat (Sinowatz & Amselgruber, 1986). Die beiden Organellen sind laut Nistal et al. (1982) Hauptcharakteristika der unreifen Stützzelle. Dies könnte nach Sinowatz und Amselgruber (1986) auf eine umfangreiche Produktion von Stoffen für die Lamina propria hindeuten, die beim Kalb zu diesem Zeitpunkt gut entwickelt ist. Auch besitzen die undifferenzierten Stützzellen die Fähigkeit zur Mitose. Sharpe et al. (2003) zufolge proliferieren die Stützzellen des Menschen und des Rhesus-Affen zu zwei Zeitpunkten, nämlich fetal/neonatal sowie peripubertal. Bei einigen Tierarten, wie zum Beispiel bei der Ratte, überlappen sich diese beiden Phasen, so dass bei dieser Tierart keine klare Trennung gezogen werden kann. Während der Differenzierungsphase proliferiert die unreife Stützzelle zur adulten Sertoli-Zelle. Beim Kalb erstreckt sich diese über die Präpubertätsphase und die Pubertätsphase (Sinowatz et al., 1983). In der Differenzierungsphase verändert sich die Funktion, Morphologie und biochemische Aktivität der Sertoli-Zelle umfassend (Petersen & Söder, 2006): ultrastrukturelle Untersuchungen am Kalb zeigten, dass sich der Kern der Stützzelle vergrößert und eine elongierte Form besitzt (Sinowatz & Amselgruber, 1986). Die Menge an Heterochromatin nimmt ab, ebenso wie die Menge an rauem ER. Ferner bildet sich der für die adulte Sertoli-Zelle typische Nukleolus aus. Die Anzahl der Mikrofilamente steigt an. Benachbarte Sertoli-Zellen bilden untereinander „tight junctions“ (Zonulae occludentes) aus und formen so einen Teil der Blut-Hoden-Schranke (Sinowatz & Amselgruber, 1986). Mit Übernahme von anderen Aufgaben verändert sich auch die Produktion und Sekretion von Proteinen wie zum Beispiel Anti-Müller Hormon (AMH) (Rajpert-De Meyts et al., 1999).

3.3.2.1.3. Funktion der primitiven Stützzellen und der Sertoli-Zellen

Die undifferenzierte Stützzelle produziert fetal AMH (McLaren, 2000): dieses hat die Funktion, die Ausbildung des Müllerschen Gang zu unterdrücken (Rey, 2005). Beim Menschen konnte eine Produktion von hohen Mengen dieses Hormons bis in die Pubertät nachgewiesen werden (Rey et al., 1996; Rajpert-De Meyts et al., 1999; Grinspon & Rey, 2010). Eventuell ist AMH beim Menschen bei der Transformation von Gonozyten zu Spermatogonien beteiligt (Baker et al., 1990). Auch beim Kalb wird bis zu 6 Wochen postnatal noch AMH produziert (Donahoe et al., 1977). Ferner weisen die primitiven Stützzellen der Ratte bis ihrer Differenzierung zur Sertoli-Zelle eine hohe Aktivität von Aromatase, einem Enzym zur Umwandlung von Steroiden zu Östrogen, auf (Papadopoulos et al., 1986; Carreau et al., 2007). Carreau et al. (2011) sehen in den Stützzellen von unreifen Tieren eine der Hauptquellen für Östrogene. Die Funktionen der adulten Sertoli-Zelle sind äußerst vielfältig (Jégou, 1992). Ziel ist, optimale Verhältnisse für die Spermatogenese zu schaffen (Griswold, 1998). Da eine Sertoli-Zelle nur eine gewisse Zahl von Keimzellen versorgen kann, ist die Anzahl der Sertoli-Zellen für die Menge der täglichen Spermienproduktion mitbestimmend (Berndtson et al., 1987; Orth et al., 1988). Die Anzahl der Keimzellen, die versorgt werden können, variiert je nach Tierart (Sharpe, 1994): nach Thompson und Berndtson (1993) entfallen beim Kaninchen auf eine Sertoli-Zelle 10,99 runde Spermatozoen. Die Sertoli-Zellen schützen und stützen die germinative Zellen, indem sie diese umhüllen (Junqueira & Carneiro, 1984; Pelletier, 2011). Auch verleihen sie dem Keimepithel insgesamt eine Stabilität (Jégou, 1992). Sajonski und Smollich (1972) weisen der Rolle der Sertoli-Zelle als mechanische Stütze aber eine nur geringe Bedeutung zu. Auch sind Sertoli-Zellen fähig, zu einem gewissen Maße die Restkörper der Spermatozoen sowie degenerierte Keimzellen zu phagozytieren und in ihren Lysosomen abzubauen (Junqueira & Carneiro, 1984; Wrobel & Schimmel, 1989; Jégou, 1992; Miething, 1992). Dies ist insofern von Bedeutung, da während der Bildung der Keimzellen mehr als die Hälfte von ihnen der Apoptose anheimfallen. Wie in vivo-Experimente bei Tieren zeigten, sinkt die Anzahl von Spermien im Nebenhoden, nachdem die Phagozytose durch Sertoli-Zellen unterbunden worden ist (Nakanishi & Shiratsuchi, 2004). Weiterhin sind Sertoli-Zellen in der Lage, verschiedene Stoffe, darunter bis zu 100 unterschiedliche Proteine (Bardin et al., 1988), zu produzieren und zu sezernieren. Diese können als autokrine oder parakrine Faktoren wirken

(Lejeune et al., 1992; Mruk & Cheng, 2004a). Hier sind unter anderem der „insulin like growth factor“ (IGF) sowie „transforming growth factor beta“ (TGF- β) zu nennen (Review Lejeune et al., 1998). Weitere Produkte der Sertoli-Zelle stellen das Androgenbindende Protein (ABP) (Hagenäs et al., 1975), Aktivin (Bader, 2001), Inhibin (Sinowatz, 2001), Transferrin, Laminin (Griswold, 1998) und Typ IV-Kollagen (Skinner et al., 1985; Richardson et al., 1995) dar. In den meisten Fällen ist die genaue Rolle der Proteine bei der Spermatogenese unbekannt (Petersen & Söder, 2006). Darüber hinaus wird von den Sertoli-Zellen eine intratubuläre Samenflüssigkeit sezerniert (Liebich, 1993), die für die Ernährung der Keimzellen sowie für den Transport der immotilen Spermien vonnöten ist (Jégou, 1992). Ferner werden in den Sertoli-Zellen in geringen Mengen Steroide hergestellt (Wrobel, 1990). Die im Zytoplasma liegenden Mikrofilamente sowie spezielle Kontaktstrukturen, die zwischen Sertoli-Zellen und Keimzellen ausgebildet sind, haben die Aufgabe, die Keimzellen unterschiedlicher Stadien zum Lumen hin zu bewegen (Junqueira & Carneiro, 1984; Sinowatz, 2001). Auch die Spermiation mit der Freisetzung der Spermien in das Lumen der Tubuli wird von den Sertoli-Zellen mitbewerkstelligt. Außerdem besitzen Sertoli-Zellen Rezeptoren für Androgene und können Stimuli dieser Hormone auf die Keimzellen übertragen (Wrobel & Sinowatz, 1982; Suárez-Quian et al., 1999; Petersen & Söder, 2006). Eine weitere wichtige Aufgabe der Sertoli-Zellen stellt die Bildung der Blut-Hoden-Schranke dar.

3.3.2.2. Blut-Hoden-Schranke

Eine Blut-Hoden-Schranke scheint außer beim Säuger auch bei Vögeln (Osman et al., 1980; Bergmann et al., 1984), bei Reptilien (Baccetti et al., 1983; Bergmann et al., 1984) und bei Fischen (Bergmann et al., 1984) ausgebildet zu sein (Pelletier & Byers, 1992). Nach Meinung von Plöen und Setchell (1992) besteht die Blut-Hoden-Schranke grundsätzlich aus drei Anteilen, nämlich aus dem Endothel der Blutgefäße bzw. der Lymphgefäße des Hodens, den myoiden peritubulären Zellen der Lamina propria sowie der Sertoli-Zell-Barriere. Die Untersuchungen von Fawcett et al. (1969), Dym und Fawcett (1970) sowie Yazama et al. (1997) bestätigen die Rolle der myoiden peritubulären Zellen als Barriere bei der Ratte und beim Meerschweinchen. Für Primaten scheint eine solche jedoch nicht zu bestehen (Dym, 1973; Landon & Pryor, 1981). Die Resultate von Kormanov (1967) sowie Holash et al. (1993) stützen die Bedeutung des Endothels der

Blutgefäße: so ist ab der Pubertät die Diffusion von Farbstoffen aus den Blutgefäßen in das Interstitium verringert bzw. unmöglich (Kormano, 1967). Holash et al. (1993) fanden bei den Endothelzellen des Rattenhodens ähnliche Eigenschaften und Marker wie bei den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke. Dennoch sind laut Setchell und Brooks (1988) die myoiden peritubären Zellen nur von geringer Bedeutung für die Funktion der Blut-Hoden-Schranke. Auch den Endothelzellen der Blutgefäße wird dafür lediglich eine untergeordnete Bedeutung zugesprochen (Setchell & Brooks, 1988), da Serumproteine durch die Endothelzellen diffundieren können (Mancini et al., 1965; Cheng & Mruk, 2009). So stellen also die Sertoli-Zelle mit ihren „tight junctions“ (Zonulae occludentes), die zwischen den Ammenzellen ausgebildet sind, den weitaus wichtigsten morphologischen Teil der Blut-Hoden-Schranke dar (Jégou, 1992). Die Blut-Hoden-Schranke bildet auf diese Weise eine selektive Diffusionsbarriere: während sie für Wasser, Alkohol, Glycerin, Harnstoff und Bikarbonat durchlässig ist (Junqueira & Carneiro, 1984), unterbindet sie die Diffusion von Serumproteine und Cholesterol. Diese Blut-Hoden-Schranke liegt im unteren Drittel des Keimepithels und unterteilt es in zwei Kompartimente, nämlich in ein basales und in ein adluminale Kompartiment (Dym & Fawcett, 1970; Yazama et al., 1991); dadurch werden die unterschiedlich entwickelten Keimzellstadien räumlich getrennt: das basale Kompartiment (unterhalb der Blut-Hoden-Schranke bis Basalmembran der Lamina propria) beinhaltet den basalen Teil der Sertoli-Zellen sowie als germinative Zellen die Spermatogonien und die präleptotänen Spermatozyten I. Ordnung (Dym & Fawcett, 1970). Diese können also in gewissem Maße mit der Umgebung kommunizieren und haben relativ freien Zugang zu Stoffen, die über Blutgefäße herantransportiert werden (Junqueira & Carneiro, 1984; Jégou, 1992; Welsch, 2010). Das adluminale Kompartiment (oberhalb der Blut- Hoden-Schranke bis Lumen) beinhaltet den apikalen Teil der Sertoli-Zellen sowie sekundäre Spermatozyten, Spermatisden und Spermien. Diese germinative Zellen haben nun nicht mehr direkten Zugang zu allen Nährstoffen, Wachstumsfaktoren etc. und sind deshalb von den Sertoli-Zellen abhängig (Junqueira & Carneiro, 1984; Sharpe et al., 2003). Die von den Keimzellen benötigten Stoffe kann die Sertoli-Zelle u. a. durch selektiven Transport oder durch eigene Synthese zur Verfügung stellen (Pelletier & Byers, 1992) und dadurch die Menge der Hormone, Nährstoffe etc. regulieren (Cheng & Mruk, 2009). Um den Übergang der Keimzellen vom basalen in das adluminale

Kompartiment ermöglichen zu können, sind Veränderungen an der Blut-Hoden-Schranke notwendig (Cheng & Mruk, 2009). Russell (1978) erwähnt bei der Ratte ein temporäres Intermediärkompartiment, das als „Durchgangsraum“ für leptotäne Spermatozyten vom basalen in das adluminal Kompartiment fungieren soll. Unter den Keimzellen, die in das adluminal Kompartiment wandern sollen, werden wohl neue „tight junctions“ (Zonulae occludentes) geschlossen, bevor die Verbindungen oberhalb der Keimzellen geöffnet werden (Wrobel, 1990). Es ist somit zu jeder Zeit eine Blut-Hoden-Schranke gegeben (Wrobel & Sinowatz, 1982; Cheng & Mruk, 2009). Die Blut-Hoden-Schranke hat die Funktion inne, optimale Voraussetzungen für die Meiose im adluminalen Kompartiment zu schaffen (Setchell & Brooks, 1988). So obliegt ihr die Aufgabe, die empfindlichen Keimzellen des adluminalen Kompartiments vor schädigenden Substanzen wie zum Beispiel Toxinen zu bewahren (Su et al., 2011). Ferner wird durch die Kontrolle der Stoffe, die in das abgeschlossene adluminal Kompartiment gelangen, ein geeignetes, konstantes Milieu zur Spermiogenese geschaffen (Su et al., 2011). Auch sollen die germinativen Zellen des adluminalen Kompartiments vor Autoimmunreaktionen geschützt werden (Cheng & Mruk, 2009; Su et al., 2011), da Antikörper als Reaktion auf postmeiotisch entstandene, spezifische Proteine der Keimzellen gebildet werden. So wurden beim Kaninchen auf primäre Spermatozyten im pachytänen Stadium Auto- und Isoantigene gefunden (O’Rand & Romrell, 1977). Diese immunologische Aufgabe der Blut-Hoden-Schranke wird von einigen Autoren eingeschränkt (Yule et al., 1988; Pelletier, 2011): so identifizierten Yule et al. (1988) auch auf den Keimzellen im basalen Kompartiment außerhalb der Blut-Hoden-Schranke der Sertoli-Zellen Antigene, die eine Autoimmunreaktion auslösen könnten. Beim Nerz, einem saisonal zyklischen Tier, tritt bei einer vorübergehender durchlässigen Blut-Hoden-Schranke während der Sexualruhe keine Autoimmunreaktion von größeren Ausmaß und Schaden auf (Pelletier, 1986). Die Bildung der Blut-Hoden-Schranke findet beim Kaninchen, wie auch bei anderen Tierarten, postnatal statt (Gondos & Connell, 1978). In einer Untersuchung von Sun und Gondos (1986) mit „Weißen Neuseeländern“ wurde eine Blut-Hoden-Schranke ab der 10. Lebenswoche nachgewiesen. Zeitgleich konnten pachytäne Spermatozyten identifiziert werden (Sun & Gondos, 1986). Laut Sun und Gondos (1986) scheint eine Blut-Hoden-Schranke nicht für den Beginn, aber für den kompletten physiologischen Ablauf der Spermatogenese wichtig zu sein. Auch beim Kalb fällt die Ausbildung der

Blut-Hoden-Schranke mit dem erstmaligen Auftreten von pachytänen Spermatozyten zusammen (Curtis & Amann, 1981). Beim Nerz hingegen ist vermutlich die Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke unabhängig vom Auftreten bestimmter Keimzelltypen (Pelletier, 1986).

3.3.2.3. Keimzellen und Spermatogenese

Die Keimzellen (Cellulae spermatogenicae) liegen zwischen den Sertoli-Zellen im Keimepithel des Tubulus seminifer contortus. Sie durchlaufen mehrere Vermehrungs- und Reifungsphasen, so dass Spermatogonien, Spermatozyten I. Ordnung (primäre Spermatozyten), Spermatozyten II. Ordnung (sekundäre Spermatozyten), Spermatiden sowie Spermien (Spermatozoen; Samenzellen) unterschieden werden müssen (Welsch, 2010). Der gesamte Prozess der Keimzellproliferation und Keimzelldifferentiation im Keimepithel des Tubulus seminifer contortus wird als Spermatogenese bezeichnet (Liebich, 1993). Dabei können drei Abschnitte unterschieden werden, nämlich die Spermatozytogenese (Vermehrungsperiode) mit Bildung der Spermatozyten aus Spermatogonien durch Mitosen, die Meiose (Reifungsperiode) mit Reifeteilungen der Spermatozyten zur Erlangung von Spermatiden mit reduziertem Chromosomensatz sowie die Spermio-genese (Spermiohistogenese; Differentiationsperiode) mit der Transformation der Spermatiden zu Spermien (Peterson et al., 1992; Sinowatz, 2000c; Welsch, 2010).

3.3.2.3.1. Spermatozytogenese und Spermatogonien

Diese Phase umfasst die mitotischen Teilungen der Spermatogonien bis zur Entstehung der primären Spermatozyten. Durch die mitotische Teilung der Spermatogonien, den sog. Stammzellen, entstehen zwei Tochterzellen. Eine dieser Tochterzellen bleibt inaktiv als zukünftige Stammzelle zurück. Die zweite Tochterzelle teilt sich mehrmals mitotisch. Die Anzahl der Teilungen ist ebenso wie die Nomenklatur der einzelnen Teilungsschritte je nach Tierart unterschiedlich (Dellmann & Wrobel, 1987; Liebich, 1993). Dabei liegen für das Kaninchen unterschiedliche Angaben vor: während Blanco-Rodríguez (2002) sechs Teilungen erwähnt, geben Swierstra und Foote (1963) lediglich fünf Teilungen an. Die Spermatozytogenese findet im basalem Kompartiment statt (Wrobel et al., 1995a). Es können unterschiedliche Typen von Spermatogonien identifiziert werden: bei den meisten Säugetieren, u.a. beim Rind (Wrobel et al.,

1995a), bei der Ratte (Leblond & Clermont, 1952), bei der Maus (Abou-Haila & Tulsiani, 2000), beim Hund (Ibach et al., 1976) und beim Kaninchen (Swierstra & Foote, 1963), werden A-, B- und In-Spermatogonien unterschieden. Sie divergieren in ihrer Struktur, ihrem Volumen und in ihrer Lage zur Wand des Tubulus seminifer contortus (Nicander & Plöen, 1969; Liebich, 1993). Allen ist ein diploider Chromosomensatz gemeinsam (Wrobel, 1990). Die A-Spermatogonien stellen die Stammzellen der Keimzellen dar (Rüsse & Sinowatz, 1998). Die A-Spermatogonie ist von runder oder ovaler Gestalt (Dellmann, 1971). Ihr großer Kern ist beim Haussäugetier ellipsoid und weist nur wenig Heterochromatin auf. Gelegentlich können mehrere Nukleoli beobachtet werden. Das Zytoplasma beheimatet nur wenige Organellen (Liebich, 1993). In-Spermatogonien (Intermediärspermatogonien) sind kleiner als A-Spermatogonien und besitzen im Gegensatz zu ihren Vorgängern einen kleineren und dichteren Kern von ovaler Form (Banks, 1981; Liebich, 1993). Ihre Gestalt ist oval bis rund (Dellmann, 1971). Das Chromatin ist von grobkörnigem Charakter (Liebich, 1993). Auch sie besitzen zwei bis drei Nukleoli (Banks, 1981). B-Spermatogonien verlieren den Kontakt zur Lamina propria (Liebich, 1993). Sie weisen eine birnenförmige oder runde Gestalt auf und sind von geringer Größe (Banks, 1981). Das Chromatin im Kern, der kleiner ist als der der In-Spermatogonien (Wrobel et al., 1995a), verdichtet sich weiter (Liebich, 1993). In der Regel ist nur ein zentral gelegener Nukleolus zu beobachten (Liebich, 1993; Sinowatz, 2000c).

3.3.2.3.2. Meiose und Spermatozyten

In dieser Phase entstehen in einer Reduktionsteilung und einer anschließenden Äquationsteilung aus einer diploiden Zelle mit einem DNS-Gehalt von $4n$ (primäre Spermatozyte) vier haploide Zellen mit einem DNS-Gehalt von $1n$ (runde Spermatozyte). Nach ihrer Entstehung aus B-Spermatogonien verdoppeln die primären Spermatozyten ihren DNS-Gehalt, so dass sie zu Beginn der ersten Reifeteilung einen DNS-Gehalt von $4n$ aufweisen (Sinowatz, 2000c). Die Meiose kann in die Stadien Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase unterteilt werden. Die Prophase wiederum umfasst die Stadien Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese (Welsch, 2010). Im Leptotän werden die 44 Chromosomen des Kaninchens (Painter, 1926) durch Spiralisierung als lange, dünne Fäden sichtbar (Wrobel, 1990). Die Keimzellen befinden sich zu diesem Zeitpunkt bereits im adluminalen Kompartiment der Blut-Hoden-Schranke (Dym

& Fawcett, 1970). Im Zygotän beginnen sich die homologen Chromosome zu paaren; dabei werden sie durch einen synaptonemalen Komplex zusammengehalten. Im Pachytän ist die Paarung der homologen Chromosomen abgeschlossen und es kann eine zunehmende Verkürzung und Verdickung der Chromosomen beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt der Austausch von genetischem Material zwischen den homologen Chromosomen. In der Phase des Diplotän trennen sich die homologen Chromosomen wieder. Im letzten Abschnitt der Prophase, der Diakinese, löst sich die Kernmembran auf. Die homologen Chromosomen, die sich in der Metaphase in der Äquatorialebene angeordnet haben, werden in der Anaphase auf zwei Tochterzellen aufgeteilt. Diese weisen daher nur einen haploiden Chromosomensatz auf (Reduktionsteilung) (Wrobel, 1990; Sinowatz, 2000c). Im Gegensatz zu der Metaphase, Anaphase und Telophase, die sehr schnell verlaufen, stellt die Prophase eine sehr lang andauernde und komplizierte Phase dar; beim Mensch erstreckt sie sich über 22-24 Tage (Sinowatz, 2000c). Für das Kaninchen werden 16,5 Tage veranschlagt (Swierstra & Foote, 1965). Resultat der ersten Reifeteilung sind die sekundäre Spermatozyten. Sie besitzen einen haploiden Chromosomensatz und einen DNS-Gehalt von $2n$. Die sekundären Spermatozyten werden ohne vorherige Verdopplung der DNS sehr schnell einer zweiten Reifeteilung unterzogen (Wrobel, 1990; Sinowatz, 2000c). Laut Banks (1981) beträgt die Verweildauer lediglich wenige Minuten bis zu einer Stunde. Sekundäre Spermatozyten sind daher nur selten im Präparat zu identifizieren (Liebich, 1993). Die zweite Meiose stellt eine Äquationsteilung dar: dabei werden die beiden Chromatiden der Chromosomen getrennt und zufällig auf die Tochterzellen verteilt. Dadurch entstehen runde Spermatiden mit einem haploiden Chromosomensatz und einem DNS-Gehalt von $1n$. Diese Spermatiden stellen den Ausgangspunkt der Spermiogenese dar (Welsch, 2010).

3.3.2.3.3. Spermiogenese und Spermatiden/Spermien

In dieser Phase finden keine weiteren Teilungen statt; stattdessen wandeln sich die Spermatiden zu hoch differenzierten und spezialisierten Spermien (Sinowatz, 2001). Swierstra und Foote (1965) geben für das Kaninchen eine Dauer der Spermiogenese von knapp 26 Tagen an. Die Spermiogenese wird je nach Tierart in unterschiedliche viele Stadien unterteilt; so nennt Plöen (1971) beim Kaninchen zehn Schritte, Courtens (1992) hingegen 15 Schritte. Die Spermiogenese der

Maus wird von Oakberg (1956) in 16 Schritten beschrieben. Beim Rind wird sie von Sinowatz und Wrobel (1981) in 15 Schritte unterteilt. Vereinfacht und tierartlich übergreifend können vier Abschnitte unterschieden werden, nämlich Golgi-Phase, Kappenphase, Akrosomenphase und Reifungsphase (Leblond & Clermont, 1952; Clermont & Leblond, 1955). In der Golgi-Phase produziert der Golgi-Apparat glykoproteinreiche Vesikel. Diese lösen sich vom Golgi-Apparat ab und verschmelzen an einem der Kernpole zu einer akrosomalen Vakuole. (Liebich, 1993; Sinowatz, 2001). In der Kappenphase verdichtet sich der Inhalt der akrosomalen Vakuole zu einem akrosomalen Granulum. Sie flacht sich ab und legt sich um den Kern. Es entwickelt sich eine Akrosomenkappe. Der Hauptanteil des Zytoplasmas inklusive der Organellen wird zu dem Pol transportiert, der dem Akrosom gegenüber liegt (Liebich, 1993; Sinowatz, 2001). In der Akrosomenphase flachen der Zelleib sowie der Zellkern ab. Der Kern erhält damit eine elongierte Gestalt. Die Akrosomenkappe wird endgültig zum Akrosom, das den Kern zu zwei Drittel bedeckt. Das Chromatin kondensiert weiter von apikal nach distal (Liebich, 1993; Sinowatz, 2001). Auch die DNS verdichtet sich stark, indem sie lysinreiche gegen argininreiche Histone austauschen (Dellmann & Wrobel, 1987). Der Geißelapparat entwickelt sich im Halsbereich der Spermatide aus dem distalen Zentriol. In der Nähe des proximalen Zentriols entsteht der Schlußring (Anulus) (Wrobel, 1990; Liebich, 1993). In der Reifungsphase werden die Kondensation des Chromatins und die Formung des Akrosom zum Abschluss gebracht. Der Hauptanteil des Zytoplasmas mit Golgi-Apparat, Lipidtropfen, vielen Mitochondrien wird abgeschnürt und als Restkörper (Residualkörper) abgestoßen (Liebich, 1993; Sinowatz, 2001). Laut Russell (1979) hat die Zelle bereits vor der Reifungsphase wohl durch die Ausbildung von sog. „apical tubulobulbar complexes“ einen Teil des überschüssigen Zytoplasmas abgegeben. Je nach Tierart werden die Residualkörper unterschiedlich eliminiert: sie können von den Sertoli-Zellen phagozytiert werden oder gehen wie beim Büffel (Pawar & Wrobel, 1991) oder Rind (Wrobel & Schimmel, 1989) in schnelle Autolyse über. Beim Menschen werden sie in das Lumen abgegeben (Breucker et al., 1985). Der Schlußring bewegt sich an das Ende des Mittelstücks. Der Geißelapparat wird fertiggestellt. Ferner werden die Zytoplasmabrücken zwischen den Zellen aufgelöst (Wrobel, 1990; Liebich, 1993; Rüsse & Sinowatz, 1998). Die Spermiogenese ist damit beendet. Das Endprodukt der Spermiogenese kann in das Lumen des Tubulus

seminifer contortus abgegeben werden und wird als „Spermium“ bezeichnet (De Kretser & Kerr, 1988). Die Gestalt und Größe des Spermiums schwankt je nach Tierart (Wrobel, 1990; Smollich & Michael, 1992). Auch wenn während der anschließenden Nebenhodenpassage unter anderem die Form und Größe des Spermienkopfs bzw. des Akrosoms leicht verändert wird (Bedford, 1965; Bedford & Nicander, 1971; Pérez-Sánchez et al., 1998), so bleibt der Grundaufbau des Spermiums des Hodens, des Nebenhodens sowie der ejakulierten Spermien aber identisch (Wrobel, 1990). Ein Spermium besteht aus einem Kopf (Caput) und einem Schwanz (Flagellum). Bei den Haussäugetieren finden sich Unterschiede in der Ausformung des Kopfes des Spermiums und des Akrosoms (Fawcett, 1970; Fawcett et al., 1971). Das Akrosom bedeckt den Kopf des Spermiums zu zwei Dritteln. Derjenige Teil des Kopfes, der nicht vom Akrosom bedeckt wird, wird von der postakrosomalen Scheide umhüllt. Das Akrosom fasst eine Reihe von Enzyme wie Akrosin, Hyaluronidase, saure Hydrolasen und Esterase, die für die Penetration der Eihüllen der Eizelle (Corona radiata und Zona pellucida) und somit auch für die Befruchtung mitverantwortlich sind (Sinowatz, 2000c). Der Zellkern beinhaltet einen haploiden Chromosomensatz mit einem DNS-Gehalt von $1n$. Die Basalplatte stellt den Übergang vom Kopf zum Schwanz dar (Sinowatz, 2001). Letztere setzt sich aus dem Hals-, Mittel-, Haupt- und Endstück zusammen. Der Hals des Spermiums (Pars conjugens) ist ein bewegliches Teilstück, das den Kopf mit dem Mittelstück verbindet (Liebich, 1993). Der Hals setzt sich aus glykoproteinreichen Segmenten, den sog. Streifenkörpern, zusammen (Liebich, 1993; Welsch, 2010). Hier liegt das proximale Zentriol, das bei der Befruchtung der Eizelle, die kein Zentriol besitzt, an diese weitergegeben wird (Sinowatz, 2001). Am Streifenkörper beginnen die Mantelfasern (ODF Outer dense fibres), die einen Teil des Geißelapparats bilden. Letzterer besteht aus einem Achsenfaden (Axonema) mit einem zentralen Tubuluspaar und 9 äußeren Doppeltubuli, die das zentrale Tubuluspaar umgeben ($9 \times 2 + 2$ Struktur). Während das zentrale Paar getrennt ist, verschmelzen die Doppeltubuli zum Teil miteinander. Sie sind miteinander durch Dynein-Arme verbunden. Um die neun Doppeltubuli verlaufen neun dichte Mantelfasern in Längsrichtung. Der Geißelapparat befähigt das Spermium zur Eigenbewegung: indem die Doppeltubuli gegeneinander verschoben werden, entsteht eine schraubenförmige Wellenbewegung des Schwanzes (Rovan, 2001; Sinowatz, 2001). Das Mittelstück (Pars intermediata) beinhaltet den Achsenfaden und Mantelfasern des

Geißelapparats. Die Mitochondrien, die für die Energiebereitstellung der Motilität verantwortlich sind, ordnen sich spiralig um das Axonema an. Der Schlussring bildet die Grenze zum darauffolgenden Abschnitt des Spermiums. Dieser verhindert die Passage von Mitochondrien in den darauffolgenden Abschnitt (Sinowatz, 2001). Das Hauptstück (Pars principalis) besitzt eine Vielzahl von Ringfasern, die die Mantelfasern und den Achsenfaden umgeben (Welsch, 2010). Im Endstück wird das Axonema nur noch von der Zellmembran umschlossen und spaltet sich in mehrere Mikrotubuli auf (Rüsse & Sinowatz, 1998).

3.3.2.3.4. Spermiation und Transport der Spermien

Spermiation nennt man den Prozess der Freisetzung der Spermien, die an Sertoli-Zellen gebunden sind, in das Lumen der Tubuli seminiferi contorti. Die Spermiation stellt einen komplexen Prozess dar und dauert bei der Ratte ca. 82 h (O'Donnell et al., 2011). Sie wird von den Sertoli-Zellen mitbewerkstelligt. Es gibt zwei mögliche Varianten: zum einen ist es möglich, dass durch aktive Bewegungen und Kontraktionen der Sertoli-Zellen die Samenzellen freigegeben werden; zum anderen könnte es durch den Abbau der Sertoli-Keimzell-Verbindung zur Freisetzung der Spermien kommen (Wrobel & Sinowatz, 1982; O'Donnell et al., 2011). Die Regulation und Koordination der Freisetzung der Spermien ist nicht vollständig geklärt (Yan et al., 2008; O'Donnell et al., 2011). Nach der Spermiation werden die Keimzellen vom Tubulus seminifer contortus über den Tubulus rectus zum Rete testis transportiert. Von dort aus gelangen die Spermatozoon über die Ductuli efferentes und den Ductus epididymidis zum Nebenhodenschwanz (Jégou, 1992; Liebich, 1993). Sinowatz (2001) gibt für die Dauer des Transports vom Rete testis zum Nebenhodenschwanz je nach Tierart zwischen 7 und 14 Tage an. Im Nebenhoden geschehen weitere Reifungsprozesse, die erst das Spermium motil und befruchtungsfähig werden lassen (Rüsse & Sinowatz, 1998). Diese Nebenhodenpassage beträgt beim Kaninchen 9-10 Tage (Amann et al., 1965; Orgebin-Crist, 1965).

3.3.2.3.5 Entwicklung der Keimzellen

In der Keimzellentwicklung können folgende Zellen unterschieden werden: Primordialkeimzellen, Präspmatogonien sowie Spermato gonien (Rüsse & Sinowatz, 1998). Beim Kaninchen entwickeln sich die Präspmatogonien aus den Primordialkeimzellen (Urkeimzellen, Gonozyten, Urgeschlechtszellen) (Rüsse &

Sinowatz, 1998) zwischen dem 26. und 31. Tag post coitum (p.c.) (Gondos & Conner, 1973). Sie ordnen sich zur Ende der Trächtigkeit (31. Tag p.c.) in der Peripherie der primitiven Hodenkanälchen an (Gondos & Conner, 1973; Gondos et al., 1973). Im Gegensatz zur Eizelle tritt die PräspERMATOGONIE im primitiven Hodenkanälchen nicht in die Reifeteilung ein. Dies ist vermutlich auf Meiose-hemmende Stoffe zurückzuführen (Hayashi et al., 2000). Es wird diskutiert, ob diese Substanz von den primitiven Stützzellen produziert wird (Müller & Skakkebak, 1992; Griswold, 1998; McLaren, 2000). Gondos et al. (1973) setzen den Beginn der Spermatogenese in den Hodentubuli der „Weißen Neuseeländer“ bei 7 bis 8 Lebenswochen an. Am Ende der 7. Lebenswoche sind Spermatogonien vom Typ A und B zu identifizieren; 1 Woche später sind die ersten primären Spermatozyten erkennbar. Die erste Spermiation erfolgt in dieser Untersuchung am Ende der 14. Lebenswoche. Die Dauer dieses ersten Spermatogenese-Zyklus ist vergleichbar mit der des erwachsenen Tieres (Gondos et al., 1973).

3.3.2.3.6. Kinetik der Spermatogenese und Keimepithelzyklus

Die Spermatogenese vom Beginn der Mitose der Spermatogonie bis zur Spermiation, dauert je nach Tierart unterschiedlich lang: beim Rind werden 52-54 Tage (Liebich, 1993; Sinowatz, 2001) veranschlagt, beim Schaf 49-52 Tage (Liebich, 1993; Sinowatz, 2001), beim Pferd ca. 49 Tage (Liebich, 1993), beim Schwein ca. 34 Tage (Sinowatz, 2001) und beim Kaninchen durchschnittlich 43,6 Tage (Swierstra & Foote, 1965). Beim Menschen umfasst die Spermatogenese 74 Tage (Sinowatz, 2000c). Vom Spermatogenese-Zyklus muss der Keimepithelzyklus abgegrenzt werden. Er ist definiert als „vollständiger Ablauf einer Serie typischer Zellbilder an einer bestimmten Stelle des Tubulus bis zur nächsten gleichen Zellgemeinschaft“ (Cole & Cupps, 1977). Dieser Keimepithelzyklus umfasst beim Rind 13,5 Tage, beim Schaf 10,5 Tage und beim Schwein 8,5 Tage (zitiert nach Monesi, 1976 in Smollich & Michael, 1992). Für das Kaninchen wurden 10,7 Tage (Amann et al., 1965), 10,9 (Swierstra & Foote, 1965) bzw. 11,2 Tage (Orgebin-Crist, 1965) ermittelt. Um den Keimepithelzyklus weiter unterteilen zu können, werden unterschiedliche Methoden angewendet: Leblond & Clermont (1952) beschreiben mittels der Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Färbung) nach McManus die Entstehung der Akrosomen während der Differenzierung der Spermatozyten und nutzen die einzelnen Entwicklungsschritte zur Unterteilung des Keimepithelzyklus. Daher beginnt ihr Keimepithelzyklus mit

dem Auftreten von Spermatiden. Die Anzahl der Phasen variieren je Tierart: Leblond und Clermont (1952) beschreiben bei der Ratte 19 Stadien, während Oakberg (1956) bei der Maus 16 Stadien definiert. Roosen-Runge und Giesel (1950) sowie Ortavant (1959; zitiert nach Ortavant et al., 1969) hingegen orientieren sich nach den Stadien der Meiose, der Form der Spermatidenkerne, der Lage der Spermatiden bzw. Spermien sowie der Spermiation, um verschiedene Phasen des Keimepithelzyklus beschreiben zu können. Sie beginnen ihren Zyklus mit dem Ende der Spermiation. Auf diese Weise bestimmen sie folgende acht Phasen: Phase I erstreckt sich vom Ende der Spermiation bis zum Beginn der Elongation der Spermatiden der nächsten Generation. Phase II erstreckt sich vom Beginn der Elongation der Spermatiden bis zum Ende Elongation Spermatiden. Phase III erstreckt sich vom Ende der Spermatidenverlängerung bis zum Beginn der ersten Reifeteilung. Phase IV umfasst die Bildung der charakteristischen Kopfform der Spermatiden sowie den Beginn der ersten Reifeteilung bis Ende der zweiten Reifeteilung der neuen Generation. Phase V erstreckt sich vom Ende der zweiten Reifeteilung bis zum Auftreten der neuen Generation von rundkernigen Spermatiden, deren Kerne staubartiges Chromatin aufweist. Phase VI erstreckt sich vom Auftreten der rundkernigen Spermatiden mit staubartigem Chromatin bis zum Beginn der Verlagerung der elongierten Spermatiden Richtung Lumen. Phase VII umfasst die Verlagerung der elongierten Spermatiden Richtung Lumen. Phase VIII beschreibt die ausdifferenzierten Spermien, die saumartig das Lumen des Tubulus seminifer contortus umgeben. Laut Onyango et al. (2000) wird das Klassifikationssystem auf Basis der Akrosomenentwicklung vor allem bei Labornagern angewendet (Leblond & Clermont, 1952; Oakberg, 1956), während die zweite oben beschriebene Methode nach Roosen-Runge und Giesel (1950) sowie Ortavant (1959, zitiert nach Ortavant et al., 1969) sehr oft bei Haussäugetieren Anwendung findet. Beim Menschen und bei einigen Primaten sind an einem Tubulusquerschnitt verschiedene Stadien des Keimepithelzyklus zu sehen (Clermont, 1963), während beim Haussäugetier der gesamte Tubulusquerschnitt nur eine einzige Phase aufweist (Ortavant et al., 1969; Swierstra et al., 1974).

3.4. Intratestikuläre spermienableitende Wege

Das intratestikuläre, spermienableitende System besteht aus Kanälen, die für den Weitertransport der noch unbeweglichen Spermien aus den Tubuli seminiferi in

den Nebenhodengang zuständig sind. Es setzt sich aus den Terminalsegmenten, den Tubuli recti sowie den Ductuli efferentes zusammen. Neben dem Transport der Spermien zum Nebenhoden erfüllt es darüber hinaus auch Absorption- und Sekretionsaufgaben (Wrobel et al., 1978; Smollich & Michael, 1992).

3.4.1. Terminalsegment

Der Übergang eines Tubulus seminifer contortus in einen Tubulus rectus wird als Terminalsegment (Fawcett & Dym, 1974; Osman, 1979; Wrobel et al., 1982; Ezeasor, 1986), „transitional zone“ (Dym, 1974; Nykänen, 1979; Lindner & Holstein, 1982) oder „intermediate region“ (Perey et al., 1961) bezeichnet. Für einige Tiere liegen Beschreibungen des Terminalsegments vor, u. a. für das Rind (Wrobel et al., 1978; Osman & Plöen, 1979; Wrobel et al., 1982; Wrobel & Sinowatz, 1982), für den Hamster (Cavicchia & Burgos, 1977), für das Kaninchen (Osman, 1979), für den Makaken (Dym, 1974), für die Katze (Murakami et al., 1988), für die Westafrikanische Zwergziege (Ezeasor, 1986), für die Ratte (Nykänen, 1979; Hermo & Dworkin, 1988), für das Schaf (Osman & Plöen, 1979) für die Ziege (Osman & Plöen, 1979) und für das Schwein (Osman, 1978). Im Terminalsegment verringern sich allmählich der Durchmesser und das Lumen des Tubulus seminifer contortus (Wrobel & Sinowatz, 1982). Kennzeichnend für dieses Segment sind hochprismatische Epithelzellen, die modifizierte Sertoli-Zellen (Dym, 1974; Osman, 1978, 1979; Osman & Plöen, 1979; Lindner & Holstein, 1982) oder transitionale Zellen (Hermo & Dworkin, 1988) genannt werden. Wrobel et al. (1978, 1982) unterteilen das Terminalsegment des Bullen in drei Abschnitte, nämlich in Übergangsregion, Mittelabschnitt und terminaler Pfropf: während in der Übergangsregion „normale“ Sertoli-Zellen beobachtet werden können, ist der Mittelabschnitt sowie der terminale Pfropf gekennzeichnet durch modifizierte Sertoli-Zellen. Die Längsachsen dieser Zellen neigen sich im Verlauf des Terminalsegments in Richtung des Tubulus rectus, so dass eine Zytoplasmaprotrusion ohne permanentes Lumen geformt wird. Dieser Zellpfropf ragt in das Lumen des Tubulus rectus hinein (Wrobel et al., 1978, 1982). Laut Osman (1979) liegen beim Kaninchen in der Mehrzahl der Fälle keine Zytoplasmaprotrusion und kein terminaler Pfropf vor. Zwischen den Sertoli-Zellen sind lediglich Spermatogonien und Spermatozyten lokalisiert; eine vollständige Spermatogenese findet im Terminalsegment nicht mehr statt (Osman, 1978; Wrobel & Sinowatz, 1982; Wrobel et al., 1982). Die modifizierten

Sertoli-Zellen haben mehrere Funktionen zu erfüllen: beim Makaken (Dym, 1974), beim Kaninchen (Osman, 1979), bei der Katze (Murakami et al., 1988), beim Rind (Wrobel et al., 1982), bei der Ratte (Nykänen 1979) und beim Schwein (Osman, 1978) beteiligen sie sich an der Phagozytose von abnormen oder geschädigten Spermien. Ferner soll der terminale Pfropf den Rückfluss von Spermien und Flüssigkeit aus dem Rete testis bzw. Tubuli recti verhindern (Perey et al. 1961; Roosen-Runge, 1961; Cavicchia & Burgos, 1977; Wrobel et al., 1978, 1982; Ezeasor, 1986). Dem widersprechen allerdings Setchell und Waites (1971), Tuck et al. (1970), sowie Nykänen und Kormano (1978): laut Tuck et al. (1970) konnte trotz des terminalen Pfropfes ein Rückfluss von Flüssigkeit aus dem Rete in die Tubuli seminiferi contorti beobachtet werden. Ferner erwägen Wrobel et al. (1982) die Möglichkeit, dass der terminale Pfropf den Binnendruck in den Tubuli seminiferi contorti reguliert. In den modifizierten Sertoli-Zellen des terminalen Pfropfes des Makaken liegen Lymphozyten (Dym, 1974), während in dem von Ratten Makrophagen lokalisiert sind, die an der Phagozytose der Spermien beteiligt sind (Nykänen, 1979). Außen liegen dem Terminalsegment ein Gefäßgeflecht sowie Leydig-Zellen an. Ferner befinden sich beim Hamster (Cavicchia & Burgos, 1977) und beim Rind (Wrobel & Sinowatz, 1982) am Übergang vom Tubulus seminifer contortus zum Tubulus rectus kontraktile Zellen. Bei Rindern (Wrobel et al., 1979), Westafrikanischer Zwergziegen (Ezeasor, 1986) und Schweinen (Osman, 1978) ist die Sertoli-Sertoli-Zellverbindung spätestens im terminalen Pfropf aufgehoben.

3.4.2. Tubuli recti

Die Tubuli recti (sive gerade Hodenkanälchen) stellen die Verbindung zwischen dem Terminalsegment und dem Rete testis dar (Fawcett & Dym, 1974; Cavicchia & Burgos, 1977; Osman & Plöen, 1978; Wrobel et al., 1978). Eine Beschreibung dieser Struktur liegt für das Rind (Osman & Plöen, 1978; Wrobel et al., 1978), für den Hamster (Cavicchia & Burgos, 1977), für das Schwein, für das Schaf, für die Ziege, für das Kaninchen und für die Ratte (Osman & Plöen, 1978) vor. Bei sehr vielen Tierarten beginnen die Tubuli recti mit einer in der Literatur als kelchartige Erweiterung beschriebenen Struktur (Wrobel et al., 1978). Diese umschließt den terminalen Pfropf. Bei Ratten und Kaninchen entfällt laut Osman und Plöen (1978) dieser Abschnitt. Der Durchmesser der Tubuli recti verringert sich anschließend im Verlauf zum Rete testis hin und weist dann etwa ein Drittel des

Anfangsdurchmessers auf (Wrobel et al., 1978). Es herrscht eine klare histologische Grenze zwischen dem Terminalsegment und den Tubuli recti: weist der terminaler Pfropf noch ein hochprismatisches Epithel auf, so ist in den geraden Kanälchen ein einschichtig-kubisches bis flach-zylindrisches Epithel zu beobachten (Cavicchia & Burgos, 1977; Osman & Plöen, 1978; Wrobel et al., 1978). Das Epithel weist einen geringen Besatz mit Mikrovilli auf (Osman & Plöen, 1978). Gelegentlich können Zilien identifiziert werden (Osman & Plöen, 1978). Wie im Terminalsegment, so kann auch im Epithel der Tubuli recti des Rindes (Sinowatz et al., 1979) und der Katze (Murakami et al., 1988) Phagozytose von Spermatozoa nachgewiesen werden. Ferner befinden sich im Epithel der Tubuli recti zahlreiche freie Zellen, die aus dem subepithelialen Epithelbereich eingewandert sind. Es sind dies vor allem Makrophagen, aber auch in geringerer Zahl Lymphozyten (Osman & Plöen, 1978; Wrobel et al., 1978). Auch in den Tubuli recti von gesunden Rhesus-Affen und Ratten (Dym & Romrell, 1975) sind Lymphozyten nachgewiesen worden. Der Übergang zum Rete testis ist durch keine scharfe histologische Grenze gekennzeichnet (Wrobel, 1990).

3.4.3. Rete testis und Mediastinum testis

Die Tubuli recti münden in das Rete testis. Von dort aus schaffen Ductuli efferentes den Anschluss an die Nebenhoden (Smollich & Michael, 1992). Ein Rete testis kann lakunär oder kanalikulär organisiert sein (Hees et al., 1987). Ein lakunäres Rete, wie bei der Ratte (Roosen-Runge, 1961) und beim Hamster (Cavicchia & Burgos, 1977), besteht aus einem Raum, in dem sich die Tubuli recti öffnen und der unvollständig von Septen unterteilt wird. Bei vielen Tierarten und beim Mensch jedoch ist das Rete kanalikulär organisiert (Hees et al., 1987). Es stellt sich hier als ein anastomisierendes Netzwerk von Gängen und Kanälchen dar. Das Rete testis befindet sich im Mediastinum, einem bindegewebigen Bezirk im Hoden. Neben dem Rete testis beinhaltet es auch Blut- und Lymphgefäße (Hees et al., 1989). Beim Rind sind im Stroma des Mediastinums Myofibroblasten, elastische Fasern und glatte Muskelzellen eingelagert (Hees et al., 1989). Auch beim Menschen sind hier glatte Muskelzellen zu beobachten (Bustos-Obrégon & Holstein, 1976). Die Lage des Mediastinums und die des Rete testis ist speziesabhängig. Benoit (1926; zitiert nach Hees et al., 1987) unterscheidet zwischen einem zentralen (axialen) und einem marginalem (superfiziellen; oberflächlichen) Rete testis. Das axiale Rete testis verläuft zentral

im Hoden und durchzieht nahezu dessen gesamte Länge. Diese Form ist bei sehr vielen Säugetieren zu finden, wie zum Beispiel beim Rind (Dym, 1976; Hees et al., 1987), beim Schaf (Dym, 1976), beim Meerschweinchen (Dym, 1976), beim Schwein (Dym, 1976; Schmidbauer, 2001), beim Hund (Dym, 1976; Montkowski, 1992) und bei der Katze (Dym, 1976; Prem, 1992). Auch das Kaninchen besitzt nach Dym (1976) sowie Lohiya und Mathur (1983) ein axiales Rete testis. Das marginale Rete testis findet sich direkt unter der Tunica albuginea. Das Mediastinum liegt hier am kranialen Hodenpol und ist von geringem Ausmaß (Hees et al., 1987). Diese Form ist u. a. bei der Ratte (Dym, 1976), bei der Maus (Dym, 1976), beim Hamster (Dym, 1976; Cavicchia & Burgos, 1977) und beim Hengst (Kuhrau, 1994) nachgewiesen worden. Im Lumen des Rete testis befinden sich beim Menschen (Roosen-Runge & Holstein, 1978) und beim Rind (Wrobel et al., 1978; Hees et al., 1987; Abd-Elmaksoud, 2005) sog. Chordae retis. Diese rundlichen Trabekel weisen einen Epithelüberzug sowie elastisches Fasern auf (Roosen-Runge & Holstein, 1978; Wrobel et al., 1978). Das Epithel des Rete testis ist einschichtig-flach bis hochprismatisch (Wrobel, 1990). Die Kerne sind unregelmäßig geformt und heterochromatinreich (Dym, 1976). Beim Menschen und bei manchen Tierarten tragen die Epithelzellen apikal Mikrovilli (Dym, 1976; Roosen-Runge & Holstein, 1978) sowie ein langes Zilium (Bustos-Obrégon & Holstein, 1976). Im Epithel des Rindes und anderer Tierarten liegen Lymphozyten (Dym & Romrell, 1975; Dym, 1976; Hees et al., 1989) und Makrophagen (Sinowatz et al., 1979; Hees et al., 1989). Ihr Anteil schwankt aber je nach Tierart. So liegt dieser beim Hund unter 1%, beim Schaf und beim Primaten bis 2% (Dym, 1976). Beim Rind lassen sich vor allem Makrophagen und weniger Lymphozyten nachweisen (Wrobel et al., 1978; Hees et al., 1989). Ebenso wie die Terminalsegmente und die Tubuli recti ist auch das Epithel des Rete testis zur Phagozytose fähig (Rind: Sinowatz et al., 1979; Goyal, 1982). Eine weitere Aufgabe des Rete besteht in der Sekretion von Rete testis-Flüssigkeit, die beim Schaf bis zu 40 ml pro Tag betragen kann (Wrobel, 1990) sowie in Absorption (Smollich & Michael, 1992). Diese Rete testis-Flüssigkeit weist eine andere Zusammensetzung auf als Hodenlymphe, Blutplasma oder die Flüssigkeit der Tubuli seminiferi contorti (Tuck et al., 1970; Wrobel, 1990). Das Rete testis ist beim Schwein (Schmidbauer, 2001) und beim Hund (Montkowski, 1992) von elastischen Fasern umgeben. Der Mensch (Roosen-Runge & Holstein, 1978) und einige Tierarten, darunter die Ratte (Roosen-Runge, 1961; Dym, 1976), die Katze

(Prem, 1992; Viotto et al., 1993), die Maus (Dym, 1976), der Hamster (Dym, 1976; Cavicchia & Burgos, 1977), das Schaf (Dym, 1976), das Meerschweinchen (Dym, 1976), das Pferd (Kuhrau, 1994) und das Kaninchen (Jones et al., 1979), besitzen neben dem intratestikulären Rete testis noch einen extratestikulären Anteil. Dieser verbindet das intratestikuläre Rete testis mit den Ductuli efferentes (Roosen-Runge & Holstein, 1978). Das Rind hingegen verfügt über keinen extratestikulären Reteanteil; hier enden am kranialen Hodenpol alle Retekanäle in einen gemeinsamen Raum, der Area confluens, von wo aus Ductuli efferentes zum Nebenhoden laufen (Hees et al., 1989).

3.5. Interstitium

Das Interstitium (sive intertubuläres Gewebe, intertubuläres Kompartiment, intertubulärer Raum, interstitielles Gewebe) füllt den Raum zwischen den Tubuli seminiferi contorti aus. Es besteht aus lockerem Bindegewebe mit relativ viel ungeformter Grundsubstanz und wenigen elastischen sowie kollagenen Fasern. Darin eingebettet sind Leydig-Zellen und einige undifferenzierte Zellen mesenchymalen Ursprungs (Leeson & Leeson, 1970; Wrobel, 1990). Letztere gelten als Vorläufer der Leydig-Zellen, der peritubulären Zellen sowie der Fibrozyten (Wrobel et al., 1988). Das intertubuläre Kompartiment wird durchzogen von Blut- und Lymphgefäßen sowie Nerven (Welsch, 2010). Im Stroma befinden sich neben Plasmazellen auch Makrophagen, die zum mononukleär-phagocytären System gezählt werden (Wrobel, 1990). Das quantitative Verhältnis zwischen Samenkanälchen und Interstitium sowie dessen Aufteilung in Leydig-Zellen und Blutgefäße/Bindegewebe ist artspezifisch. Tabelle 1 gibt darüber für einige Tierarten Auskunft.

Tabelle 1: Durchschnittswerte der verschiedenen Hodengewebsteile

| Tierart | Tubuläre Komponente | Intertubuläre Komponente | |
|----------------|---------------------|---------------------------|---------------|
| | | Gefäß-Bindegewebs-Apparat | Leydig-Zellen |
| Pferd | 70% | 20% | 10% |
| Rind | 85% | 7,5% | 7,5% |
| Schwein | 68% | 11,5% | 20,5% |
| Ratte | 91% | 3% | 6% |

Quelle: Smollich und Michael (1992)

Dieses quantitative Verhältnis zwischen Samenkanälchen und Intertubulärraum

verändert sich während der postnatalen Entwicklung: bei vierwöchigen Kälbern nimmt das intertubuläre Kompartiment 5% des Hodenvolumens ein; die restlichen 50% entfallen auf die Hodenkanälchen. Bei Kälbern zwischen der 30. und 52. Lebenswoche wird der Anteil des intertubulären Kompartiments auf 20% zugunsten der Tubuli zurückgedrängt. Bei Rindern mit 78 Wochen macht das intertubuläre Kompartiment nur noch 15% aus. Dabei schwankt die Entwicklung je nach Lage im Hoden: subtunikal ist der Anteil der Tubuli seminiferi contorti höher als nahe dem Mediastinum (Wrobel et al., 1988). Neben der tierartspezifischen Anzahl der Leydig-Zellen und der Menge an interstitiellem Gewebe ist im Interstitium außerdem eine speziesabhängige Organisation der Lymphgefäße auszumachen. Beim Rind, beim Rhesus-Affen, beim Menschen, beim Elefanten und beim Schaf liegen die Leydig-Zellen weit verstreut im sehr lockeren Bindegewebe. Die auffälligen Lymphgefäße befinden sich bei diesen Tierarten meist in zentraler Lage zwischen den Tubuli seminiferi contorti (Fawcett et al., 1973). Beim Schwein, beim Zebra, beim Opossum und beim Hund hingegen füllen die Leydig-Zellen beinahe den gesamten interstitiellen Raum aus und dominieren auf diese Weise das Interstitium. Dabei ist nur wenig lockeres Bindegewebe vorhanden. Der interstitielle Raum wird von wenigen, kleinkalibrigen Lymphgefäße durchzogen (Fawcett et al. 1973; Hund: Montkowski, 1992; Schwein: Pinart et al., 2001c). Auch bei der Katze (Prem, 1992) ist der intertubuläre Raum ausgefüllt von Leydig-Zellen. Meerschweinchen, Chinchillas, Ratten und Mäuse besitzen hingegen eine nur kleine Menge an Leydig-Zellen und interstitiellem Gewebe. Den größten Anteil des Interstitiums nehmen bei diesen Arten die peritubulären Lymphsinusoiden ein. Dabei ist bei der Ratte und der Maus kein durchgehendes Epithel ausgebildet. Die Lymphsinusoide umgeben die um die Blutgefäße gruppierten Leydig-Zellen, wobei schmale Brücken aus Bindegewebe von diesen „Inseln“ zu dem peritubulären Gewebe führen (Fawcett et al., 1973).

3.5.1. Leydig-Zellen

Leydig-Zellen werden auch als interstitielle Zellen oder „Endocrinocyti interstitiales“ bezeichnet. Castro et al. (2002) geben für die Kaninchenrasse „Weiße Neuseeländer“ eine durchschnittliche Gesamtanzahl von $103,7 \times 10^6$ Leydig-Zellen pro Hoden an. Beim Menschen und bei der Ratte scheint die Population der adulten Leydig-Zellen stabil zu sein: die Zellen teilen sich kaum

und sterben nicht ab (Mensch: Davidoff et al., 1993; Ratte: Teerds et al., 1989). Die Regenerationsrate adulter Leydig-Zellen ist laut Wrobel (1990) gering. Bei der geschlechtsreifen Ratte kann jedoch nach einer selektiven Zerstörung der Leydig-Zell-Population eine neue Generation von adulten Leydig-Zellen beobachtet werden (Kerr et al., 1987). Das Volumen der Leydig-Zellen ist speziesabhängig. Die adulte Leydig-Zelle des Rindes besitzt ein kleineres, die des Schweins ein größeres Volumen (Smollich & Michael, 1992). Die endokrinen Zwischenzellen erscheinen in den unterschiedlichsten Formen. So können sie einzeln, in mehr oder wenigen großen Gruppen oder in Strängen liegen (Dellmann & Wrobel, 1987; Wrobel, 1990). Beim Schwein wurden auch über weite Strecken ausgedehnte Platten beobachtet (Schmidbauer, 2001). Aus diesem Grunde erhält nicht jede Zelle Kontakt mit einer Kapillare, Venole oder Lymphgefäß (Wrobel et al., 1981). Die Leydig-Zelle weist ein, zumal auch zwei große, runde Kerne auf. Auch können ein bis zwei deutliche Nucleoli identifiziert werden (Bloom & Fawcett, 1968). Im Zytoplasma sind die für die Steroidproduktion notwendigen Zellorganellen eingebettet. Bei den meisten Haussäugetieren stellt ein umfangreiches ER vom glatten Typ das vorherrschende Zellorganell dar (Wrobel, 1990). Das Rind hingegen weist neben glattem ER auch große Mengen an rauem ER auf (Wrobel et al., 1981, Wrobel, 1990). In den Membranen des ER sitzen die Enzyme zur Steroidproduktion. Auch wird dieses Organell mit der Produktion von Trägerproteinen für Androgene in Verbindung gebracht (Smollich & Michael, 1992). Für die Produktion der Sexualsteroiden sind neben dem ER zudem Mitochondrien notwendig. Dort wird durch die Abspaltung der Cholesterolseitenketten und die Bildung von Pregnenolon der erste Schritt zu deren Synthese getätigt (Dellmann & Wrobel, 1987). Bei den meisten Tierarten handelt es sich vor allem um Mitochondrien vom tubulären Typ. Beim Rind (Smollich & Michael, 1992) und beim Menschen (Welsch, 2010) jedoch finden sich sowohl Mitochondrien vom tubulären Typ als auch vom Cristae-Typ. Die Rolle des Golgi-Apparates in der Synthese von Hormonen ist noch nicht hinreichend geklärt (Dellmann & Wrobel, 1987), wobei Wrobel (1990) eine Beteiligung an der Steroidproduktion ausschließt. Überdies ist im Zytoplasma eine tierartlich unterschiedliche Menge von Lipideinschlüssen eingelagert. Hunde (Connell, 1976; Zirkin et al., 1980), Löwen (Sinha & Seal, 1969) und Schweine (Banks, 1981) besitzen eine große Anzahl, während Rinder (Wrobel et al., 1981; Abd-Elmaksoud, 2005) ebenso wie Ratten (Murakami, 1966; Zirkin et al., 1980),

Schweine (Schmidbauer, 2001) und Hamster (Zirkin et al., 1980) relativ wenige Lipideinschlüsse aufweisen. Kaninchen und Meerschweinchen haben dagegen eine mittlere Anzahl von Lipidtropfen eingelagert (Zirkin et al., 1980). Das Lipid wird bei der Präparation extrahiert, so dass Vakuolen entstehen, die das Zytoplasma schaumig erscheinen lassen (Banks, 1981). Die Leydig-Zellen stellen mit der Produktion von Sexualhormonen den endokrinen Teil der männlichen Keimdrüse dar (Wrobel, 1990). Vornehmlich werden in den Leydig-Zellen Androgene hergestellt, wobei der Hoden die Hauptandrogenquelle des Körpers darstellt (Crabo, 1963; Connell, 1976). Unter den Androgenen wiederum ist Testosteron das häufigste und wichtigste Produkt (Castro et al., 2002; Diemer et al., 2003), so auch beim Kaninchen während der Pubertät (Chubb et al., 1978; Berger et al., 1982). Beim Eber (Dellmann & Wrobel, 1987; Wrobel, 1990) und beim Hengst (Fawcett et al., 1973) wird auch das Hormon Östrogen hergestellt. Neben Sexualhormone produzieren die Leydig-Zellen eine Vielzahl anderer Stoffe, die sowohl parakrine als auch autokrine Funktionen besitzen (Saez, 1994; Lejeune et al., 1998; Habert et al., 2001), wie zum Beispiel den „corticotropin-releasing factor“ (CRF) (Fabbri, 1990; Tinajero et al., 1992) sowie IGF-I und TGF- β (Habert et al., 2001). Zudem kann in den Leydig-Zellen von adulten Ratten eine testikuläre pro-opio-melano-cortin-messenger-Ribonucleinsäure (POMC-mRNA) nachgewiesen werden (Pintar et al., 1984; Chen & Madigan, 1987; Li et al., 1993). Davidoff et al. (1993) vermuten in der menschlichen Leydig-Zelle neuronale und neuroendokrine Eigenschaften, nachdem sie in den Leydig-Zellen einige neuronale Marker sowie Enzyme, die in der Herstellung der Neurotransmitter Dopamin, Serotonin und Noradrenalin involviert sind, gefunden haben. Beim Kaninchen vollzieht sich die Entwicklung der Leydig-Zellen in einer ersten fetalen sowie in einer zweiten postnatalen Phase vor bzw. während der Pubertät (Gondos et al. 1977; Lejeune et al., 1998; O'Shaughnessy et al., 2006). Die erste fetale Generation von Leydig-Zellen wird beim Kaninchen um die Geburt abgebaut (Gondos & Conner, 1972; Gondos et al., 1976). Lediglich in der 1. Woche post partum (p.p.) konnten noch vereinzelt voll ausdifferenzierte Leydig-Zellen beobachtet werden (Gondos et al., 1977; Tsunenari & Kast, 1992). Da laut Gondos et al. (1976) keine Anzeichen von Degeneration oder Zelltod zu beobachten waren, gehen sie davon aus, dass die reifen fetalen Leydig-Zellen zu weniger ausdifferenzierten Zelltypen abgebaut werden. Auch Prince (1990) führt den Rückgang der reifen fetalen Leydig-Zellen auf Regression zurück, sieht aber

auch in einem geringen Maße Hinweise für Degeneration. Nach dem Abbau der fetalen Leydig-Zellen wird das Interstitium des Kaninchens in der 1.–5. Lebenswoche von undifferenzierten, mesenchymähnlichen Zellen dominiert (Gondos et al., 1977). Allerdings treten neben jenen Zellen auch vereinzelt teilweise differenzierte Zellen in Erscheinung. Zwischen der 5. und 6. Lebenswoche des Kaninchens sind die ersten voll ausdifferenzierten Leydig-Zellen zu erkennen. Der Großteil des intertubulären Kompartiments besteht allerdings noch aus undifferenzierten bzw. teilweise differenzierten Zellen. Die Anzahl der Leydig-Zellen nimmt ab der 6. Lebenswoche stark zu, mit einer Verlangsamung der Neubildung in der 9. Woche, dem in der 10. und 11. Woche ein zweiter Schub folgt. Ab der 11. Woche besteht nun der größte Teil des Interstitiums aus voll differenzierten Leydig-Zellen (Gondos et al., 1976, 1977). Die adulten Leydig-Zellen entstehen laut Chen et al. (2010) durch Proliferation und Differenzierung aus Stammzellen im intertubulären Raum. Mesenchymähnliche Zellen werden in den meisten Arbeiten als Stammzellen für die adulte Generation der Leydig-Zellen angesehen (Hardy et al., 1989; Vergowen et al. 1991; Ariyaratne et al., 2000). Als Alternative schlagen Davidoff et al. (2009) vaskuläre glatte Muskelzellen und Perizyten als Stammzellen für die endokrinen Leydig-Zellen vor.

3. Glykohistochemie

Der Begriff „Lektin“ wurde von William C. Boyd und Elizabeth Shapleigh geprägt: dem lateinischen Wort „legere“=„auswählen“ umfasst laut Boyd und Shapleigh (1954) die Gruppe der Lektine blutgruppenspezifische Antigene und Antikörper-ähnliche Substanzen aus Pflanzenteilen. Nach 25 Jahren Forschung legten Goldstein et al. im Jahre 1980 eine überarbeitete Definition vor: demnach ist ein Lektin ein zuckerbindendes Protein oder Glykoprotein nicht-immunogenem Ursprung, das Zellen agglutiniert und/oder Glykokonjugate präzipitiert. Nach Goldstein et al. (1980) weist ein Lektin mindestens zwei Bindungsstellen für Zucker auf. Ferner ist die Spezifität eines Lektins durch denjenigen Zucker bestimmt, der in der Lage ist, die Präzipitation durch dieses Lektin zu hemmen. Durch diese Definition werden Lektine von anderen kohlenhydratbindenden Proteinen wie Hormonen, Toxinen, Enzymen etc. abgrenzt; ferner wird der Ursprung der Lektine erweitert. Ein Lektin muss demnach nicht mehr zwangsläufig aus einer Pflanze stammen, auch ein tierischer oder bakterieller

Ursprung ist denkbar. Aktuell werden Lektine als Proteine definiert, die Kohlenhydrate binden und dabei nicht enzymatisch tätig sind. Sie sind weder Antikörper noch Sensor- oder Transportproteine (Gabius et al., 2011). Wie bereits erwähnt, besitzen Lektine mindestens zwei Bindungsstellen für Kohlenhydrate; diese sind von wesentlicher Bedeutung für die Agglutination von Zellen. Eine Untereinheit besitzt dabei eine Zuckerbindungsstelle (Lis & Sharon, 1986). Viele Lektine binden an endständige, nicht-reduzierenden Kohlenhydraten, während einige auch innere Zuckerstrukturen erkennen (Lis & Sharon, 1986). Goldstein und Poretz (1986) teilen Lektine je nach ihrer spezifischen Bindung an Zucker in sieben Gruppen ein: 1. Glukose/Mannose, 2. Galaktose, 3. N-Acetyl-D-glukosamin, 4. N-Acetyl-D-galaktosamin, 5. L-Fukose, 6. Sialinsäure sowie 7. komplexe Kohlenhydratstrukturen. Im Zuge neuerer Forschungsergebnisse wurde diese Klassifikation überarbeitet und besteht nur noch aus sechs Lektingruppen, nämlich Gruppe I. D-Glukose/D-Mannose bindende Lektine, Gruppe II. D-Galaktose bindende Lektine, Gruppe III. N-Acetyl-D-Glukosamin/N-Acetyl-Neuraminsäure bindende Lektine, Gruppe IV. N-Acetyl-D-Galaktosamin/D-Galaktose bindende Lektine, Gruppe V. L-Fukose-bindende Lektine sowie Gruppe VI. Lektine mit Bindungsstellen für Oligosaccharide (Lohr et al., 2010; Rüdiger & Gabius, 2009; Gabius, 2011; Gabius et al., 2011). Heute werden Lektine unter anderem eingesetzt, um die Bindungsstellen und damit Kohlenhydratstruktur von Zellen zu entdecken, zu isolieren und zu charakterisieren (Rüdiger & Gabius, 2001; Sharon & Lis, 2004). Dabei werden Lektine mit bekanntem Bindungsverhalten verwendet, die spezifisch an Mono- und Oligosaccharide auf der Zelloberfläche oder in Zellen binden. Auf diese Weise können die Zuckerstrukturen im gesunden Gewebe untersucht werden. Die Verteilung von Zuckerstrukturen in Geweben und Zellen kann mit dem Licht- und Elektronenmikroskop untersucht werden; dabei werden Lektine an fluoreszierende Substanzen, an kolloidales Gold oder an Enzyme, wie Peroxidase gekoppelt. Ihre Bindung wird dann direkt bzw. indirekt sichtbar gemacht (Roth, 1983; Roth 2011). Zu der Verteilung von Lektinbindungsstellen im adulten Hoden liegen Arbeiten für das Dromedar (Abd-Elmaksoud et al., 2008), den Hamster (Pastor et al., 2003), den Hund (Castagnaro & Valenza, 1990; Montkowski, 1992) die Katze (Prem, 1992; Desantis et al., 2006), die Maus (Lee & Damjanov, 1984; Lemaire & Heinlein, 1992; Zhou et al., 1992; Lohr et al., 2010), das Pferd (Kuhrau, 1994; Verini-Supplizi et al., 2000), die Ratte (Arya & Vanha-Perttula, 1984; Söderström

et al., 1984; Malmi et al., 1990; Jones et al., 1992; Jones et al., 1993), das Rind (Arya & Vanha-Perttula, 1985; Ertl & Wrobel, 1992; Manning et al., 2004; Abdelmaksoud, 2005), das Schaf (Steger, 1994), das Schwein (Calvo et al., 2000; Pinart et al., 2001a; Pinart et al., 2001b; Pinart et al., 2002), die Ziege (Kurohmaru et al., 1991) sowie den Menschen (Lee & Damjanov, 1985; Arenas et al., 1998; Gheri et al., 2009) vor. Die Keimzellen vieler Tierarten zeigen während der Spermatogenese eine Modifikation ihrer Zuckerreste, speziell während der Spermio-genese (Malmi et al., 1990; Verini-Supplizi et al., 2000). Die Veränderungen der Zuckerstrukturen während der postnatalen Entwicklung wurden 1992 von Ertl und Wrobel bei Rindern im Alter von 4 bis 40 Wochen p.p. untersucht. Auch Arya und Vanha-Perttula (1985) berichten über die Lektinbindung während der postnatalen Entwicklung des Rindes (4 bis 28 Wochen p.p.). Ferner liegt eine Arbeit über den nicht-geschlechtsreifen Büffel (Goel et al., 2010) vor.

5. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie erlaubt die Lokalisation von bestimmten Antigenen in situ (Welsch, 2010). Im Zuge der immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit wird die Expression von α -SMA, Zytokeratinen und Vimentin als Komponenten des Zytoskeletts sowie das Vorkommen von Progesteronrezeptor im nicht-geschlechtsreifen sowie im geschlechtsreifen Kaninchenhoden untersucht.

5.1. Das Zytoskelett in immunhistochemischen Untersuchungen

Jede eukaryotische Zelle wird von einem Zytoskelett durchzogen. Dabei handelt es sich um ein feinfädiges, aus Proteinen aufgebautes Netzwerk (Sinowatz, 2000a). Das Zytoskelett verleiht einer Zelle ihre Form und hält diese aufrecht. Auch ist es von Bedeutung bei Transportvorgängen innerhalb des Zytoplasmas sowie der gesamten Zelle. Dabei ist das Zytoskelett kein starres Gebilde; es ist rasch veränderbar und kann sich auf die jeweiligen Gegebenheiten der Zellen einstellen (Sinowatz, 2000a). Laut Steger et al. (1994) ist das Zytoskelett von großer Bedeutung für das Keimepithel. So ermöglicht es den Sertoli-Zellen, sich beständig der Veränderungen der Keimzellen anzupassen (Russell, 1980). Das Zytoskelett setzt sich aus drei Komponenten zusammen, nämlich den Mikrotubuli, den Mikrofilamente (Aktinfilamente) sowie den Intermediärfilamente (Sinowatz,

2000a; Herrmann et al., 2009; Welsch, 2010).

5.1.1. α -SMA (“alpha-smooth muscle actin”)

Wegen ihrer geringen Durchmesser von ca. 6 bis 7 nm werden die Aktinfilamente auch Mikrofilamente genannt (Welsch, 2010). Sie entstehen aus Polymerisation von globulärem (G) Aktin. Dabei bilden 250 G-Aktinmoleküle eine Kette, die filamentäres F-Aktin genannt wird. Zwei F-Aktinfilamente winden sich helikal umeinander und bilden ein Aktinfilament (Sinowatz, 2000a). Beim Vogel und beim Säuger sind sechs isomere Formen des Aktins bekannt (Perrin & Ervasti, 2010): dabei kommen „ α -skeletal actin“, „ α -cardiac actin“, „ α -smooth muscle actin“ und „ γ -smooth muscle actin“ im Skelettmuskel-, Herzmuskel- und glattem Muskelgewebe vor; die Isoformen „ β -cytoplasmic actin“ und „ γ -cytoplasmic actin“ können in fast allen Zellen identifiziert werden können. Die Isoformen zeigen über 90% Sequenzhomologie, allerdings nur 50-60% Übereinstimmung in ihren amino-terminalen Endabschnitten (Skalli et al., 1986). Der relative Prozentanteil der Isoformen schwankt in den glatten Muskelzellen der verschiedenen Organe (Gabbiani et al., 1981) und kann dort auch unter pathologischen Veränderungen (Kocher & Gabbiani, 1986) bzw. während der embryonalen Entwicklung (Kuroda, 1985) wechseln. Die sechs Isoformen übernehmen sowohl überlappende/allgemeine als auch spezielle Funktionen (Perrin & Ervasti, 2010). α -SMA wird als Aktin-Isoform in glatten Muskelzellen sowie in Myofibroblasten exprimiert. α -SMA ist dabei an der Bildung der kontraktilen Elemente dieser beiden Zellarten involviert. Die aus ihnen geformten Aktinfilamente bilden zusammen mit den Myosinfilamenten die Myofibrillen, die zu Kontraktionen fähig sind (Welsch, 2010). Durch die Anwendung von Antikörper gegen α -SMA kann die Lokalisation von α -SMA verfolgt werden. Für das Vorkommen von α -SMA im gesunden, geschlechtsreifen Hoden liegen unter anderem Untersuchungen für das Kaninchen (Abd-Elmaksoud, 2009), für die Ratte (Palombi et al., 1992), für das Rind (Steger et al., 1994; Abd-Elmaksoud, 2005; Devkota et al., 2006), für den Rhesus-Affen (Schlatt et al., 1993), für den Hund (Egger & Witter, 2009), für das Pferd (Höffner, 2008), für das Schaf (Steger et al., 1994), für das Lama (Rodríguez et al., 1999) sowie für den Menschen (Holstein et al., 1996; Arenas et al., 1997; Middendorff et al., 2002; Pop et al., 2011) vor. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Vorkommen von α -SMA im gesunden adulten Hoden des Menschen und verschiedener Tierarten

| Art | Hoden-kapsel | Peritubuläres Gewebe | Blut-Gefäße | Rete testis | Tubuli recti |
|-----------|------------------|----------------------|------------------|----------------|----------------|
| Affe | k.A. | + | + | k.A. | k.A. |
| Hund | k.A. | + | k.A. | + | k.A. |
| Kaninchen | + | + | + | k.A. | k.A. |
| Lama | k.A. | + | k.A. | + | + |
| Pferd | k.A. | + | + | + | + |
| Ratte | k.A. | + | k.A. | k.A. | k.A. |
| Rind | k.A. | + ^{1,2,3} | + ^{2,3} | + ² | + ² |
| Schaf | k.A. | + | k.A. | k.A. | k.A. |
| Mensch | + ^{4,6} | + ⁵ | k.A. | k.A. | k.A. |

Quelle: Rhesus-Affe: Schlatt et al., 1993; Hund: Egger & Witter, 2009; Kaninchen: Abd-Elmaksoud, 2009; Lama: Rodríguez et al., 1999; Pferd: Höffner, 2008; Ratte: Palombi et al., 1992; Rind: Abd-Elmaksoud, 2005¹, Devkota et al., 2006², Steger et al., 1994³; Schaf: Steger et al., 1994; Mensch: Arenas et al., 1997⁴, Holstein et al., 1996⁵, Middendorff et al., 2002⁶; Legende: + Reaktion vorhanden, +/- teilweise Reaktion vorhanden, - keine Reaktion vorhanden

Die postnatale Entwicklung wird für die Tierarten Ratte (Tung & Fritz, 1990; Palombi et al., 1992) und Rind (Abd-Elmaksoud, 2005; Devkota et al., 2006) beschrieben.

5.1.2. Intermediärfilamente

Ihr Durchmesser beläuft sich auf 8-10 nm und liegt damit zwischen dem der Mikrofilamente und dem der Mikrotubuli. Daher werden sie Intermediärfilamente genannt (Sinowatz, 2000a). Alle Intermediärfilamente besitzen einen dreiteiligen Aufbau: eine zentrale α -Helix wird von einer N-terminalen Kopf-Domäne und einer C-terminalen Schwanz-Domäne flankiert. Der zentrale Bestandteil ist hoch konserviert, während die Kopf- und Schwanzdomäne sehr variabel in Länge und Aminosäureaufbau ist. Diese Monomere bilden Di- und Tetramere; letztere wiederum lagern sich zu Protofilamente zusammen, die ihrerseits Protofibrillen bilden. Diese bauen dann das jeweilige Intermediärfilament auf (Minin & Moldaver, 2008; Welsch, 2010). Es sind fünf Hauptklassen von Intermediärfilamenten bekannt, die sich in ihren Monomeren unterscheiden; dabei enthält meist ein bestimmter Zelltyp nur eine Klasse von Intermediärfilamenten: I. Saure Zytokeratine in Epithelzellen und Derivate der Epidermis, II. Basische

Zytokeratine in Epithelzellen, III. Vimentin in vielen mesenchymalen Zellen, Desmin in Muskelzellen, „glial acidic fibrillary protein“ in Astrozyten, Peripherin in peripheren Neuronen, IV. Neurofilamentäres Tripleprotein in Nervenzellen, V. Nukleäre Lamine in den Zellkernen (Steinert et al., 1984; Sinowatz, 2000a; Minin & Moldaver, 2008).

5.1.2.1. Zytokeratine

Die größte Klasse der Intermediärfilamente stellen die Zytokeratine (CK) dar (Gu & Coulombe, 2007). Sie sind die Grundbausteine der Zytokeratinfilamente und finden sich in Epithelzellen sowie in Derivate der Epidermis (Sinowatz, 2000a; Welsch, 2010). Die bisherige Einteilung in saure und basische Zytokeratine (sive Keratine) (Moll et al., 1982) musste vor rund 10 Jahren nach Erforschung neuer Zytokeratine erweitert werden: sie umfasst nun drei Kategorien (epitheliale Keratine/Gene, Haarkeratine/Gene sowie und Keratin-Pseudogene) und unterscheidet dabei nach wie vor zwischen Typ I (sauer) und Typ II (basisch). Damit ergibt sich folgende Einteilung der Tabelle 3 (Schweizer et al., 2006; Gu & Coulombe, 2007):

Tabelle 3: Einteilung der Zytokeratine

| <i>Kategorie</i> | <i>Zytokeratinnr./Gennr.</i> |
|--|------------------------------|
| Human Typ I Epithel-Keratine* | 9-28 |
| Human Typ I Haar-Keratine | 31-40 |
| Non-Human Typ I Epithel- und Haar-Keratine | 41-70 |
| Human Typ II Epithel-Keratine* | 1-8 und 71-80 |
| Human Typ II Haar-Keratine | 81-86 |
| Non-Human Typ II Epithel- und Haar-Keratine | 87-120 |
| Typ II Keratin Pseudogene | 121-220 |
| Typ I Keratin Pseudogene | 221ff |

Quelle: nach Schweizer et al., 2006; Legende: *die in dieser Arbeit untersuchten Zytokeratingruppen; Abkürzung: Nr Nummer

Eine der Hauptaufgaben der Zytokeratine ist der Schutz der Epithelzellen vor mechanischen Belastungen, die sonst zum Zellschaden und Zelltod führen könnte; dadurch wird die strukturelle Integrität der Zellen gesichert. Die Zytokeratine bestimmen auch die Zellpolarität und Zellform mit (Gu & Coulombe, 2007; Magin et al., 2007). Aber auch nicht mechanische Aufgaben scheinen Zytokeratine zu übernehmen: Ku und Omary (2006) stellen die Bedeutung der Zytokeratine für den Schutz der Zelle vor zellulärem Stress heraus. In ihrer Arbeit

mit Mutanten schlagen sie vor, dass Zytokeratine die stressinduzierten Phosphatkinasen hemmen und deren schädigenden Einfluss auf die Zelle mindern. Auch sollen Zytokeratine für den Transport der Organellen sowie für Zellproliferation und Proteinsynthese mitverantwortlich sein. Ferner wirken sie an intrinsischen und extrinsischen Signalkaskaden sowie an metabolischen Prozessen mit (Gu & Coulombe, 2007; Magin et al., 2007; Karantza, 2011). In der Pathologie dienen Zytokeratine als spezifische Tumormarker: durch sie lässt sich der Ursprungsort von entarteten Zellen nachvollziehen. Sie sollen aber auch bei der Metastasierung eine aktive Rolle spielen (Karantza, 2011). Allerdings darf laut Magin et al. (2007) nicht vergessen werden, dass jedes Zytokeratin eigene Aufgaben und Eigenschaften inne hat, so dass Forschungsergebnisse bezogen auf einzelne Zytokeratine nicht auf die gesamte Klasse übertragen werden können. Bei der Ratte (Paranko et al., 1992), bei der Maus (Appert et al., 1998), beim Kaninchen (Aumüller et al., 1992) und beim Menschen (Stosiek et al., 1990) wurden Zytokeratine im Zytoplasma der fetalen und präpuberalen Stützzellen nachgewiesen: dabei wurden beim Kaninchen Antikörper gegen CK 18, bei der Maus gegen CK 8 und 18, beim Mensch Antikörper gegen CK 8 und CK 18 (Stosiek et al., 1990) sowie bei der Ratte eine Antikörper-Kombination PKK1 (CK 8, SK 18, CK 19) verwendet. In den Epithelzellen des Rete testis des fetalen und adulten Kaninchens (Aumüller et al., 1992) sowie des geschlechtsreifen Menschen (Achtstätter et al., 1985; Miettinen et al., 1985) war eine positive Reaktion auf Zytokeratine zu beobachten; dabei verwendeten Miettinen et al. (1985) die Antikörper Kombination PKK1 (CK 7, CK 8, CK 18, CK 19), Achtstätter et al. (1985) die Antikörper gegen CK 7, CK 8, CK 18, CK 19 sowie Aumüller et al. (1992) Antikörper gegen CK 18. Das Reteepithel des Hundes reagierte positiv auf Antikörper gegen CK 8, CK 18, CK 19 (Wakui et al., 1994). Ferner konnte beim adulten Mann mit normaler Spermatogenese CK 10 im Zytoplasma der Leydig-Zelle sowie in den Spermatozyten nachgewiesen werden (Adly & Hussein, 2011). In den Tubuli seminiferi contorti der Säuger ist CK 5 in Keimzellen (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden) sowie in interzellulären Brücken anzutreffen (Kierszenbaum et al., 1996; Tres et al., 1996; Kierszenbaum, 2002), während CK 9 ein Bestandteil des perinukleären Rings der Manschette von Spermatiden darstellt (Mochida et al., 2000; Kierszenbaum, 2002; Rivkin et al., 2005).

5.1.2.2. Vimentin

Das Protein Vimentin ist ein stark konservierter und weit verbreiteter Vertreter der Intermediärfilamente (Satelli & Li, 2011). Vimentin kommt unter anderem in Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen und Neutrophile Granulozyten vor (Evans, 1998). Es liegen Arbeiten über die Expression von Vimentin im Hoden des adulten Hundes (Wakui et al., 1994; Egger & Witter, 2008), des Kaninchens (Aumüller et al., 1992), des Lamas (Rodríguez et al., 1999), des Pferd (Lydka et al., 2011), der Ratte (Virtanen et al., 1986; Russell et al., 1987; Kopecky et al., 2005), des Rindes (Steger et al., 1994; Wrobel et al., 1995b; Devkota et al., 2006), des Schafes (Tung et al., 1987; Steger et al., 1994) sowie des Menschen (Achtstätter et al., 1985; Miettinen et al., 1985; Virtanen et al., 1986; Aumüller et al., 1988; Dinges et al., 1991; Arenas et al., 1997; Romeo & Marcello, 1999) vor. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind in der Tabelle 4 aufgeführt. Eine Beschreibung der Expression von Vimentin im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Tieres liegt für die Ratte (Aumüller et al., 1992; Zhu et al., 1997), das Kaninchen (Aumüller et al., 1992), das Schaf und das Rind vor. Die Rolle des Vimentins in der Sertoli-Zelle und in den anderen Zellen ist nicht eindeutig geklärt (Lydka et al., 2011; Satelli & Li, 2011). Es wird angenommen, dass Vimentin, wie auch die anderen Intermediärfilamente, mechanische Aufgaben inne hat (Rodríguez et al., 1999; Satelli & Li, 2011). Vimentin interagiert aber auch mit vielen anderen Proteinen und nimmt an einer Anzahl von Zellfunktionen teil (Satelli & Li, 2011). Ferner soll Vimentin mit interzellulären Kontaktstrukturen in Verbindung stehen. Daher wird Vimentin eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Spermatogenese zugesprochen (Zhu et al., 1997; Kopecky et al., 2005). Da bei der Ratte die Verteilung von Vimentin abhängig vom Keimepithelzyklus ist und mit der Lage der elongierten Spermaticidenköpfe in Zusammenhang zu stehen scheint, könnte Vimentin am Transport dieser Spermaticiden beteiligt sein (Zhu et al., 1997). Es wird ferner diskutiert, ob durch die perinukleäre Lokalisation des Vimentins der Zellkern in seiner Position gehalten werden soll, so auch während der Differenzierung der primitiven Stützzelle zur adulten Sertoli-Zelle (Amlani & Vogl, 1988; Zhu et al., 1997; Devkota et al., 2006). Vermutlich spielen die Intermediärfilamente auch eine Rolle bei der Anpassung der Sertoli-Zelle an die sich ständig verändernden benachbarten Keimzellen (Aumüller et al., 1988). Auch soll Vimentin für das Öffnen und Schließen der „tight junctions“ (Zonulae occludentes), die zwischen den Sertoli-Zellen ausgebildet sind und einen Teil der

Blut-Hoden-Schranke bilden, von Bedeutung sein (Rodríguez et al, 1999).

Tabelle 4: Vorkommen von Vimentin im gesunden adulten Hoden des Menschen und verschiedener Tierarten

| Art | Peri-tubuläre Zellen | Sertoli-Zellen | Leydig-Zellen | Epithel Tubuli Recti | Epithel Rete Testis | Blut-gefäß |
|-----------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------|
| Hund | +/- ¹ | k.A. | k.A. | k.A. | +/- ¹ //+ ² | k.A. |
| Kaninchen | k.A. | + | + | k.A. | k.A. | k.A. |
| Lama | - | + | + | + | + | k.A. |
| Pferd | + | + | + | k.A. | k.A. | k.A. |
| Ratte | + ^{3,5} | + ^{3,5} | + ^{3,4} | k.A. | k.A. | + ^{3,5} |
| Rind | + ^{6,7} | + ^{6,7,8} | +/- ⁶ | + ^{6,8} | + ^{6,8} | + ⁶ |
| Schaf | + ⁹ | + ^{9,10} | k.A. | k.A. | + ¹⁰ | k.A. |
| Mensch | + ¹² | + ^{11,12,15} | + ^{11,12,14} | k.A. | + ¹⁶ //- ¹⁷ | k.A. |

Quelle: Hund: Egger & Witter, 2008¹, Wakui et al., 1994²; Kaninchen: Aumüller et al., 1992; Lama: Rodríguez et al., 1999; Pferd: Lydka et al., 2011; Ratte: Kopecky et al., 2005³, Russell et al., 1987⁴, Virtanen et al., 1986⁵; Rind: Devkota et al., 2006⁶, Steger et al., 1994⁷, Wrobel et al., 1995b⁸; Schaf: Steger et al., 1994⁹, Tung et al., 1987¹⁰; Mensch: Achtstätter et al., 1985¹, Arenas et al., 1997¹³, Aumüller et al., 1988¹⁵, Dinges et al., 1991¹⁶, Miettinen et al., 1985¹¹, Romeo & Marcello, 1999¹⁴, Virtanen et al., 1986¹²; Legende: + Reaktion vorhanden, +/- unregelmäßig Reaktion vorhanden, - keine Reaktion vorhanden, k.A. keine Angabe der Autoren

5.2. Progesteronrezeptoren in immunohistochemischen Untersuchungen

Progesteron ist ein Steroidhormon mit 21 C-Atomen. Es wird zu der Gruppe der Sexualhormone gezählt. Arbeiten über Vorkommen und Verteilung von Progesteronrezeptoren im geschlechtsreifen Hoden liegen unter anderem für das Pferd (Höffner, 2008), das Schwein (Kohler et al., 2007), von der Maus (You et al., 2010) und dem Menschen (Düe et al., 1989; Sha et al., 2005; Lütjens et al., 2006) vor. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 zusammengefasst. Ferner existieren Arbeiten über die Verteilung von Progesteronrezeptoren beim nicht-geschlechtsreifen Schwein (Kohler et al., 2007) und bei der nicht-geschlechtsreifen Ratte (Weber et al., 2002).

Tabelle 5: Vorkommen von Progesteronrezeptoren im gesunden adulten Hoden des Menschen und verschiedener Tierarten

| Art | Sertoli-Zellen | Keimzellen | Leydig-Zellen | Rete testis | Peritubuläre Zellen |
|----------------|----------------|---|---|--------------|------------------------------------|
| Pferd | + | + Spg, Spz, rSpd | + innerhalb Decksaison | + | + |
| Maus | - | + Spz | - | k.A. | k.A. |
| Schwein | - | + Spg | k.A. | k.A. | +/- |
| Mensch | ⁻² | ⁻² // ⁺³ Spg, Spz, rSpd | ⁻¹ // ^{+/-2} // ^{+/-3} | k.A. k.A. | +/- ⁻² ⁻³ |

Quelle: Pferd: Höffner, 2008; Maus: You et al., 2010; Schwein: Kohler et al., 2007; Mensch: Düe et al., 1989¹, Lütjens et al., 2006², Sha et al., 2005³; Legende: + Reaktion vorhanden, +/- teilweise Reaktion vorhanden, - keine Reaktion vorhanden; Abkürzungen: Spg Spermato gonien, Spz Spermatozyten I. und II. Ordnung, rSpd runde Spermatoziden

Progesteron wird über Pregnenolon aus Cholesterol synthetisiert. Im männlichen Organismus wird Progesteron in kleinen Mengen von der Nebennierenrinde sowie von den Leydig-Zellen als Vorstufe von Androgenen gebildet (Silbernagel & Despopoulos, 2001; Löffler, 2003). Die Wirkung dieses Hormons wird über seine Rezeptoren vermittelt (Meineke, 2000). Die Aufgaben des Progesterons im männlichen Organismus sind weniger gut erforscht als die im weiblichen Tier. Kohler et al. (2007) vermuten aufgrund der Expression von Progesteronrezeptoren in Keimzellen eine parakrine Wirkung von Progesteron auf die Spermatogenese. Diese Einschätzung teilen auch andere Autoren (Weber et al., 2002; Oettel & Mukhopadhyay; 2004; Kohler et al., 2007). You et al. (2010) mutmaßen aufgrund der intrazellulären Lokalisation des Rezeptors in den Keimzellen eine direkte Rolle in der Genregulation. Oettel und Mukhopadhyay (2004) halten auch eine Einflussnahme auf die Testosteronsynthese in den Leydig-Zellen für wahrscheinlich. Progesteronrezeptoren in den Spermien scheinen auch eine wichtige Rolle bei der Befruchtung zu spielen: die Rezeptoren, die sich auf der Plasmamembran der ausgereiften Spermien befinden, sollen unter anderem bei Mensch, Hund und Pferd daran beteiligt sein, die sog. Akrosomenreaktion auszulösen (Pferd: Cheng et al., 1998; Mensch: Oettel & Mukhopadhyay, 2004; Hund: Sirivaidyapong et al., 1999). Bei der Akrosomenreaktion wird es den Spermien durch die Aktivierung von akrosomalen Enzymen ermöglicht, die

Corona radiata und die Zona pellucida der Eizelle zu durchdringen, um anschließend mit der Eizelle zu verschmelzen (Schnorr & Kressin, 2001).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchungen wurden die Hoden von 15 nicht-geschlechtsreifen sowie von 10 geschlechtsreifen Kaninchen herangezogen. Die Kaninchen stammten aus dem Kaninchenzuchtverein B 630 Stamm Abensberg. Die Proben wurden unmittelbar nach der Schlachtung der Kaninchen (Blutentzug nach Kopfschlag) entnommen. Alle Tiere waren klinisch unauffällig. Die Hoden sämtlicher Kaninchen waren abgestiegen und erschienen makroskopisch unauffällig. Das Alter, Gewicht und Rasse der Tiere werden in den Tabellen 6 und 7 näher erläutert.

Tabelle 6: Übersicht über die untersuchten geschlechtsreifen Kaninchen

| Tier Nr. | Alter | Gewicht | Rasse |
|----------|-----------|---------|-----------------|
| 1 | 9 Monate | 4,6 kg | Grauer Wiener |
| 2 | 7 Monate | 4,3 kg | Grauer Wiener |
| 3 | 7 Monate | 4,5 kg | Grauer Wiener |
| 4 | 8 Monate | 4,6 kg | Grauer Wiener |
| 5 | 9 Monate | 4,8 kg | Grauer Wiener |
| 6 | 10 Monate | 7,0 kg | Deutscher Riese |
| 7 | 9 Monate | 1,9 kg | Kleinsilber |
| 8 | 9 Monate | 1,9 kg | Kleinsilber |
| 9 | 10 Monate | 3,0 kg | Kleinsilber |
| 10 | 10 Monate | 3,15 kg | Kleinsilber |

Nach Angaben der Züchter wurden die geschlechtsreifen Kaninchen bereits erfolgreich in der Zucht eingesetzt. Laut Halter der nicht-geschlechtsreifen Kaninchen befruchteten diese Tiere die im Verbund lebenden weiblichen Kaninchen nicht. Die Auswahl der Tiere orientiert sich somit nach der Definition von May und Simpson (1975), die „Geschlechtsreife“ als den Zeitpunkt ansehen, an dem ausreichend reife Spermien gebildet werden, um eine Eizelle befruchten zu können.

Tabelle 7: Übersicht über die untersuchten nicht-geschlechtsreifen Kaninchen

| Tier Nr. | Alter | Gewicht | Rasse |
|----------|-----------|---------|---|
| 1 | 11 Wochen | 1,8 kg | Kalifornier |
| 2 | 11 Wochen | 1,9 kg | Kalifornier |
| 3 | 12 Wochen | 1,9 kg | Weißer Neuseeländer |
| 4 | 12 Wochen | 1,9 kg | Mix Kalifornier und Weißer Neuseeländer |
| 5 | 11 Wochen | 1,85 kg | Kalifornier |
| 6 | 12 Wochen | 1,8 kg | Weißer Neuseeländer |
| 7 | 12 Wochen | 1,95 kg | Mix Kalifornier und Weißer Neuseeländer |
| 8 | 12 Wochen | 1,85 kg | Weißer Neuseeländer |
| 9 | 11 Wochen | 1,85 kg | Kalifornier |
| 10 | 12 Wochen | 1,8 kg | Mix Kalifornier und Weißer Neuseeländer |
| 11 | 12 Wochen | 1,95 kg | Weißer Neuseeländer |
| 12 | 12 Wochen | 0,86 kg | Zwergwidder |
| 13 | 12 Wochen | 1,6 kg | Kalifornier |
| 14 | 12 Wochen | 1,87 kg | Kalifornier |
| 15 | 12 Wochen | 1,82 kg | Mix Kalifornier und Weißer Neuseeländer |

Bei den Rassen „Weiße Neuseeländer“ und „Kalifornier“ handelt es sich laut dem „Zentralverband Deutscher Rasse-Kaninchenzüchter e.V.“ um mittelgroße Rassen (Aretz, 2008). Laut dem „Zentralverband Deutscher Rasse-Kaninchenzüchter e.V.“ zählt der „Deutsche Riese“ zu den großen Rassen, der „Graue Wiener“ zu den mittelgroßen Rassen sowie die „Kleinsilber“ zu den kleinen Rassen (Aretz, 2008).

