

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

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

**Immunhistochemische, glykohistochemische und ultrastrukturelle
Untersuchungen am Hoden des Straußes**
(Struthio camelus)

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Pauline Virginia Kästner geb. Dallmeyer
aus Starnberg

München 2016

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: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger T. Korbel

Tag der Promotion: 6. Februar 2016

Für meine liebste Mama

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Makroskopische Anatomie des Vogelhodens.....	2
2.	Mikroskopische Anatomie des Vogelhodens	4
2.1.	Histologischer Aufbau des Vogelhodens	4
2.2.	Keimzellen in der Spermatogenese	5
2.2.1.1.	Spermatogonien.....	5
2.2.1.2.	Spermatozyten	5
2.2.1.3.	Spermatiden.....	6
2.2.1.4.	Spermien.....	7
3.	Immunhistochemie	8
3.1.	α -SMA („smooth muscle actin“)... ..	8
3.2.	Desmin	9
3.3.	Vimentin.....	9
3.4.	Panzytokeratine	9
3.5.	Myosin.....	10
3.6.	Tubulin	10
3.7.	Connexin	10
3.8.	Cyclooxygenasen	10
3.9.	Östrogenrezeptor (ER)	11
3.10.	Androgenrezeptor (AR).....	11
4.	Lektinhistochemie	12
4.1.	Historie und Definition.....	12
4.2.	Funktion der Lektine	12
4.3.	Einteilung der Lektine	13
4.4.	Bindungsstellen für Lektine im Hoden	15
III.	MATERIAL UND METHODEN	16
1.	Untersuchungsmaterial.....	16
2.	Vorbereitung der Proben.....	16
2.1.	Probenentnahme	16

2.2.	Vorbereitung der Proben für lichtmikroskopische Untersuchungen.....	17
2.2.1.	Fixierung der Proben.....	17
2.2.1.1.	Formalin-Fixierung	17
2.2.1.2.	Bouin-Fixierung	18
2.2.2.	Einbettung der Proben in Paraffin.....	20
2.2.3.	Schneiden der Gewebeproben am Mikrotom.....	20
3.	Konventionelle Färbungen für die Lichtmikroskopie	21
3.1.	Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung	21
3.2.	Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach McManus (PAS-Färbung).....	22
3.3.	Alcianblau-Färbung.....	23
3.3.1.	Durchführung mit pH 1,0.....	23
3.3.2.	Durchführung mit pH 2,5.....	24
3.4.	Toluidinblau-Färbung.....	24
3.5.	Trichromfärbung nach Masson und Goldner	25
3.6.	Resorcinfuchsin-Färbung nach van Gieson	26
3.7.	Auswertung der Schnitte für die konventionellen Färbungen.....	27
4.	Immunhistochemische Untersuchungen	27
4.1.	Auswertung der Schnitte für die Immunhistochemie.....	32
5.	Glykohistochemische Untersuchungen	32
5.1.	Auswertung der Schnitte für die Glykohistochemie	36
6.	Transmissionselektronenmikroskopie.....	36
6.1.	Fixierung der Proben.....	36
6.2.	Vorkontrastierung der Proben	36
6.3.	Einbettung der Proben.....	37
6.4.	Schneiden der Gewebeproben für die Elektronenmikroskopie.....	37
6.5.	Nachkontrastierung	37
6.6.	Auswertung der Schnitte am Transmissionselektronenmikroskop	38
IV.	ERGEBNISSE	39
1.	Makroskopische Untersuchungen am Hoden des Straußes	39
2.	Lichtmikroskopische Untersuchungen am Hoden des Straußes	41

3.	Immunhistochemische Untersuchungen am Hoden des Straußes.....	55
3.1.	Immunhistochemischer Nachweis von „ α -smooth muscle actin“ (α -SMA)	55
3.2.	Immunhistochemischer Nachweis von Desmin	57
3.3.	Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin	59
3.4.	Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen	62
3.5.	Immunhistochemischer Nachweis von Myosin	63
3.6.	Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin.....	65
3.7.	Immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43	67
3.8.	Immunhistochemischer Nachweis von Cyclooxygenasen	69
3.8.1.	Cox-1	69
3.8.2.	Cox-2.....	70
3.9.	Immunhistochemischer Nachweis des Östrogen-Rezeptors α (ER α)	72
3.10.	Immunhistochemischer Nachweis des Androgenrezeptors.....	74
4.	Glykohistochemische Untersuchungen am Hoden des Straußes	76
4.1.	Bindungsstellen für <i>Concanavalin</i> Agglutinin (ConA)	76
4.2.	Bindungsstellen für <i>Lens culinaris</i> Agglutinin (LCA).....	77
4.3.	Bindungsstellen für <i>Pisum sativum</i> Agglutinin (PSA).....	79
4.4.	Bindungsstellen für <i>Ricinus communis</i> Agglutinin (RCA).....	79
4.5.	Bindungsstellen für <i>Arachis hypogaea</i> Agglutinin (PNA)	80
4.6.	Bindungsstellen für <i>Dolichos biflorus</i> Agglutinin (DBA)	80
4.7.	Bindungsstellen für <i>Griffonia simplicifolia I</i> Agglutinin (GSL-1)	80
4.8.	Bindungsstellen für <i>Glycine max</i> Agglutinin (SBA)	80
4.9.	Bindungsstellen für <i>Saphora japonica</i> Agglutinin (SJA)	80
4.10.	Bindungsstellen für <i>Sambucus nigra</i> Agglutinin (SNA).....	80
4.11.	Bindungsstellen für <i>Triticum vulgare</i> Agglutinin (WGA).....	81
4.12.	Bindungsstellen für <i>Triticum vulgare</i> Agglutinin (succinyliert) (WGAs)	83
4.13.	Bindungsstellen für <i>Phaseolus vulgaris E</i> Agglutinin (PHA E).....	85
4.14.	Bindungsstellen für <i>Phaseolus vulgaris L</i> Agglutinin (PHA L)	86
4.15.	Bindungsstellen für <i>Maacia amurensis</i> Agglutinin I (MAL-1)	88
4.16.	Bindungsstellen für <i>Ulex europaeus</i> Agglutinin I (UEA-1)	88
5.	Ultrastrukturelle Untersuchungen am Hoden des Straußes.....	89
5.1.	Ultrastruktur des intertubulären Gewebes.....	89

5.2.	Ultrastruktur der Basalmembran	90
5.3.	Ultrastruktur der Tubuli seminiferi contorti.....	94
V.	DISKUSSION	103
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	116
VII.	SUMMARY	118
VIII.	VERZEICHNISSE	120
1.	Literaturverzeichnis.....	120
2.	Abbildungsverzeichnis	130
3.	Tabellenverzeichnis	133
IX.	ANHANG	134
1.	Alkohol-Lösungen	134
2.	Fixierlösungen (Lichtmikroskopie)	134
2.1.	Formalin-Lösung	134
2.2.	Bouin-Lösung.....	135
3.	Reagenzien für die lichtmikroskopischen Untersuchungen.....	135
3.1.	Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung	135
3.2.	Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach McManus (PAS-Färbung).....	135
3.3.	Alcianblau-Färbung	136
3.4.	Toluidinblau-Färbung.....	137
3.5.	Trichromfärbung nach Masson und Goldner	137
3.6.	Resorcinfuchsin-Färbung nach van Gieson	138
4.	Reagenzien für die immunhistochemischen Untersuchungen	139
5.	Reagenzien für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen	141
X.	DANKSAGUNG	144

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Arterie	h	Stunde
Abb.	Abbildung	HC	Heterochromatin
ABC	Avidin Biotin Komplex	HE	Hämalaun-Eosin
AF	Artefakt	HPA	<i>Helix pomatia</i> Agglutinin
AK	akrosomale Kappe	HRP	horseradish peroxidase
al.	alteri	Ig	Immunglobulin
AP	Anaphase	IG	intertubuläres Gewebe
AR	Androgenrezeptor	K	Kapsel
BG	Bindegewebe	KE	Keimepithel
bidest.	bidestillata	KF	kollagene Faser
BL	Basallamina	kg	Kilogramm
BM	Basalmembran	km	Kilometer
BPA	<i>Bauhinia purpurea</i> Agglutinin	KM	Kermmembran
bzw.	beziehungsweise	krist.	kristallin
C	Celsius	l	Liter
ca.	circa	LAA	<i>Laburnum alpium</i> Agglutinin
CD	caudal	LBA	<i>Lima Bean</i> Agglutinin
cm	Zentimeter	LCA	<i>Lens culinaris</i> Agglutinin
ConA	<i>Concanavalin A</i>	LFA	<i>Limax flavus</i> Agglutinin
Cox	Cyclooxygenase	LPA	<i>Limulus polyphemus</i> Agglutinin
CR	cranial	LTA	<i>Lotus tetragonolobus</i> Agglutinin
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	LZ	Leydig-Zelle
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> Agglutinin	m	Meter
dest.	destillata	MAL	<i>Maacia amurensis</i> Agglutinin
E	elongiert	Man	D-Mannose
e.g.	exempli gratia	max.	maximal
ECA	<i>Erythrina cristagalli</i> Agglutinin	MI	Mikrotubuli
ER	Östrogenrezeptor	min	Minute(n)
ERY	Erythrozyt	mind.	mindestens
F	Fibrozyt	MIP	periphere Mikrotubuli
Fa.	Firma	MIZ	zentrale Mikrotubuli
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat	ml	Milliliter
Fuc	L-Fucose	mm	Millimeter
g	Gramm	MP	Metaphase
Gal	D-Galaktose	MPA	<i>Maclura pomifera</i> Agglutinin
GalNAc	N-Acetyl-D-Galaktosamin	MT	Mitochondrium
GF	Gefäß	NeuNAc	N-Acetyl-D-Neuraminsäure
Glc	D-Glucose	nm	Nanometer
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glukosamin	NU	Nukleolus
GSL	<i>Griffonia simplicifolia</i> Agglutinin	PAS	Perjodsäure-Schiff

PBS	phosphat buffered saline	Tab.	Tabelle
PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i> Agglutinin	Tbl.	Tablette(n)
PNA	<i>Peanut</i> Agglutinin	TD	testis dexter
KO	Kernpore	TE	Tunica externa
PSA	<i>Pisum sativum</i> Agglutinin	TI	Tunica intima
PZ	peritubuläre Zelle	TJ	tight junction
R	rund	TM	Tunica media
RCA	<i>Ricinus communis</i> Agglutinin	TS	testis sinister
rER	raues endoplasmatisches Retikulum	TUB	Tubulus seminiferus contortus
RT	Raumtemperatur	u.a.	unter anderem
s	Sekunde(n)	UEA	<i>Ulex europaeus</i> Agglutinin
SB	scale bar	V	Vene
SBA	Soybean Agglutinin	VAA	<i>Viscum album</i> Agglutinin
SG	Spermatogonie	vgl.	vergleiche
SGA	A-Spermatogonie	VK	akrosomale Vakuole
SGB	B-Spermatogonie	VVA	<i>Visea villosa</i> Agglutinin
SMA	smooth muscle actin	WGA	Wheat germ Agglutinin
SNA	<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin	ZK	Zellkern
SP	Spermium	µg	Mikrogramm
SPT	Spermatid	µl	Mikroliter
STA	<i>Solanum tuberosum</i> Agglutinin	µm	Mikrometer
SZ	Sertoli-Zelle		

I. EINLEITUNG

Der Afrikanische Strauß (*Struthio camelus*) stammt ursprünglich aus den Steppengebieten Asiens. In der heutigen Zeit ist sein Lebensraum vor allem die afrikanische Steppe in Südafrika und Namibia. Mit seiner enormen Kopfhöhe von 2,5-3 m und einem Körpergewicht von bis zu 150 kg ist er der größte Vogel der Erde. Der Strauß gehört zu den Laufvögeln (*Ratitae*, Flachbrustvögel) und kann sich mit einer Geschwindigkeit von ca. 70 km/h fortbewegen. Ursprünglich aufgrund ihrer beeindruckenden Federn in Afrika gezüchtet, wurden die Straußen aufgrund ihres Fleisches und der anderen Produkte (Eier, Leder und Federn) seit den 90er Jahren in Europa zu immer beliebteren Zuchttieren. Die Zuchtsaison beginnt bei den im europäischen Raum lebenden Straußen im März und dauert bis September an. Eine Henne legt durchschnittlich 40-100 Eier pro Saison. Die Geschlechtsaktivität wird bei den Straußen hauptsächlich durch fotoperiodische Änderungen, aber auch durch Einflussfaktoren wie Temperatur und Futterangebot gesteuert. Geschlechtsaktive Hähne haben ein schwarz gefärbtes Gefieder (vgl. Abbildung 1). In meiner Doktorarbeit wird das Hodengewebe des Straußes auf seine histologischen, immunhistochemischen, glykohistochemischen und ultrastrukturellen Besonderheiten hin betrachtet. Ziel dieser Arbeit ist es, die bisher vorliegenden, wenigen Ergebnisse zu den Eigenschaften des Hodengewebes durch immunhistochemische, glykohistochemische und elektronenmikroskopische Erkenntnisse zu ergänzen.



Abbildung 1: Afrikanischer Straußenhahn auf der Straußenfarm Donaumoos

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Makroskopische Anatomie des Vogelhodens

Die Hoden des Vogels sind paarig angelegt (Hummel 2000) und mit einem kurzen Gekröse, dem Mesorchium, an der dorsalen Wand der Leibeshöhle aufgehängt. (Freund 1917; Lake 1957) Der Ansatzpunkt dieses Gekröses befindet sich zwischen Aorta und Niere. (Salomon 1993) Die Hoden (*testes*) sind eingebettet zwischen Lunge und Niere. (König und Liebich 2001) Die Form der Hoden wird in der Literatur als bohnenförmig bis rund (Freund 1917), bohnenförmig (Hummel 2000) sowie oval-eiförmig bis rund (Waibl und Sinowatz 2004) beschrieben.

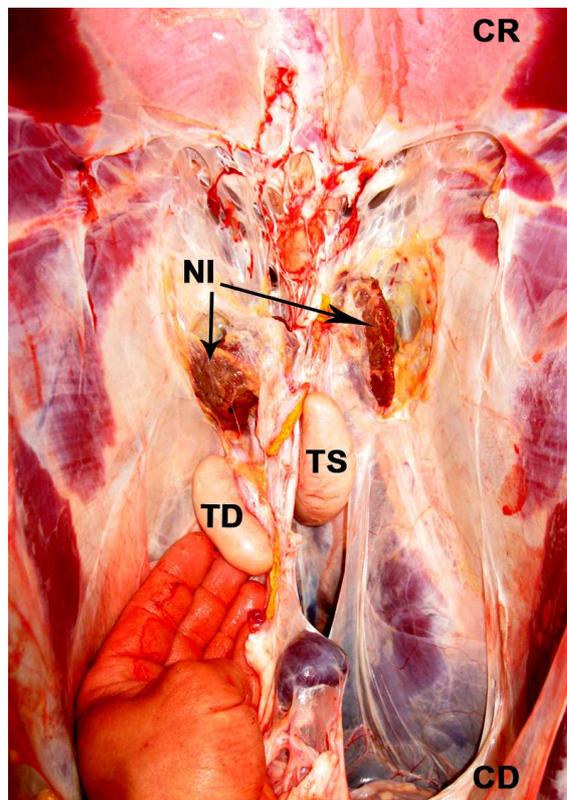


Abbildung 2: Hoden in der Leibeshöhle des Straußes

In der Leibeshöhle des Straußes sind der rechte (TD) und linke (TS) Hoden zu sehen. Ebenfalls zu sehen ist der craniale Anteil der Nieren (NI), die *divisio renalis cranialis*. Die restlichen Organe wurden vorher entfernt, um einen Zugang zu den Hoden zu ermöglichen.

TD = *testis dexter* (rechter Hoden), TS = *testis sinister* (linker Hoden), CR = cranial, CD = caudal

Jeder Hoden besitzt eine Extremitas cranialis und eine Extremitas caudalis. Seine Oberfläche lässt sich in eine Facies lateralis und Facies medialis sowie einen Margo liber und einen Margo epididymis, dem der Nebenhoden anliegt, einteilen. (Hummel 2000) Der der linke Hoden ist meist größer als der rechte. (Disselhorst 1908; Freund 1917; Lake 1957) Im Jahr 1885 beschrieb bereits Solger beim Broncemännchen einen Größenunterschied der beiden Hoden um mehr als das Doppelte. (Solger 1885) Die Größe der einzelnen Hoden variiert stark abhängig von der sexuellen Aktivität des Tieres. Waibl und Sinowatz erwähnen beim Sperling eine Größenzunahme um das 300fache in der Fortpflanzungsperiode. (Waihl und Sinowatz 2004) Diese Größenzunahme resultiert aus einer Zunahme der Länge, einem vergrößertem Durchmesser der Hodenkanälchen und einer Zunahme der Anzahl der Zwischenzellen. (Kamar 1960; Hummel 2000) Durch sexuelle Aktivität ändert sich nicht nur die Größe, sondern auch die Farbe der Hoden von gelblich zu weiß (Hummel 2000) bzw. zu grauweiß laut Salomon. (Salomon 1993) Freund ordnet den Hoden die Farbe gelblich bis weiß zu. (Freund 1917) Waibl und Sinowatz sowie König und Liebich beschreiben die Farbe der Vogelhoden ebenfalls als gelblich-weiß, wobei sie übereinstimmend mit Bittner eine mögliche Pigmentierung bei manchen Rassen bzw. Arten erwähnen. (Waihl und Sinowatz 2004; König und Liebich 2001; Bittner 1925) Salomon und Hummel beschreiben ein Verschwinden dieser Pigmentierung bei sexueller Aktivität. (Salomon 1993; Hummel 2000)

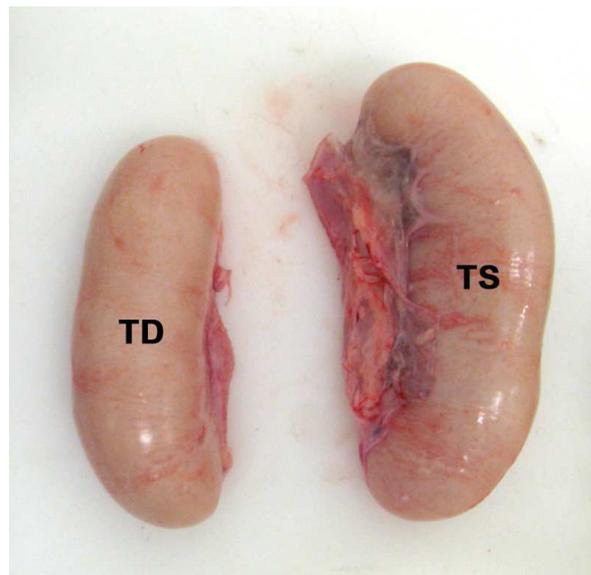


Abbildung 3: Hoden des Straußes

TD = rechter Hoden, TS = linker Hoden

2. Mikroskopische Anatomie des Vogelhodens

2.1. Histologischer Aufbau des Vogelhodens

Der Hoden des Vogels ist außen von einer dünnen Kapsel aus Bindegewebe, der Tunica albuginea, überzogen. (Lake 1957) Diese wird außen von der Serosa umschlossen, die in das Mesorchium übergeht. In der Tunica albuginea findet man Fibroblasten und kollagene Fasern, beim Hahn zusätzlich glatte Muskelzellen. (Waibl und Sinowatz 2004; König und Liebich 2001) Laut Waibl und Sinowatz sowie König und Liebich entsteht bei sexueller Aktivität eine weitere Bindegewebsschicht. (Waibl und Sinowatz 2004; König und Liebich 2001) Die Tunica albuginea entlässt beim Vogel nur feine Bindegewebsstränge in das Hodengewebe, so dass eine Einteilung in Septen – wie bei den meisten Säugern – nicht zu finden ist. (Huber 1916; Lake 1957) Beim Vogel ist auch kein Mediastinum testis ausgebildet. (Waibl und Sinowatz 2004; König und Liebich 2001) In dem Gewebe, welches sich zwischen den Tubuli seminiferi contorti befindet, sind die Leydig-Zellen einzeln oder in Gruppen lokalisiert. Zusätzlich findet man dort laut König und Liebich Melanozyten. (König und Liebich 2001). Die Leydig-Zellen sind für die Androgenproduktion im Hoden zuständig. Für eine zügige Abgabe der Hormone in die Blutbahn findet man in deren Nähe meist Blutgefäße. (Waibl und Sinowatz 2004; Salomon 1993) Laut Waibl und Sinowatz ist die Form der Leydig-Zellen abhängig von der sexuellen Aktivität. Bei erhöhter Sexualaktivität verändern sie sich von schmal zu polygonal. Der Kern ist in diesem Stadium groß, rund und euchromatinreich. (Waibl und Sinowatz 2004) Die Tubuli seminiferi contorti werden von der Membrana propria zum interstitiellen Bindegewebe hin begrenzt und stellen somit einen Teil der Blut-Hoden-Schranke dar. Die Membrana propria setzt sich zusammen aus der Basalmembran, peritubulären Zellen und retikulären, kollagenen und elastischen Fasern. Laut Waibl und Sinowatz besitzen die peritubulären Zellen eine kontraktile Funktion und ermöglichen so eine Weiterleitung der Spermien in das Rete testis. (Waibl und Sinowatz 2004) Direkt der Basalmembran aufsitzend findet man das Keimepithel. (Waibl und Sinowatz 2004) Es wird von Sertoli-Zellen und den Keimzellen in ihren verschiedenen Entwicklungsstadien gebildet. Die Sertoli-Zellen liegen der Basalmembran mit einer breiten Basis auf und besitzen einen großen, ovalen, manchmal birnenförmigen Kern mit zentralem Nukleolus. (Zlotnik 1947; Cooksey und Rothwell 1973) Sie sind für mehrere

Aufgaben zuständig: ein Stützen des Keimepithels, die Ernährung der Keimzellen, die Sekretion der intratubulären Flüssigkeit und die Phagozytose von degenerierten Keimzellen sowie von Restkörpern der Spermatozyten. Um diese Funktionen ausüben zu können, besitzen sie Fortsätze, die sich zwischen den Keimzellen befinden und somit einen Kontakt miteinander ermöglichen. Dieser Kontakt der Stützzellen untereinander wird durch „tight junctions“ sichergestellt, wodurch sie einen weiteren wichtigen Teil der Blut-Hoden-Schranke verkörpern. Durch die „tight junctions“ wird eine Einteilung des Keimepithels in ein basales und ein adluminales Kompartiment ermöglicht. (Osman et al. 1980; Bergmann und Schindelmeiser 1987)

2.2. Keimzellen in der Spermatogenese

Die Entwicklung der Stamm-Spermatogonien mit diploidem Chromosomensatz zu den haploiden Spermien wird Spermatogenese genannt. Diese beinhaltet die mitotische Teilung, die meiotische Reifung und letztendlich die Spermio-genese, während der sich die Spermatozyten zu Spermien differenzieren.

2.2.1.1. Spermatogonien

Am Anfang der Entwicklung stehen die Stamm-Spermatogonien, welche der Basalmembran anliegen. Nach ihrer mitotischen Vermehrung verbleiben diese entweder als A-Spermatogonien an der Basalmembran oder entwickeln sich zu B-Spermatogonien weiter, die etwas weiter Richtung Tubuluslumen wandern und somit nicht mehr der Basallamina aufliegen. (Waibl und Sinowatz 2004) Waibl und Sinowatz beschreiben die A-Spermatogonien als rundliche Zellen mit einem querovalen, viel Euchromatin besitzenden Kern. Dieser große, exzentrisch gelegene Kern besitzt zwei Nukleoli und häufig eine Kernvakuole. (Waibl und Sinowatz 2004; Zlotnik 1947) Im Gegensatz dazu findet man in den B-Spermatogonien einen runden Kern mit zentral gelegenen Nukleolus ohne Kernvakuole. (Waibl und Sinowatz 2004) Bei Zlotnik und bei Salomon werden die Spermatogonien als einheitlich elliptisch geformt charakterisiert. (Zlotnik 1947; Salomon 1993)

2.2.1.2. Spermatozyten

Durch weitere mitotische Teilung der B-Spermatogonien entstehen die primären Spermatozyten. Nachdem diese eine Wachstumsphase durchlaufen haben, sind sie die größten der Keimzellen. (Zlotnik 1947; Waibl und Sinowatz 2004) Laut

Salomon besitzen sie einen großen Zellkern mit einem zarten Chromatin-Netzwerk. (Salomon 1993) Nun vollzieht sich die 1. meiotische Reifeteilung, wobei sich die Chromosomen spiralisieren und die homologen Chromosomen paaren. (Waibl und Sinowatz 2004) Die 1. meiotische Reifeteilung wird untergeteilt in die folgenden Phasen: die Prophase, welche wiederum in die Abschnitte Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese unterteilt wird, die Metaphase und die Anaphase. (Waibl und Sinowatz 2004) Der Ablauf der 1. Reifeteilung ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst (vgl. Tabelle 1):

Tabelle 1: Phasen der 1. Reifeteilung (Meiose I)

Prophase	
Leptotän	Chromosomen spiralisieren zu fadenartigen Strukturen
Zygotän	Paarung der homologen Chromosomen
Pachytän	Austausch der Chromosomen
Diplotän	Trennung der Chromosomenpaare
Diakinese	Vollständige Trennung, Verschwinden der Kernhülle, Entstehen der Teilungsspindel
Metaphase	
Anordnung der bivalenten Chromosomen an der Äquatorialebene	
Anaphase	
Aufteilung der bivalenten Chromosomen auf jeweils einen gegenüberliegenden Zellpol	

Die Prophase vollzieht sich über mehrere Tage, wodurch in histologischen Hodenschnitten stets viele primäre Spermatozyten zu sehen sind. (Waibl und Sinowatz 2004) Am Ende der 1. Reifeteilung entstehen die sekundären Spermatozyten. Diese sind kleiner als die primären Spermatozyten, sie beinhalten einen haploiden Chromosomensatz und einen kleinen, runden Kern mit mehreren Chromatinansammlungen. (Waibl und Sinowatz 2004; Salomon 1993)

Im Anschluss an die 1. Reifeteilung vollzieht sich nach einer Zwischenphase eine 2. meiotische Reifeteilung, in der aus den sekundären Spermatozyten die Spermatisden hervorgehen. Da diese Zwischenphase sehr kurz ist, sind sekundäre Spermatozyten selten in histologischen Hodenschnitten anzutreffen. (Waibl und Sinowatz 2004)

2.2.1.3. Spermatisden

Die Spermatisden stellen das Anfangsstadium für die Spermiogenese dar. Sie sind kleiner als die Zellen früherer Stadien und besitzen einen runden Kern. (Nagano

1962; Waibl und Sinowatz 2004) Ihre Zellkerne beinhalten ein feines Chromatin-Geflecht. (Salomon 1993) Bei der Spermiogenese differenziert sich die Spermatide durch verschiedene Umbildungsmaßnahmen zum reifen Spermium. (Waihl und Sinowatz 2004) Das Chromatin im Kern kondensiert, so dass sich kleine, runde Aggregate bilden. (Zlotnik 1947) Im gleichen Schritt verändert der Kern seine Form von rund zu länglich. Bei dieser Formveränderung spielen Mikrotubuli eine Rolle, die sich manschettenartig um den Kern anordnen. (McIntosh und Porter 1967) In der Kernmembran findet man eine Eindellung, in welcher sich ein kleines dichtes Granulum findet. (Nagano 1962) Dieses wird zum Akrosom, indem der Golgi-Apparat kleine Vesikel entlässt, die sich am Vorderende des Kerns vereinigen. (Tingari 1973) Zur gleichen Zeit bewegen sich die Zentriolen zum gegenüberliegenden Pol und finden ihre Position im rechten Winkel zueinander. Der Achsenfaden hat seinen Ursprung im distalen Zentriol, um ihn ordnen sich die Mitochondrien spiralartig an. Er besitzt eine charakteristische 9x2+2-Struktur. (Nagano 1959; Tingari 1973) Am Ende der Spermiogenese ordnen sich die Spermatiden ährenförmig an und die Sertoli-Zellen übernehmen die Phagozytose des überschüssigen Zytoplasmas. (Waihl und Sinowatz 2004)

2.2.1.4. Spermien

Ein Spermium besteht aus Akrosom, Kopf und Schwanz. Das Akrosom sitzt dem haploiden Kern auf und beinhaltet hydrolytische Substanzen, um eine Verschmelzung des Spermiums mit der Eizelle zu gewährleisten. Der Kern macht den größten Teil des Spermienkopfes aus. Der Schwanz beginnt mit dem Hals aus dem Zentriolenpaar und setzt sich aus dem Hals, dem Mittel-, Haupt- und Endstück zusammen. (Tingari 1973; Waibl und Sinowatz 2004) Bei Hummel wird beschrieben, dass die reifen Spermien in den Tubuli seminiferi contorti mit ihren Schwänzen zum Lumen hin liegen. (Hummel 2000) Die fertigen Spermien werden durch die Kontraktionen der peritubulären Zellen weitertransportiert.

3. Immunhistochemie

3.1. α -SMA („smooth muscle actin“)

Aktine sind neben den Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten die wichtigsten Komponenten des Zytoskeletts. α -SMA wird in glatten Muskelzellen, Myoepithelzellen und Myofibroblasten exprimiert. Um α -SMA und somit glatte Muskelzellen, Myoepithelzellen und Myofibroblasten in einem Gewebe zu identifizieren, werden in der Immunhistochemie spezielle Antikörper gegen α -SMA eingesetzt. Dies erlaubt nicht nur eine Lokalisation solcher Zellen, sondern auch eine Unterscheidung der glatten von der quergestreiften Muskulatur. (Chu und Weiss 2009)

In der Literatur findet man Untersuchungen zu dem Vorkommen von α -SMA im Hodengewebe verschiedener Vogelarten. So wird eine Expression in allen peritubulären Myozyten des Huhnes (Maretta und Marettova 2004; Aire und Ozegbe 2007; Abd-Elmaksoud 2009), der Wachtel (Madekurozwa 2013; Aire und Ozegbe 2007), sowie der Ente und der Pute erwähnt. (Aire und Ozegbe 2007) Laut Reitemeier konnte SMA in der Basallamina von Papageienvögeln (Kakadu, Afrikanischer Graupapagei, Ara, Amazonenpapagei, Wellensittich) detektiert werden. (Reitemeier 2014) Aire und Ozegbe konnten eine Expression von Aktin in den inneren Zelllagen der Hodenkapsel und im peritubulären Gewebe bei Wachtel, Huhn und Ente nachweisen. (Aire und Ozegbe 2007) Untersuchungen von Abd-Elmaksoud bestätigen dies beim Huhn. (Abd-Elmaksoud 2009) Die Hodenkapsel von Pute, Ente und Taube zeigt eine Verteilung von α -SMA in allen Zelllagen. (Aire und Ozegbe 2007; Abd-Elmaksoud 2009) Das Vorkommen von Aktin in der Hodenkapsel konnte in einer Studie von Madekurozwa bei Wachteln und in einer Studie von Reitemeier bei Papageienvögeln bestätigt werden. (Madekurozwa 2013; Reitemeier 2014) In den Gefäßen des intertubulären Gewebes konnte α -SMA bei Huhn, Wachtel und den oben genannten Papageienvögeln detektiert werden, Maretta und Marettova erwähnen hierbei explizit ein Nachweis in der Tunica media. (Maretta und Marettova 2004; Abd-Elmaksoud 2009; Madekurozwa 2013; Reitemeier 2014) Reitemeier konnte SMA bei Papageienvögeln in den Keimzellen finden. Beim Wellensittich färbten sich zusätzlich die Leydig-Zellen positiv. (Reitemeier 2014)

3.2. Desmin

Desmin tritt als Teil des Intermediärfilaments in Zellen quergestreifter und glatter Muskulatur und in Herzmuskelzellen in Erscheinung. (Chu und Weiss 2009) Es verbindet die Aktinfilamente eines Sarkomers an der Z-Linie und trägt somit eine wichtige Rolle beim Kontraktionsvorgang der quergestreiften Muskulatur. (Zierz und Jerusalem 2003)

Bei den Untersuchungen verschiedener Vogelarten beschreiben Aire und Ozegbe ein Vorkommen von Desmin in den inneren Zelllagen der Hodenkapsel und im peritubulären Gewebe bei Wachtel, Hausgeflügel und Ente. (Aire und Ozegbe 2007) Bei der Pute zeigt sich eine einheitliche Verteilung von Desmin in der gesamten Kapsel. (Aire und Ozegbe 2007) Marretta und Marettova sowie Madekurozwa bestätigen diese Befunde und erwähnen zusätzlich ein Auftreten von Desmin in der Gefäßwand. (Maretta und Marettova 2004; Madekurozwa 2013)

3.3. Vimentin

Vimentin gehört zu den Intermediärfilamenten, die für die Stabilität, Form und Kompartimentbildung in Zellen sorgen. Vimentin ist u.a. in Bindegewebs-, Fett-, Knorpel-, Knochenzellen, Gefäßendothel, Mesothel und Meningealzellen enthalten. (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012)

Im Hodengewebe der Wachtel wird von Aire und Ozegbe ein Vorkommen von Vimentin in der Kapsel beschrieben, Madekurozwa bestätigt diese Erkenntnis und erwähnt zusätzlich in den Leydig-Zellen, den Fibroblasten, den peritubulären Zellen und in den Gefäßen die Expression von Vimentin. (Aire und Ozegbe 2007; Madekurozwa 2013) Bei der Pute haben Aire und Ozegbe eine schwache Ausprägung von Vimentin in den peritubulären Zellen detektiert. (Aire und Ozegbe 2007)

3.4. Panzytokeratine

Zytokeratine sind Intermediärfilamente und somit ein Bestandteil des Zytoskeletts. Sie sind in allen Epithelzellen und den intermediären Trophoblastzellen, die auch epithelialen Ursprungs sind, nachweisbar. Dieser Nachweis geschieht immunhistochemisch mit einem Panzytokeratin-Antikörper, der die meisten Intermediärfilamente, die zur Zytokeratin-Familie gehören, markiert. In der Tumordiagnostik dient er als wichtiger Marker für Tumore

epithelialen Ursprungs. (Büttner und Thomas 2003)

3.5. Myosin

Myosin ein Motorprotein und ein Teil des Zytoskeletts. Ihm fällt eine wichtige Rolle beim Kontraktionsvorgang der Muskulatur zu, indem es Komplexe mit Aktin bilden kann. (Schmidt und Lang 2007) Daher findet man Myosin vor allem in Zellen glatter und Skelettmuskulatur. (Silbernagl und Despopoulos 2003)

Holstein et al. beschreiben das Vorkommen von Myosin in den peritubulären Myofibroblasten des Hodengewebes. (Holstein et al. 1996)

3.6. Tubulin

Tubulin ist ein Bestandteil der Mikrotubuli des Zytoskeletts. Sie erfüllen in einer Zelle nicht nur eine form- und strukturgebende Funktion, sondern dienen zusätzlich als Bewegungshilfen für Zellorganellen, die innerhalb der Zelle ihre Position ändern. (Campbell 1997; Munk 2008)

Bei Maus und Rind wird ein Vorkommen von Tubulin in den Sertoli-Zellen des Hodengewebes beschrieben (O'Donnell und O'Bryan 2014; Wrobel et al. 1995), bei Schwein, Mensch und Maus gelang ein Nachweis von Tubulin im Schwanzstück der Spermien in einer charakteristischen Anordnung. (Little et al. 1983; Prigent et al. 1996; Fouquet et al. 1997)

3.7. Connexin

Connexine sind Transmembranproteine, die durch Zusammenlagerung sogenannte Connexone bilden, die einen Austausch von Signalstoffen, Nährstoffen und Ionen zwischen zwei benachbarten Zellen ermöglichen. (Karlson et al. 2005) Laut Nieschlag et al. ist Connexin-43 bedeutend für die Reifung und Steuerung der Sertoli-Zellen. (Nieschlag et al. 2009)

Risley et al. konnten Connexin-43 in Sertoli-Zellen, Leydig-Zellen, Spermatogonien, Spermatozyten und in peritubulären Zellen nachweisen. (Risley et al. 1992)

3.8. Cyclooxygenasen

Cyclooxygenasen sind Enzyme, die eine entscheidende Rolle bei der Biosynthese von Prostaglandinen im endoplasmatischen Retikulum tragen. (Pschyrembel 2002) Es werden zwei Isoformen der Cyclooxygenasen unterschieden: Cox-1 und

Cox-2. Cox-1 ist in den meisten Zellen vorhanden, wohingegen Cox-2 in den meisten Zellen erst durch Entzündungsmediatoren induziert wird. (Löscher et al. 2014)

DeWitt und Smith erwähnen eine konstitutive Expression von Cox-2 im Gehirn, den Hoden und den Macula densa-Zellen der Niere. (DeWitt und Smith 1995)

3.9. Östrogenrezeptor (ER)

Östrogene sind Sexualhormone. Zu den wichtigsten physiologischen Östrogenen zählen das Östradiol, das Östron und das Östriol. (Pschyrembel 2002) Östradiol kommt sowohl im Stoffwechsel des weiblichen als auch des männlichen Organismus vor. Bei letzterem finden sich deutlich geringere Plasmakonzentrationen. (Silbernagl und Despopoulos 2003) Man unterscheidet zwei Formen von Östrogenrezeptoren, ER α und ER β , die den Östrogenen ein Wirken ermöglichen. (Schmidt und Lang 2007)

Ein Vorkommen von ER α wurde von Reitemeier in den Keimzellen von Papageienvögeln (Kakadu, Afrikanischer Graupapagei, Ara, Amazonenpapagei, Wellensittich) gefunden. Die Leydig-Zellen reagierten nur bei Kakadu und Ara positiv. In den Gefäßen konnte ER α nur bei Kakadu, Afrikanischem Graupapagei und Amazonenpapagei nachgewiesen werden. (Reitemeier 2014)

3.10. Androgenrezeptor (AR)

Androgene sind männliche Sexualhormone, ihr wichtigster Vertreter ist das Testosteron. Dieses wird fast ausschließlich in den Leydig-Zellen der Hoden gebildet. Testosteron ist im männlichen Organismus hauptsächlich für die Entwicklung und Funktion der männlichen Geschlechtsorgane und –merkmale und die Bildung der Spermien zuständig (Silbernagl und Despopoulos 2003) Die Funktion der Androgene werden über Androgenrezeptoren vermittelt.

Laut Leska et al. zeigt sich eine Expression der AR bei der Gans in Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen und den Myoid-Zellen. (Leska et al. 2012) Diese Ergebnisse werden von Dornas et al. bei Hahn und Enterich bestätigt. (Dornas et al. 2008) Reitemeier stellte eine positive Reaktion in den Keimzellen bei Kakadu, Afrikanischem Graupapagei, Amazonenpapagei und Wellensittich fest. In den Leydig-Zellen ließen sich Androgenrezeptoren in dieser Studie ausschließlich beim Afrikanischen Graupapagei, Amazonenpapagei und beim Wellensittich

nachweisen. Die Gefäße zeigten eine positive Reaktion beim Afrikanischem Graupapagei und Amazonenpapagei. Die Kapsel wies nur beim Ara Androgenrezeptoren auf. (Reitemeier 2014)

4. Lektin histochemie

4.1. Historie und Definition

Lektine wurden erstmals im Jahr 1888 von Hermann Stillmark in der Ricinusbohne entdeckt. Er fand heraus, dass sie die Eigenschaft besitzen, Erythrozyten zu agglutinieren. Ein Zusammenhang dieser Fähigkeit zur Agglutination und den Kohlehydratgruppen auf der Oberfläche der Erythrozyten wurde zum ersten Mal von Sumner und Howell im Jahr 1936 protokolliert, als dieser Versuche mit Concanavalin A durchgeführte. (Sumner und Howell 1936) Die Bezeichnung „Lektine“ erhielten diese erstmals im Jahr 1954 von den Autoren Boyd und Shapleigh. Diese bezogen sich damit auf die Blutgruppenspezifität der Lektine, indem das lateinische Wort „legere“ im Deutschen „auswählen“ bedeutet. (Boyd und Shapleigh 1954)

Lektine sind nicht nur in Pflanzen, sondern auch in Mikroorganismen wie Bakterien und Viren, im tierischen und menschlichen Organismus und Pilzen zu finden. (Rüdiger und Gabius 1993; Gabius 2009)

Bei der Lektin histochemie werden Lektine verwendet, die Kohlehydrate und Glykoproteine in Gewebe lokalisieren und identifizieren. (Mulisch und Welsch 2010)

4.2. Funktion der Lektine

Gabius et al. beschreiben Lektine in aktuelleren Arbeiten als Proteine, die Kohlehydrate binden und keine eigene Enzymaktivität an ihren Bindungsstellen besitzen. Sie unterscheiden sich von Antikörpern und Sensor- bzw. Transportproteinen für freie Mono- und Oligosaccharide. (Gabius 2009; Gabius et al. 2011) Lektine besitzen Molmassen zwischen 8.500 und 300.000, diese sind auf zwei bis acht Untereinheiten aufgeteilt. (Pühler et al. 2000) Diese Unterschiede und die unterschiedliche Anzahl der Kohlehydratbindungsstellen erlauben eine Einteilung in verschiedene Lektin-Typen. (Goldstein und Hayes 1978) Lektine

binden sich reversibel an spezifische Kohlehydratstrukturen wie Polysaccharide, Glykoproteine und Glykolipide. Somit lagern sie sich an Zellmembranen und können ohne eigene enzymatische Aktivität biochemische Reaktionen auslösen. (Goldstein et al. 1980; Goldstein und Poretz 1986; Goldstein und Hayes 1978) So können bestimmte Lektine beispielsweise durch Anheften an Lymphozyten deren Mitoseaktivität anregen. (Steinegger und Hänsel 2013) Eine Agglutination von Erythrozyten gelingt Lektinen durch den Besitz von mindestens zwei Kohlehydratbindungsstellen. (Goldstein und Hayes 1978; Steinegger und Hänsel 2013) An der Bindung der Lektine an die Kohlehydratstrukturen sind Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte beteiligt. (Gabijs und Gabiys 1993)

4.3. Einteilung der Lektine

Pflanzenlektine lassen sich aufgrund ihrer Zuckerbindungsspezifität in verschiedene Gruppen einteilen. Bei der folgenden Einteilung nach Goldstein und Poretz (Goldstein und Poretz 1986) wird zwischen D-Mannose/D-Glukose-, D-Galaktose-, N-Acetyl-D-Galaktosamin-, N-Acetyl-D-Glukosamin-, L-Fukose-, Sialinsäure-bindenden Lektinen und Lektinen mit komplexen Kohlehydratbindungsstellen unterschieden (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2: Zuckerbindungsspezifität der Lektine
(nach Goldstein und Poretz 1986)**

Zuckerbindungsspezifität	Lektin	Herkunft
D-Mannose/D-Glukose	<i>Concanavalin A</i> (ConA)	<i>Canavalia ensiformis</i>
	<i>Lens culinaris</i> Agglutinin (LCA)	<i>Lens culinaris</i>
	<i>Pisum sativum</i> Agglutinin (PSA)	<i>Pisum sativum</i>
D-Galaktose	Peanut Agglutinin (PNA)	<i>Arachis hypogaea</i>
	<i>Griffonia simplicifolia</i> Agglutinin I (GSL-1)	<i>Griffonia simplicifolia I</i>
	<i>Ricinus communis</i> Agglutinin I/II (RCA 1/2)	<i>Ricinus communis I/II</i>
	<i>Erythrina cristagalli</i> Agglutinin (ECA)	<i>Erythrina cristagalli</i>
N-Acetyl-D-Galaktosamin (GalNAc)	Lima Bean Agglutinin (LBA)	<i>Phaseolus limensis</i>
	Soybean Agglutinin (SBA)	<i>Glycine max</i>
	<i>Helix pomatia</i> Agglutinin (HPA)	<i>Helix pomatia</i>
	<i>Bauhinia purpurea</i> Agglutinin (BPA)	<i>Bauhinia purpurea</i>
	<i>Maclura pomifera</i> Agglutinin (MPA)	<i>Maclura pomifera</i>
	<i>Visea villosa</i> Agglutinin (VVA)	<i>Visea villosa</i>
	<i>Dolichos biflorus</i> Agglutinin (DBA)	<i>Dolichos biflorus</i>
N-Acetyl-D-Glukosamin (GlcNAc)	Wheat Germ Agglutinin (WGA)	<i>Triticum vulgare</i>
	<i>Ulex europaeus</i> Agglutinin II (UEA-2)	<i>Ulex europaeus II</i>
	<i>Griffonia simplicifolia</i> Agglutinin II (GSL-2)	<i>Griffonia simplicifolia II</i>
	<i>Laburnum alpium</i> Agglutinin (LAA)	<i>Laburnum alpium</i>
	<i>Solanum tuberosum</i> Agglutinin (STA)	<i>Solanum tuberosum</i>
L-Fukose	<i>Ulex europaeus</i> Agglutinin I (UEA-1)	<i>Ulex europaeus I</i>
	<i>Lotus tetragonolobus</i> Agglutinin (LTA)	<i>Lotus tetragonolobus</i>
Sialinsäure	<i>Limulus polyphemus</i> Agglutinin (LPA)	<i>Limulus polyphemus</i>
	<i>Limax flavus</i> Agglutinin (LFA)	<i>Limax flavus</i>
	<i>Maacia amurensis</i> Agglutinin I (MAL-1)	<i>Maacia amurensis I</i>
	<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin (SNA)	<i>Sambucus nigra</i>
	<i>Viscum album</i> Agglutinin (VAA)	<i>Viscum album</i>
Lektine mit komplexen Kohlehydratbindungsstellen	<i>Phaseolus vulgaris</i> Agglutinine (PHA E/L)	<i>Phaseolus vulgaris</i>

Gabius ergänzt die oben aufgeführte Einteilung durch die Anmerkung, dass sich die Lektine teilweise nicht streng einteilen lassen und neben ihrer Monosaccharid-Spezifität auch eine Affinität für Oligosaccharide besitzen. (Gabius 2009)

Bei einer Einteilung von Gallagher aus dem Jahr 1984 wird die Position des spezifischen Zuckers innerhalb der Sequenz beachtet (Gallagher 1984): Hierbei werden die Lektine aufgrund ihres Bindungspartners in einem Glykoprotein in zwei Klassen eingeteilt. Die Klasse-I-Lektine binden an spezielle Monosaccharide am Ende einer Kohlehydrat-Kette. Daher werden sie auch als Exolektine bezeichnet. Diese Bindung kann mit einer geringen Konzentration des passenden Hemmzuckers unterdrückt werden. Die Lektine der Klasse II binden an bestimmte Kohlehydrat-Sequenzen innerhalb eines Glykoproteins. Daher erhalten sie den Beinamen „Endolektine“. Um eine Hemmung dieser Bindung zu erreichen, wird eine ähnliche oder identische Bindungsdomäne in den Hemmzuckern benötigt. (Gallagher 1984)

4.4. Bindungsstellen für Lektine im Hoden

In der Literatur finden sich nur vereinzelte Arbeiten zu glykohistochemischen Untersuchungen beim Hodengewebe verschiedener Vogelarten. Im Jahr 1991 veröffentlichten Ballesta et al. eine Studie, in der bei Tauben Bindungsstellen für ConA in den Sertoli-Zellen und den Spermatogonien nachgewiesen wurden. In den Spermatogonien wurde zusätzlich eine positive Reaktion mit WGA festgestellt. (Ballesta et al. 1991) Bakst et al. führten Untersuchungen am Hodengewebe der Pute durch und konnten Bindungsstellen für WGA in den Sertoli-Zellen detektieren. Bei der Untersuchung mit PNA reagierten die Spermatogonien und die primären Spermatozyten mit einer Anfärbung. SBA rief in einzelnen Zellen im intertubulären Gewebe und in der Basalmembran eine positive Reaktion hervor. (Bakst et al. 2007) In einer aktuelleren Studie von Keskin und Ili aus dem Jahr 2011 wurde das Hodengewebe des Denizli-Hahnes auf Bindungsstellen für PNA, MAL-1 und SNA untersucht. Das intertubuläre Gewebe, die Basalmembran, die Sertoli-Zellen und die Keimzellen färbten sich positiv. In den Keimzellen konnte hierbei durch PNA nur eine schwache Reaktion erkannt werden. (Keskin und Ili 2011)

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungsmaterial

Sämtliche Proben stammen von geschlechtsreifen, männlichen afrikanischen Straußen (*Struthio camelus*) der Straußenfarm Donaumoos (geführt von der Familie Engelhardt, Herdweg 2, 89340 Leipheim, Deutschland). Die Schlachtung der Vögel erfolgte im Alter von ca. 15 Monaten. Das Gewicht der Schlachtkörper betrug jeweils 90-100 kg. Die Hodenproben wurden für zwei unterschiedliche Schlachtungschargen entnommen, um eine Gesamtanzahl von zehn Tieren zu erzielen. Von jedem Tier wurden der rechte und linke Hoden für die Untersuchungen verwendet. Die Hähne waren zum Zeitpunkt der Schlachtung klinisch unauffällig, die Hoden aller Tiere waren makroskopisch unverändert.

2. Vorbereitung der Proben

2.1. Probenentnahme

Im Anschluss an die Schlachtung wurden die beiden Hoden aus dem Tierkörper entnommen und Breite und Länge der einzelnen Hoden ermittelt. Im nächsten Schritt wurde das Hodengewebe freigelegt, indem jeder Hoden der Länge nach vom Nebenhodenfernen Rand (Margo liber) bis zum Nebenhodenrand (Margo epididymis) mithilfe einer Skalpellklinge halbiert wurde. Die Proben wurden anschließend nach folgendem Schema (vgl. Abbildung 4) herausgeschnitten. Zu beachten ist, dass die Entnahmestellen so gewählt wurden, dass drei unterschiedliche Bereiche des Hoden auf eventuelle histologische Unterschiede untersucht werden konnten: der Bereich nahe des Margo epididymis (2), die Mitte (3) und der Parenchyembereich nahe dem Margo liber (1). Bei dieser Stelle wurde auch der Probenwürfel inklusive Kapsel herausgeschnitten. Die Proben für die Fixierung mittels Formalin und Bouin hatten eine Abmessung von ca. 1x1x1 cm. Die Proben für die elektronenmikroskopische Untersuchung waren in etwa 1x1x1 mm groß und wurden aus verschiedenen Bereichen des Hodenparenchyms entnommen (4).

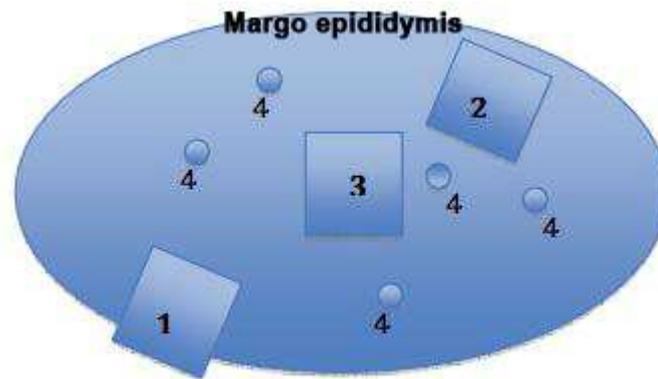


Abbildung 4: Schema der Probennahme am Hoden

Probenwürfel:

1 = inklusive Kapsel, 2 = ohne Kapsel am Nebenhodenrand, 3 = in der Mitte, 4 = für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen

2.2. Vorbereitung der Proben für lichtmikroskopische Untersuchungen

2.2.1. Fixierung der Proben

Die Gewebestücke wurden direkt nach Entnahme und anschließender Abmessung in Probengefäße mit Fixierlösung gegeben. Bei der Abmessung wurden Länge und Breite jedes Hodens erfasst. Für die Fixierung wurden zwei verschiedene Lösungen verwendet: ein Teil der Proben wurde in 4% gepuffertes Formol gegeben, der andere Teil wurde in Bouin-Lösung fixiert.

2.2.1.1. Formalin-Fixierung

Bei der ersten Probenentnahme (Tier 1 und 2) wurden für die Formalin-Fixierung je Hoden eine Probe ohne Kapsel, eine Probe inklusive Kapsel und ein Probenstück aus der Mitte des Organes entnommen. Im Verlauf der zweiten Probenentnahme (Tier 3-10) wurde pro Hoden eine Probe aus der Mitte des Hodengewebes herausgeschnitten.

Das untenstehende Protokoll (vgl. Tabelle 3) zeigt den Ablauf der Fixierung mit Formalin. Bei beiden Probenentnahmen wurde nach diesem Protokoll vorgegangen:

Tabelle 3: Protokoll Formalin-Fixierung

Tag	Vorgehen	Dauer
1	Proben direkt nach Entnahme in Formalin-Lösung gegeben	
2	Formalin-Lösung gegen frische gewechselt	
5	Probenblöcke geschnitten, eingekapselt, in Glaskolben mit frischer Formalin-Lösung gegeben	
6	Formalin gegen DEPC-Wasser ausgetauscht	40 min
	2 x DEPC-Wasser gegen frisches gewechselt	je 40 min
	DEPC-Wasser gegen 70%igen Alkohol ausgetauscht	40 min
	2 x 70%igen Alkohol gegen frischen gewechselt	je 40 min

Die Probengefäße standen während der gesamten Fixierzeit auf einem automatischen Rüttler, um ein gleichmäßiges Eindringen der Fixierlösung in das Gewebe zu gewährleisten.