Die exakte Zusammensetzung der im Folgenden erwähnten Puffer, Chemikalien und Lösungen sind unter Punkt IX Anhang (Methoden) genau aufgeführt. Die Herkunftsfirmen der benutzten Substanzen sind, wenn nicht direkt hinter dem Produkt vermerkt, unter Punkt IX Anhang (Methoden) aufgeführt.

2. Materialvorbereitung für konventionelle lichtmikroskopische, glykohistochemische und immunhistochemische Untersuchungen

Die Hodenproben von 12 nicht-geschlechtsreifen und 10 geschlechtsreifen Kaninchen für die konventionelle lichtmikroskopische, glykohistochemische und immunhistochemische Untersuchung wurden mit Hilfe von Rasierklingen auf einer Korkunterlage folgendermaßen präpariert. Die Hoden wurden längs bzw. quer halbiert. Anschließend wurden Gewebeproben von einer Dicke von 0,5x1,5x1,5 cm aus den Bereichen der Tunica albuginea, des Hodenparenchyms und des Rete testis entnommen. Unmittelbar nach dem Schneiden wurden die Gewebeproben in die jeweiligen Fixantien gegeben. Als Fixiermittel dienten Bouin'sche Lösung und „phosphate buffered saline solution“ (PBS)-gepufferte 4% Formalin-Lösung. *1. Fixierung in PBS-gepufferte 4% Formalin-Lösung:* Um eine optimale Fixierung zu erlangen, wurden die Gewebestücke 24 h lang bei Raumtemperatur in einer mit PBS gepufferten 4% Formalin-Lösung belassen. Anschließend wurde die Lösung einmal erneuert. Bevor die Proben für 5 Tage in 70% Alkohol gelegt werden konnten, mussten sie zum Auswaschen in PBS-Puffer überführt werden. *2. Fixierung in der Bouin'sche Lösung:* Die Proben wurden 24 h lang bei Raumtemperatur immersionfixiert. Am folgenden Tag wurden sie in 70% Alkohol überführt. Um die Pikrinsäure aus dem Gewebe zu entfernen, war es erforderlich, über 4 Tage hinweg den 70% Alkohol alle 24 h zu wechseln. Die Weiterverarbeitung erfolgte unabhängig von der Fixierung für alle Proben gleichermaßen: im Einbettungsautomat Shandon Duplex Processor® (Fa. Shandon, Frankfurt/Main) erfolgte über 24 h die Entwässerung der Proben über eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 80%, Ethanol 96%, Isopropanol) und einem Xylolbad sowie die Einbettung in Paraplast® (Fa. Monoject Scientific Inc., Kildare, Irland). Im Anschluss daran wurden die Proben mit dem Histostat-Tissue Embedding Centers® (Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich) in Paraplastblöcke gegossen. Daraufhin lagerten die Blöcke im Kühlschrank bei 6°C, bis unter Verwendung eines Mikrotoms (Rotationsmikrotom 1516®; Fa. Leitz, Wetzlar) 5 µm dicke Schnitte angefertigt wurden. Diese Schnitte wurden sowohl auf beschichtete Objektträger (Supra Frost Ultra Plus adhäsiv®, Fa. Menzel, Braunschweig) als auch unbeschichtete Objektträger (Supra Frost®, Fa. Menzel, Braunschweig) aufgezogen und auf einer Wärmeplatte bei 39°C getrocknet. Zur

vollständigen Trocknung wurden die Schnitte in einem Wärmeofen (Fa. Bender & Hobein, Karlsruhe) bei einer Temperatur von 35-40°C für 24 h gegeben. Danach wurden sie bei Zimmertemperatur gelagert. Die Schnitte wurden für Routinefärbungen, glykohistochemische und immunhistochemische Färbungen benutzt. Die unbeschichteten Objektträger dienten für die Übersichtsfärbungen, während die beschichteten Objektträger für die glykohistochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen verwendet wurden.

3. Histologische Routinefärbungen

3.1. Vor- und Nachbehandlung der Schnitte

Vor den entsprechenden Färbungen wurden alle Schnitte entparaffiniert und rehydriert. Dies geschah nach folgendem Protokoll (Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie der Ludwig-Maximilians-Universität LMU):

| | | |
|----|---------------------------------------|----------------------|
| 1. | Xylol in zwei separate Küvetten | je 10 min |
| 2. | Isopropanol in zwei separate Küvetten | kurz durchschwenken |
| 3. | 96% Alkohol | kurz durchschwenken |
| 4. | 70% Alkohol* | kurz durchschwenken* |
| 5. | Aqua destillata (Aqua dest.)* | kurz durchschwenken* |

*entfällt bei Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung

Nach der jeweiligen Färbung wurden die Präparate nach folgendem Protokoll (Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie der LMU) dehydriert:

| | | |
|----|--|------------------------|
| 1. | 70% Alkohol* | kurz durchschwenken* |
| 2. | 96% Alkohol** | kurz durchschwenken** |
| 3. | Isopropanol in zwei separate Küvetten*** | kurz durchschwenken*** |
| 4. | Isopropanol | kurz durchschwenken |
| 5. | Xylol in zwei separate Küvetten | je 5 min |

*entfällt bei Trichromfärbung nach Masson-Goldner und bei Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung**bei Trichromfärbung nach Masson-Goldner in 2 separate Küvetten ***bei Trichromfärbung nach Masson-Goldner in 3 separate Küvetten

Nun konnten die Schnitte mit je einem Tropfen Eukitt® (Fa. Riedel de Haen, Seelze), der auf ein dünnes Deckglasplättchen der Firma Menzel (Braunschweig)

gegeben wurde, eingedeckelt werden. Es wurden folgende Färbungen nach den Protokollen des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie der LMU durchgeführt:

3.2. Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Bei dieser Übersichtsfärbung zeigen sich alle basophilen Anteile blau gefärbt, während sämtliche azidophilen Strukturen rosarot gefärbt werden (Aescht & Büchl-Zimmermann, 2010a). Zur Kernfärbung wurden die Schnitte für 20 min in Hämalaun gegeben, kurz in Aqua dest. gespült und daraufhin zum Bläuen 20 min unter fließendes Leitungswasser gestellt. Schließlich werden die Schnitte für 10 min in ein Eosinbad gegeben und kurz in Aqua dest. gespült. Um den Erfolg der Färbung zu überprüfen, wurde als Kontrolle ein Schnitt eines anderen Gewebes mit bekannten Färbereigenschaften (Nebenhodens des Hundes) verwendet.

3.3. Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 und pH 1,0

Die Alcianblau-Färbung bei einem pH-Wert von 2,5 eignet sich gut für die Darstellung von sauren Mukosubstanzen. Sie stellen sich in blauer Farbe dar, während sich die Kerne mit Kernechtrot hellrot und der Hintergrund rosa präsentieren. Um eine Differenzierung von Karboxyl- und Sulfatgruppen vornehmen zu können, musste die Färbung jedoch bei einem pH-Wert von 1,0 wiederholt werden. Durch das Senken des pH-Wertes erscheinen nur noch sulfatierte Mukosubstanzen blau (Aescht & Büchl-Zimmermann, 2010a). Um eine Differenzierung zu ermöglichen, wurden für diese beiden Färbungen Folgeschnitte ausgesucht. Die Präparate wurden für 3 min in 3% Essigsäure (bei Alcianblau-Färbung bei pH 2,5) bzw. für 3 min in 0,1N Salzsäure (bei Alcianblau-Färbung bei pH 1,0) gegeben. Anschließend wurden sie 30 min in 1% Alcianblau 8GX (pH 2,5 oder pH 1,0 je nach Färbung) gefärbt. Daraufhin mussten die Schnitte in 3% Essigsäure und Aqua dest. (Alcianblau-Färbung bei pH 2,5) bzw. 0,1N Salzsäure und Aqua dest. (Alcianblau-Färbung bei pH 1,0) kurz abgespült werden. Nach dem Verbringen in Kernechtrot (Fa. Merck, Darmstadt) für 4 min erfolgte ein kurzes Spülen in Aqua dest. Als Positivkontrolle diente ein Schnitt des Endometriums des Rindes.

3.4. Trichromfärbung nach Masson-Goldner

Diese Übersichtsfärbung ist besonders geeignet für die Darstellung von kollagenen Bindegewebsfasern, die sich grün darstellen. Die Kerne zeigen sich

durch das Eisenhämatoxilin nach Weigert braun-schwarz und das Zytoplasma der Zellen ziegelrot. Die Erythrozyten präsentieren sich orange-gelb (Aescht & Büchl-Zimmermann, 2010a). Nachdem die Schnitte für 1 min in Eisenhämatoxylin nach Weigert gegeben worden war, wurden sie in Aqua dest. und in fließendem Leitungswasser (10 min) gut gespült. Nach einem fünfminütigem Aufenthalt in Azophloxin, erfolgte ein gründliches Ausspülen in 1% Essigsäure, bevor die Schnitte in Phosphormolybdänsäure-Orange überführt wurden. Der Aufenthalt dort schwankte zwischen 5 min und 25 min, da die Entfärbung des Bindegewebes, die lichtmikroskopisch überwacht wurde, unterschiedlich schnell voranschritt. Hierauf erfolgten ein Ausspülen mit 1% Essigsäure und eine Gegenfärbung des Bindegewebes mit Lichtgrün für 5 min, an die sich wiederum ein Spülen mit 1% Essigsäure anschloss. Als Positivkontrolle wurde ein Schnitt der Haut des Rindes benutzt.

3.5. Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung

Diese Trichromfärbung eignet sich gut zur Darstellung von elastischen Fasern, die sich blau-schwarz zeigen. Das kollagene Bindegewebe färbt sich leuchtend rot an. Die Muskulatur präsentiert sich in gelber Farbe (Aescht & Büchl-Zimmermann, 2010a). Nach dem Entparaffinieren in Xylol (2x10 min) wurden die Schnitte in einer absteigender Alkoholreihe (Isopropanol, 96% Alkohol, 80% Alkohol) kurz durchgeschwenkt und anschließend für 25 min in die Resorcinfuchsin-Lösung gegeben. Nach 1 min unter fließendem Leitungswasser wurde eine Kernfärbung in Eisenhämatoxilin nach Weigert für 3 min vorgenommen und die Schnitte in Aqua dest. kurz gespült. Im Anschluss wurden die Präparate wiederum für 10 min in fließendem Leitungswasser gespült und daraufhin für 5 min in Pikrinsäure-Thiazinrot verbracht. Im Folgenden erfolgte ein Ausspülen in Aqua dest. und eine Differenzierung in 96% Alkohol. Da diese unterschiedlich schnell voranschritt, war hier eine lichtmikroskopische Kontrolle notwendig. Nach kurzem Schwenken in Isopropanol und Verbringen in Xylol (2x5 min) wurden die Präparate eingedeckelt. Als Positivkontrolle wurde ein Schnitt der Prostata der Ratte verwendet.

3.6. Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Färbung) nach McManus ohne und nach Amylase-Verdau

Diese Färbung dient zum Nachweis von Aldehydgruppen, die durch Oxidation

von Glykogen mit Perjodsäure entstehen. Dadurch können kohlenhydratreiche Makromoleküle (Glykogen, Glykolipide, Glykoproteine, Mukopolysaccharide) erkannt werden. Die Aldehydgruppen bilden mit dem Schiff'schen Reagenz einen purpurroten Farbkomplex. Die PAS-positiven Substanzen erscheinen damit rosa bis violett-rot (Aescht & Büchl-Zimmermann, 2010a). Für diese PAS-Färbungen wurden Folgeschnitte verwandt, um identische Strukturen vergleichen zu können. Für eine PAS-Färbung ohne Amylase-Verdau wurden die Schnitte für 5 min in eine 0,5% wässrige Lösung von Perjodsäure verbracht und anschließend mit Aqua dest. kurz gespült. Daraufhin wurden die Präparate für 15 min in Schiff'sches Reagenz (Fa. Merck, Darmstadt) eingestellt. Nach einem Bad in Schwefeloxidwasser (3x2 min in 3 Küvetten) wurden die Schnitte 5 min lang in fließendem Wasser gespült. Zur Kernfärbung wurden die Schnitte in Hämalaun (5 min) gegeben und für 15 min unter fließendem Leitungswasser verbracht. Für eine PAS-Färbung mit Amylase-Verdau wurden die Schnitte in einer Feuchtkammer mit je 100 µl 0,5% Amylase bestückt und für 10 min bei 37°C in einen Wärmeofen verbracht. Die Präparate wurden danach mit Aqua dest. abgespült und dem oben beschriebenen Protokoll „PAS-Färbung ohne Amylase-Verdau“ unterzogen. Die PAS-Färbung mit Amylase-Verdau dient zum Erkennen von Glykogen: bei den Substanzen, die nach dieser Vorbehandlung noch positiv reagieren, handelt es sich deshalb nicht um Glykogen. Als Positivkontrolle diente jeweils ein Schnitt des Endometriums des Rindes.

3.7. Sirius Red-Färbung

Laut Wehrend et al. (2004) ist eine Sirius Red-Färbung geeignet, um selektiv eosinophile Granulozyten anzufärben. Die eosinophilen Granula zeigen eine rote Anfärbung. Nach dem Verbringen der Schnitte in Hämatoxylin für 10 min wurden sie 15 min lang gewässert. Danach wurden die Präparate nach kurzem Schwenken in 70% Alkohol für 1 h in Sirius Red verbracht. Als Positivkontrolle diente ein Schnitt des Endometriums des Rindes.

3.8. Auswertung

Die Auswertung erfolgte an einem Lichtmikroskop Aristoplan® der Firma Leitz, Wetzlar. Mit der Kamera Lumenera USB Camera Release 3.8® (Fa. Lumenera Corporation, Ontario, Kanada) wurden die lichtmikroskopischen Fotografien angefertigt.

4. Glykohistochemische Untersuchungen

Für die glykohistochemischen Untersuchungen wurden ausschließlich Bouin-fixierte Schnitte verwendet. Der Nachweis von Kohlenhydratstrukturen im Hodengewebe wurde mit 16 Lektinen aus sechs Lektingruppen (Goldstein & Poretz, 1986; modifiziert nach Rüdiger & Gabius, 2009, Lohr et al., 2010, Gabius et al., 2011) geführt. Die Lektine sind in der Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Lektine

| <u>Gruppe I : D-Glukose bzw. D-Mannose bindende Lektine</u> | |
|---|--|
| ConA | Canavalia ensiformis Agglutinin (Schwertbohne) |
| LCA | Lens culinaris Agglutinin (Speiselinse) |
| PSA | Pisum sativum Agglutinin (Erbse) |
| <u>Gruppe II : D-Galaktose bindende Lektine</u> | |
| PNA | Arachis hypogea Agglutinin (Erdnuss) |
| VAA | Viscum album Agglutinin (Weißbeerige Mistel) |
| RCA-I | Ricinus communis Agglutinin (Rizinusbohne) |
| <u>Gruppe III: N-Acetyl-D-Glukosamin¹/N-Acetyl-Neuraminsäure² bindende² Lektine</u> | |
| WGA^{1,2} | Triticum vulgare Agglutinin (Weizenkeim) |
| WGAs¹ | Triticum vulgare Agglutinin (Weizenkeim) succinyliert |
| <u>Gruppe IV: N-Acetyl-D-Galaktosamin³/D-Galaktose bindende⁴ Lektine</u> | |
| SJA³ | Sophora japonica Agglutinin (Chinesischer Schnurbaum) |
| DBA³ | Dolichos biflorus Agglutinin (Afrikanische Pferdebohne) |
| SBA³ | Glycine max Agglutinin (Sojabohne) |
| GSL-I³ | Griffonia simplicifolia Agglutinin (Afrikanische Schwarzbohne) |
| SNA^{3,4} | Sambucus nigra Agglutinin (Schwarzer Holunder) |
| <u>Gruppe V: L-Fukose bindende Lektine</u> | |
| UEA-I | Ulex europaeus Agglutinin (Europäischer Stechginster) |
| <u>Gruppe VI: Lektine mit Bindungsstellen für Oligosaccharide</u> | |
| PHA-E | Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (Gartenbohne) |
| PHA-L | Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (Gartenbohne) |

4.1. Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierte Lektine

Der Nachweis mit FITC konjugierten Lektine ist eine direkte Methode: das jeweilige Lektin ist direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt und bindet seinerseits an das für sie spezifische Zuckermolekül. In dieser Arbeit kamen die in der Tabelle 9 aufgeführten FITC-markierten Lektine (Fa. Vector, Burlingame, USA) zur Anwendung:

Tabelle 9: Verwendete Konzentration und Positivkontrolle bei den verwendeten FITC-markierten Lektine

| Lektin | Konzentration | Positivkontrolle |
|---------------------------|---------------|--------------------------------------|
| ConA | 1 µg/ml | Nebenhoden Hund (Ductus epididymis) |
| LCA, UEA-I | 10 µg/ml | Nebenhoden Hund (Ductus epididymis) |
| GSL-I | 5 µg/ml | Nebenhoden Hund (Ductuli efferentes) |
| PNA, WGA | 1 µg/ml | Ovar Wachtel |
| RCA-I | 5 µg/ml | Ovar Wachtel |
| WGAs, SBA | 10 µg/ml | Ovar Wachtel |
| DBA | 10 µg/ml | Nebenhoden Hund (Ductuli efferentes) |
| SJA, PHA-E, PHA-L, PSA | 5 µg/ml | Nebenhoden Hund (Ductus epididymis) |

Dem Nachweis von Glykokonjugate gingen folgende Arbeitsschritte des Entparaffinierens und Dehydrierens voraus (Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie der LMU):

| | | |
|----|------------------------------------|---------------------|
| 1. | Xylol in 2 separate Küvetten | je 30 min |
| 2. | Isopropanol in 2 separate Küvetten | kurz durchschwenken |
| 3. | 96% Alkohol | kurz durchschwenken |
| 4. | 70% Alkohol | kurz durchschwenken |
| 5. | Aqua dest. in 2 separate Küvetten | je 5 min |
| 6. | PBS in 3 separate Küvetten | je 3 min |

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte mussten im Dunklen ausgeführt werden, da der Farbstoff FITC unter Lichteinwirkung schnell verblasst. Nachdem die zu untersuchenden Schnitte zum Schutz vor Austrocknung in eine Feuchtkammer

verbracht worden waren, wurden je 100 µl des in PBS-Puffer gelösten Lektins in der jeweiligen Konzentration (s. Tab. 9) aufpipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 60 min. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit PBS-Puffer für jeweils 5 min. Daraufhin konnten die Präparate mit Roti-Mount Fluor Care DAPI® (Fa. Roth, Hamburg) werden (Protokoll Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie der LMU). Da es sich hierbei um ein Eindeckmedium handelt, das nicht aushärtet, wurden die Ränder der dünnen Deckplättchen (Fa. Menzel, Braunschweig) mit handelsüblichem Nagellack verschlossen. Bis zu Auswertung wurden die Präparate in einem lichtundurchlässigen Plastikbehälter im Kühlschrank bei 7°C gelagert.

4.2 Biotinylierte Lektine

Die biotinylierten Lektine VAA sowie SNA (alle Fa. Vector, Burlingame, USA) (Konzentrationen s. Tab. 10) wurden mit Hilfe der „Streptavidin-Biotin-Methode“ untersucht. Diese gründet auf eine beträchtliche Bindungsaffinität von Streptavidin zu Biotin. Bei Streptavidin handelt es sich um ein chemisch exakt definiertes Protein, das aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* gewonnen wird. Es bildet mit dem Farbstoff FITC einen Komplex. Das Vitamin Biotin ist bei dieser Methode an das Lektin gekoppelt. Trifft der Streptavidin-FITC-Komplex auf das Lektin samt Biotin, bindet Streptavidin an das Biotin Molekül. Durch die Markierung des Streptavidin mit dem Fluoreszenzfarbstoff wird die Bindungsstelle sichtbar.

Tabelle 10: Konzentration und Positivkontrolle bei den verwendeten biotinylierten Lektinen

| Lektin | Konzentration | Positivkontrolle |
|--------|---------------|------------------|
| SNA | 2 µg/ml | Ovar Wachtel |
| VAA | 2,5 µg/ml | Ovar Wachtel |

Zunächst wurden die Schnitte, wie unter 4.1.1 aufgeführt, entparaffiniert, rehydriert und mit PBS-Puffer gewaschen. Nachdem die Objektträger in eine Feuchtkammer überführt und mit fusselfreiem Papier getrocknet worden waren, konnten die Proben mit einigen Tropfen von Dako Protein Block Serum Free® (Fa. Dako, Hamburg) bedeckt werden. Dies hatte zum Ziel, die

Hintergrundfärbung zu reduzieren. Dabei betrug die Inkubationszeit bei Raumtemperatur 10 min. Im Anschluss daran wurden je 100µl des mit PBS verdünnten biotinylierten Lektins in der jeweiligen Konzentration (s. Tab. 10) auf die Schnitte aufgebracht. Es folgte eine Inkubation von 60 min in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Schließlich wurden die Schnitte dreimal für je 5 min in PBS-Puffer gewaschen. Die folgenden Arbeitsschritte mussten wieder im Dunklen stattfinden, um den Farbstoff vor Lichteinwirkung zu schützen. Es erfolgte das Verdünnen des Streptavidin/FITC (Fa. Dako, Hamburg) im Verhältnis 1:500 sowie das Auftragen des Komplexes von je 100µl auf die Proben. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei Raumtemperatur und erfolgte in der Feuchtkammer. Abschließend wurden die Präparate dreimal je 10 min in PBS-Puffer gewaschen (Protokoll Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie der LMU). Das Eindeckeln und die Lagerung erfolgten auf gleicher Weise wie bei den FITC-markierten Lektinen.

4.3 Hemmzucker

Bei denjenigen Lektinen, bei denen eine Bindungsfähigkeit mit dem Hodengewebe nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob sich diese mit dem korrespondierenden Zuckermolekül vermindern oder hemmen ließ. Auf diese Weise konnte die Spezifität der Lektine genauer beurteilt werden. Dafür wurde der Hemmzucker in PBS verdünnt (Konzentration s. Tab. 11) und mit den ebenfalls in PBS verdünnten korrespondierenden Lektin für 30 bzw. 60 min inkubiert.

Tabelle 11: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Hemmzucker

| Lektin | Hemmstoff (Firma) | Konzentration | Inkubationszeit |
|--------------------------|---|---------------|-----------------|
| WGA, WGAs | Chitin-Hydrosylat (Fa. Vector, Burlingame, USA) | 0,4M | 30 min |
| ConA, LCA, PSA | Methyl- α -Mannopyranoside (Fa. E-Y Labs, San Mateo, USA) | 0,4M | 1 h |
| PNA, RCA-I, GSL-I | Methyl- α -D-Galaktopyranoside (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) | 0,4M | 1 h |
| PHA-E, PHA-L | Essigsäure (Fa. Roth, Karlsruhe) | 0,4M | 1 h |

Für die Lektine PHA-E und PHA-L hat sich Essigsäure (Fa. Roth, Karlsruhe) als geeignet erwiesen. Anschließend wurden je 100 µl der Lektin-Inhibitor Lösung auf je zwei Schnitte aufgebracht. Diese waren nach dem unter 4.1.1 näher erläuterten Arbeitsschritten entparaffiniert, dehydriert und mit PBS gewaschen worden. Auf je einem Präparat wurde als Positivkontrolle das Lektin ohne Inhibitor aufgebracht (Protokoll Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie der LMU). Das weitere Vorgehen bzw. Lagerung entspricht ebenfalls dem unter 4.1.1 beschriebenes Schema.

4.4. Positivkontrollen

Um festzustellen, ob die zu untersuchenden Lektine binden, wurde für jedes Lektin eine Positivkontrolle angefertigt. Es wurden Gewebeproben verwendet, bei denen eine positive Reaktion des jeweiligen Lektins bekannt ist (Tabelle 9,10).

4.5. Negativkontrollen

Um eine Eigenfluoreszenz des zu untersuchenden Gewebes auszuschließen, wurden bei jedem Lektin Negativkontrollen durchgeführt. Dazu wurde jeweils ein Schnitt anstelle des Lektins mit 100 µl PBS-Puffer beschichtet. Ansonsten waren sämtliche Arbeitsschritte identisch.

4.6. Auswertung

Alle Lektine wurden an dem Fluoreszenzmikroskop Dialux 20® (Fa. Leitz, Wetzlar) ausgewertet. Die semiquantitative Auswertung der Reaktionsintensität erfolgte nach folgendem Schema: -negativ +/-schwach positiv +deutlich positiv ++stark positiv +++sehr stark positiv. Zusätzlich wurde erhoben, wie regelmäßig in einem Tier bzw. in allen Tieren die Struktur als positiv oder negativ beurteilt werden konnte. Dabei wird zwischen „regelmäßig“ (Färbung in allen Strukturen zu beobachten), „unregelmäßig“ (Färbung nicht in allen, aber in Mehrzahl der Strukturen zu beobachten) sowie „selten“ (Färbung in der Minderzahl der Strukturen zu beobachten) unterschieden. Auch wurde berücksichtigt, wie gleichmäßig eine Struktur gefärbt wurde: es wurde beachtet, ob eine Zelle homogen angefärbt wurde oder ob etwa nur der basale Teil markiert wurde. Alle diese Angaben finden sich in der Tabelle unter „Reaktionsintensität“, „Regelmäßigkeit der Reaktion“ sowie „Besonderheit der Reaktion“. Die Fotografien wurden mit der daran angeschlossenen Kamera ProgRes® (Fa. Jenoptik, Jena) geschossen.

5. Immunhistochemische Untersuchungen

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden ausschließlich Bouin-fixierte Schnitte herangezogen. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper

| Antigen | AK-liefernde Tierart ^(Firma) | Verdünnung | Sekundär-AK ^(Firma) | Verdünnung |
|------------------------------------|---|------------|---|------------|
| Progesteron (monoklonal) | Maus ¹ | 1:200 | Anti Maus IgG (f(ab') ₂) Kaninchen ² | 1:300 |
| α-SMA (monoklonal) | Maus ² | 1:40 | Anti Maus IgG (f(ab') ₂) Kaninchen ² | 1:300 |
| Vimentin (monoklonal) | Maus ² | 1:500 | Anti Maus IgG biot. Kaninchen ² | 1:300 |
| Panzytokeratin (monoklonal) | Maus ³ | 1:100 | Anti Maus IgG (f(ab') ₂) Kaninchen ² | 1:300 |
| CK 5 (polyklonal) | Meerschweinchen ⁴ | 1:50 | Anti Meerschweinchen IgG biot. Ziege ² | 1:300 |
| CK 8 (monoklonal) | Maus ⁵ | 1:500 | Anti Maus IgG biot. Kaninchen ² | 1:300 |
| CK 14 (polyklonal) | Meerschweinchen ⁴ | 1:50 | Anti Meerschweinchen IgG biot. Ziege ² | 1:300 |
| CK 18 (monoklonal) | Meerschweinchen ⁴ | 1:200 | Anti Meerschweinchen IgG biot. Ziege ² | 1:300 |

Firmen der antikörperliefernden Tierart: ¹Fa. Becman Coulter, Krefeld; ²Fa. Dako, Hamburg; ³Fa. Biocarta, Hamburg; ⁴Fa. Progen, Heidelberg; ⁵Fa. Novus Biologics, Littleton, USA; Abkürzung: AK Antikörper

5.1. Avidin-Biotin-Complex-Methode

In dieser Arbeit wurde die sog. Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode) nach Hsu et al. (1981) gebraucht. Diese fußt auf der hohen Bindungsaffinität von

Avidin zu dem Vitamin Biotin. Avidin ist in der Lage, vier Moleküle Biotin zu binden und kann wie in dieser Arbeit durch Streptavidin ausgetauscht werden. Der Primärantikörper, der mit dem gesuchten Antigen reagiert, wird über einen biotinylierten Sekundärantikörper an einen Komplex aus Streptavidin und einer biotinylierten Peroxidase (in dieser Arbeit ein Streptavidin-Biotin-Horseradish-Komplex) gebunden. Die Reaktionspartner Streptavidin und Peroxidase sind in einem solchen Verhältnis gemischt worden, dass noch einige Biotin-Bindungsstellen unbesetzt bleiben. Diese können mit dem Biotin des Sekundärantikörpers in Kontakt treten. Daraufhin wird die Aktivität der Peroxidase durch die Zugabe von 3,3-Diaminobenzidin (DAB) sichtbar gemacht. Das Enzym Peroxidase spaltet zunächst das zugegebene Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff. Letzter oxidiert das Substrat DAB zu einem braunen Farbprodukt. Dieses zeigt eine Antigen-Antikörper-Bildung und somit ein Immunreaktion an. Die Vorbereitung für immunhistochemische Färbungen ist, unabhängig, welches Antigen nachgewiesen werden soll, identisch und läuft nach folgendem Protokoll (Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie der Ludwig-Maximilians-Universität München) ab:

| | |
|---|----------------|
| Verbringen der Objektträger in Wärmeschrank bei 37°C | 24 h |
| Entparaffinieren in Xylol in 2 separate Küvetten | je 30 min |
| Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe: Isopropanol in 2 separate Küvetten (96% Alkohol; 70% Alkohol) | Durchschwenken |
| Rehydrieren in Aqua dest. | je 5 min |
| Dreimaliges waschen in PBS | je 5 min |

Anschließend wurde mindestens eine Vorbehandlung durchgeführt: das Einsetzen von Trypsin, Citratpuffer und Proteasen hatten zum Ziel, die gesuchten Antigene im Gewebe zu demaskieren. Tabelle 13 gibt darüber Auskunft, welche Vorbehandlung bei welchem Antikörper durchgeführt wurde. *1. Vorbehandlung mit Trypsin:* Dafür wurden je 100 ml Trypsin (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) auf den Schnitt aufgebracht und 20 min bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger in PBS-Puffer gewaschen (3x5 min). *2. Vorbehandlung mit Citratpuffer in der Mikrowelle:* Dafür wurden die Schnitte in Citratpuffer gegeben und in einer Mikrowelle bis zum Kochen erhitzt. Dabei wurde geachtet, dass die Schnitte immer von der Flüssigkeit des Puffers bedeckt waren. Danach mussten die Präparate 20 min bei Raumtemperatur

abkühlen, bevor sie drei Mal in PBS-Puffer gewaschen werden konnten.

3. *Vorbehandlung mit 0,1% Protease*: Hier wurden 100 µl 0,1% Protease (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) auf jedem Schnitt aufgebracht und in der Feuchtkammer 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen in PBS für je 5 min.

4. *Hemmung der endogenen Peroxidase*: Peroxidasen finden sich in Gewebe, so dass versucht werden musste, diese endogenen Peroxidasen zu hemmen, um bei Zugabe des Streptavidin-Peroxidase Komplexes falsch-positive Reaktionen zu verhindern. Dabei wurden die Schnitte in einer Lösung von Hydrogenperoxid und Aqua dest. verbracht und dort für 10 min bei Raumtemperatur belassen. Danach wurden die Schnitte 10 min in fließendem Leitungswasser und drei Mal in PBS für je 5 min gewaschen.

Tabelle 13: Vorbehandlung der Schnitte für immunhistochemischen Untersuchungen

| Vorbehandlung | CK 8, Vimentin | Progesteron | α -SMA, CK 5, CK 14, CK 18 | Panzyto-keratin |
|-----------------------------|----------------|-------------|-----------------------------------|-----------------|
| Trypsin | - | - | - | X |
| Citratpuffer | - | X | - | - |
| 0,1% Protease | X | - | - | - |
| Hemmung endogene Peroxidase | X | X | X | X |

Legende: - diese Vorbehandlung wurde nicht durchgeführt, X diese Vorbehandlung wurde durchgeführt.

Nach der Vorbehandlung wurden die Schnitte, um unspezifische Hintergrundfärbungen zu minimieren, mit Dako Protein Block Serum Free with background reducing components® (Fa. Dako, Hamburg) benetzt. Die anschließende 10-minütige Inkubation erfolgte in der Feuchtkammer. Daraufhin wurden 100 µl des Primärantikörpers, verdünnt mit Dako Antibody Diluent® (Fa. Dako, Hamburg), auf jedem Schnitt aufgebracht. Die Konzentration ist aus der Tabelle 12 ersichtlich. Nun wurden die Präparate in der Feuchtkammer für 24 h bei 6°C und im Anschluss daran noch 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Hier stellte das Antigen α -SMA eine Ausnahme dar, das lediglich 60 min bei Raumtemperatur inkubiert werden musste. Nach dreimaligem Waschen in PBS für 5 min konnten die Sekundärantikörper aufgetragen werden. Um die

entsprechende Konzentration zu erreichen, wurden sie mit PBS-Puffer verdünnt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte über 30 min in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Nach Waschen in PBS (3x5 min) wurden je Schnitt drei Tropfen des Streptavidin-Biotin-Horseradish-Peroxidase Complex® (Fa. Dako, Hamburg) aufgeträufelt und dort für 30 min bei Raumtemperatur belassen. Daraufhin mussten die Schnitte in PBS gereinigt werden (3x5 min) und in eine DAB-Hydrogenperoxidlösung überführt. Dort blieben sie abgedunkelt für 8 min. Nach einem kurzen Waschen unter fließendem Leitungswasser wurden die Kerne gefärbt, indem die Schnitte 30 sec in Hämalaun und 10 min in Leitungswasser verbracht wurden. Nach Entwässern in einer aufsteigender Alkoholreihe und einem Xylolbad (2x10 min) wurden die Präparate mit Eukitt® (Fa. Riedel de Haen, Seelze), der auf ein Deckgläschen (Fa. Menzel, Braunschweig) gegeben wurde, eingedeckelt (Protokoll Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie der LMU). Bis zu Auswertung wurden die Präparate bei Raumtemperatur gelagert. Diese erfolgte an einem Lichtmikroskop Aristoplan® der Fabrik Leitz, Wetzlar.

5.2. Positivkontrolle

Um festzustellen, ob die Arbeitsschritte richtig erledigt wurden, musste für jedes Antigen eine Positivkontrolle angefertigt werden. Es wurden Gewebeproben verwendet, bei denen eine positive Reaktion bekannt ist. Tabelle 14 gibt Auskunft über die verwendeten Positivkontrollen.

Tabelle 14: Übersicht über die in der Immunhistochemie verwendeten Positivkontrollen

| <u>Primärantikörper</u> | <u>Positivkontrolle</u> |
|--|--------------------------------|
| Progesteron, CK 5, CK 8, CK 14, CK 18 | Ovar Rind |
| α-SMA, Vimentin | Ovar Wachtel |
| Panzytokeratin | Haut Rind |

5.3. Negativkontrollen

Um unspezifische Reaktion im Gewebe ausschließen zu können, wurden bei jedem Antigennachweis Negativkontrollen durchgeführt. Dazu wurde jeweils ein Schnitt anstelle des Primärantikörpers mit 100 μ l Dako Antibody Diluent® (Fa. Dako, Hamburg) beschichtet. Ansonsten waren sämtliche Arbeitsschritte

identisch.

5.4. Auswertung

Die semiquantitative Auswertung der Reaktionsintensität erfolgte nach folgendem Schema: -negativ +/-schwach positiv +deutlich positiv ++stark positiv +++sehr stark positiv. Zusätzlich wurde erhoben, wie regelmäßig in einem Tier bzw. in allen Tieren die Struktur als positiv oder negativ beurteilt werden konnte. Auch wurde berücksichtigt, wie gleichmäßig eine Struktur gefärbt wurde. Diese Angaben finden sich in der Tabelle unter „Reaktionsintensität“, „Regelmäßigkeit der Reaktion“ sowie „Besonderheit der Reaktion“. Die dort angeschlossene Kamera Lumenera USB Camera Release 3.8® (Fa. Lumenera Corporation, Ontario, Kanada) ermöglichte das Anfertigen von Fotografien

6. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Hodenproben für die Elektronenmikroskopie von fünf nicht-geschlechtsreifen und fünf geschlechtsreifen Kaninchen wurden auf einer Wachsunterlage mit zwei gegeneinander geführten Rasierklingen gewonnen. Dabei wurden aus dem Hodengewebe ca. 1x1x1 mm große Stücke präpariert. Direkt nach dem Schneiden wurden die Proben in Karnovsky-Lösung überführt und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C fixiert. Nach dreimaligem Waschen in Natriumcacodylat-Puffer (0,1M; pH-Wert 7,2) wurden die Proben mit 1% Osmiumtetroxid-1,5% Kaliumferrocyanid 2 h lang vorkontrastiert. Danach mussten die Gewebeproben drei Mal mit Natriumcacodylatpuffer (0,1M; pH-Wert 7,2) gespült werden. All diese Arbeitsschritte geschahen bei 4°C, während die nun folgenden Tätigkeiten bei Raumtemperatur und auf einen Schüttler erledigt werden konnten. Nach einer Dehydrierung in einer aufsteigender Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 90% Ethanol, je 30 min, Ethanol absolut, 3x30 min) erfolgte die schrittweise Einbettung. Zuerst wurden die Proben zwei Mal für je 15 min in Propylenoxid (Fa. Merck, Darmstadt), danach für 1 h in Propylenoxid und Polyembed in einem Verhältnis 2:1, dann über Nacht in Propylenoxid und Polyembed in einem Verhältnis 1:1, und abschließend 1h in reinem Polyembed verbracht. Nun konnten die Proben in Silikonformen der Firma Plano (Wetzlar) gefüllt und 18 h lang im Wärmeschrank bei 60°C polymerisiert werden. Das Schneiden der Semidünnschnitte (1µm) und Ultradünnschnitte (60nm) erfolgte an einem Ultramikrotom (Ultracut E®, Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich). Die Semidünnschnitte wurden mit

Methylenblau nach Richardson gefärbt und dienten zum Auffinden der gesuchten Bereiche im Hodengewebe. Die Ultradünnschnitte (Interferenzfarbe grau) wurden auf Kupfergrids (Standard-Copper-150mesh®, Fa. Polysciences, Eppelheim) aufgezogen und mussten nachkontrastiert werden. Dafür wurden die Schnitte 10 min in 2% Uranylacetat (Fa. Agar Scientific LTD, Essex, Großbritannien) und 3 min in Bleizitrat (Reynolds, 1963) gegeben werden (Protokoll Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie der LMU). Die Auswertung und das Anfertigen der Fotos erfolgten an einem Transmissionselektronenmikroskop (EM 902® (Fa. Zeiss, Oberkochen).

7. Histometrie und Parameter für Hodenentwicklung

7.1. Messung der Dicke der Hodenkapsel

Die Dicke der Hodenkapsel wurde bei 10 nicht-geschlechtsreifen und bei 10 geschlechtsreifen Kaninchen ermittelt. Dabei wurden je Kaninchen 10 Stellen mit Hilfe des Adobe Photoshop® untersucht. Gemessen wurde von der Tunica vaginalis bis zur Lamina propria der äußerst gelegenen Tubuli seminiferi contorti. Ein Wilcoxon-Rangsummentest (Signifikanzniveau $\alpha=0,10$) klärte ab, ob ein signifikanter Unterschied in der Dicke der Hodenkapsel zwischen nicht-geschlechtsreifen und geschlechtsreifen Tiere besteht.

7.2. Messung der Höhe des Keimepithels

Die Höhe des Keimepithels wurde für die Phasen I, II, III, IV, V-VII sowie VIII berechnet. Auch hierbei wurde das Programm Adobe Photoshop® verwendet. Es wurden die Schnitte von 10 geschlechtsreifen Kaninchen verwendet. Je Phase wurden 20 Tubuli untersucht. Dabei wurden möglichst runde Tubuli benutzt; aus jeweils vier Strecken pro Tubuli wurde ein Mittelwert berechnet. Um einen eventuellen signifikanten Unterschied in der Höhe des Keimepithels während der Phasen zu ermitteln, wurde eine Varianzanalyse (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$) durchgeführt.

7.3. Messung des Durchmessers der Tubuli seminiferi contorti

Der mittlere Tubulusdurchmesser wurde sowohl beim nicht-geschlechtsreifen als auch beim geschlechtsreifen Kaninchen berechnet. Mit Hilfe des Adobe Photoshop® wurden bei 10 geschlechtsreifen und 10 nicht-geschlechtsreifen Kaninchen je 15 möglichst runde Tubuli seminiferi contorti gemessen. Die Phase

des Keimepithelzykluses blieb bei der Auswahl der Tubuli seminiferi contorti unberücksichtigt, da die Varianzanalyse kein signifikanter Unterschiede bezüglich der Höhe des Keimepithelzykluses während der unterschiedlichen Stadien ergeben hatte. Es wurden sowohl Tubuli seminiferi contorti nahe der Hodenkapsel als auch nahe dem Rete testis untersucht. Laut Tsunenari und Kast (1992) spielt bei der Messung des Durchmessers der Tubuli von „Himalaya“ Kaninchen die Lage keine Rolle. Je Tubulus erfolgte die Messung an zwei Stellen. Ein Wilcoxon-Rangsummentest (Signifikanzniveau $\alpha=0,10$) klärte ab, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Durchmessern von geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Tieren besteht.

7.4. Berechnung des Prozentsatzes der Tubuli mit begonnener/abgeschlossener Lumenbildung

Bei allen nicht-geschlechtsreifen Kaninchen wurden an je 50 Tubuli seminiferi contorti untersucht, wie weit die Lumenbildung fortgeschritten ist. Dabei wurden drei Zustände unterschieden: 1. Lumenbildung nicht begonnen: keine deutlichen Vakuolen im Zytoplasma der Stützzellen erkennbar 2. Lumenbildung begonnen: Vakuolen mit unterschiedlichen Durchmesser erkennbar 3. Lumenbildung (weitgehend) abgeschlossen: zentraler Kanal deutlich erkennbar. Im Anschluss wurde der Prozentsatz ermittelt.

7.5. Berechnung des Prozentsatzes der Tubuli mit Spermatozyten, Spermatiden und Spermien

Bei allen nicht-geschlechtsreifen Kaninchen wurden an je 50 Tubuli seminiferi contorti untersucht, wie weit die Keimzellbildung fortgeschritten ist. Es wurde unterschieden: 1. nur Stützzellen und Spermatogonien vorhanden 2. leptotäne Spermatozyten vorhanden 3. zygotäne Spermatozyten vorhanden 4. pachytäne Spermatozyten vorhanden 5. runde oder elongierende Spermatiden vorhanden 6. Spermien vorhanden. Dabei wurden diejenige Keimzellart in die Berechnung mit eingeschlossen, die am weitesten entwickelt ist: bei einem Tubulus seminifer contortus mit Spermatozyten und runden Spermatiden wurden die Spermatiden in die Berechnung miteingeschlossen; bei einem Tubulus mit leptotäne und pachytänen Spermatozyten wurden die Keimzellen im Pachytän in die Auswertung eingehen. Im Anschluss wurde der Prozentsatz ermittelt.

IV. ERGEBNISSE

1. Ergebnisse der makroskopischen Untersuchungen

Die Hoden aller Kaninchen weisen eine spindelförmige Gestalt auf. Die Testes sämtlicher geschlechtsreifer und nicht-geschlechtsreifer Kaninchen sind in die Skrotaltaschen abgestiegen. Sie werden zur Gänze von einer Kapsel umgeben, die von derbem, weißem Charakter ist.

2. Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen

2.1. Hodenkapsel

Geschlechtsreife Kaninchen:

Die Hoden aller geschlechtsreifen Kaninchen werden vollständig von einer Hodenkapsel umhüllt. Diese weist folgenden, dreischichtigen Aufbau auf: die äußerste Lage stellt die Tunica vaginalis (Epiorchium) dar. Lichtmikroskopisch ist an diesem serösen Überzug nur das einschichtige Plattenepithel erkennbar. Die subepitheliale Zone von Bindegewebe hingegen, die ebenfalls in der Literatur beschrieben wird, kann von der sich anschließenden Tunica albuginea nicht unterschieden werden. Da es sich beim Epiorchium um eine sehr dünne Schicht handelt, wirkt es in konventionellen Färbungen unauffällig. Mit den immunhistochemischen Untersuchungen wie mit Antikörpern gegen CK 4, CK 8 sowie gegen Panzytokeratin (Bild 115) kann der Aufbau und Verlauf des Plattenepithels aber sehr gut verfolgt werden. An einigen Stellen ist die Tunica vaginalis durch die Materialentnahme oder bei den Färbungsvorgängen verloren gegangen. Diese erste Lage ist mit der darunterliegenden Tunica albuginea fest verbunden und geht ohne erkennbare Grenze in diese über. Die Tunica albuginea (Tunica fibrosa) stellt die breiteste und somit auffälligste Schicht der Hodenkapsel dar. Diese mittlere Lage ist aus straffem Bindegewebe aufgebaut. Ihr Hauptbestandteil sind demnach kollagene Fasern, die besonders gut in Spezialfärbungen wie der Trichromfärbung nach Masson-Goldner (Bild 2) oder der Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung (Bild 4) hervortreten. Bei der Trichromfärbung nach Masson-Goldner zeigen sich die kollagenen Fasern als dicke, grün gefärbte Schicht (Bild 2). Bei der Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung sind die kollagenen Fasern rot tingiert (Bild 4). Darüber hinaus findet

sich bei allen untersuchten Kaninchen eine Vielzahl von glatten Muskelzellen. Sie stellen sich in der Trichromfärbung nach Masson-Goldner orange-rot dar (Bild 2). Besonders gut jedoch ist der Verlauf und die Lage dieser kontraktiven Zellen in den immunhistochemischen Untersuchungen mit Antikörpern gegen α -SMA zu beobachten (Bild 94, 100). Die glatten Muskelzellen sind in zwei Lagen organisiert, die ihrerseits mehrere Schichten aufweisen. Die erste äußere Zone findet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum Epididymium. Sie verläuft zur Längsachse des Hodens (Bild 2). Die zweite innere Schicht liegt im mittleren Bereich der Tunica albuginea eingebettet und zieht als zirkuläre Zone entlang des Umfangs des Testis (Bild 2). Die beiden Lagen stehen somit im rechten Winkel zueinander. Getrennt werden die beiden Schichten durch kollagene Fasern oder zusätzlich durch kleinere Lymph- oder Blutgefäße (Bild 2). Die kontraktiven Zellschichten sind im gesamten Verlauf der Tunica fibrosa zu finden. Wie in der Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung gut zu verfolgen ist, besitzt die Tunica albuginea des Kaninchens neben kollagenen Fasern auch eine nicht unbeträchtliche Anzahl von elastischen Fasern, die sich bei dieser Färbung blau-schwarz zeigen (Bild 4). Als dritte Schicht der Hodenkapsel kann die Tunica vasculosa betrachtet werden, die den Tubuli seminiferi contorti anliegt und somit parenchymseitig verläuft. Sie schließt sich ohne erkennbare Grenze an die Tunica albuginea an. Sie besteht aus lockerem Bindegewebe, in dem Lymph- und Blutgefäße liegen (Bild 2). In dieser innersten Schicht der Organkapsel werden in der Regel keine glatten Muskelzellen gefunden. Im Bereich des Übergangs der Tunica albuginea zur Tunica vasculosa bzw. in der Tunica vasculosa selbst befinden sich unregelmäßig einige wenige heterotope-Leydig-Zellen (Bild 4). Sie liegen einzeln oder in kleinen Gruppen. Größere Ansammlungen dieser Leydig-Zellen können jedoch nicht beobachtet werden. Die Hodenkapsel der geschlechtsreifen Tiere erreicht eine durchschnittliche Dicke von 197,40 μm (Standardabweichung $s\pm 10,00$). Bei den nicht-geschlechtsreifen Kaninchen ist sie im Mittel nur 150,90 μm ($s\pm 16,36$) stark. Damit liegt laut Wilcoxon-Rangsummentest ein signifikanter Unterschied vor (Signifikanzniveau $\alpha=0,10$). Bei der PAS-Färbung nach McManus ohne bzw. nach Amylase-Verdau zeigt sich die Organkapsel violett-rot. Bei der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 und bei pH 1,0 wird lediglich bei dem pH-Wert von 2,5 eine Blaufärbung der extrazellulären Substanz der Hodenkapsel sichtbar. Mastzellen, deren Granula prinzipiell bei der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 anfärbbar sind, können nicht identifiziert werden.

Die Sirius Red-Färbung zum Nachweis von eosinophilen Granulozyten zeigt ebenfalls kein positives Ergebnis.

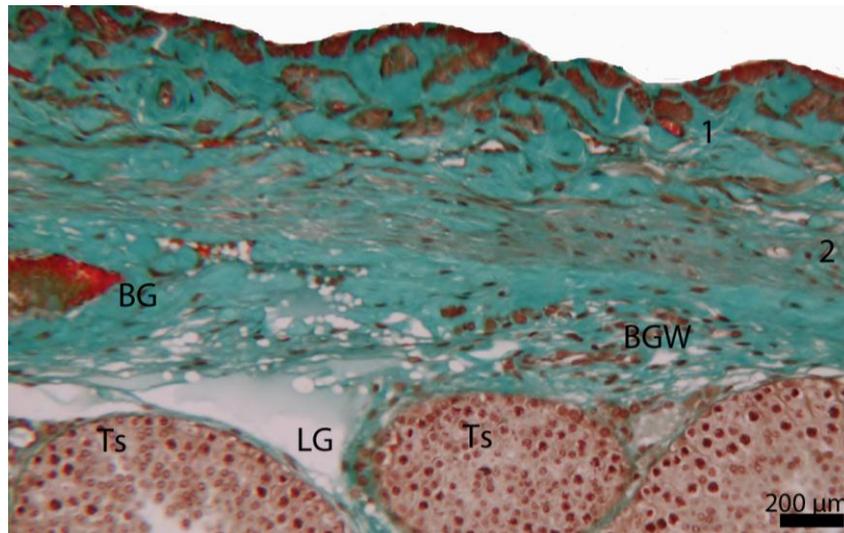


Bild 2: Hodenkapsel eines geschlechtsreifen Kaninchens. Trichromfärbung nach Masson-Goldner. SB=200 µm. Die Tunica albuginea aus vorwiegend kollagenen Fasern (grün) beinhaltet zwei senkrecht zueinander laufende Schichten von kontraktilen Zellen (rot), die längs (1) bzw. zirkulär (2) verläuft. Die Tunica vasculosa besteht aus lockerem Bindegewebe (BGW) mit Lymphgefäße (LG) und Blutgefäße (BG). Ts Tubuli seminiferi contorti

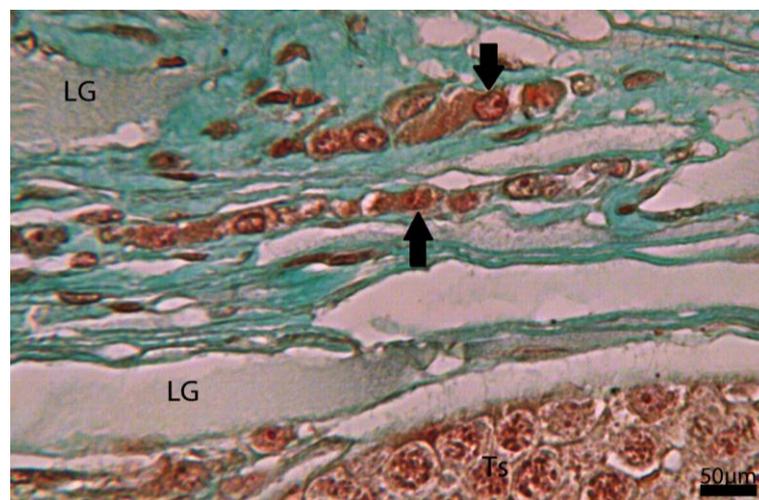
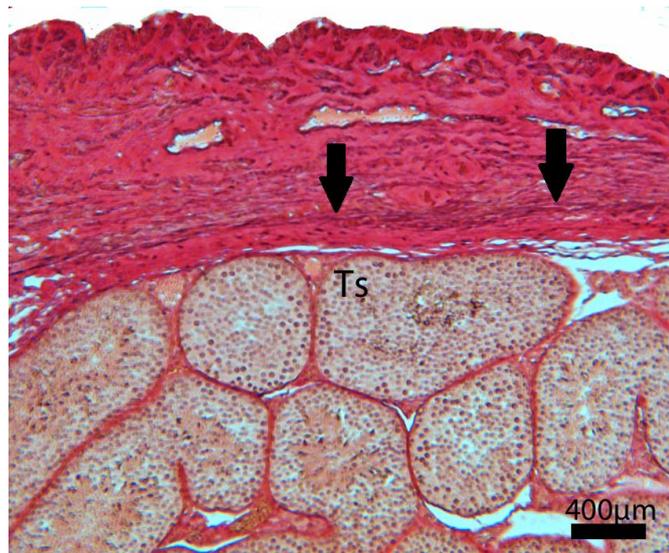


Bild 3: Heterotope Leydig-Zellen (Pfeile) in der Hodenkapsel eines geschlechtsreifen Kaninchens. Trichromfärbung nach Masson-Goldner. SB=50 µm. Ts Tubuli seminiferi contorti, LG Lymphgefäß



**Bild 4: Hodenkapsel eines geschlechtsreifen Kaninchens. Resorcin-fuchsin-
van Gieson-Färbung. SB=400 μ m. Die in dieser Färbung schwarz gefärbten
elastischen Fasern (Pfeile) treten deutlich hervor. Ts Tubuli seminiferi contorti.**

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Die Hoden sämtlicher nicht-geschlechtsreifer Tiere werden vollständig von einer dreischichtigen Hodenkapsel umschlossen. Die äußerste Lage stellt die Tunica vaginalis dar. Sie geht ohne erkennbare Grenze in die Tunica albuginea über. Diese bindegewebige Schicht ist vor allem aus kollagenen Fasern aufgebaut. Neben elastischen Fasern können auch glatte Muskelzellen gefunden werden. Diese sind in zwei Lagen angeordnet, die ihrerseits mehrere Schichten aufweisen. Die erste äußere Zone verläuft zur Längsachse des Hodens. Die zweite innere Schicht von glatten Muskelzellen befindet sich im mittleren Bereich der Tunica albuginea und zieht als zirculäre Zone entlang des Umfangs des Testis. Die dritte Schicht der Hodenkapsel, die Tunica vasculosa, befindet sich parenchymseitig. Sie besteht aus lockerem Bindegewebe, in dem Lymph- und Blutgefäße liegen. In dieser innersten Schicht der Hodenkapsel können in der Regel keine glatten Muskelzellen identifiziert werden. Im Bereich des Übergangs der Tunica albuginea zur Tunica vasculosa bzw. in der Tunica vasculosa selbst können unregelmäßig wenige heterotpe Leydig-Zellen. Sie treten nur gelegentlich einzeln oder in kleinen Gruppen auf. Wie der Wilcoxon-Rangsummentest bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,10$ zeigt, liegt ein signifikanter Unterschied in der Dicke der Hodenkapsel vor: die nicht-geschlechtsreifen Tiere besitzen mit $150,90 \mu\text{m}$ ($s+16,36$) eine dünnere Hodenkapsel als die geschlechtsreifen Kaninchen mit

einer durchschnittliche Dicke von 197,40 μm ($s\pm 10,00$). Bei der Spezialfärbung mit PAS nach McManus ohne bzw. nach Amylase-Verdau zeigt sich die Organkapsel violett-rot. Bei der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 und bei pH 1,0 wird lediglich bei dem pH-Wert von 2,5 eine Blaufärbung der extrazellulären Substanz der Hodenkapsel sichtbar. Mastzellen, deren Granula prinzipiell bei der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 anfärbbar sind, können nicht identifiziert werden. Die Sirius Red-Färbung zum Nachweis von eosinophilen Granulozyten zeigt ebenfalls kein positives Ergebnis.

2.2. Septulae testis und Lobuli testis

Geschlechtsreife Kaninchen:

Die Hodenkapsel der Kaninchen entlässt Septen ins Innere des Testis. Diese ziehen konvergierend in Richtung Mediastinum. Die Septen im Hoden sind zumeist von dünner, feiner Natur. Darüber hinaus sind sie in der Regel inkomplett. Sie lassen sich nicht durchgängig in ihrem Verlauf von der Organkapsel bis zum Mediastinum verfolgen und unterteilen deshalb das Hodenparenchym meist in nur undeutliche Läppchen. Letztere beherbergen die gewundenen Samenkanälchen der Hoden und das intertubuläre Kompartiment. An einigen wenigen Stellen jedoch sind die Septen von dickerer Beschaffenheit, wie etwa in der Nähe der Hodenkapsel. Hier kann eine Aufteilung des Parenchyms in Lobuli erkannt werden. Die Septen bestehen vor allem aus kollagenen Fasern, wie in der Trichromfärbung nach Masson-Goldner gut nachvollzogen werden kann. In der Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung ist zu beobachten, dass einige Septen von elastischen Fasern durchzogen werden. Die Septen führen Blut- und Lymphgefäße mit sich. Bei der Färbung mit PAS nach McManus ohne bzw. nach Amylase-Verdau zeigen sich die Septen violett-rot markiert. Bei der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 und bei pH 1,0 resultiert lediglich bei dem pH-Wert von 2,5 eine Blaufärbung der Septen.

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Von der Hodenkapsel aus verlaufen Septen ins Innere des Testis in Richtung Mediastinum (Bild 5). Da diese Septen in der Regel dünn und unvollständig sind, kann eine Einteilung des Hodenparenchyms in Läppchen nicht regelmäßig beobachtet werden.

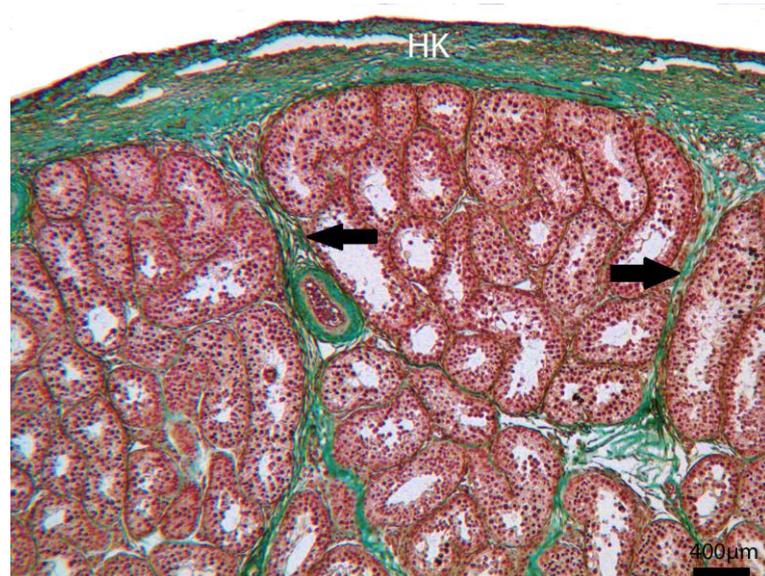


Bild 5: Septulae testis im Hoden eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Trichromfärbung nach Masson-Goldner. SB=400 μ m. Die Hodenkapsel (HK) entlässt Septen (Pfeile) ins Innere des Hodens. In dieser Färbung sind die kollagenen Fasern der Septen grün tingiert.

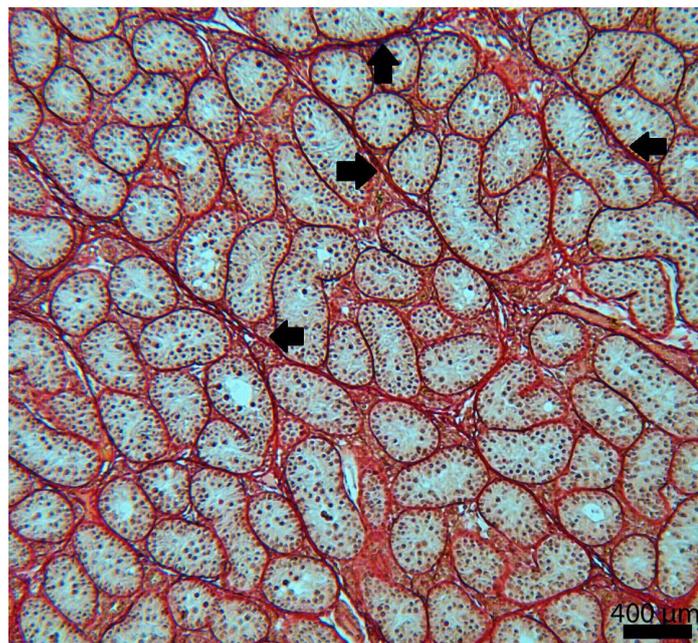


Bild 6: Septulae testis im Hoden eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung. SB=400 μ m. Neben kollagenen Fasern bestehen Septen (Pfeile) auch aus elastischen Fasern, die dieser Färbung schwarz tingiert sind.

Nur an einigen wenigen Stellen sind die Septen von dickerer Beschaffenheit. Hier kann eine Aufteilung des Parenchyms in Lobuli nachvollzogen werden. In den

Lobuli testis können die gewundenen Samenkanälchen und das intertubuläre Kompartiment unterschieden werden. Die Septulae testis sind vor allem kollagener Natur (Bild 5), aber auch einige elastische Fasern können identifiziert werden (Bild 6). Die Septen werden von Blut- und Lymphgefäße begleitet. Bei der PAS-Färbung nach McManus ohne bzw. nach Amylase-Verdau sind die Septen violett-rot markiert. Bei der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 und bei pH 1,0 kann lediglich bei dem pH-Wert von 2,5 eine Blaufärbung der Septen beobachtet werden.

2.3. Tubuli seminiferi contorti

Geschlechtsreife Kaninchen:

Die Tubuli seminiferi contorti sind die dominierende Struktur und nehmen den Hauptanteil des Hodenparenchyms ein (Bild 7).

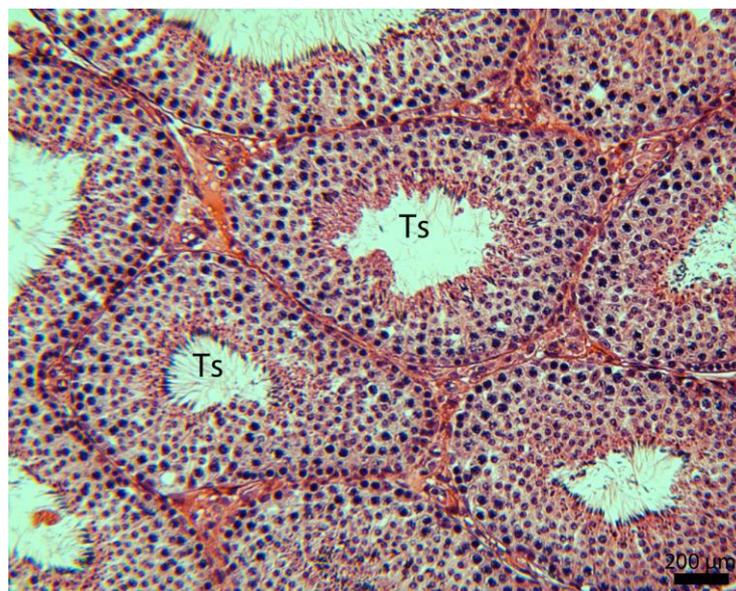


Bild 7: Hodenparenchym eines geschlechtsreifen Kaninchens. HE-Färbung. SB=200 µm. Die Tubuli seminiferi contorti (Ts) sind die dominierende Struktur des Hodenparenchyms.

Ein Tubulus seminifer contortus besteht aus dem Keimepithel und der Lamina propria. Letztere grenzt das gewundene Hodenkanälchen gegenüber dem Interstitium ab. Das Lumen des Tubulus seminifer contortus ist stets offen und meist frei von Inhalt. Nur in Einzelfällen finden sich dort Spermien oder degenerierte Zellen. Der Durchmesser des gewundenen Samenkanälchens in den Hoden eines geschlechtsreifen Tieres beträgt im Mittel 200,76 µm (s+/-7,27). Es weist damit laut Wilcoxon-Rangsummentest ($\alpha=0,10$) ein signifikant höheres

Kaliber auf als der Tubulus seminifer contortus des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens ($110,81 \mu\text{m}$; $s\pm 14,90$).

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Auch beim nicht-geschlechtsreifen Kaninchen prägen die Tubuli seminiferi contorti das Hodenpräparat (Bild 8).



Bild 8: Hodenparenchym eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=400 μm . Auch im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens dominieren die Tubuli seminiferi contorti (Ts) das histologische Bild des Präparats.

Der Tubulus seminifer contortus des nicht-geschlechtsreifen Tieres weist einen mittleren Durchmesser von $110,81 \mu\text{m}$ ($s\pm 14,90$) auf. Damit liegt laut Wilcoxon-Rangsummentest ein signifikanter Unterschied ($\alpha=0,10$) zwischen dem mittleren Durchmesser des Hodenkanals im geschlechtsreifen und im nicht-geschlechtsreifen Kaninchen vor. Das gewundene Samenkanälchen des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens wird wie auch beim adulten Tier durch eine Lamina propria begrenzt. In den Tubuli seminiferi contorti der nicht-geschlechtsreifen Kaninchen kann die Bildung der Lumina beobachtet werden. Dabei können mehrere Formen unterschieden werden: bei allen nicht-geschlechtsreifen Kaninchen findet sich eine unterschiedliche Anzahl von Tubuli seminiferi contorti, die weder ein Lumen noch deutliche Vakuolen als erste Anzeichen einer Kanalisierung aufweisen. Das Zytoplasma der Stützzellen ist in diesem Fall von schaumigem, aufgelockertem Charakter (Bild 9).

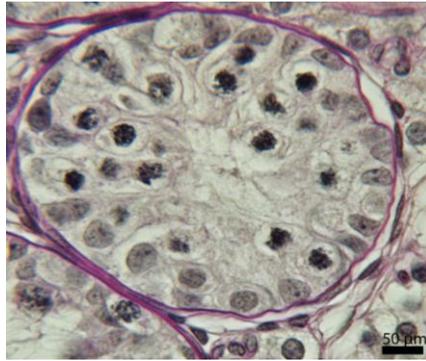


Bild 9: Tubulus seminifer contortus ohne Lumen eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50 µm. Dieser Tubulus seminifer contortus zeigt keine Anzeichen von Lumenbildung wie etwa deutliche Vakuolen auf.

Außerdem können zu einem gewissen Prozentsatz Tubuli seminiferi contorti beobachtet werden, die erste Anzeichen von einer Lumenbildung erkennen lassen: im Zytoplasma der Stützzellen sind Vakuolen mit unterschiedlichem Durchmesser zu beobachten. Diese könnten zentral, aber auch im mittleren Drittel des Epithels gelegen sein. Die Anzahl der Vakuolen variiert: einige Tubuli seminiferi contorti weisen nur eine, manche auch mehrere auf (Bild 10, 11). Ferner besitzen alle nicht-geschlechtsreifen Tiere eine gewisse Anzahl von Tubuli seminiferi contorti, die bereits einen deutlichen, zentral gelegenen Kanal erkennen lassen (Bild 12).



Bild 10: Tubulus seminifer contortus mit begonnener Lumenbildung eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50 µm. Eine Vakuole (Stern), die peripher im Tubulus gelegen ist, kann als erstes Anzeichen der Lumenbildung angesehen werden.

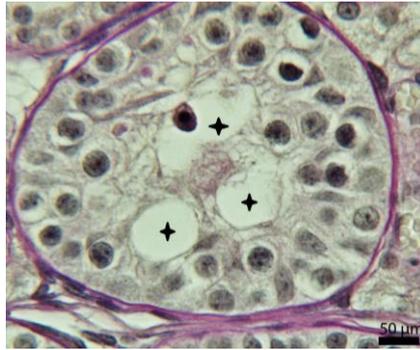


Bild 11: Tubulus seminifer contortus mit begonnener Lumenbildung eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50 µm. Drei Vakuolen (Sterne) mit unterschiedlichen Durchmessern können als erste Anzeichen der Lumenbildung im Tubulus seminifer contortus (Ts) angesehen werden.

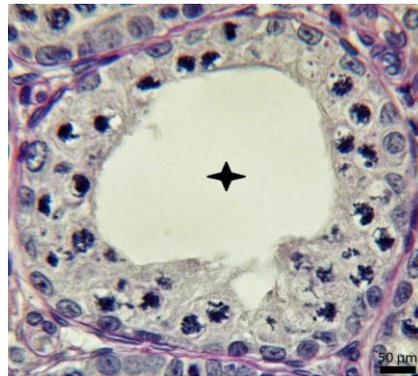


Bild 12: Tubulus seminifer contortus mit abgeschlossener Lumenbildung eines nicht-geschlechtsreifens Kaninchens, PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50 µm. Der Stern markiert den Kanal des Samenkanälchens.

Der Durchmesser des Lumens variiert. Einige Kanäle wirken wie die der adulten Tieren: sie werden von einem gleichmäßig hohem Keimepithel umgeben und das Lumen ist ohne Inhalt. Die Kanalbildung ist damit abgeschlossen. Bei einigen Tubuli seminiferi contorti hingegen scheint die Lumenbildung noch nicht ganz abgeschlossen zu sein: einzelne Zytoplasmastränge der Stützzellen können den eben geschaffenen Kanal des Tubulus seminifer contortus durchziehen. Ermittelt man die Anzahl der Tubuli seminiferi contorti ohne Lumen/mit erste Anzeichen einer Lumenbildung/mit (weitgehend) abgeschlossener Lumenbildung, so wird erkennbar, dass die Entwicklung der Lumenbildung je nach Kaninchen unterschiedlich weit fortgeschritten ist. Wie aus der Tabelle 15 ersichtlich, verfügen 7 von 10 Tieren in 60% der untersuchten Tubuli seminiferi contorti

bereits über einen deutlichen zentralen Kanal.

Tabelle 15: Prozentzahl der Tubuli seminiferi contorti ohne Lumen/mit begonnener Lumenbildung/mit (weitgehend) abgeschlossener Lumenbildung im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| Tier Nr. | Prozent Tubuli ohne Lumen | Prozent Tubuli mit begonnener Lumenbildung | Prozent Tubuli mit (weitgehend) abgeschlossener Lumenbildung |
|-----------------|----------------------------------|---|---|
| 1 | 5% | 30% | 65% |
| 2 | 5% | 23% | 72% |
| 3 | 9% | 48% | 43% |
| 4 | 16% | 18% | 66% |
| 5 | 2% | 34% | 64% |
| 6 | 11% | 44% | 45% |
| 7 | 9,5% | 4,5% | 86% |
| 8 | 63,9% | 26,5% | 9,6% |
| 9 | 7% | 25% | 68% |
| 10 | 2% | 28% | 70% |

Besonders bei Tier 7 ist die Entwicklung weit fortgeschritten. Hier besitzen 86% der begutachteten Hodenkanälchen einen deutlich erkennbaren zentralen Kanal (Bild 13). Bei Tier 8 hingegen weisen nur 9,6% der untersuchten Tubuli seminiferi contorti einen solchen auf (Bild 14). Tier 8 ist auch dasjenige, das zu 63,9% Samenkanälchen besitzt, die überhaupt keine Anzeichen von Lumenbildung aufweisen. Die Tubuli seminiferi contorti mit unterschiedlichem Entwicklungsstand können direkt nebeneinander liegen; zum Beispiel kann sich ein Tubulus seminifer contortus ohne Kanal neben einem Samenkanälchen mit einem zentralen Lumen befinden. Ferner können Tubuli seminiferi contorti beobachtet werden, deren Kanalbildung vollendet ist und keine Keimzellen mit fortgeschrittener Meiose aufweisen, während andere gewundene Samenkanälchen Spermatozyten im pachytänen Stadium besitzen, aber noch kein Lumen aufweisen. Die Tubuli seminiferi contorti, die elongierte Spermatiden aufweisen, sind stets vollständig kanalisiert.

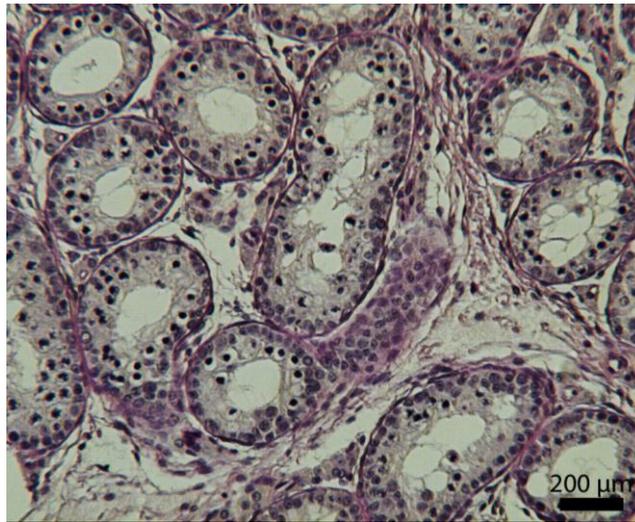


Bild 13: Hodenparenchym eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=200 μ m. Bei Tier 7 ist die Lumenbildung weit fortgeschritten: in diesem Präparat weist jedes Hodenkanälchen ein Lumen auf.

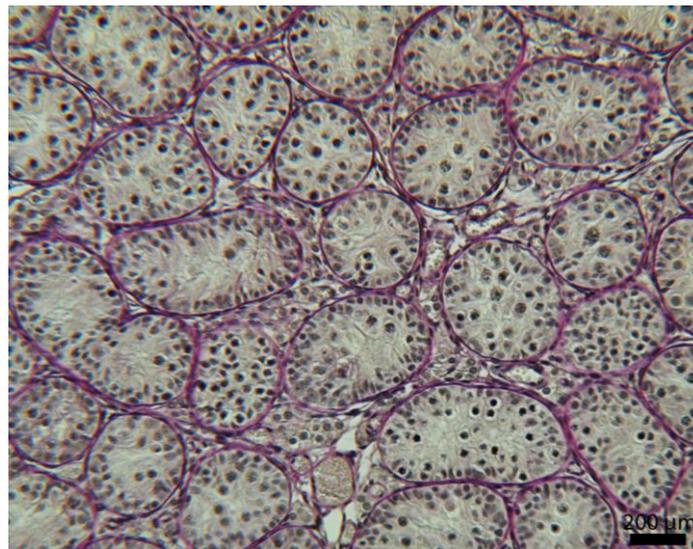


Bild 14: Hodenparenchym eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens, PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=200 μ m. Bei Tier 8 ist die Lumenbildung nicht weit fortgeschritten: in diesem Präparat weist kein Tubulus seminifer contortus ein Lumen auf.

2.3.1. Lamina propria

Geschlechtsreife Tiere:

Alle gewundenen Hodenkanälchen werden vollständig von einer Lamina propria umgeben (Bild 15, 16). Sie grenzt das Keimepithel vom intertubulären Kompartiment ab. An der Tunica propria sind folgende Lagen zu unterscheiden:

den Keimzellen und den Sertoli-Zellen des Hodenkanälchenepithels liegt eine innere azelluläre Schicht an. Dabei können lichtmikroskopisch lediglich kollagene Fasern identifiziert werden. Diese sind besonders gut in der Trichromfärbung nach Masson-Goldner zu erkennen. Wie in der Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung nachvollzogen werden kann, finden sich in dieser Lage auch einige elastische Fasern (Bild 16). Diese Zone wirkt in vielen Präparaten leicht gewellt. Daraufhin folgt eine mittlere Schicht mit myoiden Zellen. Die Kerne dieser kontraktilen Zellen sind länglich-abgeflacht. Sie sind optimal in der Immunhistochemie mit dem Antikörper gegen α -SMA zu sehen (Bild 94). Sie stellen die innere zelluläre Zone dar. Als letzte Schicht schließt sich eine Lage kollagener Fasern an. Sie ist in Trichromfärbung nach Masson-Goldner gut zu erkennen. Sie kann als äußere azelluläre Schicht bezeichnet werden.

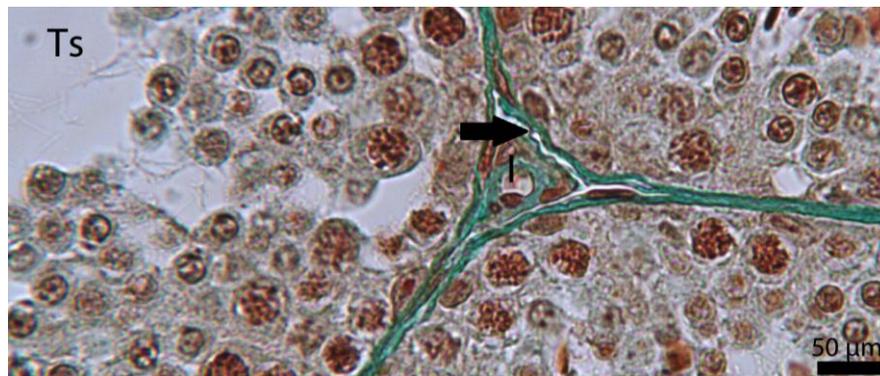


Bild 15: Lamina propria im Hoden eines geschlechtsreifen Kaninchens. Trichromfärbung nach Masson-Goldner. SB=50 μ m. Die Lamina propria (Pfeil) trennt den Tubulus seminifer contortus (Ts) vom Interstitium (I) ab. Die Lamina propria enthält kollagene Fasern, die sich in dieser Färbung grün anfärben.

Die einzelnen Lagen der Lamina propria lassen sich im Lichtmikroskop nur bei hoher Vergrößerung identifizieren. Bei schwacher Vergrößerung hingegen wirkt die Lamina propria als eine mehr oder weniger dicke homogene Schicht, die sich in der Trichromfärbung nach Masson-Goldner in grüner Farbe präsentiert (Bild 15). Die innere und äußere azelluläre Schicht ist in der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 moderat blau gefärbt. Nach einer Alcianblau-Färbung bei pH 1,0 tritt eine nur noch schwache Blaufärbung auf. Bei einer PAS-Färbung nach McManus ohne bzw. nach Amylase-Verdau ist die innere und äußere azelluläre Schicht deutlich violett gefärbt.

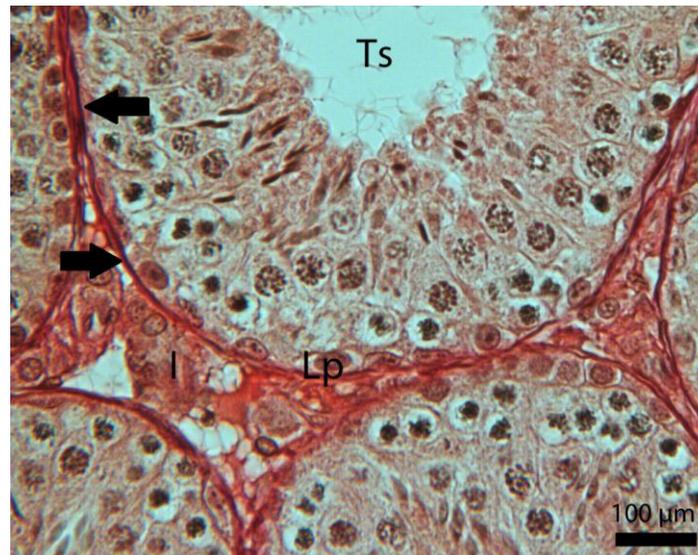


Bild 16: Lamina propria im Hoden eines geschlechtsreifen Kaninchens. Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung. SB=100 μm. Die Lamina propria (Lp) trennt den Tubulus seminifer contortus (Ts) vom Interstitium (I) ab. Die Lamina propria enthält elastische Fasern, die sich in dieser Färbung schwarz darstellen (Pfeile).

Nicht-geschlechtsreife Tiere:

Es sind lichtmikroskopisch bei hoher Vergrößerung folgende Lagen zu identifizieren: den Keimzellen und den Sertoli-Zellen benachbart befindet sich eine innere azelluläre Schicht aus kollagenen und einigen wenigen elastischen Fasern. Es schließt sich eine mittlere Schicht mit myoiden Zellen. Die Kerne dieser kontraktilen Zellen sind länglich-abgeflacht. Sie kann als innere zelluläre Zone angesehen werden. Als letzte Schicht schließt sich eine Lage kollagener Fasern an. Sie kann als äußere azelluläre Schicht bezeichnet werden. Bei schwacher Vergrößerung hingegen stellt sich die Lamina propria dicke homogene Schicht dar. Die innere und äußere azelluläre Schicht ist bei einer Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 moderat blau markiert. Bei einer Alcianblau-Färbung bei pH 1,0 kann eine nur noch schwache Blaufärbung beobachtet werden. Bei einer PAS-Färbung nach McManus ohne bzw. nach Amylase-Verdau ist die innere und äußere azelluläre Schicht deutlich violett gefärbt.

2.3.2. Keimepithel

Geschlechtsreife Kaninchen:

Das Keimepithel des geschlechtsreifen Kaninchens enthält zwei Klassen von

Zellen, nämlich Sertoli-Zellen und die verschiedenen Generationen von Keimzellen. Wie eine Varianzanalyse zeigt (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$), ist die Höhe des Keimepithels unabhängig von der Phase des Keimepithelzykluses (siehe Seite 90).

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Die Keimepithelien der nicht-geschlechtsreifen Kaninchen weisen Stützzellen und Keimzellen auf.

2.3.2.1. Sertoli-Zellen und primitive Stützzellen

Geschlechtsreife Tiere:

Neben den Keimzellen befinden sich im Keimepithel der gewundenen Samenkanälchen Sertoli-Zellen (Bild 17). Die Sertoli-Zelle des geschlechtsreifen Kaninchens sitzt der Basalmembran auf. Sie ist eine große, helle Zelle, deren apikalen und seitlichen Zytoplasmaausläufer (Processus) die Keimzellen aller Entwicklungsstufen umfassen und das Lumen des Tubulus seminifer contortus erreichen. Die Grenzen der Sertoli-Zelle sind in im Lichtmikroskop nicht zu identifizieren. Unregelmäßig ist in den HE- und PAS-gefärbten Schnitten schwach angefärbte Zellausläufer zu erkennen, die das Keimepithel Richtung Lumen durchziehen. Die Ammenzelle zeichnet sich durch die vielgestaltige Form ihres Kerns aus. Er kann eine birnenförmige, gestreckte oder längsovale Gestalt zeigen.

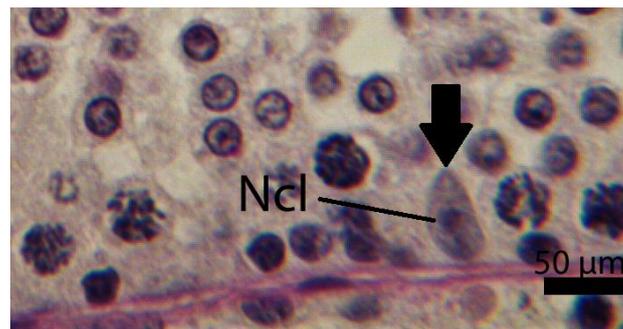


Bild 17: Kern einer Sertoli-Zelle im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50 μm. Charakteristisch für die Ammenzelle (Pfeil) ist sein hervorstechender Nukleolus (Ncl) zentral im Kern.

Der Nukleus der Sertoli-Zelle liegt in der Regel im basalen Drittel des Keimepithels. Die Längsachse des Kerns liegt senkrecht oder schräg zur Lamina

propria. Die Kernmembran ist deutlich erkennbar. Das Erkennungsmerkmal einer Sertoli-Zelle ist sein stark hervorstechender Nukleolus. Er ist rund und liegt in der Regel zentral im Kern (Bild 17). Zellorganellen sind lichtmikroskopisch nicht zu erkennen. Mit Hilfe der Immunhistochemie kann ein Teil des Zytoskeletts der Sertoli-Zellen dargestellt werden, wie etwa die Verteilung des Intermediärfilaments Vimentin (Bild 117).

Nicht-geschlechtsreife Tiere:

Das Zytoplasma der Stützzellen füllt im Tubulus seminiferi contortus ohne Lumenbildung diesen vollständig aus und umgibt dabei die Keimzellen (Bild 18).

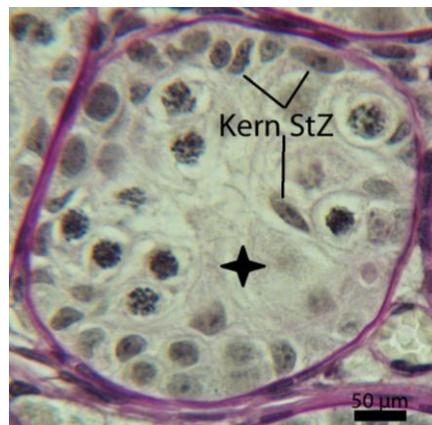


Bild 18: Stützzellen im Keimepithel eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50 µm. Das Zytoplasma der Stützzellen (Stern) nimmt einen Großteil der Zelle ein. Die Kerne der Stützzellen (StZ) können nahe der Lamina propria, aber auch im mittleren Drittel des Keimepithels liegen.

Das Zytoplasma der Stützzelle ist von aufgelockertem Aussehen und in den PAS- und HE-Färbungen durchwegs mäßig angefärbt. Wie bereits ausgeführt, besitzen einige Tubuli seminiferi contorti erste Anzeichen einer Lumenformation. Hier weist das Zytoplasma der Stützzelle eine bis mehrere Vakuolen von unterschiedlichem Durchmesser auf. Die Vakuolen können sich zentral, aber auch peripher im Samenkanälchen befinden. Auch in diesen gewundenen Kanälchen ist das Zytoplasma der Ammenzelle durch die HE- und PAS-Färbung moderat markiert. In den Samenkanälchen mit abgeschlossener Lumenbildung ohne fortgeschrittene Spermatogenese nehmen die Zytoplasmen der Stützzellen einen großen Anteil des Keimepithels ein und umsäumen zum Teil breitflächig den Kanal. In den Hodenkanälchen mit vollendeter Lumenbildung und

fortgeschrittener Spermatogenese ist der Anteil des Zytoplasmas der Stützzellen am Keimepithel stark zurückgedrängt. In den Tubuli seminiferi contorti ohne abgeschlossene Kanalbildung sowie ohne fortgeschrittene Spermiogenese (Bild 19) liegen die Kerne der Stützzellen zumeist im basalen Teil des Keimepithels.

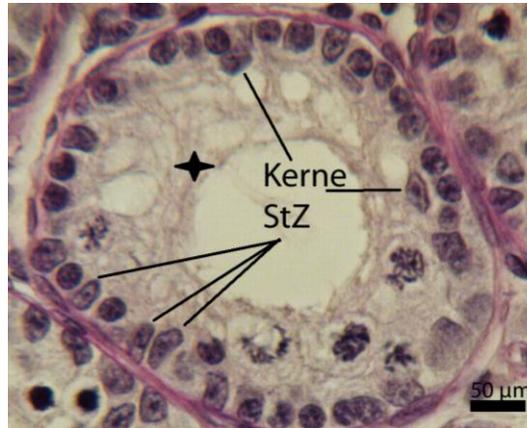


Bild 19: Stützzellen (StZ) im Keimepithel eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50 µm. Die Längsachsen der Ammenzellen können senkrecht oder parallel zur Lamina propria liegen. Der Nukleolus zentral im Kern ist deutlich erkennbar. Stern: Zytoplasma der Ammenzelle

Manchmal liegt der Nukleus der Ammenzelle auch im mittleren Drittel des Keimepithels und nur selten zentral im Tubulus seminifer contortus (Bild 18). Dabei handelt es sich jeweils um einzelne Kerne. Eine Anordnung aller Nuklei im mittleren Drittel bzw. im Zentrum wird indes nicht beobachtet. Der Kern tritt in vielfältiger Gestalt auf. Er kann ein ovales, längsovales, dreieckiges, viereckiges oder flammenförmiges Aussehen besitzen. Verschiedene Formen können auch in ein- und demselben Tubulus seminifer contortus auftreten. Die Längsachse des Kerns ist variabel. Sie kann senkrecht, parallel oder schräg zu der Lamina propria liegen (Bild 18, 19). Die meisten Stützzellen zeichnen sich durch einen deutlich dunkel angefärbten Nukleolus aus. Dieser liegt in der Regel zentral im Kern (Bild 18, 19). In den Hodenkanälchen mit fortgeschrittener Spermiogenese und zentralem Lumen liegen die Kerne der Ammenzellen stets im basalen Drittel des Keimepithels; im apikalen Drittel kann er indes nicht mehr angetroffen werden.

2.3.2.2. Keimzellen und Keimepithelzyklus

Geschlechtsreife Kaninchen:

Neben den Sertoli-Zellen befinden sich im Keimepithel in mehreren Schichten übereinander gelagert die Keimzellen. Bei allen geschlechtsreifen Kaninchen kann eine Spermienbildung beobachtet werden. Die Keimzellentwicklung verläuft über Spermatogonien, Spermatozyten (primäre und sekundäre Spermatozyten), Spermatiden (runde und elongierte) und endet mit den Spermien. Die Entwicklung beginnt basal an der Lamina propria des gewundenen Samenkanälchens und endet apikal am Lumen des Tubulus seminifer contortus. Dabei liegen Spermatogonien und präleptotäne Spermatozyten im basalen Teil des Tubulus seminifer contortus, während die in ihrer Entwicklung fortgeschrittenen Spermatozyten sowie Spermatiden und Spermien im mittleren und adluminalen Teil des gewundenen Hodenkanälchens gefunden werden können. Eine Differenzierung der Keimzellen gelingt anhand der Kernmorphologie sowie der Lage der Zelle im Keimepithel. Es lassen sich im Keimepithel des adulten Tieres A-, Intermediär (In)-, und B-Spermatogonien unterscheiden. Die Intermediär (In)-Spermatogonien gehen durch Mitosen aus den A-Spermatogonien hervor; durch mitotische Teilung der In-Spermatogonien wiederum entstehen B-Spermatogonien. Die A-Spermatogonie ist von ovaler oder dreieckiger Gestalt. Ihre Längsachse verläuft parallel zu der Lamina propria, deren Basalmembran die A-Spermatogonie aufsitzt. Die A-Spermatogonie besitzt mit durchschnittlich 9 µm den größten Zellkern aller Spermatogonien. Er kann eine ovale bis runde Gestalt zeigen und liegt meist zentral in der Zelle. Die Kernmembran ist gut erkennbar. Der in der Regel große, deutliche Nukleolus der A-Spermatogonie liegt oft zentral im Kern. Das Zytoplasma der Zelle färbt sich nur schwach eosinophil an. Die Längsachse der Intermediär (In)-Spermatogonie liegt wie die der A-Spermatogonie parallel zur Lamina propria. Die Zelle zeigt sich stärker abgerundet als die A-Spermatogonien. Der Kern der In-Spermatogonie weist mit 7 µm eine geringere Größe als der der A-Spermatogonie auf. Er zeigt eine runde oder ovale Form. Der Kern enthält meist einen runden Nukleolus ein. Das Zytoplasma ist rund um den Kern verteilt. Die B-Spermatogonie ist eine ovale bis rundliche Zelle. In letzterer Form ähnelt sie den präleptotänen Spermatozyten. Die B-Spermatogonie liegt nicht mehr in unmittelbarer Nachbarschaft zur Lamina basalis. Ihr Kern liegt zentral im

Zytoplasma. Dieser ist von runder Gestalt und beinhaltet meist ein Nukleolus. Der Kern der B-Spermatogonie ist mit durchschnittlich 6 μm der kleinste aller Spermatogonien. Aus den B-Spermatogonien gehen durch mitotische Teilungen die primären Spermatozyten hervor. Diese durchlaufen alle Stadien der ersten Reifeteilung (Pro,- Meta,- Ana- und Telophase). In den frühen Stadien der Prophase sind sie als kontinuierlicher Gürtel relativ nahe an der Basalmembran des Samenkanälchens gelegen; in den späteren Stadien rücken sie näher zum Lumen des Tubulus seminifer contortus. Sie sind die größten und markantesten Keimzellen des Keimepithels und fallen daher im Präparat auch bei kleiner Vergrößerung auf. Die primären Spermatozyten sind meist von runder Gestalt und besitzen einen großen, runden Kern mit charakteristischen Meiose-Figuren, der fast das gesamte Zytoplasma ausfüllt. Primäre Spermatozyten sind in allen Phasen des Keimepithelzykluses vorhanden. Die präleptotänen, primären Spermatozyten gehen durch Mitosen aus B-Spermatogonien hervor. Sie ist eine ovale Zelle mit einem runden Kern. Das Chromatin lässt sich relativ stark anfärben. Ein Nukleolus kann vorhanden sein. Mit Eintritt der präleptotänen Spermatozyte in die Prophase der Meiose nimmt die Zelle ständig an Größe zu. Es lassen sich anhand des Chromatinmusters im Zellkern mehrere Stadien der Prophase unterscheiden: die primäre Spermatozyte im Leptotän ist eine meist runde bis ovale Zelle mit wenig Zytoplasma. Der Kern ($\sim 5 \mu\text{m}$) besitzt eine runde oder ovale Form und liegt zentral im Kern. Das Chromatin im Zellkern ist dunkel gefärbt und füllt den Kern fast vollständig aus. Dieses Stadium tritt in den Phasen I und II des Keimepithelzykluses auf. Die primäre Spermatozyte im Zygotän ist eine runde bis ovale Zelle. Ihr Kern ist zumeist rund ($\sim 7 \mu\text{m}$). Charakteristisch für dieses Stadium ist eine nahezu chromatinfreie Zone des Kerns, so dass das Chromatin den Kern halbmondförmig ausfüllt. Dieses Stadium ist in den Phasen III und IV des Keimepithelzykluses zu beobachten. Die primäre Spermatozyte im Pachytän ist bedeutend größer als die vorherigen Zellen. Der große, runde Kern ($\sim 11 \mu\text{m}$) liegt zentral in der ovalen Zelle. Das Chromatin erscheint wie ein grobes Netz. Es wird durch die konventionellen Färbungen gut angefärbt. Das Zytoplasma ist höchstens schwach angefärbt. Die primäre Spermatozyte im Pachytän ist in jeder Phase des Keimepithelzykluses anzutreffen. Im Diplotän erreicht die primäre Spermatozyte ihre maximale Größe. Im Zellkern ($\sim 13 \mu\text{m}$) sind die Chromosomen als Fäden zu beobachten. Sie ist nur in der Phase IV des Keimepithelzykluses zu beobachten. Die primäre Spermatozyte in der Diakinese

ist nur selten zu sehen. Lediglich in der Phase IV des Keimepithelzykluses tritt sie auf. Mit Ablauf der Meta-, Ana- und Telophase ist die erste Reifeteilung vollendet. Die sekundären Spermatozyten sind das Produkt dieser Reduktionsteilung und werden relativ schnell der zweiten Reifeteilung unterzogen; daher sind sie im Präparat nur selten zu beobachten. Sekundäre Spermatozyten liegen relativ nahe am Tubuluslumen. Sie sind, falls sie sich nicht in Teilung befinden, leicht mit runden Spermatiden zu verwechseln. Die sekundären Spermatozyten besitzen einen oval bis runden Kern. Seine Kernmembran ist deutlich zu erkennen. Der Kern beinhaltet ein feines Chromatinmuster. Sekundäre Spermatozyten können im Präparat nur in der Phase IV des Keimepithelzyklus gefunden werden. Als Resultat der zweiten Reifeteilung geht die runde Spermatide hervor. Sie besitzt einen peripher liegenden, runden Zellkern mit einem deutlichen Nukleolus. Die Kernmembran ist gut zu erkennen. Ein schmaler Saum von Zytoplasma umgibt den Zellkern. Sie ist zusammen mit dem Spermium die kleinste Zelle des Keimepithels. Die runde Spermatide wird Transformationsprozessen (Golgi-, Kappen, Akrosom- und Reifungsphase) unterzogen, an deren Ende das ausdifferenzierte Spermium steht. Diese Veränderungen sind nur bedingt lichtmikroskopisch zu verfolgen: die Golgi- und Kappenphase ist gekennzeichnet durch einen runden Kern, während der Kern in der Akrosomen- und Reifungsphase elongiert vorliegt. Durch die PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau wird das akrosomale System rot-violett dargestellt und die Veränderungen des (Pro-) Akrosoms am Spermatidenkern werden deutlich. Das akrosomale System lässt sich an einem der beiden Kernpole identifizieren; anfangs in der Golgi-Phase als violettfarbige punktförmige Struktur breitet sich das akrosomale System kappenförmig über den proximalen Teil des Kerns aus (Kappenphase). Während das Akrosom den Kern zunehmend umhüllt, streckt sich dieser und nimmt eine elongierte Gestalt an (Akrosomenphase). Der Kern liegt dabei peripher in der Zelle. Das Zytoplasma sammelt sich hinter dem Zellkern. Das homogen verteilte Chromatin kondensiert im Lauf der Spermiogenese und ist deshalb im elongierten Kern dunkler und stärker heterochromatisch als im runden. Das Ergebnis der Transformation stellt das Spermium dar: dabei können lichtmikroskopisch Kopf und Schwanz unterschieden werden. Der Kopf wird vom Zytoplasma der Sertoli-Zelle umfasst, während der Schwanz in das Lumen des Tubulus seminifer contortus ragt. Die Zellmembran der Keimzellen ist in der Regel nicht gefärbt. Nur unregelmäßig

lässt sie sich in der PAS-Färbung nach Mc Manus ohne bzw. nach Amylase-Verdau relativ kräftig markieren. Bei allen adulten Kaninchen können degenerierte Keimzellen beobachtet werden. Die verschiedenen Generationen der Keimzellen zeigen typische Zellassoziationen. Im Laufe der Differenzierung der Keimzellen variiert somit das Erscheinungsbild des Keimepithels und kann daher in charakteristische Phasen unterteilt werden, die insgesamt zum Keimepithelzyklus zusammengefasst werden. Die folgende Beschreibung des Keimepithelzyklus des Kaninchens basiert auf der Einordnung von Ortavant (1959; zitiert nach Ortavant et al., 1969). Danach werden die verschiedenen Phasen der Meiose, die Form bzw. Veränderung der Spermatidenkerne, die Lage der Keimzellen sowie die Spermiation berücksichtigt. Beim geschlechtsreifen Tier können acht Phasen unterschieden werden: *Phase I* (Bild 20): Die Phase I beginnt mit dem Ende der Spermiation der reifen Spermien. Selten sind in der frühen Phase I noch einzelne Spermien im Lumen des Hodenkanälchens erkennbar. Auch können gelegentlich Restkörper der in der vorherigen Phase freigesetzten Spermatozoen identifiziert werden.