2.2.1.2. Bouin-Fixierung

Für die Fixierung in Bouin-Lösung wurden im Laufe beider Probenentnahmen von jedem Hoden ein Gewebestück mit Kapsel und eine randständige Probe ohne Kapsel entnommen und direkt in die Fixierlösung gegeben, um einem Austrocknen vorzubeugen.

Für die erste Probencharge wurde für die Fixierung mit der Bouin-Lösung untenstehendes Schema angewendet. Dieses Protokoll wurde für die zweite Charge der Bouin-Proben leicht abgewandelt. (vgl. Tabelle 4 und Tabelle 5) Die Probengefäße standen während der gesamten Fixierzeit auf einem Rüttlerautomat, um ein gleichmäßiges Eindringen der Fixierlösung in das Gewebe zu gewährleisten.

Tabelle 4: Protokoll Bouin-Fixierung nach der ersten Probenentnahme

Tag	Vorgehen	Dauer
1	Proben direkt nach Entnahme in Bouin-Lösung gegeben	
2	Bouin-Lösung gegen 70%igen Alkohol ausgetauscht	
5	70%igen Alkohol gegen frischen gewechselt	
6	70%igen Alkohol gegen frischen gewechselt	
7	70%igen Alkohol gegen frischen gewechselt	2 h
	Probenblöcke geschnitten, eingekapselt, in Glaskolben mit frischer 70%iger Alkohol-Lösung gegeben	ca. 24 h

Tabelle 5: Protokoll Bouin-Fixierung nach der zweiten Probenentnahme

Tag	Vorgehen	Dauer
1	Proben direkt nach Entnahme in Bouin-Lösung gegeben	
2	Bouin-Lösung gegen frische ausgetauscht	
3	Bouin-Lösung gegen frische ausgetauscht	
4	Bouin-Lösung gegen 70%igen Alkohol gewechselt	
5	70%igen Alkohol gegen frischen gewechselt	2 h
	Probenblöcke geschnitten, eingekapselt, in Glaskolben mit frischer 70%iger Alkohol-Lösung gegeben	
6	70%igen Alkohol gegen frischen gewechselt	2 h

2.2.2. Einbettung der Proben in Paraffin

Im Anschluss an die Fixierung wurden die Proben zur Vorbereitung der Einbettung in Paraffin über Nacht in einen Einbettungsautomaten (für die Bouin-Proben: Shandon, Duplex Processor, Frankfurt am Main, Deutschland, und für die Formalin-Proben: Shandon, Citadel 2000, Frankfurt am Main, Deutschland) gegeben, in dem die Gewebeproben die folgenden Schritte durchliefen:

Tabelle 6: Programm der Einbettungsautomaten

Schritt	Reagenz	Dauer
1	80%iger Alkohol	1,5 h
2	80%iger Alkohol	1,5 h
3	96%iger Alkohol	1,5 h
4	96%iger Alkohol	1,5 h
5	Isopropanol	1,5 h
6	Isopropanol	2,0 h
7	Isopropanol	2,0 h
8	Xylol	1,0 h
9	Xylol	1,5 h
10	Xylol	1,5 h
11	Paraplast	2,0 h
12	Paraplast	3,0 h
Gesamtdauer		20,5 h

Nach Beendigung des Programmes wurden die Proben mithilfe eines Histostat-Tissue-Embedding Centers (Leica, EG 1140 H, Rockville, USA, mit Kühlaggregat Leica, EG 1140 C, Rockville, USA) in Paraffinblöcke gegossen und anschließend bei 4°C gekühlt, um ein Schneiden des Gewebes am Mikrotom zu ermöglichen.

2.2.3. Schneiden der Gewebeproben am Mikrotom

Die 5 µm dicken Schnitte der Gewebeproben wurden mithilfe eines Mikrotoms (Microm, HM 340 E, Walldorf, Deutschland) erstellt und auf Objektträger montiert. Hierbei wurden von jedem Probenblock zehn Schnitte auf unbeschichtete Objektträger (Fisher Scientific, Adhäsionsobjektträger Superfrost Ultra Plus, Schwerte, Deutschland) und 20 Schnitte auf beschichtete Objektträger (Fisher Scientific, Superfrost, Schwerte, Deutschland) aufgebracht. Um ein zuverlässiges Haften der Schnitte auf den Objektträgern zu gewährleisten, wurden

sie für mindestens 24 Stunden in einen Wärmeschrank (37°C) gestellt. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3. Konventionelle Färbungen für die Lichtmikroskopie

3.1. Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung

Für die Färbung mit Hämalaun und Eosin wurden von zehn Tieren jeweils ein Formalin-fixierter und zwei Bouin-fixierte Gewebeschnitte pro Hoden verwendet.

Die HE-Färbung dient dazu, sich eine Übersicht über die verschiedenen Bestandteile des zu untersuchenden Gewebes zu verschaffen und somit auch die anderen histochemischen, immunhistochemischen und glykohistochemischen Färbungen besser auswerten zu können. Nach einer erfolgreichen HE-Färbung sind Zellkerne blau-violett, das übrige Gewebe rot angefärbt. (Mulisch und Welsch 2010) Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 7: Protokoll HE-Färbung

Schritt	Reagenz / Vorgehen	Dauer
1	2 x Xylol	je 10 min
2	Absteigende Alkoholreihe* bis Aqua dest.	
3	Kernfärbung mit Hämalaun	20 min
4	Abspülen in Aqua dest.	
5	Bläuen in fließenden Leitungswasser	20 min
6	Eosin	10 min
7	Abspülen in Aqua dest.	
8	Aufsteigende Alkoholreihe**	
9	2 x Xylol	je 5 min
10	Eindeckeln mit Eukitt	

*Absteigende Alkoholreihe: 2 x Isopropanol, 96%iger Alkohol, 70%iger Alkohol, kurz durchschwenken

**Aufsteigende Alkoholreihe: 70%iger Alkohol, 96%iger Alkohol, 2 x Isopropanol, kurz durchschwenken

Nach dem Färbvorgang wurden die Proben mithilfe eines Deckgläschens und Eukitt (Sigma-Aldrich, Quick Hardening Mounting Medium, Steinheim, Deutschland) eingedeckelt.

3.2. Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach McManus (PAS-Färbung)

Bei der Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach McManus wurden von allen Bouin-fixierten Proben der Tiere 1 und 2 jeweils ein Schnitt gefärbt, und zusätzlich von Tier 3-10 jeweils ein Schnitte einer Auswahl von insgesamt elf Bouin- und Formalin-fixierten Proben.

Die PAS-Färbung dient der Identifizierung von Kohlehydraten und kohlehydrathaltigen Bestandteilen durch leuchtend rote Anfärbung (Mulisch und Welsch 2010), Zellkerne werden durch das verwendete saure Hämalaun blau gefärbt (Hennemann 1991; Mulisch und Welsch 2010). Zu den PAS-positiven Bestandteilen gehören beispielsweise Glykogen, Glykolipide, Basalmembranen, neutrale Muzine und Kollagen (vor allem Typ III, das Kollagen der retikulären Fasern). (Mulisch und Welsch 2010)

In der folgenden Tabelle wird die Vorgehensweise bei der PAS-Färbung nach McManus veranschaulicht:

Tabelle 8: Protokoll PAS-Färbung

Schritt	Reagenz	Dauer
1	2 x Xylol	je 10 min
2	Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest.	
3	0,5%ige wässrige Perjodsäure-Lösung	5 min
4	Abspülen in Aqua dest.	
5	Schiff'sches Reagenz (Fuchsin-schweflige Säure)	15 min
6	3 x SO ₂ -Wasser	je 2 min
7	Leitungswasser, fließend	5 min
8	Kernfärbung mit Hämalaun	4 min
9	Leitungswasser, fließend	15 min
10	Aufsteigende Alkoholreihe	
11	2 x Xylol	je 5 min
12	Eindeckeln mit Eukitt	

3.3. Alcianblau-Färbung

Die Färbung mit Alcianblau wurde sowohl mit pH 1,0 als auch mit pH 2,5 durchgeführt. Hierbei wurde für beide Durchgänge jeweils ein Schnitt jedes Probenblockes gefärbt.

Bei der Alcianblau-Färbung mit einem pH-Wert von 2,5 ist zu erwarten, dass sich die sauren Mukosubstanzen türkis-blau anfärben, wohingegen sich bei einem pH-Wert von 1,0 nur stark sulfatierte Mukosubstanzen leuchtend blau färben. Die Kerne erscheinen durch das Kernechtrot hellrot und der Hintergrund zartrosa. (Mulisch und Welsch 2010)

3.3.1. Durchführung mit pH 1,0

Im folgenden Protokoll ist die Vorgangsweise bei der Alcianblau-Färbung mit pH 1,0 festgehalten:

Tabelle 9: Protokoll Alcian-Färbung mit pH 1,0

Schritt	Reagenz	Dauer
1	2 x Xylol	je 10 min
2	Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest.	
3	0,1 N Salzsäure	3 min
4	1% Alcianblau 8GX (in 0,1 N Salzsäure), pH 1,0	30 min
5	0,1 N Salzsäure, kurz abspülen	
6	Aqua dest., kurz abspülen	
7	Kernechtrot	4 min
8	Aqua dest., kurz abspülen	
9	Aufsteigende Alkoholreihe	
10	2 x Xylol	je 5 min
11	Eindeckeln mit Eukitt	

3.3.2. Durchführung mit pH 2,5

Die folgende Tabelle zeigt den Verlauf der Alcianblau-Färbung mit pH 2,5:

Tabelle 10: Protokoll Alcian-Färbung mit pH 2,5

Schritt	Reagenz	Dauer
1	2 x Xylol	je 10 min
2	Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest.	
3	3% Essigsäure	3 min
4	1% Alcianblau 8GX (in 3% Essigsäure), pH 2,5	30 min
5	3% Essigsäure, kurz abspülen	
6	Aqua dest., kurz abspülen	
7	Kernechtrot	4 min
8	Aqua dest., kurz abspülen	
9	Aufsteigende Alkoholreihe	
10	2 x Xylol	je 5 min
11	Eindeckeln mit Eukitt	

3.4. Toluidinblau-Färbung

Zur Toluidinblau-Färbung wurde eine Auswahl von zwölf Probenblöcken getroffen, welche von jedem der zehn Tiere mindestens eine Probe enthielt.

Toluidinblau ist ein basischer Thiazinfarbstoff (Mulisch und Welsch 2010), der basophile Strukturen anfärbt. Meist geschieht dies in Blautönen, man findet aber auch violett, rot-violett oder rot gefärbte Strukturen, die ebenfalls basophilen Charakter besitzen. Den Effekt, bei dem sich Strukturen in einem anderen Farbton als die Färbelösung anfärbt, nennt man Metachromasie. Zu den basophilen Strukturen in einem Gewebe zählt man saure Polysaccharide (Glykosaminoglykane), Nukleinsäuren, Oxidationsprodukte von Lipiden und Harnsäurederivate. (Mulisch und Welsch 2010)

Anhand der folgenden Tabelle ist die Vorgehensweise bei der Färbung mit Toluidinblau abzulesen:

Tabelle 11: Vorgehensweise Toluidinblau-Färbung

Schritt	Reagenz	Dauer
1	2 x Xylol	je 10 min
2	Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest.	
3	1% Toluidinblau-Lösung, pH 4,5	1 min
4	Aqua dest., kurz abspülen	
5	Aufsteigende Alkoholreihe	
6	2 x Xylol	je 5 min
7	Eindeckeln mit Eukitt	

3.5. Trichromfärbung nach Masson und Goldner

Bei der Trichromfärbung nach Masson und Goldner wurde je ein Schnitt von zwölf Probenblöcken gefärbt. Dabei wurde von allen zehn Tieren jeweils mindestens ein Gewebestück berücksichtigt.

Die Zellkerne stellen sich nach dem Färbevorgang braun-schwarz dar, Zytoplasma und Muskulatur erscheint ziegelrot, Bindegewebe und saurer Schleim ist grün eingefärbt. Die Erythrozyten weisen eine orange-gelbe Farbgebung auf. (Mulisch und Welsch 2010)

Im Folgenden ist das Protokoll der Trichromfärbung nach Masson und Goldner dargestellt:

Tabelle 12: Protokoll Trichromfärbung nach Masson und Goldner

Schritt	Reagenz	Dauer
1	2 x Xylol	je 10 min
2	Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest.	
3	Eisenhämatoxylin nach Weigert	1 min
4	3 x Aqua dest., kurz spülen	
5	Leitungswasser, fließend	10 min
6	Azophloxin	5 min
7	1% Essigsäure, gut spülen	4 min
8	Phosphormolybdänsäure-Orange, unter mikroskopischer Kontrolle bis oranges Bindegewebe entfärbt	ca. 30-35 min
9	1% Essigsäure, gut spülen	
10	Lichtgrün	5-6 min
11	1% Essigsäure, gut spülen	
12	2 x 96% Alkohol, kurz spülen	
13	3 x Isopropanol, kurz spülen	
14	2 x Xylol	je 5 min
15	Eindeckeln mit Eukitt	

3.6. Resorcinfuchsin-Färbung nach van Gieson

Bei der Färbung mit Resorcinfuchsin nach van Gieson wurden von allen zehn Straußen jeweils mindestens ein Probenblock mit einem Schnitt, insgesamt jedoch zwölf Schnitte gefärbt.

Die Färbung mit Resorcinfuchsin nach van Gieson färben sich die Zellkerne schwarz-braun, kollagenes Bindegewebe rot, Zytoplasma, Muskelgewebe und Epithelzellen gelb. (Mulisch und Welsch 2010)

Anhand des folgenden Färbeprotokolls kann die Vorgehensweise bei der Färbung nach van Gieson nachvollzogen werden:

Tabelle 13: Protokoll Resorcinfuchsin-Färbung nach van Gieson

Schritt	Reagenz	Dauer
1	2 x Xylol	je 10 min
2	Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest.	
3	Resorcinfuchsin-Lösung	25 min
4	Leitungswasser, fließend	1 min
6	Eisenhämatoxylin nach Weigert	2:45 min
7	3 x Aqua dest., kurz spülen	
8	Leitungswasser, fließend	10 min
9	Pikrinsäure-Thiazinrot	5 min
10	Aqua dest., kurz spülen	
12	2 x 96% Alkohol, kurz spülen bis Resorcinfuchsin-gefärbte Fasern gut sichtbar sind, mikroskopische Kontrolle	
13	2 x Isopropanol, kurz spülen	
14	2 x Xylol	je 5 min
15	Eindeckeln mit Eukitt	

3.7. Auswertung der Schnitte für die konventionellen Färbungen

Um die Auswertung der konventionell angefärbten Schnitte vorzunehmen, wurde ein Lichtmikroskop der Firma Leitz GmbH (Wetzlar, Deutschland), Modell Aristoplan mit angeschlossener Kamera Lumenera USB Camera, Release 3,8 der Firma Lumenera Corporation (Ontario, Kanada) verwendet.

4. Immunhistochemische Untersuchungen

Zur immunhistochemischen Untersuchung des Hodengewebes wurde je ein Schnitt von zwölf Probenblöcken verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, sowohl die einzelnen Tiere als auch die verschiedenen Entnahmestellen mit jeweils mindestens einem Schnitt zur Untersuchung heranzuziehen.

Die immunhistochemischen Untersuchungen in dieser Arbeit wurden mithilfe der Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode durchgeführt. (Hsu et al. 1981) Diese zählt zu den indirekten immunhistochemischen Nachweisverfahren. Avidin ist ein Hühnereiweißprotein und besitzt eine hohe Bindungsfähigkeit mit Biotin. Die gleiche Eigenschaft beherbergt Streptavidin, welches in dieser Arbeit Verwendung fand. Das Protein Streptavidin stammt aus dem Bakterium

Streptomyces avidinii. Es hat insgesamt vier Bindungsstellen für Biotin, kann aber nur mit höchstens drei Biotinmolekülen eine Bindung eingehen. Der Streptavidin-Biotin-Komplex bindet mit seinem Biotin-Molekül über eine Peroxidase an das Biotin-Molekül eines vorher biotinylierten Sekundärantikörpers. Dieser Sekundärantikörper bindet sich wiederum an den Primärantikörper, so dass dieser nun indirekt markiert ist. Die Peroxidaseaktivität kann nun durch 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) sichtbar gemacht werden, das Ergebnis ist eine dunkelbraune Färbung. (Mulisch und Welsch 2010)

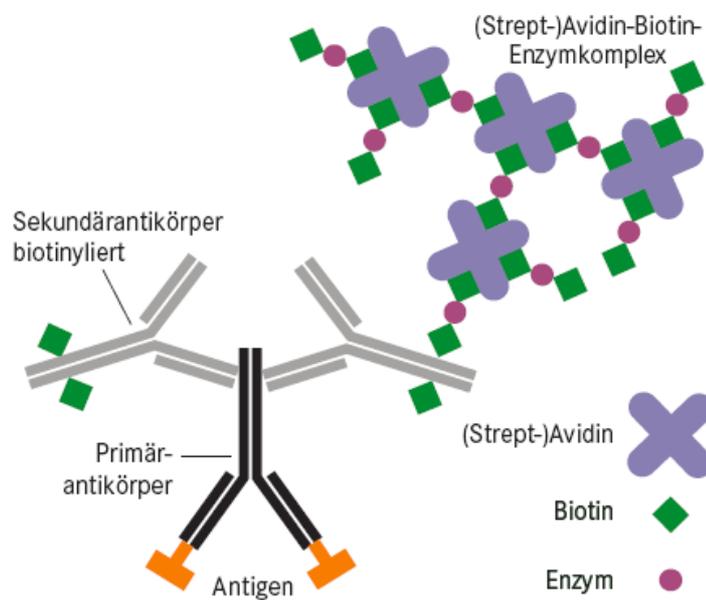


Abbildung 5: Schema der ABC-Methode (nach Mulisch und Welsch 2010)

In den folgenden Tabellen (vgl. Tabelle 14 und Tabelle 15) sind die für diese Arbeit verwendeten Primärantikörper und die dazugehörigen Sekundärantikörper aufgelistet:

Tabelle 14: Übersicht Primärantikörper

Primär-antikörper	Tierart	Hersteller	Verdünnung	Inkubationszeit	Inkubations-temperatur
α -SMA (monoklonal)	Maus	Dako, Hamburg, Deutschland	1:40	60 min	RT
Desmin (monoklonal)	Maus	Gene Tex, Taiwan	1:200	über Nacht	6°C
Vimentin (monoklonal)	Maus	Dako, Hamburg, Deutschland	1:500	über Nacht	6°C
Panzytokeratin (monoklonal)	Maus	Biocarta, Hamburg, Deutschland	1:100	über Nacht	6°C
Myosin (polyklonal)	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK	1:250	über Nacht	6°C
Tubulin (monoklonal)	Maus	Abcam, Cambridge, UK	1:400	über Nacht	6°C
Connexin (polyklonal)	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK	1:3000	über Nacht	6°C
COX-1 (polyklonal)	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK	1:250	über Nacht	6°C
COX-2 (polyklonal)	Ziege	Abcam, Cambridge, UK	1:400	über Nacht	6°C
ER α (polyklonal)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	1:400	über Nacht	6°C
AR (monoklonal)	Kaninchen	Dako, Hamburg, Deutschland	1:50	über Nacht	6°C

Die Verdünnung der Primärantikörper erfolgte mittels Dako Diluent, Fa. Dako, Hamburg, Deutschland.

Tabelle 15: Übersicht Sekundärantikörper

Primär-antikörper	Sekundär-antikörper / Tierart	Hersteller	Verdünnung	Inkubationszeit	Inkubations-temperatur
α -SMA	Anti-Maus IgG, biot. vom Kaninchen	Dako, Hamburg, Deutschland	1:300	30 min	RT
Desmin	Anti-Maus IgG, biot. vom Kaninchen	Dako, Hamburg, Deutschland	1:300	30 min	RT
Vimentin	Anti-Maus IgG, biot. vom Kaninchen	Dako, Hamburg, Deutschland	1:300	30 min	RT
Panzyto-keratin	Anti-Maus IgG, biot. vom Kaninchen	Dako, Hamburg, Deutschland	1:300	30 min	RT
Myosin	Anti-Kaninchen IgG, biot. vom Schwein	Dako, Hamburg, Deutschland	1:300	30 min	RT
Tubulin	Anti-Maus IgG, biot. vom Kaninchen	Dako, Hamburg, Deutschland	1:300	30 min	RT
Connexin	Anti-Kaninchen IgG, biot. vom Schwein	Dako, Hamburg, Deutschland	1:300	30 min	RT
COX-1	Anti-Kaninchen IgG, biot. vom Schwein	Dako, Hamburg, Deutschland	1:300	30 min	RT
COX-2	Anti-Goat IgG, biot. vom Kaninchen	Dako, Hamburg, Deutschland	1:400	30 min	RT
ER α	Anti-Kaninchen IgG, biot. vom Schwein	Dako, Hamburg, Deutschland	1:300	30 min	RT
AR	Anti-Kaninchen IgG, biot. vom Schwein	Dako, Hamburg, Deutschland	1:300	30 min	RT

Die Verdünnung der Sekundärantikörper erfolgte mittels Dako Diluent, Fa. Dako, Hamburg, Deutschland.

Die Vorgehensweise bei den immunhistochemischen Untersuchungen ist in folgendem Protokoll festgehalten:

Tabelle 16: Protokoll immunhistochemische Untersuchungen

Schritt	Vorgehen / Reagenz	Dauer	Antikörper
1	2 x Xylol	je 30 min	alle
2	Absteigende Alkoholreihe		alle
3	2 x Aqua dest.	je 5 min	alle
4	3 x PBS	je 5 min	alle
5a	3 x Citratpuffer in Mikrowelle	je 10 min	Tubulin, Connexin, COX-1, ER α
5b	Abkühlen lassen bei RT	20 min	Tubulin, Connexin, COX-1, ER α
5c	3 x PBS	je 5 min	Tubulin, Connexin, COX-1, ER α
6a	2 x Dakopuffer (pH 6,1) in Mikrowelle	je 10 min	nur AR
6b	Abkühlen lassen bei RT	20 min	nur AR
6c	3 x PBS	je 5 min	nur AR
7a	0,1 % Protease, Fa. Dako, Hamburg, Deutschland, bei RT	10 min	nur Vimentin
7b	3 x PBS	je 5 min	nur Vimentin
8a	Trypsin bei RT	20 min	nur Panzytokeratin
8b	3 x PBS	je 5 min	nur Panzytokeratin
9a	Hemmung endogener Peroxidase bei RT, in 50 ml Hydrogenperoxid verdünnt mit 150 ml Aqua dest.	10 min	alle
9b	Leitungswasser, fließend	10 min	alle
9c	3 x PBS	je 5 min	alle
10	Dako Protein Block Serum Free®, Fa. Dako, Hamburg, Deutschland, bei RT	10 min	alle
11	Primärantikörper	vgl. Tabelle 14	alle
12	3 x PBS	je 5 min	alle
13	Sekundärantikörper	vgl. Tabelle 15	alle
14	3 x PBS	je 5 min	alle
15	Streptavidin-HRP, Fa. Novocastra™, Newcastle, UK, bei RT	30 min	alle
16	3 x PBS	je 5 min	alle
17	DAB-Hydrogenperoxid-Lösung bei RT	8 min	alle
18	Leitungswasser, fließend	kurz	alle
19	Kernfärbung mit Hämalaun	30 s	alle
20	Leitungswasser, fließend	10 min	alle
21	Aufsteigende Alkoholreihe		alle
22	2 x Xylol	je 10 min	alle
23	Eindeckeln mit Eukitt		alle

4.1. Auswertung der Schnitte für die Immunhistochemie

Um die Auswertung der immunhistochemisch angefärbten Schnitte durchzuführen, wurde ein Lichtmikroskop der Firma Leitz GmbH (Wetzlar, Deutschland), Modell Aristoplan mit angeschlossener Kamera Lumenera USB Camera, Release 3,8 der Firma Lumenera Corporation (Ontario, Kanada) verwendet.

5. Glykohistochemische Untersuchungen

Um die glykohistochemischen Untersuchungen am Hodengewebe des Straußes durchzuführen, wurden für jedes Lektin je 12 Schnitte herangezogen. Bei deren Auswahl wurden alle Tiere und alle Abschnitte des Hodengewebes miteinbezogen. Bei jeder Untersuchung wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgefärbt (vgl. Tabelle 18).

Insgesamt wurden für die glykohistochemischen Untersuchungen 16 verschiedene Lektine in unterschiedlichen Konzentrationen (vgl. Tabelle 17) verwendet. Alle Lektine wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Bei dieser Untersuchungsreihe wurden 13 Lektine eingesetzt, die an Fluoreszeini- Isothiocyanat (FITC) gekoppelt waren. Hierbei bindet das bereits mit FITC-verbundene Lektin an die jeweilige Struktur im Gewebe. Desweiteren wurden drei Lektine der Firma Vector (Burlingame, USA) verwendet, die an ein Biotin gebunden sind. Hierbei wurden die Schnitte nach Inkubation mit dem biotinylierten Lektin einer Lösung mit Streptavidin-FITC-Komplexen ausgesetzt und somit indirekt markiert. Eine Bindung der Streptavidin-FITC-Komplexe an das Biotin an den Lektinen zeigt sich durch Fluoreszenz der markierten Strukturen im Gewebe. Die Protokolle der Färbungen sind in Tabelle 19 und Tabelle 20 veranschaulicht.

Um den Erfolg der Untersuchungen zu verifizieren, wurden für die Positivkontrollen Schnitte eines Gewebes herangezogen, bei dem eine positive Reaktion auf das jeweilige Lektin bekannt ist. Für die Positivkontrollen bei ConA, LCA, PSA, PNA, GSL-1, WGA, WGAs, UEA-1, PHA E und PHA L eignete sich Nebenhodengewebe des Hundes, bei RCA und SBA Hodengewebe des Rindes, bei MAL-1 und SNA Ovargewebe des Rindes, bei DBA Ovargewebe des

Schweines und bei SJA die Niere vom Rind (vgl. Tabelle 18).