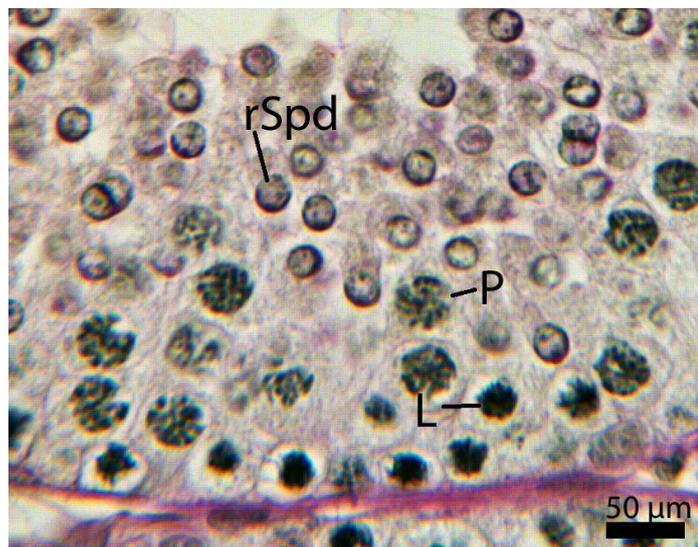


Bild 20: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase I. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50 µm. Diese Phase ist charakterisiert durch zwei Generationen von primären Spermatozyten (leptotäne Spermatozyten L, pachytäne Spermatozyten P) sowie durch eine Generation von Spermatiden (runde Spermatide rSpd).

An der Basalmembran lagern die Spermatogonien. Daran schließen sich zwei Generationen von primären Spermatozyten an: die „junge Generation“ der

leptotänen Spermatozyten liegt basal, während die „ältere Generation“ der pachytänen Spermatozyten bereits weiter luminal lokalisiert ist. Direkt am Lumen liegt in einer breiten Schicht eine Generation von Spermatiden, nämlich runde Spermatiden der Kappenphase. Das Proakrosom des runden Spermatids zeigt dabei noch nicht regelmäßig in die basale Richtung, wie es in den späteren Phasen die Regel ist.

Phase II (Bild 21): Die Phase II startet mit dem Beginn der Elongation der runden Spermatiden. Basal im Keimepithel befinden sich Spermatogonien. Daran schließen sich, wie auch in der Phase I, zwei Generationen von Spermatozyten an, nämlich „junge“ leptotäne Spermatozyten, die noch relativ nahe an der Lamina propria liegen sowie „alte“ pachytäne Spermatozyten, an. Einige wenige junge Spermatozyten aus dem leptotänen Stadium treten gegen Ende der Phase II in das Zygotän ein. Der „alten“ Generation der Spermatozyten folgt in apikaler Richtung eine Generation von Spermatiden. Diese befinden sich in der frühen Akrosomenphase. Die Phase II wird zwar geprägt von den sich elongierenden Spermatiden; je nach Stand der Phase können aber auch eine gewisse Anzahl von noch runden Spermatidenkernen beobachtet werden.

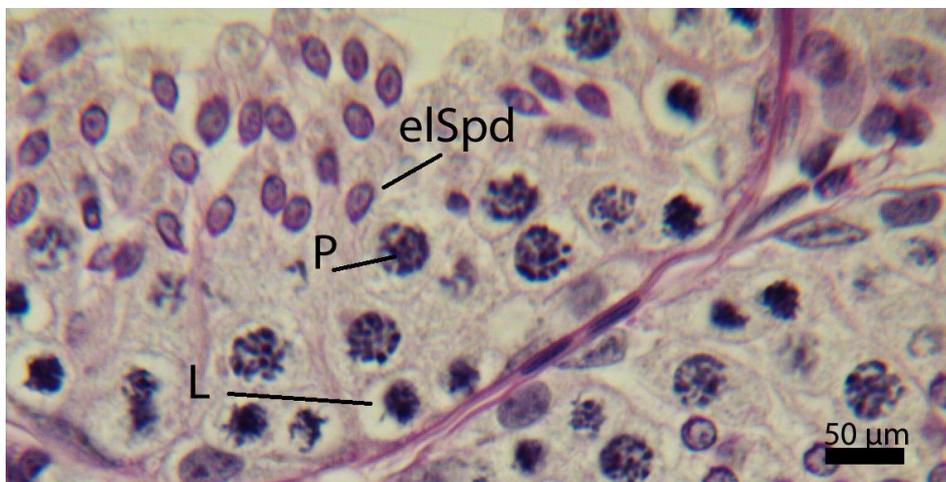


Bild 21: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase II. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50µm. Diese Phase umfasst die Elongation der runden Spermatiden. Sie ist charakterisiert durch zwei Generationen von primären Spermatozyten (leptotäne Spermatozyten L und pachytäne Spermatozyten P) sowie durch eine Generation von Spermatiden (elongierende Spermatiden elSpd).

Die nunmehr elongierte Spermatide liegt in einem nach luminal offenen Recessus

der Sertoli-Zelle. Ihr Kopf mit dem akrosomalen System weist zur Lamina propria. Diese Lage, nämlich mit dem Kopf in Richtung Lamina propria orientiert, behält die Spermatische der gesamten Spermiogenese bei.

Phase III (Bild 22): Die Phase III beginnt mit dem Ende der Elongation der Spermatischen. Basal an der Lamina propria befinden sich Spermatogonien. Weiter apikal im Keimepithel, bereits im adluminalen Kompartiment, liegen zwei Generationen von Spermatozyten: eine „junge“ Generation von zygotänen Spermatozyten sowie weiter luminal die „alte Generation“ von pachytänen Spermatozyten. Am weitesten apikal befindet sich eine Generation von Spermatischen in der Akrosomenphase. Sie liegen mit ihren Kopf zur Lamina propria gerichtet büschelweise in den Taschen der Sertoli-Zellen. Dabei sind die elongierten Spermatischen weit zur Lamina propria hin verlagert.



Bild 22: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase III. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50µm. Diese Phase ist gekennzeichnet von zwei Generationen von primären Spermatozyten (zygotäne Spermatozyten Z und pachytäne Spermatozyten P) sowie von einer Generation von Spermatischen (elongierte Spermatische eSpd).

Phase IV (Bild 23): In der Phase IV wird die erste Reifeteilung vollendet. Ferner findet die zweite Reifeteilung statt. An der Lamina basalis sind die Spermatogonien aufgereiht. Weiter apikal liegen primäre und sekundäre Spermatozyten. In der Phase IV sind im mittleren Drittel des Keimepithels variierende Zellbilder zu beobachten, abhängig davon, wie weit fortgeschritten der Verlauf der ersten und zweiten Reifeteilung ist. In der frühen Phase sind die „jungen“ Spermatozyten im Zygotän zu sehen, während die „alten“

Spermatozyten das Diplotän oder die Diakinese erreicht haben und dann mit dem Durchlaufen der Meta-, Ana- und Telophase die erste Reifeteilung vollenden. Im Verlauf dieser Phase sind deshalb auch die sich daraus entstehenden sekundären Spermatozyten im Keimepithel zu finden. Sie treten allerdings sehr schnell in die zweite Reifeteilung ein, die rasch abläuft. Gegen Ende der Phase IV können dann die „jungen“ Spermatozyten in das Pachytän eingetreten sein. Die bereits in Phase III vorhandenen elongierten Spermatiden befinden sich büschelweise gruppiert tief eingebettet in den Taschen der Sertoli-Zellen. Sie befinden sich in einem späten Stadium der Akrosomenphase bzw. in der frühen Reifungsphase. Das Chromatin im Kern kondensiert zunehmend, was an einer stärkeren Färbung des Kerns erkennbar wird.

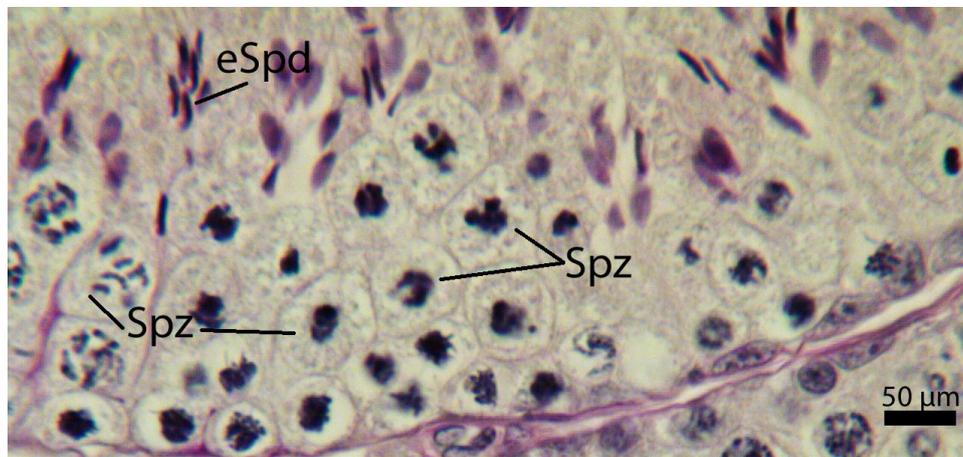


Bild 23: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase IV. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50 µm. Diese Phase ist charakterisiert von zwei Generationen von Spermatozyten (Spz) sowie von einer Generation von Spermatiden (elongierte Spermatiden eSpd).

Die folgenden drei Phasen können bei den untersuchten Kaninchen zu einer einzigen zusammengefasst werden (Bild 24). Phase V: Die Phase V beginnt mit dem Abschluss der zweiten Reifeteilung. An der Lamina basalis liegen wie in jeder Phase des Keimepithelzyklus die Spermatogonien. Weiter apikal im Keimepithel folgt eine Generation von primären Spermatozyten. Diese befinden sich im Pachytän. Luminal liegen zwei Generationen von Spermatiden: zum einen die „junge“ Generation von gerade entstandenen runden Spermatiden der Golgi-Phase sowie die „alte“ Generation von elongierten Spermatiden der Reifungsphase. Die „junge“ Generation füllt dabei fast den gesamten adluminalen Teil des Keimepithels aus. Die Köpfe der „alten“ Spermatiden sind tief in die

Taschen der Sertoli-Zellen eingebettet. Phase VI: Basal an der Lamina basalis sind auch in dieser Phase Spermatogonien zu finden. Weiter apikal liegt eine Generation von Spermatozyten im pachytänen Stadium. Zum Lumen hin liegt die „junge“ Generation von runden Spermatisden. Sie erscheinen lichtmikroskopisch unverändert. Die Modifikationen gegenüber der Phase V betrifft nur die „alte“ Generation von elongierten Spermatisden: in der Phase VI wird begonnen, die elongierten Spermatisden zum Lumen hin zu verlagern. Ihre Ausrichtung, nämlich Kopf zur Lamina propria und Zytoplasma Richtung Lumen, verändern sie dabei nicht. Phase VII: Auch in dieser Phase sind die Zellbilder im unteren und mittleren Drittel des Keimepithels gegenüber den Phasen V und VI unverändert: Spermatogonien säumen die Lamina basalis. Eine Generation von primären Spermatozyten im Pachytän schließt sich den Zellen an. Weiter apikal liegen zwei Generationen von Spermatisden: die „junge“ Generation von lichtmikroskopisch unveränderten runden Spermatisden in der Golgi-Phase sowie die „alte“ Generation von elongierten Spermatisden in der Reifungsphase, die ihre Verlagerung zum Lumen des Hodenkanälchens vollendet. Dies stellt der einzige lichtmikroskopisch darstellbare Unterschied zu den Phasen V und VI dar. Die büschelweise Gruppierung der elongierten Spermatisden, die bisher beobachtet werden konnte, verliert sich zunehmend. Das Zytoplasma bzw. Restkörper der elongierten Spermatisden säumt das Lumen; es wirkt dabei aufgelockert.

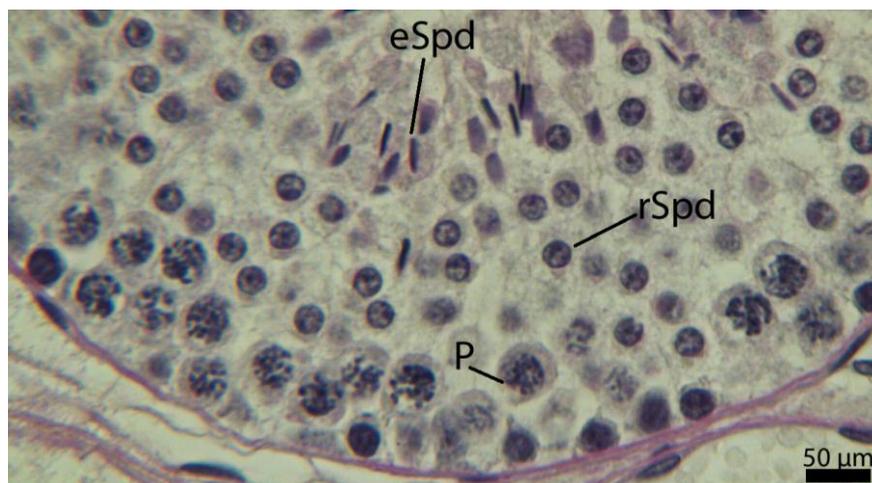


Bild 24: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phasen V-VII. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50 μm. Kennzeichnend für die Phasen V-VII sind eine Generation von primären Spermatozyten (pachytäne Spermatozyten P) sowie zwei Generationen von Spermatisden (runde Spermatisden rSpd und elongierte Spermatisden eSpd).

Phase VIII (Bild 25): Die Phase VIII beschreibt die ausdifferenzierten Spermien, die saumartig das Lumen des Tubulus seminifer umgeben und freigesetzt werden. Wie in jeder Phase umsäumen Spermatogonien die Lamina basalis. Es folgt eine Generation von primären Spermatozyten im Pachytän. Weiter apikal liegen die beiden Generationen von Spermatiden: die „jungen“ runden Spermatiden, die in die Kappenphase übertreten sowie die „alte“ Generation von nunmehr Spermien. Ihre Köpfe liegen ganz apikal im Keimepithel. Die Spermischwänze ragen in das Lumen des Hodenkanälchens und bieten einen Anblick von „Samenähren“. Die Spermatiden werden sukzessive aus dem Keimepithel entlassen. Die abgeschnürten Reste ihres Zytoplasmas, die Restkörper, bleiben im Keimepithel zurück.



Bild 25: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase VIII. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50 µm. Typisch für diese Phase sind Spermien (Spm), runde Spermatiden (rSpd) sowie eine Generation von primären Spermatozyten (pachytäne Spermatozyten P).

In der Tabelle 16 sind die acht Phasen des Keimepithelzykluses und die dabei auftretenden Keimzellen aufgelistet. Es wird deutlich, dass während des gesamten Keimepithelzyklus Sertoli-Zellen und Spermatogonien die Lamina basalis säumen. In den Phasen I bis IV sind zwei Generationen von Spermatozyten zu finden, während nur eine Generation von Spermatiden vorhanden ist. In den Phasen V bis VIII hingegen ist nur eine Generation von primären Spermatozyten zu beobachten, während zwei Generationen von Spermatiden im Keimepithel liegen. Die Phasen V, VI und VII variieren nur hinsichtlich ihrer „alten“ Generation von Spermatiden, die während der drei Stadien zum Lumen des

Samenkanälchens hin verlagert wird. Diese drei Phasen könnten somit beim Kaninchen zu einer einzigen zusammengefasst werden. Beim adulten Kaninchen ist bei der Betrachtung eines Querschnitts jeweils nur eine Phase des Keimepithelzyklus zu beobachten.

Tabelle 16: Die Phasen des Keimepithelzyklus des Kaninchens und die dabei auftretenden Keimzellen

| | Phase I | Phase II | Phase III | Phase IV | Phase V-VI | Phase VII |
|-------------------------|---------|----------|-----------|----------|------------|-----------|
| Spermien | | | | | | X |
| Elongierte Spd | | | X | X | X | |
| Elongierende Spd | | X | | | | |
| Runde Spd | X | | | | X | X |
| Sek Spz | | | | X | | |
| Spz Diakinese | | | | X | | |
| Spz Diplotän | | | | X | | |
| Spz Pachytän | X | X | X | X | X | X |
| Spz Zygotän | | | X | X | | |
| Spz Leptotän | X | X | | | | |
| Spg | X | X | X | X | X | X |

Abkürzungen: Spg Spermato gonien, Spz Spermatozyten, Sek Spz sekundäre Spermatozyten, Spd Spermatoziden

Die Höhe des Keimepithels wird für die Phasen I, II, III, IV-VII sowie VIII berechnet. Die Messungen ergeben die in der Tabelle 17 aufgeführten Werte. Wie eine Varianzanalyse auf einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ zeigt, ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in der Höhe des Keimepithels abhängig von der Phase des Keimepithelzyklus.

Tabelle 17: Messung der Höhe des Keimepithels bei geschlechtsreifen Kaninchen

| Phase I | Phase II | Phase III | Phase IV | Phase V-VII | Phase VIII |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 68,19 μm | 68,42 μm | 68,48 μm | 69,81 μm | 71,70 μm | 68,58 μm |
| (s+-5,05) | (s+-6,96) | (s+-7,91) | (s+-7,37) | (s+-4,68) | (s+-6,97) |

Abkürzung: s Standardabweichung

Nichtgeschlechtsreife Kaninchen:

Bei allen der lichtmikroskopisch untersuchten, nicht-geschlechtsreifen Kaninchen hat der Prozess der Spermatogenese eingesetzt. Es konnten beobachtet werden: Tubuli seminiferi contorti mit ausschließlich Stützzellen und Spermatogonien (Bild 26), Tubuli seminiferi contorti mit leptotänen Spermatozyten (Bild 27), Tubuli seminiferi contorti mit zygotänen Spermatozyten (Bild 28), Tubuli seminiferi contorti mit pachytänen Spermatozyten (Bild 29) sowie Tubuli seminiferi contorti mit runden und elongierende Spermatischen (Bild 30). Die Spermatogenese ist allerdings, je nach Tier, unterschiedlich weit fortgeschritten; zwischen den einzelnen Tieren bestehen zum Teil große Entwicklungsunterschiede. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Berechnung des Prozentsatzes der Tubuli seminiferi contorti mit Spermatozyten, Spermatischen und Spermien beim nicht-geschlechtsreifen Kaninchen

| Tier Nr. | Sp _g | Sp _z Leptotän | Sp _z Zygotän | Sp _z Pachytän | Spermatischen | Spm |
|----------|-----------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|-----|
| 1 | 18,7% | 3,4% | 61% | 16,9% | - | - |
| 2 | 2,9% | 5,7% | 37% | 48,6% | 5,7% rund | - |
| 3 | 15% | - | 35% | 49,3% | - | - |
| 4 | 4,2% | - | - | 60,0% | 35,7% rund | - |
| 5 | 21,2% | 7,7% | 71,2% | - | - | - |
| 6 | 21,9% | 1,2% | 70,7% | 6,1% | - | - |
| 7 | 11,9% | - | - | - | 88,1% rund +elongierend | - |
| 8 | 46% | 32% | 12% | 10% | - | - |
| 9 | 6,1% | - | - | 60,0% | 33,9% rund | - |
| 10 | 12% | 7,5% | 33% | 46% | 1,5% rund | - |

Abkürzungen: Sp_g Spermato gonien, Sp_z Spermatozyten, Spm Spermien

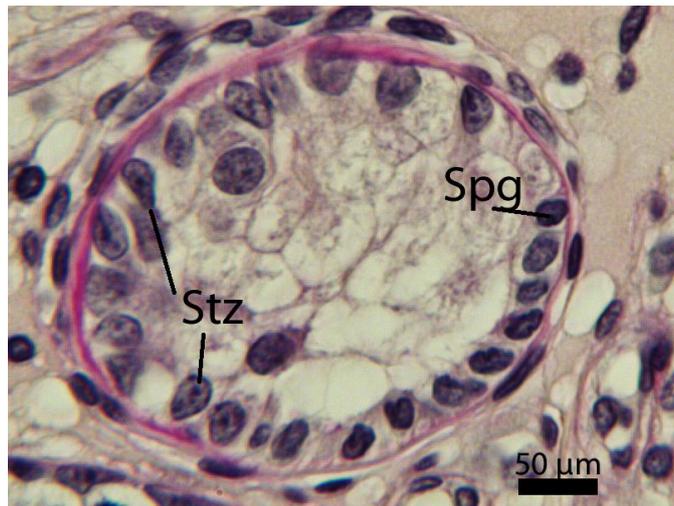


Bild 26: Tubulus seminifer contortus eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50µm. In diesem gewundenen Samenkanälchen hat die erste Reifeteilung noch nicht begonnen. Im Keimepithel sind neben Stützzellen (Stz) nur Spermatogonien (Spg) zu identifizieren.

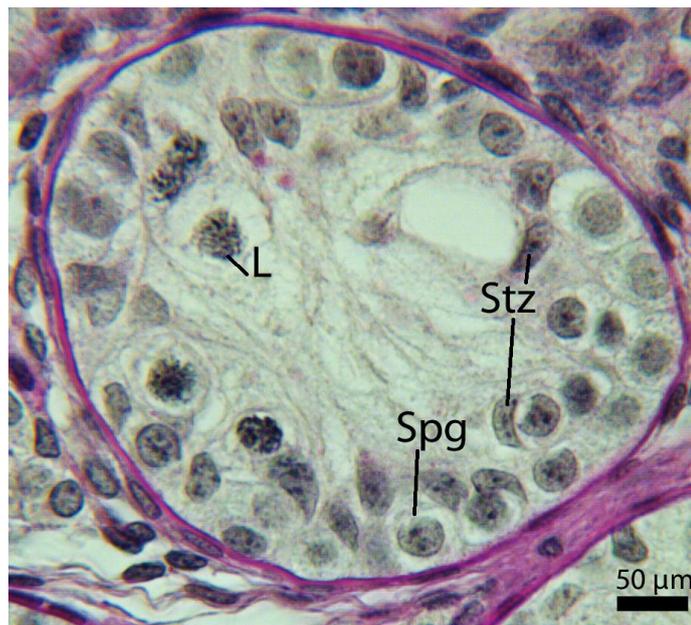


Bild 27: Tubulus seminifer contortus eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50 µm. In diesem gewundenen Samenkanälchen hat die erste Reifeteilung bereits begonnen. Im Keimepithel sind neben Stützzellen (Stz) und Spermatogonien (Spg) leptotäne Spermatozyten (L) zu beobachten.



Bild 28: Tubulus seminifer contortus eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50 µm. In diesem Samenkanälchen hat die erste Reifeteilung begonnen. Im Keimepithel sind zygotäne Spermatozyten (Z) zu beobachten.

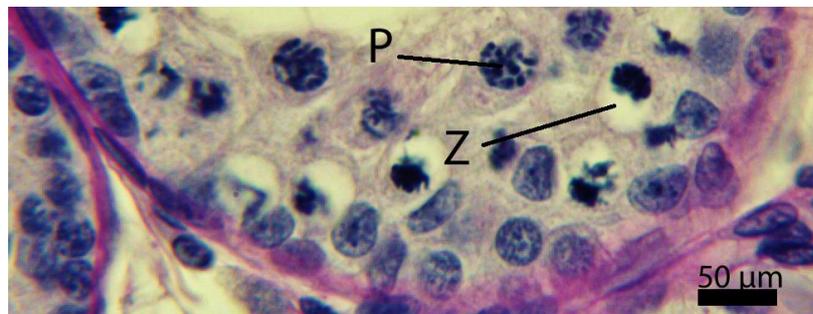


Bild 29: Tubulus seminifer contortus eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50 µm. In diesem Samenkanälchen ist die erste Reifeteilung bereits fortgeschritten. Im Keimepithel sind neben zygotäne Spermatozyten (Z) auch pachytäne Spermatozyten (P) zu identifizieren

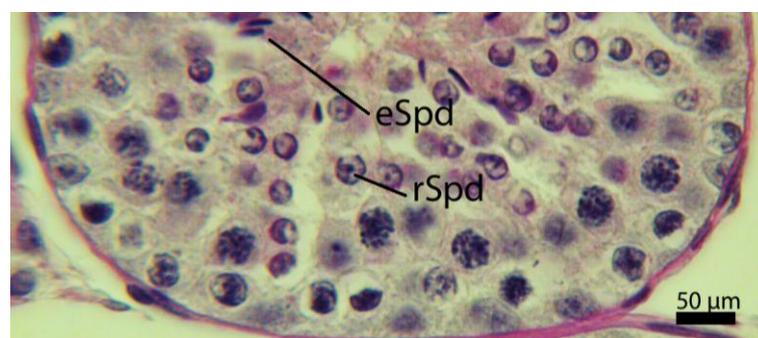


Bild 30: Tubulus seminifer contortus eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=50 µm. Die Spermio-genese ist weit fortgeschritten: im Keimepithel sind runde (rSpd) und elongierte (eSpd) Spermatisden zu sehen.

Die A-Spermatogonien ist von ovaler oder dreieckiger Gestalt. Der Zellkern weist eine ovale bis runde Gestalt auf und liegt meist zentral in der Zelle. Die Kernmembran ist gut erkennbar. Der in der Regel große, deutliche Nukleolus liegt meist zentral im Kern. Die Intermediär (In)-Spermatogonie verläuft wie die A-Spermatogonie parallel zur Lamina basalis. Der Kern einer In-Spermatogonie besitzt eine runde oder ovale Form und enthält in der Regel einen runden Nukleolus. Die B-Spermatogonie ist eine ovale bis rundliche Zelle, die nicht mehr in unmittelbarer Nachbarschaft zur Lamina propria liegt. Der runde Kern beinhaltet meist ein Nukleolus. Die leptotäne Spermatozyte ist eine meist runde bis ovale Zelle mit wenig Zytoplasma. Der Kern besitzt eine runde oder ovale Form. Das Chromatin im Zellkern ist dunkel gefärbt und füllt den Kern fast vollständig aus. Die zygotäne Spermatozyte ist eine runde bis ovale Zelle. Ihr Kern ist zumeist rund (~6 µm). Charakteristisch ist eine nahezu chromatinfreie Zone des Kerns, so dass das Chromatin den Kern halbmondförmig ausfüllt. Der runde Kern (~10,9 µm) der pachytänen Spermatozyte liegt zentral in der ovalen Zelle. Das Chromatin erscheint wie ein grobes Netz. Die sekundäre Spermatozyte besitzt einen oval bis runden Kern, der ein feines Chromatinmuster beinhaltet. Die Golgi- und Kappenphase der runden Spermatide ist gekennzeichnet durch einen runden Kern, während der Kern in der Akrosomenphase elongiert vorliegt.

2.4. Intratestikuläre samenableitende Wege

Die intratestikulären spermienableitende Wege setzen sich beim geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchen aus den Terminalsegmenten, den Tubuli recti und dem Rete testis zusammen.

2.4.1. Terminalsegment

Geschlechtsreife Kaninchen:

Die Übergänge zwischen den Tubuli seminiferi contorti und den Tubuli recti werden von den Terminalsegmenten gebildet (Bild 31, 32). Diese befinden sich hauptsächlich im Hodenparenchym nahe dem Mediastinum testis. Am Terminalsegment können folgende Teilstücke unterschieden werden: im ersten Abschnitt beginnt eine Reduzierung des Tubulusdurchmessers und eine dadurch bedingte Einengung des Lumens. Diese Region weist lichtmikroskopisch noch typische Sertoli-Zellen auf, die der Basalmembran senkrecht aufsitzen. Im Keimepithel sind lediglich Spermatogonien und primäre Spermatozyten vertreten;

Spermien und Spermatiden hingegen sind bereits verschwunden (Bild 32). Der darauffolgende, zweite Abschnitt weist vorwiegend modifizierte Sertoli-Zellen auf. Keimzellen sind nur noch selten anzutreffen. Die Längsachsen der modifizierten Sertoli-Zellen sind zu den Tubuli recti hin gewinkelt und liegen somit „stromabwärts“. Diese Neigung nimmt im Verlauf des Terminalsegments zum geraden Kanälchen hin noch zu. Die modifizierten Sertoli-Zellen besitzen einen ovalen bis länglichen Kern mit einem deutlichem Nukleolus. Meist liegen die Kerne nahe der Basalmembran, zuweilen sind die Kerne Richtung Lumen verlagert. Ihre Längsachsen liegen meist parallel zu der Basalmembran des Terminalsegments. Einige der modifizierten Sertoli-Zellen weisen Vakuolen unterschiedlichen Kalibers auf. Ferner zeichnen sich die Zellen durch lange schmale, zum Lumen hin ausgerichteten Zytoplasmfortsätze aus; diese treten mit denen der gegenüberliegenden Zellen in Verbindung bzw. streben danach. Dadurch wird das Lumen weiter eingeengt. Der dritte und letzte Abschnitt umfasst eine Vorwölbung in dem sich anschließenden Tubulus rectus. Diese Protrusion wird von sich aneinanderlagernden, blasigen Zytoplasmaanteilen der modifizierten Sertoli-Zellen gebildet. Allerdings ist dieser Abschnitt beim Kaninchen nur unregelmäßig und in unterschiedlicher Ausprägung anzutreffen. In keinem Fall handelt es sich dabei um eine Zytoplasmaprotrusion in Form eines Pfropfes. Beim Kaninchen liegt indes eine dezente Zytoplasmaprotrusion in Gestalt einer Papille oder einer zungenförmigen Struktur vor, die mehr oder weniger weit in den Tubulus rectus hineinragen kann (Bild 32).

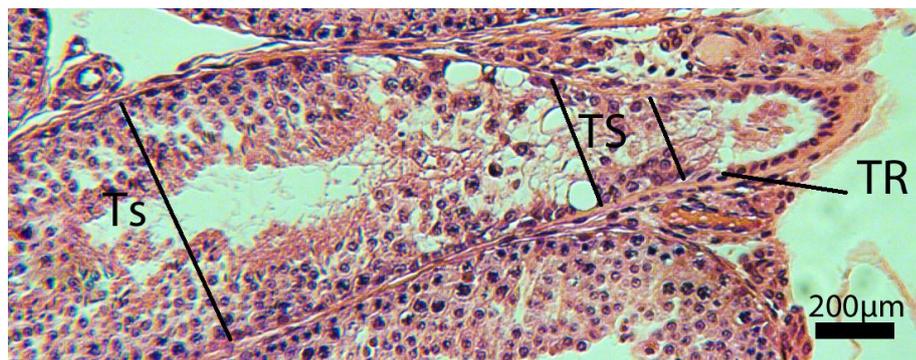


Bild 31: Terminalsegment eines geschlechtsreifen Kaninchens. HE-Färbung. SB=200 μm . Das Terminalsegment (TS) bildet den Übergang zwischen Tubulus seminifer contortus (Ts) und dem Tubulus rectus (TR). In seinem Verlauf reduziert sich sein Durchmesser (schwarze Linien), wodurch das Hodenkanälchen der Form einer Flasche ähnelt.

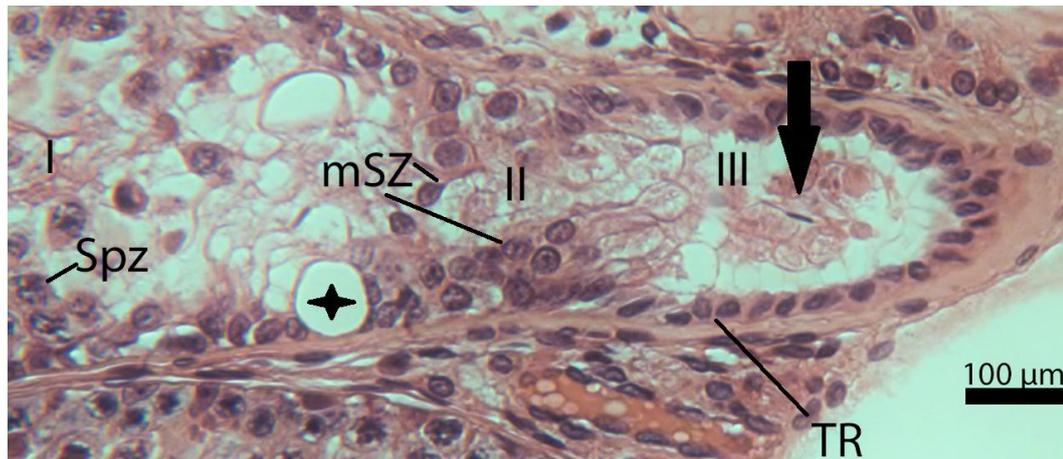


Bild 32: Vergrößerung Terminalsegment eines geschlechtsreifen Kaninchens. HE-Färbung. SB=100 µm. Im Abschnitt I sind höchstens primäre Spermatozyten (Spz) zu finden; eine vollständige Spermatogenese findet nicht mehr statt; im Abschnitt II sind modifizierte Sertoli-Zellen (mSZ) charakteristisch, deren Kerne an der Basalmembran bzw. nahe dem Lumen liegen. Sie können Vakuolen (Stern) aufweisen. Abschnitt III, der beim Kaninchen unregelmäßig vorhanden ist, umfasst eine dezente Zytoplasmaprotrusion (Pfeil) in den Tubulus rectus (TR).

In ihrem Verlauf Richtung Tubulus rectus reduziert sich der Durchmesser des Terminalsegments. Dadurch erhält das Hodenkanälchen die Form einer Flasche: der breite Durchmesser des gewundenen Kanälchen stellt den Boden der Flasche dar, während das Terminalsegment den Flaschenhals formt (Bild 31). Im Bindegewebe um das Terminalsegment befinden sich neben Blut- und Lymphgefäße auch Leydig-Zellen. Ferner sind freie Zellen zu beobachten. Bei der PAS-Färbung nach McManus ohne bzw. nach Amylase-Verdau zeigt die Membrana propria der Terminalsegmente sowie das umgebende Bindegewebe eine violett-rote Markierung. Die Membrana propria um das Terminalsegment ist der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 moderat blau gefärbt. Bei einer Alcianblau-Färbung bei pH 1,0 tritt eine nur noch schwache Reaktion auf.

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Im ersten Teilstück des Terminalsegments reduziert sich der Tubulusdurchmesser. Diese Region besitzt lichtmikroskopisch typische Sertoli-Zellen, die der Basalmembran senkrecht aufsitzen sowie unregelmäßig Spermogonien. Der zweite Abschnitt weist vorwiegend modifizierte Sertoli-Zellen, deren Längsachsen zu den Tubuli recti hin geneigt sind. Die modifizierten Sertoli-Zellen besitzen schmale, zum Lumen hin ausgerichtete Zytoplasmfortsätze; diese

kommunizieren mit denen der gegenüberliegenden Zellen. Auf diese Weise wird das Lumen weiter eingeengt. Der letzte Abschnitt umfasst eine Vorwölbung in dem sich anschließenden Tubulus rectus. Diese Protrusion wird von sich aneinanderlagernden, blasigen Zytoplasmaanteilen der modifizierten Sertoli-Zellen geformt. Dieses Teilstück kann nur unregelmäßig und in unterschiedlicher Ausprägung angetroffen werden. Ein terminaler Pfropf konnte nie identifiziert werden. Bei der PAS-Färbung nach McManus ohne bzw. nach Amylase-Verdau färbt sich die Membrana propria der Terminalsegmente sowie das umgebende Bindegewebe violett-rot. Die Membrana propria um das Terminalsegment ist der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 moderat blau markiert. Bei einer Alcianblau-Färbung bei pH 1,0 tritt eine nur noch schwache Reaktion auf.

2.4.2. Tubuli recti

Geschlechtsreife Kaninchen:

Die Tubuli recti stellen das Bindeglied zwischen dem Terminalsegment und dem Rete testis dar. Die geraden Hodenkanälchen sind ebenso wie die Terminalsegmente vor allem im Hodenparenchym nahe dem Mediastinum zu finden. Der Tubulus rectus beginnt beim Kaninchen ohne eine kelchartigen Erweiterung: der Durchmesser des geraden Kanälchens entspricht bei dieser Tierart dem des Terminalsegments (Bild 33). Die geraden Kanälchen können deshalb auch als Fortsetzung des Flaschenhalses angesehen werden. Im Verlauf zum Rete testis kann der Durchmesser des Tubulus rectus geringfügig zunehmen, wie aus Längsschnitten erkennbar ist. Das Epithel des Tubulus rectus kann als einschichtig-kubisch beschrieben werden und ruht auf einer Basalmembran (Bild 33, 34). Im distalen Teil des Tubulus rectus können, wie in Längsschnitten zu erkennen ist, auch regelmäßig hochprismatische Epithelzellen vorliegen. Besonders gut ist der Übergang vom Terminalsegment zum Tubulus rectus anhand der Immunfärbung mit Antikörper gegen CK 5, CK 14 sowie CK 18 nachzuvollziehen: zeigen die modifizierten Sertoli-Zellen des Terminalsegments keine Reaktion, so weisen die Epithelzellen des Tubulus rectus eine Färbung auf (Bild 107, 109). Das Epithel besitzt in der Regel keine starken Einbuchtungen. Meist ist das Lumen der Tubuli recti ohne Inhalt. Nur selten werden einzelne Spermien gesehen (Bild 35). Im Bindegewebe, das den Tubulus rectus umgibt, befinden sich Leydig-Zellen sowie Blut- und Lymphgefäße (Bild 35). Bei der Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung können elastische Fasern identifiziert

werden, die ringförmig den Tubulus rectus umgeben (Bild 34).

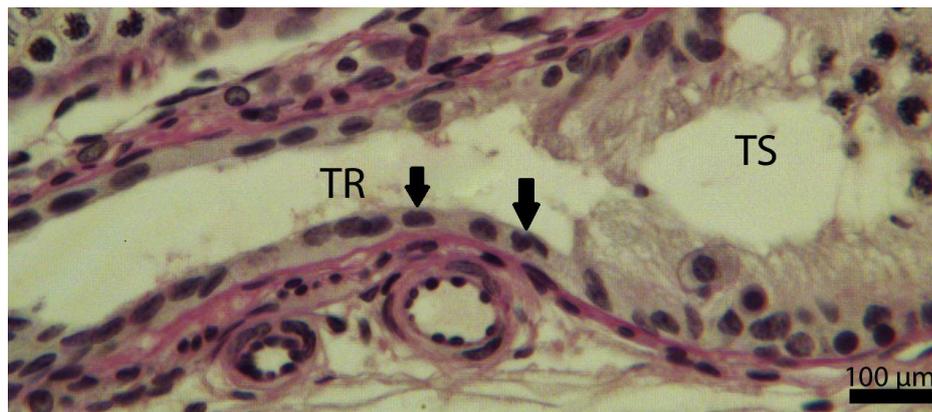


Bild 33: Terminalsegment und Tubulus rectus im Hoden eines geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau. SB=100µm. Der Tubulus rectus (TR) stellt die Fortsetzung des Terminalsegments (TS) dar. Er beginnt ohne kelchartige Erweiterung. Am geraden Hodenkanälchen kann ein einschichtig-kubisches Epithel identifiziert werden (Pfeile).

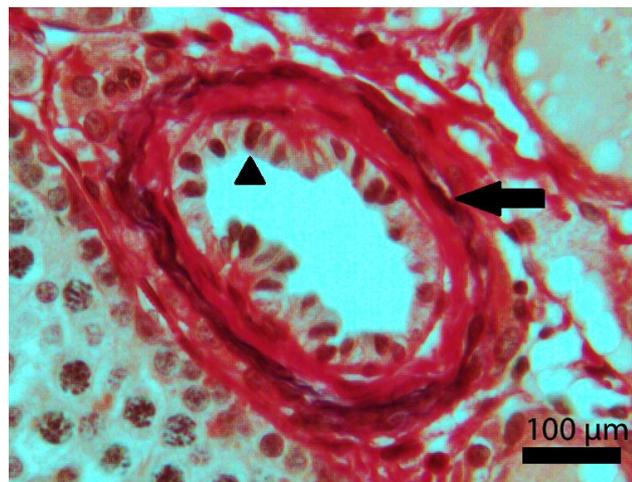


Bild 34: Tubulus rectus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Resorcin-fuchsin-van Gieson-Färbung. SB=100 µm. Es können in diesem geraden Hodenkanälchen hochprismatische Epithelzellen (Pfeilspitze) beobachtet werden. Deutlich treten die in dieser Färbung schwarz markierten elastischen Fasern hervor, die den Tubulus rectus umgeben (Pfeil).

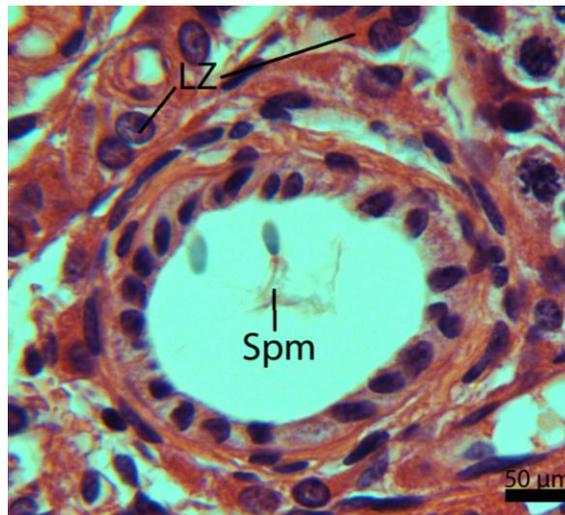


Bild 35: Tubulus rectus eines geschlechtsreifen Kaninchens. HE-Färbung. SB=50 μ m. Selten sind in den samenableitenden Wegen Spermien (Spm) zu sehen. Dem geraden Hodenkanälchen anliegend finden sich Leydig-Zellen (LZ).

Allerdings scheinen sie unterschiedlich stark ausgeprägt zu sein: nicht jeder der beobachteten Tubuli recti weist eine deutliche Ummantelung mit elastischen Fasern auf. Wie in einem Längsschnitt zu sehen ist besitzt vor allem der proximale Abschnitt elastische Fasern. Die Tubuli recti gehen ohne erkennbare histologische Grenze in das Rete testis über. Bei der PAS-Färbung nach McManus ohne bzw. nach Amylase-Verdau zeigt sich die Basalmembran des Tubulus rectus violett-rot. Bei einer Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 reagiert die Basalmembran sowie das subepitheliale Bindegewebe der Tubuli recti. Bei einer Alcianblau-Färbung bei pH 1,0 zeigen sich die Basalmembran sowie das umgebende Bindegewebe jedoch weitgehend entfärbt.

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Sämtliche Tubuli recti aller untersuchten Tiere besitzen ein deutliches Lumen (Bild 36). Der Tubulus rectus weist keine kelchartige Erweiterung auf. Das einschichtig-kubische Epithel ruht auf einer Basalmembran. Im distalen Teil des Tubulus rectus finden sich auch hochprismatische Epithelzellen. Das Epithel weist in der Regel keine starken Einbuchtungen auf. Im Bindegewebe, das den Tubulus rectus umgibt, liegen Leydig-Zellen sowie Blut- und Lymphgefäße (Bild 36). Unregelmäßig umgeben elastische Fasern die Tubuli recti. Die Tubuli recti gehen ohne mikroskopisch deutlich erkennbare Grenze in das Rete testis über. Bei der PAS-Färbung nach McManus ohne bzw. nach Amylase-Verdau färbt sich die Basalmembran des Tubulus rectus violett-rot. Mit Alcianblau-Färbung bei pH 2,5

reagiert die Basalmembran sowie das subepitheliale Bindegewebe der Tubuli recti. Bei einer Alcianblau-Färbung bei pH 1,0 zeigen sich die Basalmembran sowie das umgebende Bindegewebe jedoch weitgehend ungefärbt.

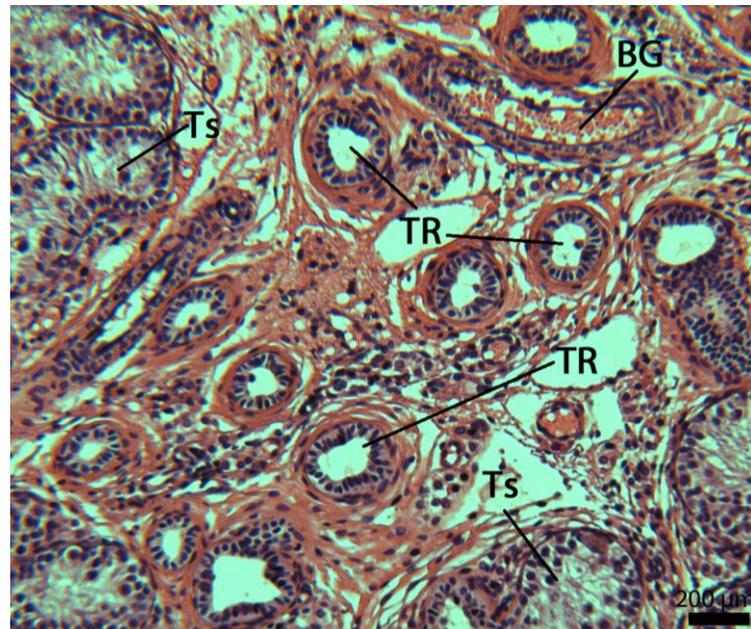


Bild 36: Tubuli recti im Hoden eines nicht-geschlechtsreifen Hodens.HE-Färbung. SB=200 µm. Im Bindegewebe, das die Tubuli recti (TR) umgibt, liegen Blutgefäße (BG). Ts Tubulus seminifer contortus

2.4.3. Mediastinum testis und Rete testis

Geschlechtsreife Kaninchen:

Das Rete testis schafft die Verbindung zwischen den Tubuli recti und den Ductuli efferentes. Dabei weist das Kaninchen einen intratestikulären und extratestikulären Anteil des Rete testis auf. Der intratestikuläre Anteil befindet sich zentral im Hoden; damit liegt beim Kaninchen eine axiale Lokalisation des Rete testis vor. Dieses ist kanalikulär organisiert: das Rete testis besteht aus einem anastomisierendem Netzwerk von Gängen, das im Mediastinum testis eingebettet ist. Es verläuft entlang der Längsachse des Hodens und durchzieht fast die gesamte Länge des Hodens; der kaudale Pol wird jedoch nicht erreicht. Das Mediastinum testis ist beim Kaninchen meist schmal. Die das Mediastinum umgebenden Tubuli seminiferi contorti und Tubuli recti liegen nahe am Rete testis. Das Mediastinum als bindegewebiger Bezirk enthält viele kollagene Fasern; elastische Fasern sind aber ebenfalls vorhanden. Diese befinden sich gleichmäßig verteilt im Stroma. Neben dem Rete testis weist das Mediastinum größere und

kleinere Lymphgefäße auf. Ferner sind hier Blutgefäße unterschiedlicher Größe zu finden (Bild 38). Selten finden sich im Stroma des Mediastinums freie Zellen. Unregelmäßig und in geringer Zahl sind beim Kaninchen heterotope Leydig-Zellen vorhanden. Sie liegen teils solitär, teils in kleinen Gruppen um Blutgefäße oder im Stroma des Mediastinums (Bild 38). Das Rete testis weist ein einschichtiges Epithel auf. Es treten kubische und hochprismatische Epithelzellen auf. Die heterochromatinreichen Zellkerne sind vielgestaltig und füllen meist das gesamte Zytoplasma der Epithelzellen aus (Bild 38). Bei hochprismatischen Zellen befinden sich die Kerne manchmal nur im oberen Drittel der Zelle. Auch freie Zellen können in den basalen Anteilen des Epithels beobachtet werden (Bild 38). Das Epithel, das keine Einbuchtungen oder Krypten aufweist, ruht auf einer dicken Basalmembran. Die Lumina weisen nur eine geringe Menge an Zellen auf: neben einer kleinen Zahl an Spermien finden sich manchmal wenige abgeschilferte Epithelzellen. Bei allen Kaninchen befinden sich im Lumen des Rete testis Chordae retis. Diese bindegewebigen Stränge durchziehen die Kanäle (Bild 37). Sie bestehen vorwiegend aus kollagenen Fasern, aber auch elastische Fasern können in der Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung nachgewiesen werden. Die bindegewebigen Körper der Chordae retis werden nach außen durch ein einschichtig-kubisches Epithel abgegrenzt (Bild 37).

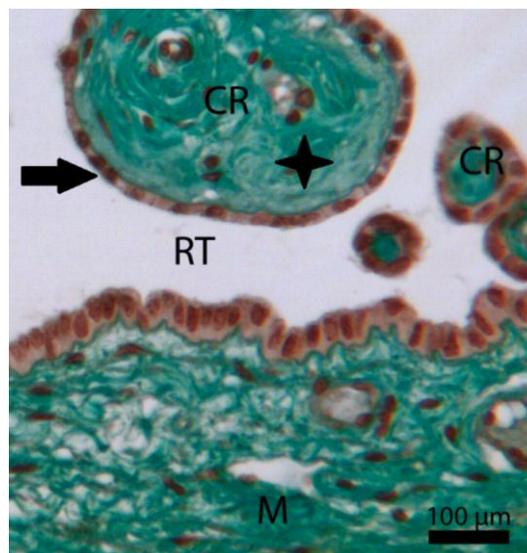


Bild 37: Chordae retis im Rete testis eines geschlechtsreifen Kaninchens. Trichromfärbung nach Masson-Goldner. SB=100 µm. Im Lumen des Rete testis (RT) befinden sich Chordae retis (CR), deren bindegewebigen Charakter in dieser Färbung betont wird (Stern): die kollagenen Fasern färben sich grün an. Die Chordae retis besitzen ein einschichtig-kubisches Epithel (Pfeil). M Mediastinum

Die Chordae retis sind von unterschiedlicher Größe. Ihre Gestalt variiert von kugelig bis längsoval. Ihre Kerne füllen die gesamte Höhe des Epithels aus. Größere Chordae retis weisen auch kleine Blutgefäße auf. Bei der PAS-Färbung nach McManus ohne bzw. nach Amylase-Verdau reagiert die Basalmembran, auf der das Epithel des Rete testis ruht, positiv, ebenso wie das umliegende Stoma des Mediastinums. Auch die bindegewebigen Anteile der Chordae retis färben sich violett-rot an. Das Stroma des Mediastinums, der bindegewebige Körper der Chordae retis sowie die apikalen Anteile der Epithelzellen des Rete testis weisen bei Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 eine Färbung auf, während bei pH 1,0 eine mäßige Entfärbung all dieser Anteile zu beobachten ist. Die Sirius Red-Färbung zum Nachweis von eosinophilen Granulozyten bringt kein positives Ergebnis. Auch Mastzellen können nach einer Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 nicht identifiziert werden.

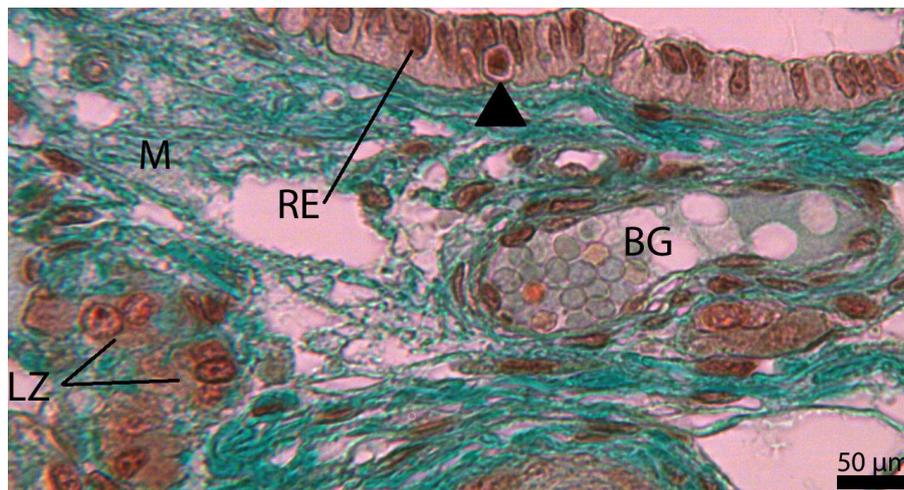


Bild 38: Rete testis im Mediastinum testis eines geschlechtsreifen Kaninchens. Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner. SB=50µm. Das Rete testis weist hier ein einschichtig-hochprismatisches Epithel (RE) auf. Das Epithel des Rete testis (RE) kann freie Zellen (Pfeilspitze) beinhalten. Im Mediastinum testis (M) können heterotope Leydig-Zellen (LZ) gefunden werden. BG Blutgefäß

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Das axial lokalisierte Rete testis setzt sich aus anastomisierenden Gängen zusammen, die im Mediastinum testis gelegen sind. Das Mediastinum stellt einen bindegewebigen Körper dar, der vor allem aus kollagenen Fasern und wenigen elastischen Fasern aufgebaut ist. Im Mediastinum testis sind Lymphgefäße, Blutgefäße sowie unregelmäßig und in geringer Zahl heterotope Leydig-Zellen

vorhanden. Das schmale Mediastinum testis durchzieht fast die gesamte Länge des Hodens; der kaudale Pol wird dabei aber nicht erreicht. Das Rete testis besitzt ein einschichtig-kubisches bis hochprismatisches Epithel, das auf einer dicken Basalmembran liegt. Die Lumina der Rete testis-Kanäle sind bei allen nicht-geschlechtsreifen Tieren vollständig kanalisiert (Bild 39) und beherbergen Chordae retis (Bild 39): diese bindegewebigen Stränge bestehen vorwiegend aus kollagenen Fasern und einig wenige elastische Fasern. Nach außen hin werden Chordae retis durch ein einschichtig-kubisches Epithel abgegrenzt, deren Kerne die gesamte Höhe des Epithels ausfüllen. Die Form der Chordae retis schwankt von kugelig bis längsoval. Größere Chordae retis besitzen auch kleine Blutgefäße.

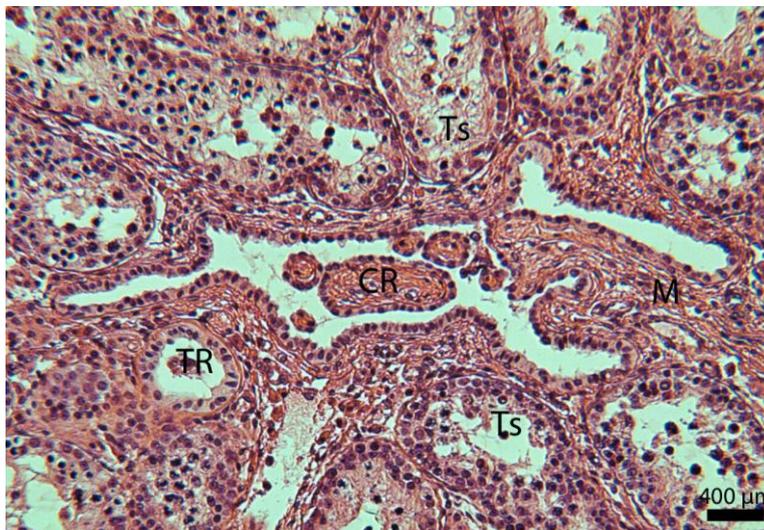


Bild 39: Rete testis im Mediastinum testis eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens-Färbung. SB=400 μ m. Das Rete testis liegt zentral im Hoden im Mediastinum testis (M). Das Rete testis ist bereits vollständig kanalisiert. Im Lumen der Rete testis-Kanälen befinden sich Chordae retis (CR). Ts Tubuli seminiferi contorti, TR Tubulus rectus

Bei der PAS-Färbung nach McManus ohne bzw. nach Amylase-Verdau reagiert die Basalmembran, auf der das Epithel des Rete testis ruht, positiv, ebenso wie das umliegende Stoma des Mediastinums. Auch die bindegewebigen Anteile der Chordae retis werden markiert. Das Stroma des Mediastinums, der bindegewebige Körper der Chordae retis sowie die apikalen Anteile der Epithelzellen des Rete testis färben sich bei Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 blau auf, während bei pH 1,0 eine mäßige Entfärbung all dieser Anteile zu beobachten ist. Die Sirius Red-Färbung zum Nachweis von eosinophilen Granulozyten zeigt kein positives Resultat. Auch Mastzellen können nach einer Alcianblau-Färbung bei pH 2,5

nicht identifiziert werden.

2.5. Interstitium

Geschlechtsreife Kaninchen:

Das intertubuläre Stroma des Hodens setzt sich aus den bindegewebigen Räumen zwischen drei oder mehreren Tubulusanschnitten zusammen. Das Interstitium des Kaninchenhodens besteht aus lockerem Bindegewebe mit kollagenen Fasern. Dies kann besonders gut in der Trichromfärbung nach Masson-Goldner nachvollzogen werden (Bild 40). In der Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung werden zudem selten einzelne elastische Fasern identifiziert. Auch finden sich im intertubulären Kompartiment kleinere und größere Blutgefäße (Bild 40). Ebenso können Lymphgefäße beobachtet werden. Die Leydig-Zellen liegen im Stroma des intertubulären Kompartiment locker verteilt (Bild 42). Die Anordnung der Zwischenzellen erscheint zufällig; sowohl in den schmalen Saum zwischen den Samenkanälchen als auch in den Räumen zwischen mindestens drei Tubuli sind sie gleichermaßen anzutreffen. Auch direkt neben der Lamina propria der Tubuli seminiferi contorti sind sie zu identifizieren. Die Leydig-Zellen bilden zumeist Gruppen oder liegen in Strängen angeordnet. Selten werden auch einzelne Zwischenzellen angetroffen. Ein Blut- oder Lymphgefäß liegt oftmals den Leydig-Zellen an, aber besonders in den schmalen Strängen zwischen zwei Tubuli seminiferi contorti sind einige der interstitiellen Zellen auch ohne Kontakt zu Blut- und Lymphgefäßen. Die Form der Leydig-Zellen sind variabel: es werden längliche, dreieckige oder ovale Zellen beobachtet. Besonders gut kann die Form der Leydig-Zellen in der Trichromfärbung nach Masson-Goldner beobachtet werden: dort hebt sich das rotbraune Zytoplasma der Leydig-Zelle deutlich von den grün gefärbten Kollagenfasern, die die Leydig-Zellen umgeben, ab. Der Kern der Leydig-Zellen ($\sim 6,4 \mu\text{m}$) ist euchromatinreich und liegt zumeist exzentrisch. Er besitzt eine in der Regel runde Form und weist einen deutlichen Nukleolus auf. Die Zone um die Kernmembran ist stark gefärbt. Dadurch ist der Kern der Leydig-Zelle gut zu erkennen (Bild 40). Das Zytoplasma der Leydig-Zellen wirkt homogen; es erscheint nur unregelmäßig dezent aufgelockert und wabig. Bei der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 und pH 1,0 zeigt sich lediglich bei dem pH-Wert von 2,5 eine schwache bis mittelstarke Blaufärbung der extrazellulären Substanz des Bindegewebes. Die Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 markiert darüber hinaus die Granula von Mastzellen. Eine solche Reaktion kann allerdings nur selten

beobachtet werden. Die Mastzellen liegen einzeln und verfügen über eine runde bis ovale Form. Die kleinen, über das gesamte Zytoplasma verteilten Granula werden durch Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 deutlich angefärbt (Bild 41).

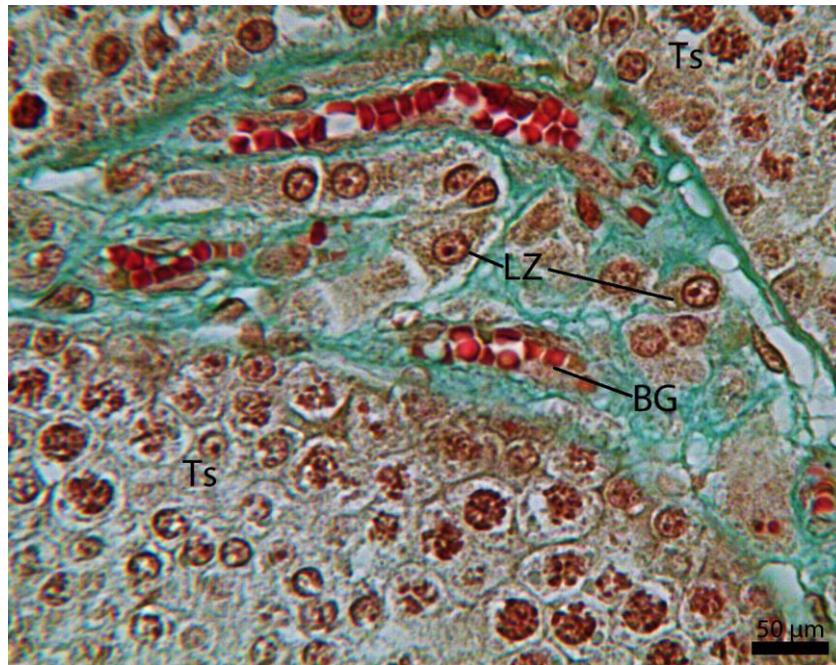


Bild 40: Leydig-Zellen im Interstitium eines geschlechtsreifen Kaninchens. Trichromfärbung nach Masson-Goldner. SB=50 µm. Die Leydig-Zellen (LZ) liegen oftmals in der Nähe von Blutgefäßen (BG). Das in dieser Färbung rot markierte Zytoplasma der Leydig-Zellen hebt sich vom grün gefärbten Bindegewebe des Interstitiums ab. TS Tubuli seminiferi contorti

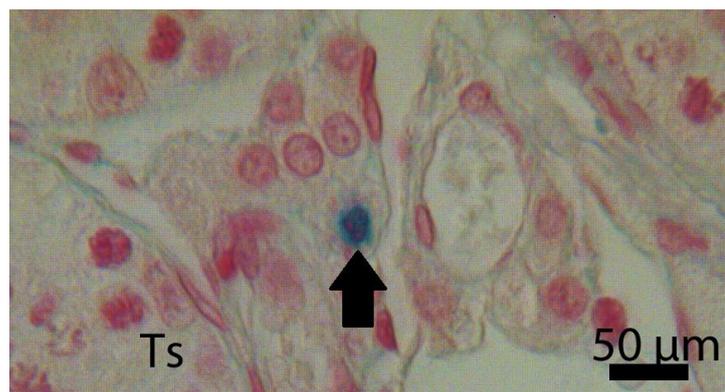


Bild 41: Mastzelle (Pfeil) im Interstitium eines geschlechtsreifen Kaninchens. Alcianblau-Färbung bei pH 2,5. SB=50 µm. Ts Tubulus seminifer contortus.

Die Sirius Red-Färbung markiert die eosinophilen Granulozyten, die vereinzelt im Interstitium anzutreffen sind. Sie besitzen eine runde bis ovale Gestalt. Durch die Sirius Red-Färbung stellen sich die einzelnen runden Granula leuchtend rot dar

(Bild 42). Sie füllen die Zelle oftmals vollständig aus, so dass der Zellkern überlagert wird.



Bild 42: Eosinophiler Granulozyt (Pfeil) im Interstitium des geschlechtsreifen Kaninchens. Sirius Red-Färbung. SB=20 µm

Bei der PAS-Färbung nach McManus ohne bzw. nach Amylase-Verdau zeigt sich die extrazelluläre Matrix des lockeren Bindegewebes schwach violett.

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Das Interstitium besteht aus lockerem Bindegewebe mit kollagenen Fasern (Bild 43). Neben kleineren und größeren Blutgefäße können Lymphgefäße beobachtet werden. Die Leydig-Zellen sind im Stroma des intertubulären Kompartiment locker eingebettet. In der Regel formen sie Gruppen oder liegen in Strängen angeordnet. Meist ist ein Blutgefäß benachbart. Leydig-Zellen können eine längliche, dreieckige oder ovale Form auftreten. Der euchromatinreiche Kern der Leydig-Zellen (~ 6,1 µm) liegt zumeist exzentrisch und weist einen deutlichen Nukleolus auf. Das Zytoplasma der Leydig-Zellen wirkt homogen, nur selten erscheint es aufgelockert und wabig. Bei der PAS-Färbung nach McManus ohne bzw. nach Amylase-Verdau färbt sich die extrazelluläre Matrix des lockeren Bindegewebes schwach violett. Bei der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 und pH 1,0 zeigt sich lediglich bei dem pH-Wert von 2,5 eine schwache bis mittelstarke Blaufärbung der extrazellulären Substanz des Bindegewebes. Die Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 färbt die Granula von Mastzellen. Eine solche Reaktion kann allerdings nur selten beobachtet werden. Die Mastzellen liegen einzeln und besitzen eine runde bis ovale Form. Die kleinen, über das gesamte Zytoplasma verteilten Granula werden durch Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 deutlich markiert. Die Sirius Red-Färbung markiert die eosinophilen Granulozyten. Sie sind

allerdings nur vereinzelt im Interstitium anzutreffen. Sie besitzen eine runde bis ovale Gestalt. Durch die Sirius Red-Färbung stellen sich die einzelnen runden Granula leuchtend rot dar. Sie füllen die Zelle oftmals vollständig aus, so dass der Zellkern überlagert wird.

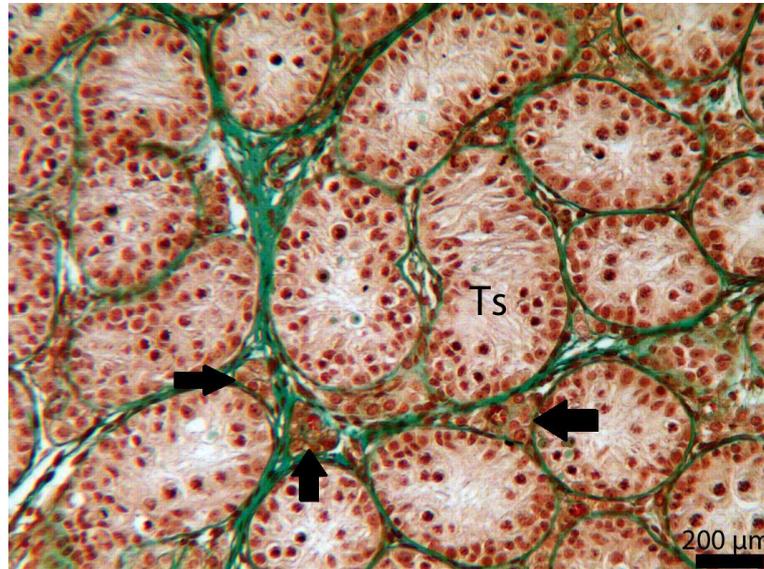


Bild 43: Intertubuläres Gewebe eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Trichromfärbung nach Masson-Goldner. SB=200 μm. Das intertubuläre Gewebe setzt sich aus den den bindegewebigen Räumen (Pfeile) zwischen den Tubuli-Anschnitten (Ts) zusammen.

3. Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen

3.1. Tubuli seminiferi contorti

3.1.1. Lamina propria

Geschlechtsreife Kaninchen:

Die Lamina propria besteht aus mehreren Schichten, deren Details erst anhand ultrastruktureller Untersuchungen präzise zu erkennen sind. Die Basallamina (Lamina basalis) stellt die innerste Schicht dar. Sie grenzt an das Keimepithel (Bild 44, 48). Gelegentlich sind knopfförmige Gebilde zu beobachten, die sich in das Keimepithel vorwölben (Bild 47). Zwischen der Basallamina und der Sertoli-Zelle sind Hemidesmosomen ausgebildet. Die Basallamina besteht beim Kaninchen aus zwei bis sechs Laminae densae. Der Basallamina schließen sich kollagene Fasern an (Bild 44, 48). Diese genannten Strukturen stellen die innere

azelluläre Schicht der Lamina propria dar. Es folgt das Stratum myoideum. Es stellt die innere zelluläre Schicht dar und besteht beim Kaninchen aus einer einzigen Lage von myoiden Zellen. Diese weisen eine spindelförmige Gestalt auf. Ferner besitzen sie einen elongierten Kern. An der inneren Kernmembran findet sich ein dicker Saum von Heterochromatin. Dem Stratum myoideum schließt sich eine weitere Lage von kollagenen Fasern an. Sie stellen die äußere azelluläre Schicht dar (Bild 44, 48). Schließlich formen Fibroblasten eine vierte, innere zelluläre Schicht, die den Übergang zum intertubulären Kompartiment bildet. Die Fibroblasten stellen sich als spindelförmige Zellen mit schlanken, langen Fortsätzen dar. Der Zellkern ist in der Regel von ovaler Gestalt und besitzt verhältnismäßig viel Heterochromatin (Bild 48).

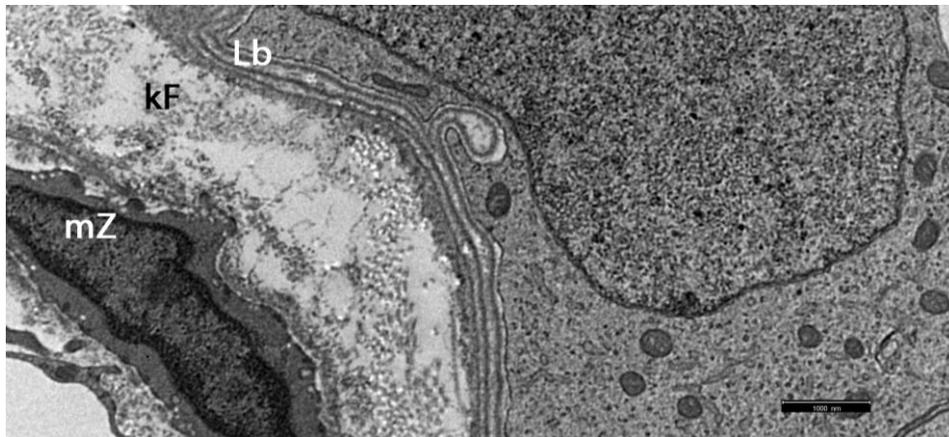


Bild 44: Ausschnitt Lamina propria eines geschlechtsreifen Kaninchen. TEM. SB=1000 nm. Die Lamina propria besteht aus mehreren Lagen: die innerste Schicht Lamina basalis (Lb) besteht aus mehreren Lamina densae. Ihr schließen sich kollagene Fasern (kF) an. Es folgt das Stratum myoideum mit einer Lage myoider Zellen (mZ).

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen

Das Keimepithel liegt auf einer gut ausgebildeten Basallamina, die aus zwei bis sechs Laminae densae aufgebaut ist. Der Basallamina folgen kollagene Fasern. Dieser inneren azellulären Schicht schließt sich eine Lage spindelförmiger myoider Zellen an. Sie besitzen einen elongierten Kern mit einem dicken Saum von Heterochromatin an der inneren Kernmembran. Dieser inneren zellulären Schicht folgen kollagene Fasern (äußere azelluläre Schicht). Ihnen schließen sich Fibroblasten an. Diese spindelförmigen Zellen mit langen, schlanken Fortsätzen weisen einen ovalen Zellkern mit viel Heterochromatin auf. Sie formen die innere

azelluläre Schicht.

3.1.2 Keimepithel

3.1.2.1. Sertoli-Zellen und primitive Stützzellen

Geschlechtsreife Kaninchen:

Mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen kann der Verlauf der Sertoli-Zellen von der Basalmembran bis hin zum Lumen des gewundenen Samenkanälchens verfolgt werden. Die Sertoli-Zelle besitzt eine breite Basis, die der Basalmembran der Lamina propria breitflächig aufsitzt (Bild 44). Auf dieser sitzt ein langer, breiter Stamm, der Richtung Lumen zieht. Vom Stamm aus ziehen zum Teil sehr filigrane Zytoplasmaausläufer zwischen die Keimzellen und umhüllen diese (Bild 44). Unregelmäßig wölbt sich ein Teil der Basalmembran knopfförmig in die Sertoli-Zelle vor. Die Dichte des Zytoplasmas der Ammenzelle variiert; es können größere Helligkeitsunterschiede beobachtet werden. Der Kern der Sertoli-Zelle ist groß und liegt im basalen Teil des Keimepithels. Meist weist er mehr oder weniger große Einbuchtungen auf und hat daher ein gelapptes Aussehen. Er kann von ovaler bis längsgestreckter Form sein. Das Karyoplasma besteht überwiegend aus Euchromatin, das homogen verteilt ist. Es tritt allerdings auch regelmäßig Heterochromatin in Form von kleinen Schollen auf; ebenso liegt es gelegentlich der inneren Kernmembran an und bildet auf diese Weise einen schmalen Saum. In der Regel kann der Kern einen großen, runden Nukleolus präsentieren. Er liegt meist zentral. Die zweischichtige Kernmembran ist regelmäßig mit Kernporen versehen (Bild 44). Oberhalb des Kerns befindet sich der Golgi-Apparat. Er ist aus wenigen, parallel angeordneten Zisternen und einigen Vesikeln aufgebaut. Als weitere Organellen können Mitochondrien vom Cristae-Typ identifiziert werden. Oft sind sie von runder Gestalt, sie können aber auch in ovaler Form auftreten. Mitochondrien werden sowohl im basalen wie auch im adluminalen Bereich des Epithels beobachtet (Bild 44). Die Mitochondrien im basalen Teil der Sertoli-Zelle sind meist rund oder oval, während sie im apikalen Teil der Zelle eine elongierte Form aufweisen. Mitochondrien sind mäßig elektronendicht. Wie Mitochondrien, so kommt auch das glatte ER in der gesamten Sertoli-Zelle vor; es liegt in glatter Form vor und ist meist unauffällig (Bild 44). Rauen ER ist in geringeren Mengen vorhanden als das glatte ER. Im Gegensatz zum glatten ER, das sowohl im basalen als auch im adluminalen

Kompartiment angetroffen werden kann, ist das Vorkommen von rauen ER auf das basale Kompartiment konzentriert. In größerer Anzahl vorhanden und gut ausgebildet sind Lysosomen. Ferner sind im Zytoplasma freie Ribosomen und Polyribosomen eingelagert. Glykogen und Lipidtropfen können ebenfalls identifiziert werden.

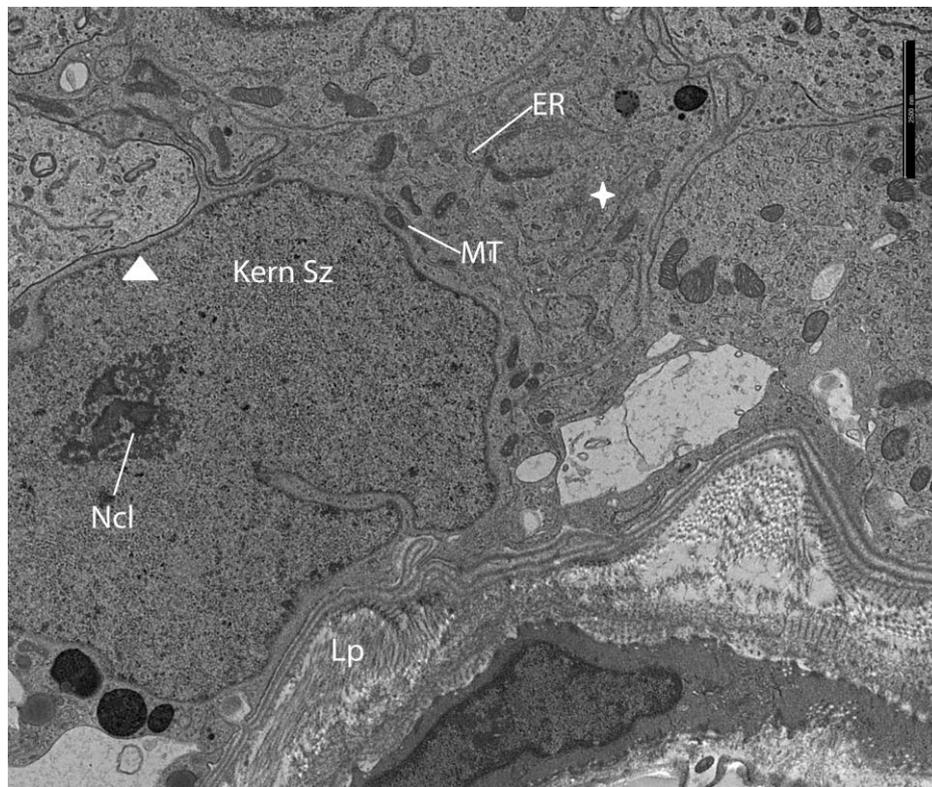


Bild 45: Kern einer Sertoli-Zelle im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM. SB=2500 nm. Der gelappte Kern der Sertoli-Zelle (Sz) sitzt der Lamina propria (Lp) auf. Der Kern beinhaltet einen Nukleolus (Ncl) sowie Chromatin an der Kernmembran (Pfeilspitze). Im Zytoplasma der Sertoli-Zelle (Stern) sind unter anderem Mitochondrien (MT) und endoplasmatische Retikulum (ER) vorhanden.

Das gesamte Zytoplasma wird von Mikrotubuli, Intermediärfilamente und Mikrofilamenten durchzogen, die Bestandteile des Zytoskeletts darstellen. Neben der Kontaktstruktur zwischen der Basalmembran und der Sertoli-Zelle sind auch noch einige Haftstrukturen zwischen zwei Sertoli-Zellen bzw. zwischen Sertoli-Zelle und Keimzellen ausgebildet: zwischen benachbarte Stützzellen sind Haftstrukturen wie „desmosome like junctions“ sowie „tight junctions“ (Zonulae occludentes) zu finden. Bei letztgenannter Haftstruktur handelt es sich um den wichtigsten Part der Blut-Hoden-Schranke. Hier sind die äußeren Zellmembrane

miteinander verschmolzen. Durch diese Blut-Hoden-Schranke wird das Keimepithel in ein basales und in ein adluminales Kompartiment aufgeteilt. Zwischen der Sertoli-Zelle und Keimzellen wie Spermatogonien, Spermatozyten und runden Spermatiden sind „desmosome like junctions“ ausgebildet. Auch „gap junctions“ sind zu finden. Ferner können noch „tubulobulbar complexes“ zwischen der Sertoli-Zelle und der elongierten Spermatide sowie „ectoplasmic specializations“ zwischen der Sertoli-Zelle und der elongierenden bzw. elongierten Spermatide beobachtet werden. Bei „tubulobulbar complexes“ handelt es sich um löffelförmige Ausstülpung des Zytoplasmas im Bereich des Spermatidenkopfes in die Sertoli-Zelle hinein. Die „ectoplasmic specializations“ setzen sich aus der Membran der Sertoli-Zelle, einem direkt darunterliegenden Aktinbündel und den submembranöse Zisternen des ER zusammen.

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Die Ammenzelle sitzt mit ihrer breiten Basis der Lamina basalis auf. Als langer, breiter Stamm läuft sie Richtung Lumen des Samenkanälchens und entlässt zarte Zytoplasmaausläufer, die zwischen die Keimzellen ziehen und diese vollständig umgeben (Bild 46). Der große oval bis längsgestreckte Kern liegt im basalen Teil des Keimepithels und besitzt unterschiedlich große Einbuchtungen. Er weist in der Regel einen großen runden Nukleolus auf. Das Karyoplasma besteht vor allem aus homogen verteiltem Euchromatin (Bild 46), aber auch Heterochromatin kann in Form von kleinen Schollen oder der inneren Kernmembran anliegend beobachtet werden. Als Zellorganellen treten freie Ribosomen, Polyribosomen sowie Lysosomen auf. Mitochondrien vom Cristae-Typ sind im gesamten Zytoplasma zu beobachten (Bild 46). Ferner können Dictyosomen des Golgi-Apparats identifiziert werden. Das ER findet sich im basalen und adluminalen Teil der Ammenzelle und liegt meist in glatter Form vor. Nur in geringer Menge kann raues ER im basalen Teil des Epithels angetroffen werden. Mikrotubuli, Intermediärfilamente und Mikrofilamenten durchziehen das Zytoplasma der Ammenzellen. Zwischen benachbarte Stützzellen Haftstrukturen wie „desmosome like junctions“ sowie „tight junctions“ zu identifizieren. Die letztgenannte Haftstruktur wird als der wichtigste Teil der Blut-Hoden-Schranke angesehen. Zwischen der Ammenzelle und Keimzellen (Spermatogonien, Spermatozyten und runden Spermatiden) sind „desmosome like junctions“ sowie „gap junctions“ zu finden.

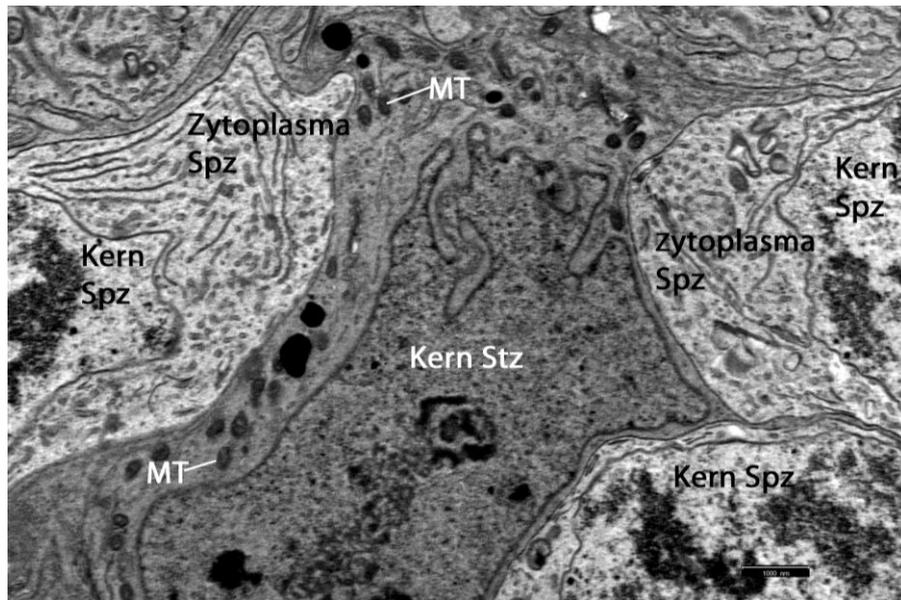


Bild 46: Kern einer Stützzelle im Keimepithel eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. TEM. SB=1000 nm. Die stark gelappte Gestalt des Kerns der Stützzelle (Stz) ist gut erkennbar. Benachbart liegen primäre Spermatozyten (Spz). Im Zytoplasma der Stützzelle sind zahlreiche Mitochondrien (MT) vorhanden.

3.1.2.2. Keimzellen

Geschlechtsreife Kaninchen:

Sämtliche Keimzellen werden von Sertoli-Zellen umgeben. In den späten Phasen der Spermiogenese allerdings ist nur noch der Kopf tief in das Zytoplasma der Sertoli-Zelle eingebettet. Der sich entwickelnde Schwanz zieht in das Lumen des Tubulus seminifer contortus. Alle Keimzellgenerationen stehen über Interzellularbrücken miteinander in Verbindung. Diese werden erst kurz vor der Spermiation gelöst. Es können A-, In- sowie B-Spermatogonien unterschieden werden. Alle Spermatogonien liegen im basalen Drittel des Keimepithels unterhalb der Blut-Hoden-Schranke. Die A-Spermatogonie liegt der Basalmembran breitflächig auf (Bild 47). Die basal gelegene Zellmembran kann durch den leicht welligen Verlauf der Lamina propria eingedrückt wirken. Bisweilen entlässt die Lamina basalis auch knopfförmige Gebilde in den basal gelegenen Teil des Zytoplasmas (Bild 47). Die Gestalt der A-Spermatogonie variiert von oval bis pyramidenförmig. Ihre Längsachse liegt parallel zur Basalmembran. Der Kern der A-Spermatogonie ist von runder bis ovaler Gestalt. und beinhaltet nur wenig Heterochromatin. Dieses ist gleichmäßig fein verteilt, so

dass der Nukleus ein homogenes Erscheinungsbild aufweist. Selten können kleine Heterochromatinschollen beobachtet werden. Das Heterochromatin verdichtet sich regelmäßig an der Kernmembran, so dass diese als schmale Linie erkennbar wird. An der Kernmembran sind ferner Kernporen erkennbar. Der Nukleus liegt meist zentral in der Spermatogonie und beansprucht einen Großteil der Zelle (Bild 47). Zentral oder peripher an der Kernmembran kann meist ein deutlicher Nukleolus identifiziert werden. Er zeigt ein prominentes Nukleonema. Dieses wird von kleinen hellen Bezirken, der Pars amorpha, unterbrochen. Das lockere und feingranulierte Zytoplasma beheimatet relativ wenige Organellen. Die Mitochondrien von runder oder elongierter Form vom Cristae-Typ sind gleichmäßig im Zytoplasma verteilt (Bild 47). Der Golgi-Apparat ist nur mäßig entwickelt. Ribosomen sind relativ zahlreich im Zytoplasma zu finden. Auch kann eine geringe Menge von vor allem glattem ER identifiziert werden (Bild 47).

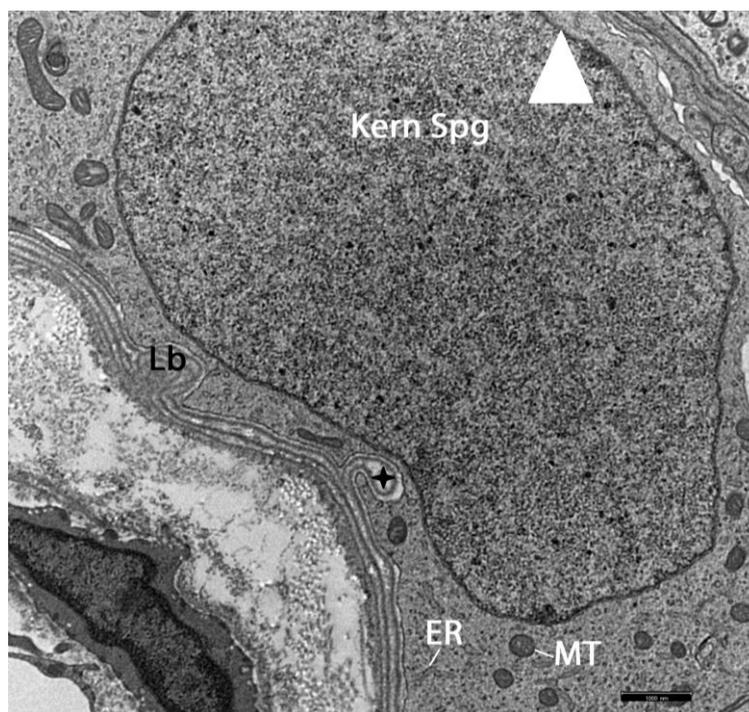


Bild 47: A-Spermatogonie im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM. SB=1000 nm. Die Spermatogonie (Spg) liegt der Lamina basalis (Lb) breitflächig auf. Die aus mehreren Laminae densae bestehende Lamina basalis entläßt in das Zytoplasma der Keimzelle eine knopfförmige Vorwölbung (Stern). Der Kern beinhaltet gleichmäßig verteiltes Chromatin. An der Kernmembran verdichtet sich das Heterochromatin (Pfeilspitze). Im Zytoplasma der Keimzelle können Mitochondrien (MT) und Endoplasmatische Retikulum (ER) identifiziert werden.

Bei einer ovalen Gestalt befindet sich der Großteil des Zytoplasmas lateral dem Kern. Bei einer dreieckigen Gestalt jedoch kann es lateral und in einem gewissen Umfang auch apikal identifiziert werden. Die In-Spermatogonie besitzt bereits eine geringere Kontaktfläche mit der Basalmembran der Lamina propria als die A-Spermatogonie; eine Verbindung bleibt aber vorhanden. Die Keimzelle kann ovale oder runde Form aufweisen. Das Chromatin ist grobkörniger als das der A-Spermatogonie. Im Nukleus finden sich mehrere, unregelmäßig verteilte Heterochromatinschollen. Zur Kernmembran hin verdichtet sich das Heterochromatin und bildet einen dunklen Saum. Es können auch Kernporen identifiziert werden. Ferner kann in der Regel ein Nukleolus identifiziert werden. Dieser zeigt sich von dunkler, runder Gestalt und liegt meist exzentrisch im Kern. Das Zytoplasma der In-Spermatogonie erscheint fein granuliert und ist dichter als das der A-Spermatogonie. Es beinhaltet Mitochondrien und einen Golgi-Apparat. Ferner kann raues sowie glattes ER auftreten. Die B-Spermatogonie verliert den Kontakt zur Lamina propria. Es können sich auch Zytoplasmaausläufer der Sertoli-Zelle zwischen die Basalmembran und die Spermatogonie schieben. Die B-Spermatogonie weist eine birnenförmige oder runde Gestalt. Der Kern liegt meist zentral in der Zelle und ist in der Regel von runder Gestalt. Die Menge an Heterochromatinschollen nimmt zu. Das Chromatin wirkt dichter als das im Kern der In-Spermatogonie. Wie auch bei der A- und In-Spermatogonie, so bildet auch in der B-Spermatogonie das Heterochromatin unterhalb der Kernmembran einen dunklen, gut sichtbaren Saum (Bild 48). Meist ist ein dezentral liegender Nukleolus zu beobachten. Dieser ist weniger auffällig als der der A-Spermatogonie. Der Anteil des Zytoplasmas am Zellvolumen ist geringer als in der A-Spermatogonie. Darin liegen runde und langgestreckte Mitochondrien vom Tubulus-Typ sowie raues und glattes ER. Ferner finden sich Ribosomen sowie ein Golgi-Apparat. Die präleptotänen primären Spermatozyten gleichen in ihrer Lage, Größe und Ausstattung den B-Spermatogonien und sind daher leicht mit diesen zu verwechseln. Sie liegt sehr nahe an der Basalmembran und hat die Blut-Hoden-Schranke noch nicht passiert. Sie ist von ovaler Gestalt und besitzt einen meist runden Kern mit stellenweise auftretenden Chromatinschollen. Ein Nukleolus kann vorhanden sein, allerdings ist er von unauffälligem Charakter. Als Zellorganellen können Mitochondrien vom Cristae-Typ und ER identifiziert werden. Die präleptotäne Spermatozyte tritt in die erste Reifeteilung der Meiose ein. Während dieser Reifeteilung treten die primären Spermatozyten vom basalen

Kompartiment des Keimepithels in das adluminal Kompartiment über und befinden sich dann oberhalb der Blut-Hoden-Schranke, die vor allem durch „tight junctions“ (Zonulae occludentes) der Sertoli-Zellen gebildet werden.

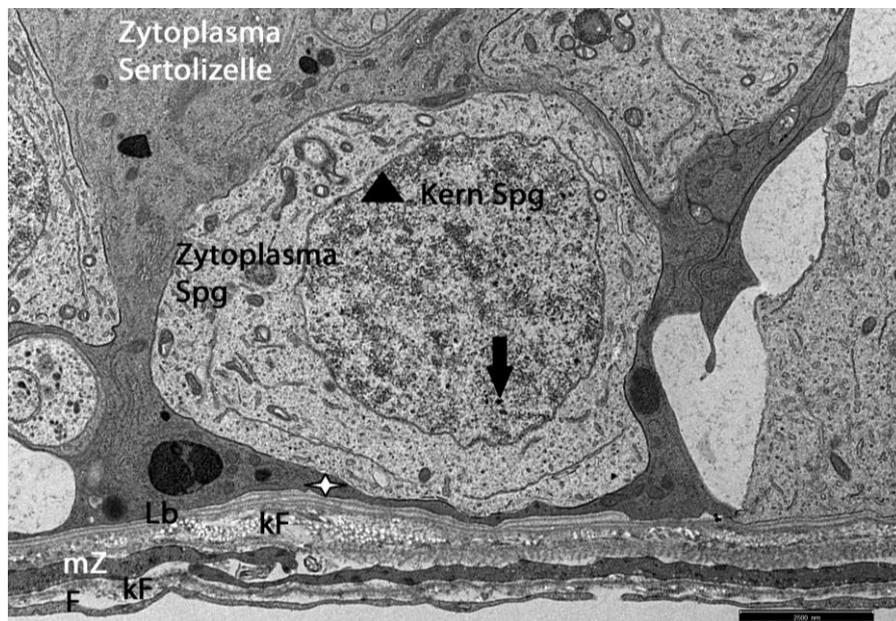


Bild 48: B-Spermatogonie und Lamina propria eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM. SB=2500 nm. Der Kern der Spermatogonie (Spg) weist einige kleine Heterochromatinschollen auf (Pfeil). Das Heterochromatin bildet einen kleinen Saum an der Kernmembran (Pfeilspitze). Die Keimzelle weist keinen Kontakt zur Lamina propria auf: ein Zytoplasmastrang der Sertoli-Zelle (Stern) schiebt sich zwischen die Keimzelle und der mehrschichtigen Lamina basalis (Lb) der Lamina propria. Letztere besteht aus der Lamina basalis (Lb), kollagenen Fasern (kF), einer Lage myoider Zellen (mZ), kollagene Fasern (kF) und Fibroblasten (F).