Tabelle 17: Übersicht über die verwendeten Lektine

Lektin		Herkunft	Zuckerspezifität	Hemmung
ConA	Concanavalin Agglutinin	Schwertbohne	Man/Glc	Methyl- α -Mannopyranoside, E-Y-Labs, San Mateo, USA
LCA	Lens culinaris Agglutinin	Linse	Man/Glc	
PSA	Pisum sativum Agglutinin	Erbse	Man/Glc	
RCA	Ricinus communis Agglutinin	Rizinusstaude	Gal	Methyl- α -Galactopyranoside, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
PNA	Peanut Agglutinin	Erdnuss	Gal	
GSL-1	Griffonia simplicifolia Agglutinin I	Afrikanische Schwarzbohne	GalNAc	
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin	Pferdebohne	GalNAc	N-Acetyl-D-Galaktosamin, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
SBA	Soybean Agglutinin	Sojabohne	GalNAc	
WGA	Wheat germ Agglutinin	Weizenkeim	GlcNAc/NeuNAc	Chitin-Hydrolysat, Vektor, Burlingame, USA
WGAs	Wheat germ Agglutinin succinyliert	Weizenkeim	GlcNAc	
UEA-1	Ulex europaeus Agglutinin I	Stechginstersamen	Fuc	α -L-Fucose
MAL-1	Maackia amurensis Leukoagglutinin I	Asiatisches Gelbholz	*	
SJA	Sophora japonica Agglutinin	Chinesischer Schnurbaum	GalNAc	N-Acetyl-D-Glukosamin
SNA	Sambucus nigra	Schwarzer Holunder	Gal/GalNAc	
PHA E	Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin	Gartenbohne	*	Essigsäure, Roth, Karlsruhe, Deutschland
PHA L	Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin	Gartenbohne	*	Essigsäure, Roth, Karlsruhe, Deutschland

MAL-1, SJA, SNA: biotinylierte Lektine

Man = D-Mannose, Glc = D-Glukose, Gal = D-Galaktose, GalNAc = N-Acetyl-D-Galaktosamin, GlcNAc = N-Acetyl-D-Glukosamin, NeuNAc = N-Acetyl-D-Neuraminsäure, Fuc = L-Fucose

* keine Spezifität bekannt

Tabelle 18: Verwendete Lektine- und Hemmzuckerkonzentrationen, Positivkontrollen

Lektin	Lektin-Konzentration in µg/ml	Hemmzucker-Konzentration in µg/ml	Inkubationszeit	Positivkontrolle
ConA	2,5	84,8	60 min	Nebenhoden Hund
LCA	5	84,8	60 min	Nebenhoden Hund
PSA	5	84,8	60 min	Nebenhoden Hund
RCA	5			Hoden Rind
PNA	5			Nebenhoden Hund
GSL-1	5			Nebenhoden Hund
DBA	5			Ovar Schwein
SBA	5			Hoden Rind
WGA	2	1:4	30 min	Nebenhoden Hund
WGAs	5	1:4	30 min	Nebenhoden Hund
UEA-1	5			Nebenhoden Hund
MAL-1	10			Ovar Rind
SJA	10			Niere Rind
SNA	10			Ovar Rind
PHA E	5	24	60 min	Nebenhoden Hund
PHA L	5	24	60 min	Nebenhoden Hund

Tabelle 19: Protokoll für glykohistochemische Färbung mit FITC-markierten Lektinen

Schritt	Vorgehen / Reagenz	Dauer
1	2 x Xylol	je 30 min
2	Absteigende Alkoholreihe	
3	2 x wässern in Aqua dest.	je 5 min
4	3 x PBS	je 5 min
5	Schnitte in feuchter Kammer mit je 100 µl verdünnter Lektin-Lösung benetzen (Konzentration vgl. Tabelle 18) Negativ-Kontrolle: nur PBS ohne Lektin	
6	Abgedunkelt bei RT stehen lassen	60 min
7	3 x PBS, abgedunkelt	je 5 min
8	Kernfärbung mit DAPI (Vector, Burlingame, USA)	
9	Eindeckeln mit handelsüblichem, durchsichtigen Nagellack	

Tabelle 20: Protokoll für glykohistochemische Färbung mit biotinylierten Lektinen

Schritt	Vorgehen / Reagenz	Dauer
1	2 x Xylol	je 30 min
2	Absteigende Alkoholreihe	
3	2 x wässern in Aqua dest.	je 5 min
4	3 x PBS	je 5 min
5	Schnitte in feuchter Kammer mit Dako Protein Block Serum Free® (Fa. Dako, Hamburg, Deutschland) benetzen, nach Inkubation abkippen	10 min
6	Schnitte mit je 100 µl verdünnter Lektin-Lösung benetzen (Konzentration vgl. Tabelle 18) Negativ-Kontrolle: nur PBS ohne Lektin	
7	Abgedunkelt bei RT stehen lassen	60 min
9	3 x PBS, abgedunkelt	je 5 min
10	Schnitte mit Streptavidin/FITC-PBS-Lösung benetzen (Konzentration 1:500)	
11	Abgedunkelt bei RT stehen lassen	30 min
12	3 x PBS, abgedunkelt	je 5 min
13	Kernfärbung mit DAPI (Vector, Burlingame, USA)	
14	Eindeckeln mit handelsüblichem, durchsichtigen Nagellack	

Um die Spezifität der Lektine bei den glykohistochemischen Untersuchungen zu kontrollieren, wurden bei den FITC-konjugierten Lektinen mit einem stark positiven Ergebnis Tests mit den jeweilig korrespondierenden Hemmzuckern (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) durchgeführt. Bei diesem wurde der jeweilige Hemmzucker in der passenden Mischung mit PBS-Puffer verdünnt (vgl. Tabelle 18) und mit dem Lektin vor dessen Verwendung inkubiert (Inkubationszeiten vgl. Tabelle 18). Hierbei wurden stets ein Schnitt mit dem Hemmzucker-Lektin-Gemisch und ein Schnitt mit dem Lektin ohne Hemmzucker beträufelt, um ein spezifisches Ergebnis zu erhalten. Die übrigen Schritte der Untersuchung liefen wie in Tabelle 19 aufgelistet ab.

5.1. Auswertung der Schnitte für die Glykohistochemie

Für die Auswertung wurde ein Auflichtfluoreszenzmikroskop der Fa. Leitz GmbH (Wetzlar, Deutschland), Modell Dialux 20 mit ProgRes® Kamera der Fa. Jenaoptik (Jena, Deutschland) verwendet.

6. Transmissionselektronenmikroskopie

6.1. Fixierung der Proben

Für die Fixierung der Proben wurde eine gekühlte Lösung aus 2,5% Paraformaldehyd und 3,0 % Glutaraldehyd verwendet. Direkt nach der Entnahme der Proben aus dem Hoden wurde zu der gepufferten Paraformaldehydlösung 25%iges Glutaraldehyd zugemischt und die Präparate in diese Lösung gegeben. Glutaraldehyd dringt schnell und schonend in das Gewebe ein und hemmt dabei die enzymatischen Aktivitäten der Zelle in sehr geringem Ausmaß. Die Vorfixierung erfolgte innerhalb von 24 Stunden bei 4°C. In der darauffolgenden Woche wurden die Proben dreimal in 0,05 M Na-Cacodylatpuffer (4°C) gewaschen.

6.2. Vorkontrastierung der Proben

Um eine bessere Darstellung der Zellbestandteile zu erreichen, ist es notwendig, die Proben mit Schwermetallsalzen zu kontrastieren. (Linß 1999) Um die Probenblöcke auf die erste Kontrastierung, die Vorkontrastierung, vorzubereiten, werden die Blöcke dreimal in 0,1 M Natriumcacodylat-Lösung mit einem pH-Wert von 7,2 gewaschen. Anschließend werden die Proben für 2 Stunden mit einer Osmiumtetroxid-Kaliumferrocyanid-Lösung benetzt. Um die Osmierung

abzuschließen ist eine erneute dreimalige Waschung mit 0,1 M Natriumcacodylat-Lösung durchzuführen. Diese Vorgänge finden bei 4°C statt.

6.3. Einbettung der Proben

Um die Probenblöcke einzubetten, werden sie schonend entwässert und in reines Polyembed überführt (vgl. Tabelle 21)

Tabelle 21: Vorbereitung zur Einbettung der Proben

Schritt	Reagenz / Vorgehen	Dauer	Temperatur
1	Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, anschließend 2 x Propylenoxid		RT
2	Polyembed : Propylenoxid-Mischung (1:2)	1 h	
3	Polyembed : Propylenoxid-Mischung (1:1)	über Nacht	
4	Polyembed, rein	1 h	
5	Einbetten in Silikonformen, Einbettofen	24 h	60°C

6.4. Schneiden der Gewebeproben für die Elektronenmikroskopie

Für die Untersuchung unter dem Elektronenmikroskop müssen die Proben in 2 Schritten geschnitten werden. Im ersten Schritt werden Semidünnschnitte am Ultramikrotom (Reichert, Ultracut II, Wien, Österreich) mithilfe eines Glas- oder Diamantmessers angefertigt. Anschließend werden diese Schnitte nach Richardson (1983) gefärbt, so dass geeignete Stellen für die Ultradünnschnitte ausgewählt werden können. (Richardson et al. 1983) Die Ultradünnschnitte werden am Ultramikrotom (Reichert, Ultracut II, Wien, Österreich) mithilfe eines Diamantmessers in einer Schnittdicke von 40-60 nm angefertigt.

Die Ultradünnschnitte werden auf Kupfernetzchen (Grids, 150 square mesh, Copper 3,05 mm Durchmesser, Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland) aufgefangen.

6.5. Nachkontrastierung

Für die Darstellung der einzelnen Zellstrukturen werden die Grids einer Nachkontrastierung unterzogen. Hierbei wird Bleicitrat nach Reynolds verwendet, um Ribosomen und zytoplasmatische Grundsubstanzen zu kontrastieren, und Uranylacetat (Agar Scientific, Stansted, UK), um Membranen und Kernchromatin deutlich sichtbar zu machen. (Reynolds 1963) In der folgenden Tabelle (vgl. Tabelle 22) ist die Nachkontrastierung in den einzelnen Schritten aufgeführt:

Tabelle 22: Nachkontrastierung der Proben

Schritt	Reagenz / Vorgehen	Dauer
1	Uranylacetat auf jeden Grid pipettieren (je 80-100 μ l), inkubieren	mind. 20 min
2	3 x Aqua dest., anschließend kurz trocknen	
3	Bleicitrat auf jeden Grid pipettieren (je 80-100 μ l), inkubieren	max. 3-5 min
4	3 x Aqua dest., anschließend trocknen	

6.6. Auswertung der Schnitte am Transelektronenmikroskop

Die Betrachtung der Schnitte für die elektronenmikroskopische Auswertung wurde am Elektronenmikroskop EM 902 der Firma Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland) durchgeführt.

IV. ERGEBNISSE

1. Makroskopische Untersuchungen am Hoden des Straußes

Nach Eröffnen der Leibeshöhle der Strauße und Entfernung der meisten abdominalen Organe befinden sich die beiden Hoden rechts und links der Aorta descendens zwischen Lunge und Niere. Bei der Entnahme muss ein kurzes Gekröse, welches an der Dorsalwand der Leibeshöhle verankert ist, durchtrennt werden. Die Form zeigt sich bei den untersuchten Tieren bohnen- bzw. strangförmig (vgl. Tabelle 23)

Tabelle 23: Form der Hoden

Tier	rechter Hoden	linker Hoden
1	bohnenförmig	bohnenförmig
2	bohnenförmig	bohnenförmig
3	bohnenförmig	bohnenförmig
4	bohnenförmig	bohnenförmig
5	bohnenförmig	bohnenförmig
6	bohnenförmig	bohnenförmig
7	bohnenförmig	bohnenförmig
8	bohnenförmig	bohnenförmig
9	strangförmig	strangförmig
10	strangförmig	strangförmig

Bei den untersuchten Hoden war meist der linke breiter und länger als der rechte: Die Länge des rechten Hodens betrug im Mittel 7,6 cm ($\pm 2,2$), wohingegen die Länge des linken Hodens mit 8,8 cm ($\pm 2,0$) gemessen wurde. Die Breite maß bei den rechten Hoden durchschnittlich 2,6 cm ($\pm 1,0$), bei den linken Hoden 3,0 cm ($\pm 1,1$). Die detaillierten Messungen sind in Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 24: Länge und Breite der Hoden

Tier	rechter Hoden		linker Hoden	
	Länge in cm	Breite in cm	Länge in cm	Breite in cm
1	12,0	4,0	12,0	3,5
2	8,0	3,0	10,0	4,0
3	6,5	2,0	9,0	3,5
4	9,5	4,0	10,0	3,5
5	8,5	2,5	10,5	3,5
6	8,5	2,5	9,0	3,5
7	5,5	2,5	6,5	2,5
8	7,0	3,0	8,5	3,5
9	5,5	1,0	6,5	1,0
10	5,0	1,0	6,0	1,0
Mittelwert	7,6	2,6	8,8	3,0
Standardabweichung	2,2	1,0	2,0	1,1

Die Farbe der verwendeten Hoden zeigte sich einheitlich gelblich-weiß ohne Pigmentierung.

2. Lichtmikroskopische Untersuchungen am Hoden des Straußes

Das Hodengewebe des Straußes ist umgeben von einer Kapsel aus Bindegewebe, die feine bindegewebige Stränge ins Innere des Hodenparenchyms zwischen die Tubuli seminiferi contorti entlässt. (vgl. Abbildung 6)

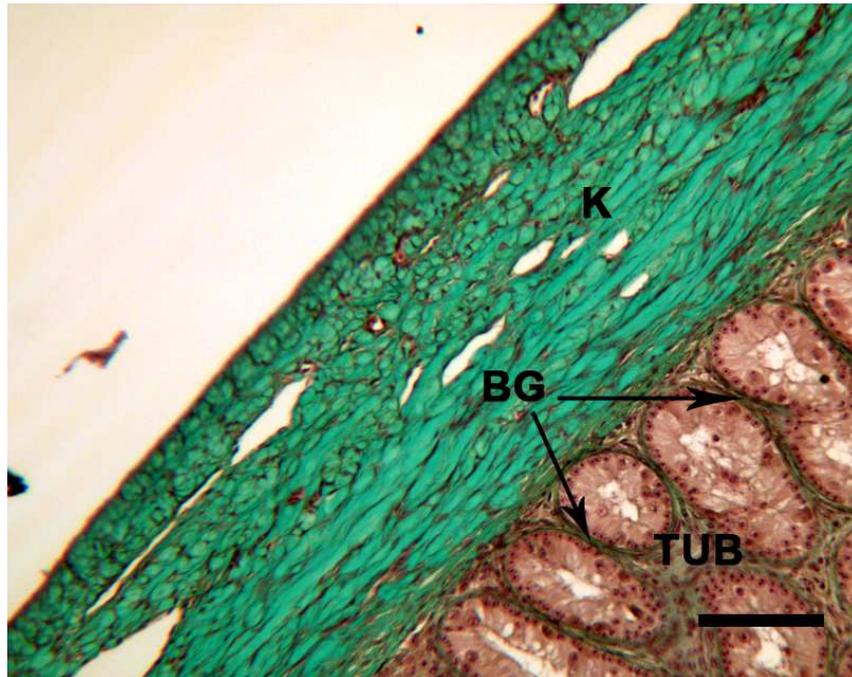


Abbildung 6: Hoden Strauß, Kapsel und angrenzendes Hodenparenchym.

Masson-Goldner-Färbung

SB = 200 μ m

Die bindegewebige Kapsel (K) entlässt feine Bindegewebsstränge (BG) zwischen die Tubuli seminiferi contorti (TUB) im Hodenparenchym.

Das Hodenstroma besteht zum größten Anteil aus den Tubuli seminiferi contorti, die dicht aneinander liegen, aber durch die feinen Bindegewebsstränge voneinander getrennt werden. (vgl. Abbildung 7)

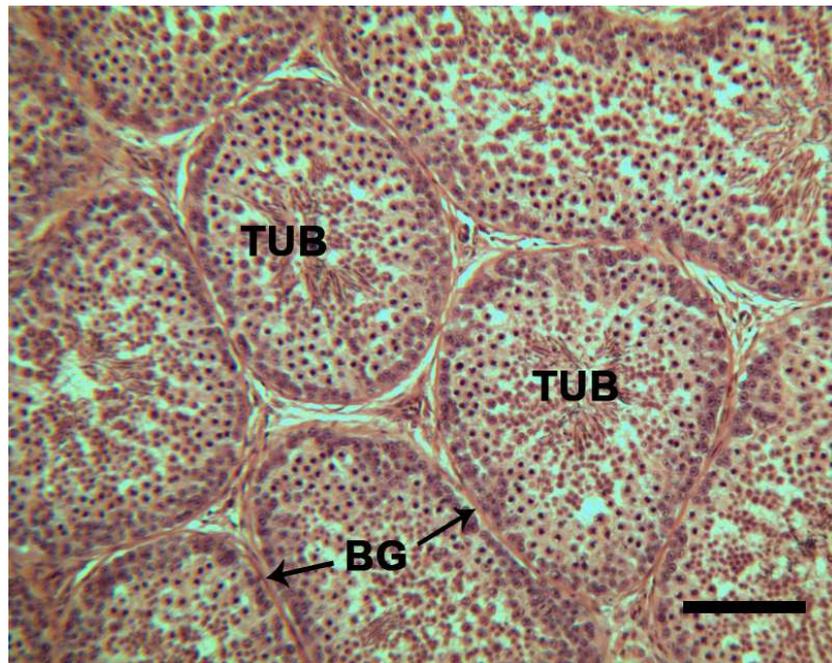


Abbildung 7: Hoden Strauß, Hodenparenchym.

HE-Färbung

SB = 100 μ m

Das Hodenparenchym besteht aus den dicht aneinander liegenden Tubuli seminiferi contorti (TUB) und den schmalen bindegewebigen Zwischenräumen (BG).

In diesen Bindegewebesträngen findet man die Leydig-Zellen, die einzeln oder in kleinen Gruppen angeordnet liegen. (vgl. Abbildung 8) Häufig findet man sie in der Nähe der Gefäße (vgl. Abbildung 9). Im untersuchten Gewebe zeigen sie sich als längliche bis polygonale Zellen mit eosinophilem Zytoplasma und einem mittig liegenden, runden bis ovalen Zellkern mit 1-4 Nukleoli.

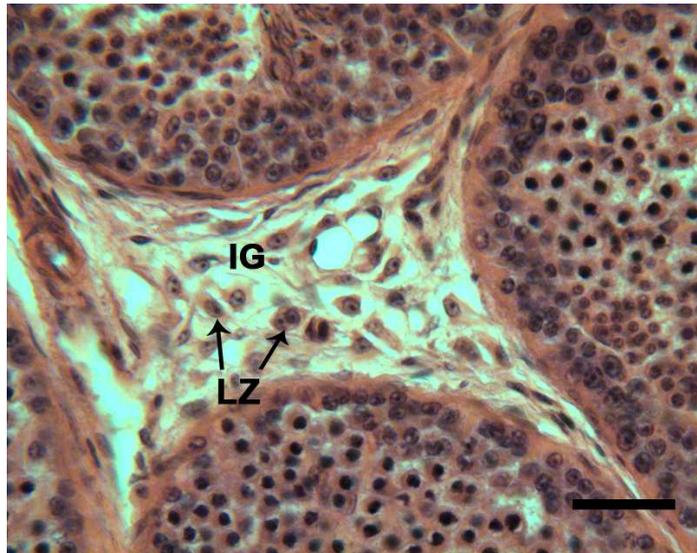


Abbildung 8: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

HE-Färbung

SB = 50 μ m

Im intertubulären Gewebe (IG) liegen die Leydig-Zellen (LZ) einzeln oder gruppiert. Durch ihr acidophiles Zytoplasma und 1-4 Nucleoli sind sie deutlich von den übrigen Strukturen abzugrenzen.

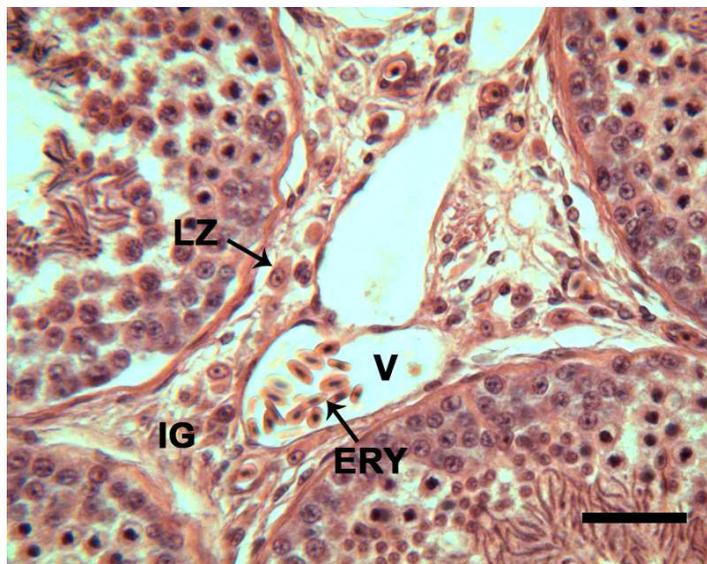


Abbildung 9: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

HE-Färbung

SB = 50 μ m

Leydig-Zellen (LZ) im intertubulären Gewebe (IG) in direkter Nähe zu einer Vene (V), in deren Inneren sich Erythrozyten (ERY) befinden. Charakteristisch ist das acidophile Zytoplasma und 1-4 Nucleoli in den Kernen der Leydig-Zellen (LZ).

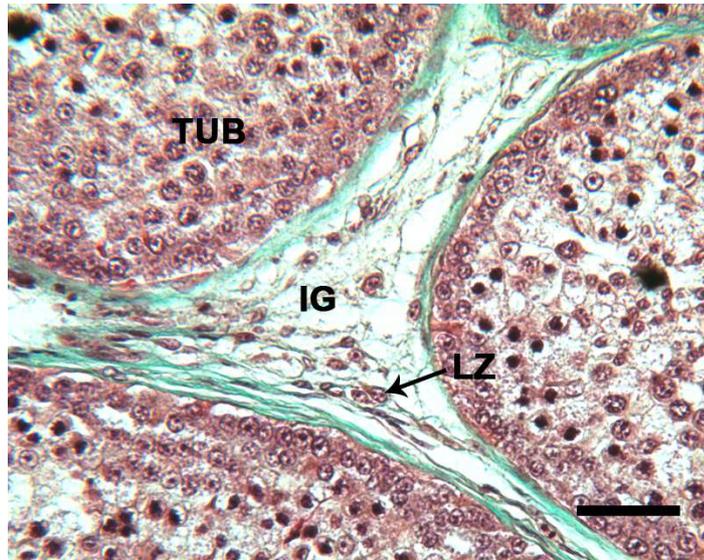


Abbildung 10: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Masson-Goldner-Färbung

SB = 50 μm

Im Gewebe (IG) zwischen den Tubuli seminiferi contorti (TUB) findet man die Leydig-Zellen (LZ). In ihren Zellkernen erkennt man deutlich ein oder mehrere Nukleoli.

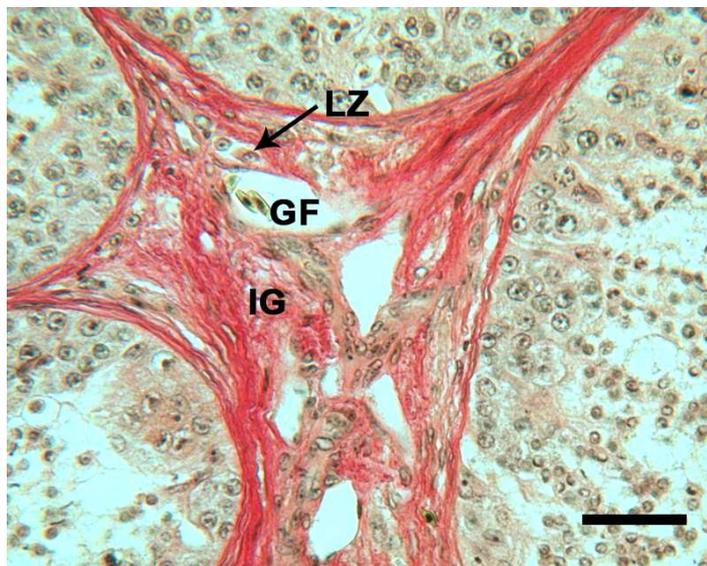


Abbildung 11: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Resorcinfuchsin-Färbung nach van Gieson

SB = 50 μm

Die im intertubulären Gewebe (IG) eingebetteten Leydig-Zellen (LZ) liegen häufig in der Nähe größerer Gefäße (GF).

Die Tubuli seminiferi contorti werden zum Bindegewebe hin begrenzt durch eine Basalmembran. Auf eine zarte basophile Basallamina (vgl. Abbildung 12 und Abbildung 13) folgen die kontraktile peritubulären Zellen (vgl. Abbildung 14) und Fasern.

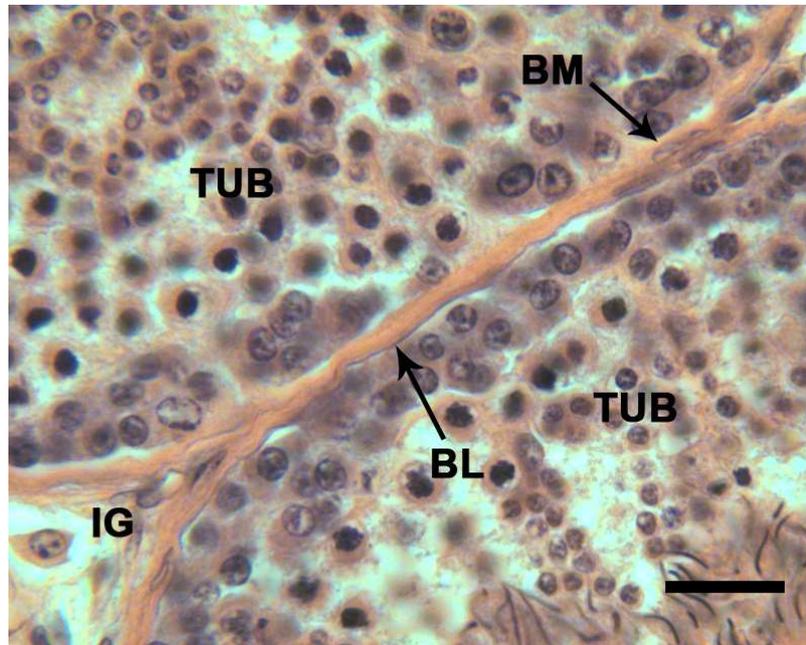


Abbildung 12: Hoden Strauß, peritubuläres Gewebe mit Basalmembran.

HE-Färbung

SB = 25 μm

Die Abgrenzung der Tubuli seminiferi contorti (TUB) vom intertubulären Gewebe (IG) wird durch die Basalmembran (BM) hergestellt. Einen Teil der Basalmembran stellt die Basallamina (BL) in Form einer dünnen basophilen Schicht dar.