Die primäre Spermatozyte besitzt eine runde bis ovale Gestalt. Ihre Größe nimmt über die einzelnen Stadien hinweg beständig zu. Der Kern dieser Keimzelle ist von runder bis ovaler Form und liegt in der Regel zentral in der Zelle. Die Kernmembran zeigt dabei einen meist welligen Verlauf auf. Während der Prophase gewinnt das Chromatin im Kern an Struktur, so dass sich einzelne Stränge identifizieren lassen. Ab dem zygotänen Stadium können bisweilen synaptonematische Komplexe beobachtet werden (Bild 49). Dabei lagern sich die homologen Chromosomen aneinander. Das Zytoplasma der Spermatozyte weist eine größere Menge an Zellorganellen auf als das der Spermatogonien. Darüber hinaus nimmt der Anteil an Zellorganellen im Laufe der Stadien der Meiose noch

zu. Mitochondrien vom Cristae-Typ sind in größerer Zahl vorhanden. Raues ER und freie Ribosomen sind ebenfalls anzutreffen. Auch der Golgi-Apparat nimmt über die verschiedenen Stadien hinweg an Umfang zu.

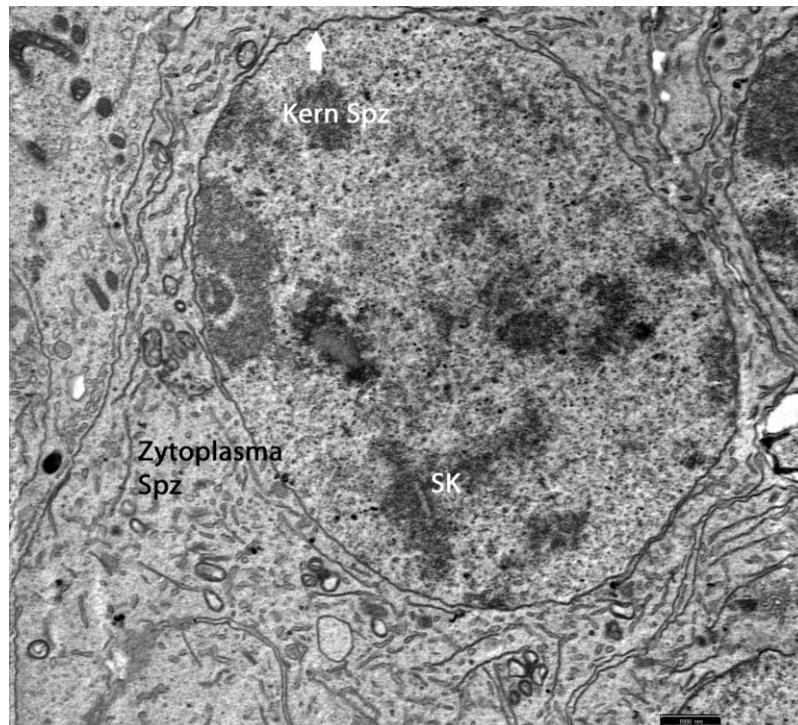


Bild 49: Primäre Spermatozyte (Spz) im Pachytän im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM. SB=1000 nm. Der ovale Kern der Keimzelle besitzt eine wellige Kernmembran (Pfeil). Es können synaptonematische Komplexe (SK), also die Aneinanderlagerung von homologen Chromosome, beobachtet werden.

Die sekundäre Spermatozyte besitzt wenig Zytoplasma. Der Zellkern ist meist rund und beinhaltet Heterochromatinschollen. Unregelmäßig können an einigen Stellen der Kernmembran größere Ansammlungen von Heterochromatin beobachtet werden. Die Kernmembran erscheint gewellt. Der Nukleolus ist klein und nicht regelmäßig anzutreffen. Die Spermatozoen befinden sich im adluminalen Kompartiment oberhalb der Blut-Hoden-Schranke. Zu Beginn der Spermiogenese liegen die Spermatozoen nahe am Lumen des Tubulus, werden während der Differenzierung vorübergehend in Richtung Basalmembran verlagert und liegen zum Schluss wieder am Tubuluslumen. Dabei drehen sich die Spermatozoen während der Akrosomenphase, so dass ihr Akrosom Richtung Lamina basalis des Tubulus seminifer contortus zeigt. Es können beim Kaninchen vier Phasen der Spermiogenese, nämlich Golgi-, Kappen-, Akrosomen- und Reifungsphase,

unterschieden werden. *1. Golgi-Phase:* Ein Spermatid der Golgi-Phase besitzt einen runden Zellkern, der homogen verteiltes Euchromatin mit einigen dunklen Heterochromatinschollen aufweist. Der Zellkern liegt zentral in der Zelle. Ein Nukleolus ist bei den frühen Entwicklungsstadien vorhanden. Die Kernmembran weist zwei Laminae auf, die durch einen deutlichen Zwischenraum getrennt sind. Der Golgi-Apparat ist gut ausgebildet und befindet sich in unmittelbarer Nähe zum Kern. Er setzt sich aus einem Stapel von Zisternen zusammen und verfügt über eine Reihe von Vesikeln und Vakuolen. Die Form des Golgi-Apparats gleicht einem Hufeisen, wobei die offene Seite meist dem Kern zugewandt ist. Eventuell können zwei Zentriolen in der Nähe des Golgi-Apparats identifiziert werden. Als sonstige Zellorganellen sind im mäßig dichten Zytoplasma freie Ribosomen und Mitochondrien zu identifizieren. Die Mitochondrien vom Cristae-Typ haben mäßig elektronendichte Matrix. ER ist nur in geringen Mengen vorhanden. Der Golgi-Apparat gibt viele Vesikel unterschiedlicher Größe ab, die in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen hell und leer erscheinen. Diese wandern vom Golgi-Apparat zur benachbarten Kernmembran und verschmelzen dort miteinander. Es bildet sich eine akrosomale Vakuole. Zwischen der Kernmembran und der akrosomalen Vakuole liegt der subakrosomale Raum. Das Chromatin, das unter diesem Raum der inneren Kernmembran anliegt, kondensiert und wirkt daher elektronendichter als das übrige Chromatin des Kerns; es entsteht ein äußerst schmaler dunkler Saum. Die Zentriolen beginnen ihre Wanderung vom Golgi-Apparat zum Kernpol, der der akrosomalen Vakuole gegenüberliegt. Aus dem distalen Zentriol bildet sich später der Geißelapparat aus. Das proximale Zentriol liegt später quer im Hals des Spermiums und wird bei der Befruchtung an die weibliche Eizelle weiter gegeben. *2. Kappenphase:* Während der Kappenphase (Bild 49, 51, 52) verdichtet sich der Inhalt der akrosomalen Vakuole, so dass das akrosomale Granulum entsteht (Bild 51).

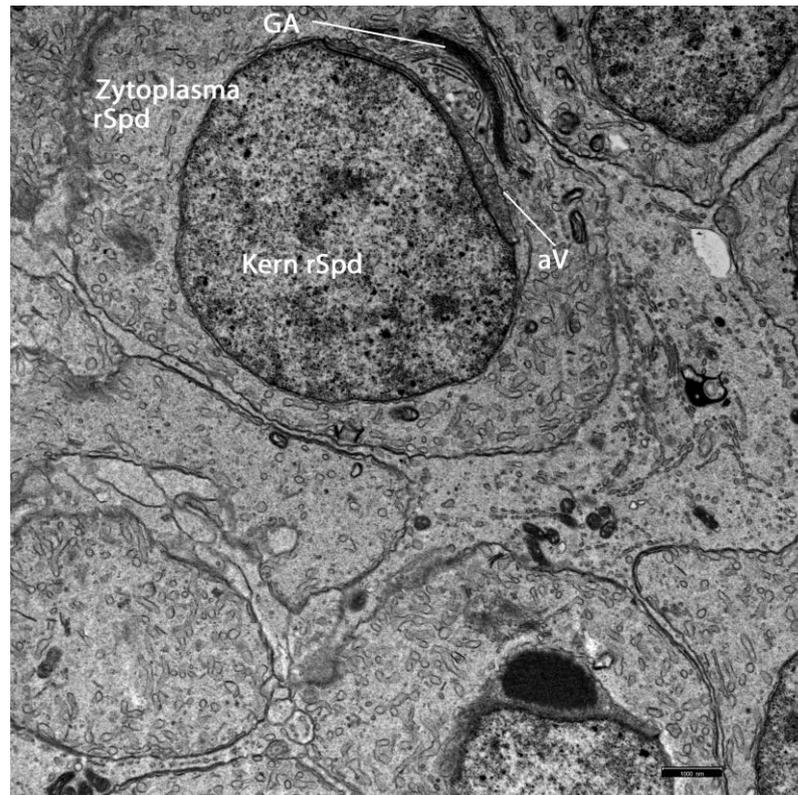


Bild 50: Runde Spermatide in der frühen Kappenphase im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM. SB=1000 nm. Während dieser Phase flacht sich die akrosomale Vakuole (aV) ab und beginnt sich kappenartig über die äußere Kernmembran der runden Spermatide (rSpd) zu legen. Im Kern beginnt die Kondensation des Chromatins. Der Golgi-Apparat (GA), der in unmittelbarer Nähe des Kerns liegt, ist gut entwickelt. Das akrosomale Granulum besteht aus nunmehr elektronendichtem Material und vergrößert sich im Laufe der Kappenphase. Die akrosomale Vakuole flacht sich ab und dehnt sich auf diese Weise aus; dabei berührt die äußere Vakuolenmembran das Granulum.

Die akrosomale Vakuole beginnt sich über die äußere Kernmembran bis zum Äquator des Kerns zu legen und wird somit zur Akrosomenkappe. Der Kern erscheint unterhalb des akrosomalen Granulums leicht eingedellt (Bild 51). Im Kern beginnt die Kondensation des Chromatins, die erst mit Ende der Spermio-genese abgeschlossen wird (Bild 50). Zum Ende der Kappenphase beginnt eine Veränderung der Form des Kerns und der Zelle. Sie wirken nicht mehr so kugelig wie in der Golgi-Phase, sondern werden zunehmend oval. Zum Ende der Kappenphase hin nimmt das proximale Zentriol mit dem Nukleus der Spermatide Kontakt auf.

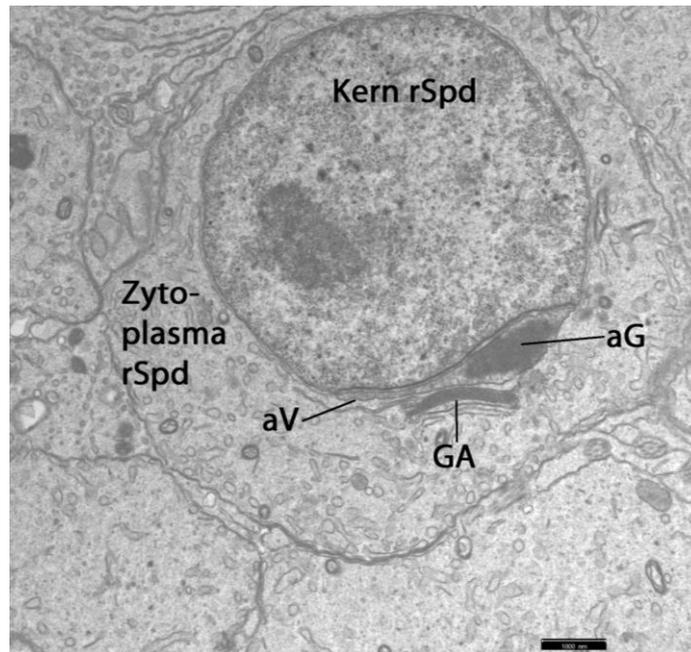


Bild 51: Runde Spermatide in der Kappenphase im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM. SB=1000 nm. Der Inhalt der akrosomalen Vakuole (aV) hat sich verdichtet, so dass ein akrosomales Granulum (aG) zu beobachten ist. Der Kern der runden Spermatide (rSpd) unterhalb der akrosomalen Vakuole erscheint eingedellt. GA Golgi-Apparat.

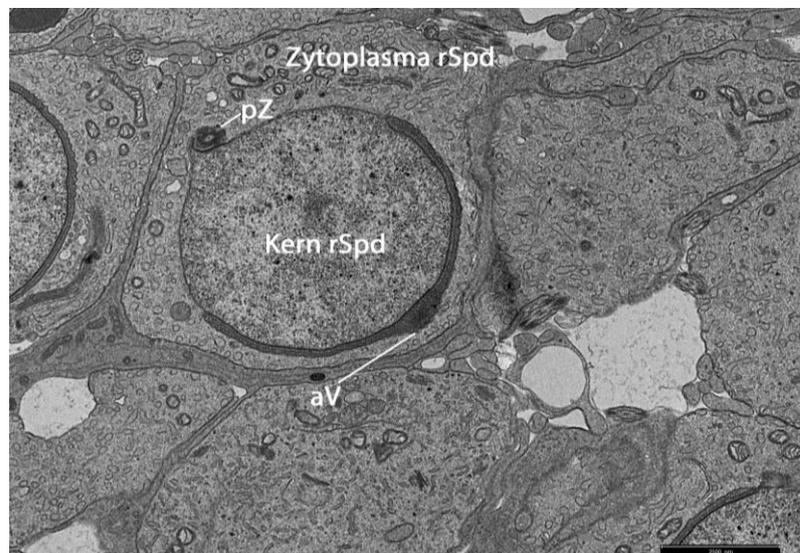


Bild 52: Runde Spermatide in der späten Kappenphase im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM. SB=2500 nm. Die akrosomale Vakuole (aV) hat sich kappenartig über die äußere Kernmembran der runden Spermatide (rSpd) bis zum Äquator des Kerns gelegt und wird zur Akrosomenkappe. Das proximale Zentriol (pZ) nimmt mit dem Kern der Spermatide Kontakt auf.

3. *Akrosomenphase*: Während der gesamten, sich anschließenden Akrosomenphase (Bild 53, 54) streckt sich der Kern und nimmt eine elongierte Gestalt ein. Ferner dreht sich der Nukleus, so dass er nun am basal liegenden Pol der Zelle liegt. Der Hauptanteil des Zytoplasmas und der Zellorganellen kommen hinter dem Kern und in dem Teil der Zelle zu liegen, der dem Lumen des Tubulus seminifer contortus nahe ist. Die Akrosomenkappe entwickelt sich weiter zum Akrosom. Dieses ist in Richtung Basalmembran orientiert. Das Akrosom bedeckt den Kern zu zwei Drittel und weist einen homogenen und elektronendichten Inhalt auf (Bild 54). Der subakrosomale Raum hingegen beinhaltet nur mäßig elektronendichten Inhalt und sticht daher zwischen dem dunklen Inhalt des Akrosoms und dem dunklen Heterochromatinsaum an der inneren Kernmembran als relativ heller, scharf umzeichnete Schicht heraus. Am Treffpunkt von innerer und äußerer Akrosomenmembran, am perinukleären Ring, ist die Kernmembran bzw. der Kern leicht eingekerbt (Bild 53,54).

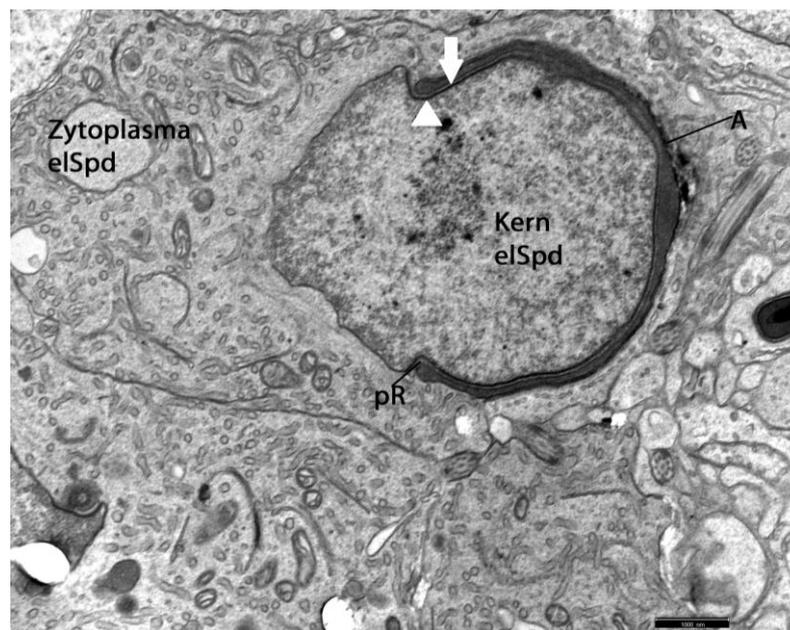


Bild 53: Elongierende Spermatide (elSpd) in der Akrosomenphase im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM. SB=100 nm. Der Kern der Spermatide beginnt sich zu strecken. Die Akrosomenkappe entwickelt sich zum Akrosom (A), das einen elektronendichten, homogenen Inhalt aufweist. Daher sticht der subakrosomale Raum (Pfeil) mit seinem nur mäßig elektronendichten Inhalt zwischen dem Akrosom (A) und dem dunklen Heterochromatinsaum der inneren Kernmembran (Pfeilspitze) hervor. Am Treffpunkt von der inneren und äußeren Akrosomenmembran, am perinukleären Ring (pR), ist der Kern der elongierenden Spermatide (elSpd) eingekerbt.

Die Kondensation des Chromatins im Kern schreitet fort. Das Chromatin besteht nun zunehmend aus elektronendichten Granula. Die innere und äußere Kernmembran liegen dicht aneinander. Der Geißelapparat, der Hauptbestandteil des Schwanzes, hat sich im Halsbereich der Spermatide aus dem distalen Zentriol geformt. Bei der Bildung des Mittelstücks des Schwanzes lagern sich die Mitochondrien, die vorher gleichmäßig im Zytoplasma verteilt waren, spiralförmig um das Axonema des Geißelapparats an. In der Nähe des proximalen Zentriols hat sich der Schlussring entwickelt. Nachdem sich die Zelle streckt, liegt dieser beim fertigen Spermium am Übergang vom Mittelstück zum Hauptstück. Zum Ende der Akrosomenphase bzw. zu Beginn der Reifungsphase wandert der perinukleäre Ring zum unteren Pol des Kerns und verschwindet. In der Nähe der Zentriolen kann auch der sog. Chromatoid-Körper beobachtet werden. Dabei handelt es sich um ein elektronendichtes Gebilde ohne Membran, um das sich mehrere Vesikel unterschiedlicher Größe gruppieren.

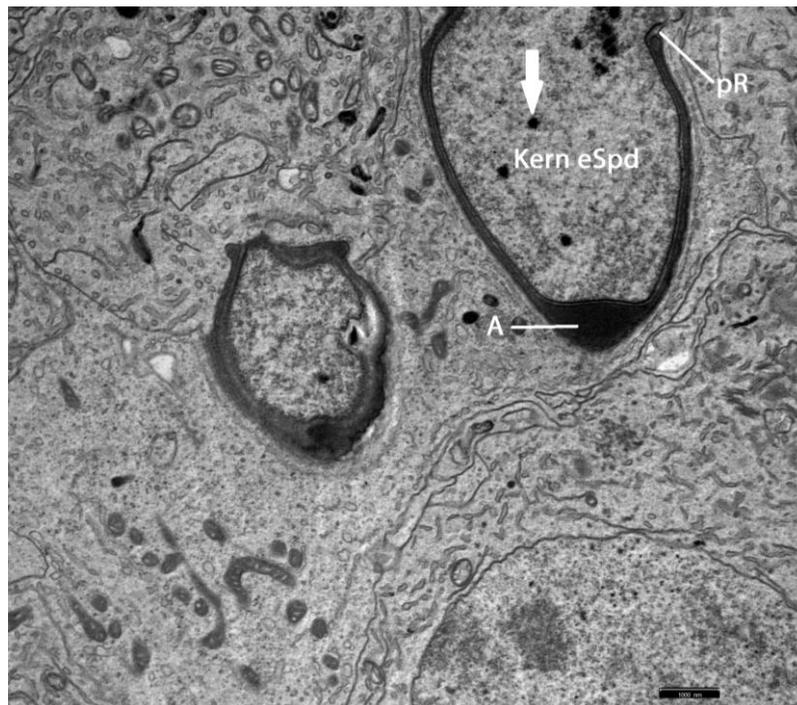


Bild 54: Elongierte Spermatide (ESpd) in der Akrosomenphase im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM.SB=1000 nm. Der Kern der Spermatide hat sich gestreckt; im Kern kondensiert das Heterochromatin weiter (Pfeil). Am perinukleären Ring (pR), dem Treffpunkt der inneren und äußeren Akrosomenmembran (A), ist eine Einkerbung des Kerns erkennbar.

4. *Reifungsphase:* In der Reifungsphase (Bild 55, 56) werden die Kondensation des Chromatins und die Formung des Akrosom abgeschlossen. Das Akrosom

liegt, getrennt durch den subakrosomalen Raum, der äußeren Kernmembran an. Der subakrosomale Raum erscheint nur mäßig elektronendicht. Das Akrosom hingegen beinhaltet einen sehr dichten Inhalt, wobei der des Kerns noch elektronendichter erscheint. Das Chromatin im Kern erscheint homogen (Bild 55 ,56). Der Hauptanteil des Zytoplasmas mit Organellen, wie zum Beispiel dem Golgi-Apparat, Lipidtropfen etc., wird abgeschnürt und als Restkörper abgegeben. Eine Ausnahme stellt das zytoplasmatische Tröpfchen am Mittelstück dar, das einen geringer Anteil des Zytoplasmas darstellt und erst im Nebenhoden entlassen wird. An der Spermatide sind die sog. „ectoplasmic specializations“ erkennbar. Diese setzen sich aus den Membranen der Sertoli-Zellen, einem Aktinbündel und submembranöse Zisternen des ER zusammen. Als eine weitere Kontaktstruktur zwischen der Spermatide und der Sertoli-Zelle können auch vereinzelt „tubulobulbar complexes“, also löffelförmige Ausstülpungen in das Zytoplasma der Sertoli-Zelle hinein, beobachtet werden. Oftmals ist direkt am Kern der Spermatide glattes ER zu identifizieren (Bild 55). Zum Ende der Spermiogenese nimmt der Kontakt der Keimzellen zur Sertoli-Zelle ab, bis sie schließlich in das Lumen des Tubulus seminifer contortus abgegeben werden.

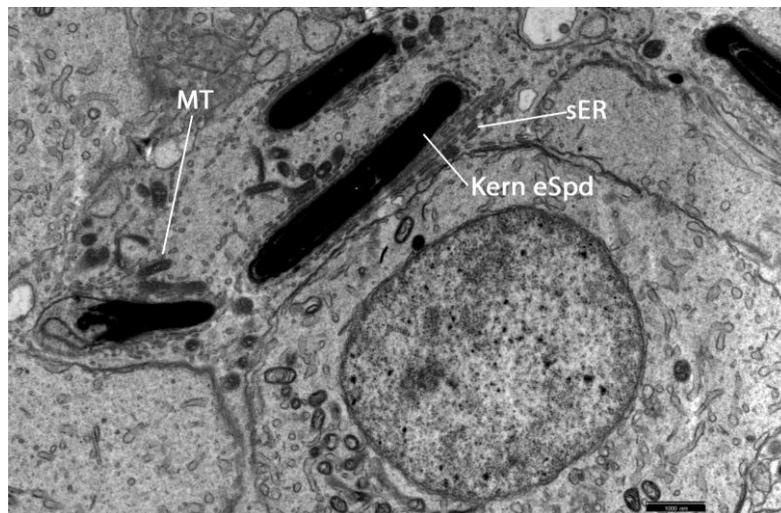


Bild 55: Elongierte Spermatide während der Reifungsphase im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM. SB=1000 nm. Während dieser Phase wird die Kondensation des Chromatins im Kern der elongierten Spermatide (eSpd) abgeschlossen. Direkt am Kern der Spermatide kann glattes Endoplasmatisches Retikulum (sER) beobachtet werden. MT Mitochondrien

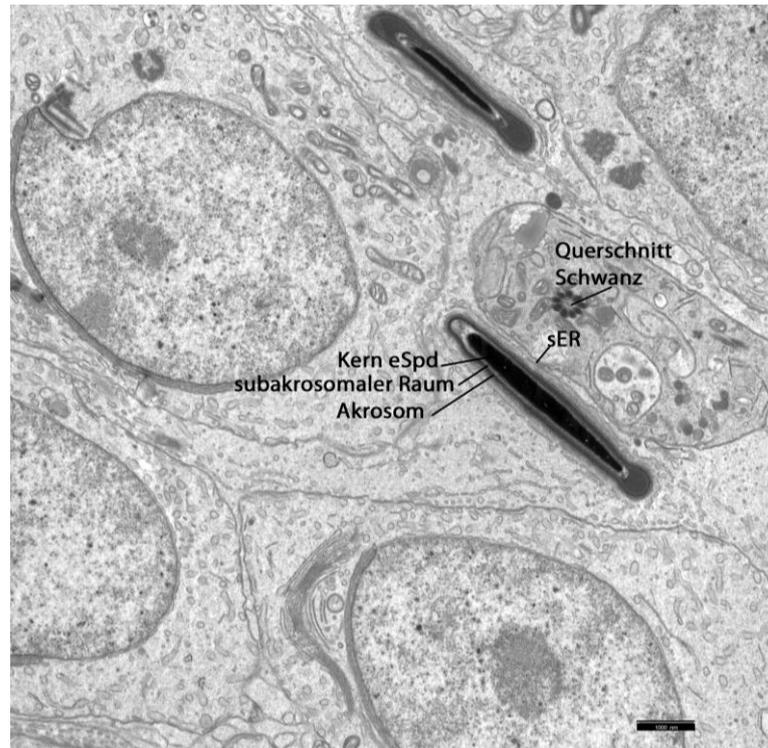


Bild 56: Elongierte Spermatozoen während der Reifungsphase im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM. SB=100 nm. In dieser Phase wird die Formung des Akrosoms abgeschlossen. Das Akrosom liegt, getrennt durch den subakrosomalen Raum, der äußeren Kernmembran an. sER glattes Endoplasmatisches Retikulum.

Das in das Lumen abgegebene Spermium besteht aus einem Kopf- und einem Schwanzteil. Der Schwanzteil wiederum kann in ein Hals-, Mittel-, Haupt- und Endstück unterteilt werden. Alle Abschnitte sind von einer Zellmembran umgeben. Der Zellkern stellt den Hauptbestandteil des Kopfes dar und ist stark verdichtet. Der Kopf des Spermiums wird im vorderen Bereich zu zwei Drittel vom Akrosom überzogen. Derjenige Teil des Kopfes, den nicht das Akrosom bedeckt, wird von der postakrosomalen Scheide umhüllt. Das Akrosom besitzt eine äußere und innere Membran. Diese fusionieren im distalen Bereich des Akrosoms, im Äquatoralsegment, miteinander. Im Raum, der zwischen den beiden Membranen liegt, befindet sich fein-granulärer Inhalt. Den Übergang vom Kopf zum Schwanz bildet die Basalplatte. Diese ist durch verdichtete Substanz gekennzeichnet. Der Schwanz des Spermiums besteht aus vier Bestandteilen (Hals, Mittelstück, Hauptstück, Endstück). Der Hals des Spermiums stellt das Bindeglied zwischen dem Kopf und dem Mittelstück des Spermiums dar. Er besitzt einen Gelenkkopf, mit dem über eine Basalplatte Kontakt zu der

Implantationsgrube besteht. Der Hals setzt sich aus elektronendichten Segmenten, den Streifenkörper, zusammen. Hier haben die Mantelfasern, die beinahe den gesamten Spermiumschwanz durchziehen, ihren Ursprung. Die Mantelfasern gehören zum Geißelapparat. Letzterer besteht aus einem Achsenfaden mit einem zentralen Tubuluspaar und neun äußeren Doppeltubuli, die das zentrale Tubuluspaar umgeben. Um die neun Doppeltubuli verlaufen neun dichte Mantelfasern in Längsrichtung. Das Mittelstück des Schwanzes beinhaltet den Achsenfaden sowie die Mantelfasern des Geißelapparats. Den Mantelfasern liegen Mitochondrien an. Der Schlussring mit elektronendichten Material bildet die Grenze zum folgenden Abschnitt des Spermiums, dem Hauptstück. Das Hauptstück beinhaltet direkt unter der Zellmembran eine Anzahl von Ringfasern. Diese sind miteinander verbunden und umhüllen die Mantelfasern und den Achsenfaden. Das Hauptstück ist von beträchtlicher Länge, während das sich anschließende Endstück relativ kurz ist. Im Endstück wird der Achsenfaden nur noch von der Zellmembran umgeben und spaltet sich in mehrere, unterschiedlich lange Mikrotubuli auf.

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen

Alle elektronenmikroskopisch untersuchten, als „nicht-geschlechtsreif“ bezeichneten Tiere waren bereits in die Spermiogenese eingetreten und weisen neben A-, In- und B-Spermatogonien und Spermatozyten runde und elongierte Spermatiden auf. A-, In- und B-Spermatogonien liegen der Lamina basalis an und befinden sich unterhalb der Blut-Hoden-Schranke. Den engsten Kontakt mit der Basalmembran weist die A-Spermatogonie auf. Der runde bis ovale Kern weist nur wenig, gleichmäßig verteiltes Heterochromatin auf. Manchmal treten kleine Heterochromatinschollen auf. Verdichtetes Heterochromatin tritt regelmäßig an der Kernmembran auf und bildet auf diese Weise einen schmalen, gut erkennbaren Saum. Der zumeist zentral liegende Kern beansprucht einen Großteil der Zelle. Zentral oder peripher an der Kernmembran liegt meist deutlicher Nukleolus mit einem prominenten Nukleonema, das von kleinen hellen Bezirken, der Pars amorpha, unterbrochen wird. Im lockeren und feingranuliertem Zytoplasma liegen relativ wenige Organellen, darunter Mitochondrien vom Cristae-Typ, ein mäßig entwickelter Golgi-Apparat, Ribosomen sowie eine geringe Menge von glattem ER. Die In-Spermatogonie ist kleiner als die A-Spermatogonie und weist eine geringere Kontaktfläche als diese mit der

Basalmembran der Lamina propria auf. Die oval bis runde Keimzelle besitzt einen im Vergleich zur A-Spermatogonie dichteren Kern. Heterochromatin tritt in Form von Schollen auf; ferner verdichtet es sich an der Kernmembran und bildet einen dunklen Saum. Meist ist ein runder, exzentrisch im Kern liegender Nukleolus erkennbar. Das fein granuliertes Zytoplasma der In-Spermatogonie beinhaltet neben dem Golgi-Apparat auch Mitochondrien sowie raues und glattes ER. Die birnenförmige bis runde B-Spermatogonie verliert den Kontakt zur Lamina basalis. Ihr runder, zentral in der Zelle liegender Kern ist kleiner als der der In-Spermatogonie. Die Menge an Heterochromatinschollen nimmt zu. Auch ist Heterochromatin als dunkler, gut sichtbarer Saum an der Kernmembran erkennbar. Das Chromatin erscheint dichter als das im Kern der In-Spermatogonie. Meist ist ein dezentral liegender, unauffälliger Nukleolus zu identifizieren. Der Anteil des Zytoplasmas am Zellvolumen ist gering. Im Zytoplasma sind runde und langgestreckte Mitochondrien vom Tubulus-Typ, raues und glattes ER, Ribosomen sowie ein Golgi-Apparat lokalisiert. Die präleptotänen primären Spermatozyten gleichen in ihrer Lage und Ausstattung der B-Spermatogonien: die ovale Keimzelle befindet sich sehr nahe an der Basalmembran und hat die Blut-Hoden-Schranke noch nicht passiert. Sie weist einen meist runden Kern mit stellenweise auftretenden Chromatinschollen auf. Ein unauffälliger Nukleolus kann vorhanden sein. Als Zellorganellen treten unter anderem Mitochondrien vom Cristae-Typ und ER auf. Während der ersten Reifeteilung werden die primären Spermatozyten vom basalen Kompartiment des Keimepithels in das adluminales Kompartiment befördert und liegen dann oberhalb der Blut-Hoden-Schranke, die hauptsächlich durch „tight junctions“ (Zonulae occludentes) der Sertoli-Zellen gebildet werden. Die primären Spermatozyte, deren Größe über die einzelnen Stadien der ersten Reifeteilung kontinuierlich zunimmt, besitzt eine runde bis ovale Gestalt. Ihr Kern liegt in der Regel zentral in der Zelle, wobei die Kernmembran in der Regel einen welligen Verlauf aufweist. Das Zytoplasma der Spermatozyte weist eine größere Menge an Zellorganellen auf als das der Spermatogonien. Auch nimmt der Anteil an Zellorganellen im Laufe der Stadien der Meiose zu; dabei sind Mitochondrien vom Cristae-Typ, raues ER, freie Ribosomen sowie ein immer umfangreicher werdender Golgi-Apparat anzutreffen. Die sekundäre Spermatozyte weist einen meist runden Kern auf. Heterochromatin kann in Form von Schollen bzw. als Ansammlung nahe der Kernmembran beobachtet werden. Die Spermatozyte besitzt

ein schmales Zytoplasma sowie einen runden bzw. später elongierten Kern. Bei den hier untersuchten nicht-geschlechtsreifen Kaninchen kann die Spermiogenese bis einschließlich der Akrosomenphase beobachtet werden. In der Golgi-Phase liegt der runde Zellkern mit homogen verteiltem Euchromatin und einigen dunklen Heterochromatinschollen zentral in der Zelle. Ein Nukleolus kann vorhanden sein. Als Zellorganellen können im mäßig dichten Zytoplasma freie Ribosomen, Mitochondrien vom Cristae-Typ sowie in geringem Maße ER identifiziert werden. Der gut ausgebildete Golgi-Apparat liegt in unmittelbarer Nähe zum Kern und setzt sich aus einem Stapel von Zisternen zusammen. Die vom Golgi-Apparat entlassenen Vesikel von unterschiedlicher Größe wandern zur benachbarten Kernmembran und verschmelzen dort miteinander. Zwischen der dadurch gebildeten akrosomale Vakuole und der Kernmembran liegt der subakrosomale Raum. Die Zentriolen wandern zu dem Kernpol, der der akrosomalen Vakuole gegenüberliegt. Zur Kappenphase hin verdichtet sich der Inhalt der akrosomalen Vakuole, so dass das akrosomale Granulum entsteht. Während der Kappenphase (Bild 59) flacht sich die akrosomale Vakuole ab, dehnt sich aus und berührt die äußere Vakuolenmembran das Granulum. Die akrosomale Vakuole beginnt sich kappenartig über die äußere Kernmembran bis zum Äquator des Kerns zu legen und wird zur Akrosomenkappe. Im Kern beginnt die Kondensation des Chromatins. Zum Ende der Kappenphase wird die Zelle zunehmend oval; ferner nimmt das proximale Zentriol mit dem Nukleus der Spermatide Kontakt auf.

Während der sich anschließenden Akrosomenphase nimmt die Spermatide eine elongierte Gestalt an. Der Nukleus dreht sich und liegt dadurch am basal liegenden Pol der Zelle liegt. Der Hauptanteil des Zytoplasmas und der Zellorganellen befinden sich hinter dem Kern der Spermatide. Die Akrosomenkappe entwickelt sich weiter zum Akrosom, das in Richtung Basalmembran orientiert ist. Der Inhalt des Akrosoms wirkt homogen elektronendicht. Am Treffpunkt von innerer und äußerer Akrosomenmembran, am perinukleären Ring, ist die Kernmembran bzw. der Kern leicht eingekerbt. Die Kondensation des Chromatins im Kern schreitet fort. Das Chromatin besteht nun zunehmend aus elektronendichten Granula.

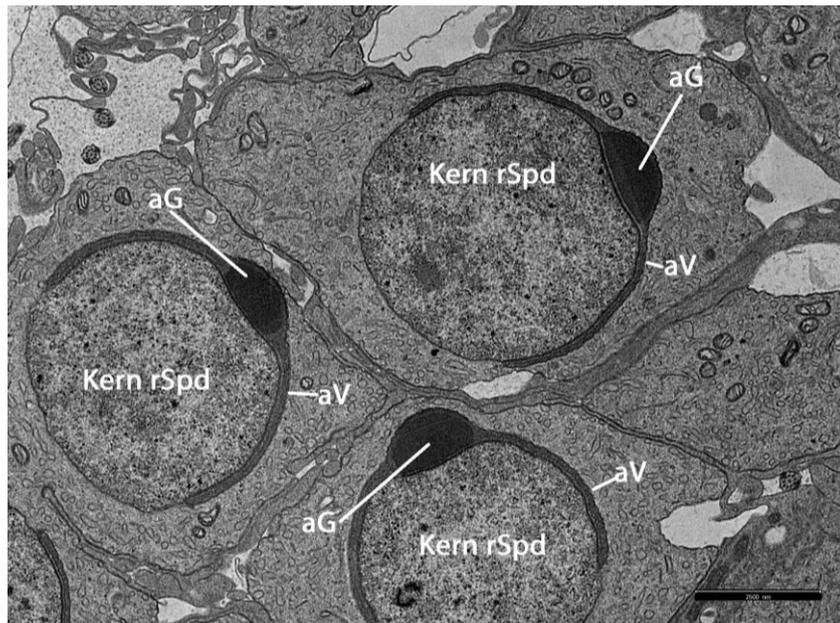


Bild 57: Runde Spermatide in der frühen Kappenphase im Keimepithel eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. TEM. SB=2500 nm. Die akrosomale Vakuole (aV) legt sich kappenartig über die äußere Kernmembran der runden Spermatide (rSpd) und wird zur Akrosomenkappe. Durch die Kondensation des Inhalts der akrosomalen Vakuole entsteht das akrosomale Granulum (aG).

3.2. Interstitium

Geschlechtsreife Kaninchen:

Im Interstitium finden sich neben Blut- und Lymphgefäßen, Fibroblasten und kollagenen Fasern auch Leydig-Zellen (Bild 58, 59). Letztere liegen in Stränge oder in kleinen Ansammlungen. Viele liegen dicht den Blutgefäßen an (Bild 59). Durch ihre Größe, der Gestalt ihres Kerns sowie der Organellenausstattung unterscheiden sie sich deutlich von den anderen Zellen des Interstitiums. Die Leydig-Zellen sind große Zellen von runder bis ovaler Gestalt. Jede interstitielle Zelle besitzt einen runden bis ovalen Kern. Dieser liegt in der Regel exzentrisch in der Zelle. Der Nukleus beinhaltet bisweilen einen Nukleolus, dessen Lage variabel ist: er wird sowohl zentral wie auch peripher an der Kernmembran beobachtet. Die zweischichtige Kernmembran besitzt einige Kernporen (Bild 59) und zeigt stellenweise leichte bis deutliche Invaginationen. In diesen Fällen wirkt der Kern mehr oder weniger gelappt. Der Kern beinhaltet in seinem Karyoplasma Euchromatin und Heterochromatin. Das Heterochromatin ist diffus im Kern

verteilt. Es verdichtet sich im Bereich der inneren Kernmembran, so dass diese als dunkel gefärbter Saum hervorsticht (Bild 58). Benachbarte Leydig-Zellen sind über „gap junctions“ miteinander verbunden. In unmittelbarer Umgebung sind ferner Kollagenfasern vorhanden, die einzelne Gruppen von Leydig-Zellen von anderen Strukturen abgrenzen. Zwischen den Leydig-Zellen sind Fibroblasten und Kollagenfasern zu erkennen.

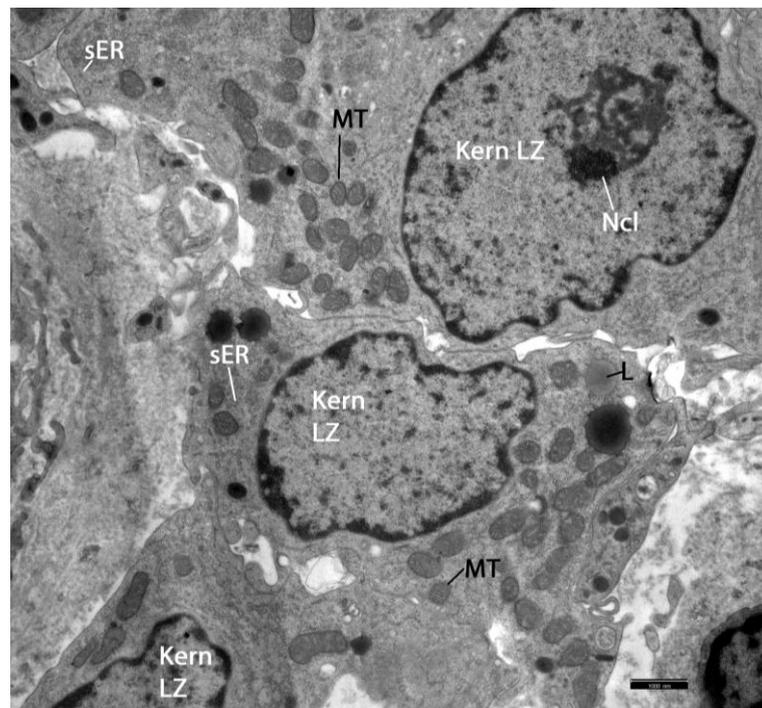


Bild 58: Leydig-Zellen eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM. SB=1000 nm. Im Zytoplasma der Leydig-Zellen (LZ) finden sich neben Lysosomen (L) auch Mitochondrien (MT) und glattes Endoplasmatisches Retikulum (sER). Im Kern der oberen Leydig-Zelle ist ein Nukleolus (Ncl) identifizierbar.

Der Saum ist dabei von unterschiedlicher Dicke. An den Kernporen ist kein Heterochromatin vorhanden, so dass diese deutlich hervortreten (Bild 61). Auch kann Nukleolus-assoziiertes Heterochromatin beobachtet werden. Das Zytoplasma ist von einer mittleren Elektronendichte. Es enthält Lysosomen, freie Ribosomen und Polyribosomen, wobei als prominenteste Organellen Mitochondrien und ER genannt werden können (Bild 58, 59). Das in den meisten Fällen glatte ER besteht aus netzartig verzweigten Schläuche, die unterschiedlich angeschnitten sind. Es ist über das gesamte Zytoplasma verteilt. Raues ER kann nur in geringerer Menge gefunden werden. Ferner sind zahlreiche Mitochondrien zu identifizieren, die scheinbar zufällig in der Zelle verteilt sind. Sie sind groß und von unterschiedlicher Gestalt. Die Matrix der Mitochondrien ist relativ dicht. Die

Mitochondrien sind vom tubulären Typ. Der Golgi-Apparat ist mäßig entwickelt und besteht aus wenigen Membranlagen. Er ist bevorzugt in Kernnähe angesiedelt. Ferner enthält die Zelle einige wenige Lipidtröpfchen, deren Größe variiert. Die Menge kann mit „wenig“ bis „moderat“ eingestuft werden.

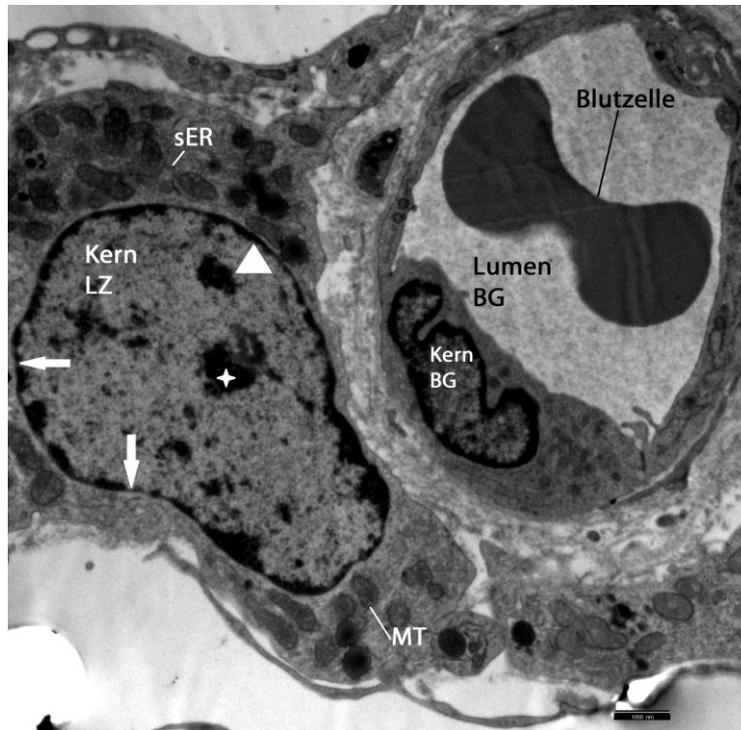


Bild 59: Leydig-Zelle eines geschlechtsreifen Kaninchens in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Blutgefäß (BG).TEM. SB=1000 nm. Die Kernmembran der Leydig-Zelle (LZ) besitzt einige Kernporen (Pfeil). Das Heterochromatin ist diffus im Kern verteilt (Stern). Im Bereich der inneren Kernmembran verdichtet sich das Heterochromatin zu einem Saum (Pfeilspitze). Im Zytoplasma der Leydig-Zellen befinden sich glattes Endoplasmatisches Retikulum (sER) und Mitochondrien (MT).

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen

Die Zwischenzellen sind in Strängen oder in kleinen Ansammlungen gelagert und liegen oft dicht den Blutgefäßen an. Die Leydig-Zellen sind von runder bis ovaler Gestalt und besitzen einen in der Regel exzentrisch liegenden Kern. Der bisweilen vorhandene Nukleolus kann zentral wie auch peripher an der Kernmembran lokalisiert sein. Die zweischichtige Kernmembran zeigt stellenweise leichte bis deutliche Invaginationen. Der Kern besitzt Euchromatin und diffus verteiltes Heterochromatin. Letzteres verdichtet sich im Bereich der inneren Kernmembran, so dass diese als dunkel gefärbter Saum von unterschiedlicher Dicke hervorsteht.

An den Kernporen ist kein Heterochromatin vorhanden, so dass diese deutlich hervortreten. Auch Nukleolus-assoziiertes Heterochromatin kann beobachtet werden. Als Organellen können Lysosomen, freie Ribosomen und Polyribosomen, Mitochondrien sowie meist glattes ER identifiziert werden (Bild 60). Neben einem mäßig entwickelten Golgi-Apparat liegt eine kleine bis eine moderate Menge an Lipidtropfen im Zytoplasma der Leydig-Zelle. „Gap junctions“ verbinden benachbarte Zwischenzellen miteinander.

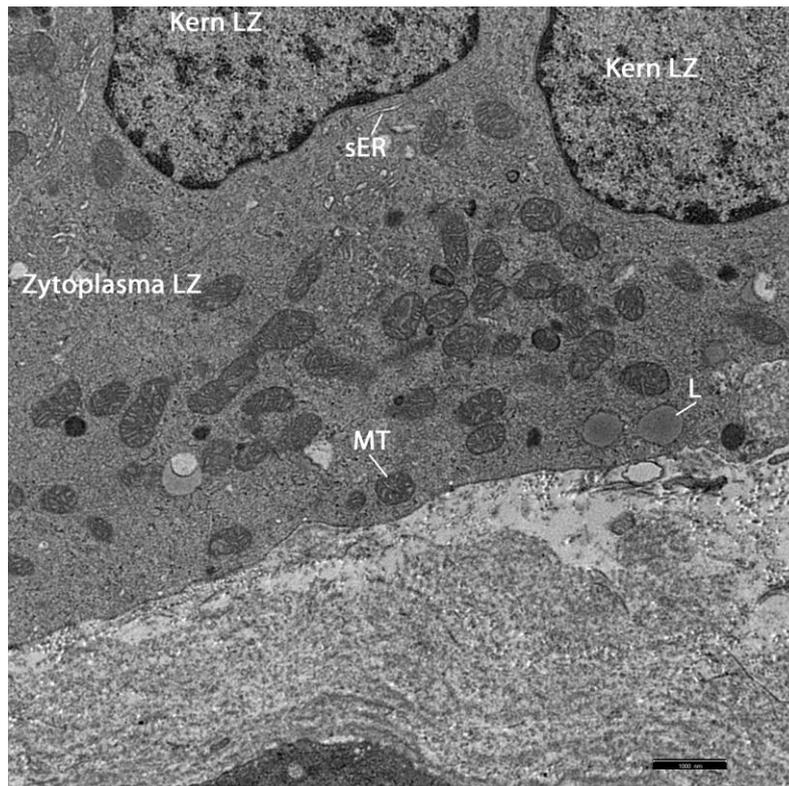


Bild 60: Zytoplasma einer Leydig-Zelle eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. TEM. SB=1000 nm. Im Zytoplasma der Leydig-Zelle (LZ) finden sich die für diese Zellen charakteristisch große Menge an Mitochondrien (MT) und glattem Endoplasmatisches Retikulum (sER). L Lysosomen

4. Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen

In diesem Abschnitt soll die Verteilung von Lektinbindestellen im geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchenhoden dargestellt werden. Es wurden ausschließlich Bouin-fixierte Schnitte benutzt. Dadurch gelangten nur nicht-geschlechtsreife Tiere zur Auswertung, deren Spermio-genese maximal bis zu runden Spermatiden fortgeschritten ist. Durch die jeweiligen korrespondierenden Zucker konnte die Bindung der entsprechende Lektine an die

sonst positiven Strukturen im Schnitt gehemmt werden. In der folgenden Darstellung der Ergebnisse werden die Intensität, die Regelmäßigkeit sowie die Gleichmäßigkeit der Reaktion durch die jeweiligen Lektine berücksichtigt.

4.1. D-Glukose bzw. D-Mannose bindende Lektine der Gruppe I

Die zu dieser Gruppe gehörenden Lektine ConA, LCA und PSA besitzen sowohl im Keimepithel als auch im übrigen Hodengewebe zahlreiche Bindungsstellen.

4.1.1. Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem *Canavalia ensiformis* Agglutinin (ConA)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Im Keimepithel des geschlechtsreifen Kaninchens ist regelmäßig eine Reaktion in den Keimzellen zu beobachten. Dort ist eine Fluoreszenz im Zytoplasma der Spermatogonien, der Spermatozyten sowie der Spermatiden erkennbar, die zumeist auf die Fluoreszenz von Granula zurückzuführen ist (Bild 62). Auch ist stets eine sehr starke Markierung im Zytoplasma der elongierten Spermatiden und in den Restkörpern der elongierten Spermatiden in Phase VIII zu beobachten (Bild 62). Das akrosomale System der runden Spermatiden bindet ConA-FITC nicht. Regelmäßig jedoch färbt sich das Akrosom der elongierten Spermatide in der Phase VII der Spermatogenese stark an (Bild 62). Am Kopf der Spermien sind stets Bindungsstellen für ConA-FITC deutlich erkennbar. Der Schwanz des Spermiums erscheint immer negativ. Der apikale Teil der Sertoli-Zellen zeigt sich regelmäßig in der zweiten Hälfte des Keimepithelzyklus mit zwei Generationen von Spermatiden fluoreszierend (Bild 62). Im Interstitium besitzt das Lektin eine Affinität zu den Leydig-Zellen. Hier kann regelmäßig eine deutliche Fluoreszenz in Granula des Zytoplasmas beobachtet werden. Ebenso zeigen sich Zellen in der Hodenkapsel und im Mediastinum markiert, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um heterotope Leydig-Zellen handelt. Ferner ist konstant eine deutlich positive Reaktion in den Wänden der Blutgefäße der Hodenkapsel, des Interstitiums, der Chordae retis (Bild 61) und des Mediastinums feststellbar. Auch das Bindegewebe des Hodenparenchyms reagiert durchwegs schwach positiv mit ConA-FITC (Bild 61). In den samenableitenden Wegen kann stets eine starke Fluoreszenz im gesamten Zytoplasma der Epithelzellen von Tubuli recti und Rete testis (Bild 61) gezeigt werden. Die Reaktionen sind in den Tabellen 19 und 20 zusammengefasst.

Tabelle 19: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von ConA-FITC im akrosomalen System (AS) der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens

| | <u>Phase I</u> | <u>Phase V-VII</u> | <u>Phase VIII</u> |
|--------------------------------|----------------|---------------------|---------------------|
| Runde Spermatische | Negativ | Negativ | Negativ |
| Elongierte Spermatische | - | AS in U-Form* ++ | - |
| Spermium | - | - | AS in U-Form* ++ |

Abkürzungen: AS akrosomales System *regelmäßig, - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv

Tabelle 20: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von ConA-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|--|------------------------|-------------------|--|
| Bindegewebe | | +/- | - |
| Blutgefäßwand | | + | Kapillare: Endothel; Arterie und Vene: Tunica intima, media, externa |
| Leydig-Zelle | | + | Granula im Zytoplasma |
| Lamina propria | | - | - |
| Keim-epithel | Sertoli-Zelle | ++ | Zytoplasma: apikal in 2. Hälfte KEZ |
| | Spermatogonie | + | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatozyte | ++ | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatische rund | ++ | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatische elongiert | ++ | AS s.Tab. |
| | Spermium | +/- | Kopf (AS s.Tab.)//Schwanz |
| | Restkörper | +++ | - |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | | ++ | Gesamte Epithelzelle |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv +++ sehr stark positiv, KEZ Keimepithelzyklus, AS akrosomales System, s. Tab. siehe Tabelle 19

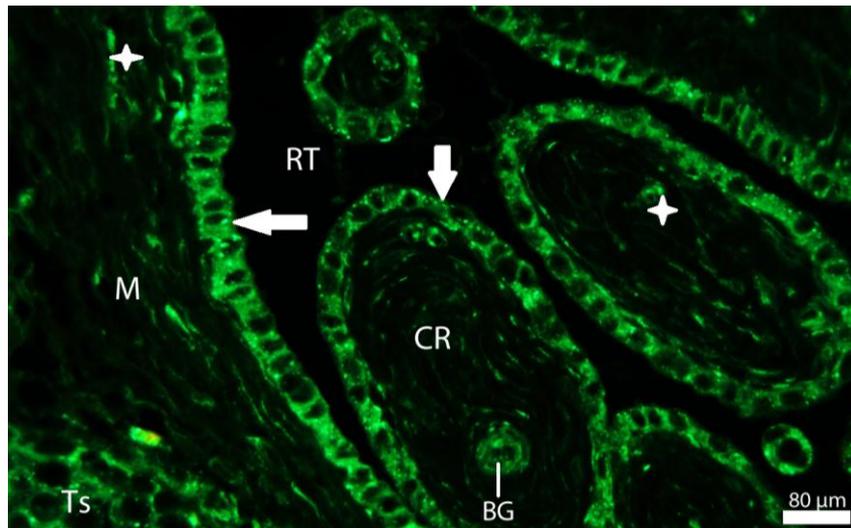


Bild 61: Rete testis im Mediastinum testis eines geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung von ConA-FITC. SB=80 µm. Die Epithelzellen der Chordae retis (CR) und des Rete testis (RT) weisen eine positive Reaktion auf (Pfeile). Dabei ist die gesamte Zelle markiert. In den Wänden der Blutgefäße (BG) der Chordae retis ist eine Fluoreszenz erkennbar. Es reagieren einzelne Bestandteile des Bindegewebes des Mediastinums (M) und der Chordae retis (Sterne). Ts Tubulus seminifer contortus

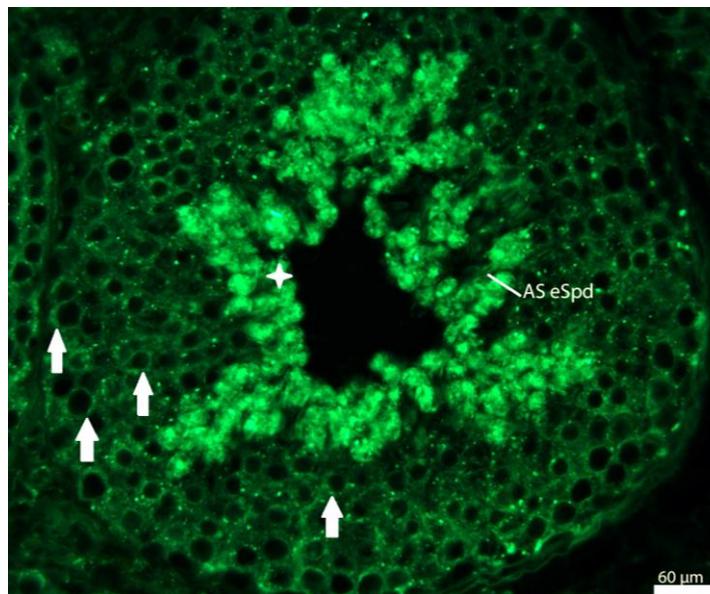


Bild 62: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase V-VII. Bindung von ConA-FITC. SB=60 µm. Im Keimepithel reagieren Granula im Zytoplasma der Spermatogonien, der Spermatozyten und der runden Spermatozoen (Pfeile). Das akrosomale System der elongierten Spermatozoen (AS eSpd) zeigt sich positiv. Das Zytoplasma der elongierten Spermatozoen sowie das apikale Zytoplasma der Sertoli-Zellen sind markiert (Stern).

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens zeigt das Bindegewebe der Hodenkapsel (Bild 63), des Interstitiums, der Chordae retis und des Mediastinums konstant eine deutlich bis stark positive Markierung mit ConA-FITC. Ferner kann regelmäßig eine deutliche Fluoreszenz im Zytoplasma der Zwischenzellen beobachtet werden. Dabei handelt es sich um eine granuläre Reaktion. Diese trifft ebenso für die höchstwahrscheinlich heterotopen Leydig-Zellen der Hodenkapsel und des Mediastinums zu. Ferner können stets Bindungsstellen für das Lektin ConA-FITC in den Spermatogonien, den Spermatozyten und bei den Tieren mit beginnender Spermio-genese in den runden Spermatischen nachgewiesen werden. Hier beschränkt sich die Reaktion zumeist auf die Granula des Zytoplasmas. Die primitiven Stützzellen bleiben ungefärbt. Darüber hinaus reagieren die Epithelzellen von Tubuli recti, Rete testis sowie Chordae retis bei 60% aller Kaninchen, positiv. Diese Markierung betrifft die gesamte Zelle. Die Wände der Blutgefäße der Hodenkapsel, des Interstitiums, der Chordae retis und des Mediastinums weist ebenso stets eine deutliche Reaktion auf. Die Reaktionen sind in der Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von ConA-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> | |
|--|--------------------|--|-----------------------|
| Bindegewebe | + bis ++ | - | |
| Blutgefäßwand | + | Kapillare: Endothel; Arterie und Vene: Tunica intima, media, externa | |
| Leydig-Zelle | + | Granula im Zytoplasma | |
| Lamina propria | - | - | |
| Keim-epithel | Stützzelle | - | |
| | Spermatogonie | ++ | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatozyte | ++ | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatische rund* | ++ | Granula im Zytoplasma |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | - bis ++ | Gesamte Epithelzelle; nicht jedes Tier | |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, *in Tubuli mit begonnener Spermio-genese

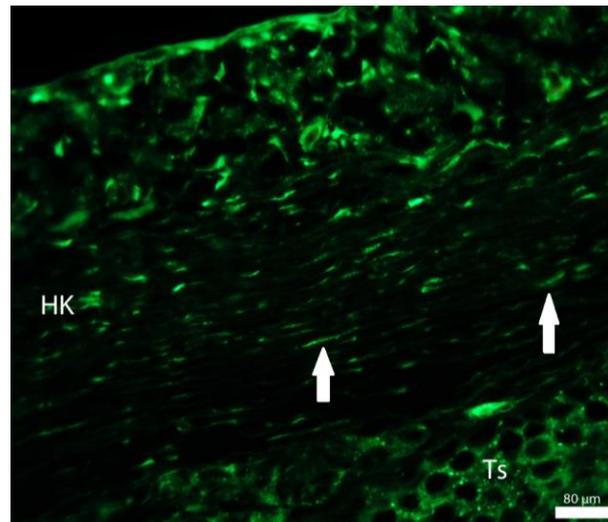


Bild 63: Hodenkapsel eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung von ConA-FITC. SB=80 μm . Einzelne Bestandteile des Bindegewebes der Hodenkapsel (HK) zeigt eine deutliche Markierung mit ConA-FITC (Pfeile). Im sich anschließenden Tubulus seminifer contortus (Ts) ist die positive Reaktion der Keimzellen erkennbar.

4.1.2. Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem Lens culinaris Agglutinin(LCA)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens bindet die Lamina propria regelmäßig LCA-FITC mit hoher Intensität (Bild 65). Ferner ist im Keimepithel eine Fluoreszenz für jede Keimzellgeneration zu beobachten: im Zytoplasma der Spermatogonie und der Spermatozyte sind regelmäßig einzelne fluoreszierende Granula erkennbar. Auch im Zytoplasma der runden und elongierten Spermatischen ist eine solche Reaktion beobachtbar (Bild 65). Regelmäßig ist auch das Akrosom von elongierenden bzw. elongierten Spermatischen der Phase II bis VII darstellbar (Bild 65). Das Akrosom der runden Spermatischen in Form von einer Kappe ist hingegen erst in der Phase I zu identifizieren. Bei Spermien bleibt das Akrosom deutlich positiv während der Schwanz des Spermiums mit LCA-FITC nur schwach markiert wird. Das akrosomale System der Spermatischen und der Spermien hingegen reagiert mit deutlicher bis starker Intensität. Die Restkörper der elongierten Spermatischen in Phase VIII zeigen in der Regel eine schwach-positiv Bindung von LCA-FITC. Im Keimepithel sind ferner einzelne Granula im Zytoplasma der Sertoli-Zellen markiert. Im Interstitium, in der Hodenkapsel, im Mediastinum und in den Chordae retis lassen sich regelmäßig das Bindegewebe

sowie die Wände der Blutgefäße darstellen (Bild 64, 65). Ferner sind die Epithelzellen der Tubuli recti, der Chordae retis sowie des Rete testis im luminalen Bereich der Zelle LCA-positiv (Bild 64). Das Reaktionsmuster nach Inkubation mit LCA-FITC ist in den Tabellen 22 und 23 zusammengefasst.

Tabelle 22: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von LCA-FITC im akrosomalen System der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens

| | <u>Phase I</u> | <u>Phase III</u> | <u>Phase V-VII</u> | <u>Phase VIII</u> |
|------------------------------|-----------------|------------------|--------------------|-------------------|
| Runde Spermotide | AS als Kappe* + | - | Negativ | Negativ |
| Elongierte Spermotide | - | AS in U-Form* + | AS in U-Form* + | - |
| Spermium | - | - | - | AS in U-Form* + |

Abkürzungen: AS Akrosomales System, *regelmäßig, - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv

Tabelle 23: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von LCA-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> | |
|---|----------------------|---|----------------------------------|
| Bindegewebe | ++ | - | |
| Blutgefäßwand | +++ | Kapillaren: Endothel; Arterie und Vene: Tunica intima, media, externa | |
| Leydig-Zelle | - | - | |
| Lamina propria | +++ | - | |
| Keim-epithel | Sertoli-Zelle | + | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatogonie | + | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatozyte | + | Granula im Zytoplasma |
| | Spermotide rund | + | Granula im Zytoplasma; AS s.Tab. |
| | Spermotide elongiert | + | Granula im Zytoplasma; AS s.Tab. |
| | Spermium | +++/- | Kopf (AS s.Tab.)//Schwanz |
| | Restkörper | + | - |
| Epithel Tubulus rectus, Rete retis, Chorda retis | +/- | Luminal | |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, AS akrosomales System, s. Tab. siehe Tabelle 22

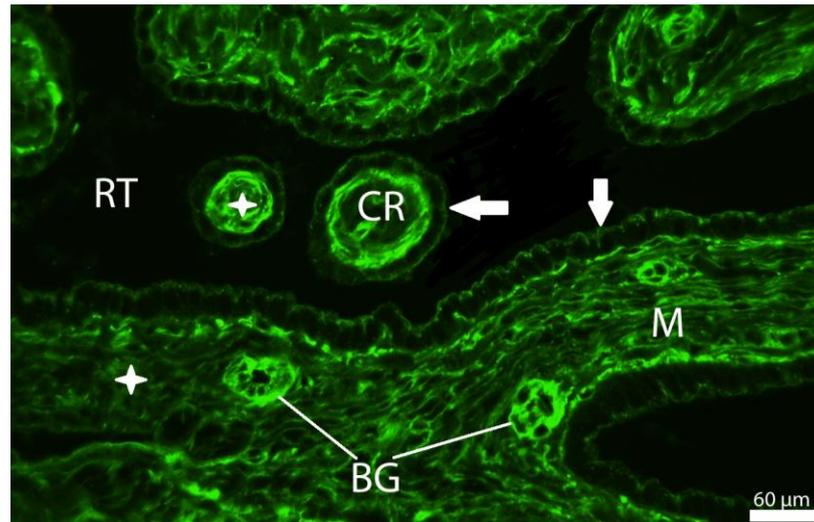


Bild 64: Rete testis im Mediastinum testis eines geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung von LCA-FITC. SB=60μm. Die Epithelzellen der Chordae retis (CR) und des Rete testis (RT) fluoreszieren im luminalen Bereich (Pfeile). Auch Zellen in den Wänden der Blutgefäße (BG) zeigen eine Reaktion mit LCA-FITC. Das Bindegewebe des Mediastinums (M) sowie der Chordae retis (CR) färbt sich ebenfalls an (Sterne).

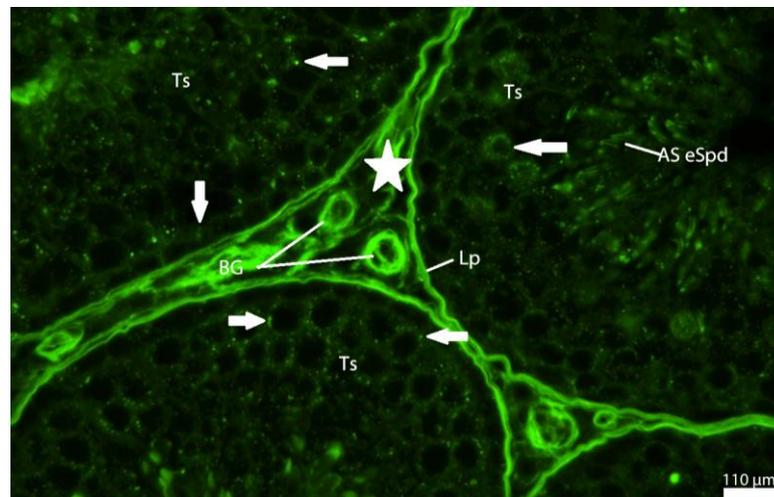


Bild 65: Hodenparenchym eines geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung von LCA-FITC. SB=110 μm. Im Interstitium fluoresziert das Bindegewebe (Stern) sowie die Wände der Blutgefäße (BG). In den Tubuli seminiferi contorti (Ts) reagieren einzelne Granula aller Keimzellgenerationen (Pfeile). Das akrosomale System der elongierten Spermatiden (AS eSpd) ist in U-Form markiert. Die Samenkanälchen werden von einer positiv reagierenden Lamina propria (Lp) umgeben.

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Im Keimepithel kann regelmäßig eine Fluoreszenz von Granula im Zytoplasma der Spermatogonien, Spermatozyten (Bild 66) und, falls die Tubuli eines Tieres schon in die Spermio-genese eingetreten ist, der runden Spermatiden festgestellt werden. Auch das Zytoplasma von Ammenzellen in Tubuli seminiferi contorti mit und ohne Lumen fluoresziert in der Regel granulär (Bild 66). Ebenfalls markiert zeigt sich regelmäßig die Lamina propria (Bild 66). Das Bindegewebe und die Wände der Blutgefäße des Interstitiums (Bild 66), der Hodenkapsel, des Mediastinums sowie der Chordae retis verfügen ebenfalls regelmäßig über Bindungsstellen. Das Epithel des Rete testis, der Chordae retis und der Tubuli recti zeigt sich bei einigen, aber nicht allen Tieren negativ: etwa zwei Drittel der untersuchten Kaninchen zeigen eine schwache Intensität im luminalen Bereich der Zelle. Die Reaktionen sind in der Tabelle 24 zusammengefasst.

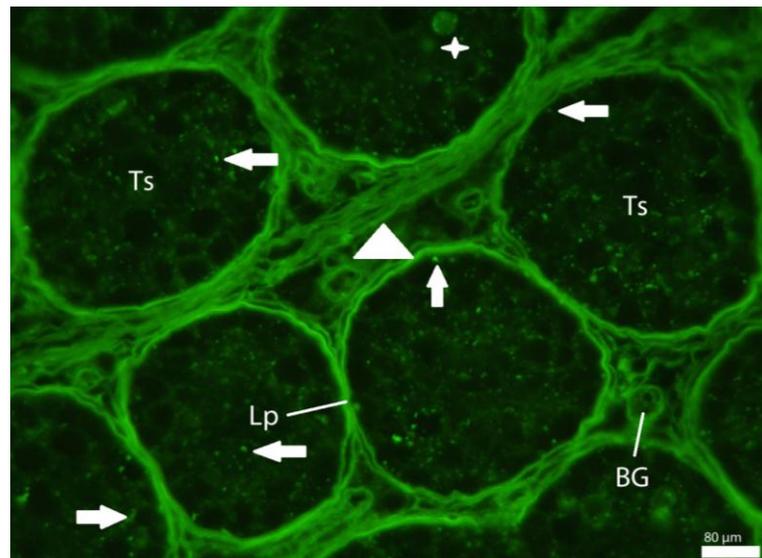


Bild 66: Hodenparenchym eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung von LCA-FITC. SB=80 µm. Im Interstitium fluoreszieren das Bindegewebe (Pfeilspitze) sowie die Wände der Blutgefäße (BG). In den Tubuli seminiferi contorti (Ts) zeigt sich eine granuläre Reaktion im Zytoplasma der Keimzellen und der Stützzellen (Pfeile). Degenerierte Keimzellen fluoreszieren ebenfalls (Stern). Lp Lamina propria

Tabelle 24: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von LCA-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|---|------------------|-------------------|--|
| Bindegewebe | | ++ | |
| Blutgefäßwand | | ++ | Kapillare: Endothel; Arterie und Vene: Tunica intima, media, externa |
| Leydig-Zellen | | - | - |
| Lamina propria | | ++ | - |
| Keim-epithel | Stützzelle | + bis ++ | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatogonie | + bis ++ | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatozyte | + bis ++ | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatide rund* | + | Granula im Zytoplasma; AS in Form von Kappe |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | | - bis ++ | Luminal; nicht jedes Tier |
| Besonderheiten: degenerierte Zellen im Keimepithel fluoreszieren | | | |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, *in Tubuli mit begonnener Spermiogenese, AS akrosomales System

4.3.1. Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem *Pisum sativum* Agglutinin (PSA)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Die Lamina propria zeigt sich stark fluoreszierend (Bild 67, 68, 69). Im Keimepithel überwiegt eine starke granuläre Reaktion im Zytoplasma von Spermatogonien, Spermatozyten sowie Spermatiden. Eine Reaktion des Akrosom ist auf das der elongierten Spermatiden und Spermien beschränkt. Am Spermischwanz ist eine nur schwach-positive Reaktion erkennbar. Ferner werden in der Regel die Restkörper der elongierten Spermatiden schwach positiv markiert. Zusätzlich kann eine granuläre Markierung im Zytoplasma der Sertoli-Zellen beobachtet werden (Bild 67, 68, 69). Ferner reagieren durchwegs die Wände der Blutgefäße (Bild 67, 68, 69) sowie das Bindegewebe der Hodenkapsel, des Interstitiums, des Mediastinums sowie der Chordae retis. Die Epithelzellen des Rete testis, der Chordae retis und der Tubuli recti fluoreszieren regelmäßig schwach positiv im luminalen Bereich. Im Interstitium weisen Granula im Zytoplasma von Leydig-Zellen eine deutliche Färbung auf (Bild 68). Diese

Reaktion tritt unregelmäßig auf: bei jedem Tier sind die meisten, aber nicht alle Leydig-Zellen angefärbt. Das Reaktionsmuster ist in den Tabellen 25 und 26 zusammengefasst.

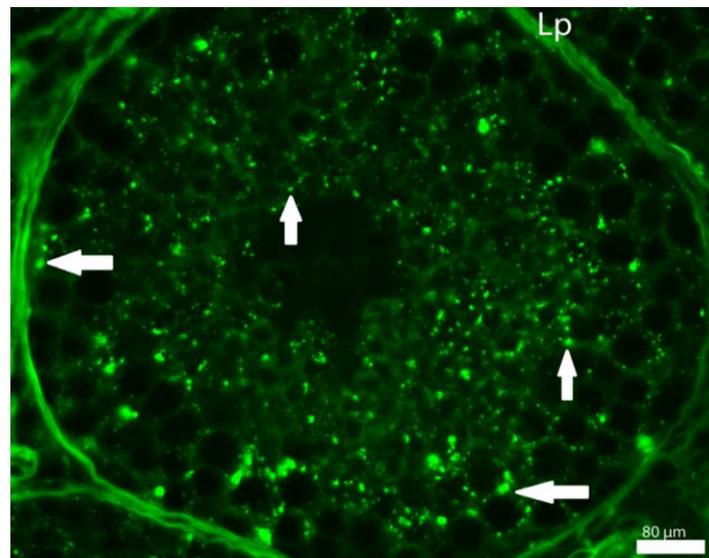


Bild 67: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase I. Bindung von PSA-FITC. SB=80 µm. Es ist eine granuläre Reaktion im Zytoplasma der Sertoli-Zellen, Spermatogonien, Spermatozyten und runden Spermatiden zu beobachten (Pfeile). Auch die Lamina propria (Lp) ist gefärbt.

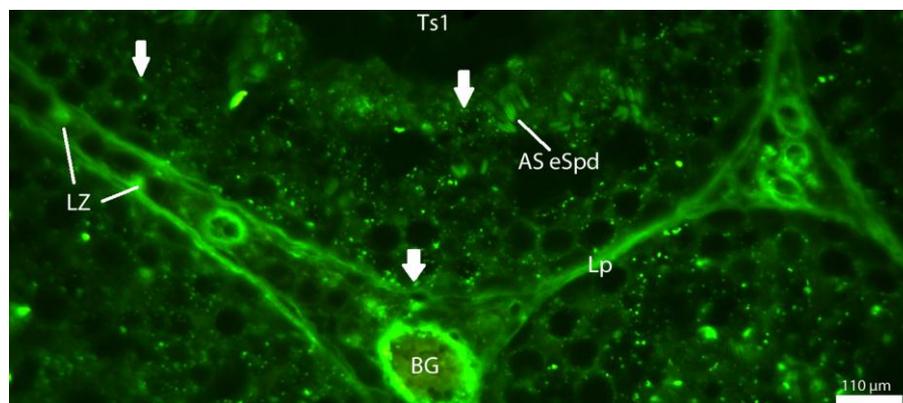


Bild 68: Hodenparenchym eines geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung von PSA-FITC. SB=110 µm. Es kann unregelmäßig eine Reaktion im Zytoplasma der Leydig-Zellen (LZ) beobachtet werden. Die Wände der Blutgefäße (BG) fluoreszieren ebenfalls. Das Keimepithel des Tubulus seminifer contortus (Ts1) in der Phase III zeigt eine granuläre Reaktion im Zytoplasma der Keimzellen aller Generationen (Pfeile). Das akrosomale System der elongierten Spermatozoen (AS eSpd) fluoresziert in U-Form. Das Samenkanälchen wird von einer fluoreszierenden Lamina propria (Lp) umgeben.

Tabelle 25: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von PSA-FITC im akrosomalen System (AS) der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens

| | <u>Phase I</u> (Bild 67) | <u>Phase III</u> (Bild 68) | <u>Phase V- VII</u> | <u>Phase VIII</u> (Bild 69) |
|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Runde Spermotide | Negativ | - | Negativ | Negativ |
| Elongierte Spermotide | - | AS in U- Form* ++ | AS in U- Form* ++ | - |
| Spermium | - | | - | AS in U-Form* + |

Abkürzungen: AS akrosomales System, *regelmäßig, - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv

Tabelle 26: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von PSA-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|--|----------------------|-------------------|--|
| Bindegewebe | | + | - |
| Blutgefäßwand | | +++ | Kapillare: Endothel; Arterie und Vene: Tunica intima, media, externa |
| Leydig-Zelle | | + | Granula im Zytoplasma: nicht jede Zelle |
| Lamina propria | | ++ | - |
| Keim-Epithel | Sertoli-Zelle | + | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatogonie | ++ | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatozyte | ++ | Granula im Zytoplasma |
| | Spermotide rund | ++ | Granula im Zytoplasma |
| | Spermotide elongiert | ++ | Granula in Phase II-IV; AS s.Tab. |
| | Spermium | +//+/- | Kopf (AS s.Tab.)// Schwanz |
| | Restkörper | +/- | - |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | | +/- | Luminal |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, AS akrosomales System, s. Tab. siehe Tabelle 25

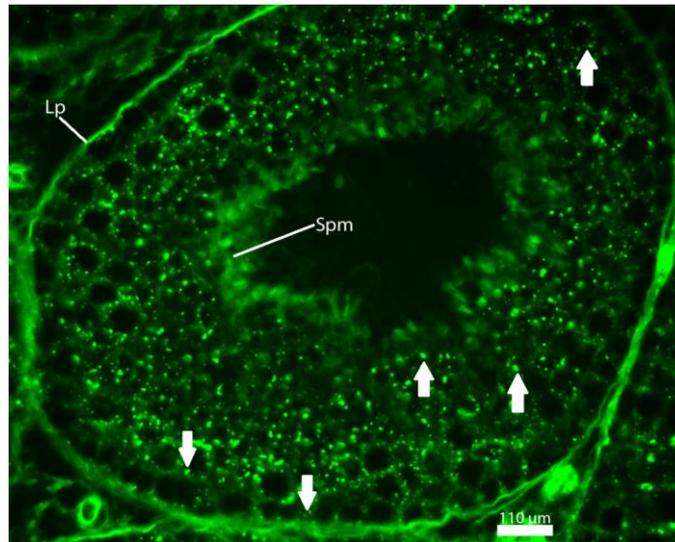


Bild 69: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase VIII. Bindung von PSA-FITC. SB=110 μm . Es reagieren die Köpfe und Schwänze der Spermien (Spm) positiv. Das akrosomale System der runden Spermatiden bleibt unmarkiert. Es kann eine granuläre Reaktion im Zytoplasma der Sertoli-Zellen, Spermatogonien, Spermatozyten, runden Spermatiden sowie in den Restkörpern beobachtet werden (Pfeile). Lp Lamina propria

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Es erweisen sich stets die Wände der Blutgefäße (Bild 70) sowie das Bindegewebe der Hodenkapsel, des Interstitiums (Bild 70), des Mediastinums und der Chordae retis nach Inkubation mit PSA-FITC als stark bzw. deutlich fluoreszierend. Die Lamina propria besitzt ebenfalls regelmäßig Bindungsstellen für das Lektin (Bild 71). Im Keimepithel zeigen sämtliche Keimzellen von Spermatogonien bis runde Spermatiden eine granuläre positive Reaktion. Auch die Stützzellen weisen in ihrem Zytoplasma eine schwache Fluoreszenz auf (Bild 71). Dies trifft sowohl auf Tubuli seminiferi contorti mit wie auch ohne Lumen zu. Im Interstitium zeigen Leydig-Zellen eine positive Markierung ihrer Granula im Zytoplasma auf (Bild 70). Diese Reaktion kann zwar bei jedem Tier, aber nicht in allen Zellen beobachtet werden. Die Epithelzellen des Rete testis, der Chordae retis und der Tubuli recti können mit Hilfe von PSA-FITC nicht bei allen Tieren dargestellt werden: bei einem Drittel der untersuchten Tiere bleiben diese Zellen ungefärbt. Die eventuelle positive Reaktion beschränkt sich auf die am Lumen des Rete testis liegenden Anteile der Epithelzellen. Die Reaktionen sind in der Tabelle 27 zusammengefasst.

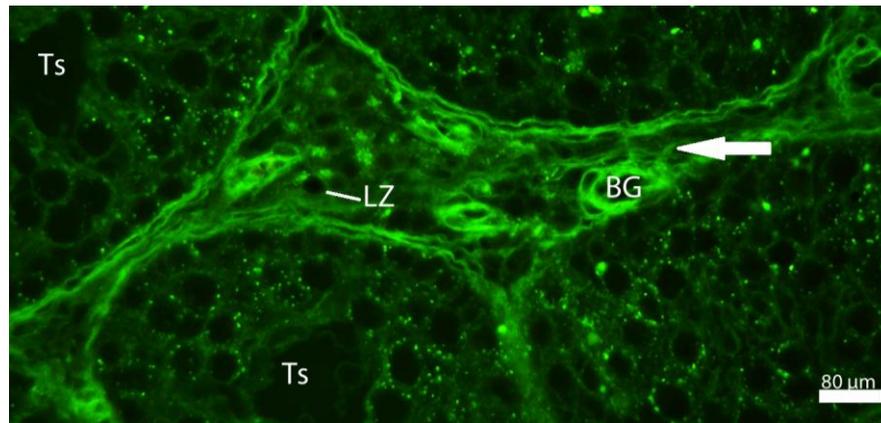


Bild 70: Interstitium eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung von PSA-FITC. SB=80 µm. Es reagieren Zellen der Blutgefäßwände (BG) sowie des Bindegewebes (Pfeil). Ferner werden Teile des Zytoplasmas von Leydig-Zellen (LZ) markiert. Ts Tubuli seminiferi contorti

Tabelle 27: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von PSA-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|--|------------------|-------------------|---|
| Bindegewebe | | + | - |
| Blutgefäßwand | | ++ | Kapillaren: Endothel; Arterie und Vene: Tunica intima, media, externa |
| Leydig-Zelle | | + | Granula im Zytoplasma: nicht jede Zelle |
| Lamina propria | | ++ bis +++ | - |
| Keim-Epithel | Stützzelle | +/- | Zytoplasma |
| | Spermatogonie | + bis ++ | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatozyte | + bis ++ | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatide rund* | ++ | Granula im Zytoplasma |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | | - bis +/- | Luminal; nicht jedes Tier |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, *in Tubuli mit begonnener Spermiogenese

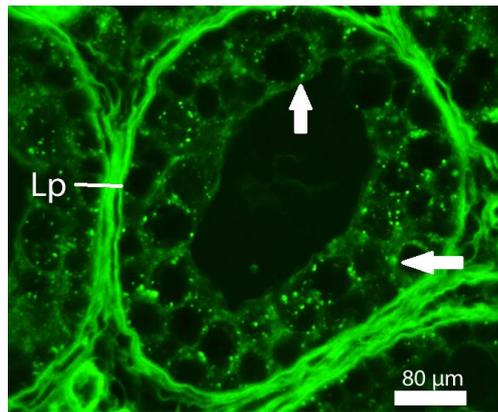


Bild 71: Tubulus seminifer contortus eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung von PSA-FITC. SB=80 μ m. Neben der Lamina propria (Lp) reagieren Granula im Zytoplasma der Stützzellen, Spermatogonien und der Spermatozyten (Pfeile) positiv.

4.2. D-Galaktose-bindende Lektine der Gruppe II

Mit den Lektinen RCA-I, VAA und PNA gelingt eine selektive Darstellung des akrosomalen Systems der runden und elongierten Spermatiden: im Laufe der Spermatogenese bilden sich an den (Pro-) Akrosomen Bindungsstellen aus, die bis zum Abschluss der Spermatogenese wieder abgebaut werden. Die Reaktion ist bei diesen Lektinen auf das Keimepithel limitiert.

4.2.1. Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem Ricinus communis Agglutinin I (RCA-I)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Im Keimepithel reagiert das Proakrosom bzw. Akrosom der runden und elongierten Spermatiden mit dem Lektin RCA-I-FITC (Bild 72, 73): am runden Spermatid fluoresziert regelmäßig das akrosomale System je nach Entwicklungsstand als punktförmige Struktur oder als kappenartiges Gebilde (Bild 72, 73). In den Phasen III bis VI der Spermiogenese zeigt sich eine konstante U-förmige Reaktion des Akrosoms der elongierten Spermatiden (Bild 72). In den Phasen VII hingegen leuchtet das Akrosom der elongierten Spermatiden nur noch in Einzelfällen. Äußerst selten ist ein positiv markiertes Akrosom eines Spermiums zu beobachten. Der Schwanz des Spermiums zeigt sich nach Inkubation mit dem Lektin RCA-I-FITC stets negativ. Ferner sind regelmäßig punktförmige Markierungen im Zytoplasma der elongierten Spermatiden (Bild 72) sowie unregelmäßig in den Restkörpern anzutreffen. Außerhalb des Keimepithels sind keine Bindungen des Lektins nachweisbar. Die

Reaktionen sind in den Tabellen 28 und 29 zusammengefasst.

Tabelle 28: Glykohochemischer Nachweis der Bindung von RCA-I-FITC im akrosomalen System (AS) der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens

| | <u>Phase I</u> | <u>Phase V-VI</u> (Bild 72) | <u>Phase VII</u> | <u>Phase VIII</u> (Bild 73) |
|--------------------------------|----------------|--------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| Runde Spermatische | AS als Kappe* | AS als Punkt* | AS als Kappe* | AS als Kappe* |
| Elongierte Spermatische | - | AS in U-Form* ++ | AS in U-Form** ++ | - |
| Spermium | - | - | - | AS in U-Form*** - bis + |

Abkürzung: AS Akrosomales System, * regelmäßig, ** unregelmäßig, *** meist negativ, - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv

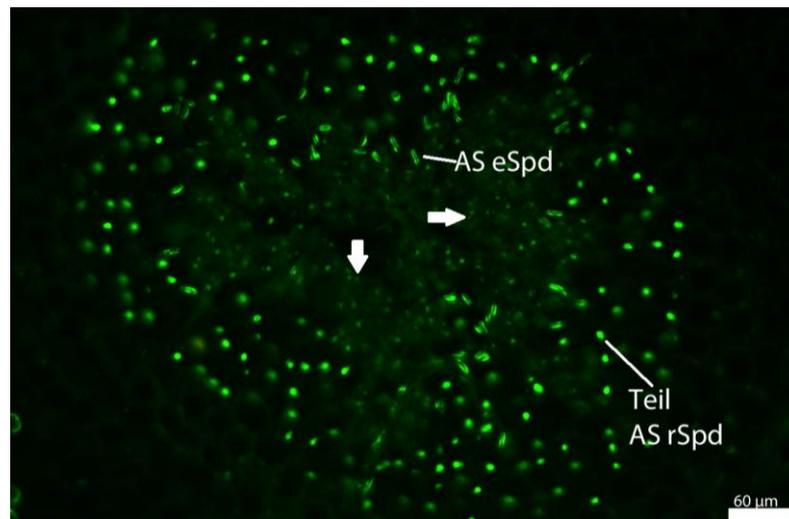


Bild 72: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase V-VII. Bindung von RCA-I-FITC. SB=60μm. In dieser Phase fluoresziert das akrosomale System der runden Spermatische (AS rSpd) punktförmig. Das akrosomale System der elongierten Spermatische in U-Form (AS eSpd) kann nicht regelmäßig beobachtet werden. Das Zytoplasma der elongierten Spermatische ist punktförmig markiert (Pfeile).

Tabelle 29: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von RCA-I im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> | |
|--|----------------------|------------------|------------------------------------|
| Bindegewebe | - | - | |
| Blutgefäßwand | - | - | |
| Leydig-Zelle | - | - | |
| Lamina propria | - | - | |
| Keim-Epithel | Sertoli-Zelle | - | |
| | Spermatogonie | - | |
| | Spermatozyte | - | |
| | Spermatide rund | ++ | AS s.Tab. |
| | Spermatide elongiert | +//++ | Zytoplasma punktförmig//AS s. Tab. |
| | Spermium | - bis +/-/- | Kopf (AS s.Tab.)//Schwanz |
| | Restkörper | +/- bis + | Punktförmig: unregelmäßig |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | - | - | |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, AS akrosomales System, s. Tab. siehe Tabelle 28

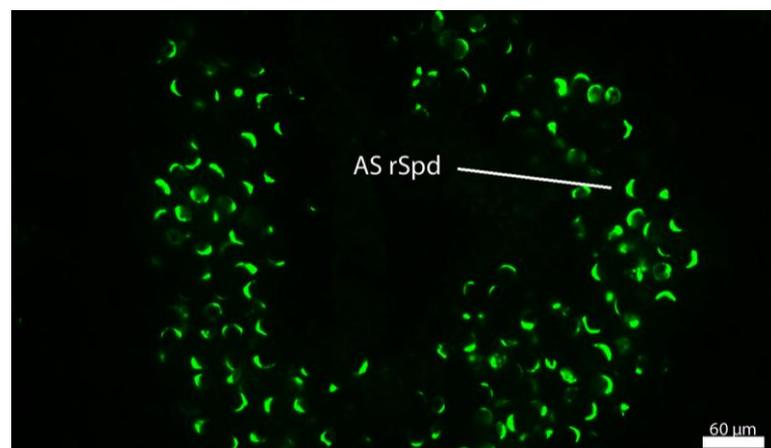


Bild 73: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase VIII. Bindung von RCA-I-FITC. SB=60 µm In dieser Phase wird regelmäßig das akrosomale System der runden Spermatiden (AS rSpd) in Form einer Kappe gefärbt.

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Es lassen sich keine Reaktionen bei Kaninchen ohne Spermiogenese nachweisen. Bei den Kaninchen mit begonnener Spermiogenese kann in den jeweiligen Tubuli seminiferi contorti eine Markierung des akrosomalen Systems wie beim

geschlechtsreifen Kaninchen identifiziert werden. Die Reaktion ist in der Tabelle 30 zusammengefasst.

Tabelle 30: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von RCA-I-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|--|------------------|-------------------|-------------------------|
| Bindegewebe | | - | - |
| Blutgefäßwand | | - | - |
| Leydig-Zelle | | - | - |
| Lamina propria | | - | - |
| Keimepithel | Stützzelle | - | - |
| | Spermatogonie | - | - |
| | Spermatozyte | - | - |
| | Spermatide rund* | ++ | AS als Punkt oder Kappe |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | | - | - |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, *in Tubuli mit begonnener Spermiogenese, AS akrosomales System

4.2.2. Untersuchung der Bindung von biotinyliertem *Viscum album* Agglutinin (VAA)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Eine Fluoreszenz ist im akrosomalen System der runden und elongierten Spermatiden zu beobachten. Eine Bindung kann dabei nur in den frühen Phasen der Spermiogenese nachgewiesen werden: das Proakrosom bzw. Akrosom der runden Spermatiden fluoresziert regelmäßig als Punkt oder Kappe (Bild 74).

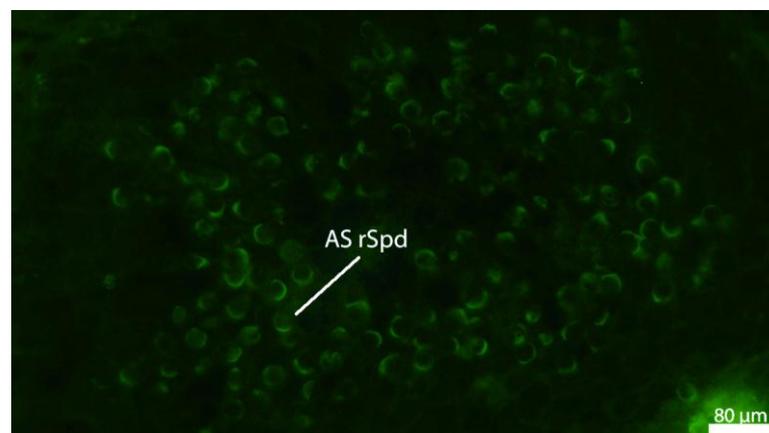


Bild 74: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase I. Bindung von biotinyliertem VAA. SB=80 µm. Es wird das akrosomale System der runden Spermatiden (AS rSpd) regelmäßig als Kappe markiert.

Beim elongierten Spermium der Phase III leuchtet das gesamte Akrosom in U-Form. Mit Auftreten der „jungen“ runden Spermien ab der Phase V jedoch kann keine Markierung der „älteren“ elongierten Spermien gefunden werden. Die Reaktionen sind in den Tabellen 31 und 32 zusammengefasst.

Tabelle 31: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von biotinyliertem VAA im akrosomalen System (AS) der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens

| | <u>Phase I</u> (Bild 74) | <u>Phase III</u> | <u>Phase V-VII</u> | <u>Phase VIII</u> |
|----------------------------|-----------------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|
| Runde Spermide | AS als Kappe* +/- | - | AS als Punkt oder Kappe* +/- | AS als Kappe* +/- |
| Elongierte Spermide | - | AS in U-Form* +/- | Negativ | - |
| Spermium | - | - | - | Negativ |

Abkürzung: AS akrosomales System *regelmäßig

Tabelle 32: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von biotinyliertem VAA im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> | |
|--|--------------------|------------------|------------|
| Bindegewebe | - | - | |
| Blutgefäßwand | - | - | |
| Leydig-Zelle | - | - | |
| Lamina propria | - | - | |
| Keimepithel | Sertoli-Zelle | - | |
| | Spermatogonie | - | |
| | Spermatozyte | - | |
| | Spermide rund | +/- | AS s.Tab. |
| | Spermide elongiert | - bis +/- | AS s. Tab. |
| | Spermium | - | - |
| | Restkörper | - | - |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | - | - | |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, AS akrosomales System, s. Tab. siehe Tabelle 32

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Eine Reaktion mit biotinyliertem VAA zeigt sich lediglich in denjenigen Tubuli, die bereits in die Spermio-genese eingetreten sind. In jenen Samenkanälchen zeigt

sich das akrosomale System der runden Spermatozoen gefärbt. Die Reaktionen sind in der Tabelle 33 zusammengefasst.

Tabelle 33: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von biotinyliertem VAA im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| Struktur/Zelle | | Intensität | Anmerkung |
|---|--------------------|------------|-------------------------|
| Bindegewebe | | - | - |
| Blutgefäßwand | | - | - |
| Leydig-Zelle | | - | - |
| Lamina propria | | - | - |
| Keim- Epithel | Stützzelle | - | - |
| | Spermatozoid rund* | +/- | AS als Punkt oder Kappe |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | | - | - |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, AS akrosomales System, *in Tubuli mit begonnener Spermio-genese

4.2.3. Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem Peanut Agglutinin (PNA)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Im Keimepithel besitzt das Lektin eine starke Bindungsaffinität zu Spermatozoen in allen Phasen der Spermio-genese: das akrosomale System der rundkernigen Spermatozoen stellt sich in den frühen Entwicklungsphasen als fluoreszierender Punkt dar, während es in späteren Stadien als fluoreszierender Halbmond oder Kappe zu beobachten ist (Bild 75). Im weiteren Verlauf der Spermio-genese umgibt das markierte Akrosom den elongierten Kern als U-förmige Struktur. Das Akrosom des Spermiums selbst fluoresziert nicht mehr. Allerdings weist das Spermium stets am distalen Stück des Kopfes Bindungsstellen für PNA-FITC auf. Der Schwanz fluoresziert regelmäßig schwach positiv. Die Reaktionen sind in den Tabellen 34 und 35 zusammengefasst.