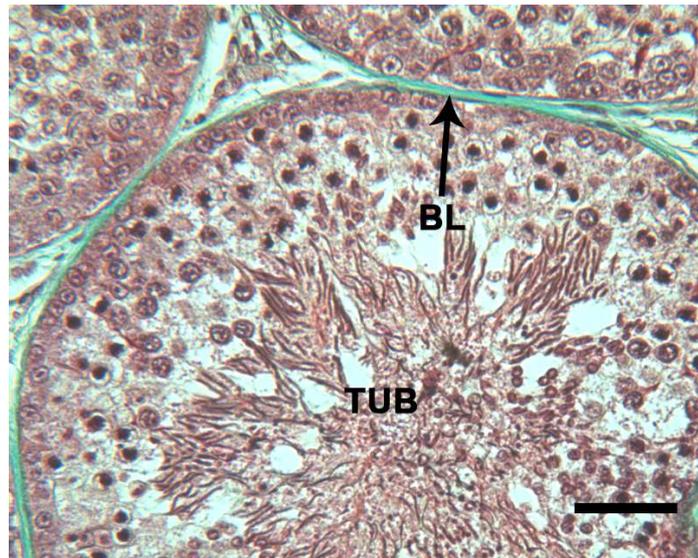


Abbildung 13: Hoden Strauß, Tubulus seminiferus contortus und peritubuläres Gewebe.

Masson-Goldner-Färbung

SB = 50 μm

Die Begrenzung des Tubulus seminiferus contortus (TUB) ist anhand der basophilen Basallamina (BL) deutlich zu lokalisieren.

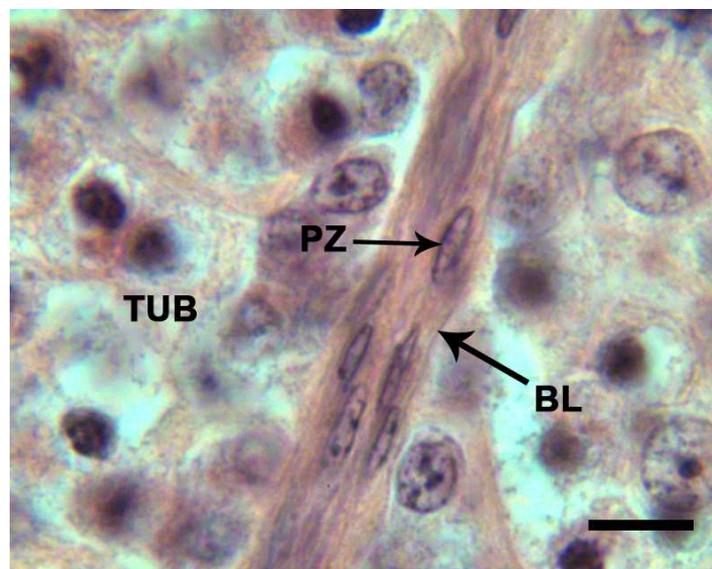


Abbildung 14: Hoden Strauß, peritubuläres Gewebe.

HE-Färbung

SB = 20 μm

Der Basallamina (BL) liegen peritubuläre Zellen (PZ) an, die eine Kontraktion der Tubuli seminiferi contorti (TUB) bewirken können und somit bei der Spermatation eine Rolle spielen.

Lumenwärts schließt sich an die Basalmembran das Keimepithel an. In diesem findet man die Sertoli-Zellen. Diese sitzen der Basalmembran breitflächig auf und verdünnen sich lumenwärts. Sie besitzen ein acidophiles Zytoplasma in dessen basalen bis mittleren Drittel der ovale bis polygonale Zellkern liegt. In diesem zeigt sich ein deutlicher Nukleolus.



Abbildung 15: Hoden Strauß, Keimepithel.

HE-Färbung

SB = 50 μm

Das acidophile Zytoplasma der Sertoli-Zellen (SZ) erstreckt sich über alle Schichten des Keimepithels. Sie beherbergen in ihrem basalen bis mittleren Drittel einen ovalen bis polygonalen Zellkern mit einem deutlichen Nukleolus.

TUB = Tubulus seminiferus contortus

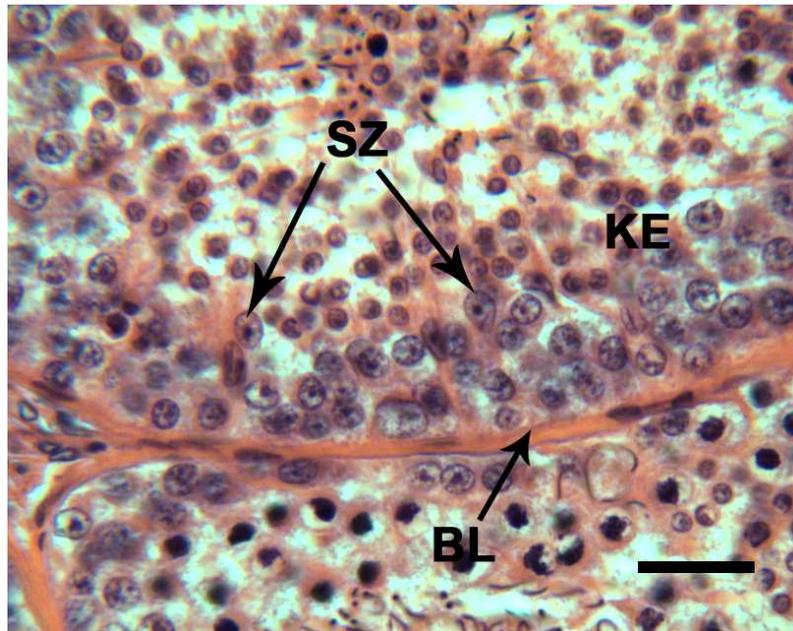


Abbildung 16: Hoden Strauß, Keimepithel.

HE-Färbung

SB = 25 µm

Die Sertoli-Zellen (SZ) liegen mit einer breiten Basis der Basallamina (BL) auf und erstrecken sich über die gesamte Höhe des Keimepithels (KE). Mit ihrem acidophilen Zytoplasma liegen sie deutlich sichtbar zwischen den Keimzellen.

Ebenfalls der Basalmembran anliegend findet man die Spermatogonien. Diese sind runde bis querovale Zellen mit einem großen, exzentrisch liegenden runden Zellkern. In diesem befindet sich viel Euchromatin und es sind 1-2 Nukleoli sichtbar. Während die A-Spermatogonien nach ihrer Entstehung an der Basalmembran zurückbleiben, wandern die B-Spermatogonien etwas weiter Richtung Tubuluslumen. Diese sind etwas kleiner als die A-Spermatogonien. Ihr Zellkern ist ebenfalls rund, er liegt aber im Gegensatz zum Zellkern der A-Spermatogonien mittig. (vgl. Abbildung 17, Abbildung 18 und Abbildung 19)

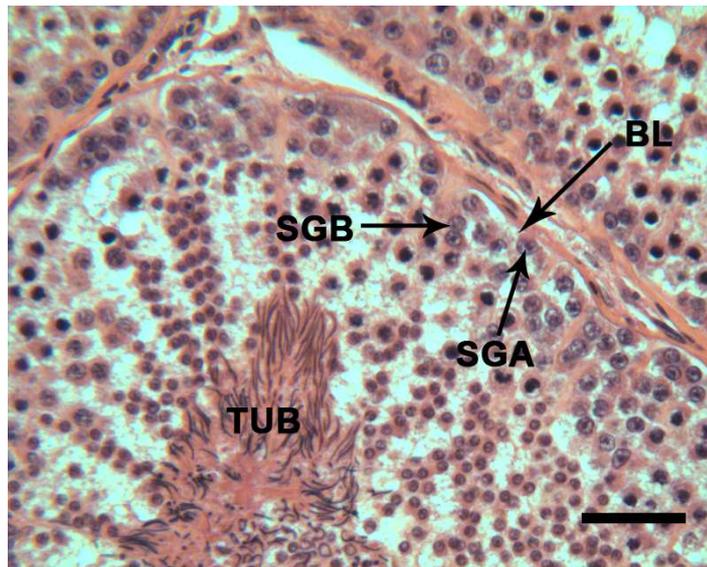


Abbildung 17: Hoden Strauß, Keimepithel.

HE-Färbung

SB = 50 μ m

An der Basallamina (BL) anliegend findet man die A-Spermatogonien (SGA) mit ihrem runden, exzentrisch liegenden Zellkern. Im Gegensatz dazu liegen die B-Spermatogonien (SGB) etwas weiter lumenwärts. Diese beherbergen einen ebenfalls runden Zellkern, der sich im Zentrum der Zelle befindet.

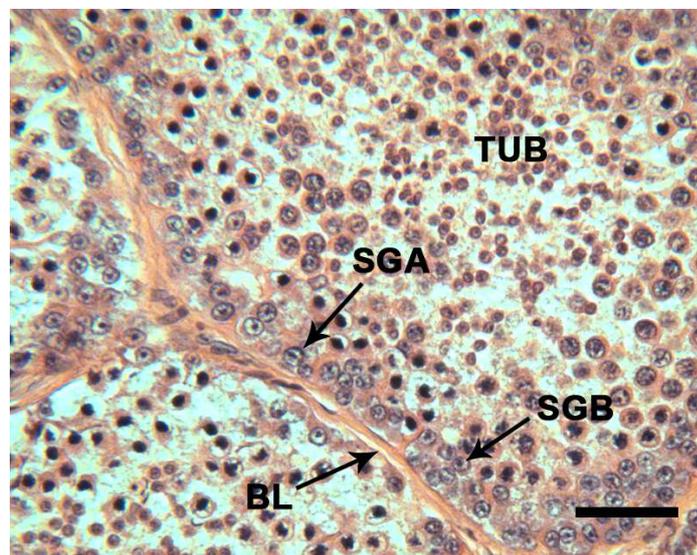


Abbildung 18: Hoden Strauß, Keimepithel.

HE-Färbung

SB = 50 μ m

Die A-Spermatogonien (SGA) liegen mit ihrem runden Zellkern direkt an der Basallamina (BL). Die B-Spermatogonien (SGB) mit einem ebenfalls runden Zellkern sieht man etwas weiter lumenwärts.

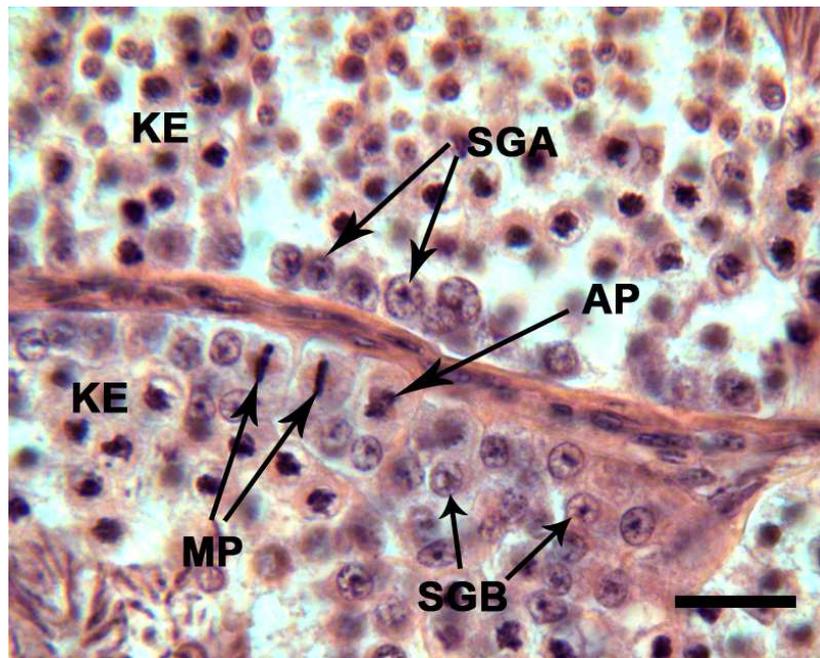


Abbildung 19: Hoden Strauß, Keimepithel.

HE-Färbung

SB = 25 μm

Die A-Spermatogonien (SGA) liegen der Basallamina an und haben einen größeren Zellkern als die B-Spermatogonien (SGB), die etwas weiter im Keimepithel (KE) zu sehen sind. In zwei Zellkernen ist die Metaphase (MP) und in einem Zellkern die Anaphase (AP) der Mitose zu beobachten.

Weiter lumenwärts trifft man auf die primären Spermatozyten, die durch mitotische Teilung aus den Spermatogonien hervorgegangen sind. Diese wachsen rasch und werden zu den größten aller Keimzellstadien. Sie tragen in ihrem eosinophilen Zytoplasma eingebettet einen Zellkern mit lockerem Chromatin. In einigen Schnitten sind die Stadien der 1. meiotischen Reifeteilung sichtbar (vgl. Abbildung 22). Aus ihr hervor gehen die deutlich kleineren sekundären Spermatozyten mit ihren kleinen runden Kernen, in dem man häufig mehrere Chromatin-Bündelungen sieht.

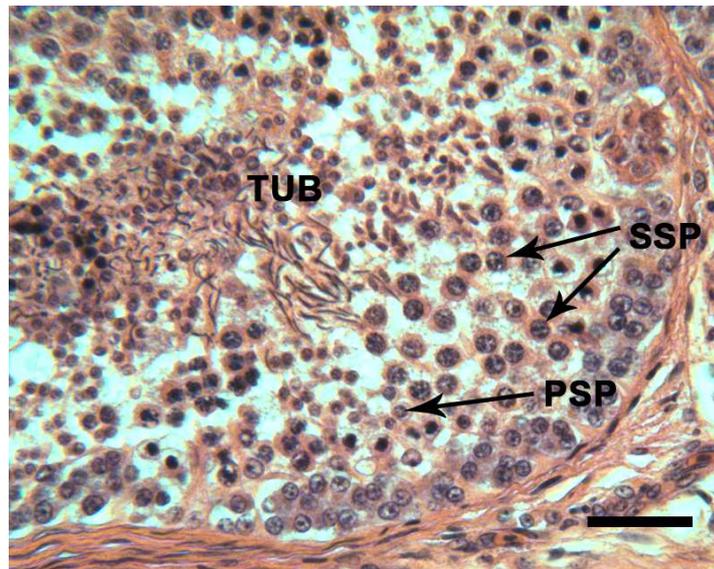


Abbildung 20: Hoden Strauß, Keimepithel.

HE-Färbung

SB = 50 μ m

Die primären Spermatozyten (PSP) sind die größten Keimzellen. Ihr eosinophiles Zytoplasma beherbergt einen großen Zellkern, der sich in verschiedenen Stadien der Meiose I befindet. Im Gegensatz dazu sind die sekundären Spermatozyten (SSP) viel kleiner, ihr Zellkern ist ebenfalls kleiner.

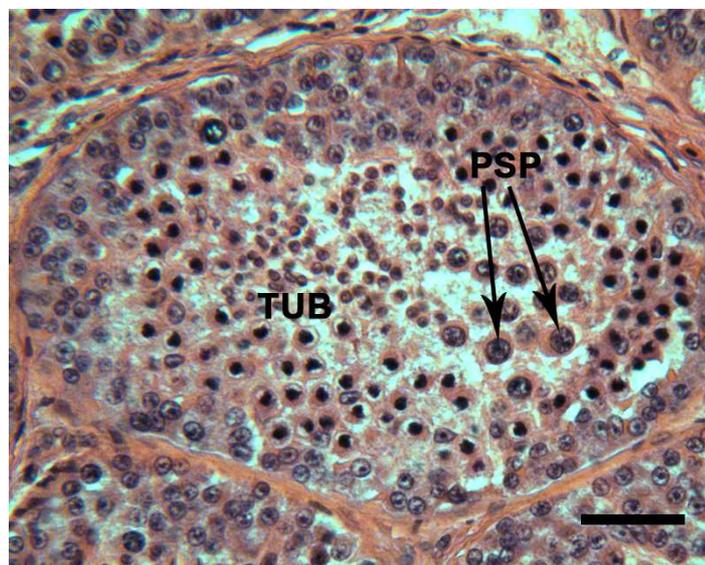


Abbildung 21: Hoden Strauß, Tubulus seminiferus contortus.

HE-Färbung

SB = 50 μ m

Die primären Spermatozyten (PSP) sind deutlich größer als alle anderen Keimzellpopulationen im Tubulus seminiferus contortus (TUB).

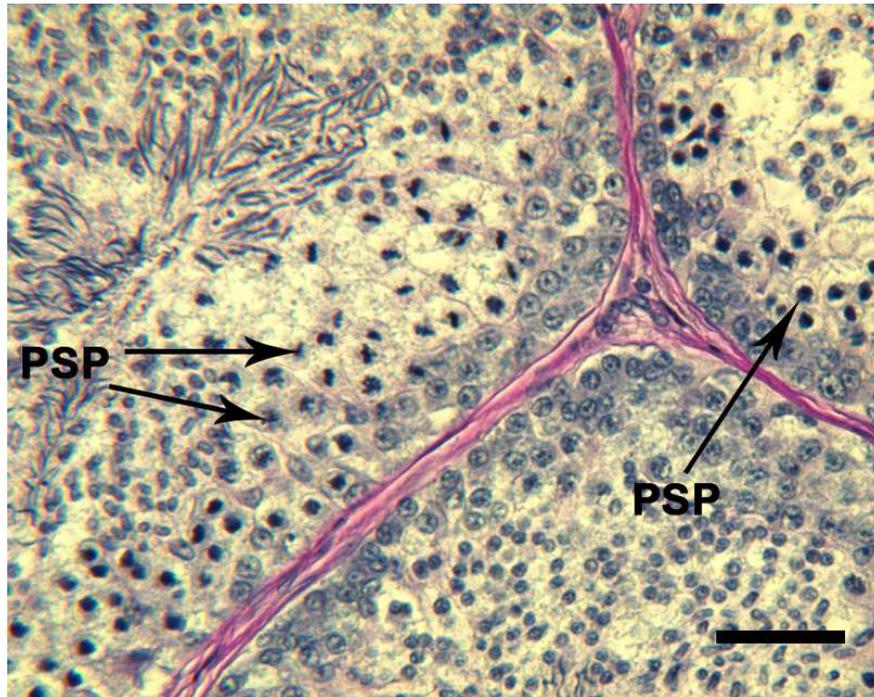


Abbildung 22: Hoden Strauß, Keimepithel.

PAS-Färbung nach McManus

SB = 50 μm

Die primären Spermatozyten (PSP) weisen verschiedene Stadien der 1. meiotischen Reifeteilung (Prophase, Metaphase) auf.

Die nächste Differenzierungsstufe der Keimzellen sind die rundkernigen Spermatischen. Sie befinden sich im luminalen Drittel der Tubuli seminiferi contorti. Sie sind kleine Zellen mit eosinophilem Zytoplasma und einem mittig gelegenen Zellkern, der ein zartes Chromatingerüst beherbergt. (vgl. Abbildung 23, Abbildung 24 und Abbildung 25) In einigen Tubuluslumina erkennt man die Entwicklung der Spermatischen zu den fertigen Spermien, die mit ihrem basophilen Kopf und Schwanz in das Tubuluslumen entlassen werden, wobei der Schwanz lumenwärts zeigt. (vgl. Abbildung 26)

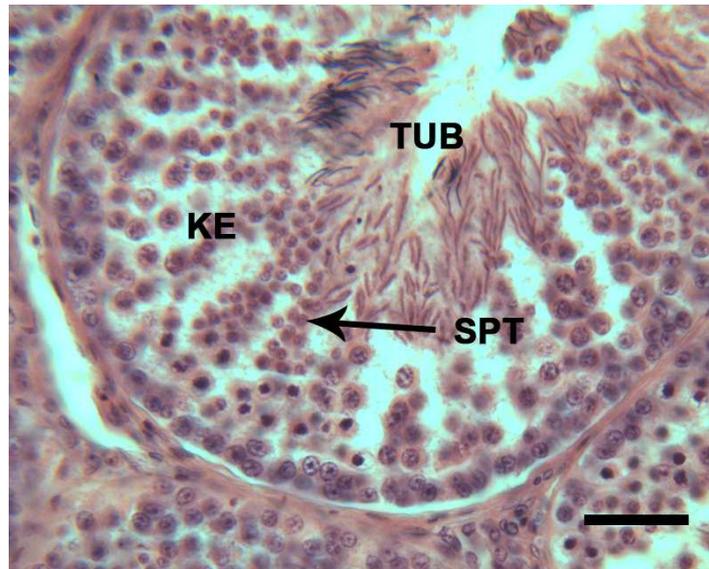


Abbildung 23: Hoden Strauß, Keimepithel.

HE-Färbung

SB = 50 μm

Die Spermatiden (SPT) sind im luminalen Drittel des Keimepithels (KE) anzutreffen.

TUB = Tubulus seminiferus contortus

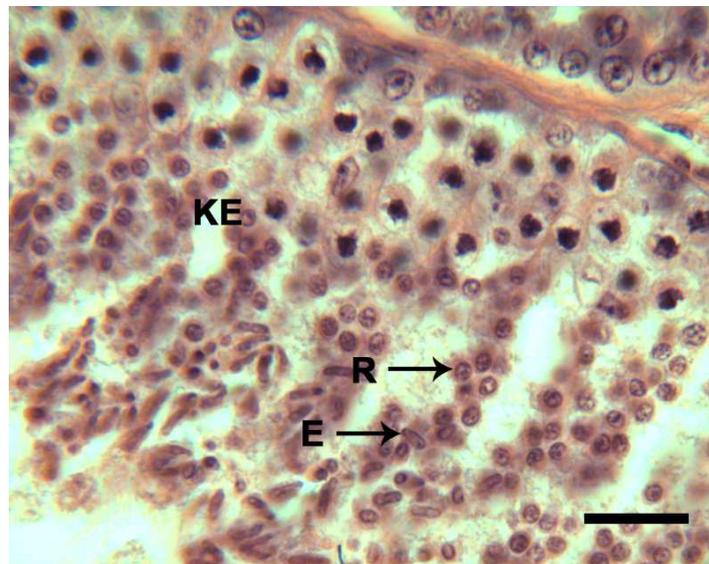


Abbildung 24: Hoden Strauß, Keimepithel.

HE-Färbung

SB = 25 μm

Die kleinen Zellkerne der Spermatiden sind in eosinophiles Zytoplasma eingebettet. Diese Zellkerne sind anfangs rund (R), elongieren (E) sich aber im Laufe der weiteren Entwicklung.

KE = Keimepithel

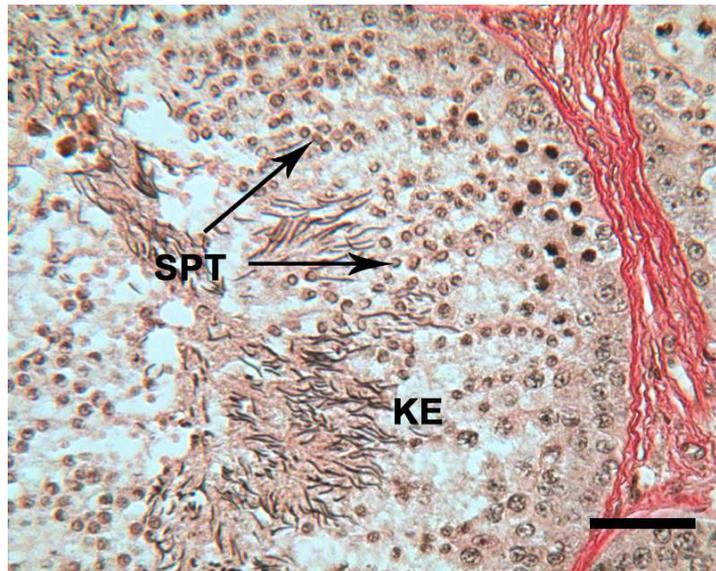


Abbildung 25: Hoden Strauß, Keimepithel.

Resorcinfuchsin-Färbung nach van Gieson

SB = 50 μm

Im luminalen Drittel des Keimepithels (KE) sind zahlreiche rundkernige Spermatiden (SPT) anzutreffen.



Abbildung 26: Hoden Strauß, Keimepithel.

Masson-Goldner-Färbung

SB = 50 μm

Die anfangs runden (R) Kerne der Spermatiden elongieren (E) sich und somit reifen die Spermatiden anschließend zu den Spermien (SP), welche ins Lumen des Tubulus seminiferus contortus (TUB) freigesetzt werden.

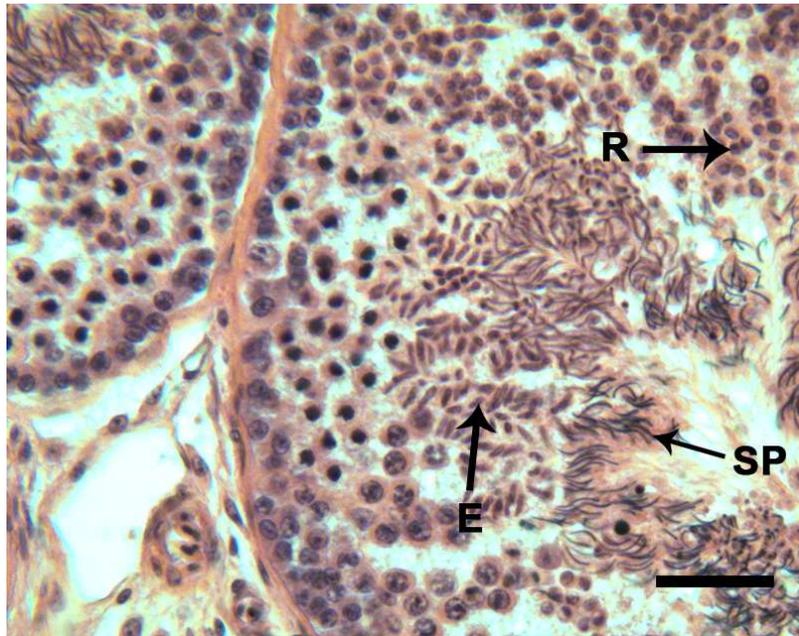


Abbildung 27: Hoden Strauß, Keimepithel.

HE-Färbung

SB = 50 μm

Die elongierten Spermatiden (E) entwickeln sich weiter zu den Spermien (SP).

R = rundkernige Spermatiden

3. Immunhistochemische Untersuchungen am Hoden des Straußes

3.1. Immunhistochemischer Nachweis von „ α -smooth muscle actin“ (α -SMA)

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der vorliegenden Hodenschnitte zeigt sich eine positive Reaktion auf α -SMA in den glatten Muskelzellen und den Myofibroblasten. Die letzteren sind peritubulär in einer dünnen Schicht angeordnet. Im intertubulären Gewebe findet man ebenfalls Zellen mit starker Anfärbung. Dort zeigen sich auch Gefäße mit einer deutlich positiven Tunica media. Die Kapsel weist ebenfalls zwischen den Fibrozyten eingebettete stark positive Zellen auf. Die restlichen Strukturen des Hodengewebes färben sich nicht an.

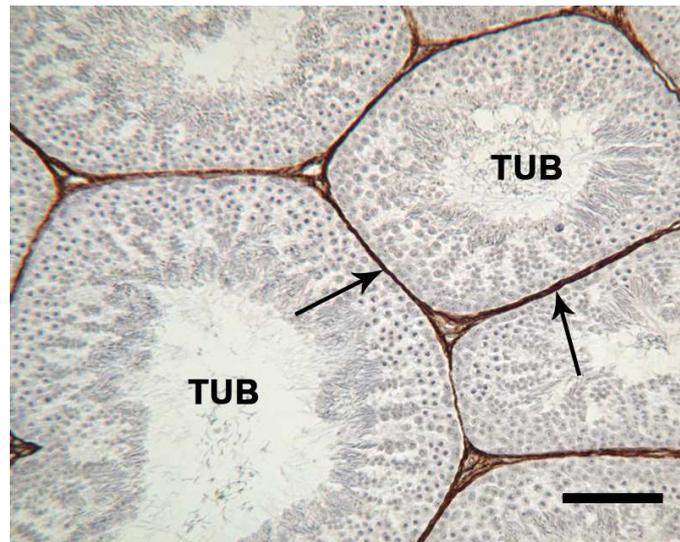


Abbildung 28: Hoden Strauß, peritubuläres Gewebe.

Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA

SB = 100 μ m

In den peritubulären Myofibroblasten ist eine stark positive Immunreaktion auf α -SMA zu beobachten (Pfeil).

TUB = Tubulus seminiferus contortus

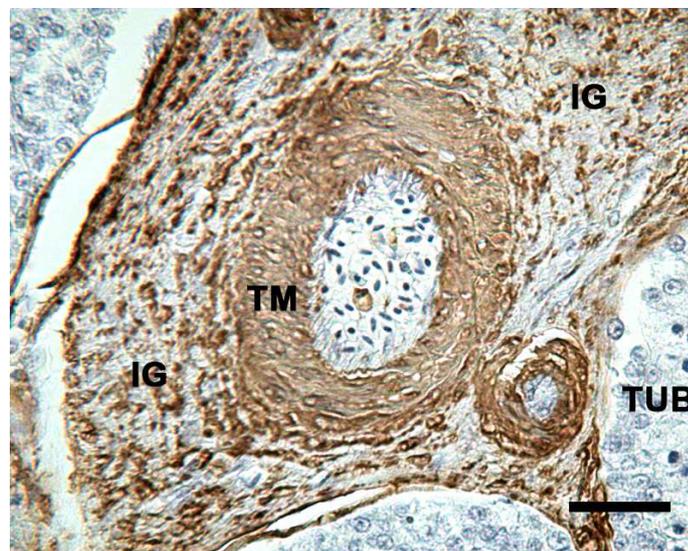


Abbildung 29: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA

SB = 50 μ m

In der Tunica media (TM) der Arterien reagieren die glatten Muskelzellen mit einer mittelstarken Anfärbung mit α -SMA-Antikörpern. Ebenso zu sehen sind im intertubulären Gewebe (IG) Fibrozyten mit starker Anfärbung.

TUB = Tubulus seminiferus contortus

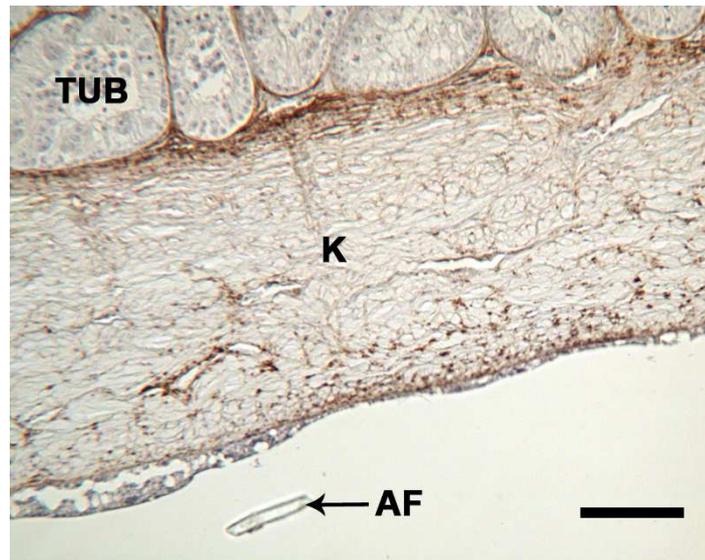


Abbildung 30: Hoden Strauß, Hodenkapsel.

Immunhistochemischer Nachweis von α -SMA

SB = 100 μ m

In der Hodenkapsel (K) reagieren Zellen stark mit dem α -SMA-Antikörper.

TUB = Tubulus seminiferus contortus, AF = Artefakt

3.2. Immunhistochemischer Nachweis von Desmin

Desmin ist immunhistochemisch im untersuchten Hodengewebe ausschließlich in glatten Muskelzellen der Tunica media der Gefäße zu detektieren. Diese Reaktion fällt intensiv aus. Die übrigen Strukturen weisen keinerlei positive Reaktion auf.

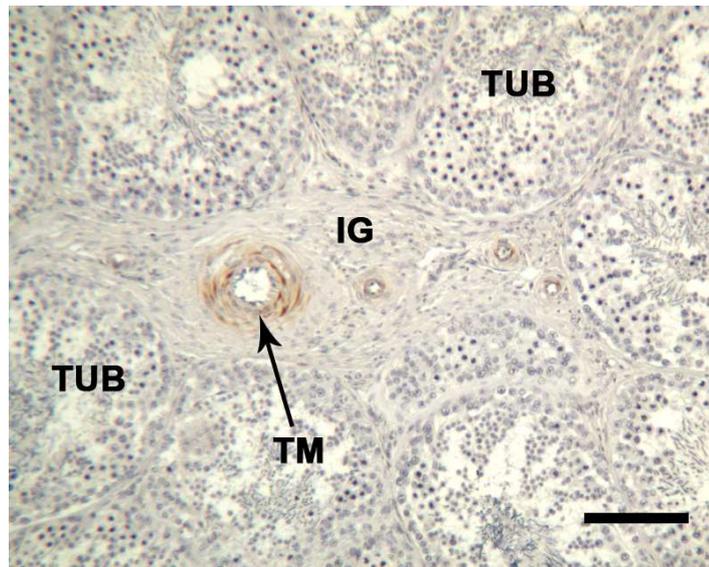


Abbildung 31: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Immunhistochemischer Nachweis von Desmin

SB = 100 μm

Desmin kann in der Tunica media (TM) der Arterien nachgewiesen werden. Die übrigen Strukturen bleiben negativ.

TUB = Tubulus seminiferus contortus, IG = intertubuläres Gewebe

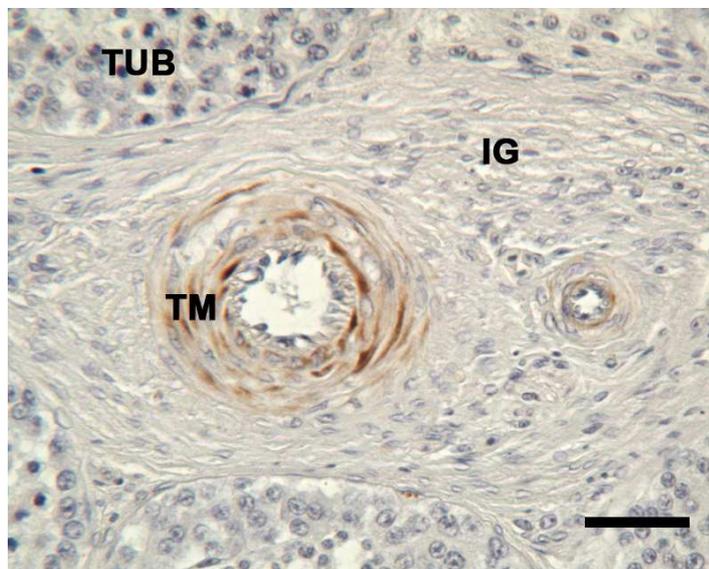


Abbildung 32: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Immunhistochemischer Nachweis von Desmin

SB = 50 μm

Beim immunhistochemischen Nachweis von Desmin wird in den glatten Muskelzellen der Tunica media (TM) der Arterien eine starke immunhistochemische Reaktion sichtbar.

TUB = Tubulus seminiferus contortus, IG = intertubuläres Gewebe

3.3. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

Der Nachweis von Vimentin ist in vielen Strukturen des Hodens positiv. In der Kapsel reagieren die Fibrozyten mittelstark. Im intertubulären Gewebe sieht man ebenfalls eine mittelstarke Reaktion der Fibrozyten, zwischen denen die stark angefärbten Leydig-Zellen eingebettet liegen. Die Gefäße weisen eine deutliche Anfärbung der Endothelzellen auf. In den Hodentubuli stellt sich das Zytoplasma der Sertoli-Zellen ebenfalls mit einer starken Immunreaktion dar. Die restlichen Strukturen des Hodengewebes reagieren negativ.

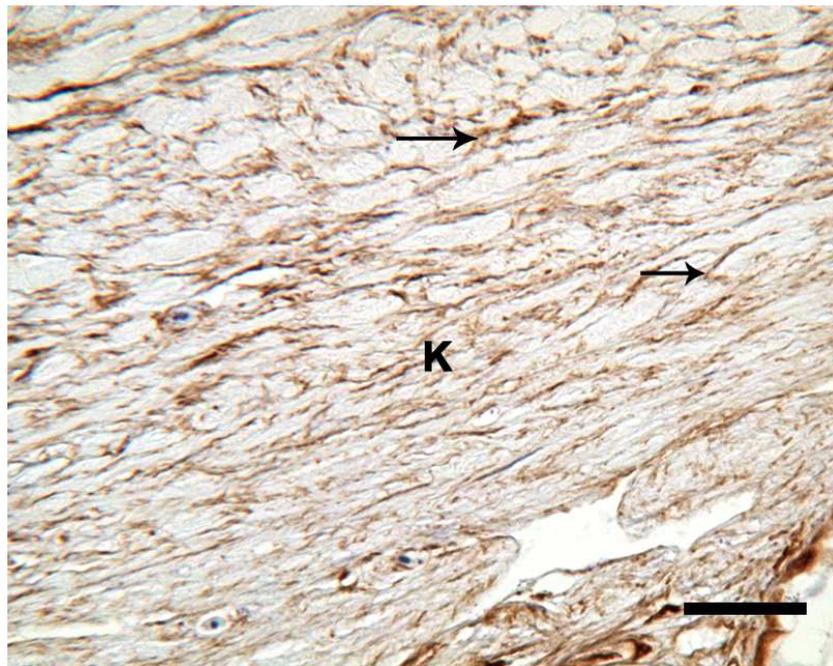


Abbildung 33: Hoden Strauß, Kapsel.

Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

SB = 50 μm

Die Fibrozyten (Pfeile) in der Hodenkapsel (K) zeigen eine mittelstarke Anfärbung.

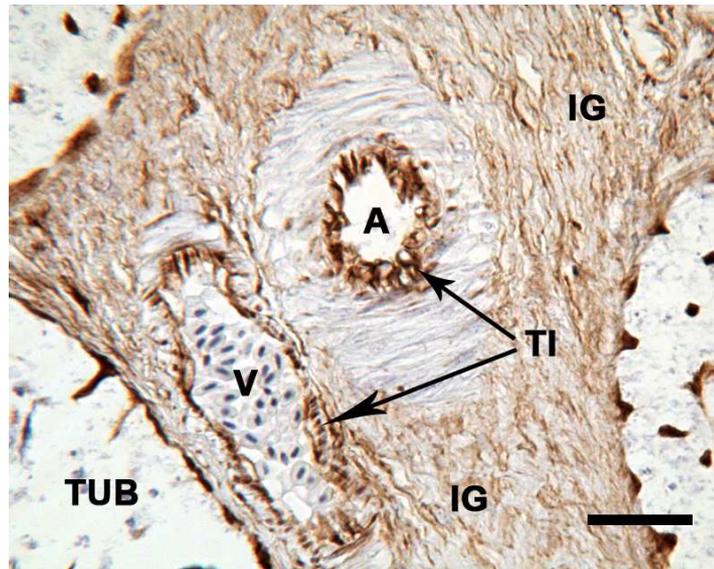


Abbildung 34: Hoden Strauß, intertubulären Gewebe.

Immunohistochemischer Nachweis von Vimentin

SB = 50 μm

Vimentin kann in den Fibrozyten des intertubulären Gewebes (IG) beobachtet werden. Die Endothelzellen in der Tunica intima (TI) der Gefäße weisen eine starke Reaktion auf.

A = Arterie, V = Vene, TUB = Tubulus seminiferus contortus



Abbildung 35: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Immunohistochemischer Nachweis von Vimentin

SB = 100 μm

Vimentin kann in den Endothelzellen der Tunica intima (TI) der Venen (V) deutlich nachgewiesen werden.

TUB = Tubulus seminiferus contortus

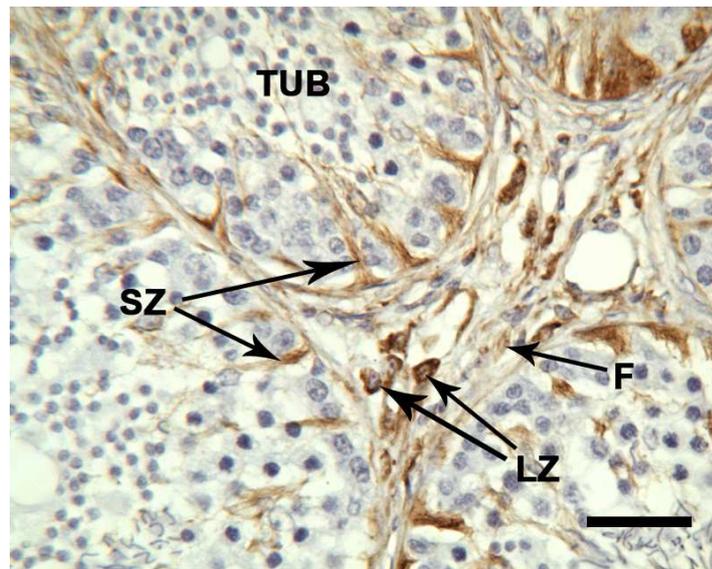


Abbildung 36: Hoden Strauß, Keimepithel und intertubuläres Gewebe.

Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

SB = 50 μ m

Die Fibrozyten (F) des intertubulären Gewebes weisen eine Anfärbung mit Vimentin-Antikörpern auf. Dazwischen eingebettete Leydig-Zellen (LZ) zeigen eine starke Reaktion. Desweiteren färbt sich das Zytoplasma der Sertoli-Zellen (SZ) im Tubulus seminiferus contortus (TUB) stark an.

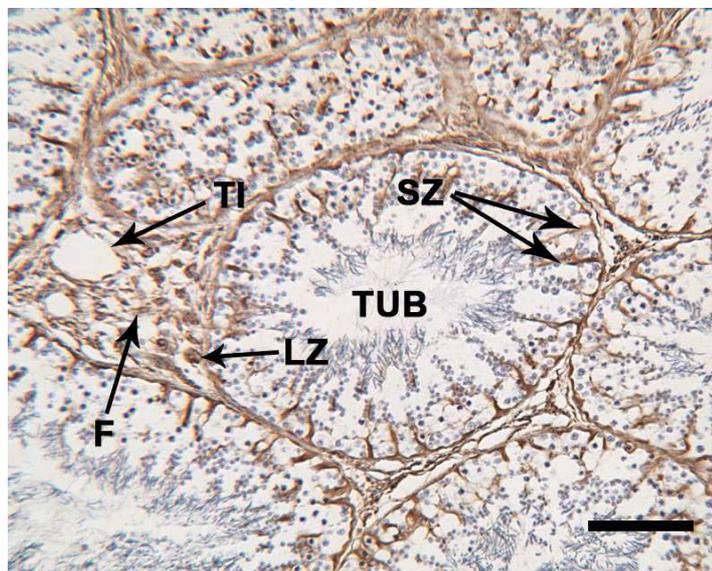


Abbildung 37: Hoden Strauß, Tubuli seminiferi contorti.

Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin

SB = 100 μ m

In der Übersicht des Hodenparenchyms kann eine Anfärbung der folgenden Strukturen beobachtet werden: Fibrozyten (F), Tunica intima (TI), Leydig-Zellen (LZ), Sertoli-Zellen (SZ).

TUB = Tubulus seminiferus contortus

3.4. Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen

Zytokeratine lassen sich in manchen Schnitten im intertubulären Gewebe nachweisen. Hierbei färben sich einige Zellen mittel- bis sehr stark an. In den Leydig-Zellen fällt die Reaktion sehr unterschiedlich aus: in manchen Schnitten färbt sich das Zytoplasma vieler Leydig-Zellen, in manchen Schnitten können Zytokeratine nur in vereinzelt Leydig-Zellen detektiert werden. In jeder der positiven Leydig-Zellen ist eine deutliche Anfärbung sichtbar. In den Gefäßwänden werden Zytokeratine in allen Schichten homogen schwach exprimiert. Zusätzlich sind einige mäßig bis stark angefärbte Zellen in der Tunica externa auffindbar.

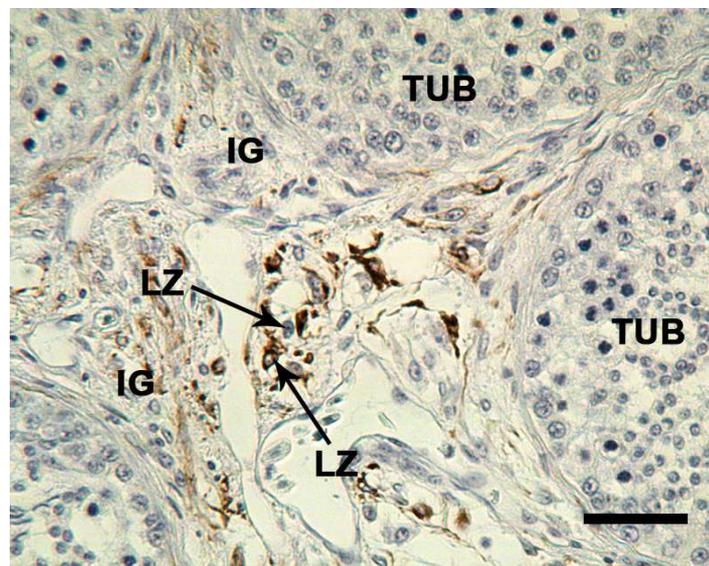


Abbildung 38: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen

SB = 50 µm

Zytokeratine lassen sich in einigen Zellen im intertubulären Gewebe (IG) beobachten. Die Zellen sind mittel- bis sehr stark angefärbt. Von den Leydig-Zellen (LZ) zeigen sich vereinzelte Zellen stark angefärbt, andere wiederum zeigen keinerlei Affinität zum verwendeten Antikörper.

TUB = Tubulus seminiferus contortus

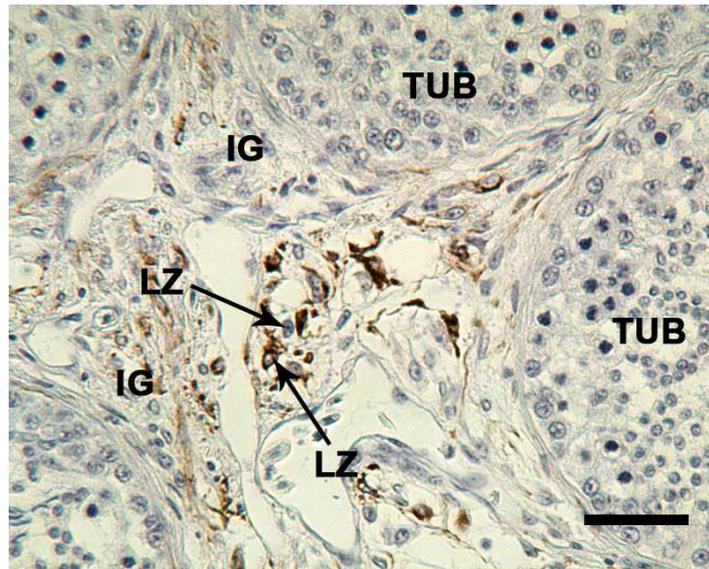


Abbildung 39: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratinen

SB = 50 μm

In einigen Schnitten verbleibt das intertubuläre Gewebe (IG) ohne positive Reaktion, nur in einigen Leydig-Zellen (LZ) kann man hier Panzytokeratin nachweisen.

TUB = Tubulus seminiferus contortus, V = Vene

3.5. Immunhistochemischer Nachweis von Myosin

In den Hodengewebeschnitten ist eine positive Reaktion in den Zellen glatter Muskulatur und in Myofibroblasten zu beobachten. Es färben sich dementsprechend die Tunica media der Gefäße leicht positiv, in den peritubulären Zellen ist eine starke Reaktion zu beobachten. In der Kapsel und in den intertubulären Räumen liegen deutlich positiv reagierende Fibrozyten. Zusätzlich kann man in vereinzelt Tubuli seminiferi contorti eine Expression von Myosin im Zytoplasma von Sertoli-Zellen und den rundkernigen Spermatozoen feststellen. In den übrigen Strukturen ist keine positive Reaktion nachvollziehbar.

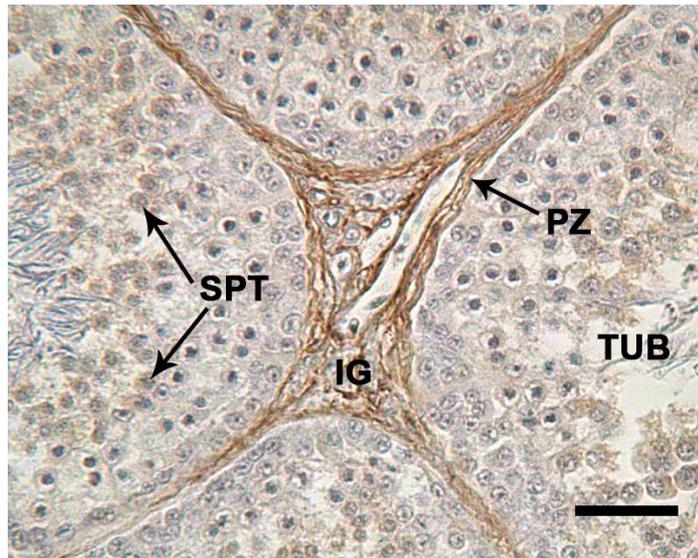


Abbildung 40: Hoden Strauß, Keimepithel und intertubuläres Gewebe.

Immunhistochemischer Nachweis von Myosin

SB = 50 μ m

Eine starke Anfärbung mit Myosin-Antikörpern kann in den peritubulären Zellen (PZ) beobachtet werden. Im intertubulären Gewebe (IG) sind ebenfalls deutlich reagierende Fibrozyten nachweisbar. Eine schwache Reaktion erfolgt im Zytoplasma der rundkernigen Spermatiden (SPT).

TUB = Tubulus seminiferus contortus

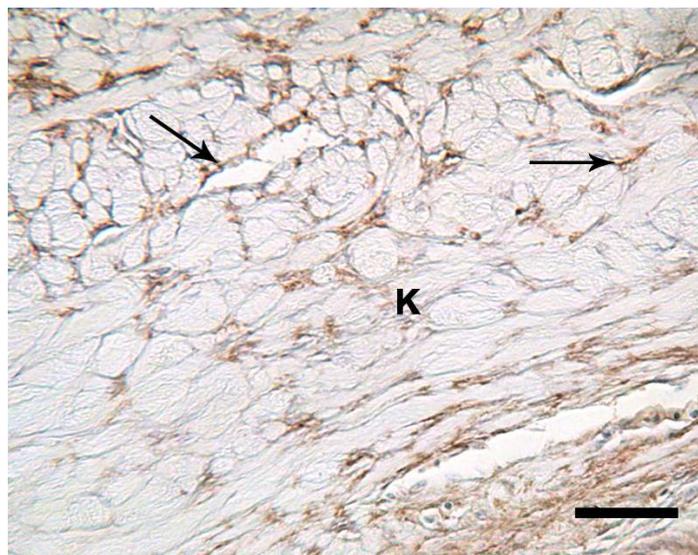


Abbildung 41: Hoden Strauß, Hodenkapsel.

Immunhistochemischer Nachweis von Myosin

SB = 50 μ m

In der Hodenkapsel (K) sind deutlich positiv reagierende Fibrozyten (Pfeile) zu finden.

3.6. Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin

In den untersuchten Proben wird Tubulin mithilfe der Immunhistochemie in den Sertoli-Zellen identifiziert, ihr Zytoplasma färbt sich stark immunopositiv. Desweiteren kann man eine mittelstarke Reaktion im Schwanzteil der Spermien feststellen. An den Gefäßen zeigt sich eine ebenfalls mittelstarke Immunreaktion in den Endothelzellen. Neben den beschriebenen Zellen bleiben alle anderen Strukturen negativ.

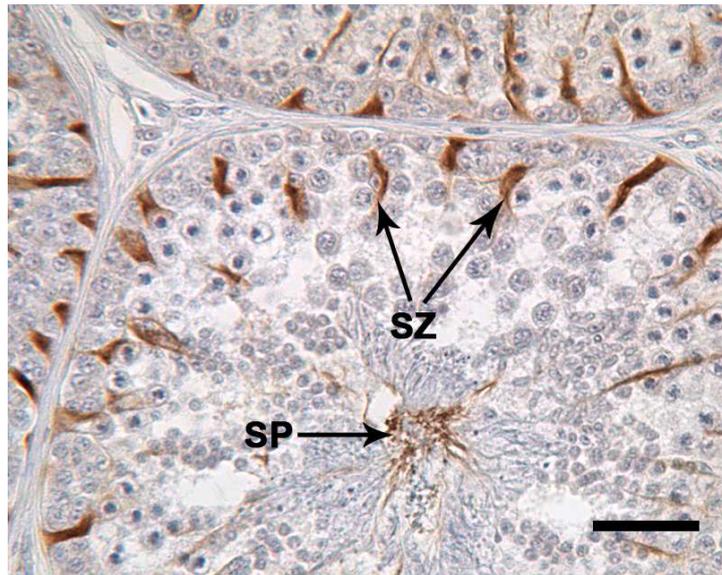


Abbildung 42: Hoden Strauß, Keimepithel.

Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin

SB = 50 μm

Tubulin ist in den Sertoli-Zellen (SZ) nachweisbar, die sich stark positiv anfärben. Ebenso ist eine deutliche Reaktion in den Schwänzen der Spermien (SP) sichtbar.