Tabelle 34: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von PNA-FITC im akrosomalen System (AS) der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens

| | <u>Phase I</u> (Bild 75) | <u>Phase V-VII</u> | <u>Phase VIII</u> |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------|
| Runde Spermatoide | AS als Kappe* ++ | AS als Punkt oder Kappe* ++ | AS als Kappe* ++ |
| Elongierte Spermatoide | - | AS in U-Form* ++ | - |
| Spermium | - | - | Negativ |

Abkürzung: AS akrosomales System, *regelmäßig, - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv

Tabelle 35: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von PNA-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> | |
|--|-----------------------|------------------|-----------------------------|
| Bindegewebe | - | - | |
| Blutgefäßwand | - | - | |
| Leydig-Zelle | - | - | |
| Lamina propria | - | - | |
| Keim-Epithel | Sertoli-Zelle | - | |
| | Spermatogonie | - | |
| | Spermatozyte | - | |
| | Spermatoide rund | ++ | AS s.Tab. |
| | Spermatoide elongiert | ++ | AS s.Tab. |
| | Spermium | +++//+/- | Distaler Teil Kopf//Schwanz |
| | Restkörper | - | - |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | - | - | |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, AS akrosomales System, s.Tab. siehe Tabelle 34

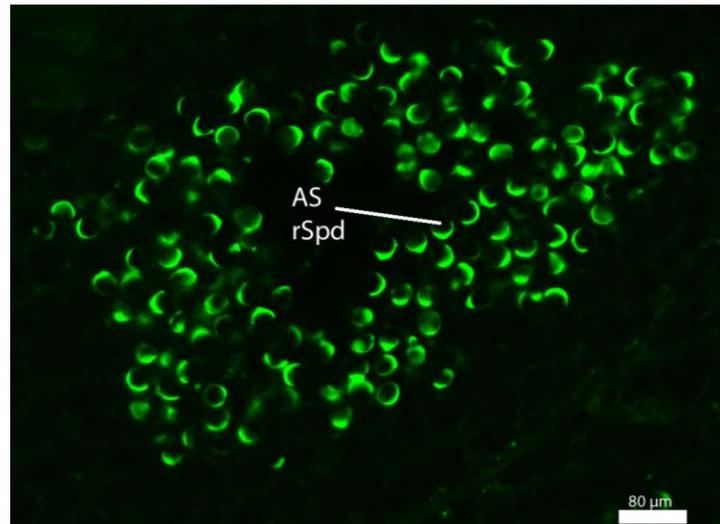


Bild 75: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase I. Bindung von PNA-FITC. SB=80 µm. In dieser Phase wird das akrosomale System der runden Spermatiden (AS rSpd) kappenförmig markiert.

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Die Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens ohne Spermiogenese weisen keine Bindungsstellen für PNA-FITC auf. In den Tubuli seminiferi contorti von nicht-geschlechtsreifen Tieren, bei denen schon die Spermiogenese eingesetzt hat, fluoresziert das akrosomale System der runden Spermatiden punkt- bzw. kappenförmig. Die Reaktionen sind in der Tabelle 36 zusammengefasst.

Tabelle 36: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von PNA-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|--|------------------|-------------------|-------------------------|
| Bindegewebe | | - | - |
| Leydig-Zelle | | - | - |
| Blutgefäßwand | | - | - |
| Lamina propria | | - | - |
| Keimepithel | Stützzelle | - | - |
| | Spermatogonie | - | - |
| | Spermatozyte | - | - |
| | Spermatide rund* | +/- bis ++ | AS als Punkt oder Kappe |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | | - | - |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, *in Tubuli mit begonnener Spermiogenese, AS akrosomales System

4.3. N-Acetyl-D-Glukosamin/N-Acetyl-Neuraminsäure bindende Lektine der Gruppe III

Die beiden Lektine WGA und WGAs, die dieser Gruppe angehören, zeigen eine breite Affinität zu den meisten Strukturen des Hodens.

4.3.1. Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem *Triticum vulgare* Agglutinin (WGA)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Am Tubulus seminifer contortus des geschlechtsreifen Kaninchenhodens fällt die Fluoreszenz der Lamina propria auf (Bild 76). Im Keimepithel besitzt die Sertoli-Zelle Bindestellen für WGA-FITC: die apikalen Anteile der Ammenzelle zeigen sich in der zweiten Hälfte des Keimepithelzyklus mit zwei Generationen von Spermatiden fluoreszierend. Auch einzelne Granula im Zytoplasma der Ammenzelle können leuchten (Bild 76). Im Keimepithel fällt insbesondere die zumeist starke Fluoreszenz der Keimzellen auf: alle Geschlechtszellen, von den Spermatogonien bis hin zu den runden Spermatiden, weisen eine markierte Zellmembran auf. Dadurch erscheint das Keimepithel von wabiger Struktur. Ob es sich hierbei um die Zellmembrane der Sertoli-Zelle oder die der Keimzelle oder beiden handelt, lässt sich lichtmikroskopisch nicht mit Sicherheit unterscheiden (Bild 76). Bei Spermatogonien und Spermatozyten bindet WGA-FITC ferner unregelmäßig an ein perinukleäres Granulum im Zytoplasma (Bild 76). Bei runden und elongierten Spermatiden markiert das Lektin das gesamte Proakrosom bzw. Akrosom (Bild 76, 77, 78). Eine Reaktion des Zytoplasmas der elongierten Spermatiden sowie der Restkörper kann ebenfalls regelmäßig beobachtet werden (Bild 77, 78). Auch bei den Spermien regelmäßig ist eine starke bzw. schwach positive Reaktion am Kopf bzw. Schwanz erkennbar. Im Interstitium verfügen Granula im Zytoplasma der Leydig-Zellen über Bindestellen für das Lektin. Auch in den heterotopen Leydig-Zellen in der Hodenkapsel und im Mediastinum leuchtet das Zytoplasma zumeist schwach positiv. Diese Reaktion findet sich in der Mehrzahl der Leydig-Zellen. Auch das Bindegewebe des intertubulären Raums, des Mediastinums und der Hodenkapsel ist stets schwach positiv fluoreszierend. Das Epithel des Rete testis ist im luminalen Bereich der Zelle regelmäßig markiert, ebenso wie die Epithelzellen der Chordae testis und die der Tubuli recti. Deutlich markiert werden ebenfalls stets die Wände der Blutgefäße des Interstitiums, des Mediastinums und des Interstitiums. Die Reaktionen sind in

den Tabellen 37 und 38 zusammengefasst.

Tabelle 37: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von WGA-FITC im akrosomalen System (AS) der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens

| | <u>Phase I</u> (Bild 76) | <u>Phase II+III</u> (Bild 77) | <u>Phase V-VII</u> (Bild 78) | <u>Phase VIII</u> |
|------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| Runde Spermatide | AS als Kappe* ++ | - | AS als Punkt* ++ | AS als Kappe* ++ |
| Elongierte Spermatide | - | AS in U-Form* ++ | AS in U-Form* ++ | - |
| Spermium | - | - | - | AS in U-Form* ++ |

Abkürzung: AS akrosomales System, * regelmäßig, - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv

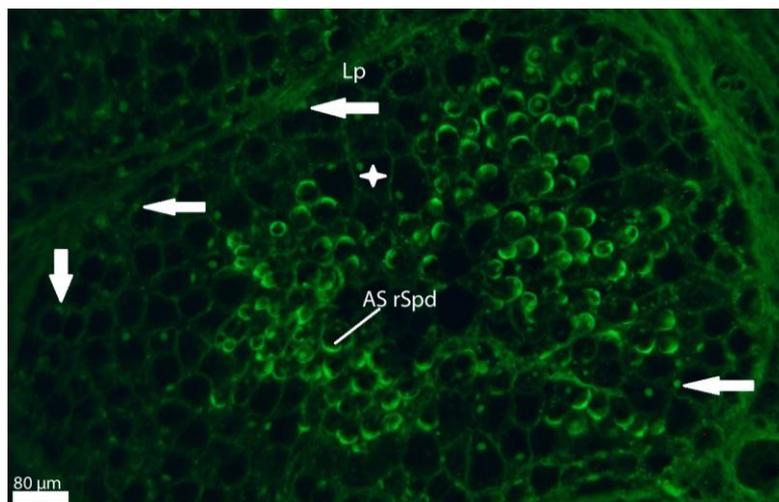


Bild 76: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase I. Bindung von WGA-FITC. SB=80 µm. Das Keimepithel weist eine wabige Struktur auf, da die Membrane der Keimzellen bzw. die der Sertoli-Zellen WGA-FITC binden (Stern). Vereinzelt sind Granula im Zytoplasma der Spermatogonien und Spermatozyten markiert (Pfeile). Das akrosomale System der runden Spermatiden (AS rSpd) fluoresziert. Auch die Lamina propria (Lp) ist markiert.

Tabelle 38: Glykohochemischer Nachweis der Bindung von WGA-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|--|----------------------|-------------------|--|
| Bindegewebe | | +/- | - |
| Blutgefäßwand | | + | Kapillare: Endothel; Arterie und Vene: Tunica intima, media, externa |
| Leydig-Zelle | | +/- | Granula im Zytoplasma |
| Lamina propria | | +/- bis + | - |
| Keim-Epithel | Sertoli-Zelle | ++ | Zytoplasma: Granula, apikal in 2. Hälfte KEZ |
| | Spermatogonie | + bis ++ | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatozyte | + bis ++ | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatide rund | ++ | AS s.Tab. |
| | Spermatide elongiert | ++ | AS s.Tab.; Zytoplasma |
| | Spermium | +++//+/- | Kopf (AS s.Tab.)// Schwanz |
| | Restkörper | ++ | |
| Epithel Tubulus recti, Rete testis, Chorda retis | | ++ | Luminal |
| Besonderheiten: Membran der Keimzellen (Spermatogonie, Spermatozyte, runde Spermatide) bzw. Sertoli-Zelle bindet WGA-FITC | | | |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, s. Tab. siehe Tabelle 37

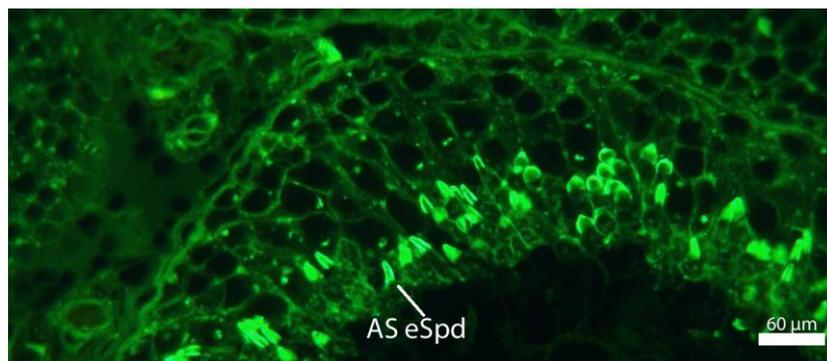


Bild 77: Akrosomales System eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase III. Bindung von WGA-FITC. SB=60 µm. Das akrosomale System der elongierten Spermatozyten (AS eSpd) fluoresziert in U-Form.

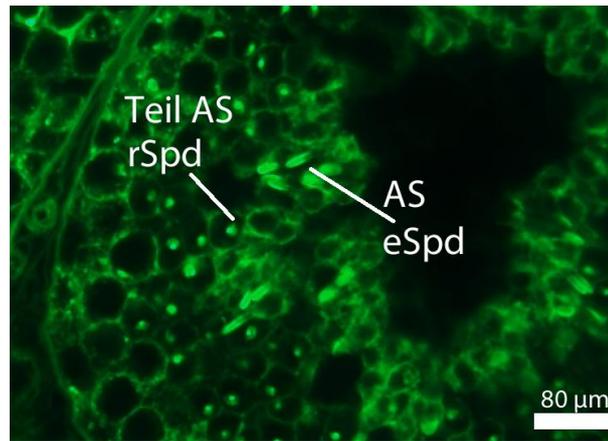


Bild 78: Akrosomales System eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase V-VII. Bindung von WGA-FITC. SB=80 μ m. In diesem Tubulus seminifer contortus (Ts) ist das akrosomale System der runden Spermatiden (AS rSpd) punktförmig markiert, das der elongierten Spermatiden (AS eSpd) U-förmig.

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Das Bindegewebe der Hodenkapsel, des Mediastinums und des Interstitiums (Bild 79) fluoresziert ebenso wie die Epithelzellen der Tubuli recti und des Rete testis. Diese Reaktion der Epithelzellen beschränkt sich auf die luminal gelegenen Bereiche der Zelle. Reaktionen in den Blutgefäßwänden sind ebenfalls konstant stark positiv (Bild 79). Ferner wird das Zytoplasma der meisten Leydig-Zellen im Interstitium granulär markiert (Bild 79). Auch die heterotopen Leydig-Zellen in der Hodenkapsel und im Mediastinum sind WGA-positiv. Im Keimepithel bindet das Lektin regelmäßig an das Zytoplasma von Stützzellen. Ferner reagieren auch einzelne Granula im Zytoplasma von Spermatogonien und Spermatozyten (Bild 79). Im Keimepithel bindet die Membrane der Keimzellen bzw. Stützzellen das Lektin WGA-FITC (Bild 79). Ferner ist das akrosomale System der runden Spermatiden punkt- bzw. kappenförmig markiert. Sehr stark angefärbt sind auch degenerierte Keimzellen. Auffällig ist ferner die regelmäßig starke Fluoreszenz der Lamina propria (Bild 79). Die Reaktionen sind in der Tabelle 39 zusammengefasst.

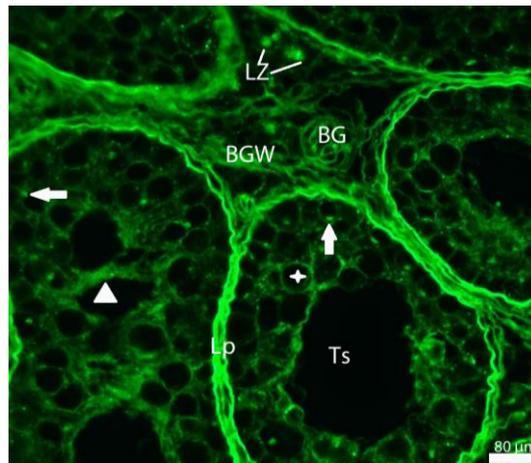


Bild 79: Hodenparenchym eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung von WGA-FITC. SB=80 µm. Im Interstitium sind das Bindegewebe (BGW), die Wände der Blutgefäße (BG) sowie das Zytoplasma der Leydig-Zellen (LZ) markiert. Im Keimepithel fluoresziert das Zytoplasma der Stützzellen (Pfeilspitze) sowie einzelne Granula in den Spermatozyten bzw. Spermatozyten (Pfeile). Ferner binden die Membrane der Keimzellen bzw. die der Stützzellen WGA-FITC (Stern). Lp Lamina propria

Tabelle 39: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von WGA-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur//Zelle</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|--|------------------|-------------------|--|
| Bindegewebe | | ++ | - |
| Blutgefäßwand | | ++ | Kapillare: Endothel; Arterie und Vene: Tunica intima, media, externa |
| Leydig-Zelle | | ++ | Granula im Zytoplasma: nicht jede Zelle, aber jedes Tier |
| Lamina propria | | ++ | - |
| Keim-Epithel | Stützzelle | + | Zytoplasma: Granula, Processus |
| | Spermatoγονie | + | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatozyte | + | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatide rund* | + | AS in Form von Punkt oder Kappe |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | | + | Luminal |
| Besonderheiten: Membran der Keimzellen (Spermatoγονien, Spermatozyten, runde Spermatiden) bzw. Stützzellen bindet deutlich WGA-FITC; Degenerierte Zellen im Keimepithel binden stark WGA-FITC | | | |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, *in Tubuli mit begonnener Spermiogenese, AS akrosomales

System

4.3.2. Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem succinyliertem *Triticum vulgare* Agglutinin (WGAs)

Geschlechtsreife Kaninchen:

In den gewundenen Samenkanälchen, die von einer fluoreszierenden Lamina propria umgeben werden (Bild 80), weisen die Sertoli-Zellen in einigen Zytoplasmaausläufern eine granuläre Reaktion auf. Auch zeigt sich während der zweiten Hälfte des Keimepithelzyklus der apikale Anteil der Ammenzelle deutlich fluoreszierend. Die Keimzellgenerationen, von den Spermatogonien bis hin zu den runden Spermatischen, weisen in der Regel markierte Zellmembrane auf; dadurch erhält das Keimepithel eine wabige oder netzartige Struktur. Ob es sich hierbei um Zellmembrane der Sertoli-Zelle oder die der Keimzelle oder von beiden handelt, lässt sich lichtmikroskopisch nicht mit letzter Sicherheit entscheiden (Bild 80). Ferner besitzen Spermatogonien und Spermatozyten in ihrem Zytoplasma deutlich markierte Granula (Bild 80). Auch weisen die Proakrosome bzw. Akrosome von runden und elongierten Spermatischen immer Bindungsstellen für WGAs-FITC auf (Bild 80).

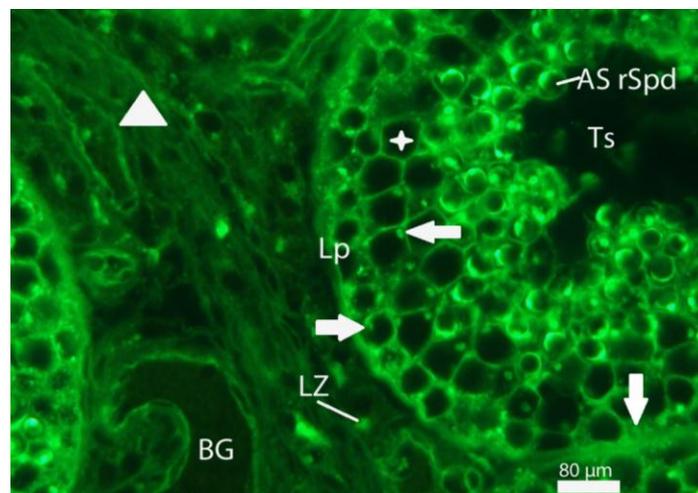


Bild 80: Interstitium und Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchen. Bindung von WGAs-FITC. SB=80 μ m. Im Interstitium sind Bindegewebe (Pfeilspitze), Leydig-Zellen (LZ) sowie die Wände der Blutgefäße (BG) markiert. Im Samenkanälchen (Ts) der Phase I ist das akrosomale System der runden Spermatischen (AS rSpd) fluoreszierend. Ebenso ist die Lamina propria sowie Granula im Zytoplasma der Spermatogonien und Spermatozyten (Pfeile) markiert. Die Membrane der Keimzellen bzw. Sertoli-Zellen binden deutlich WGAs-FITC (Stern).

An den Köpfen und Schwänzen der Spermien können ebenfalls regelmäßig Bindungsstellen für WGAs-FITC identifiziert werden: hier bindet das Lektin zum einen an das Akrosom am Kopf des Spermiums und zeigt eine dabei starke Fluoreszenz; zum anderen kann am Übergang vom Kopf zum Mittelstück eine weitere, sehr starke Fluoreszenz beobachtet werden. Die Reaktion am Schwanz fällt hingegen schwächer aus. Darüber hinaus zeigen sich durchwegs die Restkörper der Spermatiden WGAs-positiv. Im Interstitium zeigt das Lektin in der Regel eine Affinität zu Granula im Zytoplasma der Leydig-Zellen (Bild 80). Dies kann auch bei den heterotopen Leydig-Zellen der Hodenkapsel und des Mediastinums beobachtet werden. Ferner zeigt konstant das Bindegewebe sowie die Blutgefäßwände des Hodenparenchyms eine schwach positive Fluoreszenz (Bild 80). Die Epithelzellen der Tubuli recti, der Chordae retis sowie des Rete testis binden WGAs-FITC stets im luminalen Bereich. Die Reaktionen sind in den Tabellen 40 und 41 zusammengefasst.

Tabelle 40: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von WGAs-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|--|----------------------|-------------------|---|
| Bindegewebe | | +/- | - |
| Blutgefäßwand | | +/- | Kapillaren: Endothel; Arterie und Vene: Tunica intima, media, externa |
| Leydig-Zelle | | + | Zytoplasma |
| Lamina propria | | +/- | - |
| Keim-Epithel | Sertoli-Zelle | + | Zytoplasma: Granula, apikaler Anteil in 2. Hälfte KEZ |
| | Spermatogonie | + | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatozyte | + | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatide rund | ++ | AS s.Tab. |
| | Spermatide elongiert | ++ | AS s.Tab. |
| | Spermium | +++//+/- | Kopf (AS s.Tab., Übergang Kopf Mittelstück)// Schwanz |
| | Restkörper | ++ | |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | | + | Luminal |
| Besonderheiten: Die Membran der Keimzellen (Spermatogonie, Spermatozyte, runde Spermatide) bzw. Sertoli-Zelle bindet deutlich WGAs-FITC | | | |

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

sehr stark positiv, AS akrosomales System, s. Tab. siehe Tabelle 41

Tabelle 41: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von WGAs-FITC im akrosomalen System der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens

| | <u>Phase I</u> (Bild 80) | <u>Phase II+III</u> | <u>Phase V-VII</u> | <u>Phase VIII</u> |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|
| Runde Spermotide | AS als Kappe* ++ | - | AS als Punkt* ++ | AS als Kappe* ++ |
| Elongierte Spermotide | - | AS in U-Form* ++ | AS in U-Form* ++ | - |
| Spermium | - | - | - | AS in U-Form* +++ |

Abkürzungen: AS akrosomales System, * regelmäßig, - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Regelmäßig wird das Bindegewebe sowie die Wände der Blutgefäße der Hodenkapsel, des Mediastinums (Bild 81), der Chordae retis und des Interstitiums deutlich markiert. Mit am auffälligsten ist die Fluoreszenz der Laminae propriae. Im Keimepithel sind die Zytoplasmastränge der Stützzellen fluoreszierend; auch weisen die Spermotogonien und Spermatozyten in ihren Granula im Zytoplasma regelmäßig Bindestellen auf. Wie nach Inkubation mit WGA-FITC, so weisen auch die Keimzellen nach Inkubation mit WGAs-FITC in der Regel eine fluoreszierende Membran auf; ob es sich dabei um die Zellmembran der Keimzelle oder um die der primitiven Stützzelle oder um beides handelt, geht lichtmikroskopisch nicht eindeutig hervor. Bei Tieren mit runden Spermotiden wird das akrosomale System markiert. Darüber hinaus fluoreszieren die degenerierten Zellen des Keimepithels. Ferner können in allen Epithelzellen von Rete testis, Chordae retis und Tubuli recti Bindungsstellen nachgewiesen werden (Bild 81). Die Reaktion beschränkt sich hier auf den apikalen Bereich der Zellen und ist von starker Intensität. Im Interstitium sind regelmäßig Granula im Zytoplasma der Leydig-Zellen markiert, ebenso die der heterotope Leydig-Zellen in der Hodenkapsel und im Mediastinum (Bild 81). Die Reaktionen sind in der Tabelle 42 zusammengefasst.

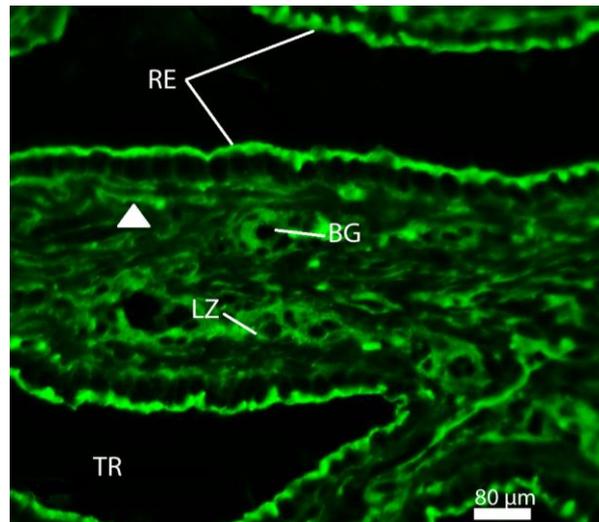


Bild 81: Rete testis eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung von WGAs-FITC. SB=80 µm. Die Epithelzellen des Rete testis (RE) und des Tubulus rectus (TR) sind luminal markiert. Ebenso fluoreszieren heterotope Leydig-Zellen (LZ) im Mediastinum testis sowie Zellen des Bindegewebes (Pfeilspitze). Auch die Wände der Blutgefäße (BG) sind gefärbt.

Tabelle 42: : Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von WGAs-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> | |
|--|-------------------|--|---------------------------------|
| Bindegewebe | + | - | |
| Blutgefäßwand | + | Kapillare: Endothel; Arterie und Vene: Tunica intima, media, externa | |
| Leydig-Zelle | + | Granula im Zytoplasma | |
| Lamina propria | ++ bis +++ | - | |
| Keim-epithel | Stützzelle | +/- | Zytoplasma: Granula, Processus |
| | Spermatogonie | + | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatozyte | + | Granula im Zytoplasma |
| | Spermatide rund* | + | AS in Form von Punkt oder Kappe |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chordae retis | ++ | Luminal | |
| Besonderheiten: Die Membran der Keimzellen (Spermatogonie, Spermatozyte, runde Spermatide) bzw. Stützzelle bindet deutlich WGAs-FITC. | | | |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, *in Tubuli mit begonnener Spermio-genese, AS akrosomales System

4.4. N-Acetyl-D-Galaktosamin/D-Galaktose bindende Lektine der Gruppe IV

Die Lektine dieser Gruppe besitzen eine recht unterschiedliche Affinität zu dem Hodengewebe: während DBA und SBA keinerlei Reaktion auslösen, färben GSL-I und SJA selektiv das akrosomale System an. Das Lektin SNA wiederum markiert das Bindegewebe und Blutgefäße des Hodens.

4.4.1. Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Es sind im Hoden der geschlechtsreifen Kaninchens keine Reaktionen erkennbar.

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Tieres sind keine Bindungsstellen für das Lektin DBA-FITC zu beobachten.

4.4.2. Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem Soybean Agglutinin (SBA)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Das Lektin SBA-FITC wird im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens nicht gebunden.

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

In meiner Arbeit kann für das Lektin SBA-FITC keine Bindungsstellen im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens nachgewiesen werden.

4.4.3. Untersuchung der Bindung von Sophora japonica Agglutinin (SJA)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Das Lektin besitzt eine Affinität zum Proakrosom und Akrosom der runden und elongierten Spermatiden (Bild 82). Je nach Stand der Spermiogenese leuchtet das akrosomale System als Punkt, Kappe oder in U-Form. Die Bindungsfähigkeit sinkt zum Ende der Spermiogenese ab: in den elongierten Spermatiden der Phase VII ist nur eine unregelmäßige, schwach positive Reaktion nachweisbar. Das Akrosom am Kopf der Spermien sowie der Schwanz des Spermiums weist nach Inkubation mit dem untersuchten Lektin keinerlei Markierungen auf. Die Reaktionen sind in den Tabellen 43 und 44 zusammengefasst.

Tabelle 43: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von SJA-FITC im akrosomalen System (AS) der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens

| | <u>Phase I</u> (Bild 82) | <u>Phase III</u> | <u>Phase V-VII</u> | <u>Phase VIII</u> |
|--------------------------------|-----------------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|
| Runde Spermatische | AS als Kappe* +/- | - | AS als Punkt bzw. Kappe* +/- | AS als Kappe* +/- |
| Elongierte Spermatische | - | AS in U-Form* +/- | AS in U-Form** +/- | - |
| Spermium | - | - | - | Negativ |

Abkürzungen: AS akrosomales System, *regelmäßig, **unregelmäßig-negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv

Tabelle 44: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von SJA-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| Struktur/Zelle | Intensität | Anmerkung | |
|--|------------------------|-----------|-----------|
| Bindegewebe | - | - | |
| Blutgefäßwand | - | - | |
| Leydig-Zelle | - | - | |
| Lamina propria | - | - | |
| Keimepithel | Sertoli-Zelle | - | |
| | Spermatogonie | - | |
| | Spermatozyte | - | |
| | Spermatische rund | +/- | AS s.Tab. |
| | Spermatische elongiert | +/- | AS s.Tab. |
| | Spermium | - | - |
| | Restkörper | - | - |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | - | - | |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, AS akrosomales System, s. Tab. siehe Tabelle 43

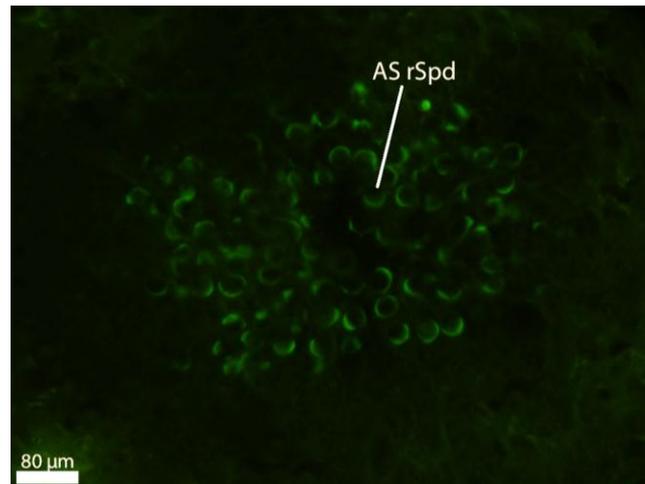


Bild 82: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase I. Bindung von SJA-FITC. SB=80 µm. In dieser Phase bindet das Lektin an das kappenförmige akrosomale System der runden Spermatiden (AS rSpd).

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens können in meiner Arbeit keine Bindungsorte für SJA-FITC festgestellt werden, sofern in den Samenkanälchen die Spermio-genese nicht eingesetzt hat. Ansonsten ist bei runden Spermatiden das akrosomale System in Form eines Punktes bzw. einer Kappe markiert. Die Reaktionen sind in der Tabelle 45 zusammengefasst.

Tabelle 45: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von SJA-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|--|------------------|-------------------|-------------------------|
| Bindegewebe | | - | - |
| Blutgefäßwand | | - | - |
| Leydig-Zelle | | - | - |
| Lamina propria | | - | - |
| Keimepithel | Sertoli-Zelle | - | - |
| | Spermatogonie | - | - |
| | Spermatozyte | - | - |
| | Spermatide rund* | + | AS als Punkt oder Kappe |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | | - | - |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, *in Tubuli mit begonnener Spermio-genese , AS akrosomales System

4.4.4. Untersuchung der Bindung von biotinyliertem *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Das Lektin SNA zeigt regelmäßig eine sehr starke Fluoreszenz in den Wänden der Blutgefäße der Hodenkapsel, des Interstitiums (Bild 83), des Mediastinums sowie der Chordae retis. Auch das dortige Bindegewebe ist stets positiv markiert (Bild 84). Die Reaktionen sind in der Tabelle 46 zusammengefasst.

Tabelle 46: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von biotinyliertem SNA im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|--|-------------------|--|
| Bindegewebe | ++ | - |
| Blutgefäßwand | +++ | Kapillare: Endothel; Arterie und Vene: Tunica intima, media, externa |
| Leydig-Zelle | - | - |
| Lamina propria | - | - |
| Keimepithel | - | - |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | - | - |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv

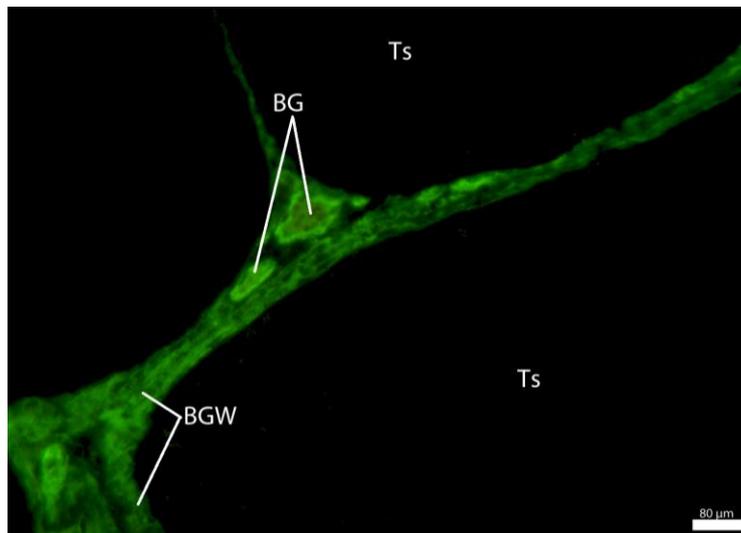


Bild 83: Hodenparenchym eines geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung von biotinyliertem SNA. SB=80 µm. Während das Lektin keine Bindestellen in den Tubuli seminiferi contorti (Ts) besitzt, fluoresziert das Bindegewebe des Interstitiums (BGW) sowie Zellen im Blutgefäß sowie in den Wänden der Blutgefäße (BG).

Nicht geschlechtsreife Kaninchen:

Es gelingt immer die Darstellung der Blutgefäße in der Hodenkapsel, des Mediastinums (Bild 84), der Chordae retis und des Interstitium. Auch das Bindegewebe dieser Strukturen zeigt durchwegs eine Fluoreszenz (Bild 84). Die Reaktionen sind in der Tabelle 47 zusammengefasst.

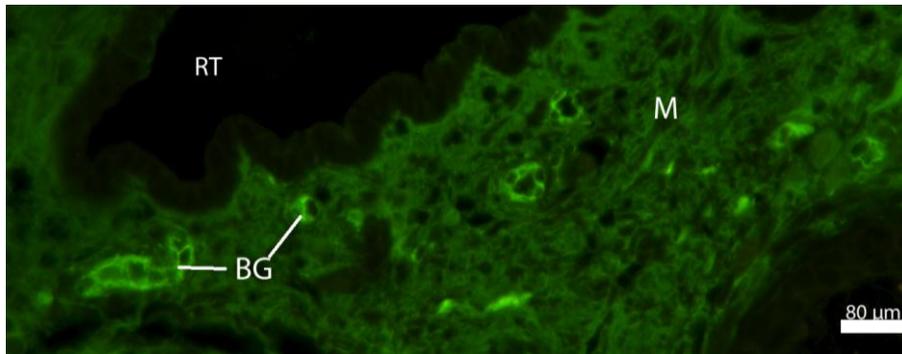


Bild 84: Rete testis eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung von biotinyliertem SNA. SB=80 µm. Im Rete testis (RT) kann eine Fluoreszenz des Bindegewebes des Mediastinums (M) und Zellen der Blutgefäßwände (BG) beobachtet werden.

Tabelle 47: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von biotinyliertem SNA im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|--|-------------------|--|
| Bindegewebe | + bis ++ | - |
| Blutgefäßwand | + bis ++ | Kapillare: Endothel; Arterie und Vene: Tunica intima, media, externa |
| Leydig-Zelle | - | - |
| Lamina propria | - | - |
| Keimepithel | Stützzelle | - |
| | Keimzelle | - |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | - | - |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv

4.4.5. Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem Griffonia simplicifolia Agglutinin (GSL-I)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Es werden Bindungsstellen für das Lektin GSL-I an runde und elongierte

Spermatiden nachgewiesen: runde Spermatiden zeigen in keiner Phase der Spermiogenese eine Fluoreszenz ihres gesamten Akrosoms, wohl aber fluoresziert regelmäßig ein Teil ihres akrosomalen Systems, etwa in Form eines Punktes oder einer kleinen Sichel in der Phase VIII und I (Bild 85). Auch elongierende und elongierte Spermatiden der Phase II und VIII weisen eine solche punktförmige Reaktion in ihren Akrosomen auf (Bild 86). Lediglich in den Phasen V bis VII kann das gesamte Akrosom U-förmig markiert sein. Eine Färbung des Akrosoms am Kopf des Spermiums unterbleibt stets. Vereinzelt ist auch eine punktförmige Reaktion in den Restkörpern beobachtbar. Die Reaktionen sind in den Tabellen 48 und 49 zusammengefasst.

Tabelle 48: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von GSL-I-FITC im akrosomalen System der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens

| | <u>Phase I</u> (Bild 85) | <u>Phase II+III</u> | <u>Phase V-VII</u> (Bild 86) | <u>Phase VIII</u> |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------|--|-------------------|
| Runde Spermatide | Teil des AS* ++ | - | Negativ | Teil des AS* ++ |
| Elongierte Spermatide | - | Teil des AS* ++ | Gesamtes AS in U-Form oder Teil des AS* ++ | - |
| Spermium | - | - | - | Negativ |

Abkürzungen: AS akrosomales System, *regelmäßig, - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv

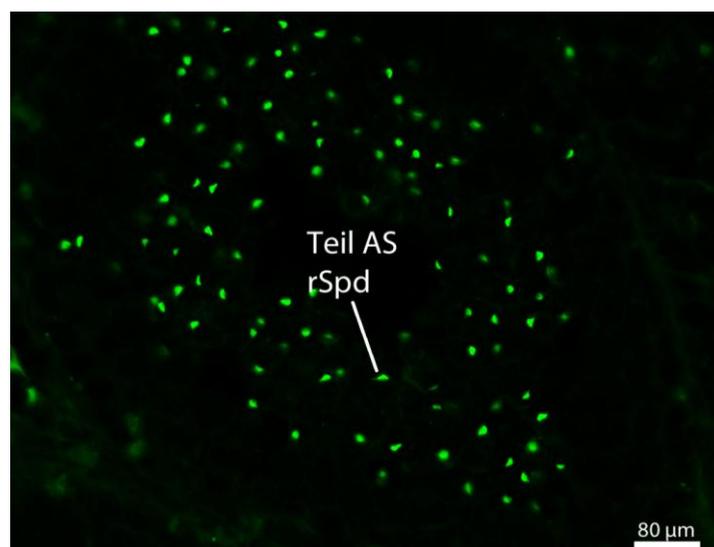


Bild 85: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase I. Bindung von SJA-FITC. SB=80 μm. Es bindet das Lektin punktförmig an Teile des kappenförmigen akrosomalen Systems der runden Spermatiden (AS rSpd).

Tabelle 49: Glykohochemischer Nachweis der Bindung von GSL-I-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> | |
|--|----------------------|------------------|-------------|
| Bindegewebe | - | - | |
| Blutgefäßwand | - | - | |
| Leydig-Zelle | - | - | |
| Lamina propria | - | - | |
| Keimepithel | Sertoli-Zelle | - | |
| | Spermatogonie | - | |
| | Spermatozyte | - | |
| | Spermatide rund | ++ | AS s.Tab. |
| | Spermatide elongiert | ++ | AS s.Tab. |
| | Spermium | - | - |
| | Restkörper | + | Punktförmig |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | - | - | |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, AS akrosomales System AS, s. Tab. siehe Tabelle 48

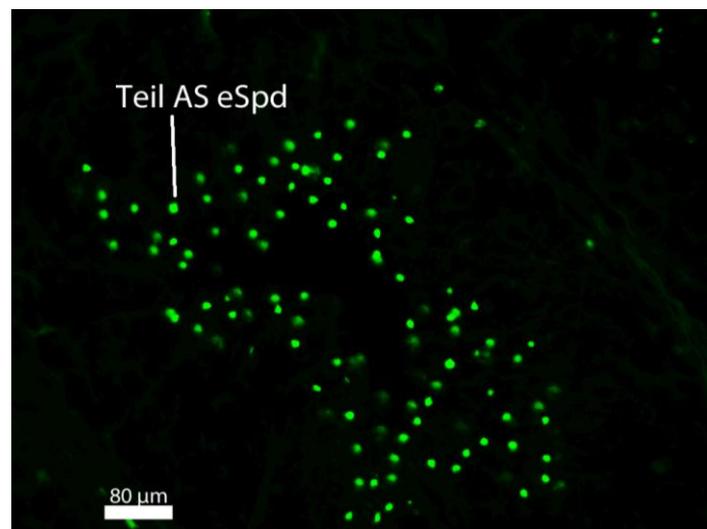


Bild 86: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase V-VII. Bindung von SJA-FITC. SB=80 µm. Das Lektin bindet punktförmig an Teile des U-förmigen akrosomalen Systems der elongierten Spermatisden (ASeSpd).

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens können keine Bindungsstellen nachgewiesen werden, sofern die Spermiogenese nicht eingesetzt hat. In jenem

Fall sind Teile des akrosomalen Systems der runden Spermatiden markiert. Die Reaktionen sind in der Tabelle 50 zusammengefasst.

Tabelle 50: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von GSL-I-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|--|------------------|-------------------|------------------|
| Bindegewebe | | - | - |
| Blutgefäßwand | | - | - |
| Leydig-Zelle | | - | - |
| Lamina propria | | - | - |
| Keimepithel | Sertoli-Zelle | - | - |
| | Spermatogonie | - | - |
| | Spermatozyte | - | - |
| | Spermatide rund* | ++ | Teil des AS |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | | - | - |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, *in Tubuli mit begonnener Spermiogenese, AS akrosomales System

4.5. L-Fukose-bindende Lektine der Gruppe V

In dieser Gruppe wurde lediglich das Lektin UEA-I untersucht. Es weist keinerlei Affinität zu Strukturen im Hoden auf.

4.5.1. Untersuchung der Bindung von FITC-markierten Ulex europaeus Agglutinin (UEA-I)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Für das Lektin UEA-I-FITC kann in meiner Arbeit keine Bindungsstellen im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens festgestellt werden.

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Ebenso wie im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens, so kann auch in den Hoden des nicht-geschlechtsreifen Tieres keine Fluoreszenz beobachtet werden.

4.6. Lektine mit Bindungsstellen für Oligosaccharide der Gruppe VI

Es wurden die Lektine PHA-E sowie PHA-L bearbeitet. Für beide Lektine können Bindestellen im Keimepithel und im Interstitium nachgewiesen werden.

4.6.1. Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem Phaseolus vulgaris erythroagglutinin (PHA-E)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Die Epithelzellen von Tubuli recti (Bild 87), Rete testis und Chordae testis besitzen regelmäßig Bindestellen für das Lektin. Hier fluoreszieren die luminal gelegenen Bereiche der Zellen.

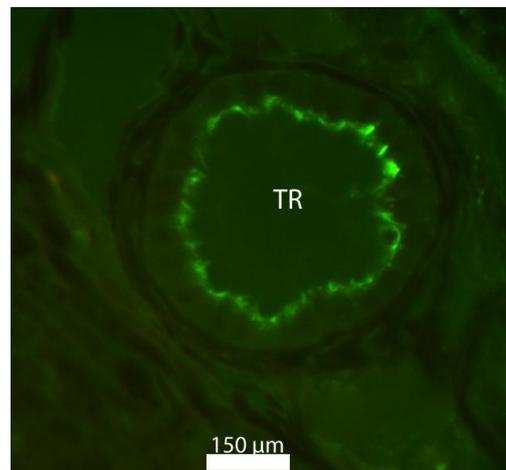


Bild 87: Tubulus rectus eines geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung von PHA-E-FITC. SB=150 µm. Es werden die Epithelzellen des Tubulus rectus (TR) luminal markiert

Im Interstitium ist ausschließlich das Zytoplasma der Leydig-Zellen granulär markiert. Auch die heterotopen Leydig-Zellen in der Hodenkapsel und im Mediastinum fluoreszieren regelmäßig schwach positiv. Im Keimepithel ist eine positive Markierung in den Sertoli-Zellen erkennbar: es leuchten einzelne schmale Zytoplasmaausläufer, die sich zwischen die Keimzellen schieben. Ferner können einzelne Granula sowie apikale Anteile des Zytoplasmas der Ammenzellen fluoreszieren. Die Reaktionen sind in der Tabelle 51 zusammengefasst.

Tabelle 51: Glykohochemischer Nachweis der Bindung von PHA-E-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|--|---------------|-------------------|---|
| Bindegewebe | | - | - |
| Blutgefäßwand | | - | - |
| Leydig-Zelle | | +/- | Granula im Zytoplasma |
| Lamina propria | | - | - |
| Keim-epithel | Sertoli-Zelle | +/- | Zytoplasma: Processus, Granula, apikale Anteile |
| | Keimzelle | - | - |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | | +bis++ | Luminal |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Es kann im Interstitium eine Reaktion in Granula im Zytoplasma der Leydig-Zellen festgestellt werden. Auch die heterotopen Leydig-Zellen der Hodenkapsel und des Mediastinum zeigen sich regelmäßig markiert. Ferner weist das Epithel des Rete testis, der Chordae retis und der Tubuli recti stets Bindestellen für PHA-E auf. Die Reaktion beschränkt sich auf den luminalen Bereich der Epithelzellen. Im Keimepithel zeigt das Lektin PHA-E eine Affinität zu den Ammenzellen: in Samenkanälchen ohne zentralem Lumen sind Stränge der Stützzellen markiert, die das Keimepithel durchziehen. Bei Tubuli seminiferi contorti mit zentralem Kanal sind oftmals die am Lumen gelegenen Zytoplasmaanteile der Ammenzellen gefärbt. In den gewundenen Hodenkanälchen, die bereits eine fortgeschrittene Spermatogenese aufweisen, gleicht die Reaktion der beim adulten Kaninchen: hier zeigen sich laterale und apikale Processus der Ammenzelle positiv markiert. Ferner fluoreszieren einzelne Granula im Zytoplasma der Stützzelle. Die Reaktionen sind in den Tabelle 52 zusammengefasst.

Tabelle 52: Glykohochemischer Nachweis der Bindung von PHA-E-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|---|------------|-------------------|--------------------------------|
| Bindegewebe | | - | - |
| Blutgefäßwand | | - | - |
| Leydig-Zelle | | +/- | Granula im Zytoplasma |
| Lamina propria | | - | - |
| Keimepithel | Stützzelle | ++ | Zytoplasma: Granula, Processus |
| | Keimzelle | - | - |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | | +/- | Luminal |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, *in Tubuli mit begonnener Spermio-genese

4.6.2. Untersuchung der Bindung von FITC-markiertem Phaseolus vulgaris leukoagglutinin (PHA-L)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Es erweisen sich einzelne Granula im Zytoplasma der Leydig-Zellen im Interstitium als positiv. Auch die heterotopen Leydig-Zellen der Hodenkapsel und des Mediastinums sind PHA-L-positiv. Im Keimepithel färben sich einzelne Ausläufer der Sertoli-Zelle an. Auch die apikalen Anteile der Sertoli-Zelle fluoreszieren regelmäßig. Die Reaktionen sind in der Tabelle 53 zusammengefasst.

Tabelle 53: Glykohochemischer Nachweis der Bindung von PHA-L-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|---|---------------|-------------------|--|
| Bindegewebe | | - | - |
| Blutgefäßwand | | - | - |
| Leydig-Zelle | | + | Granula im Zytoplasma |
| Lamina propria | | - | - |
| Keim-Epithel | Sertoli-Zelle | + | Zytoplasma: Processus, apikale Anteile |
| | Keimzelle | - | |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | | - | - |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Das Lektin PHA-L bindet an Granula von Leydig-Zellen im Interstitium (Bild 88) sowie an heterotopen Leydig-Zellen des Mediastinums und der Hodenkapsel. Auch kann im Keimepithel eine Markierung identifiziert werden: hier fluoreszieren Ausläufer der Stützzellen (Bild 88). Für die übrigen Strukturen können keine Reaktionen nachgewiesen werden. Die Reaktionen sind in der Tabelle 54 zusammengefasst.

Tabelle 54: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von PHA-L-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur/Zelle</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|--|------------|-------------------|--------------------------------|
| Bindegewebe | | - | - |
| Blutgefäßwand | | - | - |
| Leydig-Zelle | | + | Granula im Zytoplasma |
| Lamina propria | | - | - |
| Keimepithel | Stützzelle | + bis ++ | Zytoplasma: Processus, Granula |
| | Keimzelle | - | - |
| Epithel Tubulus rectus, Rete testis, Chorda retis | | - | - |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv +++ sehr stark positiv, * in Tubuli mit begonnener Spermiogenese

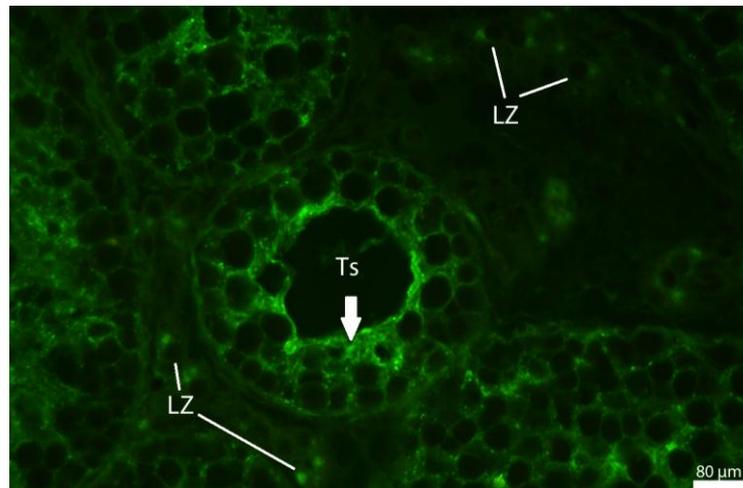


Bild 88: Hodenparenchym eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung von PHA-L-FITC. SB=80 µm. Im Tubulus seminifer contortus (Ts) fluoresziert das Zytoplasma der Stützzellen (Pfeil). Im Interstitium werden Granula im Zytoplasma der Leydig-Zellen (LZ) gefärbt.

5. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

Es wurden ausschließlich Bouin-fixierte Schnitte verwendet. Es wurden sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen angefertigt. Bei den Positivkontrollen wurden die für das Gewebe erwarteten und in früheren Arbeiten bestätigten Strukturen angefärbt. Die Negativkontrollen verliefen durchwegs ohne spezifische Markierung von Zellen oder Gewebestrukturen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die nachgewiesene Bindung der Antikörper spezifisch war.

5.1. Expression von “ α -smooth muscle actin” (α -SMA)

Geschlechtsreife Kaninchen:

In meiner Arbeit lässt sich regelmäßig bei allen Tieren eine starke Expression von α -SMA in den Myofibroblasten und glatten Muskelzellen der Hodenkapsel feststellen: es sind zwei breite Zonen der Organkapsel markiert, die wiederum aus mehreren Lagen bestehen. Die erste äußere Schicht liegt in der unmittelbaren Nachbarschaft zur Tunica visceralis und verläuft zur Längsachse des Hodens. Die zweite innere Schicht liegt im mittleren Bereich der Tunica albuginea und verläuft als zirkuläre Schicht entlang des Umfangs des Hodens. Die beiden Lagen stehen somit im 90° Grad Winkel zueinander (Bild 89). Eine relativ schmale Zone von negativen Bindegewebszellen trennt die beiden gefärbten Schichten von den Tubuli seminiferi contorti. In der ungefärbten Schicht zeigen nur die glatten Muskelzellen der Blutgefäßwände regelmäßig eine positive Reaktion auf α -SMA. Zusätzlich zeigen sich im interstitiellen Gewebe jeden Tieres einige durch den α -SMA-Antikörper markierte Myofibroblasten und glatte Muskelzellen. Ferner finden sich α -SMA positive Zellen im Mediastinum der adulten Tiere, die auch unmittelbar unter dem Epithel des Rete testis liegen können (Bild 93). Die Menge der identifizierten Immunreaktionen schwankt dabei von Tier zu Tier (Bild 90, 91). Ferner ist eine Immunreaktion in den Bindegewebskörpern der Chordae retis zu verzeichnen (Bild 93). Der α -SMA-Antikörper zeigt überdies stets eine positive Reaktion im Stratum myoideum der Lamina propria, das jeden Tubulus seminifer contortus vollständig umgibt (Bild 93, 94). Durch die Reaktion mit dem α -SMA-Antikörper werden die gewundenen Hodenkanälchen von einem Ring positiver markierten Zellen umgeben und heben sich dadurch deutlich von dem peritubulären Gewebe ab. Durch α -SMA gefärbten Zellen begleiten auch die samenableitenden Wege des Hodens: in jedem Hoden finden sich immer um die

Terminalsegmente (Bild 90, 91) sowie um die meisten Tubuli recti (Bild 90, 91, 92) Abschnitte α -SMA-exprimierende Myofibroblasten und glatte Muskelzellen. Im Gegensatz zum gewundenen Hodenkanälchen umfassen diese kontraktile Zellen die Terminalsegmente sowie die geraden Kanälchen nicht vollständig in Ringform. Darüber hinaus lassen sich in der Wand von Blutgefäßen der Hodenkapsel (Bild 89), des Interstitiums, der Chordae retis und des Mediastinums (Bild 90, 91, 92, 93) α -SMA positive Zellen erkennen. Die Reaktionen sind in der Tabelle 55 zusammengefasst.

Tabelle 55: Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| Struktur | Intensität | Anmerkung |
|---|------------------|---|
| Bindegewebe: Myofibroblast, glatte Muskelzelle | +++ Hodenkapsel | 2 Schichten |
| | +++ Mediastinum | Menge schwankt; verteilt im Mediastinum bzw. direkt unter Reteepithel |
| | +++ Chorda retis | - |
| | +++ Interstitium | - |
| Blutgefäß: glatte Muskelzelle | +++ | Arterie und Vene: Tunica intima, media |
| Leydig-Zelle | - | - |
| Lamina propria: Stratum myoideum | +++ | umgibt Tubulus seminiferus contortus vollständig |
| Keimepithel | - | - |
| Terminalsegment: Myofibroblast, glatte Muskelzelle | +++ | keine vollständige Schicht um Struktur |
| Tubulus rectus: Myofibroblast, glatte Muskelzelle | +++ | keine vollständige Schicht um Struktur; nur wenige Tubuli recti ungefärbt |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv

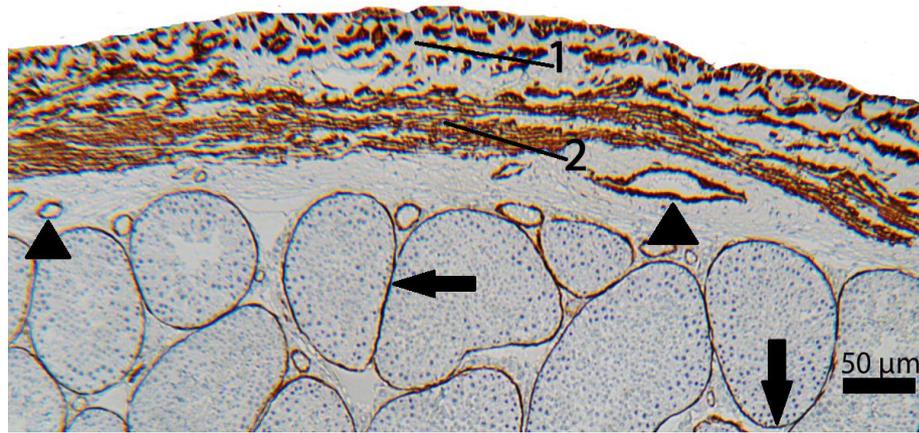


Bild 89: Hodenkapsel und Hodenparenchym eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA. SB=50 μ m. Myofibroblasten und glatte Muskelzelle reagieren in zwei senkrecht zueinander verlaufenden Schichten (1: längsverlaufende Schicht; 2: zirculär verlaufende Schicht) mit dem α -SMA-Antikörper. Die glatten Muskelzellen der Blutgefäße (Pfeilspitzen) exprimieren α -SMA. Das Stratum myoideum der Lamina propria (Pfeile), die den Tubulus seminifer umgibt, weist ebenfalls eine positive Reaktion mit α -SMA auf.

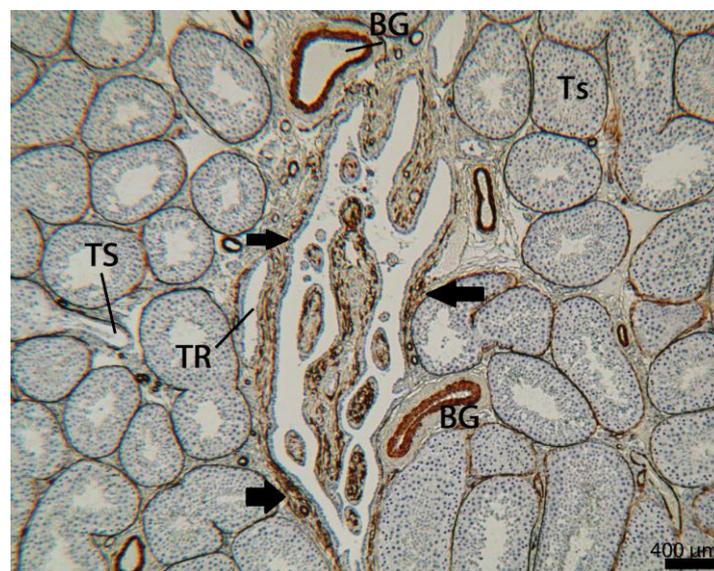


Bild 90: Mediastinum testis und Rete testis eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA. SB=400 μ m. Die Anzahl von α -SMA-positiven Myofibroblasten und glatte Muskelzellen (Pfeile) im Mediastinum schwanken von Tier zu Tier. Dieses Kaninchen besitzt im Gegensatz zu dem in Bild 91 eine große Menge dieser kontraktile Zellen. TS Terminalsegment TR Tubulus rectus Ts Tubulus seminifer contortus BG Blutgefäß

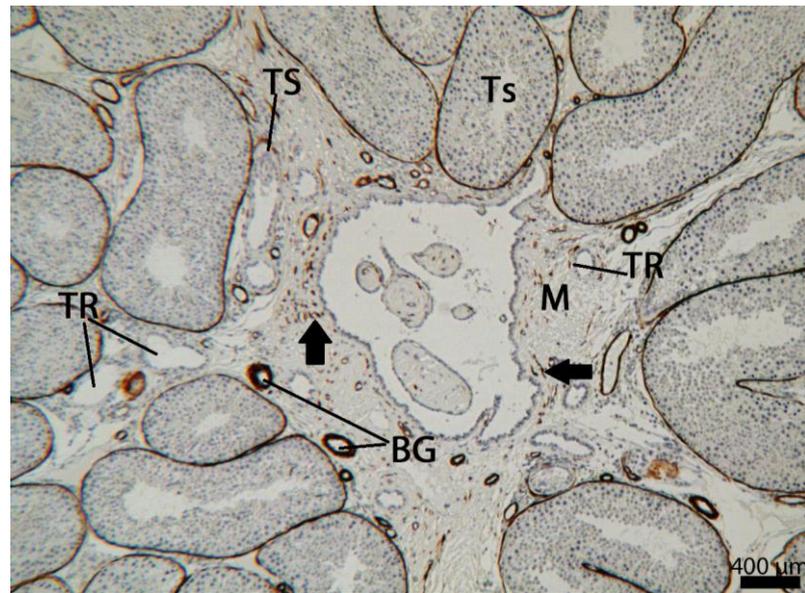


Bild 91: Mediastinum testis und Rete testis eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA. SB=400 μ m. Die Anzahl von α -SMA-positiven Myofibroblasten und glatte Muskelzellen (Pfeile) im Mediastinum schwanken von Tier zu Tier. Dieses Kaninchen besitzt im Gegensatz zu dem in Bild 90 eine geringe Menge an diesen kontraktile Zellen. TS Terminalsegment TR Tubulus rectus Ts Tubulus seminifer contortus BG Blutgefäß M Mediastinum

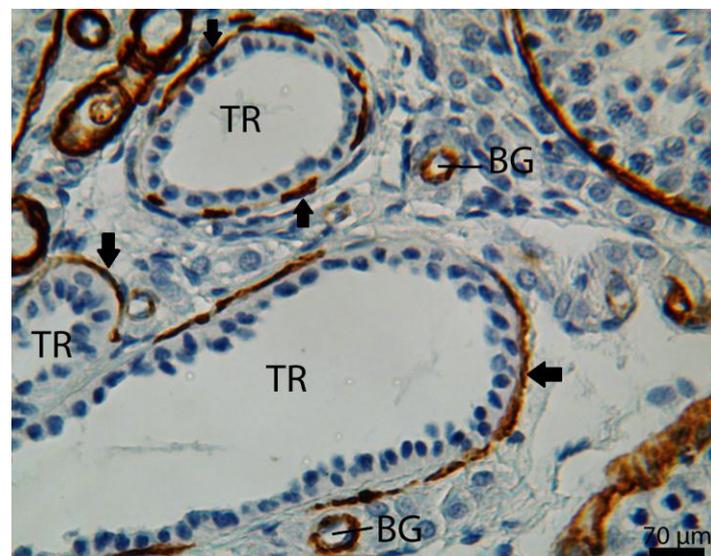


Bild 92: Tubuli recti eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA. SB=70 μ m. α -SMA-positiv Myofibroblasten und glatte Muskelzellen (Pfeile) umgeben die Tubuli recti (TR) nicht vollständig. BG Blutgefäß

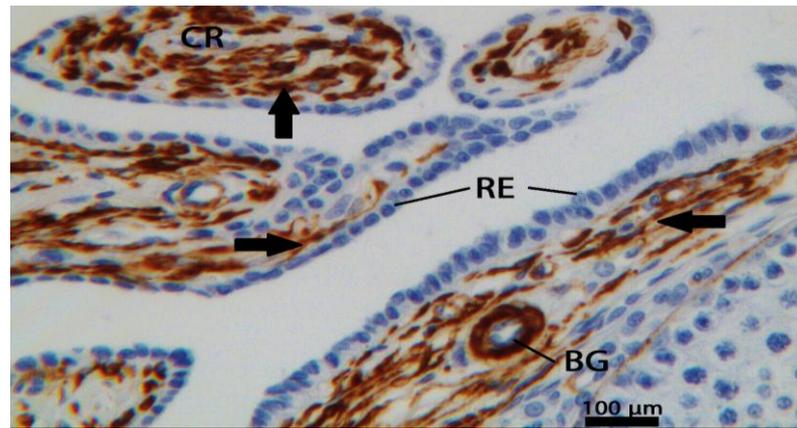


Bild 93: Rete testis eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA. SB=100 μ m. Myofibroblasten und glatte Muskelzellen (Pfeil) der Chordae retis (CR) in den Kanälen des Rete testis exprimieren α -SMA, ebenso diejenigen unterhalb des Rete testis-Epithel (RE). BG Blutgefäß

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Die Myofibroblasten und glatten Muskelzellen der Hodenkapsel sind in zwei Schichten organisiert: die erste äußere Schicht schließt sich dem Epiorchium an und verläuft parallel zur Längsachse des Hodens. Die innere Schicht befindet sich in der Mitte der Tunica albuginea eingebettet und verläuft als zirkuläre Schicht entlang des Umfangs des Hodens (Bild 95). Im intertubulären Raum sind vereinzelt α -SMA exprimierende Zellen zu beobachten. Im Mediastinum können zwar bei allen Kaninchen Myofibroblasten und glatte Muskelzellen mittels α -SMA-Antikörper dargestellt werden, allerdings in nur sehr geringer Zahl. In unmittelbarer Nähe zum Reteepithel besitzen Zellen nur in Ausnahmefällen α -SMA (Bild 94). Auch werden bei allen Tieren sämtliche Tubuli seminiferi contorti vollständig von α -SMA-positiven Zellen umgeben (Bild 95). Die Terminalsegmente sind im Gegensatz zu den gewundenen Samenkanälchen sehr selten und dann nur unvollständig durch α -SMA-Antikörper markierten Zellen umgeben. Ebenso sind α -SMA-positive Zellen um die Tubuli recti selten: bei der Hälfte der untersuchten Kaninchen lässt sich überhaupt keine Immunreaktion feststellen, bei der anderen Hälfte kommen nur in Einzelfällen α -SMA exprimierende Zellen vor (Bild 96). Es finden sich stets in den Wänden der Blutgefäße von Hodenkapsel (Bild 98), Interstitium, Mediastinum und Chordae retis (Bild 94) eine positive Markierung durch den α -SMA-Antikörper. In den Chordae retis wird keine Färbung von Myofibroblasten oder glatten Muskelzellen

beobachtet (Bild 94). Die Reaktionen sind in der Tabelle 56 zusammengefasst.

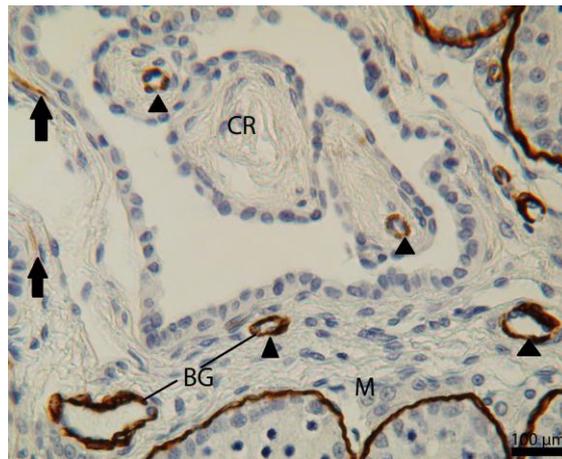


Bild 94: Rete testis eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA. SB=100 μ m. α -SMA-positive Zellen finden sich in den Wänden der Blutgefäß (BG) der Chordae retis (CR) und des Mediastinums (M) (Pfeilspitzen). α -SMA-positive Myofibroblasten und glatte Muskelzellen im Mediastinum (M) sind selten zu beobachten (Pfeile).

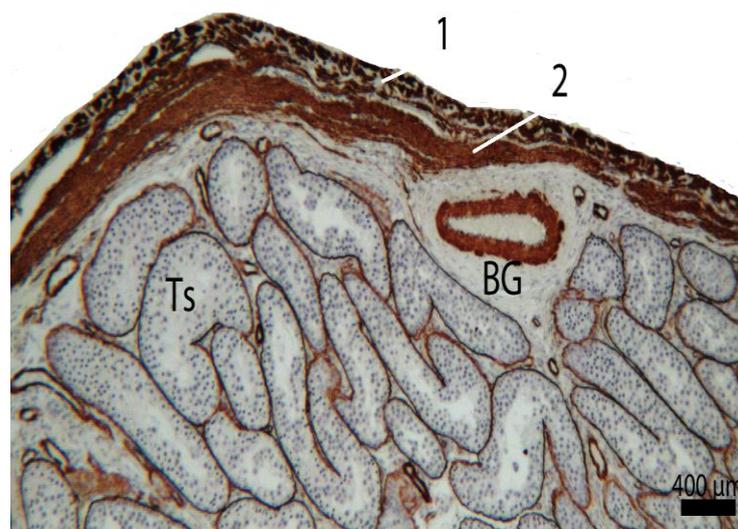


Bild 95: Hodenkapsel und Hodenparenchym eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA. SB=400 μ m. Es werden Myofibroblasten und glatte Muskelzelle in zwei senkrecht zueinander verlaufenden Schichten (1: längsverlaufende Schicht; 2: zirkulär verlaufende Schicht) markiert. Alle Tubuli seminiferi contorti (Ts) werden vollständig von einem α -SMA-exprimierenden Stratum myoideum umgeben. BG Blutgefäße

Tabelle 56: Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| Struktur | Intensität | Anmerkung |
|---|--------------------|--|
| Bindegewebe: Myofibroblast, glatte Muskelzelle | +++ Hodenkapsel | 2 Schichten |
| | +++ Mediastinum | geringe Menge; schwankt je nach Tier; kaum direkt unter Reteepithel |
| | - Chorda retis | - |
| | +++ Interstitium | - |
| Blutgefäße: glatte Muskelzelle | +++ | Arterie und Vene: Tunica intima und media |
| Leydig-Zelle | - | - |
| Lamina propria: Stratum myoideum | +++ | umgibt Tubulus seminiferus contortus vollständig |
| Keimepithel | - | - |
| Terminalsegment: Myofibroblast, glatte Muskelzelle | +++ | bei allen Tieren: selten; keine vollständige Schicht um Struktur |
| Tubulus rectus: Myofibroblast, glatte Muskelzelle | +++ | bei einigen Tieren nie, bei anderen selten; keine vollständige Schicht um Struktur |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv

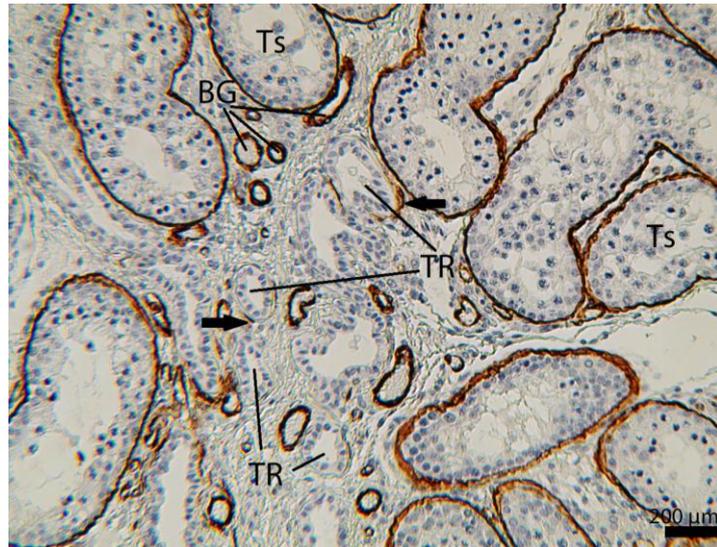


Bild 96: Tubuli recti im Hoden eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA. SB=200 μ m. Die meisten Tubuli recti (TR) sind unflankiert von α -SMA-exprimierenden glatten Muskelzellen und Myofibroblasten; nur selten können einige dieser kontraktile Zellen identifiziert werden (Pfeile), die die Tubuli recti jedoch nicht vollständig umgeben. BG Blutgefäß Ts Tubuli seminiferi contorti

5.2. Expression von Zytokeratin 5 (CK 5)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Bei allen Tieren stellt sich das Epithel der Tubuli recti, des Rete testis sowie der Chordae testis positiv dar. Das Zytoplasma aller Epithelzellen ist dabei gleichmäßig angefärbt. Auch die Blutgefäße der Hodenkapsel, des Interstitiums und des Mediastinums besitzen regelmäßig in ihrer Tunica intima und media immunreaktives CK 5. Darüber hinaus findet sich bei sämtlichen Kaninchen eine starke Expression von CK 5 in der Tunica visceralis der Hodenkapsel. Dieser äußerste Teil der Hodenkapsel ist durch konventionelle lichtmikroskopische Färbungen auf dem ersten Blick nicht als eigene Schicht zu erkennen und kann erst gut nach Anfärbung durch den CK 5-Antikörper dargestellt werden. Ferner ist eine Immunfärbung auf CK 5 im Keimepithel der gewundenen Hodenkanälchen nachzuweisen. Dies betrifft zum einen die Keimzellen während der Spermiogenese: hier kann eine punktförmige Immunfärbung im Zytoplasma der runden Spermatiden gefunden werden. Diese Bindung zeigt sich bei diesen Keimzellen ab der Phase I des Keimepithelzykluses (Bild 98), während der Phasen V bis VIII ist sie bei runden Spermatiden noch nicht beobachtbar (Bild

100, 101). Diese Reaktion kann zwar bei allen untersuchten Tieren, aber nicht in allen Tubuli seminiferi contorti der Phase I nachgewiesen werden. Regelmäßig und in allen Hoden gelingt der Nachweis von CK 5 in elongierten Spermatisden (Bild 101). Es färbt sich eine punktförmige Struktur im Zytoplasma bzw. in den Restkörpern dieser Keimzellen an. Die Expression von CK 5 in den Restkörpern bleibt auch während der Phase VIII bestehen (Bild 101). Sie ist jedoch wesentlich unregelmäßiger anzutreffen. In Einzelfällen ist bei einigen Kaninchen eine Markierung der Sertoli-Zellen zu beobachten. Es werden unregelmäßig vor allem basale, seltener apikale Zytoplasmastränge gefärbt (Bild 97). Die Reaktionen sind in der Tabelle 57 zusammengefasst.

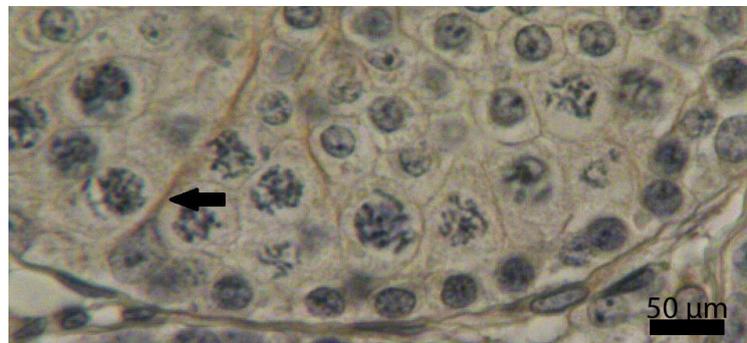


Bild 97: Keimepithel eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von CK 5. SB=50 μ m. Unregelmäßig kann eine Immunreaktion von einzelnen Zytoplasmasträngen der Sertoli-Zellen beobachtet werden (Pfeil).

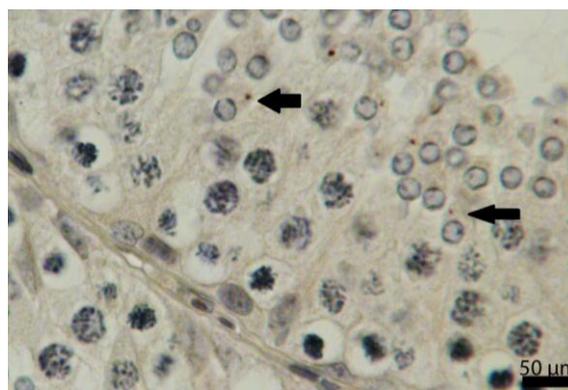


Bild 98: Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase I. Immunhistochemischer Nachweis von CK 5. SB=50 μ m. Ab Phase I kann unregelmäßig eine punktförmige Immunreaktion im Zytoplasma der runden Spermatisden beobachtet werden (Pfeile).

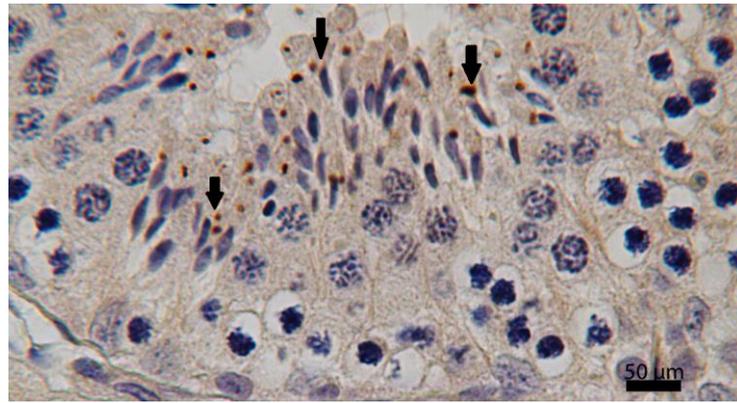


Bild 99: Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase III. Immunhistochemischer Nachweis von CK 5. SB=50 µm. In dieser Phase ist regelmäßig eine punktförmige Immunreaktion im Zytoplasma der elongierten Spermatiden zu identifizieren beobachtbar (Pfeile).

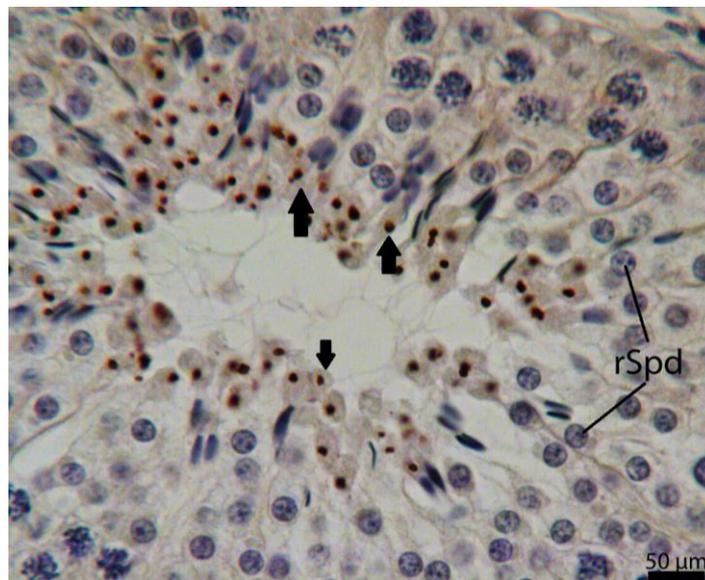


Bild 100: Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase V-VII. Immunhistochemischer Nachweis von CK 5. SB=50 µm. Während dieser Phasen ist regelmäßig eine punktförmige Immunreaktion im Zytoplasma der elongierten Spermatiden beobachtbar (Pfeile). Die runden Spermatiden (rSpd) hingegen exprimieren in diesen Phasen kein CK 5.



Bild 101: Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase VIII. Nachweis von CK 5. SB=50 µm. Unregelmäßig ist eine positive Immunfärbung in den Restkörpern der Spermien zu identifizieren (Pfeile).

Tabelle 57: Immunhistochemischer Nachweis von CK 5 im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|---|----------------------|-------------------|--|
| Hodenkapsel: Tunica visceralis | | +++ | Epithelzelle |
| Blutgefäßwand | | + | Kapillarn: Endothel; Arterie und Vene: Tunica intima, media |
| Keim-epithel | Sertoli-Zelle | +/- bis + | unregelmäßig: Processus |
| | Spermatogonie | - | - |
| | Spermatozyte | - | - |
| | Spermatide rund | + bis ++ | unregelmäßig ab Phase I: punktförmige Reaktion im Zytoplasma |
| | Spermatide elongiert | +++ | regelmäßig punktförmige Reaktion im Zytoplasma |
| | Restkörper | + bis ++ | unregelmäßig punktförmige Reaktion |
| Epithel T. rectus, Rete testis, Chorda retis | | +/- bis + | Gesamte Epithelzelle gleichmäßig gefärbt |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, T. rectus Tubulus rectus

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Bei sämtlichen nicht-geschlechtsreifen Tieren ist die Tunica visceralis der Organkapsel stets gleichmäßig und sehr stark positiv gefärbt. Auch die Wände der Blutgefäße weisen regelmäßig eine deutliche Färbung auf (Bild 102). Ferner sind

die Epithelzellen der Tubuli recti, des Rete testis (Bild 102) und der Chordae testis (Bild 102) bei allen Tieren positiv. Die Markierung mit unterschiedlicher Intensität kann in allen Tubuli recti und Retekanälen beobachtet werden. Die Epithelzelle ist dabei durchwegs homogen gefärbt. Im Keimepithel reagieren weder Stützzellen noch Spermatogonien oder Spermatozyten mit den CK 5-Antikörpern. Auch runde Spermatiden exprimieren zu diesem Zeitpunkt der postnatalen Entwicklung kein CK 5. Da in dieser immunhistochemischen Untersuchung keine nicht-geschlechtsreifen Kaninchen mit fortgeschrittener Spermiogenese verwendet wurden, kann keine Aussagen über eine mögliche positive Reaktion in elongierten Spermatiden von nicht-geschlechtsreifen Tieren getroffen werden. Die Reaktionen sind in der Tabelle 58 zusammengefasst.

Tabelle 58: Immunhistochemischer Nachweis von CK 5 im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur</u> | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|---|-------------------|--|
| Hodenkapsel: Tunica visceralis | +++ | Epithelzelle |
| Blutgefäßwand | + | Kapillare: Endothel; Arterie und Venen: Tunica intima, media |
| Keimepithel | - | - |
| Epithel T. rectus, Rete testis, Chorda retis | +/- bis + | Gesamte Epithelzelle gleichmäßig gefärbt |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, T. rectus Tubulus rectus

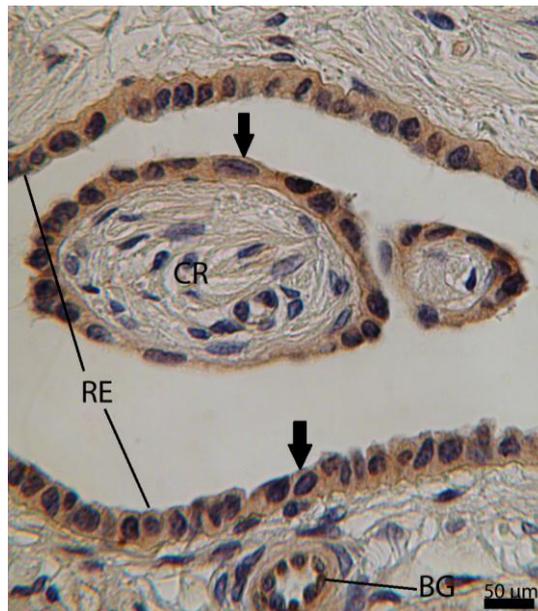


Bild 102: Rete testis eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von CK 5. Regelmäßig wird CK 5 von den Epithelzellen des Rete testis (RE) und der Chordae retis (CR) exprimiert (Pfeile). Ferner ist eine Immunreaktion in den Wänden der Blutgefäße (BG) zu beobachten.

5.3. Expression von Zytokeratin (CK 8)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Im gesamten Hodengewebe des geschlechtsreifen Kaninchens kann keine Immunfärbung mit dem CK 8-Antikörper nachgewiesen werden.

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Ebenso wie beim geschlechtsreifen Kaninchen, so reagiert auch das Hodenparenchym des nicht-geschlechtsreifen Tieres nicht mit dem Antikörper gegen CK 8.

5.4. Expression von Zytokeratin 14 (CK 14)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Die Tunica visceralis der Hodenkapsel kann regelmäßig stark positiv dargestellt werden. Auch die Blutgefäßwände der Hodenkapsel, des Mediastinums (Bild 103) und des Interstitiums zeigen stets eine Expression von CK 14. Ferner weisen in sämtlichen Gonaden alle Epithelzellen von Tubuli recti, Rete testis (Bild 103) und Chordae testis eine gleichmäßige Markierung auf. Die Reaktionen sind in der

Tabelle 59 zusammengefasst.

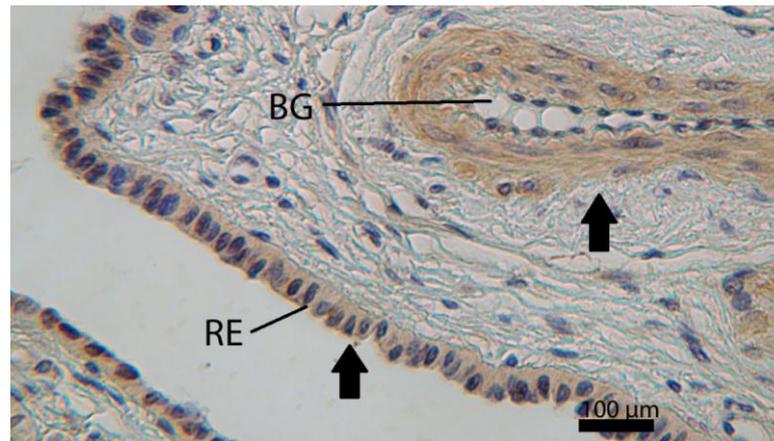


Bild 103: Rete testis eines geschlechtsreifen Kaninchens.

Immunhistochemischer Nachweis von CK 14. Das Rete testis-Epithel (RE) sowie Zellen in den Wänden der Blutgefäße (BG) exprimieren CK 14 (Pfeile).

Tabelle 59: Immunhistochemischer Nachweis von CK 14 im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur</u> | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|---|-------------------|---|
| Hodenkapsel: Tunica visceralis | +++ | Epithelzellen |
| Blutgefäßwand | +/- | Kapillare: Endothel; Arterie und Vene: Tunica intima, media |
| Keimepithel | - | - |
| Epithel T. rectus, Rete testis, Chorda retis | +/- | Gesamte Epithelzelle gleichmäßig gefärbt |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, T. rectus Tubulus rectus

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Es ist eine starke Färbung der Tunica visceralis der Hodenkapsel zu erkennen. Die Epithelien von Rete testis, Tubuli recti und Chordae retis aller Tiere zeigen regelmäßig eine Expression von CK 14. Diese ist in allen Zellen gleichmäßig zu beobachten. Ferner zeigen die Blutgefäßwände der Hodenkapsel, des Mediastinums und des Interstitiums in ihrer Tunica media eine Expression von CK 14. Die Reaktionen sind in der Tabelle 60 zusammengefasst.

Tabelle 60: Immunhistochemischer Nachweis von CK 14 im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur</u> | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|---|-------------------|---|
| Hodenkapsel: Tunica visceralis | +++ | Epithelzelle |
| Blutgefäßwand | +/- | Kapillare: Endothel; Arterie und Vene: Tunica intima, media |
| Keimepithel | - | - |
| Epithel T. rectus, Rete testis, Chorda retis | -/+ | Gesamte Epithelzelle gleichmäßig gefärbt |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, T. rectus Tubulus rectus

5.5. Expression von Zytokeratin 18 (CK 18)

Geschlechtsreife Kaninchen:

Die intratestikulären samenableitenden Wege zeigen immer eine positive Reaktion mit Antikörpern gegen CK 18: sowohl die Epithelzellen der Tubuli recti (Bild 104, 105, 106) sowie die des Rete testis (Bild 105) und der Chordae retis stellen sich regelmäßig positiv dar. Dabei werden die Epithelzellen gleichmäßig markiert. Da die restlichen benachbarten Strukturen der samenableitenden Wege nicht gefärbt werden, stellt das CK 18 eine Art „Marker“ für Tubuli recti und Rete testis dar. Auch Terminalsegmente können durch die kräftige Anfärbung des proximalen Teils des Tubulus rectus leicht aufgefunden werden. Neben den gerade besprochenen samenableitenden Wegen lässt sich die Tunica visceralis der Tunica vaginalis ausnahmslos durch die Immunreaktion sehr gut erkennen. Die Reaktionen sind in der Tabelle 61 zusammengefasst.

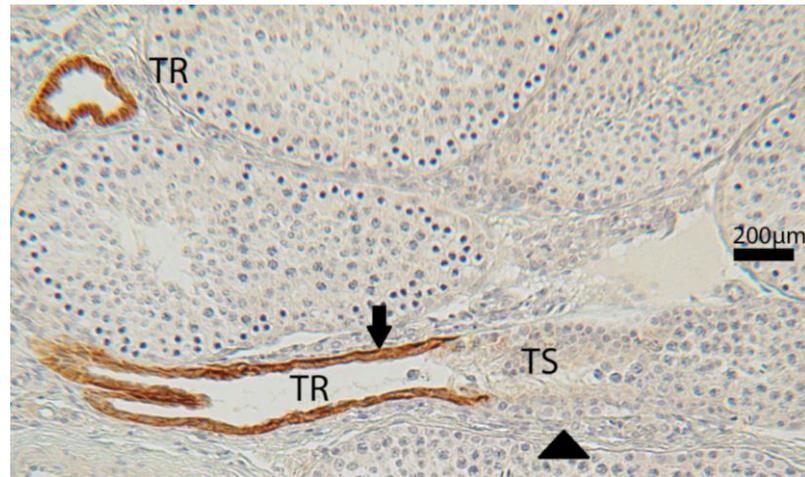


Bild 104: Terminalsegment und Tubuli recti eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von CK 18. SB=200 μ m. Während das Terminalsegment (TS) kein CK 18 exprimiert (Pfeilspitze), wird der sich anschließende Tubulus rectus (TR) durch den CK 18-Antikörper markiert (Pfeil). Dadurch kann der Übergang vom Terminalsegment zum Tubulus rectus leicht aufgefunden werden.



Bild 105: Übersicht Hodenparenchym eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von CK 18. SB=400 μ m. Im Hodenparenchym exprimieren lediglich die Epithelzellen von Tubuli recti (Pfeile) und Rete testis (Pfeilspitze) CK 18. Dieses Zytokeratin stellt somit eine Art „Marker“ für diese Strukturen dar.

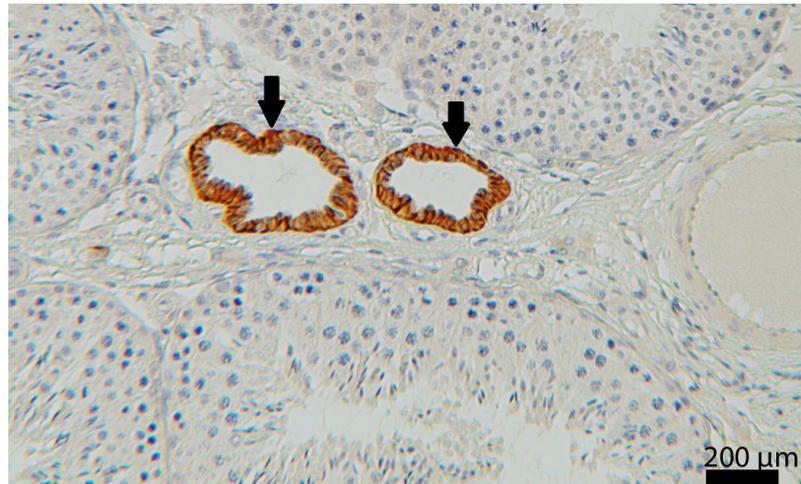


Bild 106: Tubuli recti eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von CK 18. SB=200 µm. Die Epithelzellen der Tubuli recti (TR) werden gleichmäßig angefärbt.

Tabelle 61: Immunhistochemischer Nachweis von CK 18 im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur</u> | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|---|-------------------|--|
| Hodenkapsel: Tunica visceralis | +++ | Epithelzelle |
| Blutgefäßwand | - | - |
| Keimepithel | - | - |
| Epithel T. rectus, Rete testis, Chorda retis | ++ | Gesamte Epithelzelle gleichmäßig gefärbt |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, T. rectus Tubulus rectus

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Beim nicht-geschlechtsreifen Tiere werden ohne Ausnahme die Tunica visceralis der Hodenkapsel sowie alle Epithelzellen der Tubuli recti (Bild 107), des Rete testis (Bild 107) sowie der Chordae retis (Bild 107) angefärbt und heben sich klar von den ansonsten negativen Strukturen des Hodens ab. Allerdings zeigen sich beim Epithel der Tubuli recti unterschiedliche Reaktionsintensitäten. Die Epithelzellen werden dabei gleichmäßig markiert. Im Keimepithel ist kein Expression von CK 18 nachweisbar. Die Reaktionen sind in der Tabelle 62 zusammengefasst.

Tabelle 62: Immunhistochemischer Nachweis von CK 18 im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur</u> | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|-----------------------------------|-------------------|--|
| Hodenkapsel: Tunica visceralis | +++ | Epithelzelle |
| Blutgefäßwand | - | - |
| Keimepithel | - | - |
| Epithel Tubulus rectus | +/- bis ++ | Gesamte Epithelzelle gleichmäßig gefärbt |
| Epithel Rete testis, Chorda retis | ++ | Gesamte Epithelzelle gleichmäßig gefärbt |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv.

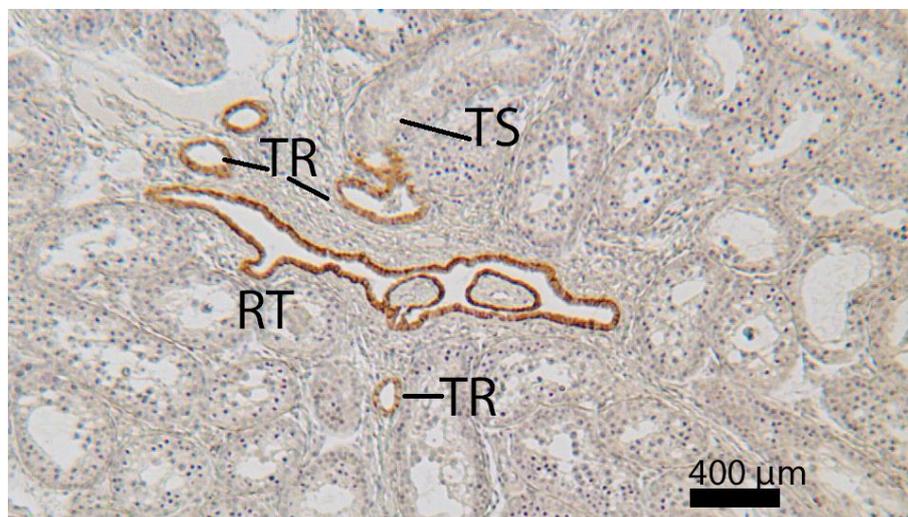


Bild 107: Übersicht Hodenparenchym eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von CK 18. SB=200 µm. Im Hodenparenchym exprimieren lediglich die Epithelzellen von Tubuli recti (TR), Rete testis (RT) und Chordae retis (CR) CK 18. Dadurch wird der Übergang von Terminalsegment (TS) zu Tubulus rectus gut erkennbar.

5.6. Expression von Zytokeratinen mit dem Antikörper gegen Panzytokeratin

Geschlechtsreife Kaninchen:

Bei den hier untersuchten Tieren kann eine positive Reaktion in den intratestikulären samenableitenden Wegen verzeichnet werden. Die Epithelien von Tubulus rectus (Bild 108), Rete testis (Bild 109) sowie der Chordae retis exprimieren Panzytokeratin. Bei jedem Tier tritt regelmäßig in den Tubuli recti,

Rete testis-Kanälen sowie in den Chordae retis eine Färbung auf. Diese Markierung betrifft die gesamte Epithelzelle. Durch die Anfärbung der Epithelzellen der geraden Kanälchen lassen sich die Übergänge von den Tubuli seminiferi contorti zu den Tubuli recti leicht ausmachen. Neben den oben erwähnten Strukturen ist auch die Tunica visceralis der Hodenkapsel regelmäßig sehr stark gefärbt. Die Reaktionen sind in der Tabelle 63 zusammengefasst.

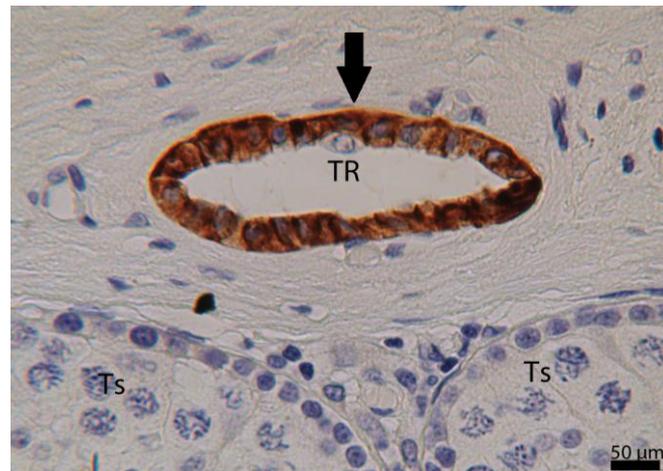


Bild 108: Tubulus rectus eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin. SB=50 µm. Die Epithelzellen des Tubulus rectus (TR) exprimieren Panzytokeratin (Pfeil). Ts Tubuli seminiferi contorti

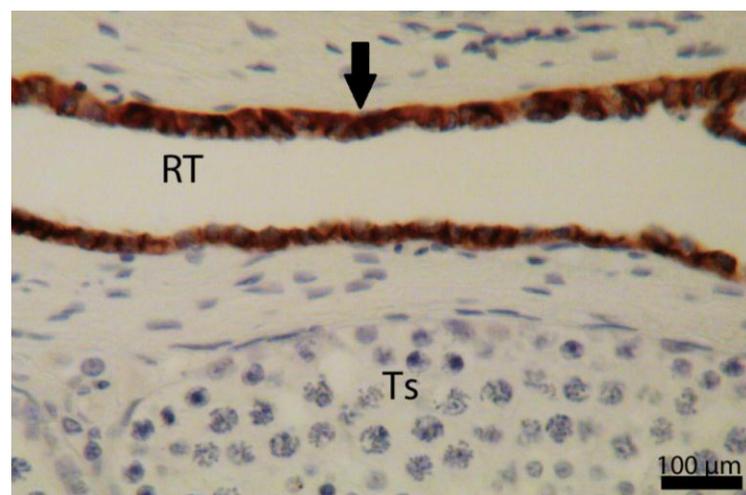


Bild 109: Rete testis eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin. SB=100 µm. Die Epithelzellen des Rete testis (RT) reagieren positiv mit dem Panzytokeratin-Antikörper (Pfeil).

Tabelle 63: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen mit einem Panzytokeratin-Antikörper im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur</u> | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|--|-------------------|--|
| Hodenkapsel: Tunica visceralis | ++ | Epithelzelle |
| Blutgefäßwand | - | - |
| Keimepithel | - | - |
| Epithel T. rectus, Rete testis, Chorda retis | +++ | Gesamte Epithelzelle gleichmäßig gefärbt |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, T. rectus Tubulus rectus

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Neben den Epithelzellen der Tunica visceralis, die regelmäßig und stark reagieren (Bild 110), verhält sich das Epithel der Tubuli recti, des Rete testis (Bild 111) und der Chordae testis bei sämtlichen Kaninchen positiv. Die Färbung ist bei den nicht-geschlechtsreifen Tieren in ihrer Intensität sehr variabel. Die Epithelzellen können dabei ungleichmäßig markiert sein. Die Reaktionen sind in der Tabelle 64 zusammengefasst.

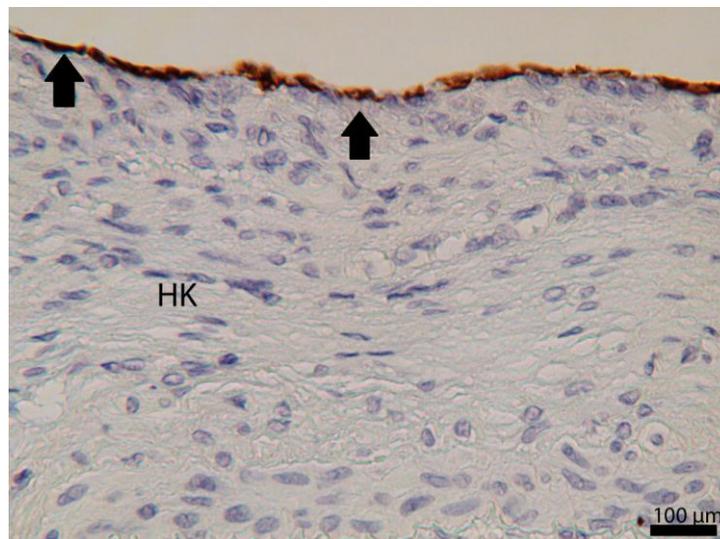


Bild 110: Ausschnitt Hodenkapsel eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin. SB=100 µm. Die Epithelzellen der Tunica vaginalis werden durch den Panzytokeratin-Antikörper deutlich markiert (Pfeile). Dadurch kann der Verlauf der äußersten Schicht der Hodenkapsel (HK) gut dargestellt werden.

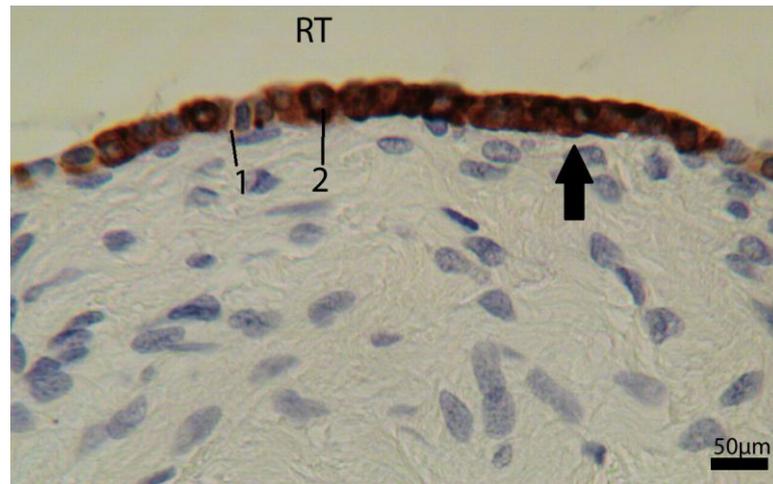


Bild 111: Rete testis-Epithel eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin 18. SB=50 µm. Die Epithelzellen des Rete testis (RT) reagieren positiv mit dem Panzytokeratin-Antikörper (Pfeil), allerdings kann die Intensität der Färbung variieren: während eine Epithelzelle nur schwach gefärbt ist (1), wird eine andere sehr stark markiert (2).

Tabelle 64: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen mit einem Panzytokeratin-Antikörper im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur</u> | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|---|-------------------|---|
| Hodenkapsel: Tunica visceralis | ++ | Epithelzelle |
| Blutgefäßwand | - | - |
| Keimepithel | - | - |
| Epithel T. rectus, Rete testis, Chorda retis | + bis +++ | Epithelzelle z.T. ungleichmäßig gefärbt |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, T. rectus Tubulus rectus

5.7. Expression von Vimentin

Geschlechtsreife Kaninchen:

In jedem untersuchten Hoden wird Vimentin von den Sertoli-Zellen exprimiert: im basalen Teil des Keimepithels sind regelmäßig angefärbte laterale Processus von Sertoli-Zellen zu beobachten, die sich parallel zur Lamina propria zwischen die Keimzellen schieben. Ferner wird der Vimentin-negative Kern regelmäßig von Vimentinfilamenten umgeben. Diese ziehen oft Richtung Lumen, erreichen dieses jedoch nicht. Die Länge dieser Intermediärfilamente, die nach apikal verlaufen,

variiert (Bild 112, 113). Die Intensität der Reaktion liegt zwischen „deutlich positiv“ und „sehr stark positiv“. Dabei lassen sich die lateralen Processus für gewöhnlich stärker anfärben als die apikalen Ausläufer. Eine Veränderung des Verteilungsmusters während des Keimepithelzykluses kann nicht eindeutig beobachtet werden. Die übrigen Zellen des Keimepithels sind durchwegs Vimentin-negativ. Die Lamina propria besitzt Vimentin-exprimierende Fibroblasten sowie Vimentin-positive myoide Zellen. Auch diese deutlich positive Reaktion ist regelmäßig feststellbar. Ferner zeigen die im Interstitium liegenden Leydig-Zellen bei allen Kaninchen regelmäßig eine starke Immunfärbung auf Vimentin. Dabei ist ein vom Zytoplasma ausgehender Ring um die Kernmembran erkennbar. Auch das Zytoplasma der Zwischenzellen ist sehr deutlich gefärbt (Bild 113). Ferner lassen sich im intertubulären Raum, im Mediastinum sowie im Bindegewebskörper der Chordae retis weitere Vimentin-exprimierende Zellen nachweisen. Dort reagieren Bausteine des Bindegewebes wie Fibroblasten sowie Myofibroblasten und glatte Muskelzellen regelmäßig stark positiv. Darüber hinaus können auch in der Hodenkapsel in sämtlichen Schichten Vimentin-positive Zellen beobachtet werden. Dabei handelt es sich sowohl um glatte Muskelzellen, Myofibroblasten, die auch durch α -SMA-Antikörper angefärbt werden, als auch um Fibroblasten. Darüber hinaus ist eine Immunreaktion in den intratestikulären samenableitenden Wege erkennbar: alle Epithelzellen von Tubuli recti, Rete testis und der Chordae retis weisen stets Bindungsstellen für den Vimentin-Antikörper auf. Diese Reaktion ist sehr deutlich, wobei in einigen Fällen die Markierung auf den infranukleären Teil der Epithelzelle beschränkt bzw. dort verstärkt ist. Sämtliche Blutgefäße aller untersuchten Hoden exprimieren in ihren Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen Vimentin (Bild 113). Die Reaktionen sind in der Tabelle 65 zusammengefasst.

Tabelle 65: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|---|---------------|-------------------|--|
| Bindegewebe | | ++ | Fibroblast, Myofibroblast, glatte Muskelzelle |
| Blutgefäßwand | | ++ | Endothelzelle, Fibroblast, glatte Muskelzelle der Tunica intima, media, externa der Arterie und Vene |
| Leydig-Zelle | | ++ | Ring um Kernmembran; Zytoplasma |
| Lamina propria | | + bis ++ | Fibroblast, myoide Zelle |
| Keim-Epithel | Sertoli-Zelle | + bis ++ | Laterale und apikale Processus |
| Epithel T. rectus, Chorda retis, Rete testis | | ++ | Epithelzelle z.T. infranukleär verstärkt gefärbt |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, T. rectus Tubulus rectus

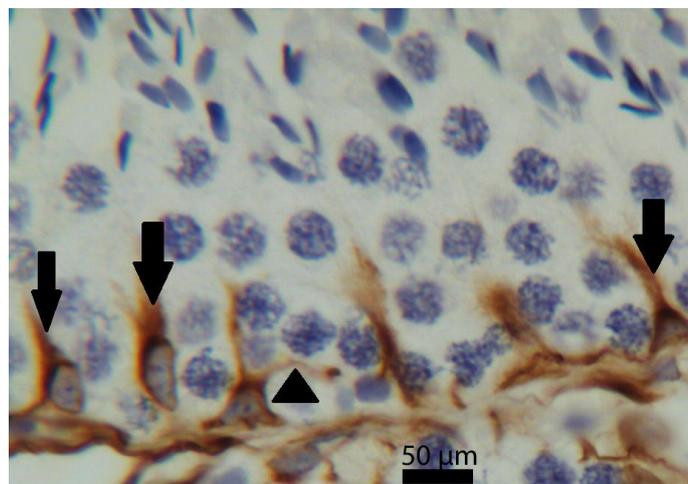


Bild 112: Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens.

Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin. SB=50 µm. Im Keimepithel werden Processus der Sertoli-Zellen angefärbt (Pfeile und Pfeilspitze). Dabei wird der Vimentin-negative Kern von den Vimentinfilamenten umgeben. Diese ziehen in Richtung Lumen des Tubulus seminifer contortus. Neben diesen apikalen Processus (Pfeile) werden auch laterale Sertoli-Zell-Stränge angefärbt (Pfeilspitze), die sich zwischen die Keimzellen schieben.

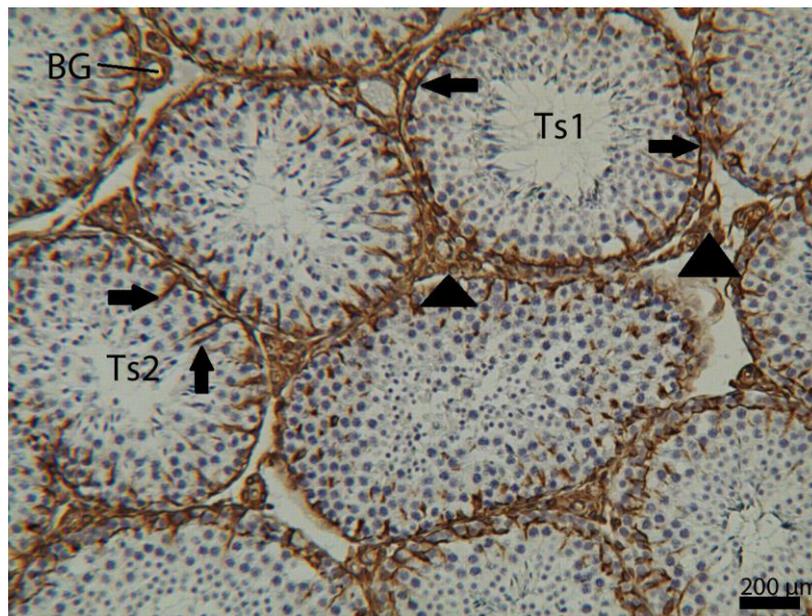


Bild 113: Übersicht Hodenparenchym eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin. SB=200 µm. Im Keimepithel der Tubuli seminiferi contorti (Ts) werden sowohl laterale (Pfeile in Ts1) als auch apikale (Pfeile in Ts2) Processus von Sertoli-Zellen markiert. Im Interstitium reagieren Leydig-Zellen (Pfeilspitzen) mit den Antikörpern gegen Vimentin. Auch die Wände der Blutgefäße (BG) besitzen Vimentin-positive Zellen.

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen:

Bei allen untersuchten nicht-geschlechtsreifen Kaninchen ist in den Tubuli recti, Rete testis und Chordae retis (Bild 117) eine Immunreaktion mit dem Vimentin-Antikörper zu beobachten, die sich meist auf die basalen Anteile der Epithelzellen beschränkt bzw. dort verstärkt ist. Ansonsten ist regelmäßig eine Expression von Vimentin in den Myofibroblasten, glatte Muskelzellen und Fibroblasten des Interstitiums, der Hodenkapsel, der Lamina propria (Bild 114, 115), des Mediastinums (Bild 117) sowie der Chordae retis (Bild 117) zu beobachten. Auch die dort gelegenen Blutgefäße weisen in ihren Wänden Vimentin-positive Zellen auf, wobei es sich in der Regel um Endothelzellen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen handelt (Bild 117). Im Keimepithel ist die Stützzelle die einzige Zelle, die Vimentin exprimiert (Bild 114, 115, 116). Vimentinfilamente können in allen Samenkanälchen sämtlicher Tiere identifiziert werden. Dabei befindet sich im Keimepithel eine vergleichsweise große Menge an Vimentin-positivem Material. In der Gruppe der nicht-geschlechtsreifen Tiere variiert das

Verteilungsmuster stark und zeigt kein spezielles Erscheinungsmuster. In den Tubuli seminiferi contorti ohne Lumina durchziehen lange Vimentinstränge das Zytoplasma der Stützzelle und lassen sich auch im Inneren der Hodenkanälchen finden. In den gewundenen Hodenkanälchen mit begonnener Lumenbildung können Intermediärfilamente beobachtet werden, die sich zwischen Keimzellen schieben oder das Keimepithel ringförmig zum Lumen hin abschließen (Bild 114). Manchmal umgeben auch Vimentinfilamente kreisförmig die Keimzellen. In den Tubuli mit Lumenbildung sind auch Intermediärfilamente erkennbar, die sich zum Lumen hin strecken und dieses auch erreichen (Bild 115). Eine Einteilung in apikale/laterale Processus wie bei geschlechtsreifen Kaninchen ist zuweilen schwer. Im Falle eines Tieres, dessen Tubuli seminiferi contorti allesamt aktive Spermatogenese zeigen, gleicht die Verteilung von Vimentin dem der adulten Kaninchen. Hier sind laterale und apikale Processus zu beobachten. Die Leydig-Zellen des Interstitiums zeigen eine Expression von Vimentin um die Membran des Kerns sowie in ihrem Zytoplasma (Bild 115). Die Reaktionen sind in der Tabelle 66 zusammengefasst.

Tabelle 66: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur</u> | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|--|-------------------|--|
| Bindegewebe | ++ | Fibroblast, Myofibroblast, glatte Muskelzelle |
| Blutgefäßwand | ++ | Endothelzelle, Fibroblast, glatte Muskelzelle der Tunica intima, media, externa der Arterie und Vene |
| Leydig-Zelle | ++ | Ring um Kernmembran; Zytoplasma |
| Lamina propria | + bis ++ | Fibroblast, myoide Zelle |
| Keim-epithel | + bis ++ | Laterale und apikale Processus durchziehen gesamtes Zytoplasma |
| Stütz-Zelle | | |
| Epithel Tubulus rectus | ++ | Färbung Epithelzelle z.T. infranukleär beschränkt bzw. verstärkt |
| Epithel Rete testis, Chorda retis | +/- bis ++ | Färbung Epithelzelle z.T. infranukleär beschränkt bzw. verstärkt |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv

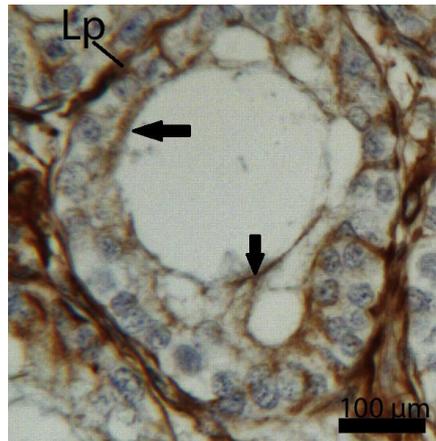


Bild 114: Tubulus seminifer contortus mit Lumen eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von **Vimentin**. SB=100 μ m. Zytoplasmastränge der Stützzellen exprimieren Vimentin (Pfeile). Die Lamina propria (Lp), die das Samenkanälchen umgibt, reagiert ebenfalls positiv mit dem Vimentin-Antikörper.

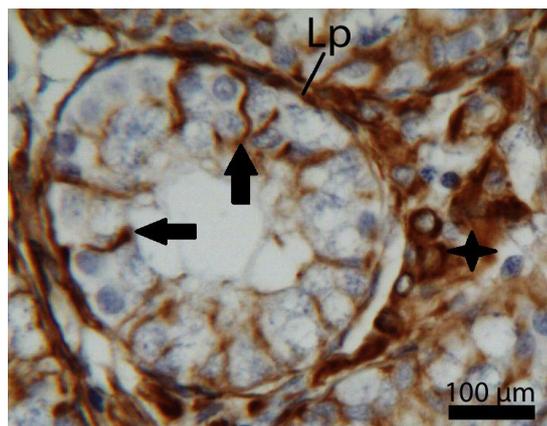


Bild 115: Tubulus seminifer contortus mit Lumen eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von **Vimentin**. SB=100 μ m. Die Stützzellen exprimieren Vimentinstränge (Pfeile). In diesem Tubulus seminifer contortus mit Lumen überwiegen Processus, die in Richtung Lumen ziehen und dieses auch erreichen. Im Interstitium ist die Immunreaktion der Leydig-Zellen erkennbar (Stern). Dabei ist der Vimentin-negative Kern von Vimentinsträngen umgeben; auch das Zytoplasma der Zwischenzelle ist markiert. Lp Lamina propria

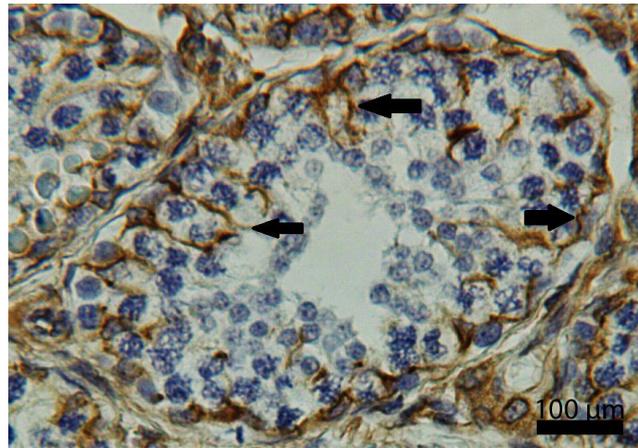


Bild 116: Tubulus seminifer contortus mit Lumen eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin. SB=100 µm. Die Stützzellen exprimieren Vimentinstränge (Pfeile). Das Verteilungsmuster hier ähnelt bereits dem des geschlechtsreifen Kaninchens, bei denen die Vimentinstränge Richtung Lumen ziehen, dieses aber nicht erreichen.

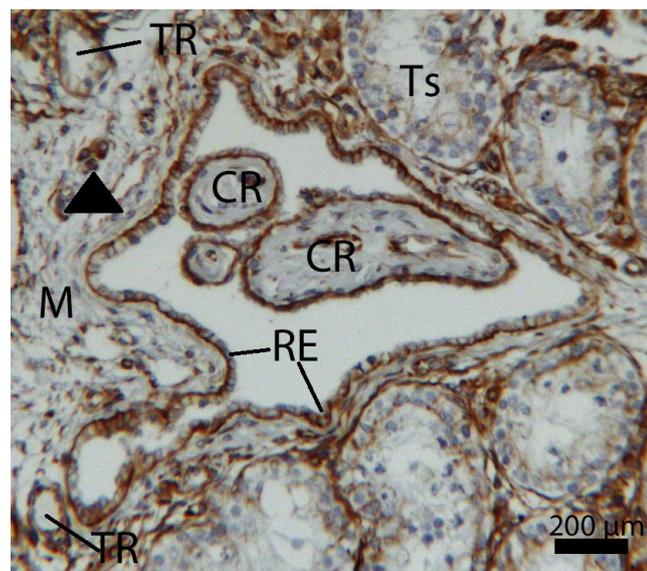


Bild 117: Rete testis im Mediastinum testis eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin. SB=200µm. Markiert sind die Epithelzellen der Tubuli recti (TR), der Chordae retis (CR) und des Rete testis (RE) beobachtet werden. Fibroblasten, Myofibroblasten und glatte Muskelzelle des Mediastinums (M) und der Chordae retis (CR) exprimieren Vimentin. Auch heterotope Leydig-Zellen im Mediastinum zeigen eine Markierung (Pfeilspitze). Ts Tubuli seminiferi contorti

5.8. Expression von Progesteronrezeptoren

Geschlechtsreife Kaninchen:

Die Expression von Progesteronrezeptoren kann in lediglich im Keimepithel der adulten Kaninchen nachgewiesen werden, alle anderen Strukturen des Hodens reagieren negativ. Im Keimepithel ist regelmäßig bei allen Kaninchen eine Bindung des Progesteronrezeptor-Antikörpers an elongierte Spermatozoen der Phasen V bis VII erkennbar. Angefärbt werden das gesamte Zytoplasma der Spermatozide sowie eine punktförmige Verdickung am luminal gelegenen Ende des Kerns (Bild 118, 119). Es können jedoch keine Bindungsstellen für den Antikörper an runden Spermatozoen, elongierende Spermatozoen der Phase II oder elongierte Spermatozoen der Phasen II oder VI gefunden werden. Spermien zeigen eine Expression von Progesteronrezeptoren am proximalen Abschnitt des Schwanzes (Bild 120). Es ist lichtmikroskopisch nicht eindeutig zu unterscheiden, ob dabei das Halsstück oder das Mittelstück die Rezeptoren exprimiert. Diese Reaktion ist ebenfalls regelmäßig in allen untersuchten reifen Gonaden zu beobachten, fällt allerdings in ihrer Intensität etwas schwächer aus als bei den elongierten Spermatozoen. Die Restkörper sind negativ bzw. unregelmäßig schwach positiv bis deutlich positiv gefärbt. Die übrigen Zellen des Keimepithels wie Spermogonien, Spermatozyten oder Sertoli-Zellen verhalten sich negativ. Die Reaktionen sind in der Tabelle 67 zusammengefasst.

Tabelle 67: Immunhistochemischer Nachweis von Progesteronrezeptoren im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens

| <u>Struktur</u> | | <u>Intensität</u> | <u>Anmerkung</u> |
|---|-------------------------|-------------------|--|
| Bindegewebe | | - | - |
| Blutgefäßwand | | - | - |
| Lamina propria | | - | - |
| Keim-epithel | Runde Spermatozide | - | - |
| | Elongierte Spermatozide | ++ | Nur elongierte der Phasen V-VII: apikales Ende des Kerns; Zytoplasma |
| | Spermium | + | Proximaler Abschnitt des Schwanzes |
| | Restkörper | - bis + | - |
| Epithel T. rectus, Rete testis, Chorda retis | | - | - |

Legende: - negativ, +/- schwach positiv, + deutlich positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv, T. rectus Tubulus rectus

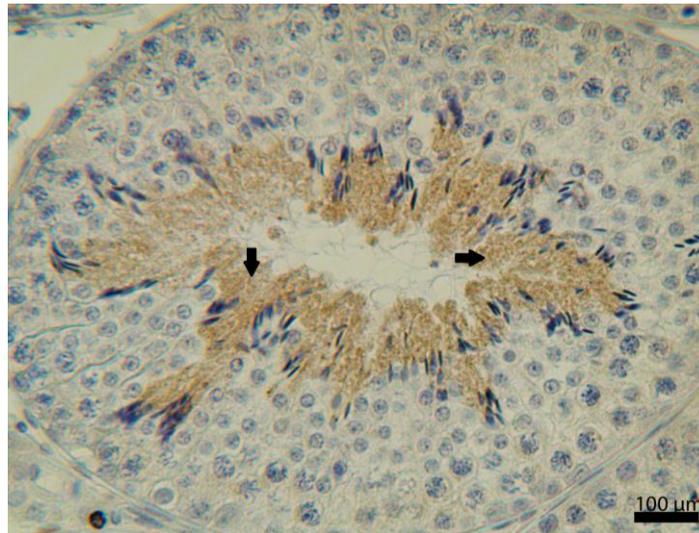


Bild 118: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase V-VII. Immunhistochemischer Nachweis von Progesteronrezeptoren. SB=100 µm. Das Zytoplasma der elongierten Spermatozoen wird durch die Immunreaktion markiert (Pfeile).

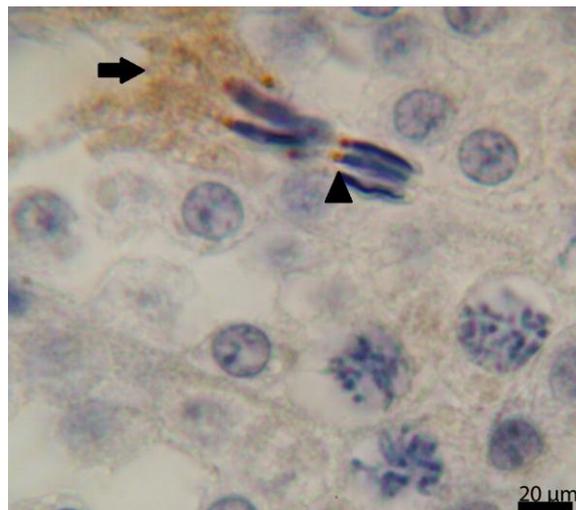


Bild 119: Vergrößerung Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase V-VII. Immunhistochemischer Nachweis von Progesteronrezeptoren. SB=20 µm. Es reagiert das Zytoplasma (Pfeil) sowie eine punktförmige Struktur am apikalen Ende (Pfeilspitze) des Kerns der elongierten Spermatozoen

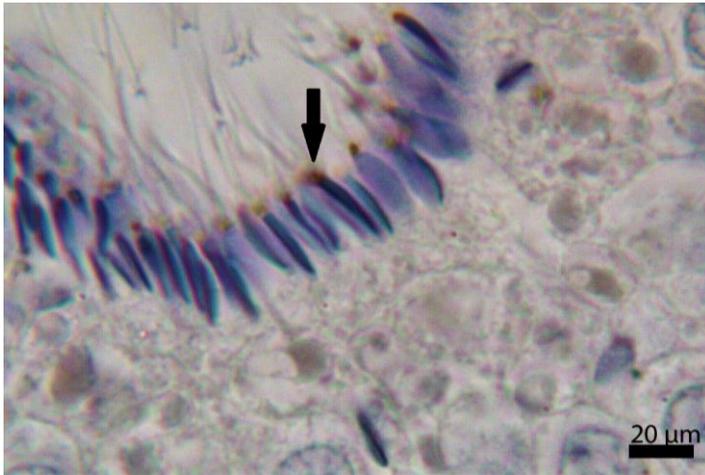


Bild 120: Vergrößerung Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase VIII. Immunhistochemischer Nachweis von Progesteronrezeptoren. SB=20 μm . Es kann eine Immunreaktion am proximalen Ende des Spermiumschwanzes beobachtet werden (Pfeil).

Nicht-geschlechtsreife Kaninchen

Für die in dieser Arbeit untersuchten Hoden von nicht-geschlechtsreifen Kaninchen können keine Progesteronrezeptoren immunhistochemisch nachgewiesen werden.

V. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Morphologie, Glykohistochemie und Immunhistochemie des nicht-geschlechtsreifen (11-12 Wochen) sowie des geschlechtsreifen Kaninchenhodens (7-10 Monate). Neben der Beschreibung der Strukturen des nicht-geschlechtsreifen Hodens wird in dieser Dissertation über die postnatale Entwicklung mittels mikroskopischer Parameter (Messung der Dicke der Hodenkapsel; Messung des Durchmessers der Tubuli seminiferi contorti; Berechnung des Prozentsatzes der Tubuli seminiferi contorti mit begonnener/abgeschlossener Lumenbildung; Berechnung des Prozentsatzes der Tubuli seminiferi contorti mit Spermatozoen) berichtet. Diese Variablen wurden auch von anderen Forschungsgruppen verwendet (Iczkowski et al., 1991; Tsunenari & Kast, 1992; García-Tomás et al., 2009a, b).

1. Diskussion der Ergebnisse der makroskopischen Untersuchungen

Die Hoden des Kaninchens weisen bei einer geringen Breite eine verhältnismäßig große Länge auf und besitzen dadurch eine Torpedo-ähnliche Form. Dies steht in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Koch und Berg (1990), Löhle (2003) sowie Hofheinz (2007). Die Hoden aller geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchen (11 bzw. 12 Wochen) waren schon in die Skrotaltaschen abgestiegen. Dies steht in Einklang mit der Literatur, die in der Frage des Hodendescensus zwar stark divergierende Altersangaben beinhaltet, aber als Obergrenze 12 Wochen angibt (Skinner, 1967; Rajfer, 1982; Laborde et al., 1996; Hatt & Isenbügel, 2001).

2. Diskussion der Ergebnisse der licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die lichtmikroskopische Auswertung wurden die Gewebeproben einer HE-Färbung, einer Trichromfärbung nach Masson-Goldner, einer Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung, einer PAS-Färbung nach McManus, einer Alcianblau-Färbung bei pH 1,0 und pH 2,5 sowie einer Sirius Red-Färbung unterzogen. Dabei diente die HE-Färbung als Übersichtsfärbung. Die Trichromfärbung nach

Masson-Goldner hingegen wurde insbesondere für die Beurteilung des Anteils an kollagenen Fasern herangezogen. Die Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung erlaubte die Beschreibung der Verteilung von elastischen Fasern im Hodenparenchym. Mit der PAS-Färbung nach McManus konnten Kohlenhydrate nachgewiesen werden. Die Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 und pH 1,0 zeigte die Verteilung von karboxylierten bzw. sulfatierten Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen an. Mit der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 konnten auch Mastzellen gut dargestellt werden. So verwendete Enerback (1986) sowie Anton et al. (1998) diese Färbung zum Nachweis von Mastzellen bei verschiedenen Tierarten. Die Sirius Red-Färbung schließlich wurde zur Darstellung von eosinophilen Granulozyten durchgeführt. Die Markierung dieser Zellen beruht auf die Anfärbung des basischen Proteins in ihren Granula (Welsch, 2010). Diese Färbung wurde von verschiedenen Autoren zur Darstellung der eosinophilen Granulozyten bei einer Reihe von Spezies verwendet: so untersuchten Wehrend et al. (2004) mit der Sirius Red-Färbung das Vorkommen von eosinophilen Granulozyten in der Zervix von Rindern, Schafen und Pferden. Auch Huchzermeyer (2003) gelang die Markierung dieser Zellart in der Zervix des Pferdes, ebenso Reibiger und Spanel-Borowski (2000) in den Eierstöcken von Rindern. Die Spezifität der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 und der Sirius Red-Färbung ist nicht ganz gesichert. Huchzermeyer (2003) weist auf die Möglichkeit eines fälschlicherweise als negativ bezeichneten Ausfall der Färbung, wenn es etwa durch die Vorbehandlung zu einer Entleerung der Granula gekommen war. Eine sichere Darstellung der eosinophilen Granulozyten ist immunhistochemisch mit dem Antikörper gegen das „major basic protein“, einer wichtigen Komponente der eosinophilen Granula, möglich. Zum Nachweis der Mastzellen könnte ein Antikörper gegen das „mast cell expressed membrane protein1“ (MCEMP1)(N-Term) verwendet werden. Für die lichtmikroskopische Auswertung wurden sowohl Bouin-als auch Formalin-fixierte Schnitte verwendet. Dabei zeigte sich die Fixierung mit Bouin`scher Lösung gegenüber derjenigen mit in PBS-gepufferten 4%Formalin überlegen: die Strukturen wirkten nach Bouin-Fixierung klarer und es traten weniger Fixationsartefakte auf. Dies berichten auch Latendresse et al. (2002). Für einige Auswertungen, etwa der Histometrie und der Beurteilung der Spermatogenese, wurden deshalb nur Bouin-fixierte Schnitte herangezogen. Dabei muss beachtet werden, dass die Bouin`sche-Lösung ein leichtes Schrumpfen des Hodenparenchyms nach sich ziehen kann (Latendresse et

al., 2002), das bei der Bewertung der Befunde berücksichtigt werden muss. Wie schon aus der HE-Färbung ersichtlich wird, entspricht der Grundaufbau des Kaninchenhodens dem anderer Säuger: die Gonade wird von einer Hodenkapsel umgeben, von der aus bindegewebige Septen in Richtung des Mediastinums testis laufen. Sie unterteilen das Parenchym in meist undeutliche Läppchen. In letzteren finden sich das intertubuläre Kompartiment sowie die Tubuli seminiferi contorti. Letztere gehen kurz vor Übergang in das Mediastinum in die Tubuli recti über. Dieser Übergang wird Terminalsegment genannt. Im Mediastinum münden die Tubuli recti in das Rete testis.

2.1. Hodenkapsel

Die Hoden sämtlicher untersuchter Kaninchen werden von einer dreischichtigen Organkapsel umgeben. Diese Architektur ist konform mit den Ergebnissen anderer Studien über die Hodenkapsel von Säugern (Davis et al., 1970; Langford & Heller, 1973; Leeson & Cookson, 1974; Middendorff et al., 2002). Als äußerste Schicht konnte bei allen untersuchten Kaninchen eine dünne Tunica visceralis identifiziert werden. Dies steht in Übereinstimmung mit der Arbeit von Leeson und Adamson (1962). Ihr schließt sich bei sämtlichen Tieren die Tunica albuginea, eine derbe, straffe, bindegewebige Schicht, an. Sie besteht vor allem aus kollagenen Fasern, wobei auch einige elastische Fasern zu identifizieren sind. Diese Charakterisierung trifft ebenfalls auf die Tunica albuginea des Hundes (Montkowski, 1992), der Katze (Prem, 1992), des Rindes (Abd-Elmaksoud, 2005), des Schweins (Schmidbauer, 2001) des Pferdes (Kuhrau, 1994) und des Menschen (Arenas et al., 1997; Middendorff et al., 2002) zu. Prominentes Element der Tunica albuginea des Kaninchens stellen kontraktile Zellen wie glatte Muskelzellen und Myofibroblasten dar. Ihre Verteilung in zwei senkrecht zueinander stehenden Schichten dürfte eine Besonderheit beim Kaninchen sein, da sie nach meinen Recherchen bei keiner anderen Tierart auftritt. Die Beobachtung von Myofibroblasten und glatten Muskelzellen stimmt überein mit früheren Untersuchungen über die Hodenkapsel von Kaninchen (Holstein, 1967; Davis et al., 1970; Davis & Langford, 1971; Banks et al., 2006; Abd-Elmaksoud, 2009). Während in dieser Arbeit bereits bei nicht-geschlechtsreifen Tieren von 11 bzw. 12 Wochen die charakteristische Anordnung der kontraktilen Zellen verfolgt werden konnte, beobachteten Leeson und Forman (1981) diese erst ab der 18. Lebenswoche. Eventuell liegt die Ursache für diese Divergenz in der Auswahl der

untersuchten Kaninchenrasse: Leeson und Forman (1981) untersuchten Vertreter der mittelgroßen Rasse „Weißer Neuseeländer“, während in dieser Dissertation nicht nur reinrassige Tiere, sondern auch Kreuzungstiere verwendet wurden. Diese fallen laut Löhle (2003) durch Frühreife auf. Aber auch andere Einflussfaktoren der postnatalen Entwicklung wie Lichtverhältnisse, Fütterungsregime, Klima, Geburtszeitpunkt etc. dürfen nicht vernachlässigt werden (Löhle, 2003; García-Tomás et al. 2009a). Das Auftreten von kontraktilen Elementen ist nicht spezifisch für Kaninchen: auch bei der Katze (Leeson & Cookson, 1974; Prem, 1992), beim Hund (Leeson & Cookson, 1974; Montkowski, 1992), bei der Maus (Banks et al., 2006), beim Schwein (Ohanian et al., 1979; Chacon-Arellano & Wooley, 1980; Wrobel, 1990), beim Pferd (Chacon-Arellano & Wooley, 1980; Wrobel, 1990), bei der Ratte (Davis & Langford, 1971; Gorgas & Böck, 1974; Leeson & Cookson, 1974; Banks et al., 2006), beim Schaf (Chacon-Arellano & Wooley, 1980; Wrobel, 1990) sowie beim Menschen (Langford & Heller, 1973; Leeson & Cookson, 1974; Arenas et al., 1997; Middendorff et al., 2002; Banks et al., 2006) wird über das Auftreten von einer variierenden Menge an glatten Muskelzellen und Myofibroblasten berichtet. Als dritte Schicht der Hodenkapsel liegt die Tunica vasculosa direkt den Tubuli seminiferi contorti auf. Diese parenchymale Lage entspricht der des Menschen (Arenas et al., 1997), des Rindes (Abd-Elmaksoud, 2005), des Hundes (Trautmann & Fiebiger, 1949) und des Schafes (Trautmann & Fiebiger, 1949; Banks, 1981). Sie besteht wie auch bei anderen Säugern (Leeson & Cookson, 1974) und beim Menschen (Middendorff et al., 2002) aus lockerem Bindegewebe und führt zahlreiche Blut- und Lymphgefäße. In meiner Arbeit konnten weder in der Hodenkapsel des nicht-geschlechtsreifen noch in der der geschlechtsreifen Kaninchen Mastzellen oder eosinophile Granulozyten identifiziert werden. Dies ist auch beim Schwein und beim Mensch der Fall (Anton et al., 1998). In der Hodenkapsel finden sich sowohl beim nicht-geschlechtsreifen als auch beim geschlechtsreifen Kaninchen unregelmäßig Zellen, die lichtmikroskopisch den Zwischenzellen des Interstitiums in Form und Aussehen gleichen. Dabei handelt es sich um heterotope Leydig-Zellen. Auch beim Hund (Montkowski, 1992), bei der Katze (Wrobel & Hees, 1987; Prem, 1992) und beim Mensch (Middendorff et al., 2002) liegen neben den orthotopen Leydig-Zellen im interstitiellen Raum auch ektopische Leydig-Zellen in der Hodenkapsel. Beim Rind hingegen konnte Abd-Elmaksoud (2005) keine heterotopen Leydig-Zellen beobachten. Bei ektopischen

Leydig-Zellen handelt es sich laut Wrobel und Hees (1987) entweder um ausgewanderte Zellen, die nicht mittels Desmosomen oder Nexus verbunden sind, oder um die Reste einer aus der pränatalen Entwicklung. Jun et al. (2008) erwähnen ebenfalls die Möglichkeit einer in situ-Differenzierung. Dabei könnten aus undifferenzierten Zellen durch hormonelle Stimulierung eine Differenzierung zu Leydig-Zellen eingeleitet werden. Die Funktion der heterotopen Leydig-Zellen ist nicht hinreichend geklärt, dürfte aber wie die der orthotopen Zwischenzellen in der Produktion von Androgenen liegen. Wrobel und Hees (1987) jedoch sprechen den Leydig-Zellen in der Hodenkapsel keine besonderen Aufgaben zu. Middendorff et al. (2002) mutmaßen hingegen, dass das in den heterotopen Leydig-Zellen hergestellte Hormon Testosteron die Differenzierung der kontraktile myoiden Zellen fördert. Paranko und Pelliniemi (1992) vermuten diesen Effekt auch im fetalen Rattenhoden. Ein Unterschied zwischen den untersuchten nicht-geschlechtsreifen und geschlechtsreifen Tieren in der Häufigkeit oder Morphologie der ektopischen Leydig-Zellen konnte nicht festgestellt werden. Interessant wäre es zu untersuchen, ab welchem Zeitpunkt heterotope Leydig-Zellen im fetalen/postnatalen Hoden des Kaninchens auftreten. In einer weiterführenden Arbeit könnten zudem Enzyme oder Hormone, die für Leydig-Zellen typisch sind, untersucht werden. Middendorff et al. (2002) setzten hierfür Antikörper gegen Cytochrom P450 und Testosteron ein und erreichten sowohl für heterotope als auch für orthotope Leydig-Zellen ein positives Ergebnis. Jun et al. (2008) benutzten in einer immunhistochemischen Untersuchung unter anderem Antikörper gegen Calretinin und Inhibin. Hier reagierten sowohl Leydig-Zellen des Interstitiums als auch heterotope Leydig-Zellen positiv. Zum anderen könnten weiterführende elektronenmikroskopische Untersuchungen Aufschluss über die Ultrastruktur der heterotopen Leydig-Zellen geben. Aufgrund der Markierung der Hodenkapsel durch die PAS-Färbung nach McManus kann davon ausgegangen werden, dass diese unter anderem aus Glykoproteine besteht. Durch die Markierung mit Alcianblau bei pH 2,5 und einer ausbleibenden Färbung bei pH 1,0 kann geschlossen werden, dass die Hodenkapsel auch karboxylierte Glykosaminoglykane und Proteoglykane als Bestandteile der Grundsubstanz der extrazellulären Matrix enthält (Welsch, 2010). Vergleicht man den Aufbau der Hodenkapsel beim geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchen, so unterscheiden sich die beiden Gruppen nur in einem Punkt: die geschlechtsreifen Tiere weisen mit $197,40 \mu\text{m}$ ($s \pm 10,00$) eine

signifikant dickere Organkapsel auf als die nicht-geschlechtsreifen Tiere mit 150,90 μm (s+16,36). Wünschenswert wäre eine Arbeit über die Entwicklung der Hodenkapsel von der 12. Woche bis zur 52. Woche, also über den hier untersuchten Zeitraum hinaus, sowie eine genaue Untersuchung, welche Schicht wann an Dicke zunimmt. Aufgrund ihres hohen Anteils an kollagenen Fasern verfügt die Hodenkapsel nur über eine geringe Dehnbarkeit und übt dadurch einen Druck auf das darunterliegende Parenchym aus. Dieser Hodenbinnendruck soll laut Sajonski und Smollich (1972) sowie Smollich und Michael (1992) wichtig für den ungestörten Ablauf der Spermatogenese sowie für den Transport der Spermien vom Hoden über die intratestikulären Wege in den Nebenhoden sein. Trotz der kollagenen Fasern stellt die Hodenkapsel dennoch keine starre Hülle dar (Leeson & Forman, 1981): bei einigen Tierarten, unter anderem dem Kaninchen, konnten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Kontraktionen der Hodenkapsel beobachtet werden (Hamster: Ellis et al., 1978; Kaninchen: Holstein, 1967; Holstein & Weiss, 1967; Davis & Langford, 1971; Michell & Seeley, 1977; Ellis et al., 1978; Nemetallah et al., 1983; Banks et al., 2006; Maus: Ellis et al., 1978; Banks et al., 2006; Mensch: Banks et al., 2006; Ratte: Ellis et al., 1978; Banks et al., 2006; Schwein: Ohanian et al., 1979). Neben adulten Tieren können diese auch schon nicht-geschlechtsreifen Kaninchen zeigen, wenngleich auch die Amplituden der Kontraktionen im zunehmenden Alter ansteigen (Mitchell & Seeley, 1977). Holstein (1967), Holstein und Weiss (1967), Davis und Langford (1971), Langford und Heller (1973), Gorgas und Böck (1974), Leeson und Cookson (1974), Middendorff et al. (2002) sowie Banks et al., (2006) schlagen vor, dass auf diese Weise die immotilen Spermien in den Nebenhoden befördert werden. Auch könnte der durch die Kontraktionen erhöhte Hodenbinnendruck für den Transport von Flüssigkeiten in bzw. aus Kapillaren (Setchell, 1978) sowie den Lymph- und Blutfluss verantwortlich sein (Davis & Langford, 1971; Langford & Heller, 1973; Middendorff et al., 2002). Die Bedeutung der glatten Muskulatur für den Spermientransport wird jedoch kontrovers diskutiert (Chacon-Arellano & Woolley, 1980), schließlich weisen bereits nicht-geschlechtsreifen Tiere ohne Spermatogenese Kontraktionen der Hodenkapsel auf (Mitchell & Seeley, 1977). Allerdings könnten meines Erachtens die Aufgaben je nach Alter variieren oder eine unterschiedliche Gewichtung erhalten. Der durch Kontraktion der Hodenkapsel indirekt modifizierte Blut- und Lymphfluss ist sowohl für geschlechtsreife wie auch für nicht-geschlechtsreife Tiere wichtig. Ab dem

Beginn der Pubertät und der Differenzierung der Keimzellen könnte die Bedeutung der Kontraktionen der Hodenkapsel für den Beginn und Aufrechterhaltung der Spermatogenese zunehmen. Eventuell kommt mit Vollendung der Spermiogenese sowie der Spermiation den kontraktilen Zellen zusätzlich eine Aufgabe im Transport der Spermien zu.

2.2. Septulae testis und Lobuli testis

Die Septulae testis der Kaninchen, die sich größtenteils aus kollagenen Fasern und einigen elastischen Fasern zusammensetzen, treten nur an wenigen Stellen deutlich hervor. In der Regel sind sie dünn, was der Beschreibung von Davis et al. (1970) entspricht. Auch die Septen des Rindes (Dellman & Wrobel, 1987; Abdelmaksoud, 2005), der Katze (Dellmann & Wrobel, 1987; Prem, 1992) und des Pferdes (Kuhrau, 1994) werden als unauffällig bzw. inkomplett beschrieben (Dellmann & Wrobel, 1987). Die Septen des Kaninchens unterteilen das Hodenparenchym nur äußerst selten in deutliche Läppchen, wie es etwa beim Schwein (Dellmann & Wrobel, 1987; Schmidbauer, 2001) oder dem Hund (Montkowski, 1992) regelmäßig der Fall ist. Ein Unterschied zwischen geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchen, etwa bezüglich der Dicke oder der Komplettheit der Septen, konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Bei der PAS-Färbung nach McManus wurden die Septen deutlich dargestellt. Sie enthalten daher reichlich Kohlenhydrate. Die Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 und pH 1,0 ergab lediglich bei einem pH-Wert von 2,5 eine Blaufärbung der Septen. Somit sind diese unter anderem aus karboxylierten Glykosaminoglykanen aufgebaut.

2.3. Tubuli seminiferi contorti

Wie auch bei allen bisher untersuchten Haussäugetieren (Wrobel, 1990), lassen sich am Samenkanälchen aller untersuchten Kaninchen das Keimepithel und die Lamina propria unterscheiden. Die gewundenen Hodenkanälchen der geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchen dieser Arbeit divergieren in folgenden drei Punkten:

- Während alle Tubuli seminiferi contorti sämtlicher geschlechtsreifer Kaninchen eine ungestörte Spermatogenese zeigen, weisen die der nicht-geschlechtsreifen Kaninchen einen unterschiedlichen Entwicklungsgrad ihrer Keimzellen auf (siehe V.2.3.2.2).

- Die Tubuli seminiferi contorti der geschlechtsreifen Kaninchen besitzen mit $200,76 \mu\text{m}$ ($s\pm 7,27$) einen signifikant größeren Durchmesser als die der nicht-geschlechtsreifen Kaninchen mit durchschnittlich $110,81 \mu\text{m}$ ($s\pm 14,90$).

Wie in dieser Dissertation, so nutzten auch Iczkowski et al. (1991), Tsunenari und Kast (1992) sowie García-Tomás et al. (2009a, b), den Durchmesser der gewundenen Hodenkanälchen als mikroskopischen Parameter zur Beurteilung der Hodenentwicklung beim Kaninchen. Nach Untersuchungen von Iczkowski et al. (1991) nimmt beim Kaninchen der Rasse „Weißer Neuseeländer“ der Durchmesser der Tubuli seminiferi contorti mit Beginn der Spermatogenese ab der 7. Lebenswoche zu. García-Tomás et al. (2009b) verzeichneten bei den Fleischrassen „Caldo“ und „Prat“ einen starken Anstieg der Durchmesser der Tubuli seminiferi contorti zwischen der 8. und 14. Lebenswoche. Laut Tsunenari und Kast (1992) nimmt das Kaliber der gewundenen Hodenkanälchen bei Kaninchen der Rasse „Himalaya“ in der 12. und 13. Lebenswoche beträchtlich zu. García-Tomás et al. (2009a) stellten ferner eine moderate, positive Korrelation zwischen dem Durchmesser der Tubuli seminiferi contorti und der Prozentzahl der Tubuli mit elongierten Spermatozoen fest. Eine solche Berechnung wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt, so dass diesbezüglich keine Aussage getroffen werden kann. Beim „Himalaya“ Kaninchen registrierten Tsunenari und Kast (1992) eine Zunahme des Durchmessers der gewundenen Hodenkanälchen bis zur 104. Lebenswoche (2 Jahre). Wenn dies bei allen Kaninchenrassen zutrifft, würde das bedeuten, dass die hier untersuchten geschlechtsreifen Tiere (7-10 Monate) noch nicht ihre endgültige Tubulidurchmesser erreicht haben. Interessant wäre deshalb eine Studie mit älteren Kaninchen von etwa 3 Jahren. Wie aus den Ergebnissen der nicht-geschlechtsreifen Tiere ersichtlich wird, unterscheiden sich die nicht-geschlechtsreifen Kaninchen stark in den Durchmessern ihrer gewundenen Hodenkanälchen. Dieser unterschiedliche Entwicklungsstand passt zu den Ergebnissen früherer Arbeiten. So betonen Frame et al. (1994) die deutlichen individuellen Unterschiede in der Entwicklung von Kaninchen: selbst Tiere gleicher Rasse, gleichen Alters sowie gleicher Haltungsbedingungen weisen starke Schwankungen bezüglich ihrer Reife auf. Bei meinen Untersuchungen stammten alle nicht-geschlechtsreifen Tiere von einem Züchter, dennoch konnte nicht sichergestellt werden, ob alle Kaninchen unter denselben Bedingungen gehalten wurden. Ferner handelt es sich bei den von mir untersuchten Tieren um

unterschiedliche Rassen: einige waren reinrassig, einige hingegen Hybridkaninchen, die laut Löhle (2003) früher reif werden. Darüber hinaus schwankt das Alter zwischen 11 und 12 Wochen. Aufgrund nicht auszuschließender Haltungsunterschiede, unterschiedlicher Rasse, eines Altersunterschieds von ca. 7 Tagen sowie individuellen Schwankungen, ist ein etwas unterschiedlicher Entwicklungsgrad der Hoden bei den untersuchten nicht-geschlechtsreifen Kaninchen nicht überraschend.

- Geschlechtsreife Kaninchen weisen in sämtlichen Tubuli seminiferi contorti ein zentrales Lumen auf. Nicht-geschlechtsreifen Kaninchen im Alter von 11 bzw. 12 Wochen hingegen besitzen je nach Tier nur wenige, viele oder teilweise auch sehr viele kanalisierte gewundene Hodenkanälchen.

Die Beobachtung von Samenkanälchen ohne Lumen im nicht-geschlechtsreifen Kaninchenhoden stimmt mit den Berichten von Gondos et al. (1973) über die postnatale Entwicklung beim Kaninchen überein. Auch die Lumenbildung des Menschen (von Herrath & Abramow, 1965) und der Haussäugetiere (Rüsse, 1998; Schnorr & Kressin, 2001) findet erst während der Pubertät statt (Wrobel et al., 1986). Der Stand der Kanalisierung in den hier untersuchten Hoden nicht-geschlechtsreifer Tiere wird mit den Prozentsätzen „Tubuli ohne/mit begonnener/mit abgeschlossener Lumenbildung“ angegeben. Die Berechnung der Anzahl der kanalisierten Kanäle wurde auch in den Arbeiten von García-Tomás et al. (2009a, b) als Parameter zur Angabe der Hodenentwicklung angewendet. Ferner werden kanalisierte Tubuli seminiferi contorti als Indikator für den Beginn der Pubertät angesehen (García-Tomás et al., 2009b). Bei allen lichtmikroskopisch untersuchten nicht-geschlechtsreifen Tieren hat die Lumenbildung begonnen. Allerdings ist sie unterschiedlich weit fortgeschritten, wie an den folgenden Beispielen zu sehen ist: bei einem Tier besitzen bereits 86% der untersuchten Tubuli seminiferi contorti einen vollständig ausgebildeten Kanal. Bei einem anderen Kaninchen hingegen sind erst 9,6% der untersuchten Hodenkanälchen mit einem zentralen Lumen versehen. Dennoch kann insgesamt die postnatale Hodenentwicklung als fortgeschritten angesehen werden: 7 von 10 Tiere haben in 60% bereits deutlich zentrale Kanäle aufzuweisen. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Keimzellbildung und der Kanalisierung der Samenkanälchen im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens erscheint möglich, muss aber noch genauer untersucht werden: einige Tubuli seminiferi contorti weisen einen

deutlichen Kanal, aber keine Keimzellen mit fortgeschrittener Meiose auf, während manche Hodenkanälchen über Keimzellen im pachytänen Stadium, aber über kein Lumen verfügen. Eine offensichtliche Korrelation zwischen der Lumenbildung und der Meiose kann also in dieser Arbeit nicht gefunden werden. Andererseits können elongierte Spermatiden ausschließlich in Tubuli seminiferi contorti mit abgeschlossener Lumenbildung beobachtet werden, so dass eventuell die Kanalisierung mit der Spermiogenese im Zusammenhang steht. Ferner kann kein bestimmtes Entwicklungsschema in Bezug auf die Lage der Tubuli seminiferi contorti festgestellt werden: die Hodenkanälchen in der Nähe des Rete testis sind nicht früher oder später kanalisiert als die unter der Hodenkapsel. Auch liegen Tubuli seminiferi contorti mit unterschiedlichem Entwicklungsstand direkt nebeneinander. Insgesamt vier Arbeiten geben bisher Einblick in den Beginn der Lumenbildung beim Kaninchen: Hayashi et al. (2002), die mit der mittelgroßen Rasse „Weiße Japaner“ arbeiten, fanden erste Anzeichen der Lumenbildung 79 Tage p.c. Am 100. Tag p.c. ist sie in allen Tubuli seminiferi contorti abgeschlossen. In der Arbeit von Gondos et al. (1973) mit „Weißen Neuseeländern“ setzte die Lumenbildung ab Ende der 12. Lebenswoche, zeitgleich mit dem Erscheinen der ersten Spermatiden, ein. In der vorliegenden Arbeit tritt die Lumenbildung unabhängig vom Erscheinen der ersten Spermatiden auf. Auch bei Tieren ohne einen einzigen Tubulus seminifer contortus mit Eintritt in die Spermiogenese sind einige der gewundenen Samenkanälchen bereits kanalisiert. Iczkowski et al. (1991), die wie Gondos et al. (1973) mit „Weißen Neuseeländern“ arbeiten, geben als Beginn der Lumenbildung hingegen bereits die 8. bis 9. Lebenswoche an. García-Tomás et al. (2009b), welche die Fleischrassen „Caldes“ und „Prat“ untersuchten, setzen für den Beginn der Kanalisierung die 8. bis 14. Lebenswoche fest. Dabei scheint der Verlauf der Entwicklung rasseabhängig zu sein: während bei den „Caldes“ eine allmähliche Zunahme der Kanalisierung der Tubuli seminiferi contorti zu verzeichnen war, wird diese von García-Tomás et al. (2009b) bei den „Prat“ als sprunghaft beschrieben. Der genaue Verlauf der Kanalisierung der Samenkanälchen war bisher nur selten Thema einer Arbeit. Sinowatz et al. (1983) sehen bei der Lumenbildung in den Tubuli seminiferi contorti des Rindes eine wichtige Rolle für die sog. zentralen Stützzellen (siehe auch V.2.3.2.1.). Durch Vakuolisierung der apikalen Abschnitte der sog. basalen Stützzellen verlieren die zentralen Stützzellen den Kontakt zu den basalen Stützzellen und werden über die

ableitenden Samenwege abtransportiert. Da die Trennung zwischen basalen und zentralen Stützzellen nur von artifizielle Natur zu sein scheint (Sinowatz & Amselgruber, 1986), schlagen die beiden Autoren vor, dass mehrere, unterschiedlich große Vakuolen in den Zytoplasmen der Stützzellen sich zu einer einzigen vereinigen und anschließend mit der apikalen Zellmembran fusionieren, um einen gemeinsamen zentralen Kanal zu formen. Diese Vakuolisierung könnte in dem in dieser Arbeit genannten Stadium „Lumenbildung begonnen“ entsprechen.

2.3.1. Lamina propria

Die Lamina propria besteht bei sämtlichen untersuchten Kaninchen aus vier aufeinanderfolgenden Schichten (innere azelluläre; innere zelluläre; äußere azelluläre, äußere zelluläre Lage). Bei allen Tieren kann eine dem Keimepithel anliegende Lamina basalis sowie kollagene und einige elastische Fasern identifiziert werden. Ähnlich wie auch beim Rind (Wrobel et al., 1979) und beim Menschen (Bustos-Obregón & Holstein, 1973; De Kretser et al., 1975) entlässt diese innere azelluläre Schicht knopfförmige Gebilde in das Keimepithel des Kaninchens. Elastische Fasern sind auch an dieser Stelle bei der Maus (Brissie et al., 1975), beim Rind (Wrobel et al., 1979) und beim Primaten (Hermo et al., 1977) zu finden. Als innere zelluläre Schicht folgen beim Kaninchen myoide Zellen. Diese konnten bei Säugern (Wrobel et al., 1979; Maekawa et al., 1996), bei Reptilien (Wrobel et al., 1979) sowie bei Vögeln (Wrobel et al., 1979; Christl, 1990) beobachtet werden. Allerdings variiert deren Organisation. Die untersuchten Kaninchen weisen eine einzige Schicht myoider Zellen auf. Dies ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen an Kaninchen durch Leeson und Forman (1981) sowie Christl (1990). Auch das Chinchilla (Fawcett et al., 1969), die Ratte (Clermont, 1958; Lacy & Rotblat, 1963; Leeson & Leeson, 1963; Maekawa et al., 1996), die Maus (Ross, 1967; Maekawa et al., 1996), der Hund (Christl, 1990), die Katze (Christl, 1990), der Hamster (McCord, 1970; Maekawa et al., 1996) und das Meerschweinchen (Fawcett et al., 1969) verfügen in der Lamina propria der Hodenkanälchen über eine einzige Lage dieser Zellart. Es schließt sich eine Lage kollagener Fasern (äußere azelluläre Schicht) an, die an die äußere zelluläre Schicht aus Fibroblasten grenzt. Der geschilderte Aufbau der Lamina propria der untersuchten Kaninchen wird so auch in den bisher veröffentlichten Artikeln (Crabo, 1963; Leeson & Forman, 1981; Christl, 1990)

über die Tunica propria des Kaninchens beschrieben. Der oben geschilderte Grundaufbau der Lamina propria findet sich bei allen der bisher untersuchten Säuger wieder (Wrobel et al., 1979; Christl, 1990). Die in dieser Arbeit untersuchten geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchen weisen keinen Unterschied im Aufbau ihrer Lamina propria auf. In einer Arbeit von Leeson und Forman (1981), die bereits bei der Diskussion der Hodenkapsel besprochen wurde, konnte eine „strukturelle Reife“ des peritubulären Gewebes jedoch erst ab dem 112. Tag, also ab der 16. Lebenswoche, nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für diesen Entwicklungsunterschied wird im Abschnitt V.2.1. gegeben. Im Lichtmikroskop erschienen die azelluläre Schichten der Lamina propria bei der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 moderat blau gefärbt. Dies ist wahrscheinlich auf sulfatierte und/oder karboxylierte Glykosaminoglykane und Glykoproteine der inneren und äußeren azelluläre Schicht zurückzuführen. Bei einer Alcianblau-Färbung bei pH 1,0 trat eine noch schwache Färbung auf. Hier sind nur noch die sulfatierten Glykosaminoglykane angefärbt. Aus den beiden Färbungen Alcianblau bei pH 1,0 sowie bei 2,5 lässt sich somit schließen, dass mäßig viel sulfatierten und karboxylierten Glykosaminoglykane oder Glykoproteine vorliegen, aber letztere mengenmäßig überlegen sind. Bei der PAS-Färbung nach McManus war die innere und äußere azelluläre Schicht deutlich violett gefärbt. Eine vorangehende Inkubation mit Amylase schwächte diese Reaktion nicht ab. Diese beiden Lagen enthalten somit eine größere Menge an Glykoproteinen.

2.3.2. Keimepithel

2.3.2.1. Primitive Stützzellen und Sertoli-Zellen

Die licht- und elektronenmikroskopischen Beobachtungen meiner Arbeit an der adulten Sertoli-Zelle decken sich mit den bisherigen Erkenntnissen über die adulte Ammenzelle des Kaninchens (Osman, 1979; Chrenek et al., 2009). Diese stellt eine hochprismatische Zelle dar, deren Zytoplasmaausläufer zwischen die Keimzellen aller Generationen ziehen. Der große, euchromatinreiche Zellkern, der von unterschiedlicher Form sein kann, besitzt eine deutlich erkennbare Kernmembran sowie in der Regel einen ausgeprägten runden Nukleolus. Als Zellorganellen finden sich, neben dem Golgi-Apparat und Mitochondrien, glattes und verhältnismäßig wenig raues ER, Lysosomen, Glykogen sowie Lipidtropfen.

Als Haftstrukturen sind zwischen benachbarte Sertoli-Zellen „desmosome like junctions“ sowie „tight junctions“ (Zonulae occludentes) ausgebildet. Bei letztgenannter Haftstruktur handelt es sich um den wichtigsten Part der Blut-Hoden-Schranke. Die Gestalt und die Zellorganellen der Ammenzelle des geschlechtsreifen Kaninchens gleichen im Wesentlichen der anderer Säugetiere (Schwein: Schmidbauer, 2001; Hund: Montkowski, 1992; Katze: Prem, 1992) sowie des Menschen (Nagano, 1966; Bloom & Fawcett, 1986; Welsch, 2010), wenngleich auch mengenmäßige Unterschiede bestehen. So verfügt das Rind (Wrobel & Sinowatz, 1982; Abd-Elmaksoud, 2005), das Schwein (Liebich, 1993) und der Mensch (Junqueira & Carneiro, 1984) im Gegensatz zum Kaninchen über einen relativ hohen Anteil an rauem ER. Eine Unterteilung in helle und dunkle Sertoli-Zellen, wie sie Vilar (1970) vorgenommen hat, konnte in meiner Arbeit nicht gezogen werden. Dies gelang auch anderen Studien nicht (Nistal et al., 1982) und dürfte wahrscheinlich auf eine unzureichende Fixierung beruhen. Betrachtet man lichtmikroskopisch die Stützzelle des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens, so füllen die Ammenzellen im Tubulus seminifer contortus ohne Lumen diesen vollständig aus und umgeben dabei die Keimzellen. In gewundenen Hodenkanälchen mit ersten Anzeichen einer Lumenbildung zeigt das Zytoplasma der Stützzellen eine bis mehrere Vakuolen. In Tubuli seminiferi contorti mit bereits abgeschlossener Lumenbildung decken sich die Ergebnisse beim nicht-geschlechtsreifen Tier mit jenen beim geschlechtsreifen Tier. Abdel-Raouf (1960) sowie Sinowatz et al. (1983) berichten über basale und zentrale primitive Stützzellen, wobei letztere einen im Tubulus seminiferus contortus zentral gelegenen Kern aufweisen. Sinowatz und Amselgruber (1986) schränken dies insofern ein, als sie in ultrastrukturellen Untersuchungen keine morphologischen Unterschiede feststellen konnten und die Zellen sich nur bezüglich der Lage des Kerns unterschieden. Daher sehen sie keinen Grund, diese artifizielle Unterscheidung beizubehalten. In dieser Arbeit sind zentral gelegene Kerne nicht regelmäßig zu beobachten. Die Nuklei der hier beobachteten Stützzellen liegen zumeist im basalen Teil des Keimepithels und nur einzelne Kerne können manchmal im mittleren oder inneren Drittel des Keimepithels ausgemacht werden. Auch ordnen sich die Kerne nicht rosettenförmig an, wie von Sinowatz et al. (1983) für das Kalb beschrieben. Es scheint also auch beim Kaninchen nicht sinnvoll zu sein, zwischen basalen und zentralen Stützzellen zu unterscheiden. In der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Stützzellen der nicht-

geschlechtsreifen Tiere konnten keine Unterschiede, wie etwa in der Ausstattung mit Zellorganellen, zu den adulten Sertoli-Zellen des geschlechtsreifen Kaninchens gefunden werden. Diese Ergebnis mag auf dem ersten Blick überraschen, da Untersuchungen zur postnatalen Hodenentwicklung anderer Tierarten belegen, dass sich die primitiven Stützzellen des nicht-geschlechtsreifen Tieres von den adulten Sertoli-Zellen der geschlechtsreifen Tiere unter anderem in ihrer ultrastrukturellen Morphologie unterscheiden (Ramos & Dym, 1979; Nistal et al., 1982; Sinowatz & Amselgruber, 1986; Petersen & Söder, 2006). Es kommen zwei mögliche Ursachen in Frage: entweder unterscheiden sich bei der Tierart Kaninchen die primitiven Stützzellen ultrastrukturell nicht von den adulten Sertoli-Zellen oder aber die Entwicklung der untersuchten Kaninchen ist zu weit fortgeschritten und die Differenzierung der primitiven Stützzelle zur adulten Sertoli-Zelle hatte somit bereits stattgefunden. Für das Kaninchen liegt nur eine einzige Beschreibung für die Ammenzelle der nicht-geschlechtsreifer „Weißer Neuseeländer“ von der Geburt bis zum 5. Lebensmonat vor (Gondos et al., 1973), allerdings bietet sie keine Anhaltspunkte für mögliche Unterschiede der Ammenzellen des geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Eine Differenzierung der Stützzelle zur adulten Sertoli-Zelle wird nicht erwähnt und damit auch kein Vergleich zwischen den beiden Zellen angestellt (Gondos et al., 1973). Für die zweite Möglichkeit, nämlich dass die Differenzierung bei den von mir untersuchten Kaninchen bereits abgeschlossen ist, spricht, dass die elektronenmikroskopisch untersuchten Tiere in ihrer Lumenbildung sowie in ihrer Spermio-genese weit fortgeschritten sind, wenngleich auch keine fertig ausdifferenzierten Spermien vorhanden sind. Beim Kalb wurden schon an primitiven Stützzellen, die in Tubuli ohne Lumina liegen, erste Veränderungen beobachtet. In kanalisierten Tubuli mit elongierten Spermatozoen konnten bereits adulte Sertoli-Zellen identifiziert werden (Sinowatz & Amselgruber, 1986). Dieser Entwicklungsstand entspricht dem der hier mit dem Elektronenmikroskop untersuchten nicht-geschlechtsreifen Kaninchen, so dass höchstwahrscheinlich bei den von mir untersuchten Tieren tatsächlich bereits eine Differenzierung der primitiven Stützzelle stattgefunden hat. In einer weiteren Arbeit könnten daher Kaninchen unter 10 Wochen ultrastrukturell untersucht werden, so dass eine Beschreibung der primitiven Stützzellen und eine eventuelle Unterscheidung zu adulten Sertoli-Zellen erstellt werden könnte. Diese elektronenmikroskopischen Untersuchungen sollten durch biochemische ergänzt werden, da sich primitive

Stütz- und Sertoli-Zellen nicht nur ultrastrukturell, sondern auch in ihrer biochemischen Aktivität unterscheiden (Petersen & Söder, 2006). Das Vorhandensein einer Blut-Hoden-Schranke durch „tight junctions“ (Zonulae occludentes) der Ammenzellen der nicht-geschlechtsreifen Kaninchen im Alter von 11 bzw. 12 Wochen entspricht den Ergebnissen bisheriger Arbeiten. So fanden Sun und Gondos (1986) in der 10. Lebenswoche eine Blut-Hoden-Schranke in den Hoden von „Weißen Neuseeländern“. Connel und Gondos (1976, nicht veröffentlicht, zitiert nach Gondos & Connell, 1978) beschreiben ab der 8. Lebenswoche sind bei Vertretern der „Weißen Neuseeländer“ „tight junctions“.

2.3.2.2. Keimzellen und Keimepithelzyklus

Im Keimepithel aller geschlechtsreifen Kaninchen konnte die Bildung von Spermien, ausgehend von Spermatogonien über primäre und sekundäre Spermatozyten sowie runden und elongierten Spermatiden, beobachtet werden. Eine Differenzierung der Keimzellen erfolgte in dieser Arbeit anhand der Kernmorphologie, der Lage der Zelle sowie der Zellausstattung mit Organellen anhand von Ultradünnschnitten sowie Paraffinschnitten, wobei bei letzteren besonders die PAS-Färbung nach McManus geeignet war. Beim Kaninchen werden A-, In- und B-Spermatogonien unterschieden. Sie gehen jeweils durch Mitosen aus ihren Vorgängerzellen hervor. Die Spermatogonien der Kaninchen variieren, ähnlich wie bei anderen Haussäugetieren (Liebich, 1993), in ihrer Lage zur Lamina propria sowie in der Größe und Struktur ihres Kerns. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Arbeiten über Keimzellen beim Kaninchen von Swierstra und Foote (1963) sowie Nicander und Plöen (1969). Auch bei Entwicklung der Keimzellen beim Rind (Wrobel et al., 1995a), bei der Ratte (Leblond & Clermont, 1952), bei der Maus (Abou-Haila & Tulsiani, 2000), beim Schwein, bei der Katze und beim Hund (Ibach et al., 1976) können diese drei Arten von Spermatogonien differenziert werden. Das Produkt der B-Spermatogonien, die präleptototäne primäre Spermatozyte, wird bei den beobachteten Kaninchen einer ersten Reifeteilung (Reduktionsteilung) unterzogen. Diese kann beim Kaninchen, wie bei allen Säugetieren, in mehrere Stadien eingeteilt werden, nämlich in Pro-, Meta-, Ana- und Telophase. Die Prophase wiederum kann, wie auch für den Menschen (Welsch, 2010) und für Haussäugetiere (Liebich, 1993) beschrieben, in Leptotän, Pachytän, Zygotän, Diplotän und Diakinese unterteilt werden. Das Produkt der ersten Reifeteilung,

die sekundäre Spermatozyte, wird schnell einer zweiten Reifeteilung (Äquationsteilung) unterzogen, so dass hieraus die runden Spermatiden resultieren. Diese wiederum stellen den Anfangspunkt der Spermiogenese dar, einem Prozess, während dem in vier Phasen (Golgi-, Kappen-, Akrosom- und Reifungsphase) Transformationsprozesse stattfinden (Leblond & Clermont, 1952; Clermont & Leblond, 1955). Endprodukt der gesamten Spermatogenese stellen die Spermien dar, die im Rahmen der Spermiation in das Lumen des Tubulus seminiferus contortus abgegeben und über den Tubulus rectus zum Rete testis transportiert werden. Dies wird auch für andere Haussäugetiere beschrieben (Liebich, 1993). Bei allen adulten Kaninchen dieser Arbeit konnten degenerierte Keimzellen beobachtet werden, wenngleich auch in geringerem Maße als bei den nicht-geschlechtsreifen Tieren. Dies ist nicht außergewöhnlich, da laut Wrobel (1990) 20% bis 60% der entstanden Spermatogonien im Verlauf der Spermatogenese zugrunde gehen. Swierstra & Foote (1963) geben für das Kaninchen 24% Verlust an Keimzellen bis zur Spermiogenese an. Das Keimepithel jeder Tierart, auch das der Kaninchen, weist Zellassoziationen auf, die sich an ein- und derselben Stelle jedes Tubulus seminifer contortus regelmäßig wiederholen (Cole & Cupps, 1977). Dadurch kann das Erscheinungsbild des Keimepithels in charakteristische Phasen unterteilt werden, die zum Keimepithelzyklus zusammengefasst werden. Prinzipiell können mehrere Klassifikationssysteme unterschieden werden, unter anderem die von Roosen-Runge und Giesel (1950) sowie von Ortavant (1959; zitiert nach Ortavant et al., 1969) beschriebene und auch hier verwendete Einteilung. Dabei werden die verschiedenen Phasen der Meiose, die Form bzw. Veränderung der Spermatidenkerne, die Lage der Spermatiden sowie die Spermiation berücksichtigt. Auf diese Weise können beim adulten Kaninchen acht Phasen unterschieden werden. In den Phasen I bis IV können zwei Generationen von Spermatozyten gefunden werden, während nur eine Generation von Spermatiden vorhanden ist. In den Phasen V bis VIII hingegen ist nur eine Generation von Spermatozyten zu beobachten, während zwei Generationen von Spermatiden im Keimepithel liegen. Der Keimepithelzyklus endet in der Phase VIII mit der Spermiation der Spermien. Dieses Klassifikationssystem verwendeten Swierstra und Foote (1963) sowie Steger et al. (2005) in ihrer Arbeit mit dem adulten Kaninchen. Auch beim Hund (Foote et al., 1972), der Katze, dem Schwein (Swierstra, 1968), dem Schaf, dem Pferd (Swierstra et al., 1974), der Ziege

(Onyango et al., 2000) und dem Rind (Wrobel & Schimmel, 1989) hat sich dieses System bewährt. Hier in dieser Arbeit können die Phasen V, VI und VII aufgrund nur minimaler Veränderungen zu den Phasen V-VII zusammengefasst werden. Dies wird auch in Studien mit der Ziege (Onyango et al., 2000) oder mit dem Rind (Wrobel & Schimmel, 1989) praktiziert. Beim Menschen und bei einigen Primaten sind an einem Tubulusquerschnitt verschiedene Stadien des Keimepithelzyklus zu sehen (Clermont, 1963), während bei den hier untersuchten geschlechtsreifen Kaninchen, wie auch bei den anderen Haussäugetieren (Ortavant et al., 1969), der gesamte Tubulusquerschnitt nur eine einzige Phase aufweist. Wie eine Varianzanalyse zeigte, ergeben sich beim adulten Kaninchen keine signifikanten Unterschiede in der Höhe des Keimepithelzykluses abhängig von der Phase des Keimepithelzykluses. Dies trifft auch für das Rind (Wrobel & Schimmel, 1989) und dem Pferd (Swierstra et al., 1974) zu, nicht jedoch für die Ratte (Roosen-Runge, 1955). Alle Keimzellen dieser Arbeit, außer den Stammspermatogonien, stehen bis zur Spermiation über Interzellularbrücken in Verbindung. Dies wird auch von Burgos und Fawcett, (1955), Fawcett (1961), Dym und Fawcett (1971) sowie Connel (1984) geschildert. Die Zytoplasmabrücken sollen eine synchrone Entwicklung sichern (Fawcett et al., 1959; Hermo et al., 2010), die haploiden Keimzellen mit den Produkten eines diploiden Genoms versorgen sowie sicherstellen, dass Keimzellen mit einem Y-Chromosom, denen wichtige Gene des X-Chromosoms fehlen, zu Spermien reifen können (Rüsse & Sinowatz, 1998). Als Kontaktstrukturen zwischen Spermatischen und Sertoli-Zellen sind „apical ectoplasmic specializations“ zu erwähnen. Diese werden auch von Russell (1977), Kopera et al. (2010) sowie Lie et al. (2010) beschrieben. Sie sind nur im Hoden ausgebildet (Mruk & Cheng, 2004a) und dienen wohl der Verankerung der Spermatische sowie der richtigen Orientierung und Positionierung der Spermaticenköpfe (Vogl et al., 2000; Mruk & Cheng, 2004b). Auch finden sich zwischen Sertoli-Zellen und elongierten Spermatischen der Kaninchen sog. „tubulobulbar complexes“. Diese von Russel und Clermont (1976), Russel und Malone (1980) sowie Lie et al. (2010) beschriebene Struktur sollen dem Spermaticenkopf eine gewisse Stabilität verleihen sowie eine weitere Möglichkeit darstellen, überschüssiges Zytoplasma abzusondern (Russell, 1979; Sprando & Russell, 1987). Wie wichtig Haftstrukturen für die Entwicklung der Spermien sind, zeigt sich mitunter auch daran, dass bei der Entwicklung von männlichen Kontrazeptiva genau diese als Angriffspunkt genutzt werden: Adjudin

(Hu et al., 2009) und Gamendazole (Tash et al., 2008) stören bei einigen Tierarten, unter anderem beim Kaninchen, die Strukturen zwischen Sertoli-Zellen und Spermatisden und unterbinden damit die Adhäsion der Keimzellen (Cheng et al., 2005; Mok et al., 2011). Die Spermatisden werden somit im unreifen Status ins Lumen des Tubulus abgegeben (Mok et al., 2011). Bei allen der in meiner Arbeit licht- und elektronenmikroskopisch untersuchten, nicht-geschlechtsreifen Kaninchen (11-12 Wochen) hat der Prozess der Spermatogenese eingesetzt, ist aber bei keinem der Tiere vollendet. Somit sind bei keinem der beobachteten nicht-geschlechtsreifer Kaninchen Spermien zu identifizieren. Daher sind die untersuchten Kaninchen „nicht geschlechtsreif“ im Sinn der Definition von May und Simpson (1975): nach ihrer Definition müssen Spermien gebildet werden, die eine Eizelle befruchten könnten. Wohl aber sind die Kaninchen in die Pubertät eingetreten: Chemes (2001) sieht den Beginn der Pubertät in einer starken Vermehrung der Spermatogonien und der primären Spermatozyten. Die Entwicklungsstufen, Morphologie bzw. Lage der Keimzellen im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens entsprechen die der geschlechtsreifen Tiere. Die Spermatogenese ist, je nach Tier, unterschiedlich weit fortgeschritten. Bei allen Kaninchen konnten zumindest in einigen Tubuli seminiferi contorti die Keimzellentwicklung inklusive erste Reifeteilung beobachtet werden. Bei 10 der 15 Tiere hat die Spermio-genese eingesetzt. Bei jenen Kaninchen konnten runde (vier Tiere) bzw. elongierte (sechs Tiere) Spermatisden identifiziert werden. Um die Unterschiede in der Keimzellentwicklung darstellen zu können, wurden in dieser Arbeit die Prozentzahlen der Tubuli mit Spermien und Spermatisden berechnet. Dieses Prinzip wurde von den Arbeiten von Gracia-Tomas et al. (2009a, b) übernommen. Ferner wurde dieses Vorgehen auf Tubuli seminiferi contorti mit pachytänen, zygotänen und leptotänen Spermatozyten übertragen. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss beachtet werden, dass in den gewundenen Samenkanälchen der erwachsenen Kaninchen in 100% der Fälle Spermatisden (rund und/oder elongiert) auftreten. Tier 7 der nicht-geschlechtsreifen Kaninchen erfüllt bereits diese Kriterien: alle gewundenen Hodenkanälchen, die in die Spermatogenese eingetreten sind, weisen Spermatisden auf. Es existieren aber nicht nur zwischen den einzelnen Tieren Entwicklungsunterschiede, auch innerhalb eines einzelnen nicht-geschlechtsreifen Kaninchenhodens können Tubuli seminiferi contorti mit Spermatogenese neben gewundenen Kanälchen mit lediglich Sertoli-Zellen und Spermatogonien auftreten. Auffällig ist ferner die

hohe Anzahl an degenerierten Zellen in den Hodenkanälchen. Auch weist das Keimzellepithel oft Lücken auf, was auf Phagozytose von degenerierten Zellen hindeuten könnte. Gondos et al. (1973) setzen den Beginn der Spermatogenese in den gewundenen Samenkanälchen der „Weißen Neuseeländer“ mit 7 bis 8 Lebenswochen fest. Zu diesem Zeitpunkt sind Spermatogonien vom Typ A und B zu identifizieren. 1 Woche später, ab der 9. Lebenswoche, sind die ersten primären Spermatozyten erkennbar. Zeitgleich mit der Lumenbildung in der 12. Lebenswoche erscheinen die ersten Spermatiden in den Tubuli seminiferi contorti der „Weißen Neuseeländer“. Die erste Spermiation erfolgt am Ende der 14. Lebenswoche. Chubb et al. (1978) verwendeten ebenfalls „Weiße Neuseeländer“. Auch sie fanden die ersten Spermatogonien in der 7. Lebenswoche, die ersten präleptotäne Spermatozyten in der 8. Lebenswoche, die ersten pachytänen Spermatozyten in der 10. Lebenswoche sowie die ersten Spermatiden in der 12. Lebenswoche. In der 15. Lebenswoche sind die ersten Spermien im Nebenhoden angelangt. Hayashi et al. (2002) identifizierten bei „Weißen Japanern“ die ersten Spermatozyten ab dem 79. Tag p.c. und die ersten Spermatiden ab dem 100. Tag p.c. Die „Himalaya“ Kaninchen von Tsunenari und Kast (1992) zeigen ab der 7. Lebenswoche A-Spermatogonien. Ab der 12. Lebenswoche erscheinen im Keimepithel die ersten elongierten Spermatiden. Bei den spanischen Kaninchenrassen „Caldes“ und „Prat“ treten die ersten elongierten Spermatiden im Alter von 14 Lebenswochen auf. Mit 14 bis 16 Lebenswochen sind auch Spermien zu beobachten (García-Tomás et al., 2009b). Dabei treten keine Rasseunterschiede auf. Betrachtet man die soeben vorgestellten Studien und diese Arbeit, so lassen sich die Resultate darin widerspruchsfrei einfügen.

2.4. Intratestikuläre samenableitende Wege

Die intratestikulären spermienableitende Wege setzen sich bei den geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchen aus den Terminalsegmenten, den Tubuli recti und dem Rete testis zusammen. Auch die bisher untersuchten Säuger weisen diese Strukturen auf (u.a. Hund: Montkowski, 1992; Katze: Prem, 1992; Pferd: Kuhrau, 1994; Rind: Abd-Elmaksoud, 2003; Schwein: Schmidbauer, 2001).

2.4.1. Terminalsegment

Die Terminalsegmente sind bei geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen

Kaninchen gleichermaßen aufgebaut: nach einem Abschnitt mit reduziertem Durchmesser und einem Keimepithel mit noch „typischen“ Sertoli-Zellen sowie eingeschränkter Spermatogenese kann ein durch modifizierte Sertoli-Zellen gekennzeichnetes Teilstück identifiziert werden. Die sehr stark in Richtung Tubulus rectus geneigten modifizierten Stützzellen weisen Zytoplasmafortsätze auf, die mit denen der gegenüberliegenden Seite Kontakt suchen und dadurch das Lumen einschränken. Diese beiden Abschnitte des Kaninchens könnten mit der Übergangsregion und dem Mittelabschnitt des Bullens (Wrobel et al., 1978; 1982) gleichgestellt werden. In einigen Fällen folgt bei den Kaninchen ein dritter und letzter Abschnitt mit einer dezenten Vorwölbung des Zytoplasmas der modifizierten Sertoli-Zellen in dem sich anschließenden Tubulus rectus in Form einer Papille oder Zunge. Die Terminalsegmente der geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchen sind somit als unauffällig zu bezeichnen, kann doch im Gegensatz zum Rind (Wrobel et al., 1978; Osman & Plöen, 1979; Wrobel et al., 1982; Abd-Elmaksoud, 2005), zum Schwein (Schmidbauer, 2001), zur Westafrikanischen Zwergziege (Ezeasor, 1986), zur Ziege (Osman & Plöen, 1979), zum Schaf (Osman & Plöen, 1979) sowie zum Hund (Montkowski, 1992) kein prominenter terminaler Pfropf beschrieben werden. Die hier angestellten Beobachtungen über die Terminalsegmente des Kaninchens decken sich mit denen von Osman (1979). Auch er findet beim Kaninchen keinen „echten“ terminalen Pfropf und in der Mehrzahl keine Zytoplasmaprotrusionen. Der Grundaufbau des Terminalsegments des Kaninchens, nämlich reduzierter Durchmesser des Hodenkanälchens, das Auftreten von modifizierten Sertoli-Zellen sowie das Aussetzen der Spermatogenese, entspricht dem anderer Säuger (Rind: Wrobel et al., 1978; Osman & Plöen, 1979; Wrobel et al., 1982; Wrobel & Sinowatz, 1982; Abd-Elmaksoud, 2005; Hamster: Cavicchia & Burgos, 1977; Makake: Dym, 1974; Katze: Murakami et al., 1988; Hund: Montkowski, 1992; Westafrikanische Zwergziege: Ezeasor, 1986; Ratte: Nykänen, 1979; Hermo & Dworkin, 1988; Schaf: Osman & Plöen, 1979; Schwein: Osman, 1978; Schmidbauer, 2001; Ziege: Osman & Plöen, 1979). Im Stroma um das Terminalsegment der Kaninchen sind Blutgefäße und, wie die immunhistochemische Untersuchungen mit dem α -SMA-Antikörper ergaben, kontraktile Zellen wie Myofibroblasten und glatte Muskelzellen eingebettet. Diese sind beim Rind wahrscheinlich in der Lage, die Lichtung des Terminalsegments zu regulieren und den Transport der Spermien auf deren Weg zum Nebenhoden zu

steuern (Wrobel et al., 1978; 1982). In der Literatur herrschen unterschiedliche Zeitangaben über die Bildung des Terminalsegments: während sich das Terminalsegment laut Stieve (1932; zitiert nach Nykänen, 1979) und Wrobel et al. (1986) erst während der postnatalen Entwicklung ausbildet, ist es bei der nicht-geschlechtsreifen Ziege laut Osman und Plöen (1979) bereits vor der Bildung der Lumina der Tubuli seminiferi vorhanden. Die hier untersuchten nicht-geschlechtsreifen Kaninchen besitzen bereits Terminalsegmente. Die Frage, wann diese entstanden, ob kurz nach der Geburt oder kurz vor der Bildung der ersten Lumina, kann in meiner Arbeit nicht geklärt werden. Dies müsste in einer Studie mit jüngeren Tieren untersucht werden. Bei der PAS-Färbung nach McManus zeigte die Membrana propria der Terminalsegmente sowie das umliegende Stroma eine violett-rote Anfärbung. Diese Gewebestrukturen enthalten also Kohlenhydrate. Beim Rind (Wrobel et al., 1978) und beim Schaf (Osman, 1984) konnten am Terminalsegment glykogenhaltige Zellen gefunden werden. Dies gelang in dieser Arbeit mit Kaninchen anhand der PAS-Färbung nach McManus nach Amylase-Verdau, die für den Nachweis von Glykogen vorgesehen ist, jedoch nicht. Vergleicht man die Stärke der Reaktion hier am Terminalsegment mit der Färbung um die Tubuli seminiferi contorti, so findet man beim Kaninchen keine Unterschiede. Beim Schafbock jedoch ist die Reaktion um die Tubuli seminiferi contorti mäßig, während sie um das Terminalsegment als „stark“ eingestuft wird (Osman, 1984). Hier könnte ein tierartlich unterschiedlicher Aufbau des Gewebes vorliegen. Nach der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 färbte sich die Membrana propria des Terminalsegments moderat blau an. Bei einer Färbung bei pH 1,0 trat eine nur noch schwache Färbung auf. Das Gewebe enthält also karboxylierte, aber auch sulfatierte Glykosaminoglykane und Glykoproteine.

2.4.2. Tubuli recti

Bei den Tubuli recti der geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchen entfällt die „kelchartige Erweiterung“ zu Beginn der Tubuli recti. Eine solche findet sich bei vielen Tierarten wie beim Rind (Osman & Plöen, 1978), beim Schwein (Osman & Plöen, 1978; Schmidbauer, 2001), beim Schaf (Osman & Plöen, 1978), bei der Ziege (Osman & Plöen, 1978) sowie beim Hund (Montkowski, 1992). Wie in dieser Arbeit, so konnten auch Osman und Plöen (1978) in ihrer Untersuchung über Tubuli recti beim Kaninchen und bei der Ratte keine kelchartige Erweiterung feststellen. Laut Osman & Plöen (1978) besitzt

diese Struktur wohl keine spezifische Aufgabe. Das Kaninchen zeigt im Tubulus rectus ein einschichtig-kubisches Epithel. Besonders im distalen Teil der Tubuli recti können jedoch vereinzelt hochprismatische Epithelzellen und geringfügig höhere Durchmesser beobachtet werden. Auch die Tubuli recti des Hamsters weisen in ihrem distalen Abschnitt eine Zunahme des Durchmessers auf (Cavicchia & Burgos, 1977). Im Stroma, das die Tubuli recti umgibt, sind neben Blutgefäßen elastische Fasern sowie kontraktile Zellen wie Myofibroblasten und glatte Muskelzellen (siehe V.4.1.) auszumachen. Sie scheinen besonders um den proximalen Teil der geraden Hodenkanälchen stark ausgebildet. Die Architektur der Tubuli recti der geschlechtsreifen Kaninchen gleicht der der nicht-geschlechtsreifen Tiere. Die Zahl der kontraktilen Zellen steigt mit zunehmendem Alter allerdings noch an (siehe V.4.1.). Alle geraden Hodenkanälchen der nicht-geschlechtsreifen Kaninchen sind bereits vollständig kanalisiert. Ein Vergleich mit anderen Arbeiten ist nicht möglich, da solche für nicht-geschlechtsreife Kaninchen nicht vorliegen. Allerdings erwähnen Wrobel et al. (1986), dass die Tubuli recti eines vierwöchigen Kalbes im Gegensatz zu den Tubuli seminiferi contorti bereits regelmäßig Lumina aufweisen. Bei der PAS-Färbung nach McManus zeigte sich die Basalmembran der Tubuli recti violett-rot. Die Basalmembran der Tubuli recti ist somit unter anderem aus Glykoproteinen aufgebaut. Der Hamster weist in den Epithelzellen seines distalen Segments Glykogen auf (Fawcett & Dym, 1974; Osman & Plöen, 1978). Die PAS-Färbung nach McManus mit vorangehender Inkubation mit Amylase ergab, dass beim Kaninchen keine größeren Mengen an Glykogen in den Tubuli recti vorkommen. Bei der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 trat eine Blaufärbung der Basalmembran sowie des benachbarten Bindegewebes der Tubuli recti auf. Bei einer Färbung bei pH 1,0 waren diese Strukturen weitgehend entfärbt. Sie scheinen somit aus karboxylierten Glykosaminoglykane und Glykoproteinen aufgebaut zu sein.

2.4.3. Mediastinum testis und Rete testis

Die in meiner Arbeit untersuchten Kaninchen zeigen eine axiale Lokalisation des Rete testis. Auch Dym (1976) sowie Lohiya und Mathur (1983) beschreiben für das Kaninchen diese Lage. Dhingra (1977) hingegen gibt für das Kaninchen ein superfizielles Rete testis an, wie es auch Hamster, Ratte und Maus besitzen (Dym, 1976; Dhingra, 1977). Ein zentral im Hoden liegendes Rete testis findet sich neben dem Kaninchen bei der Mehrzahl der bisher untersuchten Säugetiere

(Katze: Dym, 1976; Prem, 1992; Hund: Dym, 1976; Montkowski, 1992; Meerschweinchen: Dym, 1976; Schaf: Dym, 1976; Schwein: Dym, 1976; Schmidbauer, 2001; Rind: Dym, 1976; Hees et al., 1987; Abd-Elmaksoud, 2005). Das aus einem anastomisierendem Netzwerk von Gängen aufgebaute Rete testis liegt im schmalen, bindegewebigen Mediastinum des Kaninchenhodens. Neben einigen elastischen Fasern, Myofibroblasten und glatten Muskelzellen (siehe V.4.1.) sind sich beim geschlechtsreifen wie beim nicht-geschlechtsreifen Kaninchen relativ wenige ektopische Leydig-Zellen eingebettet. Auch bei der Katze (Wrobel & Hees, 1987; Prem, 1992) und beim Hund (Montkowski, 1992) werden an dieser Stelle heterotope Leydig-Zellen angetroffen. Kontraktile Zellen um das Rete testis wurden nicht nur beim Kaninchen, sondern auch beim Menschen (Bustos-Obregón & Holstein, 1976) und beim Rind (Hees et al., 1989) festgestellt. Elastische Fasern wurden, wie beim Kaninchen, auch für das Rind (Abd-Elmaksoud, 2005; Hees et al., 1989; Wrobel et al., 1978), für das Schwein (Schmidbauer, 2001) und für den Hund (Montkowski, 1992) identifiziert. Das Rete testis der Kaninchen weist ein einschichtiges Epithel auf. Die Epithelzellen zeigen sich kubisch bis hochprismatisch. Dies stimmt mit den Berichten über das Rete testis des Kaninchens durch Dym (1976) sowie Lohiya und Mathur (1983) überein. Auch die bisher untersuchten Säugetiere besitzen ein einschichtig-flaches bis hochprismatisches Epithel (Dym, 1976; Wrobel 1990). Bei allen Kaninchen unabhängig ihres Alters befinden sich im Lumen der Rete testis-Kanäle Chordae retis, die als bindegewebigen Stränge diese durchziehen. In den Chordae retis können elastische Fasern und kontraktile Zellen identifiziert werden. Zum Lumen der Kanäle hin werden die bindegewebigen Körper durch ein Epithel abgegrenzt, das auf einige Zytokeratin-Antikörper positiv reagiert. Chordae retis werden auch für den Menschen (Roosen-Runge & Holstein, 1978) und für das Rind (Wrobel et al., 1978; Hees et al., 1987; Abd-Elmaksoud, 2005) beschrieben. Hees et al. (1987) äußern bereits die Vermutung, dass Chordae retis bei vielen Spezies auftreten könnten. Dennoch liegen für das Kaninchen nach meiner Kenntnis keine Berichte über ihr Vorkommen vor. Die genaue Funktion der Chordae retis ist unbekannt. Hees et al. (1987) vermuten eine transluminale Verbindung des kontraktilen Systems. Nicht-geschlechtsreife und geschlechtsreife Kaninchen zeigen grundsätzlich denselben Aufbau des Rete testis. Das Mediastinum testis des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens unterscheidet sich von dem des geschlechtsreifen Tieres lediglich durch seine geringere Menge an

Myofibroblasten und glatten Muskelzellen (siehe V.4.1.). Das Rete testis erweist sich bei allen nicht-geschlechtsreifen Kaninchen als vollständig kanalisiert. Laut Dym (1976) entstehen die Lumina der Rete testis-Kanäle bei Affen (Pavian; Makake) erst während der postnatalen Entwicklung. Die Kanalisation des Rete testis beim Kalb hingegen findet bereits im 3. Monat der Trächtigkeit statt (Anton, 1987; Rüsse, 1998). Aus meinen Untersuchungen kann geschlossen werden, dass die Kanalisierung des Rete testis bei nicht-geschlechtsreifen Kaninchen mit 11 bzw. 12 Wochen abgeschlossen ist. Ferner geht sie offensichtlich der Lumenbildung der Tubuli seminiferi contorti voraus (siehe V.2.3.2). Wann genau aber die Lumenbildung der Rete testis-Kanäle beim Kaninchen einsetzt, ob prä-, peri- oder postnatal, erfordert weitere Untersuchungen. Bei der PAS-Färbung nach McManus reagierten die Basalmembran des Rete testis, die bindegewebigen Anteil der Chordae retis sowie das Mediastinum aller Kaninchen positiv. Somit enthalten die genannten Strukturen in größerer Menge Kohlenhydrate. Das Stroma des Mediastinums, der bindegewebige Kern der Chordae retis sowie die apikalen Anteile der Epithelzellen des Rete testis wiesen bei der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 eine Färbung auf, während bei pH 1,0 eine mäßige Entfärbung aller Anteile zu beobachten war. Es scheinen also diese Strukturen aus karboxylierten, aber auch aus sulfatierten Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen aufgebaut zu sein. Mit der Sirius Red-Färbung konnten keine eosinophilen Granulozyten bzw. mit der Alcianblau-Färbung bei pH 2,5 auch keine Mastzellen im Mediastinum nachgewiesen werden.