Abbildung 43: Hoden Strauß, Tubuli seminiferi contorti.

Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin

SB = 100 μ m

Im Zytoplasma der Sertoli-Zellen (SZ) und in den Schwänzen der Spermien (SP) ist eine deutliche Immunfärbung sichtbar.

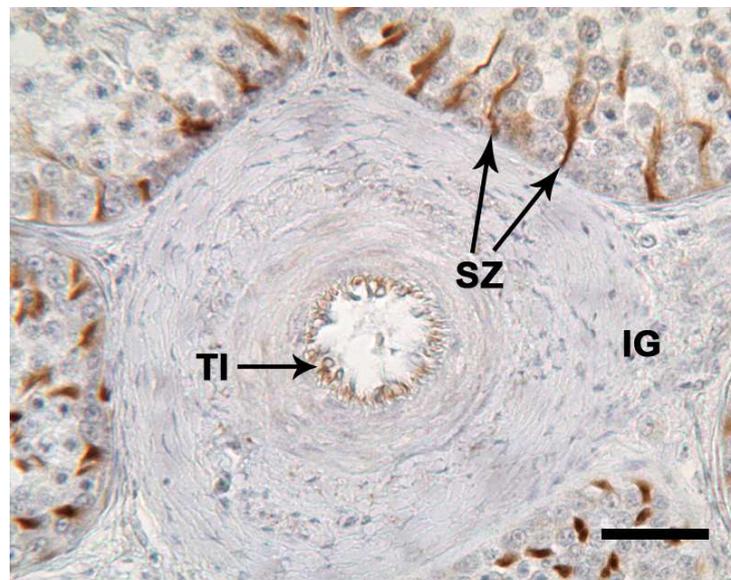


Abbildung 44: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Immunhistochemischer Nachweis von Tubulin

SB = 50 μ m

Die Endothelzellen in der Tunica interna (TI) der Arterie reagieren mittelstark auf eine Anfärbung mit Tubulin-Antikörpern. Zu sehen ist auch eine deutliche Anfärbung im Zytoplasma der Sertoli-Zellen (SZ).

IG = intertubuläres Gewebe

3.7. Immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43

Connexin 43 wird in den untersuchten Gewebeschnitten in den Leydig-Zellen stark exprimiert. In vereinzelt Sertoli-Zellen kann nur eine schwache Immunreaktion im mittleren Drittel nachgewiesen werden. In den Gefäßen zeigt sich eine mittelstarke Anfärbung des Endothels. Alle anderen Strukturen bleiben reaktionslos.

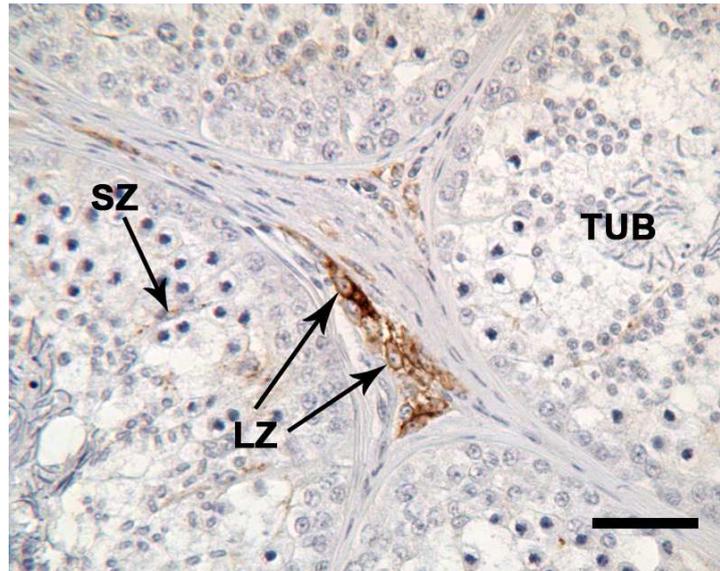


Abbildung 45: Hoden Strauß, Keimepithel und intertubuläres Gewebe.

Immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43

SB = 50 μ m

Im Zytoplasma der Leydig-Zellen (LZ) ist eine starke Expression von Connexin 43 zu beobachten.

In vereinzelt Sertoli-Zellen (SZ) zeigt sich eine leichte Immunreaktion.

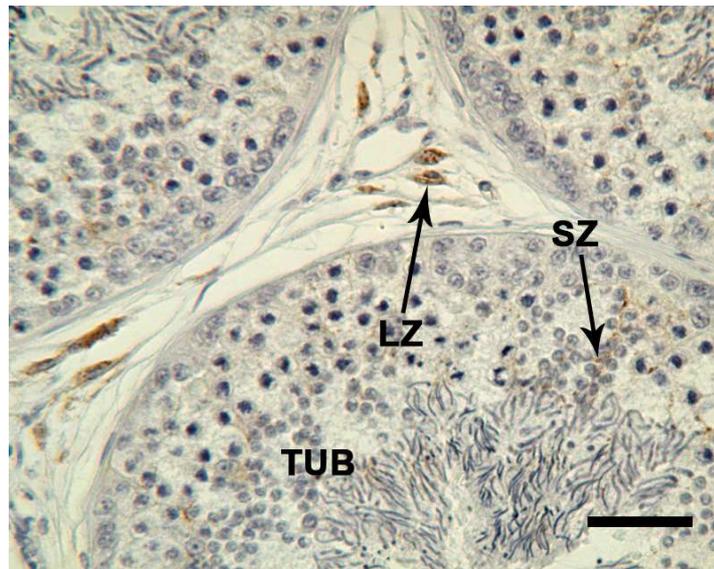


Abbildung 46: Hoden Strauß, Keimepithel und intertubuläres Gewebe.

Immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43

SB = 50 μm

In den Leydig-Zellen (LZ) ist eine starke Anfärbung zu beobachten. Eine schwache Reaktion zeigt sich im Zytoplasma einzelner Sertoli-Zellen (SZ).

TUB = Tubulus seminiferus contortus

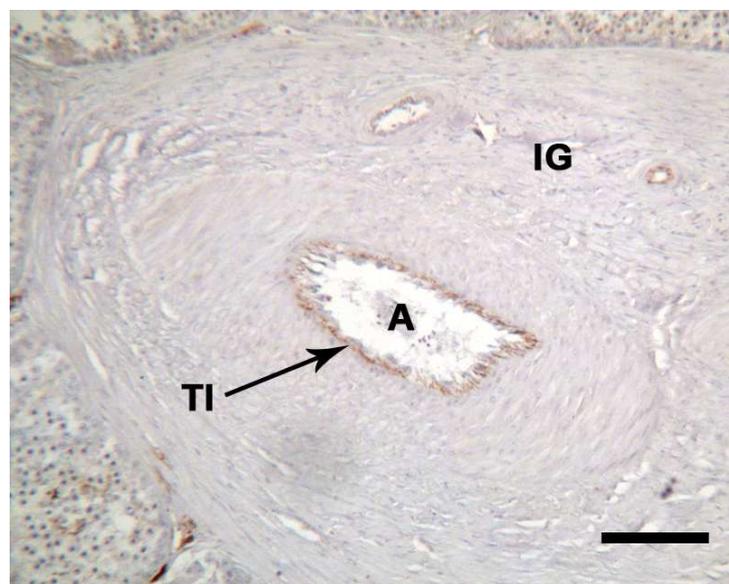


Abbildung 47: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Immunhistochemischer Nachweis von Connexin 43

SB = 100 μm

In den Endothelzellen der Tunica interna (TI) der Arterie (A) ist eine mittelstarke Immunreaktion festzustellen.

IG = intertubuläres Gewebe

3.8. Immunhistochemischer Nachweis von Cyclooxygenasen

3.8.1. Cox-1

Der immunhistochemische Nachweis von Cyclooxygenase-1 gelingt ausschließlich in Zellen des Keimepithels. Hierbei färben sich das Zytoplasma der Spermatisden deutlich an. Die übrigen Strukturen zeigen keinerlei positive Reaktion.

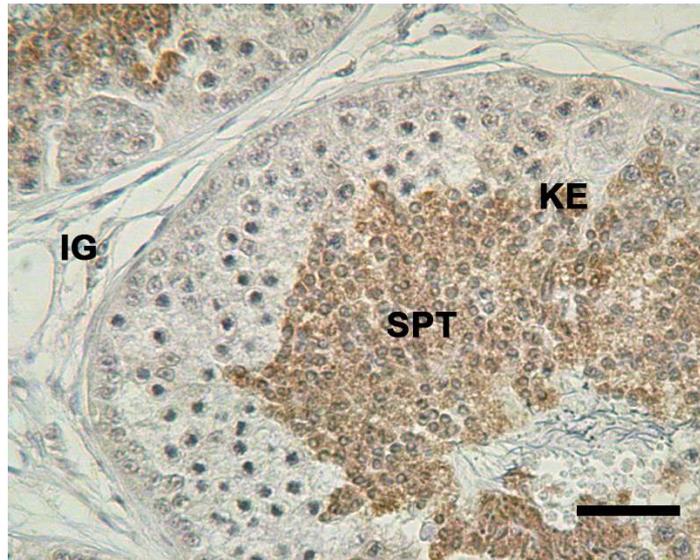


Abbildung 48: Hoden Strauß, Keimepithel.

Immunhistochemischer Nachweis von Cox-1

SB = 50 µm

In den Gewebeschnitten ist innerhalb des Keimepithels (KE) eine starke Anfärbung der Spermatisden (SPT) zu sehen.

IG = intertubuläres Gewebe

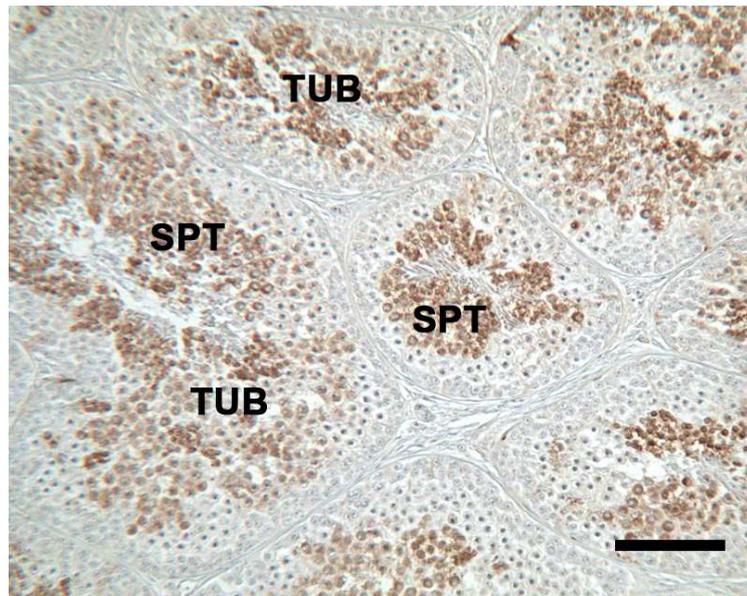


Abbildung 49: Hoden Strauß, Tubuli seminiferi contorti.

Immunohistochemischer Nachweis von Cox-1

SB = 100 μm

In der Übersicht des Hodenparenchyms sieht man die deutlich positive Reaktion der Spermatozoen (SPT) mit den Cox-1-Antikörpern.

3.8.2. Cox-2

Die Expression von Cyclooxygenase-2 kann mithilfe der Immunhistochemie im Zytoplasma der Sertoli-Zellen in einer mittleren Intensität nachgewiesen werden. Das Zytoplasma der Leydig-Zellen zeigt eine stark positive Reaktion. Desweiteren lässt sich eine zarte Anfärbung der Tunica media und eine deutliche positive Immunreaktion der Tunica intima der Gefäße feststellen. Alle weiteren Strukturen bleiben reaktionslos.

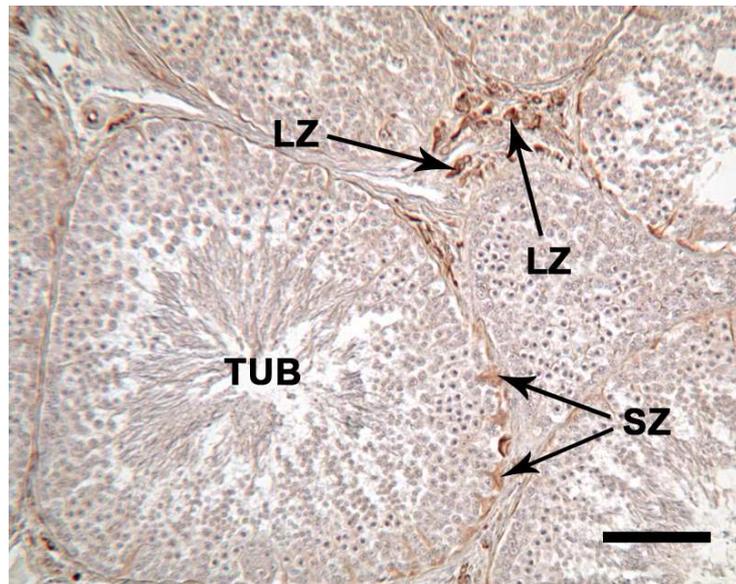


Abbildung 50: Hoden Strauß, Tubuli seminiferi contorti und intertubuläres Gewebe.

Immunohistochemischer Nachweis von Cox-2

SB = 100 µm

Im Zytoplasma der Sertoli-Zellen (SZ) ist Cox-2 in mittlerer Ausprägung nachweisbar. Dagegen färbt sich das Zytoplasma der Leydig-Zellen (LZ) stark an.

TUB = Tubuli seminiferi contorti

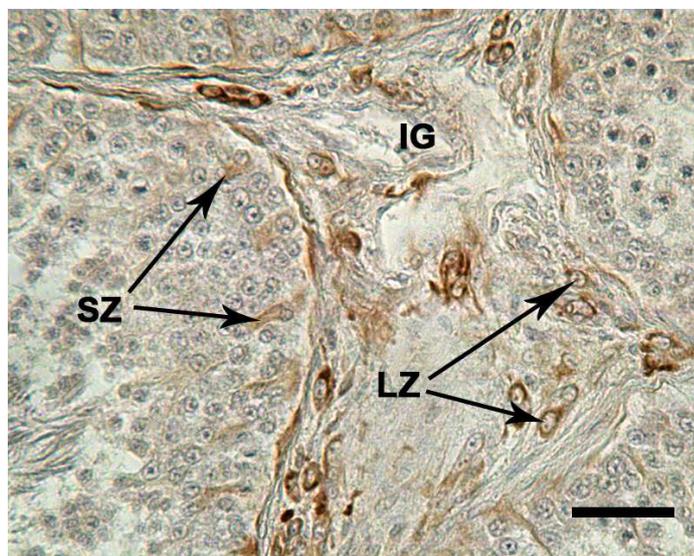


Abbildung 51: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Immunohistochemischer Nachweis von Cox-2

SB = 50 µm

Cox-2 lässt sich in den Leydig-Zellen (LZ) in starker Intensität nachweisen. Die Sertoli-Zellen (SZ) zeigen eine mittelstarke Reaktion.

IG = intertubuläres Gewebe

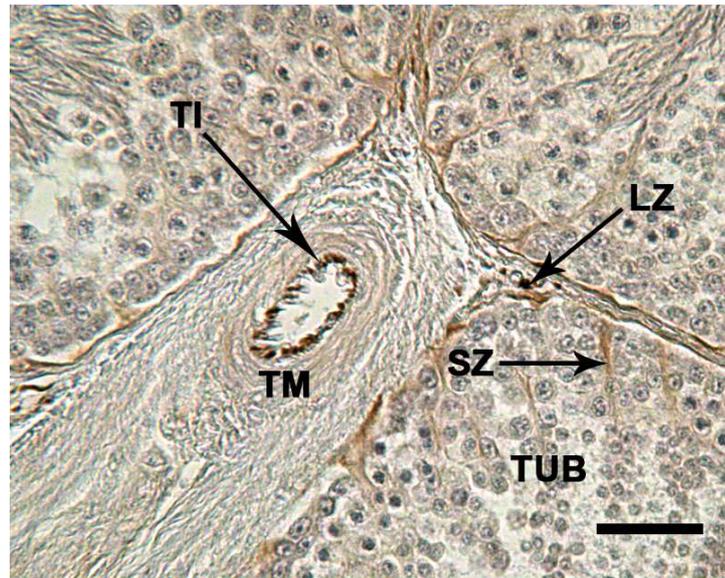


Abbildung 52: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Immunhistochemischer Nachweis von Cox-2

SB = 50 μm

Das Endothel der Gefäße (TI) weist eine stark positive Reaktion auf, wohingegen die Tunica media (TM) sich nur schwach anfärbt. In den Leydig-Zellen (LZ) fällt die Reaktion sehr stark aus. In den Tubuli seminiferi contorti (TUB) zeigen sich die Sertoli-Zellen (SZ) mit einer mittelstarken Reaktion ihres Zytoplasmas.

3.9. Immunhistochemischer Nachweis des Östrogen-Rezeptors α (ER α)

Eine positive immunhistochemische Reaktion von Antikörpern gegen ER α lässt sich ausschließlich in vereinzelt Leydig-Zellen beobachten. Bei allen restlichen Strukturen bleibt eine Anfärbung aus.

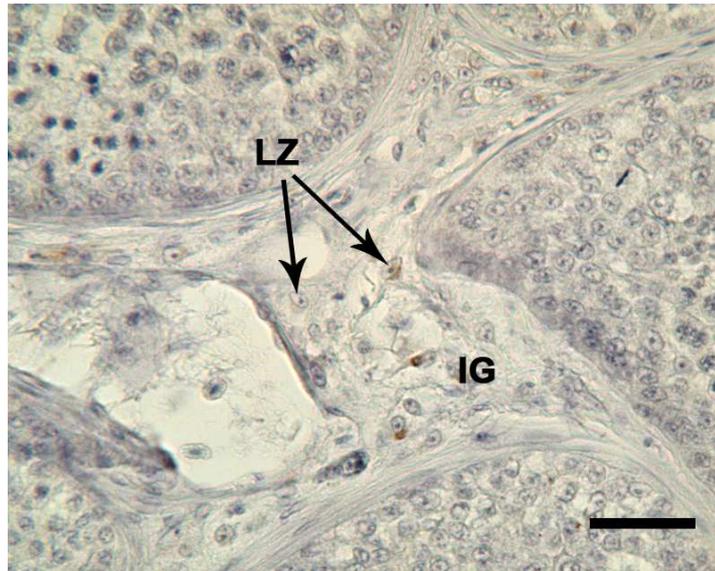


Abbildung 53: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Immunhistochemischer Nachweis von ER α

SB = 50 μ m

Eine Expression von ER α lässt sich nur in vereinzelt Leydig-Zellen (LZ) nachweisen. Andere hingegen zeigen sich vollkommen negativ.

IG = intertubuläres Gewebe

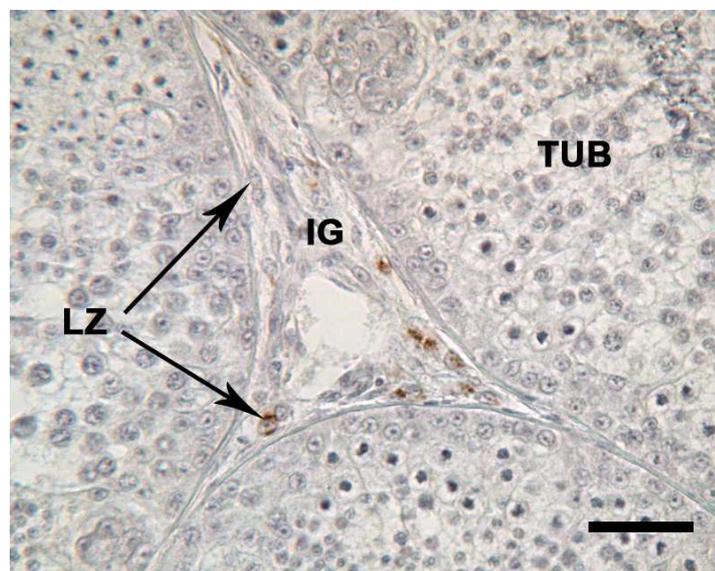


Abbildung 54: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Immunhistochemischer Nachweis von ER α

SB = 50 μ m

Leydig-Zellen (LZ): positiv reagierende Zellen neben Zellen ohne Immunreaktion.

IG = intertubuläres Gewebe, TUB = Tubulus seminiferus contortus

3.10. Immunhistochemischer Nachweis des Androgenrezeptors

Innerhalb der untersuchten Gewebeschnitte gelingt der immunhistochemische Nachweis von Androgenrezeptoren als schwache positive Reaktion in den Zellen der Tunica interna und media der Gefäße festzustellen. Der Rest des Gewebes verbleibt ohne Anfärbung.

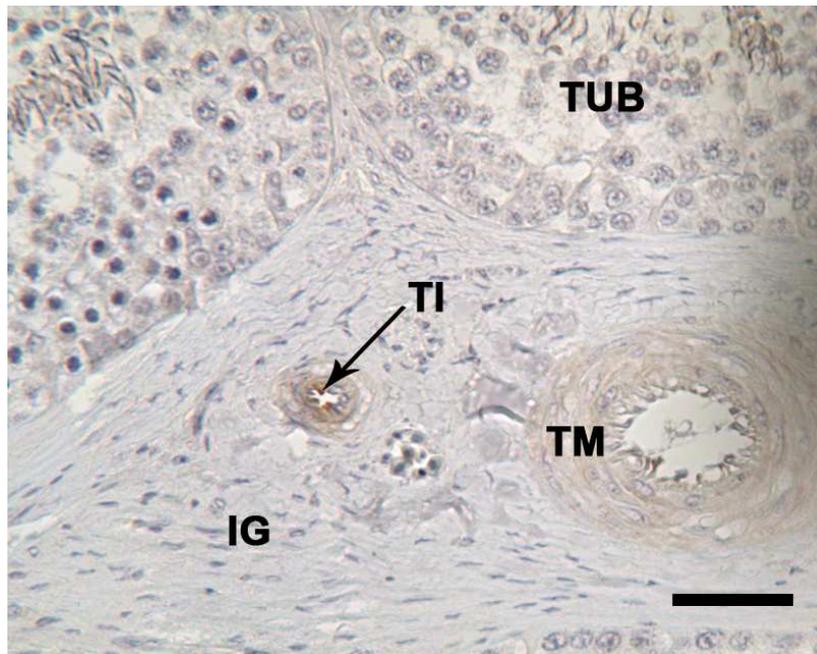


Abbildung 55: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Immunhistochemischer Nachweis von Androgenrezeptoren

SB = 50 μm

In den Gefäßen zeigt sich eine leicht positive Immunreaktion in der Interna (TI) und der Tunica media (TM).

IG = intertubuläres Gewebe, TUB = Tubulus seminiferus contortus

Tabelle 25: Übersicht über die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

Antikörper	Gewebestruktur												
	SZ	SG	PSP	SSP	SPT	SP	PZ	IG	LZ	GF			K
										TI	TM	TE	
α -SMA	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	+++	-	+++
Desmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-
Vimentin	+++	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	-	-	++
Panzyto-keratin	-	-	-	-	-	-	-	++/ +++	-/+++	+	+	+/+++ /+++	-
Myosin	-/+	-	-/+	-	-	-	+++	+++	-	-	+	-	+++
Tubulin	+++	-	-	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-
Connexin	-/+	-	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	-	-
COX-1	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
COX-2	++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+	-	-
ER α	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-
AR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-

SZ = Sertoli-Zellen, SG = Spermatogonien, PSP = primäre Spermatozyten, SSP = sekundäre Spermatozyten, SPT = Spermatozyten, SP = Spermien, PZ = peritubuläre Zellen, IG = intertubuläres Gewebe, LZ = Leydig-Zellen, GF = Gefäße, TI = Tunica interna, TM = Tunica media, TE = Tunica externa, K = Kapsel

- = keine Anfärbung, + = schwache Anfärbung, ++ = mäßig bis mittelstarke Anfärbung, +++ = starke Anfärbung

4. Glykohochemische Untersuchungen am Hoden des Straußes

4.1. Bindungsstellen für *Concanavalin Agglutinin* (ConA)

Bindungsstellen für ConA finden sich im Zytoplasma der Sertoli-Zellen. Hier ist eine starke Anfärbung festzustellen. Ebenfalls ist eine Anfärbung mit ConA-FITC im Zytoplasma aller Keimzellstadien (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden) zu beobachten, wobei diese Reaktion nur mäßig stark ausfällt. Im Zytoplasma vereinzelter Leydig-Zellen ist ebenfalls eine Reaktion mit ConA-FITC nachweisbar.

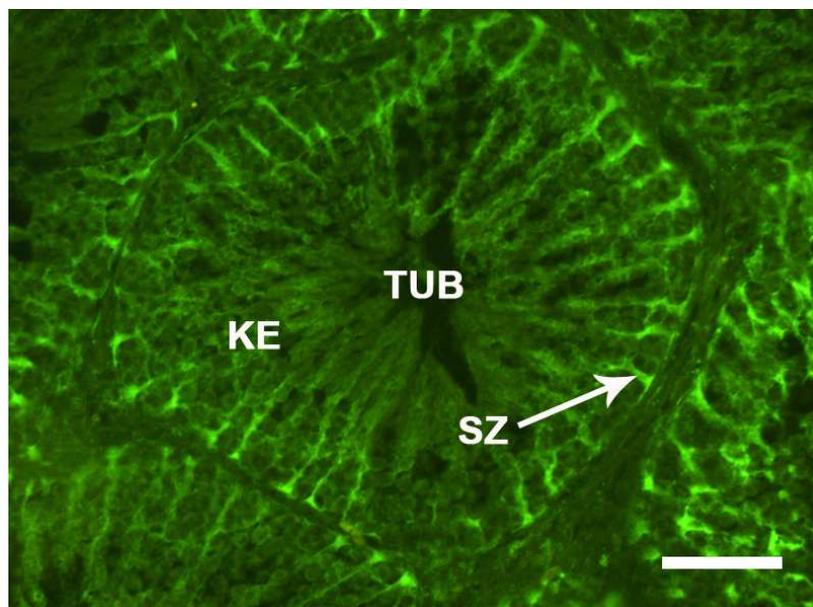


Abbildung 56: Hoden Strauß, Tubulus seminiferus contortus.

Bindung von ConA-FITC

SB = 50 μ m

Eine starke Anfärbung mit ConA-FITC ist im Zytoplasma der Sertoli-Zellen (SZ) zu beobachten. Im Zytoplasma aller Keimzell-Stadien (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden) des Keimepithels (KE) zeigt sich dagegen nur eine mäßige Reaktion.