2.5. Interstitium

Das interstitielle Gewebe zwischen den gewundenen Hodenkanälchen besteht bei den untersuchten geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchen aus lockerem Bindegewebe mit einigen kollagenen und elastischen Fasern, in welchem Fibroblasten, Myofibroblasten, glatte Muskelzellen (siehe V.4.1.), Leydig-Zellen, Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven eingebettet sind. Zu diesem Ergebnis kommt ebenfalls eine Studie über interstitielle Zellen beim adulten Kaninchen von Crabo (1963). Somit entsprechen die Grundbausteine des Interstitiums im Kaninchenhoden denen anderer bisher untersuchter Tierarten (u.a. Hund: Connell & Christensen, 1975; Connell, 1976; Montkowski, 1992; Katze: Lüdtkke, 1987; Prem, 1992; Ratte: Murakami, 1966, Rind: Wrobel et al., 1981; Abd-Elmaksoud, 2005; Schwein: Pinart et al., 2001c; Schmidbauer, 2001) sowie denen des

Menschen (Sinowatz, 2000c; Welsch, 2010). Obwohl die Grundelemente des Interstitiums in jeder Tierart dieselben sind, so lassen sich dennoch tierartige Variationen bezüglich der Anordnung dieser Komponenten sowie der Menge der Leydig-Zellen finden. Laut Trautmann und Fiebiger (1949) können zahlreiche Leydig-Zellen im intertubulären Raum des Pferdes und des Schweines gefunden werden. Eine mittlere Zahl ist im Interstitium der Fleischfresser eingebettet. Die Wiederkäuer hingegen weisen eine nur geringe Anzahl von Leydig-Zellen auf. Angaben über die Zahl von Zwischenzellen beim Kaninchen liegen nur spärlich vor: Kothari et al. (1978) geben das gesamte Leydig-Zellvolumen beim Kaninchen mit 16,17% an; damit besitzen sie ähnliche Werte wie der Mensch (15,70%) (Kothari et al., 1978). Ewing et al. (1979) hingegen errechnen für das Leydig-Zellvolumen des Kaninchens lediglich 2,24%. Die vorliegende Arbeit schließt keine Berechnung für das gesamte Leydig-Zellvolumen ein. Allerdings könnte aufgrund der lichtmikroskopischen Untersuchungen vermutet werden, dass das geschlechtsreife und nicht-geschlechtsreife Kaninchen über eine mäßige Menge an Leydig-Zellen verfügt. Fawcett et al. (1973) stellen für die Anordnung und Menge von Leydig-Zellen, Lymphgefäßen sowie Bindegewebe im Interstitium tierartige Unterschiede fest und formulieren drei Grundformen: bei Rind, Rhesus-Affe, Mensch, Elefant und Schaf liegen die Leydig-Zellen weit verstreut im sehr lockeren Bindegewebe. Die auffälligen Lymphgefäße sind hier in der Regel zentral zwischen den Hodenkanälchen zu finden. Im Interstitium des Schweins, des Zebras, des Opossums und des Hundes treten Leydig-Zellen als vorherrschendes Element auf und füllen beinahe den gesamten Bereich zwischen den Hodenkanälchen aus. Lockeres Bindegewebe mit einzelnen kleinkalibrigen Lymphgefäßen ist daher nur in geringem Maße zu finden. Als dritte Form beschreiben Fawcett et al. (1973) das Interstitium von Meerschweinchen, Ratte, Maus und Chinchilla: hier nehmen peritubuläre Lymphsinusoide einen Großteil des Raums ein. Interstitielles Bindegewebe und Leydig-Zellen hingegen sind nur in geringer Zahl vorhanden. Das Kaninchen wurde bisher keiner der drei Grundformen zugeordnet. Aufgrund der hier untersuchten Tiere könnte das Kaninchen am ehesten in die Gruppe 1 mit Rind, Rhesus-Affe, Mensch, Elefant und Schaf eingereiht werden: die Intertubularräume des Kaninchens sind, anders als bei Vertretern der Gruppe 2, nicht ausgefüllt mit Leydig-Zellen. Sie verfügen, wie auch andere Tiere der Gruppe 1, über eine größere Menge an lockerem Bindegewebe. Ausgeprägte peritubuläre Lymphsinusoide wie bei der Maus und

der Ratte der Gruppe 3 treten beim Kaninchen nicht auf. Für die Verteilung, die Menge sowie den ultrastrukturellen Aufbau der Leydig-Zellen im geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchenhoden konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Damit ging wohl die Differenzierung der adulten Generation der Zwischenzellen der Differenzierung des Keimepithels voraus. Die hier angestellten Beobachtungen über die Leydig-Zellen im nicht-geschlechtsreifen Tier entsprechen den Resultaten der bisherigen Arbeiten über die postnatale Entwicklung der Zwischenzellen beim Kaninchen (Gondos et al., 1976; Gondos et al., 1977). In ihren Untersuchungen traten die ersten adulten Leydig-Zellen im Hoden der „Weißen Neuseeländer“ ab der 5. Lebenswoche vor Beginn der Spermatogenese auf. Die Entwicklung der adulten Generation der Zwischenzellen ist bis zur 11. Lebenswoche abgeschlossen. Da die hier begutachteten Tiere mit 11 bzw. 12 Wochen bereits zu alt sind, um die Entwicklung und Differenzierung der adulten Leydig-Zellen nachvollziehen zu können, sollte eine weitere Arbeit über die Zwischenzellen des Kaninchens jüngere Tiere miteinschließen. Eine zuverlässige Produktion von Androgenen ist für den Eintritt und den ungestörten Verlauf der Keimzellbildung unerlässlich: laut Ewing und Brown (1977) sowie Chen et al. (2009) handelt es sich bei der Spermatogenese um einen androgenabhängigen Prozess. Die Leydig-Zellen werden dabei als wichtigste Produktionsstätte der Androgene angesehen (Crabo, 1963; Connell, 1976). Auch für weitere Aspekte der postnatalen Entwicklung sind die Sexualhormone der Zwischenzellen von Bedeutung: Androgene besitzen eine insgesamt anabole Wirkung (Wrobel 1998). Ebenso dürfte die Wirkung der Sexualhormone auf das sexuelle Verhalten sowie auf die akzessorischen Geschlechtsdrüsen und den Penis (Dellmann & Wrobel, 1987) für den heranwachsenden, aber auch für das geschlechtsreife Kaninchen von Wichtigkeit. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass die Leydig-Zellen der Kaninchen einen runden bis ovalen, oft exzentrisch liegenden Kern mit einem in der Regel deutlichen Nukleolus besitzen. Sie liegen meist in kleinen Gruppen oder Strängen. Ultrastrukturell konnte in meiner Arbeit als vorherrschendes Zellorganell eine große Menge an glatten ER identifiziert werden. Auch Mitochondrien sind in größerer Menge vorhanden. Diese beiden Beobachtungen entsprechen der Organellenausstattung einer steroidproduzierenden Zelle (Dellmann & Wrobel, 1987). Ferner ist eine meist mäßige Anzahl von Lipidropfen zu beobachten. Die in meiner Arbeit angestellten

licht- und elektronenmikroskopischen Beobachtungen gehen größtenteils konform mit denen früherer Arbeiten über die Leydig-Zellen der Kaninchen (Crabo, 1963; Gondos et al., 1976; Ewing et al., 1979; Zirkin et al., 1980; Chrenek et al., 2010). Allerdings kann in dieser Arbeit, im Gegensatz zu Crabo (1963), der sowohl dunkle wie auch helle Zwischenzellen beschreibt, nur ein Typ von Leydig-Zellen beschrieben werden. Auch der Grundaufbau der Zwischenzellen des Menschen (Sinowatz, 2000c; Welsch, 2010) sowie des Hundes (Connell & Christensen, 1975; Connell, 1976; Montkowski, 1992), der Katze (Lüdtke, 1987; Prem, 1992), des Löwen (Sinha & Seal, 1969), des Meerschweinchens (Merkow et al., 1968), des Pferdes (Kuhrau, 1994), der Ratte (Murakami, 1966) und des Schweins (Pinart et al., 2001c) stimmt im Wesentlichen mit dem der Kaninchen überein. In einigen Punkten konnten jedoch tierartlichen Besonderheiten festgestellt werden, wie etwa in der Menge der Lipidtropfen (Zirkin et al., 1980; Banks, 1981). Reinksche Kristalle wie beim Reh, bei der Katze, beim Pferd (Krölling, 1960) oder beim Menschen (Krölling, 1960; Sinowatz, 2000c; Welsch, 2010) werden beim Kaninchen nicht angetroffen. Dies steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Marino et al. (2003): laut ihren Angaben konnten Reinksche Kristalle zwar bei einem Kaninchen mit interstitiellen Zelltumoren nachgewiesen werden, nicht jedoch bei gesunden Tieren. Eine Studie über die postnatale Entwicklung des Interstitiums beim Rind (Wrobel et al., 1988) berichtet über eine Verschiebung des quantitativen Verhältnisses zwischen Tubuli seminiferi contorti und intertubulären Kompartiment: nimmt das Interstitium beim Kalb von 4 Lebenswochen noch 50% ein, so wird er beim Rind mit 78 Lebenswochen auf 15% reduziert. In meiner Arbeit wurde der Anteil des intertubulären Kompartiments prozentual nicht erhoben. Wrobel et al. (1988) empfehlen für einen optimalen Erhalt des Interstitiums, der für quantitative Untersuchungen Voraussetzung ist, eine Perfusionsfixierung des Untersuchungsmaterials. In dieser Arbeit wurde jedoch eine Immersionsfixierung durchgeführt. Eine weiterführende Studie mit einer geeigneten Fixierlösung könnte diese Frage klären. In dieser Arbeit konnten im Interstitium des Hodens vom Kaninchen in einigen wenigen Fällen Mastzellen und eosinophilen Granulozyten lokalisiert werden. Mastzellen werden im Knochenmark produziert und finden sich beim Menschen als ausdifferenzierte Zellen in Haut, Schleimhaut und Bindegewebe (Welsch, 2010). Das Zytoplasma dieser Zellart beinhaltet basophile Granula. Diese weisen einen hohen Gehalt an Polyanionen auf, die sich durch die Alcianblau-Färbung bei pH

2,5 darstellen lassen. Die Granula beinhalten unter anderem Enzyme wie Trypsin, die auch beim Umbau der Bindegewebsmatrix involviert ist. Ferner verfügen Mastzellen über Stoffe wie Histamin, Heparin, saure Hydrolasen, Leukotriene und Zytokine, die für die Immunantwort sowie bei Allergien von Bedeutung sind. Ebenso modulieren diese Stoffe Fibroblasten, Mikrozirkulation und Matrixproteine (Welsch, 2010). Die eosinophilen Granulozyten gehören dem angeborenen zellvermittelten Immunsystem an (Göbel & Kaspers, 2005). Sie besitzen als ausgereifte Zellen einen zweigeklappten heterochromatinreichen Kern. Im Zytoplasma eingebettet liegen relativ große Granula (Welsch, 2010). Diese können mit sauren Farbstoffen angefärbt werden (Sinowatz, 2000b). Die Granula beinhalten Enzyme wie Peroxidase, Katalase und Esterase (Sinowatz, 2000b). Eosinophilen Granulozyten sind unter anderem bei der Abwehr von Parasiten von Bedeutung. Auch bei entzündlichen und immunologischen Abläufen spielen die Granulozyten eine nicht unbedeutende Rolle (Bignold, 1995). Über das Vorkommen von eosinophilen Granulozyten sowie Mastzellen im Interstitium des Kaninchenhodens liegen bisher noch keine Arbeiten vor. Studien über das Vorkommen und Verteilung dieser Zellen im geschlechtsreifen Hoden von Ratte (Anton et al., 1998), Feldhase (Anton et al., 1998), Hund (Anton et al., 1998), Katze (Anton et al., 1998), Schwein (Anton et al., 1998; Pinart et al., 2001c), Rind (Anton et al., 1998; Abd-Elmaksoud, 2005), Pferd (Anton et al., 1998) und Mensch (Anton et al., 1998) ergeben, dass eosinophile Granulozyten im Interstitium von Pferd, Feldhase und Schwein angetroffen werden können. Mastzellen hingegen können im intertubulären Raum des Schweins, des Menschen und des Pferdes identifiziert werden (Anton et al., 1998; Pinart et al., 2001c). Über die exakten Aufgaben der eosinophilen Granulozyten und Mastzellen im Hoden kann nur spekuliert werden. Für die Mastzellen wird angenommen, dass einige Substanzen, die diese Zellen ausschütten, die Produktion der Sexualhormone in den Leydig-Zellen modulieren. Laut Mayerhofer et al. (1989) fördert Histamin die Synthese von Testosteron im Hoden des Hamsters, während der „tumor necrosis factor alpha“ (TNF α) und Serotonin die Hormonherstellung in den Leydig-Zellen der Ratte hemmt (Tinajero et al., 1992; Xiong & Hales, 1993). Inwieweit dies auf andere Tierarten übertragbar ist, muss noch untersucht werden. Gaytan et al. (1989) sowie Anton et al. (1998) vermuten zudem, dass die Mastzellen bei der Regulation des Blutflusses involviert sind. Neben der vasoaktiven Substanz Histamin sollen die Mastzellen

von Ratten auch die Hauptquelle von Serotonin darstellen (Aguilar et al., 1995), das bei dieser Tierart vermutlich den Blutfluss mitreguliert (Sowerbutts et al., 1986; Collin et al., 1996). Auch die Funktion der eosinophilen Granulozyten im Hodengewebe ist noch nicht geklärt. Sie enthalten eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen mit unterschiedlichsten Funktionen (Costa et al., 1997; Walsh, 1997). Anton et al. (1998) vermuten aufgrund dieser Faktoren regulatorische Aufgaben auf parakriner Ebene. „Light intercalated cells“, die als spezielle testikuläre Makrophagen angesehen werden (Wrobel et al., 1981), können im Gegensatz zum Rind (Wrobel et al., 1981; Sinowatz & Amselgruber, 1987) in dieser Arbeit über Kaninchen nicht beobachtet werden. Aufgrund der schwachen bis mäßig-starken Anfärbung des lockeren Bindegewebes mit der PAS-Färbung nach McManus kann davon ausgegangen werden, dass diese unter anderem aus kohlenhydrathaltigen Makromolekülen besteht. Durch die Markierung mit Alcianblau bei pH 2, 5 und einer ausbleibenden Färbung bei pH 1,0 kann geschlossen werden, dass das Gewebe des intertubulären Raums vor allem aus karboxylierten Proteoglykanen aufgebaut ist.

3. Diskussion der Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen

In meiner Arbeit wurde das Bindungsverhalten von 14 FITC-markierten Lektinen (ConA, LCA, PSA, GSL-I, PNA, RCA-I, WGA, WGAs, DBA, SJA, SBA, UEA-I, PHA-E, PHA-L) sowie zwei biotinylierten Lektinen (VAA, SNA) aus sechs Gruppen im Kaninchenhoden untersucht. Zu dieser Thematik liegen noch keine Ergebnisse anderer Autoren vor. Für die glykohistochemischen Untersuchungen dieser Dissertation wurden ausschließlich Bouin-fixierte Schnitte verwendet, da in früheren Studien mit dieser Fixierlösung die besten Färbeergebnisse erzielt wurden (Söderström et al., 1984). Söderström et al. (1984) berichten über eine intensivere Markierung bei Bouin-fixierten Schnitten im Vergleich zu Formalin-fixierten Schnitten. Bei der Erhebung der Ergebnisse wurde die Intensität der Lektinbindung, die Regelmäßigkeit sowie die Gleichmäßigkeit der Reaktion bei verschiedenen Tieren bewertet. Die Erhebung der Regelmäßigkeit innerhalb eines geschlechtsreifen Hodens erweist sich als geeignet für die Darstellung der Veränderung des Bindungsverhaltens während der Spermiogenese: so kann das

Lektin RCA-I regelmäßig an das akrosomale System der runden Spermatozoen binden, aber nur noch unregelmäßig an das der elongierten Spermatozoen. Das Akrosom der Spermien verhält sich meist vollkommen negativ. Dadurch lassen sich für die Bindung der Lektine am akrosomalen System mehrere Gruppen unterscheiden, die im Laufe der Diskussion noch besprochen werden sollen. Ferner wird anhand der Regelmäßigkeit der Reaktion innerhalb einer Altersgruppe verdeutlicht, dass sich anscheinend die Bindestellen einer Struktur während der postnatalen Entwicklung verändern: im Hoden sämtlicher untersuchter geschlechtsreifer Kaninchen bieten die Epithelzellen von Tubuli recti und Rete testis Bindestellen für die D-Glukose bzw. Mannose bindende Lektine ConA, LCA sowie PSA an. In den Hoden der nicht-geschlechtsreifen Tiere jedoch können diese drei Lektine nur bei zwei Drittel der Tiere an das Epithel der intratestikulären samenableitenden Strukturen binden. Eine weitere Studie, die eine größere Altersspanne der nicht-geschlechtsreifen Kaninchen umfasst, könnte etwaige Zusammenhänge mit der Hodenentwicklung abklären. In meiner Untersuchung konnte aber festgestellt werden, dass diejenigen Kaninchen, deren Epithel sich durch LCA anfärben lässt, unterschiedlich weit in ihrer Spermio-genese fortgeschritten sind. Ferner finden sich Epithelien, die sich zwar durch ConA markieren lassen, nicht jedoch durch LCA. Ungeklärt bleibt die Frage, ob hier eine postnatale Veränderung der Lektinbindestellen vorliegt oder etwa andere Gründe verantwortlich sind: im Studium mit Lektinen muss bedacht werden, dass diese zwar spezifisch an Zuckerstrukturen binden, aber die Bindung von Lektinen an Kohlenhydrate bestimmte Besonderheiten aufweist (Roth, 2011): so ist die Affinität und Spezifität für den Bindungspartner bei Lektinen geringer als die von Antikörpern (Goldstein & Poretz, 1986; Tateno et al., 2009; Roth, 2011). Ferner beschreibt Montkowski (1992) verschiedene Faktoren, die das Bindungsverhalten von Lektinen beeinflussen. Zu den „inneren“ Faktoren zählt unter anderem die Struktur des Zuckers, an dem das Lektin bindet. Er kann α - oder β -glykosidische Bindungen aufweisen. Benachbarte Zucker sind in der Lage, die Bindung von Lektin zu einem Zucker zu beeinflussen. Laut Lis und Sharon (1986) ist ferner die Tertiärstruktur mitentscheidend für das Bindungsverhalten des Lektins. Die zweite von Montkowski (1992) beschriebene Gruppe, die sog. „äußeren“ Faktoren, beinhaltet etwa die Fixierung des Gewebes (Söderström et al., 1984; Allison, 1987; Malmi & Söderström, 1988). Wie bereits ausgeführt, wird laut

Söderström et al. (1984) mit der Bouin'scher Lösung eine stärkere Lektinbindung erzielt als nach Fixierung mit 10% Formalin. Sie vermuten eine bessere Konservierung der „Architektur“ der Glykane durch die Bouin'sche Lösung. In einem Vergleich mit mehreren Fixierungslösungen schneidet laut Allison (1987) Ethanol beim Nachweis von Lektinbindestellen am besten ab. Roth (2011) hingegen hält in PBS gepuffertes 2% Formaldehyd-0,1% Glutaraldehyd-Gemisch als das Mittel der Wahl. Neben dem Fixierungsmittel spielt aber auch das Protokoll für die Färbung mit Lektinen eine bedeutende Rolle: Lektinkonzentration, Temperatur, Inkubationszeit und pH-Wert können das Ergebnis verändern (Dulaney, 1979; Roth, 1983). Aufgrund der Fülle der Arbeiten über Lektinbindung im Hoden und den dabei z.T. unterschiedlichen Ergebnissen selbst innerhalb einer Tierart sollen im Diskussionsteil nur diejenigen Arbeiten berücksichtigt werden, die Bouin-fixiertes Gewebe verwenden. Aber auch hier muss beim Vergleich mit den in meiner Arbeit erzielten Ergebnissen kritisch hinterfragt werden, nämlich ob wirklich tierartliche Unterschiede in der Lektinbindung bestehen oder ob einer der erwähnten „äußeren“ oder „inneren“ Faktoren bei der Reaktion dafür verantwortlich ist. Aus der Gruppe I (D-Glukose bzw. D-Mannose bindende Lektine) wurden die Lektine ConA, LCA und PSA untersucht. Alle drei Lektine markieren in den Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens das Bindegewebe, die Wände der Blutgefäße sowie die Epithelzellen von Tubuli recti und vom Rete testis. Auch reagieren ConA, LCA und PSA mit den Sertoli-Zellen des Keimepithels und mit sämtlichen Keimzellgenerationen. Dabei zeigen LCA und PSA eine Affinität zum Schwanz des Spermiums. Ferner färben ConA und PSA Leydig-Zellen im Interstitium, während PSA und LCA an die Laminae propriae der Samenkanälchen binden. Im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens zeigen wie bereits besprochen nicht alle Epithelien der intratestikulären samenableitenden Wege Bindungsstellen für die Lektine ConA, LCA und PSA. Die Ammenzellen des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens werden durch LCA und PSA, nicht jedoch durch ConA markiert. Die übrigen Reaktionen im nicht-geschlechtsreifen Hoden entsprechen denen der geschlechtsreifen Kaninchen. In vielen Arbeiten über die Verteilung von Lektinen im geschlechtsreifen Hoden wird ConA verwendet. Die meisten Studien finden eine breite Affinität des Lektins ConA zum Hodenparenchym, wie dies auch beim Kaninchen der Fall ist. So geben Montkowski (1992) für den Hundehoden, Prem (1992) für den Katzenhoden, Kuhrau (1994) für den Pferdehoden sowie Calvo et

al. (2000) für den Schweinehoden eine ConA-Fluoreszenz der Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatischen, Sertoli-Zellen, Leydig-Zellen, Blutgefäße sowie des Bindegewebes an. LCA bindet beim adulten Dromedar an die Spermatogonien, die Spermatozyten, die Laminae propriae, die Leydig-Zellen sowie an das Bindegewebe (Abd-Elmaksoud et al., 2008). Beim adulten Rind werden die Spermatozyten, die Spermatischen, die Sertoli-Zellen, die Laminae propriae und die Leydig-Zellen markiert (Abd-Elmaksoud, 2005). Für PSA sind im Hoden des geschlechtsreifen Dromedars, wie auch beim Kaninchen, Bindungsstellen an den Spermatischen, der Lamina propria sowie an den Leydig-Zellen zu beobachten (Abd-Elmaksoud et al., 2008). Für das geschlechtsreife Rind ist ebenfalls eine Fluoreszenz in den Leydig-Zellen, den Spermatischen und den Sertoli-Zellen beschrieben. (Abd-Elmaksoud, 2005). Für die Gruppe II, die die vornehmlich D-Galaktose bindenden Lektine zusammenfasst, wurden die Lektine RCA-I, VAA und PNA untersucht. Alle drei Lektine markieren selektiv das akrosomale System der Spermatischen. Eine Fluoreszenz des Akrosoms der Spermien konnte nach Inkubation mit VAA und PNA nicht bzw. nach Inkubation mit RCA-I nur selten nachgewiesen werden. PNA zeigt indes eine Fluoreszenz am distalen Abschnitt des Spermiumkopfes sowie am Schwanz. Bei der geschlechtsreifen Maus (Lohr et al., 2009) werden durch VAA deren Spermatozyten und Spermatischen gekennzeichnet. Anders als beim Kaninchen werden hier zusätzlich auch die Leydig-Zellen und das Bindegewebe markiert. Für PNA liegen mehrere Arbeiten am Hoden vor. Mit Ausnahme des Schweins (Pinart et al., 2001a; Pinart et al., 2001b; Pinart et al., 2002), das auch Bindungsstellen im Interstitium besitzt, beschränkt sich die Reaktion beim Dromedar (Abd-Elmaksoud et al., 2008), beim Hamster (Pastor et al., 2003), beim Hund (Montkowski, 1992), bei der Katze (Prem, 1992; Desantis et al., 2006), bei der Maus (Lohr et al., 2010), bei der Ratte (Söderström et al., 1984; Malmi et al., 1990) und beim Rind (Arya & Vanha-Perttula, 1985; Ertl & Wrobel, 1992) auf das Keimepithel. Hier zeigen sich unterschiedliche Keimzellgenerationen positiv. Als Vertreter der Gruppe III der N-Acetyl-D-Glukosamin/N-Acetyl-Neuraminsäure bindende Lektine wurden die beiden Lektine WGA und WGAs untersucht. Beide zeigen eine Affinität zu sämtlichen Strukturen des Hodens: das Bindegewebe, die Wände von Blutgefäßen, die Leydig-Zellen, die Sertoli-Zellen, die Keimzellen aller Entwicklungsstufen, die Lamina propria sowie die Epithelien der Tubuli recti und des Rete testis werden durch WGA und WGAs markiert. Die Strukturen, die im

Hoden auf WGA und WGAs reagieren, sind beim geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Tier gleich. Auch im Hodengewebe anderer geschlechtsreifer Tierarten färbt WGA die Keimzellen, die Sertoli-Zellen, die Leydig-Zellen, die Lamina propria sowie das Bindegewebe an, so auch beim Hund (Montkowski, 1992), bei der Katze (Prem, 1992), beim Pferd (Kuhrau, 1994) sowie beim Schwein (Pinart et al., 2001a; Pinart et al., 2001b; Pinart et al., 2002). Für die Gruppe IV der hauptsächlich N-Acetyl-D-Galaktosamin/D-Galaktose bindende Lektine wurden GSL-I, SJA, DBA, SBA und SNA untersucht. Sie weisen recht unterschiedliche Verteilungsmuster auf. Während SBA und DBA an keine Strukturen im Hoden des nicht-geschlechtsreifen und geschlechtsreifen Kaninchens binden können, reagiert SJA sowie GSL-I mit dem akrosomalen System der Spermatozoen. SNA markiert das Bindegewebe und die Wände der Blutgefäße im geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Hoden. Wie im Kaninchenhoden, so bindet DBA nicht an Strukturen beim geschlechtsreifen Dromedar (Abd-Elmaksoud et al., 2008), beim Hund (Montkowski, 1992) sowie beim Pferd (Kuhrau, 1994). Für einige geschlechtsreife Spezies jedoch finden sich Bindestellen in den Keimzellen, wie bei der Ratte (Söderström et al., 1984; Malmi et al., 1990), bei der Maus (Lohr et al., 2010), beim Rind (Arya & Vanha-Perttula, 1985; Ertl & Wrobel, 1992; Abd-Elmaksoud, 2005) und beim Schwein (Pinart et al., 2001b; Pinart et al., 2002). SBA kann im Gegensatz zu den Kaninchen dieser Arbeit, die keinerlei Reaktionen zeigen, stets in den Keimzellen des geschlechtsreifen Tubulus seminifer contortus von Hamster (Pastor et al., 2003), Hund (Montkowski, 1992), Katze (Prem, 1992; Desantis et al., 2006), Pferd (Kuhrau, 1994), Ratte (Malmi et al., 1990), Rind (Arya & Vanha-Perttula, 1985; Ertl & Wrobel, 1992; Abd-Elmaksoud, 2005) sowie Schwein (Pinart et al., 2001b) binden. Wie beim Kaninchen, so reagiert GSL-I im Dromedarhoden (Abd-Elmaksoud et al., 2008) und im Rinderhoden (Abd-Elmaksoud, 2005) nur mit Spermatozoen. Beim geschlechtsreifen Hund (Montkowski, 1992) und bei der Katze (Prem, 1992, Desantis et al., 2006) hingegen sind mehrere Generationen von Keimzellen markiert. Das Lektin SNA färbt beim geschlechtsreifen Schwein die Leydig-Zellen und das Bindegewebe (Pinart et al., 2001a, Pinart et al., 2001b; Pinart et al., 2002), beim Hamster die Lamina propria und die Leydig-Zellen (Pastor et al., 2003), bei der Katze die Sertoli-Zellen und die Lamina propria (Desantis et al., 2005) sowie bei der geschlechtsreifen Maus die Spermatozoen, die Spermatozoen und die Leydig-Zellen (Lohr et al., 2010). Lektinmarkierte

Blutgefäßwände, wie beim Kaninchen, werden jedoch bei keiner anderen Tierart erwähnt (Maus: Lohr et al., 2010; Schwein: Pinart et al., 2002; Mensch: Arenas et al., 1998; Gheri et al., 2009). Als Vertreter der Gruppe V der L-Fukose bindenden Lektine wurde UEA-I untersucht, das beim Kaninchen keine Bindung im Hoden zeigt. Auch im Hoden des erwachsenen Hundes (Montkowski, 1992) konnten keine Bindungsstellen für UEA-I in den Gonaden nachgewiesen werden. Beim Hamster werden die Spermien und die Lamina propria (Pastor et al., 2003), beim geschlechtsreifen Schwein die Lamina propria und das Bindegewebe (Calvo et al., 2000; Pinart et al., 2001a) sowie beim geschlechtsreifen Dromedar (Abd-Elmaksoud et al., 2008) ausschließlich das Bindegewebe markiert. Aus der Gruppe VI der Lektine mit Bindungsstellen für Oligosaccharide wurden PHA-E sowie PHA-L verwendet. PHA-E und PHA-L färben die Zytoplasmastränge und Granula der Ammenzellen der geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Tiere. Durch PHA-E und PHA-L lassen sich in jeder Altersstufe die Leydig-Zellen darstellen, während durch PHA-E die Epithelien der Tubuli recti und des Rete testis im geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Hoden markiert werden. PHA-E kann bei der Maus an den Spermatisden binden, reagiert aber auch noch mit der Lamina propria, dem Bindegewebe und den Blutgefäßwänden (Lohr et al., 2010). PHA-L wiederum färbt die Spermatisden, die Blutgefäßwände und das Bindegewebe (Lohr et al., 2010). Betrachtet man die Strukturen und diejenigen Lektine, die an erstere binden können, so lässt sich für das geschlechtsreife Kaninchen folgendes zusammenfassen: die Lektine LCA, PSA, ConA (Gruppe I), WGA, WGAs (Gruppe III) sowie SNA (Gruppe IV) binden an Komponenten des Bindegewebes der Hodenkapsel, des Interstitiums sowie des Mediastinums. Die Lektine ConA und PSA (Gruppe I), WGA und WGAs (Gruppe II) sowie PHA-E und PHA-L (Gruppe VI) reagieren mit Granula, die im Zytoplasma der Leydig-Zellen liegen. Die Lektine ConA, PSA und LCA (Gruppe I), WGA und WGAs (Gruppe II) sowie SNA (Gruppe IV) zeigen eine Bindung an Strukturen der Blutgefäßwände. Die Lektine ConA, PSA und LCA (Gruppe I), WGA und WGAs (Gruppe II) sowie PHA-E und PHA-L (Gruppe VI) besitzen Bindungsstellen im Zytoplasma der Sertoli-Zellen. Dabei binden LCA und PSA (Gruppe I) sowie WGA, WGAs (Gruppe II) an Granula im Zytoplasma der Ammenzelle, PHA-E und PHA-L (Gruppe VI) an Processus. Die Markierung des adluminalen Anteils durch ConA und WGA scheint abhängig vom Keimepithelzyklus zu sein: sie wird im Laufe der zweiten Hälfte des

Keimepithelzykluses beobachtet. Dies beschreibt auch Kuhrau (1994) für ConA im Keimepithel des Pferdes. Arya und Vanha-Pertulla (1985) berichten ebenfalls über eine Bindung von ConA sowie WGA an Sertoli-Zellen im Hoden des Rindes, die abhängig vom Keimepithelzyklus ist: nach der Freisetzung der Spermien sind die apikalen Processus der Sertoli-Zellen markiert. In späteren Stadien indes ist eine Fluoreszenz nur im basalen Teil der Sertoli-Zellen zu beobachten. Die Lektine PSA und LCA (Gruppe I) sowie WGA und WGAs (Gruppe II) binden an Bestandteile der Lamina propria. Die Lektine LCA, PSA und ConA (Gruppe I), WGA und WGAs (Gruppe II) sowie PHA-E und PHA-L (Gruppe VI) markieren die Epithelzellen von Rete testis und von Tubuli recti im Hoden des geschlechtsreifen Tieres. Die Reaktion von ConA ist granulärer Natur, die das gesamte Zytoplasma der Epithelzelle betrifft, während LCA und PSA sowie WGA im luminalen Teil der Zelle im Bereich der Zellmembran binden. Die Lektine ConA, PSA, und LCA (Gruppe I) sowie WGA und WGAs (Gruppe II) reagieren mit Bindungsstellen in Spermatogonien und Spermatozyten. Die Lektine ConA, PSA, LCA (Gruppe I), VAA, RCA-I, PNA (Gruppe II), WGA und WGAs (Gruppe II), SJA sowie GSL-I (Gruppe IV) besitzen Bindungsstellen im akrosomalen System. Dabei können die oben bereits angesprochenen vier Erscheinungsmuster unterschieden werden: 1. Lektine, die während der gesamten Spermiogenese und darüber hinaus am fertigen Spermium am akrosomalen System binden können: WGA, WGAs (beide Gruppe II). Ein solches Bindungsverhalten beschreiben auch Abd-Elmaksoud (2005) beim Rind sowie Pastor et al. (2003) beim Hamster. 2. Lektine, die ab Beginn der Spermiogenese am akrosomalen System binden können, wobei die Bindung während den Differenzierungsvorgängen abnimmt und bei den Spermien nicht mehr oder nur unregelmäßig zu beobachten ist: VAA, RCA-I, PNA (alle Gruppe II), SJA (Gruppe IV). VAA kann entgegen den Ergebnissen am Kaninchenhoden bei den Tierarten Rind (Abd-Elmaksoud, 2005) und Maus (Lohr et al., 2010) während der gesamten Spermiogenese das akrosomale System markieren. Auch PNA bindet beim Hamster (Pastor et al., 2003), bei der Maus (Lohr et al., 2010) und beim Schwein (Calvo et al., 2000; Pinart et al., 2001a) während aller Phasen der Spermiogenese. Die Katze hingegen zeigt ein ähnliches Muster wie das Kaninchen. PNA kann hier nur runde Spermatiden markieren. 3. Lektine, die im Laufe der Entwicklung der runden Spermatide am akrosomalen System binden können und die Bindung auch beim fertigen Spermium bestehen bleibt: LCA

(Gruppe I). 4. Lektine, die am akrosomalen System der elongierten Spermatide und der Spermien binden können: ConA (Gruppe I), PSA (Gruppe I). Die Lektine LCA, PSA (Gruppe I), PNA (Gruppe II), WGA und WGAs (beide Gruppe III) markieren den Spermiumschwanz; PNA (Gruppe II) sowie WGAs (Gruppe III) besitzen Bindestellen am distalen Teil des Spermiumkopfes. Vergleicht man das Vorkommen und die Verteilung der 16 untersuchten Lektine im nicht-geschlechtsreifen und geschlechtsreifen Kaninchen ohne Berücksichtigung der Intensität der Reaktion, so lassen sich nur wenige Altersunterschiede feststellen. So färben LCA, PSA und ConA der Gruppe I die Epithelien der Tubuli recti und des Rete testis nicht aller nicht-geschlechtsreifer Tiere, wohl aber sämtlicher geschlechtsreifer Tiere. Unterschiede finden sich ferner in den Ammenzellen: ConA bindet an das apikale Zytoplasma des Tubulus seminifer contortus im geschlechtsreifen Tier, nicht hingegen an das im nicht-geschlechtsreifen Kaninchen, selbst wenn das Samenkanälchen Spermatisden aufweist. Da jedoch die Färbung im Laufe des Keimepithelzyklus mit der Differenzierung der elongierten Spermatisden und Spermien auftritt, ist im nicht-geschlechtsreifen Tier die Entwicklung der Keimepithelzellen wohl noch nicht weit genug fortgeschritten. Denkbar wäre auch eine ausschließliche Färbung der adulten Sertoli-Zelle. Für eine altersabhängige Reaktion eines Lektins in den Leydig-Zellen dürften die untersuchten Tiere bereits zu alt sein; auch in den anderen ultrastrukturellen und immunhistochemischen Untersuchungen finden sich für diese Zellart keine Unterschiede. Es sollte also, um etwaige Veränderungen in der Verteilung der Lektine aufzudecken, jüngere Kaninchenhoden glykohistochemisch untersucht werden. Für andere Strukturen, wie die Lamina propria und das Bindegewebe, mögen Unterschiede in der Reaktionintensität liegen. Diese wird in dieser Arbeit aber nur semiquantitativ erhoben. Eine Vergleichbarkeit ist daher eingeschränkt. Wünschenswert wäre hierfür eine quantitative Auswertung der Lektinbindung im Kaninchenhoden.

1. Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

Für den Nachweis von CK 5, CK 8, CK 14, CK 18, Panzytokeratin, α -SMA,

Vimentin und Progesteronrezeptor wurden ausschließlich Bouin-fixierte Schnitte verwendet, da die Bouin'sche-Lösung die Bindestellen für die Antikörper besser erhält als eine PBS-gepufferte 4% Formalin-Lösung: wie Latendresse et al. (2002) anmerken, wird die Bouin'sche Lösung von vielen Wissenschaftlern als Routine-Fixierung für den Hoden angesehen und empfohlen. Für die immunhistochemischen Nachweise wurde in meiner Arbeit die ABC-Methode nach Hsu et al. (1981) angewendet. Diese ist als sehr sensitiv angesehen und kann auch geringe Mengen an Antigenen im Gewebe anzeigen. Die benötigte Konzentration an Antikörpern kann daher reduziert werden, so dass unspezifische Signale seltener zu beobachten sind (Aescht & Büchl-Zimmermann, 2010b). Es wurden monoklonale (gegen CK8, CK18, Panzytokeratin, Progesteronrezeptor, α -SMA, Vimentin) sowie polyklonale Antikörper (gegen CK14, CK5) eingesetzt. Monoklonale Antikörper bieten eine hohe Spezifität, so dass die Hintergrundfärbung minimal ausfällt und die Färbung durch den Antikörper sehr exakt ausfällt (Aescht & Büchl-Zimmermann, 2010b). Allerdings binden die monoklonalen Antikörper nur an ein bestimmtes Epitop. Liegt dieses auch nur leicht modifiziert vor, entfällt eine Markierung (Aescht & Büchl-Zimmermann, 2010b). Dies muss bei polyklonale Antikörper nicht befürchtet werden, da sie in der Lage sind, an mehreren Epitopen des gesuchten Antigens zu binden. Dadurch aber können auch nicht beabsichtigte, falsch-positive Reaktionen hervorgerufen werden. Die Spezifität ist also niedriger einzuschätzen als bei monoklonale Antikörpern (Aescht & Büchl-Zimmermann, 2010b). Im Folgenden sollen die Ergebnisse meiner Dissertation mit den bisherigen Erkenntnissen früherer Arbeiten verglichen werden. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass sich die Studien in ihrem Aufbau und Durchführung (Zeitraum zwischen Tod und Gewinnung des Probematerials; Fixierung; monoklonale versus polyklonale Antikörper; unterschiedliche Protokolle etc.) unterscheiden und ein Vergleich zumindest erschwert wird. Bei der Auswertung der Ergebnisse meiner Arbeit wurde auf die Regelmäßigkeit, Gleichmäßigkeit sowie auf die Stärke der Reaktion geachtet. Dabei muss beachtet werden, dass letztere subjektiv eingeschätzt wurde.

4.1. “ α -smooth muscle actin” (α -SMA)

α -SMA stellt eine der sechs Isoformen des Aktins dar. Dies ist ein Baustein der Aktin- oder Mikrofilamente, die zum Zytoskelett der Zelle gezählt werden (Sinowatz, 2000a; Perrin & Ervasti, 2010; Welsch, 2010). α -SMA wird in glatten

Muskelzellen sowie in Myofibroblasten exprimiert und ist an der Bildung der kontraktilen Elemente involviert. Die möglichen Aufgaben der kontraktilen Zellen der Hodenkapsel wurden in der Diskussion über die Hodenkapsel angesprochen. In den Hoden der geschlechtsreifen Kaninchen zeigt sich eine Expression von α -SMA in den Myofibroblasten und glatten Muskelzellen der Hodenkapsel, der Blutgefäßwände, des Interstitiums, des Mediastinums, der Chordae retis, der Laminae propriae sowie desjenigen Gewebes, das die intratestikulären samenableitenden Wege umgab. Dabei werden die Tubuli seminiferi contorti komplett von kontraktilen Zellen umgeben, während die Terminalsegmente und die Tubuli recti nur unvollständig flankiert werden. In jedem Hoden ist die Reaktion um die Terminalsegmente stets anzutreffen, die um die Tubuli recti in der Mehrzahl der Fälle. Es scheinen also nicht alle Abschnitte des geraden Hodenkanälchens im geschlechtsreifen Kaninchenhoden von Myofibroblasten und glatten Muskelzellen umgeben zu sein; einige sind völlig frei davon. Ähnliches ergibt auch die Auswertung der Resorcin-fuchsin-van Gieson-Färbung in meiner Arbeit: hier kann nicht an jedem beobachteten Querschnitt eines geraden Hodenkanälchens elastische Fasern identifiziert werden. Nach meinem Wissen liegt bisher eine einzige Studie über die Verteilung von α -SMA im Hoden geschlechtsreifer Kaninchen vor: darin wurde das auch in dieser Arbeit beschriebene Vorkommen von α -SMA in der Hodenkapsel sowie im peritubulären Gewebe und in den Gefäßwänden erwähnt (Abd-Elmaksoud, 2009). Andere Strukturen wurden in seiner Arbeit nicht untersucht. Auch in der Hodenkapsel des erwachsenen Menschen wurde α -SMA identifiziert (Arena et al., 1994; Middendorff et al., 2002). Für andere Säuger liegen keine Ergebnisse vor. Arbeiten beim Rhesus-Affen (Schlatt et al., 1993), beim Hund (Egger & Witter, 2009), beim Lama (Rodríguez et al., 1999), beim Pferd (Höffer, 2008), bei der Ratte (Palombi et al., 1992), beim Rind (Abd-Elmaksoud, 2005), beim Schaf (Steger et al., 1994) und beim Menschen (Arena et al., 1997; Middendorff et al., 2002) wiesen bei jeder dieser Art α -SMA im peritubulären Gewebe des geschlechtsreifen Hodens nach. Dies stimmt überein mit der Aussage von Wrobel et al. (1979) sowie von Maekawa et al. (1996), nach der alle Säuger kontraktile Zellen in der Lamina propria besitzen. Wie bei den Kaninchen dieser Arbeit, so findet sich auch beim Rind (Abd-Elmaksoud, 2005), beim Pferd (Höffer, 2008) und beim Rhesus-Affen (Schlatt et al., 1993) α -SMA in den Blutgefäßwänden der geschlechtsreifen Hoden. Für andere Säuger liegen keine Aussagen vor. Glatte

Muskelzellen in den Wänden der Blutgefäße werden jedoch in den Lehrbüchern der Histologie der Haussäugetiere (Liebich, 1993) und der Menschen (Hees, 2000) beschrieben. α -SMA kann, wie auch hier beim Kaninchen, im Mediastinum von Hund (Egger & Witter, 2009), Lama (Rodríguez et al., 1999), Pferd (Höffer, 2008) und Rind (Abd-Elmaksoud, 2005), angetroffen werden. Allerdings sind die α -SMA-positiven Zellen beim geschlechtsreifen Rind in mehreren Schichten unter dem Rete testis-Epithel lokalisiert. Beim Kaninchen handelt es sich um eine geringere Menge, die nicht in Schichten organisiert ist und nicht nur epithelnah konzentriert, sondern im Mediastinum verteilt vorliegt. Wie beim Kaninchen, so befinden sich auch beim Pferd (Höffer, 2008), beim Rind (Abd-Elmaksoud, 2005) und beim Lama (Rodríguez et al., 1999), α -SMA-positiven Zellen in den subepithelialen Zellen der Tubuli recti. Offen bleibt die Frage, ob im Bindegewebe der Chordae retis von Menschen und Rindern α -SMA gefunden werden kann. Auch über das Vorhandensein von α -SMA im Interstitium des Hodens sowie im Gewebe rund um das Terminalsegment konnte in den bisherigen Arbeiten anderer Tierarten keine Aussagen gefunden werden. Die Expression von α -SMA in den nicht-geschlechtsreifen Kaninchenhoden variiert nur in wenigen Punkten von der in den geschlechtsreifen Kaninchenhoden: so konnte beim nicht-geschlechtsreifen Tier kein α -SMA in den Bindegewebskörpern der Chordae retis nachgewiesen werden. Ferner ist im Vergleich zum geschlechtsreifen Kaninchen α -SMA nur unregelmäßig und in sehr geringen Mengen um die Terminalsegmente und um die Tubuli recti vorhanden. Auch im Bindegewebe des Mediastinums im nicht-geschlechtsreifen Hoden war α -SMA verhältnismäßig selten nachzuweisen. Über die Verteilung von α -SMA im postnatalen Hoden des Kaninchens liegen keine Arbeiten vor. Leeson und Forman (1981) allerdings untersuchten die Entwicklung von kontraktilen Zellen in der Hodenkapsel und im peritubulären Gewebe des Kaninchens und kommen zu dem Schluss, dass diese erst mit 18 Wochen (Kapsel) bzw. mit 16 Wochen (Lamina propria) abgeschlossen ist. Diese Ergebnisse kann in meiner Arbeit weder lichtmikroskopisch noch immunhistochemisch nachvollzogen werden: der Nachweis von α -SMA in der Hodenkapsel in zwei senkrecht aufeinander stehender Schichten gelang in meiner Arbeit bereits bei Kaninchen mit 11 bzw. 12 Wochen. Auch das α -SMA der kontraktilen Zellen um den Tubulus seminifer contortus konnte in der vorliegenden Dissertation bereits bei 11 bzw. 12 Wochen alte Tieren beobachtet werden. Es konnten jedoch bei den hier untersuchten nicht-geschlechtsreifen

Kaninchen keine bzw. nur eine geringe Menge an α -SMA um die Terminalsegmente, um die Tubuli recti, im Mediastinum und in den Chordae retis gefunden werden. Es scheint also, dass die postnatale Entwicklung von α -SMA und damit auch die der kontraktilen Zellen in den hier untersuchten Kaninchen noch nicht abgeschlossen ist. Diese könnte nach einem bestimmten Muster abzulaufen: α -SMA in der Hodenkapsel und um die Tubuli seminiferi tritt in der postnatalen Entwicklung früher auf als um die Terminalsegmente, um die Tubuli recti, im Mediastinum und in den Chordae retis. Ein ähnliches Ergebnis findet sich in der Literatur für das Rind: bei dieser Tierart erreicht α -SMA im peritubulären Gewebe mit 5 Monaten das Level eines geschlechtsreifen Tieres, um die Tubuli recti und um die Rete testis-Kanäle hingegen erst mit 12 Monaten (Devkota et al., 2006).

4.2. Zytokeratin 5, 8, 14 und 18 sowie Panzytokeratin

Zytokeratine gehören den Intermediärfilamenten an, die wiederum zum Zytoskelett der Zelle gezählt werden (Sinowatz, 2000a; Gu & Coulombe, 2007). Sie sind die Grundbausteine der Keratinfilamente und finden sich in Epithelzellen sowie in Derivate der Epidermis (Sinowatz, 2000a; Welsch, 2010). Im Rahmen meiner Dissertation wurde das Vorkommen von CK 5, CK 8, CK 14, CK 18 sowie Panzytokeratin im Hoden der geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchen untersucht. Dabei zählen laut der aktuellen Einteilung der Zytokeratine nach Schweizer et al. (2006) CK 5 und CK 8 zu den Human Typ II Epithel Keratinen, CK 14 und CK 18 hingegen zu den Human Typ I Epithel Keratinen. In meiner Dissertation lassen sich beim geschlechtsreifen Kaninchen CK 5, CK 14, CK 18 sowie Panzytokeratin in den Epithelzellen der Tunica visceralis, der äußersten Schicht der Hodenkapsel, nachweisen. Auch die Epithelzellen der Tubuli recti, des Rete testis und der Chordae retis sind durch die gerade genannten Zytokeratin-Antikörper mit unterschiedlicher Intensität und Regelmäßigkeit anfärbbar. CK 5 konnte als einziges Keratin im Keimepithel des geschlechtsreifen Tieres nachgewiesen werden. Dort lässt sich eine punktförmige Färbung in den Zytoplasmen der runden und elongierten Spermatozoen sowie in den Restkörpern finden. Ferner konnte in Einzelfällen eine Markierung apikaler und basaler Anteile der Zytoplasmen von Sertoli-Zellen gefunden werden. CK 8 lässt sich mit dem verwendeten monoklonalen Antikörper nicht nachweisen. Die Positivkontrolle zeigt jedoch die erwartete Markierung, so dass ein Fehler im

Arbeitsprozess weitgehend ausgeschlossen werden kann. Es kommen also zwei Möglichkeiten in Betracht: entweder das Kaninchen besitzt keine Bindungsstellen für den Antikörper gegen CK 8 oder aber der verwendete Antikörper ist nicht in der Lage, an das Kaninchen-CK 8-Antigen zu binden. Dies liegt im Bereich des Möglichen, da ein monoklonaler Antikörper sehr spezifisch bindet und ein leicht verändertes Epitop, das das Kaninchen eventuell aufwies, nicht erkennen kann. In meiner Arbeit zeigen die geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchen in den positiv verlaufenden Nachweisen der CK 5, CK 14, CK 18 sowie Panzytokeratin keine Unterschiede in ihrer Reaktion mit folgender Ausnahme: CK 5 kann beim nicht-geschlechtsreifen Kaninchen weder in den Keimzellen noch in den Ammenzellen gefunden werden. Wahrscheinlich sind die Tiere mit runden Spermatiden noch nicht entwickelt genug, da ja auch bei den geschlechtsreifen Kaninchen die Markierung der runden Spermatiden erst ab Phase I zu identifizieren ist. Denkbar wäre auch, dass eine Expression von CK 5 durch Keimzellen erst bei einer Etablierung des Keimepithelzykluses auftritt, was bei den untersuchten Tieren noch nicht der Fall ist. Über das Vorkommen und die Verteilung von Zytokeratinen im Hoden des geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchens liegt mir nur eine Arbeit von Aumüller et al. (1992) vor. Ihnen gelang es, CK 18 in den Stützzellen des Kaninchens bis zum 84. Lebensstag nachzuweisen. Sie berichten, dass die Expression von CK 18 nicht schlagartig, sondern langsam zurückgefahren wird. Laut Aumüller et al. (1992) könnte die Einstellung der Expression des CK 18 nach der 12. Lebenswoche mit dem Beginn der Spermatogenese der Kaninchen, die sie zu dieser Zeit beobachten können, zusammenhängen. In meiner Arbeit konnte keine Reaktion nach Inkubation mit dem Antikörper gegen CK 18 im Hoden der nicht-geschlechtsreifen Kaninchen beobachtet werden. Eventuell befinden sich die hier untersuchten Tiere mit 11 bzw. 12 Wochen so weit in ihrer Entwicklung und in der Spermatogenese, dass die Ammenzelle die Expression von Keratin bereits eingestellt hat. Die Stützzellen der nicht-geschlechtsreifen Kaninchen werden auch durch keinen anderen Zytokeratin-Antikörper angefärbt. Allerdings findet sich in Einzelfällen eine Expression des CK 5 in den Sertoli-Zellen geschlechtsreifer Kaninchen. Die Zytokeratinexpression in adulten menschlichen Sertoli-Zellen, insbesondere die von CK 8 und CK 18, wird oftmals als pathogenes Zeichen angesehen (Stosiek et al., 1990; Rogatsch et al., 1996). Daher gilt in vielen Arbeiten über den menschlichen Hoden insbesondere CK 18 als

Marker für unreife oder geschädigte Gonaden (Stosiek et al., 1990; Steger et al., 1999; Bar-Shira Maymon et al., 2000). Adly und Hussein (2011) aber fanden beim Menschen CK 18 auch in adulten Sertoli-Zellen in Tubuli seminiferi contorti mit ungestörter Spermatogenese. Auch Miettinen et al. (1985) berichten in einer Untersuchung mit der Antikörper Kombination PKK1 (CK7, CK8, CK18, CK19) über das gelegentliche Vorkommen von Zytokeratinen in Sertoli-Zellen bei normaler Spermatogenese. Aumüller et al. (1992) beschreiben eine Expression des Zytokeratins 18 im Epithel des Rete testis des geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Nicht nur in den intratestikulären samenableitenden Wege im Kaninchenhoden lassen sich bestimmte Zytokeratine nachweisen, auch andere Tierarten, wie das geschlechtsreifer Lama, besitzen in den Epithelzellen der Tubuli recti und des Rete testis Bindungsstellen für unter anderem CK 5 und CK 14. CK 18 hingegen konnte beim Lama an dieser Struktur nicht nachgewiesen werden (Rodríguez et al., 1999). Auch in den Epithelzellen des Rete testis des geschlechtsreifen Menschen ist eine positive Reaktion auf CK 18 zu vermerken (Achtstätter et al., 1985; Miettinen et al., 1985). Das Reteepithel des Hundes reagiert ebenfalls positiv auf unter anderem CK 18 (Wakui et al., 1994). Neben den intratestikulären samenableitenden Wegen lässt sich in dieser Arbeit eine positive Reaktion durch den CK 5-Antikörper in den runden und elongierten Spermatischen der Kaninchen feststellen. CK 5 konnte auch in anderen Arbeiten über den Säugerhoden in dieser Keimzelle nachgewiesen werden (Kierszenbaum et al., 1996; Tres et al., 1996; Kierszenbaum, 2002). Die in meiner Arbeit beobachtete punktförmige Expression von CK 5 im Zytoplasma der Spermatischen bzw. in den Restkörpern lässt sich lichtmikroskopisch keiner Struktur zuordnen. Das Zytokeratin wird im Laufe der Spermiogenese exprimiert; da es aber im Restkörper, dem überschüssigen Teil des Zytoplasmas wieder abgegeben wird, scheint es für die fertige Spermie nicht mehr von Bedeutung zu sein.

4.3. Vimentin

Als weiteren Vertreter der Intermediärfilamente wurden das Vorkommen und die Verteilung von Vimentin im Kaninchen untersucht. Sowohl beim geschlechtsreifen wie auch beim nicht-geschlechtsreifen Tier exprimieren dieselben Zellarten Vimentin; hier findet sich also kein Altersunterschied. Dieses Intermediärfilament lässt sich im Zytoplasma der Sertoli-Zelle, der Leydig-Zelle

sowie in den Epithelzellen der Tubuli recti, des Rete testis und der Chordae retis nachweisen. Ferner exprimieren Fibroblasten, Myofibroblasten und glatte Muskelzellen im Interstitium, in der Hodenkapsel, im Mediastinum, in den Chordae retis das Intermediärfilament. Auch die Endothelzellen, Fibroblasten und kontraktilen Zellen der Blutgefäßwände sowie der Laminae propriae zeigen sich durch den Vimentin-Antikörper markiert. Über Vimentin im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens existiert nur eine Arbeit von Aumüller et al. (1992). Diese bestätigt die Expression von Vimentin in den Sertoli-Zellen und den Leydig-Zellen dieser Tierart, erwähnt andere Strukturen aber nicht. Vergleicht man die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse vom geschlechtsreifen Kaninchen mit denen anderer Tierarten, so gibt es große Übereinstimmung: alle bisher untersuchten geschlechtsreifen Säuger, unter anderem der Mensch (Miettinen et al., 1985; Virtanen et al., 1986; Aumüller et al., 1988; De Miguel et al., 1997), das Rind (Steger et al., 1994; Wrobel et al., 1995b), das Lama (Rodríguez et al., 1999), das Schaf (Tung et al., 1987; Steger et al., 1994;), das Pferd (Lydka et al., 2011), die Maus (Tanemura et al., 1994) und die Ratte (Virtanen et al., 1986) exprimieren in ihren Sertoli-Zellen Vimentin. Neben dem perinukleär gelegenen Vimentin-positiven Material, das bei allen gerade aufgeführten Tieren beschrieben wird, lässt sich Vimentin beim Kaninchen auch in den apikalen Zytoplasmasträngen der Sertoli-Zellen beobachten, ähnlich wie dies beim Pferd (Lydka et al., 2011), bei der Maus (Tanemura et al., 1994), bei der Ratte (Paranko et al., 1986; Zhu et al., 1997) und beim Menschen (De Miguel et al. (1997) der Fall ist. Geschlechtsreife Rinder und Schafe hingegen zeigen in ihren apikalen und lateralen Sertoli-Zell-Strängen kein Vimentin (Rind: Wrobel et al. 1995b; Devkota et al., 2006, Schaf: Steger et al., 1994). Bei den hier untersuchten Kaninchen lässt sich nicht entscheiden, ob die Vimentinexpression abhängig vom Keimepithelzyklus schwankt, wie dies auch bei der Ratte und beim Menschen zu beobachten ist (Ratte: Mali et al., 1987; Amlani & Vogl, 1988; Zhu et al., 1997; Mensch: Aumüller et al., 1988). Zwar ändern sich die Intensität der Färbung sowie die Länge der angefärbten Processus der Sertoli-Zellen, aber es lässt sich keine sichere Korrelation zu einer bestimmten Keimepithelphase aufstellen. Genau wie bei den hier untersuchten Kaninchen, so berichten auch Rodríguez et al. (1999) beim Lama, Miettinen et al. (1985) beim Menschen, Kopecky et al. (2005) bei der Ratte sowie Lydka et al. (2011) beim Pferd über Vimentin-positive Leydig-Zellen im geschlechtsreifen Hoden. Auch hier zeigt sich, wie beim

Kaninchen, das Intermediärfilament im Zytoplasma der Zelle. Wie beim Kaninchen, so kann auch bei der geschlechtsreifen Ratte (Virtanen et al., 1986) Vimentin in den Wänden der Blutgefäße identifiziert werden. Nicht nur die myoiden Zellen der Laminae propriae des Kaninchenhodens, auch die des Menschen (Virtanen et al., 1986; Arenas et al., 1997), der Ratte (Virtanen et al., 1986; Kopecky et al., 2005), des Pferdes (Lydka et al., 2011), des Rindes und des Schafes (Steger et al., 1994) zeigen eine Expression von Vimentin. Beim geschlechtsreifen Hund allerdings lässt sich nur in zwei der drei Lagen Vimentin nachweisen (Egger & Witter, 2009). Genau wie in der Hodenkapsel der Kaninchen, so lassen sich auch in der des Mannes Vimentin-positive Zellen, nämlich Fibroblasten sowie myoide Zellen, identifizieren (Arenas et al., 1997; Middendorff et al., 2002). Wie die Epithelzellen der intratestikulären samenableitenden Wege des Kaninchens, so exprimieren auch die Tubuli recti des Lamas (Rodríguez et al., 1999) sowie das Rete testis des Lamas (Rodríguez et al., 1999), des Schafes (Tung et al., 1987) und des Hundes (Wakui et al., 1994; Egger & Witter, 2008) im geschlechtsreifen Hoden Vimentin. Dabei wurde beim Lama eine besonders starke Reaktion im basalen Teil der Zellen beschrieben (Rodríguez et al., 1999). Dies konnte bei den Kaninchen meiner Arbeit nicht beobachtet werden. Beim Menschen liegen unterschiedliche Ergebnisse vor: während Dingens et al. (1991) eine Immunreaktion auf Vimentin beobachten konnten, berichten Achtstätter et al. (1985) über Vimentin-negative Reteepithelzellen. Ergebnisse über Vimentin im nicht-geschlechtsreifen Hoden des Kaninchens liegen nur von Aumüller et al. (1992) vor. Wie diese berichten, ist beim Kaninchen der Grad der Expression von Vimentin in der primitiven Stützzelle und in der adulten Sertoli-Zelle vergleichbar. Beim Rind (Devkota et al., 2006), beim Schaf (Steger & Wrobel, 1994) und bei der Ratte (Zhu et al., 1997) hingegen konnte eine Abnahme der Vimentinmenge festgestellt werden. Eine Veränderung im Grad der Expression für die in meiner Arbeit begutachteten Schnitte zu beurteilen fällt schwer, schließlich variiert die Intensität der Reaktion bei den geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Tiere schon innerhalb der Gruppe. Ferner handelt es sich lediglich um eine subjektive Einschätzung. Die übrigen Ergebnisse der hier untersuchten nicht-geschlechtsreifen Tiere konnte durch keine Kaninchenstudie bestätigt bzw. widerlegt werden. Allerdings berichten Devkota et al. (2006) bereits beim Kalb unter 4 Wochen über Vimentin in einigen Leydig-Zellen, in den peritubulären Myofibroblasten, in der Wand von Blutgefäßen, in den

Epithelzellen des Rete sowie der Tubuli recti. Es wäre sinnvoll, eine Untersuchung mit jüngeren Kaninchen durchzuführen, um die Entwicklung der Vimentinverteilung im frühen postnatalen Stadium zu untersuchen.

4.4. Progesteronrezeptor

Schließlich wurden in meiner Arbeit das Vorkommen und die Verteilung von Progesteronrezeptoren im Hodengewebe der Kaninchen näher untersucht. Im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens war eine Bindung des Progesteronrezeptor-Antikörpers an die elongierten Spermatozoen der Phasen V-VII erkennbar. Die Expression von Progesteronrezeptoren kann also erst in den späteren Phasen der Spermiogenese nachgewiesen werden. Dabei zeigen sich das gesamte Zytoplasma sowie das luminal gelegene Ende des Kerns, also der Übergang des zukünftigen Kopfes zum Schwanz, gefärbt. Die Restkörper reagieren negativ bzw. unregelmäßig schwach positiv bis deutlich positiv: zum Ende der Spermiogenese hin wird das überflüssige Zytoplasma und damit auch der dort lokalisierte Progesteronrezeptor als Restkörper abgeschnürt. Manche Rezeptoren scheinen bereits abgebaut worden zu sein und sind somit nicht mehr nachweisbar. Die Spermien zeigen eine Expression von Progesteronrezeptoren am Übergang Kopf-Schwanz, die schon an der Spermatozide zu sehen sind. Interessant wäre es in einer weiteren Untersuchung herauszufinden, ob ejakulierte Kaninchenspermien ebenfalls Progesteronrezeptoren besitzen oder ob sie während der Reifung im Nebenhoden abgebaut werden. Beim Pferd (Cheng et al., 1998), Menschen (Sha et al., 2005) und dem Hund (Sirivaidyapong et al., 2001) werden Progesteronrezeptoren auf Spermien, die im Nebenhoden ausgereift waren, exprimiert. Ergebnisse anderer Arbeiten über Progesteronrezeptoren im Kaninchenhoden liegen nicht vor. In den Untersuchungen anderer adulter Spezies weisen Schweine, Pferde, Mäuse und Menschen recht unterschiedliche Lokalisationen für den Progesteronrezeptor auf: die Sertoli-Zellen des Pferdes (Höffner, 2008) besitzen im Gegensatz zu den gerade aufgezählten Arten sowie zum Kaninchen Progesteronrezeptoren (Pferd: Höffner, 2008; Maus: Mensch: Schwein: Kohler et al., 2007). Die Leydig-Zellen des Pferdes exprimieren saisonal Progesteronrezeptoren (Höffner, 2008). Beim Menschen hingegen zeigen die Zwischenzellen entweder gar keine Immunfärbung (Düe et al., 1989) oder nur unregelmäßig (Lütjens et al., 2006; Sha et al., 2005). Die peritubulären Zellen des Pferdes, des Schweins und des Menschen weisen teilweise Progesteronrezeptoren

auf (Pferd: Höffner, 2008; Schwein: Kohler et al., 2007; Mensch: Lütjens et al., 2006). Im Pferdehoden exprimiert auch das Epithel des Rete testis Progesteronrezeptoren (Höffner, 2008). Für die Expression von Progesteronrezeptoren durch Keimzellen liegen unterschiedliche Ergebnisse vor: beim Pferd zeigen Spermatogonien, primäre und sekundäre Spermatozyten sowie runde Spermatisden eine positive Markierung für Progesteronrezeptoren, nicht jedoch elongierte Spermatisden sowie Spermien (Höffner, 2008). Die Maus exprimiert ebenfalls in den primären und sekundären Spermatozyten Progesteronrezeptoren (You et al., 2010). Das Schwein hingegen besitzt nur in Spermatogonien Rezeptoren für Progesteron (Kohler et al., 2007). Der Mensch verfügt laut Lütjens et al. (2006) über keine Progesteronrezeptoren in Keimzellen, während nach Sha et al. (2005) die Spermatogonien, die Spermatozyten sowie die runden Spermatisden des Menschen Rezeptoren für Progesteron besitzen. In meiner Dissertation konnten Progesteronrezeptoren ausschließlich in den Hoden geschlechtsreifer Kaninchen nachgewiesen werden, nicht jedoch in denen nicht-geschlechtsreifer Tiere; beim nicht-geschlechtsreifen Schwein (Kohler et al., 2007) und bei der Ratte (Weber et al., 2002) wurde die postnatale Entwicklung der Verteilung von Steroidrezeptoren näher untersucht: im Rattenhoden werden der Progesteronrezeptor in den Kernen von Spermatogonien, in Sertoli-Zellen sowie in Leydig-Zellen exprimiert (Weber et al., 2002). Im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Schweins verfügen Prä-spermatogonien über Progesteronrezeptoren, ebenso wie einige wenige peritubuläre myoide Zellen (Kohler et al., 2007). Prä-spermatogonien konnten in meiner Arbeit nicht mehr identifiziert werden; erstrebenswert wäre deshalb eine Untersuchung, die jüngere Kaninchen miteinbezieht, deren Keimzellen nicht so entwickelt waren, wie in der vorliegenden Arbeit.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Hoden von 15 nicht-geschlechtsreifen (11-12 Wochen) und 10 geschlechtsreifen (7-10 Monate), klinisch gesunden Kaninchen einer lichtmikroskopischen, ultrastrukturellen, glykohistochemischen sowie immunhistochemischen Analyse unterzogen. Der Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens wird von einer dreischichtigen Organkapsel umgeben: unter dem Epiorchium befindet sich die Tunica albuginea mit zwei senkrecht zueinander laufende Schichten von kontraktile Zellen. Die Tunica vasculosa verläuft beim Kaninchen parenchymseitig. In der Hodenkapsel liegen vereinzelt heterotope Leydig-Zellen. Von der Hodenkapsel aus laufen in der Mehrheit dünne, unvollständige Septen in Richtung Mediastinum. Die Septen unterteilen das Hodenparenchym in meist undeutliche Läppchen. In letzteren finden sich das intertubuläre Kompartiment sowie die Tubuli seminiferi contorti mit der Lamina propria und dem Keimepithel. Letzteres beheimatet die Sertoli-Zellen sowie die Keimzellen. Beim geschlechtsreifen Kaninchen können acht Phasen des Keimepithelzykluses beschrieben werden. Als Grundlage der Einordnung dienen dabei die verschiedenen Phasen der Meiose, die Lage der Zellen im Keimepithel sowie die Morphologie der Spermatidenkerne. Eine signifikante Veränderung der Höhe des Keimepithels abhängig vom Keimepithelzyklus konnte dabei nicht festgestellt werden. Die die Hodenkanälchen umgebende Lamina propria der Kaninchen ist aus vier Schichten (Lamina basalis und kollagene Fasern, Stratum myoideum, kollagene Fasern, Fibroblasten) aufgebaut, wobei das Stratum myoideum aus einer einzigen Lage myoider Zellen besteht. Die spermienableitenden intratestikulären Wege des Kaninchens setzen sich aus Terminalsegmente, Tubuli recti sowie Rete testis zusammen. Die Terminalsegmente umfassen beim Kaninchen einen ersten Abschnitt mit einem reduziertem Tubulusdurchmesser, typischen Sertoli-Zellen und unvollständiger Keimzellpopulation, einem zweiten Abschnitt mit modifizierten Sertoli-Zellen sowie unregelmäßig einen dritten Abschnitt mit einer leichten Protrusion des Zytoplasmas der modifizierten Sertoli-Zellen in den Tubulus rectus hinein. Die Tubuli recti beginnen ohne kelchartige Erweiterung. Ihr Epithel ist in proximalen Abschnitten kubisch, in distalen Abschnitten auch hochprismatisch. Das Rete testis des Kaninchens besteht aus anastomisierenden

Kanäle, die ein einschichtig-kubisch bis hochprismatischen Epithel aufweisen und liegt im Mediastinum testis zentral im Hoden. In den Lumina des Rete testis liegen beim Kaninchen Chordae retis aus bindegewebigen Strängen mit Blutgefäßen und elastischen sowie kontraktilen Zellen, die von einem einschichtig-kubischen Epithel begrenzt werden. Im bindegewebigen Mediastinum testis mit Blut- und Lymphgefäßen, elastischen Fasern und Myofibroblasten/glatte Muskelzellen liegen vereinzelt heterotope Leydig-Zellen. Die intertubuläre Räume beinhalten neben wenigen eosinophilen Granulozyten und Mastzellen sowie Blut- und Lymphgefäßen die steroidproduzierenden Leydig-Zellen. Die Morphologie des Hodens des geschlechtsreifen Kaninchens stimmt somit weitgehend mit den Beschreibungen anderer adulten Säuger überein. Abweichend von den meisten Säugern besitzt das Kaninchen Chordae retis in den Kanälen des Rete testis sowie heterotope Leydig-Zellen in der Hodenkapsel und im Mediastinum. Auch die große Menge an Myofibroblasten und glatten Muskelzellen in zwei senkrecht aufeinander stehenden Schichten in der Hodenkapsel kann als artspezifisch betrachtet werden. Der Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens weist im Prinzip denselben Aufbau wie die Gonade des geschlechtsreifen Tieres auf; allerdings besitzt die dreischichtige Organkapsel eine signifikant geringere Dicke als die der geschlechtsreifen Tiere. Die Tubuli seminiferi contorti der nicht-geschlechtsreifen Kaninchen besitzen einen signifikant geringeren Durchmesser als die der geschlechtsreifen Tiere. Die Kanalisierung der gewundenen Hodenkanälchen hat bei jedem nicht-geschlechtsreifen Tier begonnen, ist aber bei keinem beendet. Die Keimzellbildung hat bei jedem der nicht-geschlechtsreifen Tiere eingesetzt und ist bis zur Spermiogenese fortgeschritten; letztere ist bei keinem der nicht-geschlechtsreifen Tiere vollendet. Die Tubuli recti und die Rete testis-Kanäle sind in den untersuchten Hoden der nicht-geschlechtsreifen Kaninchen bereits vollständig kanalisiert. Das Vorkommen und die Verteilung von Kohlehydratstrukturen in den Gonaden der geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchen wurden anhand 16 Lektine aus 6 Lektingruppen untersucht. Für diese glykohistochemische Untersuchung wurden sowohl FITC-markierte Lektine (ConA, LCA, PSA, RCA-I, PNA, WGA, WGAs, GSL-I, DBA, SBA, SJA, UEA-I, PHA-E, PHA-L) als auch biotinylierte Lektine (VAA, SNA) verwendet. Es konnten Bindungsstellen von den Lektinen LCA, PSA, ConA, WGA, WGAs, SNA, PHA-E, PHA-L, VAA, RCA-I, PNA, SJA sowie GSL-I im

Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens nachgewiesen werden. Für das Bindungsverhalten der Lektine am akrosomalen System werden vier Muster diskutiert. Im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens reagieren die Lektine LCA, PSA, ConA, PHA-E, PHA-L, WGA, WGAs, RCA-I, VAA und SNA mit Bestandteilen des Hodens. In der immunhistochemischen Analyse wurde das Vorkommen und die Verteilung des Progesteronrezeptors sowie einiger Komponenten des Zytoskeletts (CK 5, CK 8, CK 14, CK 18, Panzytokeratin, Vimentin, α -SMA) näher untersucht. Für die immunhistochemischen Untersuchung der geschlechtsreifen und nicht-geschlechtsreifen Kaninchen wurden monoklonale Antikörper (CK 8, CK 18, Panzytokeratin, Progesteronrezeptor, Vimentin, α -SMA) als auch polyklonale Antikörper (CK 5, CK 14) herangezogen. Für den immunhistochemischen Nachweis wurde die Avidin-Biotin-Complex-Methode gewählt. Im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens kann α -SMA in der Hodenkapsel, in Blutgefäßwänden, in der Lamina propria, im Interstitium, im Mediastinum, in Chordae retis sowie im Großteil des Gewebes um die intratestikulären samenableitenden Wege nachgewiesen werden. Dabei werden die gewundenen Hodenkanälchen vollständig und die Terminalsegmente und Tubuli recti unvollständig von α -SMA-positiven Zellen umgeben. CK 5, CK 14 sowie CK 18 werden von den Epithelzellen der Tunica vaginalis, der Tubuli recti, des Rete testis sowie der Chordae retis exprimiert. CK 5 und CK 14 markieren die Wände der Blutgefäße. CK 5 wird vereinzelt in Sertoli-Zellen sowie regelmäßig in runden und elongierten Spermatozoen beobachtet. Eine Expression des Intermediärfilaments Vimentin zeigen neben Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen auch die Epithelzellen des Tubulus rectus, des Rete testis sowie der Chordae retis. Ferner besitzt das Interstitium, die Hodenkapsel, das Mediastinum und Chordae retis Vimentin-positive Zellen. Ebenfalls immunreaktiv zeigen sich Blutgefäßwände und die Lamina propria. Antikörper gegen Progesteronrezeptoren können regelmäßig an der elongierten Spermatozoid der Phase V-VII sowie am Schwanz des Spermiums binden. Im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens kann eine Expression von α -SMA in der Hodenkapsel, in Blutgefäßwänden, in der Lamina propria sowie im Interstitium nachgewiesen werden. α -SMA kann nicht bzw. nur in geringen Mengen um die Terminalsegmente, um die Tubuli recti und im Mediastinum testis beobachtet werden. CK 5, CK 14 sowie CK 18 lassen sich in den Epithelzellen des Epididymiums, der Tubuli recti, des Rete testis sowie der Chordae retis

nachweisen. CK 5 und CK 14 werden in Blutgefäßwänden exprimiert. Vimentinfilamente können in den Epithelzellen der Tubuli recti, des Rete testis, der Chordae testis sowie in Ammenzellen und Leydig-Zellen nachgewiesen werden. Auch Zellen des Interstitiums, der Hodenkapsel, des Mediastinums und der Chordae testis exprimieren Vimentin. Ebenfalls immunreaktiv präsentieren sich Blutgefäßwände und die Lamina propria. Progesteronrezeptoren können immunhistochemisch im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens nicht nachgewiesen werden.

VII. SUMMARY

Lightmicroscopical, ultrastructural, glycohistochemical, and immunohistochemical studies of the testis of the sexually immature and mature rabbit (*Oryctolagus cuniculus f. dom*)

This study describes the testis morphology of the immature and mature rabbits. The testes of 15 immature (11-12 weeks) and 10 mature (7-10 months) healthy rabbits were investigated using light microscopical, electron microscopical, glycohistochemical and immunohistochemical methods. The testis of the adult rabbit is covered by the testicular capsule, which consists of three distinct layers (epiorchium/tunica albuginea/tunica vasculosa). In the capsule of the rabbit, occasional heterotopic Leydig cells are present. Thin and mostly incontinuous septa extend from the capsule to the mediastinum testis, dividing the testicular parenchyma into mostly incomplete lobules. Each of these lobules is composed of some seminiferous tubules and the interstitial tissue. The epithelium of the seminiferous tubules is composed of Sertoli cells and the different generations of spermatogenic cells (spermatogonia, spermatocytes, spermatids, spermatozoa). In the rabbit, the seminiferous epithelium cycle can be divided into eight different stages. Each convolutes seminiferis tubule is surrounded by a distinct lamina propria. The intratesticular excurrent duct system of the rabbit is composed of terminal segments, tubuli recti and rete testis. Contrary to many other mammals, the tubuli recti of the adult rabbit do not show a funnel-shaped enlargement at their beginning. The rete testis of the rabbit is situated in the mediastinum testis in the centre of the testis. The interstitial tissue contains few eosinophil granulocytes, mast cells, blood-and lymph vessels as well as the testosterone producing Leydig cells. The structure of the adult rabbit testicle corresponds in most aspects to that of other mammals. As a difference to many other animals, the rabbit possess few heterotopic Leydig cells in the testicular capsule and in the mediastinum testis, and chordae retis in the lumina of the rete testis channels, Additionally, a high amount of contractile cells can be observed in the rabbit's testicular capsule. The histological organization of the immature rabbit studied in this thesis is already very similar to that of the adult buck with some exceptions: the testicular capsule of the immature rabbit is significantly thinner than that of the mature animals. The

seminiferous tubules of the adult are significantly larger in diameter than that of the immature rabbit. In the immature rabbits studied, some of the convoluted tubules start to form a lumen, but none of the animals showed a completed canalization of the tubuli seminiferi contorti. In all examined immature rabbits, some, but not all, of the seminiferous epithelium displayed active spermatogenesis. The cellular distribution of glycoconjugates within the immature and mature testis was investigated using 16 lectins. For the glycohistochemical studies both FITC-marked lectins (ConA, LCA, PSA, RCA-I, PNA, WGA, WGAs, GSL-I, DBA, SBA, SJA, UEA-I, PHA-E, PHA-L) and biotinylated lectins (VAA, SNA) were used. For ConA, LCA, PSA, RCA-I, VAA, PNA, WGA, WGAs, GSL-I, SJA, PHA-E, PHA-L, a specific binding pattern in the adult testes was demonstrated. For staining the spermatid and sperm acrosomes, four patterns are discussed. In the immature testis, a positive reaction could be found for ConA, LCA, PSA, RCA-I, VAA, PNA, WGA, WGAs, GSL-I, SJA, SNA, PHA-E and PHA-L. In the immunohistochemical studies, the distributions of keratin 5, 8, 14, 18, pancytokeratin, vimentin, α -SMA and progesterone receptor were investigated using the Avidin-Biotin-Complex-method. In the adult testes, α -SMA can be detected in cells of the testicular capsule, blood vessels, laminae propriae, intertubular tissue, mediastinum testis and chordae retis. α -SMA is also observed in the boundary tissue of the intratesticular excurrent duct system. The convoluted tubules are completely, the terminal segments and tubuli recti incompletely surrounded by α -SMA positive cells. Keratin 5, 14 and 18 is localized to the epithelium of the epididymium, tubuli recti, rete testis and chordae retis. Blood vessels express keratin 5 and 14. Keratin 5 stains specifically round and elongated spermatids. Vimentin is detectable in Sertoli cells, Leydig cells, and in the epithelium of tubuli recti, rete testis, and chordae retis. It is additionally localized in the testicular capsule, mediastinum testis, chordae retis, and intertubular tissue. The walls of blood vessels and the laminae propriae are also marked. In the adult, an expression of the progesterone receptor can be proved in the elongated spermatid and in the spermatozoon tail. In the immature testis, α -SMA was found in the contractile cells of the testicular capsule, blood vessels, laminae propriae, and intertubular tissue. α -SMA can rarely be seen in the cells of the tissue surrounding the terminal segments, tubuli recti and mediastinum testis. Immunostaining of keratin 5, 14 and 18 is localized in the epithelium of the epididymium, tubuli recti, rete testis and chordae retis. Walls of blood vessels

express keratin 5 and 14. Vimentin immunoreactivity is observed in supporting cells, Leydig cells and in the epithelium of tubuli recti, rete testis and chordae retis. Additionally, it is found in the testicular capsule, mediastinum testis, chordae retis, and intertubular tissue. The walls of blood vessels and the laminae propriae are also stained. In the immature testis, no cells exhibit expression of the progesterone receptor.

VIII. VERZEICHNISSE

1. Literaturverzeichnis

- Abd-Elmaksoud, A. (2005).** *Morphological, glycohistochemical, and immunohistochemical studies on the embryonic and adult bovine testis.* Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, München.
- Abd-Elmaksoud, A. (2009).** Comparative expression of laminin and smooth muscle actin in the testis and epididymis of poultry and rabbit. *Journal of Molecular Histology*, 40, 407-416.
- Abd-Elmaksoud, A., Sayed-Ehmed, A., Kassab, M. & Aly, K. (2008).** Histochemical mapping of glycoconjugates in the testis of the one humped camel (*Camelus dromedarius*) during rutting and non-rutting seasons. *Acta Histochemica*, 110, 124-133.
- Abdel-Raouf, M. (1960).** The postnatal development of the reproductive organs in bulls with special reference to puberty. *Acta Endocrinologica (Suppl 49)*, 34, 9-109.
- Abou-Haila, A. & Tulsiani, D.R.P. (2000).** Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379, 173-182.
- Achtstätter, T., Moll, R., Moores, B. & Franke, W.W. (1985).** Cytokeratin polypeptide patterns of different epithelia of the human male urogenital tract: immunofluorescence and gel electrophoretic studies. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33, 415-426.
- Adly, M.A. & Hussein, M.R.A. (2011).** Expression of cytokeratin 10 protein in the human testis showing normal and abnormal spermatogenesis. *Ultrastructural Pathology*, 35, 209-213.
- Aescht, E. & Büchl-Zimmermann, S. (2010a).** Färbungen. In M. Mulisch & U. Welsch (Hrsg.), *Romeis-Mikroskopische Technik* (18. Auflage). (S. 181-297) Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Aescht, E. & Büchl-Zimmermann, S. (2010b).** Immunlokalisation. In M. Mulisch & U. Welsch (Hrsg.), *Romeis-Mikroskopische Technik* (18. Auflage). (S. 387-417) Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Aguilar, R. Antón, F., Bellido, C., Aguilar, E. & Gaytan, F. (1995).** Testicular serotonin is related to mast cells but not to Leydig cells in the rat. *Journal of Endocrinology*, 146, 15-21.
- Allison, R.T. (1987).** The effects of various fixatives on subsequent lectin binding to tissue sections. *Histochemical Journal*, 19, 65-74.
- Amann, R.P., Koefoed-Johnsen, H.H. & Levi, H. (1965).** Excretion pattern of labelled spermatozoa and the timing of spermatozoa formation and epididymal transit in rabbits injected with thymidine-³H. *Journal of Reproduction and Fertility*, 10, 169-183.
- Amlani, S. & Vogl, A.W. (1988).** Changes in the distribution of microtubules and intermediate filaments in mammalian Sertoli cells during spermatogenesis. *Anatomical Record*, 220, 143-160.
- Anton, H. (1987).** *Vergleichende Untersuchungen über die Entwicklung des Rete testis und Rete ovarii beim Rind (Bos primigenius taurus f. taurus).* Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, München.
- Anton, F., Morales, C., Aguilar, R., Bellido, C., Aguilar, E. & Gaytan, F. (1998).** A comparative study of mast cells and eosinophil leukocytes in the mammalian testis. *Zentralblatt für Veterinärmedizin A*, 45, 209-218.

- Aponte, P.M., Rooij, D.G. & Bastidas, P. (2005).** Testicular development in Brahman bulls. *Theriogenology*, 64, 1440-1455.
- Appert, A., Fridmacher, V., Loquet, O. & Magre, S. (1998).** Patterns of keratin 8, 18 and 19 during gonadal differentiation in the mouse: sex- and time-dependent expression of keratin 19. *Differentiation*, 63, 273-284.
- Arenas, M.I., Bethencourt, F.R., Fraile, B. & Paniagua, R. (1997).** Immunocytochemical and quantitative study of the tunica albuginea testis in young and ageing men. *Histochemistry and Cell Biology*, 107, 469-477.
- Arenas, M.I., Madrid, J.F., Bethencourt, F.R., Fraile, B. & Paniagua, R. (1998).** Lectin histochemistry of the human testis. *International Journal of Andrology*, 21, 332-342.
- Aretz, K. (2008).** *Rassekaninchen Oryctolagus cuniculus f. dom.* Münster: Natur und Tier-Verlag.
- Arya, M. & Vanha-Perttula, T. (1984).** Distribution of lectin binding in rat testis and epididymis. *Andrologia*, 16, 495-508.
- Arya, M. & Vanha-Perttula, T. (1985).** Lectin-binding pattern of bull testis and epididymis. *Journal of Andrology*, 6, 230-242.
- Ariyaratne, H.B.S., Mason, J.I. & Mendis-Handagama, S.M.L.C. (2000).** Effects of tri-iodothyronone on testicular interstitial cells and androgen secretory capacity of the prepubertal rat. *Biology of Reproduction*, 63, 493-502.
- Asdell, S.A. (1946).** *Patterns of mammalian reproduction.* Ithaca, New York: Comstock.
- Aughey, E. & Frye, F. (2001).** *Comparative veterinary histology with clinical correlates.* London: Manson Publishing.
- Aumüller, G., Schulze, C. & Viebahn, C. (1992).** Intermediate filaments in Sertoli cells. *Microscopy Research and Technique*, 20, 50-72.
- Aumüller, G., Steinbrück, M., Krause, W. & Wagner, H.-J. (1988).** Distribution of vimentin-type intermediate filaments in Sertoli cells of the human testis, normal and pathologic. *Anatomy and Embryology*, 178, 129-136.
- Baccetti, B., Bigliardi, E., Talluri, M.V. & Burrini, A.G. (1983).** The Sertoli cell in lizards. *Journal of Ultrastructural Research*, 85, 11-23.
- Bader, H. (2001).** Physiologie und Pathologie der Kopulation. Andrologie beim Hengst. In W. Busch & A. Holzmann (Hrsg.), *Veterinärmedizinische Andrologie. Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren* (S. 347-364). Stuttgart/New York: Schattauer.
- Baker, M.L., Metcalfe, S.A. & Hutson, J.M. (1990).** Serum levels of mullerian inhibiting substance in boys from birth to 18 years, as determined by enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 70, 11-14.
- Banks, W.J. (1981).** *Applied Veterinary Histology.* Baltimore/London: Williams & Wilkins.
- Banks, F.C.L., Knight, G.E., Calvert, R.C., Turmaine, M., Thompson, C.S., Mikhailidis, D.P. et al. (2006).** Smooth muscle and purinergic contraction of the human, rabbit, rat, and mouse testicular capsule. *Biology of Reproduction*, 74, 473-480.
- Bar-Shira Maymon, B., Paz, G., Elliott, D.J., Hammel, I., Kleiman, S.E., Yogev, L. et al. (2000).** Maturation phenotype of Sertoli cells in testicular biopsies of azoospermic men. *Human Reproduction*, 15, 1537-1542.
- Bardin, C.W., Cheng, C.Y., Musto, N.A. & Gunsalus, G.L. (1988).** The Sertoli cell. In E. Knobil & J.D. Neill (Hrsg.), *The physiology of reproduction.* Vol 1. (S. 933-974). New York: Raven Press.
- Bedford, J. M. (1965).** Changes in fine structure of the rabbit sperm head during passage through the epididymis. *Journal of Anatomy*, 99, 891-906.

- Bedford, J. M. & Nicander, L. (1971).** Ultrastructural changes in the acrosome and sperm membranes during maturation of spermatozoa in the testis and epididymis of the rabbit and monkey. *Journal of Anatomy*, 108, 527-543.
- Benecke, N. (2001).** *Der Mensch und sein Haustier. Die Geschichte einer Jahrtausendalten Beziehung.* Stuttgart: Theiss.
- Berger, M., Jean-Faucher, CH., de Turckheim, M., Veyssiere, G., Blanc, M.R., Poirier, J.C. et al. (1982).** Testosterone, luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in plasma of rabbit from birth to adulthood. Correlation with sexual and behavioural development. *Acta Endocrinologica*, 99, 459-465.
- Bergmann, M. (2005).** Spermatogenese. Physiologie und Pathophysiologie. *Urologe*, 44, 1131-1138.
- Bergmann, M., Schindelmeiser, J. & Greven, H. (1984).** The blood-testis barrier in vertebrates having different testicular organization. *Cell and Tissue Research*, 238, 145-150.
- Berndtson, W.E., Igboeli, G. & Pickett, B.W. (1987).** Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. *Journal of Animal Science*, 64, 241-246.
- Bielańska-Osuchowska, Z. & Sysa, P.S. (1981).** Ultrastructure of the bull seminiferous tubule supporting cells with special consideration of the cell junctions. *Anatomia Histologia Embryologia*, 10, 370-387.
- Bignold, L.P. (1995).** The eosinophil leucocyte: controversies of recruitment and function. *Experientia*, 51, 317-327.
- Blanco-Rodríguez, J. (2002).** Deoxyribonucleic acid replication and germ cell apoptosis during spermatogenesis in the rabbit. *Journal of Andrology*, 23, 182-187.
- Bloom, W. & Fawcett, D.W. (1968).** *A Textbook of Histology.* Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- Bloom, W. & Fawcett, D.W. (1986).** *A Textbook of Histology* (9. Auflage) Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Böck, P., Breitenecker, G. & Lunglmayr, G. (1972).** Kontraktile Fibroblasten (Myofibroblasten) in der Lamina propria der Hodenkänäälchen vom Menschen. *Cell and Tissue Research*, 133, 519-527.
- Boyd, W.C. & Shapleigh, E. (1954).** Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119, 419.
- Breucker, H., Schäfer, E. & Holstein, A.-F. (1985).** Morphogenesis and fate of the residual body in human spermiogenesis. *Cell and Tissue Research*, 240, 303-309.
- Brissie, R.M., Spicer, S.S. & Thompson, N.T. (1975).** The variable fine structure of elastin visualized with Verhoeff's iron hematoxylin. *Anatomical Record*, 181, 83-94.
- Burgos, M.H. & Fawcett, D.W. (1955).** Studies on the fine structure of the mammalian testis. I. Differentiation of the spermatids in the cat (*Felis Domestica*). *Journal of Biophysical & Biochemical Cytology*, 1, 287-300.
- Bustos-Obregón, E. & Courot, M. (1974).** Ultrastructure of the lamina propria in the ovine seminiferous tubule. *Cell and Tissue Research*, 150, 481-492.
- Bustos-Obregón, E. & Holstein, A.-F. (1973).** On structural patterns of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Zeitung für Zellforschung*, 141, 413-425.
- Bustos-Obregón, E. & Holstein, A.-F. (1976).** The rete testis in man: ultrastructural aspects. *Cell and Tissue Research*, 175, 1-15.
- Calvo, A., Pastor, L.M., Bonet, S., Pinart, E. & Ventura, M. (2000).**

- Characterization of the glycoconjugates of boar testis and epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120, 325-335.
- Carreau, S., Bouraima-Lelong, H. & Delalande, C. (2011).** Estrogens-new players in spermatogenesis. *Reproductive Biology*, 11, 174-193.
- Carreau, S., Silandre, D., Bourguiba, S., Hamden, K., Said, L. et al. (2007).** Estrogens and male reproduction: a new concept. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40, 761-768.
- Castro, A.C.S., Berndtson, W.E. & Cardoso, F.M. (2002).** Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35, 493-498.
- Cavicchia, J.C. & Burgos, M.H. (1977).** Tridimensional reconstruction and histology of the intratesticular seminal pathway in the hamster. *Anatomical Record*, 187, 1-10.
- Chacon-Arellano, J. & Wooley, D. (1980).** Smooth muscle cells in the testicular capsule of the horse, pig and sheep. *Journal of Anatomy*, 131, 263-273.
- Chemes, H.E. (2001).** Infancy is not a quiescent period of testicular development. *International Journal of Andrology*, 24, 2-7.
- Chen, H., Ge, R.-S. & Zirkin, B.R. (2009).** Leydig cells: from stem cells to aging. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 306, 9-16.
- Chen, C.L. & Madigan, M.B. (1987).** Regulation of testicular proopiomelanocortin gene expression. *Endocrinology*, 121, 590-596.
- Chen, H., Stanley, E., Jin, S. & Zirkin, B.R. (2010).** Stem Leydig cells: from fetal to aged animals. *Birth Defects Research (Part C)*, 90, 272-283.
- Cheng, C.Y., Gadella, B.M., Voorhout, W.F., Fazeli, A., Bevers, M.M. & Colenbrander, B. (1998).** Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. *Biology of Reproduction*, 59, 733-742.
- Cheng, C.Y., Mruk, D., Silvestrini, B., Bonanomi, M., Wong, C.-H. & Siu, M.K. (2005).** AF-2364 [1-(2, 4-dichlorobenzyl)-1H-indazole-3-carbohydrazide] is a potential male contraceptive: a review of recent data. *Contraception*, 72, 251-261.
- Cheng, C.Y. & Mruk, D.D. (2009).** An intracellular trafficking pathway in the seminiferous epithelium regulating spermatogenesis: a biochemical and molecular perspective. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44, 245-263.
- Collin, O., Damber, J.-E. & Bergh, A. (1996).** 5-Hydroxytryptamine-a local regulator of testicular blood flow and vasomotion in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 106, 17-22.
- Connell, C.J. & Christensen, A.K. (1975).** The ultrastructure of the canine testicular interstitial tissue. *Biology of Reproduction*, 12, 368-382.
- Costa, J.J., Weller, P.F. & Galli, S. J. (1997).** The cells of the allergic response. Mast cells, basophils and eosinophils. *Journal of the American Medical Society*, 278, 1815-1822.
- Chrenek, P., Makarevich, A.V., Kubovičová, E. & Pivko, J. (2009).** Morphology of testes from transgenic rabbits: histological and ultrastructural aspects. *Anatomia Histologia Embryologia*, 39, 27-33.
- Christl, H.-W. (1990).** The lamina propria of vertebrate seminiferous tubules: a comparative light and electron microscope investigation. *Andrologia*, 22, 85-94.
- Chubb, C., Ewing, L., Irby, D. & Desjardins, C. (1978).** Testicular maturation in the rabbit: secretion of testosterone, dihydrotestosterone, 5 α -Androstan-3 α , 17 β -diol and 5 α -Androstan-3 β , 17 β -diol by perfused rabbit testes-epididymides

and spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 18, 212-218.

Clermont, Y. (1958). Contractile elements in the limiting membrane of the seminiferous tubules of the rat. *Experimental Cell Research*, 15, 438-440.

Clermont, Y. (1963). The cycle of seminiferous epithelium in man. *American Journal of Anatomy*, 112, 35-51.

Clermont, Y. & Leblond, C.P. (1955). Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the "Periodic acid-schiff" technique. *American Journal of Anatomy*, 96, 229-254.

Clermont, Y. & Perey, B. (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *American Journal of Anatomy*, 100, 241-267.

Cole, H.H. & Cupps, P.T. (1977). *Reproduction in domestic animals*. New York/London: Academic Press.

Connell, C.J. (1976). A scanning electron microscope study of the interstitial tissue of the canine testis. *Anatomical Record*, 185, 389-402.

Courtens, J.-L., Biggiogera, M., Rothfield, N.F., Burnier, M. & Fakan, S. (1992). Migration of centromere proteins in rabbit spermatids. *Molecular Reproduction and Development*, 32, 369-377.

Crabo, B. (1963). Fine structure of the interstitial cells of the rabbit testes. *Zeitschrift für Zellforschung*, 61, 587-604.

Curtis, S.K. & Amann, R.P. (1981). Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. *Journal of Animal Science*, 53, 1645-1657.

Davidoff, M.S., Middendorff, R., Müller, D. & Holstein, A.-F. (2009). The neuroendocrine Leydig cells and their stem cells progenitors, the pericyte. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 205, 1-107.

Davidoff, M.S., Breucker, H., Holstein, A.-F. & Seidl, K. (1990). Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell and Tissue Research*, 262, 253-261.

Davidoff, M.S., Schulze, W., Middendorff, R. & Holstein, A.-F. (1993). The Leydig cell of the human testis-a new member of the diffuse neuroendocrine system. *Cell and Tissue Research*, 271, 429-439.

Davis, J.R., Langford, G.A. & Kirby, P.J. (1970). The testicular capsule. In A. D. Johnson, W. R. Gomes & N.L. Vandemark (Hrsg.), *The testis*. Vol. 1. (S. 281-337). New York: Academic Press.

Davis, J.R. & Langford, G.A. (1971). Comparative responses of the isolated testicular capsule and parenchyma to autonomic drugs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 26, 241-245.

De Kretser, D.M. & Kerr, J.B. (1988). The cytology of the testis. In E. Knobil & J.D. Neill (Hrsg.), *The physiology of reproduction*. Vol. 1. (S. 837-916). New York: Raven Press.

De Kretser, D.M., Kerr, J.B. & Paulsen, C.A. (1975). The peritubular tissue in the normal and pathological human testis. An ultrastructural study. *Biology of Reproduction*, 12, 317-324.

De Miguel, M.P., Bethencourt, F.R., Arenas, M.I., Fraile, B. & Paniagua, R. (1997). Intermediate filaments in the Sertoli cells of the ageing human testis. *Virchows Archiv*, 431, 131-138.

Dellmann, H.D. (1971). *Veterinary Histology*. Philadelphia: Lea und Flickinger.

Dellmann, H.-D. & Wrobel, K.-H. (1987). Male reproductive system. In H. D. Dellmann & E. Brown (Hrsg.), *Textbook of Veterinary Histology* (S. 286-312). Philadelphia: Lea & Febiger.

Desantis, S., Ventriglia, G., Zubani, D., Deflorio, M., Megalofonou, P., Accone, F. et al. (2006). Histochemical analysis of glycoconjugates in the domestic cat

testis. *Histology and Histopathology*, 21, 11-22.

Devkota, B., Sasaki, M., Takahashi, K.-I., Matsuzaki, S., Matsui, M., Haneda, S. et al. (2006). Postnatal developmental changes in immunohistochemical localization of α -smooth muscle actin (SMA) and vimentin in bovine testes. *Journal of Reproduction and Development*, 52, 43-49.

Dhingra, L.D. (1977). Mediastinum testis. In A.D. Johnson & W.R. Gomez (Hrsg.), *The testis. Vol. IV.* (S. 451-458). New York: Academic Press.

Diemer, T., Hales, D.B. & Weidner, W. (2003). Immune-endocrine interactions and Leydig cell function: the role of cytokines. *Andrologia*, 35, 55-63.

Dinges, H.P., Zatloukal, K., Schmid, C., Mair, S. & Wirnsberger, G. (1991). Co-expression of cytokeratin and vimentin filaments in rete testis and epididymis. *Virchows Archiv A of Pathology and Anatomy*, 418, 119-127.

Donahoe, P.K., Ito, Y., Morikawa, Y. & Hendren, W.H. (1977). Mullerian inhibiting substance in human testes after birth. *Journal of Pediatric Surgery*, 12, 323-330.

Donovan, B.T. & Van der Werff ten Bosch, J.J. (1965). *Physiology of puberty.* London: Edward Arnold.

Düe, W., Dieckmann, K.-P., Loy, V. & Stein, H. (1989). Immunohistological determination of oestrogen receptor, progesterone receptor, and intermediate filaments in Leydig cell tumours, Leydig cell hyperplasia, and normal Leydig cells of the human testis. *Journal of Pathology*, 157, 225-234.

Dulaney, J.T. (1979). Binding interactions of glycoproteins with lectin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 21, 43-63.

Dym, M. (1973). The fine structure of the monkey Sertoli cell and its role in maintaining the blood-testis barrier. *Anatomical Record*, 175, 639-656.

Dym, M. (1974). The fine structure of monkey Sertoli cells in the transitional zone at the junction of the seminiferous tubules with the tubuli recti. *American Journal of Anatomy*, 140, 1-26.

Dym, M. (1976). The mammalian rete testis-a morphological Examination. *Anatomical Record*, 186, 493-524.

Dym, M. (1994). Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocrine Reviews*, 15, 102-115.

Dym, M. & Fawcett, D.W. (1970). The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biology of Reproduction*, 3, 308-326.

Dym, M. & Romrell, L.J. (1975). Intraepithelial lymphocytes in the male reproductive tract of rats and rhesus monkeys. *Journal of Reproduction and Fertility*, 42, 1-7.

Egger, G.F. & Witter, K. (2009). Peritubular contractile cells in testis and epididymis of the dog, *canis lupus familiaris*. *Acta Veterinaria Brno*, 78, 3-11.

Ekstedt, E., Söderquist, L. & Plöen, L. (1986). Fine structure of spermatogenesis and Sertoli cells (*epitheliocytus sustentans*) in the bull. *Anatomia Histologia Embryologia*, 15, 23-48.

Ellis, L.C., Buhrey, L.E.Jr. & Hargrove, J.L. (1978). Species differences in contractility of seminiferous tubules and tunica albuginea as related to sperm transport through the testis. *Archive of Andrology*, 1, 139-146.

Enerback, L. (1986). Mast cell heterogeneity: the evolution of the concept of a specific mucosal mast cell. In A.D. Befus, J. Bienestock & J.A. Denburg (Hrsg.), *Mast cell differentiation and Heterogeneity.* (S.1-26). New York: Raven Press.

Ertl, C. & Wrobel, K.-H. (1992). Distribution of sugar residues in the bovine testis during postnatal ontogenesis demonstrated with lectin-horseradish

- peroxidase conjugates. *Histochemistry*, 97, 161-171.
- Evans, R.M. (1998).** Vimentin: the conundrum of the intermediate filament gene family. *BioEssays*, 20, 79-86.
- Ewing, L.L., Zirkin, B.R., Cochran, R.C., Kromann, N., Peters, C. & Ruiz-Bravo, N. (1979).** Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused *in vitro*: correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology*, 106, 1135-1142.
- Ewuola, E.O. & Egbunike, G.N. (2010).** Effects of dietary fumonisin B₁ on the onset of puberty, semen quality, fertility rates and testicular morphology in male rabbits. *Reproduction*, 139, 439-445.
- Ezeasor, D. N. (1986).** Ultrastructural observations on the terminal segment epithelium of the seminiferous tubule of West African dwarf goats. *Journal of Anatomy*, 144, 167-179.
- Fabbri, A. (1990).** The role and regulation of testicular opioids. *Trends of Endocrinology and Metabolism*, 1, 117-20.
- Fawcett, D.W. (1970).** A comparative view of sperm ultrastructure. *Biology of Reproduction*, 2, 90-127.
- Fawcett, D.W., Anderson, W.A. & Phillips, D.M. (1971).** Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. *Developmental Biology*, 26, 220-251.
- Fawcett, D.W. & Dym, M. (1974).** A glycogen-rich segment of the tubuli recti and proximal portion of the rete testis in the guinea-pig. *Journal of Fertility*, 38, 401-409.
- Fawcett, D.W., Heidger, P.M. & Leak, L.V. (1969).** Lymph vascular system of the interstitial tissue of the testis as revealed by electron microscopy. *Journal of Reproduction and Fertility*, 19, 109-119.
- Fawcett, D.W., Ito, S. & Slautterback, D. (1959).** The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 5, 453-460.
- Fawcett, D.W., Neaves, W.B. & Flores, M.N. (1973).** Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*, 9, 500-532.
- Foote, R.H., Swierstra, E.E. & Hunt, W.L. (1972).** Spermatogenesis in the dog. *Anatomical Record*, 173, 341-352.
- Frame, S.R., Hurtt, M.E. & Green, J.W. (1994).** Testicular maturation in prepubertal New Zealand White Rabbits. *Veterinary Pathology*, 31, 541-545.
- Gabbiani, G., Schmid, E., Winter, S., Chaponnier, C., de Ckhashtonay, C., Vandekerckhove, J., Weber, K. & Franke, W.W. (1981).** Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 298-302.
- Gabius, H.-J. (2011).** Glycobiomarkers by glycoproteomics and glycan profiling (glycomics): emergence of functionality. *Biochemical Society Transactions*, 39, 499-405.
- Gabius, H.-J., André, S., Jiménez-Barbero, J., Romero, A. & Solís, D. (2011).** From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends in Biochemical Sciences*, 36, 298-313.
- García-Tomás, M., Sánchez, J. & Piles, M. (2009a).** Post-natal sexual development of testis and epididymis in the rabbit: variability and relationships among macroscopic and microscopic markers. *Animal Reproduction Science*, 110, 347-355.
- García-Tomás, M., Sánchez, J. & Piles, M. (2009b).** Postnatal sexual

- development of testis and epididymis in the rabbit: growth and maturity pattern of macroscopic and microscopic markers. *Theriogenology*, 71, 292-301.
- Gaytan, F., Carrera, G., Pinilla, L., Aguilar, R. & Bellido, C. (1989).** Mast cells in the testis, epididymis and accessory glands of the rat: effects of neonatal steroid treatment. *Journal of Andrology*, 10, 351-358.
- Gheri, G., Vichi, D., Zappoli Thyron, G.D., Bonaccini, L., Vannelli, G.B., Marini, M. et al. (2009).** Sialic acid in human testis and changes with aging. *Reproduction, Fertility and Development*, 21, 625-633.
- Goel, S., Reddy, N., Mandal, S., Fujihara, M., Kim, S.-M. & Imai, H. (2010).** Spermatogonia-specific proteins expressed on prepubertal buffalo (*Bubalus bubalis*) testis and their utilization for isolation and in vitro cultivation of spermatogonia. *Theriogenology*, 74, 1221-1232.
- Göbel, Th. & Kaspers, B. (2005).** Immunabwehr und Blutgruppen. In W. von Engelhardt & G. Breves (Hrsg.). *Physiologie der Haustiere* (2. Auflage)(S. 213-229). Stuttgart: Enke Verlag.
- Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T. & Sharon, N. (1980).** What should be called a lectin? *Nature*, 285, 66.
- Goldstein, I.J. & Poretz, R.D. (1986).** Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In I. E. Liener, N. Sharon & I. J. Goldstein (Hrsg.), *The Lectins-properties, functions, and applications in biology and medicine* (S. 35-250). Orlando: Academic Press.
- Gondos, B. & Connell, C.J. (1978).** Cellular interrelationships in the fetal rabbit testis. *Archives of Andrology*, 1, 19-30.
- Gondos, B. & Conner, L.A. (1972).** Ultrastructural differentiation of interstitial cells in the fetal and postnatal rabbit testis. *Biology of Reproduction*, 7, 118.
- Gondos, B. & Conner L.A. (1973).** Ultrastructure of developing germ cells in the fetal rabbit testis. *American Journal of Anatomy*, 136, 23-42.
- Gondos, B., Morrison, K.P. & Renston, R.H. (1977).** Leydig cell differentiation in the prepubertal rabbit testis. *Biology of Reproduction*, 17, 745-748.
- Gondos, B., Renston, R.H. & Conner, L.A. (1973).** Ultrastructure of germ cells and Sertoli cells in the postnatal rabbit testis. *American Journal of Anatomy*, 136, 427-440.
- Gondos, B., Renston, R.H. & Goldstein, D.A. (1976).** Postnatal differentiation of Leydig cells in the rabbit testis. *American Journal of Anatomy*, 145, 167-182.
- Gorgas, K. & Böck, P. (1974).** Myofibroblasts in the rat testicular capsule. *Cell and Tissue Research*, 154, 533-541.
- Goyal, H.O. (1982).** Light microscopic and ultrastructural evidence of epithelial phagocytosis of sperm in the rete testis and ductuli efferentes in the bull. *American Journal of Veterinary Research*, 43, 785-90.
- Graham, J.D. & Clarke, C.L. (1997).** Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Review*, 18, 502-519.
- Grau, H. & Walter, P. (1967).** Der männliche Geschlechtsapparat. In: *Grundriss der Histologie und der vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere* (S. 96-100). Berlin/Hamburg: Paul Parey.
- Grinson, R.P. & Rey, R.A. (2010).** Anti-müllerian hormone and Sertoli cell function in paediatric male hypogonadism. *Hormone Research in Paediatrics*, 73, 81-92.
- Griswold, M.D. (1998).** The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell and Developmental Biology*, 9, 411-416.
- Gu, L.-H. & Coulombe, P.A. (2007).** Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. *Current Opinion in Cell Biology*, 19, 13-23.

- Habert, R., Lejeune, H. & Saez, J.M. (2001).** Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Molecular and Cell Endocrinology*, 179, 47-74.
- Hagenäs, L., Ritzen, A.M., Plooen, L., Hansson, V., French, F.S. & Nayfeh, S.N. (1975).** Sertoli cells origin of testicular androgen binding protein (ABP). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2, 339-350.
- Hardy, M.P., Zirkin, B.R. & Ewing, L.L. (1989).** Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in the testes of the pubertal rat. *Endocrinology*, 124, 762-770.
- Hatt, J.-M. & Isenbügel, E. (2001).** Andrologie bei männlichen Zoosäugetern und Heimtieren. In W. Busch & A. Holzmann (Hrsg.), *Veterinärmedizinische Andrologie. Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren* (S. 452-460). Stuttgart: Schattauer.
- Haider, S.G., Talati, J. & Servos, G. (1999).** Ultrastructure of peritubular tissue in association with tubular hyalinization in human testis. *Tissue and Cell*, 31, 90-98.
- Hayashi, T., Kageyama, Y., Ishizaka, K., Kihara, K. & Oshima, H. (2000).** Sexual dimorphism in the regulation of meiotic process in the rabbit. *Biology of Reproduction*, 62, 1722-1727.
- Hees, H. (2000).** Kreislaufsystem. In H. Hees & F. Sinowatz (Hrsg.). *Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie* (3. Auflage) (191-203). Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.
- Hees, H., Wrobel, K.-H., Kohler, T., Leiser, R. & Rothbacher, I. (1987).** Spatial topography of the excurrent duct system in the bovine testis. *Cell and Tissue Research*, 248, 143-151.
- Hees, H., Wrobel, K.-H., Kohler, T., Abou Elmagd, A. & Hees, I. (1989).** The mediastinum of the bovine testis. *Cell and Tissue Research*, 255, 25-39.
- Hermo, L. & Dworkin, J. (1988).** Transitional cells at the junction of seminiferous tubules with the rete testis of the rat: their fine structure, endocytic activity, and basement membrane. *American Journal of Anatomy*, 181, 111-131.
- Hermo, L., Lalli, M. & Clermont, Y. (1977).** Arrangement of connective tissue components in the walls of seminiferous tubules of man and monkey. *American Journal of Anatomy*, 148, 433-445.
- Hermo, L., Pelletier, R.-M., Cyr, D.G. & Smith, C.E. (2010).** Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 4: Intercellular bridges, mitochondria, nuclear envelope, apoptosis, ubiquitination, membrane/voltage-gates channels, methylation/acetylation, and transcription factors. *Microscopy Research and Technique*, 73, 364-408.
- Herrmann, H., Strelkov, S.V., Burkhard, P. & Aebi, U. (2009).** Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *Journal of Clinical Investigation*, 119, 1772-1783.
- Höffner, J. (2008).** *Saisonale Einflüsse auf die Morphologie des Hodens beim Hengst. Eine histologische und immunhistochemische Studie.* Inaugural-Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, München.
- Hofheinz, A.R. (2007).** *Sonographische Darstellung der männlichen und weiblichen Geschlechtsorgane und der Trächtigkeit beim Kaninchen.* Inaugural-Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, München.
- Holash, J.A., Harik, S.I., Perry, G. & Stewart, P.A. (1993).** Barrier properties of testis microvessels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 11069-11073.
- Holstein, A.-F. (1967).** Muskulatur und Motilität des Nebenhodens beim Kaninchen. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 76, 498-

510.

Holstein, A.-F., Maekawa, M., Nagano, T. & Davidoff, M. (1996).

Myofibroblasts in the Lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. *Archives of Histology and Cytology*, 59, 109-125.

Holstein, A.-F. & Weiss, C. (1967). Über die Wirkung der glatten Muskulatur in der Tunica Albuginea im Hoden des Kaninchens: Messungen des interstitiellen Druckes. *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin*, 142, 334-337.

Hu, G.-X., Hu, L.-F., Yang, D.-Z., Li, J.-W., Chen, G.-R., Chen, B.-B. et al. (2009). Adjudin targeting rabbit germ cell adhesion as a male contraceptive: a pharmacokinetics study. *Journal of Andrology*, 30, 87-93.

Huchzermeyer, S. (2003). *Funktionelle und morphologische Studien über die equine Zervix im Stadium der Ingravidität*. Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen.

Ibach, B., Weissbach, L. & Hilscher, B. (1976). Stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the dog. *Andrologia*, 8, 297-307.

Iczkowski, K.A., Sun, E.L. & Gondos, B. (1991). Morphometric study of the prepubertal rabbit testis: germ cell numbers and seminiferous tubule dimensions *American Journal of Anatomy*, 190, 266-272.

Jégou, B. (1992). The Sertoli cell *in vivo* and *in vitro*. *Cell Biology and Toxicology*, 8, 49-54.

Johnson, L., Zane, R.S., Petty, C.S. & Neaves, W.B. (1984). Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cells numbers, and age-related decline. *Biology of Reproduction*, 31, 785-795.

Jones, R., Hamilton, D.W. & Fawcett, D.W. (1979). Morphology of the epithelium of the extratesticular rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymidis of the adult male rabbit. *American Journal of Anatomy*, 156, 373-400.

Jones, C.J.P., Morrison, C.A. & Stoddart, R.W. (1992). Histochemical analysis of rat testicular glycoconjugates. 1. Subsets of N-linked saccharides in seminiferous tubules. *Histochemical Journal*, 24, 319-326.

Jones, C.J.P., Morrison, C.A. & Stoddart, R.W. (1993). Histochemical analysis of rat testicular glycoconjugates. 3. Non-reducing terminal residues in seminiferous tubules. *Histochemical Journal*, 25, 711-718.

Jun, S.-Y., Ro, J.Y., Park, Y.W., Kim, K.-R. & Ayala, A.G. (2008). Ectopic Leydig cells of testis. An immunohistochemical study on tissue microarray. *Annals of Diagnostic Pathology*, 12, 29-32.

Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (1984). *Histologie* (4. Auflage). Berlin: Springer.

Karantz, V. (2011). Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene*, 30, 127-138.

Kerr, J. B., Bartlett, J.M.S., Donachie, K. & Sharpe, R.M. (1987). Origin of regenerating Leydig cells in the testis of the adult rat. *Cell and Tissue Research*, 249, 367-377.

Kerr, J.B., Mayberry, R.A. & Irby, D.C. (1984). Morphometric studies on lipid inclusions in Sertoli cells during the spermatogenic cycle in the rat. *Cell and Tissue Research*, 236, 699-709.

Kierszenbaum, A.L. (2002). Keratins: unraveling the coordinated construction of scaffolds in spermatogenic cells. *Molecular Reproduction and Development*, 61, 1-2.

Kierszenbaum, A.L., Rivkin, E., Fefer-Sadler, S., Mertz, J.R. & Tres, L.L. (1996). Purification, partial characterization, and localizazion of Sak57, an acidic

intermediate filament keratin present in rat spermatocytes, spermatids, and sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 44, 382-394.

Koch, T. & Berg, R. (1990). *Lehrbuch der Veterinär-Anatomie*. Jena: Gustav Fischer Verlag.

Kocher, O. & Gabbiani, G. (1986). Cytoskeletal features of normal and atheromatous human arterial smooth muscle cells. *Human Pathology*, 17, 875-880.

Kohler, C., Riesenbeck, A. & Hoffmann, B. (2007). Age-dependent expression and localization of the progesterone receptor in the boar testis. *Reproduction in Domestic Animals*, 42, 1-5.

Kopecky, M., Semecky, V. & Nachtigal, P. (2005). Vimentin expression during altered spermatogenesis in rats. *Acta Histochemica*, 197, 279-289.

Kopera, I.A., Bilinska, B., Cheng, C.Y. & Mruk, D.D. (2010). Sertoli-germ cell junctions in the testis: review of recent data. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B*, 365, 1593-1605.

Korman, M. (1967). Dye permeability and alkaline phosphatase activity of testicular capillaries in the postnatal rat. *Histochemie*, 9, 327-338.

Kothari, L.K., Patni, M.K. & Jain, M.L. (1978). The total Leydig cell volume of the testis in some common mammals. *Andrologia*, 10, 218-222.

Krölling, O. (1960). Männliche Geschlechtsorgane. In O. Krölling & H. Grau (Hrsg.), *Lehrbuch der Histologie und der vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Haustiere* (S. 315-354). Berlin/Hamburg: Paul Parey.

Kuhrau, J. (1994). *Histologische, ultrastrukturelle und histochemische Untersuchungen an Hoden und Nebenhoden des Pferdes*. Inaugural-Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, München.

Kuroda, M. (1985). Change of actin isomers during differentiation of smooth muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*, 843, 208-213.

Kurohmaru, M., Kanai, Y. & Hayashi, Y. (1991). Lectin-binding patterns in the spermatogenic cells of the Shiba goat testis. *Journal Veterinary Medical Science*, 53, 893-897.

Ku, N.O. & Omary, M.B. (2007). A disease-and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. *Journal of Cell Biology*, 174, 115-125.

Laborde, P., Barkey, R.J., Belair, L., Remy, J.J., Djiane, J. & Salesse, R. (1996). Ontogenesis of LH and FSH receptors in postnatal rabbit testes: age-dependent differential expression of long and short RNA transcripts. *Journal of Reproduction and Fertility*, 108, 25-30.

Lacy, D. & Rotblat, J. (1960). Study of normal and irradiated boundary tissue of the seminiferous tubules of the rat. *Experimental Cell Research*, 21, 49-70.

Landon, G.V. & Pryor, J.P. (1981). The blood-testis barrier in men of diverse fertility status: an ultrastructural study. *Virchows Archiv*, 392, 355-364.

Langford, G. & Heller, C. (1973). Fine structure of muscle cells of the human testicular capsule: basis of testicular contractions. *Science*, 179, 573-575.

Latendresse, J.R., Warbritton, A.R., Jonassen, H. & Creasy, D.M. (2002). Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidsons's fluid. *Toxicologic Pathology*, 39, 524-533.

Leblond, C.P. & Clermont, Y. (1952). Part 1. Spermatogenesis and sperm maturation. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals New York Academy Sciences*, 55, 548-573.

Lee, M.-C. & Damjanov, I. (1984). Anatomic distribution of lectin-binding sites in mouse testis and epididymis. *Differentiation*, 27, 74-81.

Lee, M.-C. & Damjanov, I. (1985). Lectin binding sites on human sperm and

- spermatogenic cells. *Anatomical Record*, 212, 282-287.
- Leeson, T.S. & Adamson, L. (1962).** The mammalian tunica vaginalis testis: its fine structure and function. *Acta Anatomica*, 51, 226-240.
- Leeson, T.S. & Cookson, F.B. (1974).** The mammalian testicular capsule and its muscle elements. *Journal of Morphology*, 144, 237-254.
- Leeson, C.R. & Forman, D.E. (1981).** Postnatal development and differentiation of contractile cells within the rabbit testis. *Journal of Anatomy*, 132, 491-511.
- Leeson, C.R. & Leeson, T.S. (1963).** The postnatal development and differentiation of the boundary tissue of the seminiferous tubule of the rat. *Anatomical Record*, 147, 243-259.
- Leeson, T.S. & Leeson, C.R. (1970).** *Histology*. Philadelphia: Saunders.
- Lejeune, H., Habert, R. & Saez, J.M. (1998).** Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, 20, 1-25.
- Lejeune, H., Skalli, M., Chatelain, P.G., Avallet, O. & Saez, J.M. (1992).** The paracrine role of Sertoli cells on Leydig cell function. *Cell Biology and Toxicology*, 8, 73-83.
- Lemaire, L. & Heinlein, U.A.O. (1992).** Stage-specific mouse testis cell surface alterations detected by fluorescence-labeled lectins. *Cell Biology International Reports*, 16, 675-677.
- Li, H., Risbridger, G.P. & Clements, J.A. (1993).** Pro-opiomelanocortin (POMC) gene expression, as identified by in situ hybridization, in purified populations of interstitial macrophages and Leydig cells of the adult rat testis. *Reproduction, Fertility, Development*, 5, 545-554.
- Lie, P.P.Y., Mruk, D.D., Lee, W.M. & Cheng, C.Y. (2010).** Cytoskeletal dynamics and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, 365, 1581-1592.
- Liebich, H.-G. (1993).** *Funktionelle Histologie. Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere* (2. Auflage). Stuttgart/New York: Schattauer.
- Lindner, S.G. & Holstein, A.-F. (1982).** On the morphology of the transitional zone of the seminiferous tubule and the rete testis in man. *Andrologia*, 14, 352-362.
- Lis, H. & Sharon, N. (1986).** Lectins as molecules and as tools. *Annual Review of Biochemistry*, 55, 35-67.
- Löffler, G. (2003).** *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie* (5. Auflage). Berlin/Heidelberg: Springer.
- Löhle, K. (2003).** Fortpflanzung. In W. Schlotlauer (Hrsg.). *Das große Buch vom Kaninchen* (S. 162-163). Frankfurt am Main: DLG Verlag.
- Lohiya, N.K. & Mathur, N. (1983).** Excurrent duct system in male rabbit: a morphological study. *Acta Europaea Fertilitatis*, 14, 433-441.
- Lohr, M., Kaltner, H., Schwartz-Albiez, R., Sinowatz, F. & Gabius, H.-J. (2010).** Towards functional glycomics by lectin histochemistry: strategic probe selection to monitor core and branch-end substitutions and detection of cell-type and regional selectivity in adult mouse testis and epididymis. *Anatomia Histologia Embryologia*, 39, 481-493.
- Lüdtke, U.-R. (1987).** *Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie des Interstitiums im Hoden der Katze (Felis domestica)*. Inaugural-Dissertation, Justus-Leibig-Universität Giessen, Giessen.
- Lütjens, C.M., Didolkar, A., Kliesch, S., Paulus, W., Jeibmann, A., Böcker, W. et al. (2006).** Tissue expression of the nuclear progesterone receptor in male non-human primates and men. *Journal of Endocrinology*, 189, 529-539.
- Lydka, M., Kotula-Balak, M., Kopera-Sobota, I., Tischner, M. & Bilińska, B.**

- (2011). Vimentin expression in testes of Arabian stallions. *Equine Veterinary Journal*, 43, 184-289.
- Maekawa, M., Kamimura, K. & Nagano, T. (1996).** Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of Histology and Cytology*, 59, 1-13.
- Magin, T.M., Vijayaraj, P. & Leube, R.E. (2007).** Structural and regulatory function of keratins. *Experimental Cell Research*, 313, 2021-2032.
- Mali, P., Virtanen, I. & Parvinen, M. (1987).** Vimentin expression in spermatogenic and Sertoli cells is stage-related in rat seminiferous epithelium. *Andrologia*, 19, 644-653.
- Malmi, R., Fröjdman, K. & Söderström, K.-O. (1990).** Differentiation-related changes in the distribution of glycoconjugates in rat testis. *Histochemistry*, 94, 387-395.
- Malmi, R. & Söderström, K.-O. (1988).** Lectin binding to rat spermatogenic cells: effects of different fixation methods and proteolytic enzyme treatment. *Histochemical Journal*, 20, 276-282.
- Mancini, R.E., Vilar, O., Alvarez, B. & Seiguer, A.C. (1965).** Extravascular and intratubular diffusion of labeled serum proteins in the rat testis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 13, 376-385.
- Mann, T. & Parsons, U. (1947).** Effect of testicular hormone on the formation of seminal fructose. *Nature*, 160, 294.
- Manning, J.C., Seyrek, K., Kaltner, H., André, S., Sinowatz, F. & Gabius, H.-J. (2004).** Glycomic profiling of developmental changes in bovine testis by lectin histochemistry and further analysis of the most prominent alteration on the level of the glycoproteome by lectin blotting and lectin affinity chromatography. *Histology and Histopathology*, 19, 1043-1060.
- Marino, F., Ferrara, G., Rapisarda, G. & Galofaro, V. (2003).** Reinke's crystals in an interstitial cell tumour of a rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Reproduction in Domestic Animals*, 38, 421-422.
- May, D. & Simpson, K.B. (1975).** Reproduction in the rabbits. *Animal Breeder Abstract*, 43, 253-261.
- McCord, R.G. (1970).** Fine structural observations of the peritubular cell layer in the hamster testis. *Protoplasma*, 69, 283-289.
- McLaren, A. (2000).** Germ and somatic lineages in the developing gonad. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 163, 3-9.
- Meineke, B. (2000).** Allgemeine Endokrinologie. In W. von Engelhardt & G. Breves (Hrsg.), *Physiologie der Haustiere*. (S. 490-497). Stuttgart: Enke.
- Merkow, L., Acevedo, H.F., Slifkin, M. & Pardo, M. (1968).** Studies on the interstitial cells of the testis. II. The ultrastructure in the adult guinea pig and the effect of stimulation with human chorionic gonadotropin. *American Journal of Pathology*, 53, 989-1007.
- Middendorff, R., Müller, D., Mewe, M., Mukhopadhyay, A.K., Holstein, A.-F. & Davidoff, M.S. (2002).** The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cyclic GMP. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87, 3486-3499.
- Miething, A. (1992).** Germ-cell death during prespermatogenesis in the testis of the golden hamster. *Cell and Tissue Research*, 267, 583-590.
- Miettinen, M., Virtanen, I. & Talerman, A. (1985).** Intermediate filament proteins in human testis and testicular germ-cell tumors. *American Journal of Pathology*, 120, 402-410.
- Minin, A.A. & Moldaver, M.V. (2008).** Intermediate vimentin filaments and their role in intracellular organelle distribution. *Biochemistry*, 73, 1453-1466.

- Mitchell, M.A. & Seeley, R.R. (1977).** Autorhythmic contractions of the postnatal rabbit testicular capsule and its response to prostaglandins, epinephrine and acetylcholine. *Biology of Reproduction*, 17, 591-598.
- Mochida, K., Rivkin, E., Gil, M. & Kierszenbaum, A.L. (2000).** Keratin 9 is a component of the perinuclear ring of the manchette of rat spermatids. *Developmental Biology*, 227, 510-519.
- Mok, K.-W., Mruk, D.D., Lie, P.P.Y., Lui, W.-Y., Cheng, C.Y. (2011).** Adjudin, a potential male contraceptive, exerts its effects locally in the seminiferous epithelium of mammalian testes. *Reproduction*, 141, 571-580.
- Moll, R., Franke, W.W. & Schiller, D.L. (1982).** The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31, 11-24.
- Montkowski, A. (1992).** *Lichtmikroskopische, ultrastrukturelle und glykohistochemische Untersuchungen am Hoden des Hundes (Canis familiaris)*. Inaugural-Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, München.
- Mruk, D.D. & Cheng, C.Y. (2004a).** Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, 25, 747-806.
- Mruk, D. D. & Cheng, C.Y. (2004b).** Cell-cell interactions at the ectoplasmic specialization in the testis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 15, 439-447.
- Müller, J. & Skakkebaek, N.E. (1992).** The prenatal and postnatal development of the testis. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 6, 251-268.
- Murakami, M. (1966).** Elektronenmikroskopische Untersuchungen am interstitiellen Gewebe des Rattenhodens, unter besonderer Berücksichtigung der Leydigischen Zwischenzellen. *Zeitschrift für Zellforschung*, 72, 139-156.
- Murakami, M., Yokoyama, R., Nishida, T., Shiromoto, M. & Sato, H. (1988).** Scanning and transmission electron microscope observations of the terminal segment of the cat seminiferous tubule: epithelial phagocytosis of spermatozoa and latex beads. *Archive of Histology and Cytology*, 51, 185-192.
- Nagano, T. (1966).** Some observations on the fine structure of the Sertoli cell in the human testis. *Zeitschrift für Zellforschung*, 73, 89-106.
- Nakanishi, Y. & Shiratsuchi, A. (2004).** Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 13-16.
- Nicander, L. & Plöen, L. (1969).** Fine structure of spermatogonia and primary spermatocytes in rabbits. *Zeitschrift für Zellforschung*, 99, 221-234.
- Nistal, M., Abaurrea, M.A. & Paniagua, R. (1982).** Morphological and histometric study on the human Sertoli cell from birth to the onset of puberty. *Journal of Anatomy*, 14, 351- 363.
- Norton, J.N. & Skinner, M.K. (1989).** Regulation of Sertoli cell function and differentiation through the actions of a testicular paracrine factor P-Mod-S. *Endocrinology*, 124, 2711-2719.
- Nykänen, M. (1979).** Fine structure of the transitional zone of the rat seminiferous tubule. *Cell and Tissue Research*, 198, 441-454.
- Nykänen, M. & Kormano, M. (1978).** Early effects of efferent duct ligation on the rat rete testis. *International Journal of Andrology*, 1, 225-234.
- Oakberg, E.F. (1956).** A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *American Journal of Anatomy*, 99, 391-413.
- O'Donnell, L., Nicholls, P.K., O'Bryan, M.K., McLachlan, R.I. & Stanton, P.G. (2011).** Spermiation. The process of sperm release. *Spermatogenesis*, 1, 14-

35.

Oettel, M. & Mukhopadhyay, A.K. (2004). Progesterone: the forgotten hormone in men? *The Aging Male*, 7, 236-257.

Ohanian, C., Rodriguez, H., Piriz, H., Martino, I., Rieppi, G., Garófalo, E.G. & Roca, R.A. (1979). Studies on the contractile activity and ultrastructure of the boar testicular capsule. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57, 79-85.

O`Rand, M.G. & Romrell, L.J. (1977). Appearance of cell surface auto- and isoantigens during spermatogenesis in the rabbit. *Developmental Biology*, 55, 347-358.

Onyango, D.W., Wango, E.O., Otiang'a-Owiti, G.E., Oduor-Okelo, D. & Werner, G. (2000). Morphological characterization of the seminiferous cycle in the goat (*Capra hircus*): a histological and ultrastructural study. *Annals of Anatomy*, 182, 235-241.

Ortavant, R., Courot, M. & Hochereau-de Reviers, M.T. (1969). Spermatogenesis and morphology of the spermatozoon. In H.H. Cole & P.T. Cupps (Hrsg.), *Reproduction in domestic animals* (2. Auflage) (S. 251-267). London, New York: Academic Press.

Orgebin-Crist, M.C. (1965). Passage of spermatozoa labeled with thymidine³H through the ductus epididymidis of the rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility*, 10, 241-251.

Orth, J.M., Gunsalus, G.L. & Lamperti, A.A. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, 122, 787-794.

O`Shaughnessy, P.J., Baker, P.J. & Johnston, H. (2006). The foetal Leydig cell-differentiation, function and regulation. *International Journal of Andrology*, 29, 90-95.

Osman, D.I. (1978). On the ultrastructure of modified Sertoli cells in the terminal segment of seminiferous tubules in the boar. *Journal of Anatomy*, 127, 603-613.

Osman, D.I. (1979). A comparative ultrastructural study on typical and modified Sertoli cells before and after ligation of the efferent ductules in the rabbit. *Zentralblatt für Veterinärmedizin (Reihe C), Anatomia, Histologia, Embryologia*, 8, 114-123.

Osman, D.I. (1984). On the histochemistry of the seminiferous tubules and their terminal segments in the ram testis. *Zentralblatt für Veterinärmedizin (Reihe C), Anatomia, Histologia, Embryologia*, 13, 319-326.

Osman, D.I., Ekwall, H. & Plöen, L. (1980). Specialized cell contacts and the blood-testis barrier in the seminiferous tubules of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *International Journal of Andrology*, 3, 553-562.

Osman, D.I. & Plöen, L. (1978). The mammalian tubuli recti: ultrastructural study. *Anatomical Record*, 192, 1-18.

Osman, D.I. & Plöen, L. (1979). Fine structure of the modified Sertoli cells in the terminal segment of the seminiferous tubules of the bull, ram and goat. *Animal Reproduction Science*, 2, 343-351.

Painter, T.S. (1926). Studies in mammalian spermatogenesis.VI. The chromosomes of the rabbit. *Journal of Morphology and Physiology*, 43, 1-43.

Palombi, F., Farini, D., Salanova, M., De Grossi, S. & Stefanini, M. (1992). Development and cytodifferentiation of peritubular myoid cells in rat testis. *Anatomical Record*, 233, 32-40.

Papadopoulos, V., Carreau, S., Szerman-Joly, E., Drosdowsky, M.A., Dehennin, L. et al. (1986). Rat testis 17 β -estradiol: identification by gas chromatography-mass spectrometry and age-related cellular distribution. *Journal*

of Steroid Biochemistry, 24, 1211-1216.

- Paranko, J., Kallajoki, M., Pelliniemi, L.J., Lehto, V.-P. & Virtanen, I. (1986).** Transient coexpression of cytokeratin and vimentin in differentiating rat Sertoli cells. *Developmental Biology*, 117, 35-44.
- Paranko, J. & Pelliniemi, L.J. (1992).** Differentiation of smooth muscle cells in the fetal rat testis and ovary: localization of alkaline phosphatase, smooth muscle myosin, F-actin, and desmin. *Cell and Tissue Research*, 268, 521-530.
- Pastor, L.M., Morales, E., Polo, L.A., Calvo, A., Pallarés, J. & DeLaViesca, S. (2003).** Histochemical study of glycoconjugates in active and photoperiodically-regressed testis of hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta Histochemica*, 105, 165-173.
- Patton, N.M. (1994).** Colony husbandry. In P.J. Manning, D.H. Ringler & C.E. Newcomer (Hrsg.). *The biology of the laboratory rabbit*. 2. Auflage (S. 28-45). Orlando: Academic Press.
- Pawar, H.S. & Wrobel, K.-H. (1991).** Quantitative aspects of water buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatogenesis. *Archive of Histology and Cytology*, 54, 491-509.
- Pelletier, R.M. (1986).** Cyclic formation and decay of the blood-testis barrier in the mink (*Mustela vison*), a seasonal breeder. *American Journal of Anatomy*, 175, 91-117.
- Pelletier, R.-M. (2011).** The blood-testis barrier: the junctional permeability, the proteins and the lipids. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 46, 49-127.
- Pelletier, R.-M. & Byers, S.W. (1992).** The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microscopy Research and Technique*, 20, 3-33.
- Perey, B., Clermont, Y. & Leblond, C.P. (1961).** The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *American Journal of Anatomy*, 108, 47-77.
- Pérez-Sánchez, F., Tablado, L. & Soler, C. (1998).** Quantitative changes in sperm head morphology during passage through the male excurrent duct system of the rabbit. *Molecular Reproduction and Development*, 51, 203-209.
- Perrin, B.J. & Ervasti, J.M. (2010).** The actin gene family: function follows isoforms. *Cytoskeleton*, 67, 630-634.
- Petersen, C. & Söder, O. (2006).** The Sertoli cell- a hormonal target and “super” nurse for germ cells that determines testicular size. *Hormone Research*, 66, 153-161.
- Peterson, R.N., Bozzola, J. & Polakoski, K. (1992).** Protein transport and organization of the developing mammalian sperm acrosome. *Tissue and Cell*, 24, 1-15.
- Piles, M., Rafel, O., Ramon, J. & Gómez, E.A. (2004).** Crossbreeding parameters of some productive traits in meat rabbits. *World Rabbit Science*, 12, 139-148.
- Pinart, E., Bonet, S., Briz, M., Pastor, L.M., Sancho, S., García, N. et al. (2001a).** Lectin affinity of the seminiferous epithelium in healthy and cryptorchid post-pubertal boars. *International Journal of Andrology*, 24, 153-164.
- Pinart, E., Bonet, S., Briz, M., Pastor, L.M., Sancho, S., García, N. et al. (2001b).** Morphological and histochemical characteristics of the lamina propria in scrotal and abdominal testes from the postpubertal boars: correlation with the appearance of the seminiferous epithelium. *Journal of Anatomy*, 199, 435-448.
- Pinart, E., Bonet, S., Briz, M., Sancho, S., García, N. & Badia, E. (2001c).** Cytology of the interstitial tissue in scrotal and abdominal testes of postpubertal boars. *Tissue and Cell*, 33, 8-24.

- Pinart, E., Bonet, S., Briz, M., Pastor, L.M., Sancho, S., García, N. et al. (2002).** Histochemical study of the interstitial tissue in scrotal and abdominal boar testes. *The Veterinary Journal*, 163, 68-76.
- Pintar, J.E., Schachter, B.S., Herman, A.B., Durgerian, S. & Krieger, D.T. (1984).** Characterization and localization of proopiomelanocortin messenger RNA in the adult rat testis. *Science*, 225, 632-634.
- Plöen, L. (1971).** A scheme of rabbit spermateleosis based upon electron microscopical observations. *Zeitung für Zellforschung*, 115, 553-564.
- Plöen, L. & Setchell, B.P. (1992).** Blood-testis barriers revisited. A homage to Lennart Nicander. *International Journal of Andrology*, 15, 1-4.
- Pop, O.T., Cotoi, C.G., Pleșea, I.E., Gherghiceanu, M., Enache, S.D., Mandache, E., Hortopan, G. & Pleșea, R.M. (2011).** Histological and ultrastructural analysis of the seminiferous tubule wall in ageing testis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 52, 241-248.
- Prem, J. (1992).** *Histologische, ultrastrukturelle und histochemische Untersuchungen an Hoden und Nebenhoden der Katze (Felis silvestris "familiaris")*. Inaugural-Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, München.
- Prince, F.P. (1990).** Ultrastructural evidence of mature Leydig cells and Leydig cell regression in the neonatal human testis. *The Anatomical Record*, 228, 405-417.
- Quesenberry, K.E. & Carpenter, J.W. (2004).** *Ferrets, rabbits, and rodents. Clinical medicine and surgery*. Philadelphia: Saunders.
- Rajfer, J. (1982).** Endocrinological study of testicular descent in the rabbit. *Journal of Surgical Research*, 3, 158-163.
- Rajpert-De Meyts, E., Jørgensen, N., Græm, N., Müller, J., Cate, R.L. et al. (1999).** Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84, 3836-3844.
- Ramos, A.S. & Dym, M. (1979).** Ultrastructural differentiation of rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction*, 21, 909-922.
- Reibiger, I. & Spaniel-Borowski, K. (2000).** Difference in localization of eosinophils and mast cells in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118, 243-249.
- Rey, R. (2005).** Anti-Müllerian hormone in disorders of sex determination and differentiation. *Brazilian Archives of Endocrinology and Metabolism*, 49, 26-36.
- Rey, R., Al-Attar, L., Louis, F., Jaubert, F., Barbet, P. et al. (1996).** Testicular dysgenesis does not affect expression of anti-müllerian hormone by Sertoli cells in premeiotic seminiferous tubules. *American Journal of Pathology*, 148, 1689-1698.
- Reynolds, E.S. (1963).** The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17, 208-212.
- Richardson, L.L., Kleinman, H.K. & Dym, M. (1995).** Basement membrane gene expression by Sertoli and peritubular myoid cells in vitro in the rat. *Biology of Reproduction*, 52, 320-330.
- Rivkin, E., Eddy, E.M., Willis, W.D., Goulding, E.H., Sukanuma, R., Yanagimachi, R. et al. (2005).** Sperm tail abnormalities in mutant mice with neo (r) gene insertion into an intron of the keratin 9 gene. *Molecular Reproduction and Development*, 72, 259-271.
- Rodríguez, A., Rojas, M.A., Bustos-Obregón, E., Urquieta, B. & Regadera, J. (1999).** Distribution of keratins, vimentin and actin in the testis of two South American camelids: vicuna (*vicugna vicugna*) and llama (*lama lama*). An

immunohistochemical study. *Anatomical Record*, 254, 330-335.

Rogatsch, H., Jezek, D., Hittmair, A., Mikuz, G. & Feichtinger, H. (1996). Expression of vimentin, cytokeratin, and desmin in Sertoli cells of human fetal, cryptorchid, and tumour-adjacent testicular tissue. *Virchows Archiv*, 427, 497-502.

Romeo, R. & Marcello, M.F. (1999). Some considerations in the human Leydig cell (immunohistochemical observations). *Archivio Italiano Di Urologia Andrologia*, 71, 143-148.

Roosen-Runge, E.C. (1951). Motions of the seminiferous tubules of rat and dog. *Anatomical Record*, 109, 153.

Roosen-Runge, E.C. (1955). Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. III. Volume changes in the cells of the seminiferous tubules. *Anatomical Record*, 123, 385-398.

Roosen-Runge, E.C. (1961). The rete testis in the albino rat: its structure, development and morphological significance. *Acta Anatomica*, 45, 1-30.

Roosen-Runge, E.C. & Giesel, L.O. (1950). Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *American Journal of Anatomy*, 87, 1-30.

Roosen-Runge, E.C. & Holstein, A.-F. (1978). The human rete testis. *Cell and Tissue Research*, 189, 409-433.

Ross, M.H. (1967). The fine structure and development of the peritubular contractile cell component in the seminiferous tubules of the mouse. *American Journal of Anatomy*, 121, 523-558.

Roth, J. (1983). Application of lectin-gold complexes for electron microscopic localization of glycoconjugates on thin sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 31, 987-999.

Roth, J. (2011). Lectins for histochemical demonstration of glycans. *Histochemistry and Cell Biology*, 136, 117-130.

Rovan, E. (2001). Biochemie der Spermatozoa. In W. Busch & A. Holzmann (Hrsg.), *Veterinärmedizinische Andrologie. Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren* (S. 23-54). Stuttgart /New York: Schattauer.

Rüdiger, H. & Gabius, H.-J. (2001). Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal*, 18, 589-613.

Rüdiger, H. & Gabius, H.-J. (2009). Plant lectins. In: In H.-J. Gabius (Hrsg.), *The Sugar Code – Fundamentals of Glycosciences* (S. 261-268). Weinheim: Wiley-Blackwell.

Rüsse, I. & Sinowatz, F. (1998). Gametogenese. In I. Rüsse & F. Sinowatz (Hrsg.), *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere* (2. Auflage) (S. 42-88). Berlin: Parey Buchverlag.

Rüsse, I. (1998). Harn- und Geschlechtsorgane. In I. Rüsse & F. Sinowatz (Hrsg.), *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere* (2. Auflage) (S. 304-337). Berlin: Parey Buchverlag.

Russell, L.D. (1977). Observations on rat Sertoli ectoplasmis („junctional“) specializations in their association with germ cells on the rat testis. *Tissue and Cell*, 9, 475-498.

Russell, L.D. (1978). The blood-testis barrier and its formation relative to spermatocyte maturation in the adult rat: a lanthanum tracer study. *Anatomical Record*, 190, 99-112.

Russell, L.D. (1979). Spermatid-Sertoli tubulobulbar complexes as devices for elimination of cytoplasm from the head region of late spermatids of the rat. *Anatomical Record*, 194, 233-246.

Russell, L.D. (1980). Sertoli-germ interrelations: a review. *Gamete Research*, 3, 179-202.

- Russell, L.D., Amlani, S.R., Vogl, A.W. & Weber, J.E. (1987).** Characterization of filaments within Leydig cells of the rat testis. *American Journal of Anatomy*, 178, 231-240.
- Russell, L. & Clermont, Y. (1976).** Anchoring device between Sertoli cells and late spermatids in rat seminiferous tubules. *Anatomical Record*, 185, 259-278.
- Russell, L. D. & Malone, J.P. (1980).** A study of Sertoli-spermatid tubulobulbar complexes in selected mammals. *Tissue and Cell*, 12, 263-285.
- Saez, J.M. (1994).** Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocrine Reviews*, 15, 574-626.
- Sajonski, H. & Smollich, A. (1972).** *Mikroskopische Anatomie*. Leipzig: Hirzel-Verlag.
- Satelli, A. & Li, S. (2011).** Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 3033-3046.
- Schinckel, A., Johnson, R.K., Pumfrey, R.A. & Zimmermann, D.R. (1983).** Testicular growth in boars of different genetic lines and its relationship to reproductive-performance. *Journal of Animals Science*, 56, 1065-1076.
- Schlatt, S., Weinbauer, G.F., Arslan, M. & Nieschlag, E. (1993).** Appearance of α -smooth muscle actin in peritubular cells of monkey testes is induced by androgens, modulated by follicle-stimulating hormone, and maintained after hormonal withdrawal. *Journal of Andrology*, 14, 340-350.
- Schmidbauer, S.-M. (2001).** *Lichtmikroskopische, ultrastrukturelle und immunhistochemische Untersuchungen am Hoden des Ebers (Sus scrofa domestica)*. Inaugural-Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, München.
- Schnorr, B. & Kressin, M. (2001).** *Embryologie der Haustiere* (4. Auflage). Stuttgart: Enke Verlag.
- Schulze, C. (1974).** On the morphology of the human Sertoli cell. *Cell and Tissue Research*, 153, 339-355.
- Schweizer, J., Bowden, P.E., Coulombe, P.A., Langbein, L., Lane, E.B., Magin, T.M. et al. (2006).** New consensus nomenclature for mammalian keratins. *Journal of Cell Biology*, 174, 169-174.
- Setchell, B.P. (1978).** The mammalian testis. Ithaca, New York: Cornell University Press.
- Setchell, B.P. & Brooks, D.E. (1988).** Anatomy, vasculature innervation, and fluids of the male reproductive tract. In E. Knobil & J.D. Neill (Hrsg.), *The physiology of reproduction. Vol. 1* (S. 753- 836). New York: Raven Press.
- Setchell, B.P. & Waites, G.M.H. (1970).** Changes in the permeability of the testicular capillaries and of the "blood-testis barrier" after injection of cadmium chloride in the rat. *Journal of Endocrinology*, 47, 81-86.
- Setchell, B.P. & Waites, G.M.H. (1971).** The exocrine secretion of the testis and spermatogenesis, *Journal of Reproduction and Fertility, Suppl. 13*, 15-27
- Sha, C., Modi, D., Sachdeva, G., Gadkar, S. & Puri, C. (2005).** Coexistence of intracellular and membrane-bound progesterone receptor in human testis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90, 474-483.
- Sharon, N. & Lis, H. (2004).** History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14, 53R-62R.
- Sharpe, R.M. (1994).** Regulation of spermatogenesis. In E. Knobil & J.D. Neill (Hrsg.), *The physiology of Reproduction. Vol. 1*. (S. 1363-1434). New York: Raven Press.
- Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C. & Fisher, J.S. (2003).** Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125, 769-784.

- Silbernagel, S. & Despopoulos, A. (2001).** Taschenatlas der Physiologie (5. Auflage). Stuttgart/New York: Georg Thieme.
- Sinha, A.A. & Seal, U.S. (1969).** The testicular interstitial cells of a lion and a three-toed sloth. *Anatomical Record*, 164, 35-45.
- Sinowatz, F. (2000a).** Die Zelle. In: H. Hees & F. Sinowatz (Hrsg.). *Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie* (3. Auflage) (35-93). Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.
- Sinowatz, F. (2000b).** Blut, Knochenmark und lymphatisches System. In: H. Hees & F. Sinowatz (Hrsg.). *Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie* (3. Auflage) (204-251). Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.
- Sinowatz, F. (2000c).** Männliche Geschlechtsorgane. In: H. Hees & F. Sinowatz (Hrsg.). *Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie* (3. Auflage) (325-344). Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.
- Sinowatz, F. (2001).** Morphologie und Histologie der männlichen Geschlechtsorgane. In: W. Busch & A. Holzmann (Hrsg.), *Veterinärmedizinische Andrologie. Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren* (S. 1-22). Stuttgart/New York: Schattauer.
- Sinowatz, F. & Amselgruber, W. (1986).** Postnatal development of bovine Sertoli cells. *Anatomy and Embryology*, 174, 413-423.
- Sinowatz, F. & Amselgruber, W. (1987).** Zur Morphologie der Leydig-Zellen und der Light-intercalated cells im Rinderhoden. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 74, 274-277.
- Sinowatz, F. & Wrobel, K.-H. (1981).** Development of the bovine acrosome. *Cell and Tissue Research*, 219, 511-524.
- Sinowatz, F., Wrobel, K.-H., Fischerleitner, F. & Schilling, E. (1983).** Morphologische Aspekte der postnatalen Hodendifferenzierung. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 70, 194-197.
- Sinowatz, F., Wrobel, K.-H., Sinowatz, S. & Kugler, P. (1979).** Ultrastructural evidence for phagocytosis of spermatozoa in the bovine rete testis and testicular straight tubules. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57, 1-4.
- Sirivaidyapong, S., Bevers, M.M., Gadella, B.M. & Colenbrander, B. (1999).** Acrosome reaction in dog sperm is induced by a membrane-localized progesterone receptor. *Journal of Andrology*, 20, 537-544.
- Sirivaidyapong, S., Bevers, M.M., Gadella, B.M. & Colenbrander, B. (2001).** Induction of the acrosome reaction in dog sperm cells is dependent on epididymal maturation: the generation of a functional progesterone receptor is involved. *Molecular Reproduction and Development*, 58, 451-459.
- Skalli, O., Ropraz, P., Trzeciak, A., Benzonana, G., Gillessen, D. & Gabbiani, G. (1986).** A monoclonal antibody against α -smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *Journal of Cell Biology*, 103, 2787-2796.
- Skinner, J.D. (1967).** Puberty in the male rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility*, 14, 151-154.
- Skinner, M.K. & Moses, H.L. (1989).** Transforming growth factor β gene expression and action in the seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interactions. *Molecular Endocrinology*, 3, 625-634.
- Skinner, M.K., Takacs, K. & Coffey, R.J. (1989).** Transforming growth factor- α -gene expression and action in the seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interactions. *Endocrinology*, 124, 845-854.
- Skinner, M.K., Tung, P.S. & Fritz, I.B. (1985).** Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *Journal of Cell Biology*, 100, 1941-1947.
- Smollich, A. & Michael, G. (1992).** *Mikroskopische Anatomie der Haustiere* (2.

Auflage). Jena/Stuttgart: Gustav Fischer.

Söderström, K.O., Malmi, R. & Karjalainen, K. (1984). Binding of fluorescein isothiocyanate conjugated lectins to rat spermatogenic cells in tissue sections. *Histochemistry*, 80, 575-579.

Sowerbutts, S.F., Jarvis, L.G. & Setchell, B.P. (1986). The increase in testicular vascular permeability induced by human chorionic gonadotrophin involves 5-hydroxytryptamine and possibly oestrogens, but not testosterone, prostaglandins, histamine or bradykinin. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 64, 137-147.

Sprando, R.L. & Russell, L.D. (1987). Comparative study of cytoplasmic elimination in spermatids of selected mammalian species. *American Journal of Anatomy*, 178, 72-80.

Steger, K. (1994). *Die postnatale Ontogenese des Hodens beim Schaf (Ovis ammon): eine histologische, ultrastrukturelle, morphometrische, lektin- und immunhistochemische Untersuchung.* Dissertation, Universität Regensburg, Regensburg.

Steger, K., Rey, R., Louis, F., Kliesch, S., Behre, H.M., Nieschlag, E. et al. (1999). Reversion of the differentiated phenotype and maturation block in Sertoli cells in pathological human testis. *Human Reproduction*, 14, 136-143.

Steger, K., Schimmel, M. & Wrobel, K.-H. (1994). Immunocytochemical demonstration of cytoskeletal proteins in seminiferous tubules of adult rams and bulls. *Archives of Histology and Cytology*, 57, 17-28.

Steger, K., Slavov, M., Failing, K., Weidner, W. & Bergmann, M. (2005). Effect of vasectomy on sperm nuclear chromatin condensation in the rabbit. *Journal of Andrology*, 26, 289-295.

Steger, K. & Wrobel, K.-H. (1994). Immunohistochemical demonstration of cytoskeletal proteins in the ovine testis during postnatal development. *Anatomia & Embryologia*, 189, 521-530.

Steinberger, A. & Steinberger, E. (1971). Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biology of Reproduction*, 4, 84-87.

Steinert, P.M., Jones, J.C.R. & Goldman, R.D. (1984). Intermediate filaments. *Journal of Cell Biology*, 99, 22s-26s.

Stosiek, P., Kasper, M. & Karsten, U. (1990). Expression of cytokeratins 8 and 18 in human Sertoli cells of immature and atrophic seminiferous tubules. *Differentiation*, 43, 66-70.

Su, L., Mruk, D.D. & Cheng, C.Y. (2011). Drug transports, the blood testis barrier, and spermatogenesis. *Journal of Endocrinology*, 209, 207-223.

Suárez-Quian, C.A., Martínez-García, F., Nistal, M. & Regadera, J. (1999). Androgen receptor distribution in adult human testis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84, 350-358.

Sun, E.L. & Gondos, B. (1986). Formation of the blood-testis barrier in the rabbit. *Cell and Tissue Research*, 243, 575-578.

Swierstra, E.E. (1968). Cytology and duration of the cycle of seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. *Anatomical Record*, 161, 171-186.

Swierstra, E.E. & Foote, R. (1963). Cytology and kinetics of spermatogenesis in the rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility*, 5, 309-322.

Swierstra, E.E. & Foote, R. (1965). Duration of spermatogenesis and spermatozoan transport in the rabbit based on cytological changes, DNA synthesis and labeling with tritiated thymidine. *American Journal of Anatomy*, 116, 401-412.

Swierstra, E.E., Gebauer, M.R. & Pickett, B.W. (1974). Reproductive

physiology of the stallion. I. Spermatogenesis and testis composition. *Journal of Reproduction and Fertility*, 40, 113-123.

Tanemura, K., Kurohmaru, M., Kuramoto, K., Matsumoto, M. & Hayashi, Y. (1994). Age-related changes in cytoskeletal components of the BDF1 mouse Sertoli cells. *Tissue and Cell*, 26, 447-455.

Tash, J.S., Chakrasali, R., Jakkaraj, S.R., Hughes, J., Smith, S.K., Hornbaker, K. et al. (2008). Gamendazole, an orally active indazole carboxylic acid male contraceptive agent, targets HSP90AB1(HSP90BETA) and EE1A1(eEF1A), and stimulates Il1a transcription in rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction*, 78, 1139-1152.

Tateno, H., Kuno, A. & Hitabayashi, J. (2009). How to determine specificity: from lectin profiling to glycan mapping. In: H. Gabius (Hrsg.), *The sugar code fundamentals of glycosciences* (S. 247-259). Weinheim: Wiley

Teerds, K.J., de Rooij, D.G., Rommerts, F.F.G., Van der Tweel, I. & Wensing, C.J.G. (1989). Turnover time of Leydig cells and other interstitial cells in testes of adult rats. *Archives of Andrology*, 23, 105-111.

Thompson, T.L. & Berndtson, W.R. (1993). Testicular weight, Sertoli cell number, daily sperm production, and sperm output of sexually mature rabbits after neonatal or prepubertal hemicastration. *Biology of Reproduction*, 48, 952-957.

Tierschutzbericht der Bundesregierung 2011-Bericht über den Stand der Entwicklung des Tierschutzes Zugriff am 31.05.2012 http://www.bmt-tierschutz.de/.../2011/Tierschutzbericht_2011_vorlaeufigesPDF.pdf

Tinajero, J.C., Fabbri, A. & Dufau, M.L. (1992). Regulation of corticotropin-releasing factor secretion from Leydig cells by Serotonin. *Endocrinology*, 130, 1780-1787.

Tres, L.L., Rivkin, E. & Kierszenbaum, A.L. (1996). Sak57, an intermediate filament keratin present in intercellular bridges of rat primary spermatocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 45, 93-105.

Tsunenari, I. & Kast, A. (1992). Developmental and regressive changes in the testes of the Himalayan rabbit. *Laboratory Animals*, 26, 167-179.

Tuck, R.R., Setchell, B.P., Waites, G.M.H. & Young, J.A. (1970). The composition of fluid collected by micropuncture and catheterization from the seminiferous tubules and rete testis of rats. *Pflügers Archiv*, 318, 225-243.

Tung, P.S. & Fritz, I.B. (1990). Characterization of rat testicular peritubular myoid cells in culture: α -smooth muscle isoactin is a specific differentiation marker. *Biology of Reproduction*, 42, 351-365.

Tung, P.S., Rosenior, J. & Fritz, I.B. (1987). Isolation and culture of ram rete testis epithelial cells: structural and biochemical characteristics. *Biology of Reproduction*, 36, 1297-1312.

Vergowen, R.P.F.A., Jacobs, S.G.M., Huiskamp, R., Davids, J.A.G. & Rooij, D.G. (1991). Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *Journal of Reproductive Fertility*, 93, 233-243.

Verini-Supplizi, A., Stradaoli, G., Fagioli, O. & Parillo, F. (2000). Localization of the lectin reactive sites in adult and prepubertal horse testes. *Research in Veterinary Science*, 69, 113-118.

Vilar, O. (1970). Histology of the human testis from neonatal period to adolescence. In E. Rosenberg & C.A. Paulsen (Hrsg.), *The human testis* (S. 95-101). New York: Plenum.

Virtanen, I., Kallajoki, M., Närvänen, O., Paranko, J., Thornell, L.-E., Miettinen, M. et al. (1986). Peritubular myoid cells of human and rat testis are smooth muscle cells that contain desmin-type intermediate filaments. *Anatomical*

Record, 215, 10-20.

Viotto, M. J. S., Orsi, A.M., Vicentini, C.A., Mello Dias, S. & Gregório, E.A. (1993). Ultrastructure of the rete testis in the cat (*Felis domestica*, L.). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 22, 114-122.

Vogl, A.W., Pfeiffer, D.C., Mulholland, D., Kimel, G. & Guttman, J. (2000). Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: ectoplasmic specializations. *Archives of Histology and Cytology*, 63, 1-15.

von Herrath, E. & Abramow, S. (1950). *Atlas der normalen Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen* (1. Auflage). Stuttgart: Thieme.

Wakui, S., Furusato, M., Ushigome, S. & Kano, Y. (1994). Coexpression of different cytokeratins, vimentin and desmin in the rete testis and epididymis in the dog. *Journal of Anatomy*, 184, 147-151.

Walsh, G.M. (1997). Human eosinophils: their accumulation, activation and fate. *British Journal of Haematology*, 97, 701-709.

Weber, M.A., Groos, S., Aumüller, G. & Konrad, L. (2002). Post-natal development of the rat testis: steroid hormone receptor distribution and extracellular matrix deposition. *Andrologia*, 34, 41-54.

Wehrend, A., Hetzel, U., Huchzermeyer, S., Klein, C. & Bostedt, H. (2004). Sirius Red is able to selectively stain eosinophil granulocytes in bovine, ovine and equine cervical tissue. *Anatomie, Histologie, Embryologie*, 33, 180-182

Welsch, U. (2010). *Lehrbuch Histologie* (3. Auflage). München: Urban Fischer.

Weyrauch, K.D. & Smollich, A. (1998). *Histologie-Kurs für Veterinärmediziner*. Stuttgart: Enke Verlag.

Winkelmann, J. & Lammers, H.-J. (1996). *Kaninchenkrankheiten*. Stuttgart: Ulmer Verlag.

Wrobel, K.-H. (1990). Männliche Geschlechtsorgane. In W. Mosimann & T. Kohler (Hrsg.), *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere* (S. 206-219). Berlin: Paul Parey.

Wrobel, K.-H., Bickel, D., Kujat, R. & Schimmel, M. (1995a). Configuration and distribution of bovine spermatogonia. *Cell and Tissue Research*, 279, 277-289.

Wrobel, K.-H., Bickel, D., & Kujat, R. (1995b). Distribution pattern of F-actin, vimentin and alpha-tubulin in the bovine testis during postnatal development. *Acta Anatomica*, 153, 263-272

Wrobel, K.-H., Dostal, S. & Schimmel, M. (1988). Postnatal development of the tubular lamina propria and the intertubular tissue in the bovine testis. *Cell and Tissue Research*, 252, 639-653.

Wrobel, K.-H. & Hees, H. (1987). Über heterotope Leydigzellen bei der Katze. *Antomia, Histologia, Embryologia*, 16, 289-292.

Wrobel, K.-H., Mademann, R. & Sinowatz, F. (1979). The lamina propria of the bovine seminiferous tubule. *Cell and Tissue Research*, 202, 357-377.

Wrobel, K.-H., Schilling, E. & Zwack, M. (1986). Postnatal development of the connexion between tubulus seminiferus and tubulus rectus in the bovine testis. *Cell and Tissue Research*, 246, 387-400.

Wrobel, K.-H. & Schimmel, M. (1989). Morphology of the bovine Sertoli cell during the spermatogenic cycle. *Cell and Tissue Research*, 257, 93-103.

Wrobel, K.-H. & Sinowatz, F. (1982). Aktuelle Probleme der funktionellen Morphologie des Rinderhodens. *Tierärztliche Praxis*, 10, 35-47.

Wrobel, K.-H., Sinowatz, F. & Kugler, P. (1978). Zur funktionellen Morphologie des Rete testis, der Tubuli recti und der Terminalsegmente der Tubuli seminiferi des geschlechtsreifen Rindes. *Zentralblatt für Veterinärmedizin (Reihe C) Anatomia, Histologia, Embryologia*, 7, 320-335.

- Wrobel, K.-H., Sinowatz, F. & Mademann, R. (1981).** Intertubular topography in the bovine testis. *Cell and Tissue Research*, 217, 289-310.
- Wrobel, K.-H., Sinowatz, F. & Mademann, R. (1982).** The fine structure of the terminal segment of the bovine seminiferous tubule. *Cell and Tissue Research*, 225, 29-44.
- Wrobel, K.-H. & Schimmel, M. (1989).** Morphology of the bovine Sertoli cell during the spermatogenic cycle. *Cell and Tissue Research*, 257, 93-103.
- Yan, H.H.N., Mruk, D.D., Wong, E.W.P., Lee, W.M. & Cheng, C.Y. (2008).** An autocrine axis in the testis that coordinates spermiation and blood-testis barrier restructuring during spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 8950-8955.
- Yazama, F., Esaki, M. & Sawada, H. (1997).** Immunocytochemistry of extracellular matrix components in the rat seminiferous tubule: electron microscopic localization with improved methodology. *Anatomical Record*, 248, 51-62.
- Yazama, F., Sawada, H., Hirosawa, K., Hayashi, Y. & Nishida, T. (1991).** Deep-etch visualization of the Sertoli cell (blood-testis) barrier in the boar. *Tissue and Cell*, 23, 235-246.
- You, S., Zuo, L. & Varma, V. (2010).** Broad tissue expression of membrane progesterone receptor alpha in normal mice. *Journal of Molecular Histology*, 41, 101-110.
- Yule, T.D., Montoya, G.D., Russell, L.D., Williams, T.M. & Tung, K.S.K. (1988).** Autoantigenic germ cells exist outside the blood testis barrier. *Journal of Immunology*, 141, 1161-1167.
- Zhou, X.H., Kawakami, H. & Hirano, H. (1992).** Changes in lectin binding patterns of Leydig cells during fetal and postnatal development in mice. *Histochemical Journal*, 24, 354-360.
- Zhu, L.-J., Zong, S.-D., Phillips, D.M., Moo-Young, A.J. & Bardin, C.W. (1997).** Changes in the distribution of intermediate filaments in rat Sertoli cells during the seminiferous epithelium cycle and postnatal development. *Anatomical Record*, 248, 391-405.
- Zirkin, B.R., Ewing, L.L., Kromann, N. & Cochran, R.C. (1980).** Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused *in vitro*: correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology*, 107, 1867-1874.

2. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Durchschnittswerte der verschiedenen Hodengewebsteile..... | 27 |
| Tabelle 2: Vorkommen von α -SMA im gesunden adulten Hoden des Menschen und verschiedener Tierarten..... | 35 |
| Tabelle 3: Einteilung der Zytokeratine..... | 36 |
| Tabelle 4: Vorkommen von Vimentin im gesunden adulten Hoden des Menschen und verschiedener Tierarten..... | 39 |
| Tabelle 5: Vorkommen von Progesteronrezeptoren im gesunden adulten Hoden des Menschen und verschiedener Tierarten..... | 40 |
| Tabelle 6: Übersicht über die untersuchten geschlechtsreifen Kaninchen..... | 42 |
| Tabelle 7: Übersicht über die untersuchten nicht-geschlechtsreifen Kaninchen.. | 43 |
| Tabelle 8: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Lektine..... | 49 |
| Tabelle 9: Verwendete Konzentration und Positivkontrolle bei den verwendeten FITC-markierten Lektine..... | 50 |
| Tabelle 10: Konzentration und Positivkontrolle bei den verwendeten | |

| | |
|---|-----|
| biotinylierten Lektinen..... | 51 |
| Tabelle 11: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Hemmzucker..... | 52 |
| Tabelle 12: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper..... | 54 |
| Tabelle 13: Vorbehandlung der Schnitte für immunhistochemischen Untersuchungen..... | 56 |
| Tabelle 14: Übersicht über die in der Immunhistochemie verwendete Positiv- kontrollen..... | 57 |
| Tabelle 15: Prozentzahl der Tubuli seminiferi contorti ohne Lumen/mit begonnener Lumenbildung/mit (weitgehend) abgeschlossener Lumenbildung im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 71 |
| Tabelle 16: Die acht Phasen des Keimepithelzykluses des Kaninchens und die dabei auftretenden Keimzellen..... | 87 |
| Tabelle 17: Messung der Höhe des Keimepithels bei geschlechtsreifen Kaninchens..... | 87 |
| Tabelle 18: Berechnung des Prozentsatzes der Tubuli seminiferi contorti mit Spermatozyten, Spermatiden und Spermien beim nicht-geschlechtsreifen Kaninchen..... | 88 |
| Tabelle 19: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von ConA-FITC im akrosomalen System der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 129 |
| Tabelle 20: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von ConA-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 129 |
| Tabelle 21: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von ConA-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 131 |
| Tabelle 22: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von LCA-FITC im akrosomalen System der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 133 |
| Tabelle 23: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von LCA-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 133 |
| Tabelle 24: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von LCA-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 136 |
| Tabelle 25: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von PSA-FITC im akrosomalen System der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 138 |
| Tabelle 26: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von PSA-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 138 |
| Tabelle 27: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von PSA-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 140 |
| Tabelle 28: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von RCA-I-FITC im akrosomalen System der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 142 |
| Tabelle 29: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von RCA-I-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 143 |
| Tabelle 30: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von RCA-I-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 144 |
| Tabelle 31: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von VAA-FITC im akrosomalen System der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 145 |
| Tabelle 32: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von VAA-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 145 |
| Tabelle 33: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von VAA-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 146 |
| Tabelle 34: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von PNA-FITC im akrosomalen System der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 147 |
| Tabelle 35: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von PNA-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 147 |
| Tabelle 36: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von PNA-FITC im | |

| | |
|--|-----|
| Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 148 |
| Tabelle 37: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von WGA-FITC im akrosomalen System der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 150 |
| Tabelle 38: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von WGA-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 151 |
| Tabelle 39: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von WGA-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 153 |
| Tabelle 40: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von WGAs-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 155 |
| Tabelle 41: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von WGAs-FITC im akrosomalen System der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 156 |
| Tabelle 42: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von WGAs-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 157 |
| Tabelle 43: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von SJA-FITC im akrosomalen System der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 159 |
| Tabelle 44: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von SJA-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 159 |
| Tabelle 45: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von SJA-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 160 |
| Tabelle 46: Glykohistochemischer Nachweis von biotinyliertem SNA im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 161 |
| Tabelle 47: Glykohistochemischer Nachweis von biotinyliertem SNA im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 162 |
| Tabelle 48: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von GSL-I-FITC im akrosomalen System der Keimzellen des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 163 |
| Tabelle 49: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von GSL-I-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 164 |
| Tabelle 50: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von GSL-I-FITC im Hoden des nicht- geschlechtsreifen Kaninchens..... | 165 |
| Tabelle 51: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von PHA-E-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 167 |
| Tabelle 52: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von PHA-E-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 168 |
| Tabelle 53: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von PHA-L-FITC im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 168 |
| Tabelle 54: Glykohistochemischer Nachweis der Bindung von PHA-L-FITC im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 169 |
| Tabelle 55: Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 171 |
| Tabelle 56: Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 176 |
| Tabelle 57: Immunhistochemischer Nachweis von CK 5 im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 180 |
| Tabelle 58: Immunhistochemischer Nachweis von CK 5 im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 181 |
| Tabelle 59: Immunhistochemischer Nachweis von CK 14 im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 183 |
| Tabelle 60: Immunhistochemischer Nachweis von CK 14 im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 184 |
| Tabelle 61: Immunhistochemischer Nachweis von CK 18 im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 186 |
| Tabelle 62: Immunhistochemischer Nachweis von CK 18 im Hoden des nicht- | |

| | |
|---|-----|
| geschlechtsreifen Kaninchens..... | 187 |
| Tabelle 63: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen mit einem Panzytokeratin-Antikörper im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 189 |
| Tabelle 64: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen mit einem Panzytokeratin-Antikörper im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 190 |
| Tabelle 65: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 192 |
| Tabelle 66: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin im Hoden des nicht-geschlechtsreifen Kaninchens..... | 194 |
| Tabelle 67: Immunhistochemischer Nachweis von Progesteronrezeptoren im Hoden des geschlechtsreifen Kaninchens..... | 197 |

3. Bilderverzeichnis

| | |
|--|----|
| Bild 1: Ein Vertreter der Kaninchenrasse „Grauer Wiener“..... | 2 |
| Bild 2: Hodenkapsel eines geschlechtsreifen Kaninchens. Trichromfärbung nach Masson-Goldner..... | 63 |
| Bild 3: Heterotope Leydig-Zellen in der Hodenkapsel eines geschlechtsreifen Kaninchens. Trichromfärbung nach Masson-Goldner..... | 63 |
| Bild 4: Hodenkapsel eines geschlechtsreifen Kaninchens. Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung..... | 64 |
| Bild 5: Septulae testis im Hoden eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Trichromfärbung nach Masson-Goldner..... | 66 |
| Bild 6: Septulae testis im Hoden eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung..... | 66 |
| Bild 7: Hodenparenchym eines geschlechtsreifen Kaninchens. HE-Färbung..... | 67 |
| Bild 8: Hodenparenchym eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 68 |
| Bild 9: Tubulus seminifer contortus ohne Lumen eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 69 |
| Bild 10: Tubulus seminifer contortus mit begonnener Lumenbildung eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 69 |
| Bild 11: Tubulus seminifer contortus mit begonnener Lumenbildung eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 70 |
| Bild 12: Tubulus seminifer contortus mit abgeschlossener Lumenbildung eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 70 |
| Bild 13: Hodenparenchym eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 72 |
| Bild 14: Hodenparenchym eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 72 |
| Bild 15: Lamina propria im Hoden eines geschlechtsreifen Kaninchens. Trichromfärbung nach Masson-Goldner..... | 73 |
| Bild 16: Lamina propria im Hoden eines geschlechtsreifen Kaninchens. Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung..... | 74 |
| Bild 17: Kern einer Sertoli-Zelle im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 75 |
| Bild 18: Stützzellen im Keimepithel eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 76 |
| Bild 19: Stützzellen im Keimepithel eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. | |

| | |
|---|-----|
| PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 77 |
| Bild 20: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase I. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 81 |
| Bild 21: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase II. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 82 |
| Bild 22: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase III. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 83 |
| Bild 23: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase IV. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 84 |
| Bild 24: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phasen V-VII. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 85 |
| Bild 25: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase VIII. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 86 |
| Bild 26: Tubulus seminifer contortus eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 89 |
| Bild 27: Tubulus seminifer contortus eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 89 |
| Bild 28: Tubulus seminifer contortus eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 90 |
| Bild 29: Tubulus seminifer contortus eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens, PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 90 |
| Bild 30: Tubulus seminifer contortus eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens, PAS-Färbung nach McManus ohne Amylase-Verdau..... | 90 |
| Bild 31: Terminalsegment eines geschlechtsreifen Kaninchens. HE-Färbung.... | 92 |
| Bild 32: Vergrößerung Terminalsegment eines geschlechtsreifen Kaninchens. HE-Färbung..... | 93 |
| Bild 33: Terminalsegment und Tubulus rectus im Hoden eines geschlechtsreifen Kaninchens. PAS-Färbung nach Mc Manus ohne Amylase-Verdau..... | 95 |
| Bild 34: Tubulus rectus eines geschlechtsreifen Kaninchens. Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung..... | 95 |
| Bild 35: Tubulus rectus eines geschlechtsreifen Kaninchens. HE-Färbung..... | 96 |
| Bild 36: Tubuli recti im Hoden eines nicht-geschlechtsreifen Hodens. HE- Färbung..... | 97 |
| Bild 37: Chordae retis im Rete testis eines geschlechtsreifen Kaninchens. Trichromfärbung nach Masson-Goldner..... | 98 |
| Bild 38: Rete testis im Mediastinum testis eines geschlechtsreifen Kaninchens. Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner..... | 99 |
| Bild 39: Rete testis im Mediastinum testis eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. HE-Färbung..... | 100 |
| Bild 40: Leydig-Zellen im Interstitium eines geschlechtsreifen Kaninchens. Trichromfärbung nach Masson-Goldner..... | 102 |
| Bild 41: Mastzelle im Interstitium eines geschlechtsreifen Kaninchens. Alcianblau-Färbung bei pH 2,5..... | 102 |
| Bild 42: Eosinophiler Granulozyt im Interstitium des geschlechtsreifen Kaninchens. Sirius Red-Färbung..... | 103 |
| Bild 43: Intertubuläres Gewebe eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Trichromfärbung nach Masson-Goldner..... | 104 |
| Bild 44: Ausschnitt Lamina propria eines geschlechtsreifen Kaninchen. TEM.. | 105 |
| Bild 45: Kern einer Sertoli-Zelle im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM..... | 107 |
| Bild 46: Kern einer Stützzelle im Keimepithel eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. TEM..... | 109 |

| | |
|--|-----|
| Bild 47: A-Spermatogonie im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM..... | 110 |
| Bild 48: B-Spermatogonie und Lamina propria eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM..... | 112 |
| Bild 49: Primäre Spermatozyte im Pachytän im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM..... | 113 |
| Bild 50: Runde Spermatische in der frühen Kappenphase im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM..... | 115 |
| Bild 51: Runde Spermatische in der Kappenphase im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM..... | 116 |
| Bild 52: Runde Spermatische in der späten Kappenphase im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM..... | 116 |
| Bild 53: Elongierende Spermatische in der Akrosomenphase im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM..... | 117 |
| Bild 54: Elongierte Spermatische in der Akrosomenphase im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM..... | 118 |
| Bild 55: Elongierte Spermatische während der Reifungsphase im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM..... | 119 |
| Bild 56: Elongierte Spermatische während der Reifungsphase im Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM..... | 120 |
| Bild 57: Runde Spermatische in der frühen Kappenphase im Keimepithel eines nicht geschlechtsreifen Kaninchens. TEM..... | 124 |
| Bild 58: Leydig-Zellen eines geschlechtsreifen Kaninchens. TEM..... | 125 |
| Bild 59: Leydig-Zelle eines geschlechtsreifen Kaninchens in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Blutgefäß. TEM..... | 126 |
| Bild 60: Zytoplasma einer Leydig-Zelle eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. TEM..... | 127 |
| Bild 61: Rete testis im Mediastinum testis eines geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung mit ConA-FITC..... | 130 |
| Bild 62: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase V-VII. Bindung mit ConA-FITC..... | 130 |
| Bild 63: Hodenkapsel eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung mit ConA-FITC..... | 132 |
| Bild 64: Rete testis im Mediastinum testis eines geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung mit LCA-FITC..... | 134 |
| Bild 65: Hodenparenchym eines geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung mit LCA-FITC..... | 134 |
| Bild 66: Hodenparenchym eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung mit LCA-FITC..... | 135 |
| Bild 67: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase I. Bindung mit PSA-FITC..... | 137 |
| Bild 68: Hodenparenchym eines geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung mit PSA-FITC..... | 137 |
| Bild 69: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase VIII. Bindung mit PSA-FITC..... | 139 |
| Bild 70: Interstitium eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung von PSA-FITC..... | 140 |
| Bild 71: Tubulus seminifer contortus eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung mit PSA-FITC..... | 141 |
| Bild 72: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase V-VII. Bindung von RCA-I-FITC..... | 142 |
| Bild 73: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase | |

| | |
|---|-----|
| VIII. Bindung von RCA-I-FITC..... | 143 |
| Bild 74: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase I. Bindung von biotinyliertem VVA..... | 144 |
| Bild 75: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase I. Bindung mit PNA-FITC..... | 148 |
| Bild 76: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase I. Bindung mit WGA-FITC..... | 150 |
| Bild 77: Akrosomales System eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase III. Bindung mit WGA-FITC..... | 151 |
| Bild 78: Akrosomales System eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase V-VII. Bindung mit WGA-FITC..... | 152 |
| Bild 79: Hodenparenchym eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung mit WGA-FITC..... | 153 |
| Bild 80: Interstitium und Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchen. Bindung mit WGAs-FITC..... | 154 |
| Bild 81: Rete testis eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung mit WGAs-FITC..... | 157 |
| Bild 82: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase I. Bindung mit SJA-FITC..... | 160 |
| Bild 83: Hodenparenchym eines geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung mit biotinyliertem SNA..... | 161 |
| Bild 84: Rete testis eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung mit biotinyliertem SNA..... | 162 |
| Bild 85: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase I. Bindung mit SJA-FITC..... | 163 |
| Bild 86: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase V-VII. Bindung mit SJA-FITC..... | 164 |
| Bild 87: Tubulus rectus eines geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung mit PHA-E-FITC..... | 166 |
| Bild 88: Hodenparenchym eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Bindung mit PHA-L-FITC..... | 169 |
| Bild 89: Hodenkapsel und Hodenparenchym eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA..... | 172 |
| Bild 90: Mediastinum testis und Rete testis eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA..... | 172 |
| Bild 91: Mediastinum testis und Rete testis eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA..... | 173 |
| Bild 92: Tubuli recti eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA..... | 173 |
| Bild 93: Rete testis eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA..... | 174 |
| Bild 94: Rete testis eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA..... | 175 |
| Bild 95: Hodenkapsel und Hodenparenchym eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA..... | 175 |
| Bild 96: Tubuli recti im Hoden eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA..... | 177 |
| Bild 97: Keimepithel eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von CK 5..... | 178 |
| Bild 98: Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase I. Immunhistochemischer Nachweis von CK 5..... | 178 |
| Bild 99: Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase III. | |

| | |
|--|-----|
| Immunhistochemischer Nachweis von CK 5..... | 179 |
| Bild 100: Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase V-VII. | |
| Immunhistochemischer Nachweis von CK 5..... | 179 |
| Bild 101: Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase VIII. Nachweis von CK 5..... | 180 |
| Bild 102: Rete testis eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. | |
| Immunhistochemischer Nachweis von CK 5..... | 182 |
| Bild 103: Rete testis eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von CK 14..... | 183 |
| Bild 104: Terminalsegment und Tubuli recti eines geschlechtsreifen Kaninchens. | |
| Immunhistochemischer Nachweis von CK 18..... | 185 |
| Bild 105: Übersicht Hodenparenchym eines geschlechtsreifen Kaninchens. | |
| Immunhistochemischer Nachweis von CK 18..... | 185 |
| Bild 106: Tubuli recti eines geschlechtsreifen Kaninchens. | |
| Immunhistochemischer Nachweis von CK 18..... | 186 |
| Bild 107: Übersicht Hodenparenchym eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. | |
| Immunhistochemischer Nachweis von CK 18..... | 187 |
| Bild 108: Tubulus rectus eines geschlechtsreifen Kaninchens. | |
| Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin..... | 188 |
| Bild 109: Rete testis eines geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin..... | 188 |
| Bild 110: Ausschnitt Hodenkapsel eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. | |
| Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin..... | 189 |
| Bild 111: Rete testis-Epithel eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. | |
| Immunhistochemischer Nachweis von Panzytokeratin..... | 190 |
| Bild 112: Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens. | |
| Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin..... | 192 |
| Bild 113: Übersicht Hodenparenchym eines geschlechtsreifen Kaninchens. | |
| Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin..... | 193 |
| Bild 114: Tubulus seminifer contortus mit Lumen eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin..... | 195 |
| Bild 115: Tubulus seminifer contortus mit Lumen eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin..... | 195 |
| Bild 116: Tubulus seminifer contortus mit Lumen eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin..... | 196 |
| Bild 117: Rete testis im Mediastinum testis eines nicht-geschlechtsreifen Kaninchens. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin..... | 196 |
| Bild 118: Tubulus seminifer contortus eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase V-VII. Immunhistochemischer Nachweis von Progesteronrezeptoren..... | 198 |
| Bild 119: Vergrößerung Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase V-VII. Immunhistochemischer Nachweis von Progesteronrezeptoren..... | 198 |
| Bild 120: Vergrößerung Keimepithel eines geschlechtsreifen Kaninchens, Phase VIII. Immunhistochemischer Nachweis von Progesteronrezeptoren..... | 199 |

IX. ANHANG**Lichtmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie, Immunhistochemie****Fixierlösungen**

| | | |
|--------------------------|---|-----------------------------|
| Bouin`sche Lösung | Gesättigte wässrige Pikrinsäure ¹ (filtriert) 37% Formaldehyd ² Eisessig ¹ | 1500 ml 500 ml 100 ml |
| Formalin | 37% Formaldehyd ² 1:10 mit PBS verdünnen | |

Puffer

| | | | |
|----------------------------|---|--|------------------------------------|
| PBS-Puffer pH 7,4 | Natriumchlorid ¹ Di-Natrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat ¹ Natrium-dihydrogenphosphat-Monohydrat ¹ ad Aqua dest. | | 42,50 g 6,35 g 1,95 g 5 l |
| Citratpuffer pH 6,0 | <i>Stammlösung A</i> | 0,1M Zitronensäure ¹ ad Aqua dest. | 21,01 g 1000 ml |
| | <i>Stammlösung B</i> | 0,1M Natriumcitrat ² ad Aqua dest. | 29,41 ml 1000 ml |
| | <i>Gebrauchslösung</i> | Stammlösung A Stammlösung B ad Aqua dest. | 9 ml 41 ml 500 ml |

Hämalaun-Eosin-Färbung

| | | | | |
|-----------------|--|--|--|------------------------------|
| Hämalaun | Hämatoxilin Natriumjodat Kalialaun ¹ p.A. | 2,0 g 0,4 g 100 g | Chloralhydrat ¹ Zitronensäure ¹ krist. ad Aqua dest. | 100 g 2 g 2000 ml |
| Eosin | <i>1% Stammlösung</i> | Eosin Aqua dest. 37% Formaldehyd | | 2,0 g 198 ml 5 Tropfen |
| | <i>Gebrauchslösung</i> | Stammlösung Aqua dest. Eisessig | | 60 ml 600 ml 8 Tropfen |

Alcianblau 8 GX bei pH 2,5 und pH 1,0

| | | |
|--|--|---------------|
| Alcianblau pH 2,5 | Alcianblau 8 GX ¹ 3% Essigsäure ¹ | 1g 100 ml |
| Alcianblau pH 1,0 | Alcianblau 8 GX ¹ 0,1 N Salzsäure ¹ | 1 g 100 ml |
| pH-Wert auf 2,5 bzw. 1,0 einstellen. Lösung filtrieren und Thymolkristall ¹ zusetzen. | | |

Trichromfärbung nach Masson Goldner

| | | | |
|---------------------------------------|---|--|---------------------------|
| Eisen-hämatoxylin nach Weigert | <i>Lösung A:</i> | Hämatoxylin ¹ 96% Alkohol | 1 g 100 ml |
| | <i>Lösung B:</i> | EisenIIIchlorid ¹ Aqua dest. 37% Salzsäure ¹ | 2,48 g 100 ml 1 ml |
| | Mischung von Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:1 | | |
| Azophloxin | Azophloxin ² Aqua dest. Eisessig ¹ | | 0,5 g 100 ml 0,2 ml |
| Phosphormolybdänsäure-Orange | Phosphormolybdänsäure ¹ Aqua dest. Orange G ¹ | | 5 g 100 ml 2 g |
| Lichtgrün | Lichtgrün ¹ Aqua dest. Eisessig ¹ | | 0,2 g 100 ml 0,2 ml |

Resorcinfuchsin-van Gieson-Färbung

| | | |
|---|---|----------------------|
| Resorcinfuchsin | | |
| <i>Lösung A</i> | Fuchsin Resorcin Aqua dest. | 2 g 4 g 200 ml |
| <i>Lösung B</i> | Eisenchlorid ¹ Aqua dest. | 8 g 40 ml |
| Lösung A erhitzen+ Lösung B dazugeben; unter Schwenken 5 min kochen. Auf Raumtemperatur abkühlen lassen + filtrieren. Filter mit Niederschlag in Erlmeyerkolben geben + mit 350 ml 96% Alkohol Übergießen. Erhitzen und nach Abkühlen auf Zimmertemperatur 2,8 ml konz. Salzsäure ¹ zugeben +filtrieren. | | |
| Pikrinsäure-Thiazinrot-Lösung nach Domagk | | |
| gesättigte wässrige Pikrinsäure ¹ 1% wässrige Thiazinlösung ² | | 100 ml 7,5 ml |

PAS-Färbung nach McManus

| | | |
|---|---|--------------------------|
| 0,5% wässrige Perjodsäure | Perjodsäure ¹ Aqua dest. | 1 g 200 ml |
| n-Salzsäure | Aqua dest. konzentrierte Salzsäure ¹ | 900 ml 100 ml |
| Schwefeldioxid-Wasser | Leitungswasser Kalium- Pyrosulfitlösung ² n-Salzsäure ¹ | 200 ml 10 ml 10 ml |
| α-Amylase 0,5% | α -Amylase ¹ Aqua dest. | 10 mg 2 ml |

Sirius Red-Färbung

| | | |
|-------------------|--|--|
| Sirius Red | Sirius Red ³ Aqua bidest absoluter Alkohol ² 1% Natriumhydroxid ¹ 20% Natriumchlorid ¹ | 500 mg 45 ml 50 ml 1 ml 4 ml |
|-------------------|--|--|

Lösungen für immunhistochemischen Untersuchungen

| | | | |
|--|--|---|----------------------------|
| Hemmung endogene Peroxidase | Aqua. dest. Hydrogenperoxid ¹ | 150 ml 50 ml | |
| Streptavidin-Biotin Horseradish | PBS-Puffer Streptavidin aus Flasche A ⁴ biotinylierte Peroxidase aus Flasche B ⁴ | 5 ml 1 Tropfen 1 Tropfen | |
| DAB-Hydrogenperoxidlösung | <i>Stamm-</i> <i>lösung</i> | PBS-Puffer 30% Hydrogenperoxidlösung ¹ | 5 ml 15 µl |
| | <i>Gebrauchs-</i> <i>lösung</i> | Stammlösung DAB-Tabletten ⁴ Aqua dest. | 0,4 ml 6 Stück 60 ml |

Elektronenmikroskopie**Fixanzien**

| | | |
|------------------------------------|---|----------------------------|
| Fixierlösung nach Karnovsky | | |
| <i>Gebrauchslösung</i> | Karnovsky-Stammlösung (s.u.) Glutaraldehyd 25% ⁶ | 10 ml 1,37 ml |
| <i>Karnovsky-Stammlösung</i> | 10% Paraformaldehyd-Lösung (s.u.) 0,2M Natriumcacodylat-Puffer (s.u.) Kalziumchlorid, wasserfrei ⁵ | 20 ml 50 ml 0,05 g |
| <i>10% Paraformaldehyd</i> | Paraformaldehyd ² ad Aqua dest. 1M Natriumhydroxid ¹ | 10g 100 ml 2 Tropfen |

Puffer

| | | | |
|--|--|--|-------------------------|
| 0,2M Natriumcacodylat-Puffer (pH 7,2) | <i>Lösung A</i> | Natriumcacodylat ⁸ ad Aqua dest. | 8,56 g 200 ml |
| | <i>Lösung B</i> | Aqua dest. 0,2 M Salzsäure ⁷ | 100 ml pH einstellen |
| | Lösung A Lösung B | | 50 ml 100 ml |
| 0,1M Natriumcacodylat (pH7,2) | 0,2M Natriumcacodylat-Puffer Aqua dest. | | 50 ml 50 ml |

Kontrastierungslösung

| | |
|---|----------------|
| 2% Osmiumtetroxid-Lösung 4% Osmiumtetroxid ⁹ 0,1M Natriumcacodylat-Puffer (s.u.) | 2 ml 2 ml |
| 3% Kaliumferrocyanid-Lösung Kaliumferrocyanid ² ad 0,1M Natriumcacodylat- Puffer (s.u.) | 0,3 g 10 ml |
| 1% Osmiumtetroxid –1,5% Kaliumferrocyanid in Cacodylatpuffer 2% Osmiumtetroxid-Lösung 3% Kaliumferrocyanid-Lösung | 4 ml 4 ml |

Einbettung

| | |
|---|--------|
| Polyembed-Einbettung | |
| Poly/Bed 812 (1,2,3-Propanetriol, polymer with (Chlormethyl)oxirane) ⁹ | 20 ml |
| DDSA (Dodecyl succinyl Anhydride) ⁹ | 16 ml |
| NMA (Nadic Methyl Anhydride) ⁹ | 10 ml |
| BDMA (N,N-Benzyl dimethylamine) ⁹ | 1,4 ml |

Färbelösung

| | | | |
|-------------------------------------|--|--|--------------|
| Methylenblau nach Richardson | <i>Lösung A</i> | 1% Methylenblau ¹ 1% Borax (Natriumtetraboraldehydhydrat)-Lösung ⁵ | 1g 100ml |
| | <i>Lösung B</i> | Azur II ¹⁰ ad Aqua dest. | 1g 100 ml |
| | Lösung A und Lösung B im Verhältnis von 1: 1 mischen | | |

Nachkontrastierungsmedien

| | | |
|---|--|--------------------------------------|
| Bleicitratlösung nach Reynolds (pH~12) | Bleinitrat ² Natriumcitrat ² Aqua dest. 1M Natriumhydroxid ¹ | 0,266 g 0,352 g 5 ml 1,6 ml |
|---|--|--------------------------------------|

¹Fa. Merck, Darmstadt ²Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim ³Steinheim REACTIFS, Martillac, Frankreich ⁴Fa. Dako, Hamburg ⁵Fa. Serva, Heidelberg ⁶Fa. Plano, Wetzlar ⁷Fa. Roth, Karlsruhe ⁸Fa. Agar Scientific Ltd, Essex, Großbritannien ⁹Fa. Polysciences, Eppelheim ¹⁰Fa. Chroma-Gesellschaft, Münster

X. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien, das Anfertigen der elektronenmikroskopischen Bilder sowie die Betreuung bedanken.

Ferner danke ich den Mitgliedern des Kaninchenzuchtvereins B 630 Stamm Abensberg für die Bereitstellung der Kaninchen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau G. Rußmeier für die Bereitstellung der Fixanzien, die Einbettung der lichtmikroskopischen Proben sowie die Einarbeitung in die immunhistochemischen Techniken bedanken.

Zudem danke ich vielmals Herrn Y. Göck für die Einarbeitung in licht- und glykohistochemischen Techniken.

Frau W. Scholz und Frau C. Neumüller danke ich ganz herzlich für deren engagierten Einsatz bei der Vorbereitung und Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Auch Herrn Dr. F. Habermann danke ich für seinen fachkundigen Rat und Einweisung in das Fluoreszenzmikroskop.

Bei Frau M. Kazior möchte ich mich für die Unterstützung in organisatorischen Fragen bedanken.

Weiterhin danke ich Frau Dr. D. Rodler, Herr Dr. J. Wendl sowie Frau Dr. E. Philipp für die Überlassung von Proben zur Anfertigung der Positivkontrollen.

Zudem möchte ich mich bei Frau Dr. K. Ebach und Frau Dr. D. Rodler für deren fachlichen Rat bedanken.

Ebenfalls gilt mein Dank meinen Eltern, deren emotionale und finanzielle Hilfe mir das Studium und die Promotion ermöglicht haben.

Des weiteren bedanke ich bei meiner Schwester E.M. Gebendorfer für ihre Hilfe und Unterstützung.

Ferner möchte ich mich bei Miriam, David, Olga, Jurij, Pjotr und Galina für deren Unterstützung und Zuspruch danken.