TUB = Tubulus seminiferus contortus

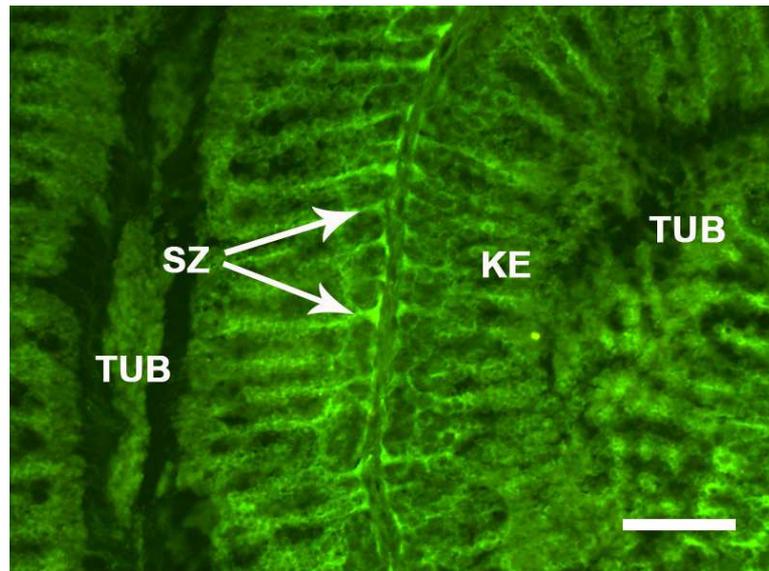


Abbildung 57: Hoden Strauß, Keimepithel.

Bindung von ConA-FITC

SB = 50 μ m

Im Keimepithel ist eine Anfärbung aller Keimzellstadien festzustellen (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatozyten, Spermatozyten, Spermatozyten). Die Sertoli-Zellen (SZ) zeigen eine deutlich positive Reaktion.

TUB = Tubulus seminiferus contortus

4.2. Bindungsstellen für *Lens culinaris* Agglutinin (LCA)

Bindungsstellen für LCA-FITC finden sich im untersuchten Gewebe im intertubulären Gewebe in schwacher Ausprägung. Die peritubulären Zellen hingegen weisen eine schwache bis mäßige Anfärbung auf. Die Zellen der Tunica externa der Arterien reagieren stark positiv. In den übrigen Strukturen ist keinerlei positive Reaktion zu beobachten.

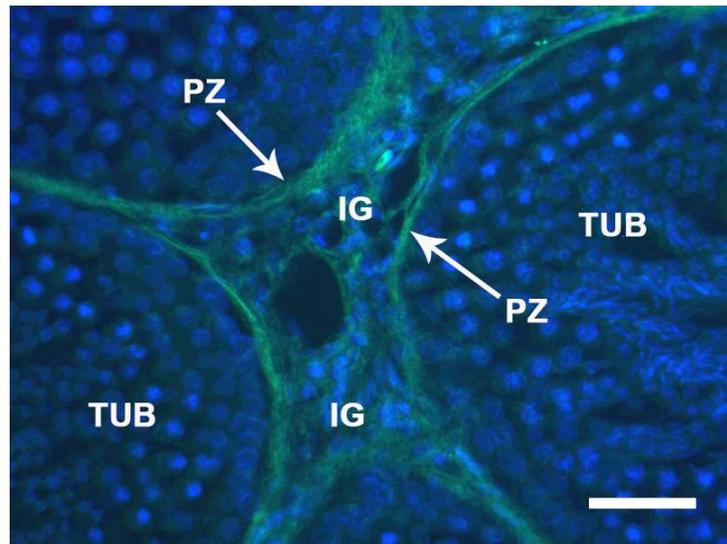


Abbildung 58: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Bindung von LCA-FITC

SB = 50 μm

Im intertubulären Gewebe (IG) ist eine schwache Fluoreszenz nachweisbar. Peritubulär (PZ) zeigt sich das Gewebe mit einer etwas deutlicheren Anfärbung.

TUB = Tubulus seminiferus contortus

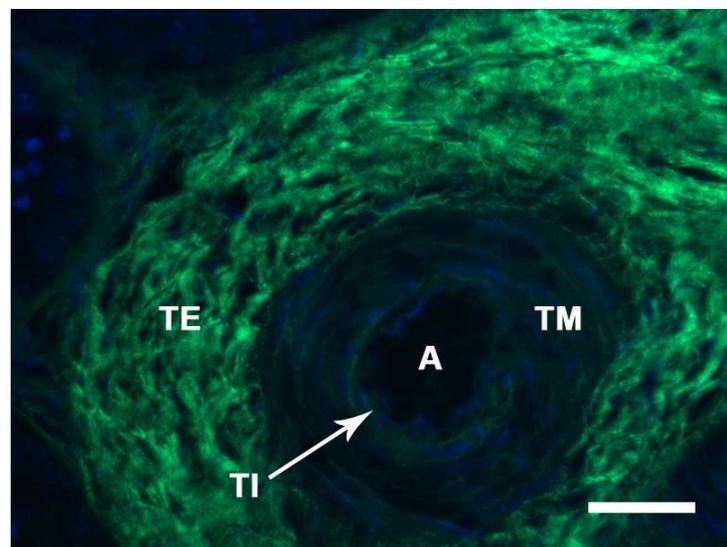


Abbildung 59: Hoden Strauß, Arterie im intertubulären Gewebe.

Bindung von LCA-FITC

SB = 50 μm

Die Tunica externa (TE) der Arterie (A) weist eine deutliche Reaktion auf, die Tunica media (TM) und Tunica intima (TI) hingegen zeigen keinerlei Fluoreszenz.

4.3. Bindungsstellen für *Pisum sativum* Agglutinin (PSA)

Bindungsstellen für PSA-FITC sind im Zytoplasma der Sertoli-Zellen in schwacher Ausprägung zu finden. Eine positive Reaktion ist ebenfalls in im Zytoplasma der Keimzellen (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden) zu beobachten, hier erfolgt eine starke Anfärbung von Strukturen in Zellkernnähe. Im intertubulären Gewebe ist eine schwache homogene Fluoreszenz sichtbar.

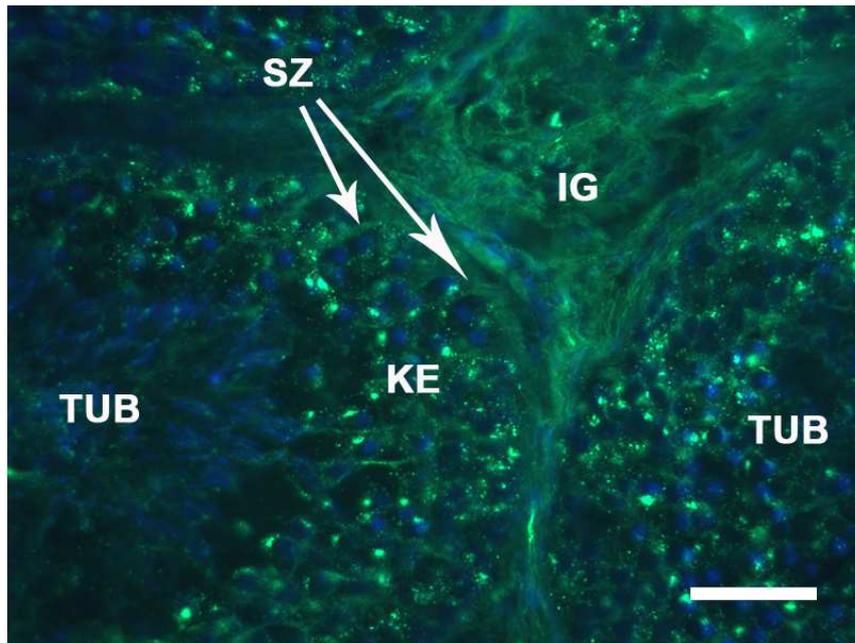


Abbildung 60: Hoden Strauß, Keimepithel und intertubuläres Gewebe.

Bindung von PSA-FITC

SB = 50 μ m

Im Keimepithel (KE) ist eine starke Anfärbung von kernnahen Bereichen in den Spermatogonien und primären Spermatozyten zu sehen. Das intertubuläre Gewebe (IG) und die Sertoli-Zellen (SZ) besitzen nur wenige Bindungsstellen für PSA-FITC.

TUB = Tubulus seminiferus contortus

4.4. Bindungsstellen für *Ricinus communis* Agglutinin (RCA)

Eine positive Reaktion mit RCA-FITC kann ausschließlich im Kapselgewebe und in der Tunica externa der Arterien detektiert werden. In beiden Geweben ist nur eine schwache Anfärbung feststellbar. Alle anderen Strukturen zeigen sich reaktionslos.

4.5. Bindungsstellen für *Arachis hypogaea* Agglutinin (PNA)

Bei der Anfärbung der Schnitte mit PNA-FITC ist eine schwache Fluoreszenz ausschließlich in den Spermatogonien und primären Spermatozyten zu beobachten. Hierbei erkennt man eine positive Reaktion von Strukturen im Zytoplasma. Alle restlichen Strukturen verbleiben ungefärbt.

4.6. Bindungsstellen für *Dolichos biflorus* Agglutinin (DBA)

Die glykohistochemische Untersuchung konnte keine Bindung von DBA-FITC im Hodengewebe nachweisen.

4.7. Bindungsstellen für *Griffonia simplicifolia I* Agglutinin (GSL-1)

Im untersuchten Gewebe konnte keine Bindung von GSL-1-FITC nachgewiesen werden.

4.8. Bindungsstellen für *Glycine max* Agglutinin (SBA)

Bei der glykohistochemischen Untersuchung des Hodengewebes können keine Bindungsstellen für SBA-FITC detektiert werden.

4.9. Bindungsstellen für *Saphora japonica* Agglutinin (SJA)

Bei der Untersuchung des Hodengewebes mit SJA-FITC kann keine Anfärbung beobachtet werden.

4.10. Bindungsstellen für *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA)

Im untersuchten Hodengewebe ist eine schwache Anfärbung mit SNA-FITC in vereinzelt Zellen im intertubulären Gewebe und in vereinzelt Spermatozyten zu beobachten. Das Endothel der Gefäße zeigt sich ebenfalls mit einer leicht positiven Reaktion.

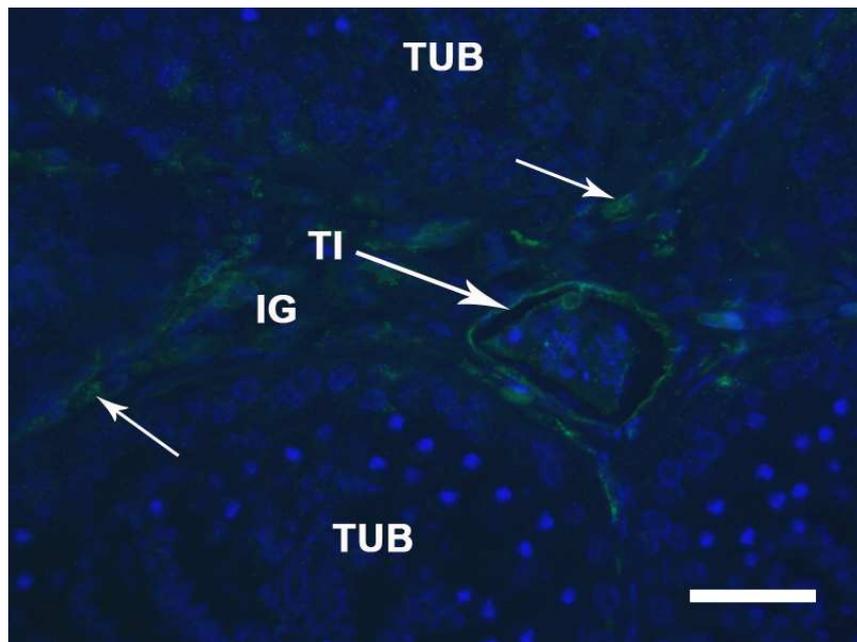


Abbildung 61: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Bindung von SNA-FITC

SB = 50 μm

In vereinzelt Zellen (Pfeile) im intertubulären Gewebe (IG) ist eine schwache Bindung von SNA-FITC nachweisbar. Die Endothelzellen der Gefäße (TI) zeigen ebenfalls eine zarte Fluoreszenz.

TUB = Tubulus seminiferus contortus

4.11. Bindungsstellen für *Triticum vulgare* Agglutinin (WGA)

Bindungsstellen für WGA finden sich in den Spermatogonien, den Spermatozyten, den Spermatischen und den Leydig-Zellen. Hierbei kann an zahlreichen Zellen eine Anfärbung in Zellkernnähe beobachtet werden. Das intertubuläre Gewebe beherbergt eine schwache bis mittelstarke Anfärbung mit WGA-FITC. Die im intertubulären Gewebe eingebetteten Gefäße weisen eine stark positive Reaktion in ihrer Tunica intima auf.

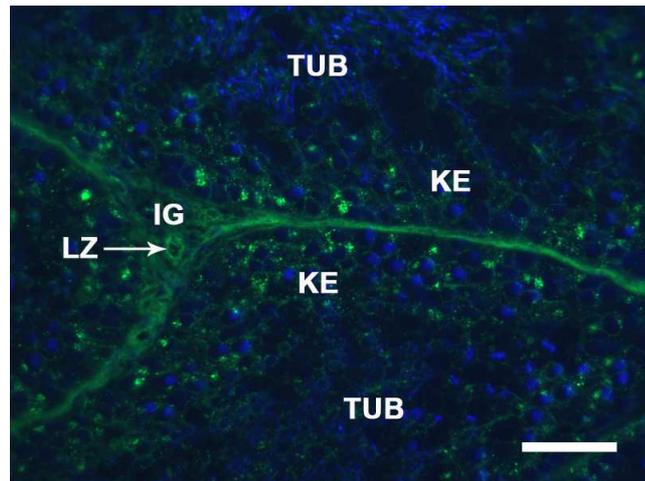


Abbildung 62: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Bindung von WGA-FITC

SB = 50 μ m

Eine Fluoreszenz ist in den Leydig-Zellen (LZ) und innerhalb des Keimepithels (KE) in den Spermatozyten, den Spermatozyten und den Spermatozyten sichtbar. Hierbei können Anfärbungen in Zellkernnähe beobachtet werden. Das intertubuläre Gewebe (IG) weist eine schwache bis mäßige Reaktion mit WGA-FITC auf.

TUB = Tubulus seminiferus contortus

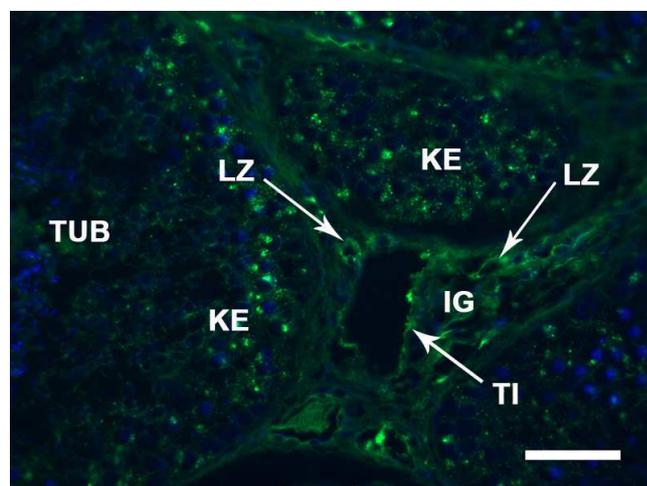


Abbildung 63: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe, Keimepithel.

Bindung von WGA-FITC

SB = 50 μ m

Innerhalb des Keimepithels (KE) sind in den Spermatozyten, den Spermatozyten und den Spermatozyten fluoreszierende Strukturen in Zellkernnähe zu sehen. Das intertubuläre Gewebe (IG) ist schwach bis mäßig positiv, in ihm eingebettet liegen die deutlich positiven Leydig-Zellen (LZ). Ebenfalls deutlich positiv reagiert die Tunica intima (TI) der Gefäße.

TUB = Tubulus seminiferus contortus

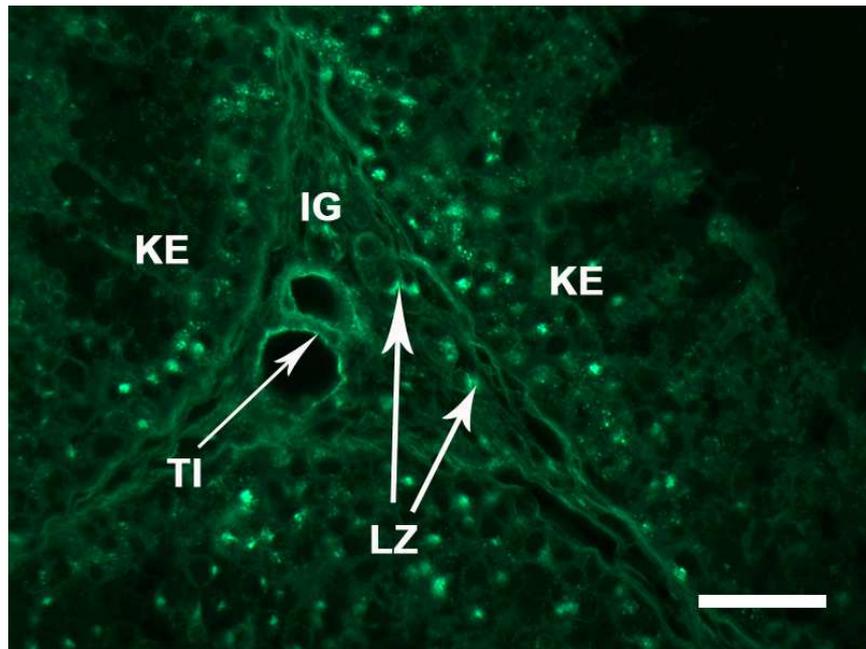


Abbildung 64: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Bindung von WGA-FITC

SB = 50 μ m

Die fluoreszierenden Areale in den Leydig-Zellen (LZ) und den Spermatogonien, den Spermatozyten und den Spermatiden innerhalb des Keimepithels (KE) sind deutlich erkennbar. Im schwach bis mäßig gefärbten intertubulären Gewebe (IG) liegen die Gefäße mit einer positiv reagierenden Tunica intima (TI) und die Leydig-Zellen (LZ), die ebenfalls eine Fluoreszenz aufweisen.

4.12. Bindungsstellen für *Triticum vulgare* Agglutinin (succinyliert) (WGAs)

Bei der glykohistochemischen Untersuchung mit WGAs-FITC kann wie bei WGA-FITC eine positive Reaktion von Strukturen in den Spermatogonien, den Spermatozyten und den Spermatiden beobachtet werden. Das intertubuläre Gewebe weist eine mäßige Anfärbung auf, wogegen sich die peritubulären Zellen deutlich positiv sind. An den Gefäßen ist eine schwache Reaktion der Tunica intima und eine starke Färbung der Tunica externa zu sehen, die Tunica media weist dagegen keinerlei Bindungsstellen für WGAs-FITC auf.

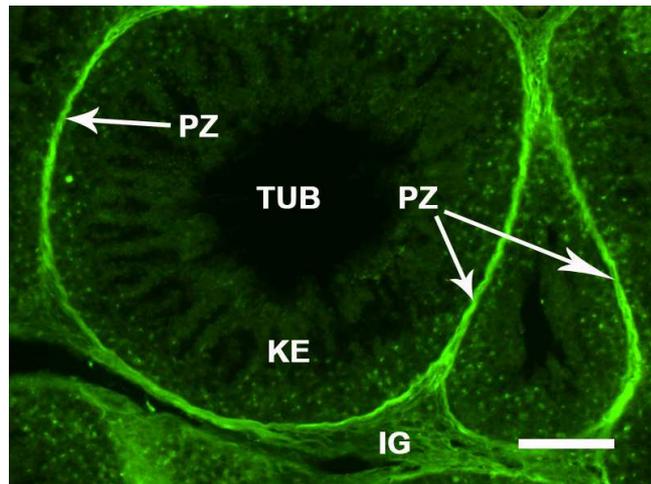


Abbildung 65: Hoden Strauß, Tubuli seminiferi contorti.

Bindung von WGAs-FITC

SB = 50 μm

Innerhalb des Keimepithels (KE) kann eine Fluoreszenz in den Spermato gonien, den Spermatozyten und den Spermato den beobachtet werden. Im intertubulären Gewebe (IG) ist eine mittelstarke Anfärbung festzustellen, in den peritubulären Zellen (PZ) zeigt sich eine starke Fluoreszenz.

TUB = Tubulus seminiferus contortus

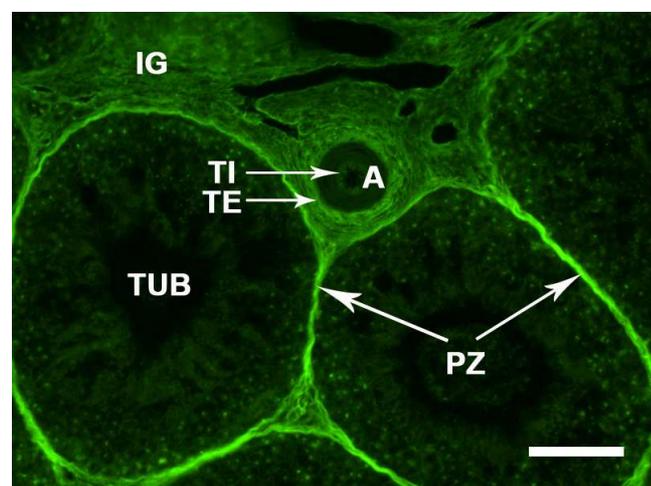


Abbildung 66: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe, Tubuli seminiferi contorti.

Bindung von WGAs-FITC

SB = 50 μm

Das intertubuläre Gewebe (IG) zeigt eine mäßige Fluoreszenz, wohingegen das peritubuläre Gewebe (PZ) eine starke Fluoreszenz aufweist. An den Gefäßen reagiert die Tunica intima (TI) schwach auf WGAs-FITC, die Tunica externa (TE) zeigt sich stark reaktiv.

TUB = Tubulus seminiferus contortus

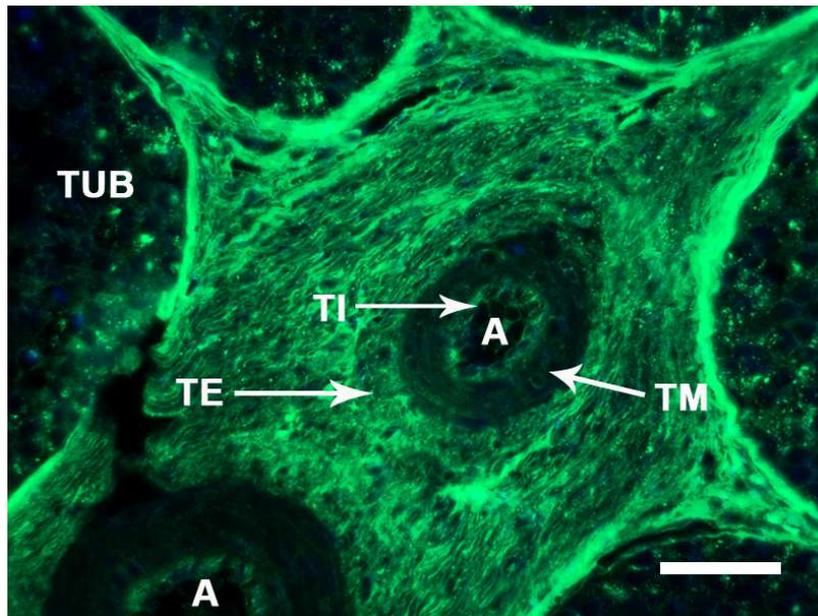


Abbildung 67: Hoden Strauß, Arterie im intertubulären Gewebe.

Bindung von WGAs-FITC

SB = 50 μm

An den Arterien (A) ist eine deutlich unterschiedliche Fluoreszenz an den einzelnen Schichten zu beobachten: die Tunica intima (TI) zeigt sich schwach, die Tunica externa (TE) stark reaktiv und die Tunica media weist keinerlei Anfärbung auf.

TUB = Tubulus seminiferus contortus

4.13. Bindungsstellen für *Phaseolus vulgaris E* Agglutinin (PHA E)

Bei der glykohistochemischen Untersuchung mit PHA E-FITC ist eine starke Fluoreszenz-Reaktion im Zytoplasma der Leydig-Zellen im intertubulären Gewebe zu entdecken. Diese Reaktion konzentriert sich in den meisten Zellen auf einen Pol. Nur in vereinzelt Leydig-Zellen ist die Reaktion homogen im Zytoplasma verteilt. In allen anderen Strukturen kann keine Reaktion hervorgerufen werden.

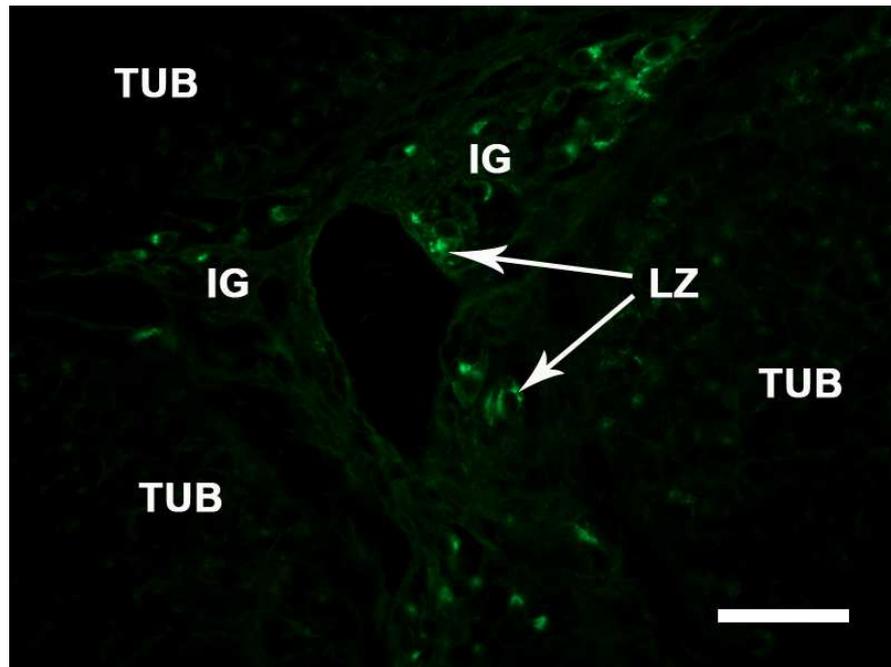


Abbildung 68: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.

Bindung von PHA E-FITC

SB = 50 μm

Die Leydig-Zellen (LZ) zeigen sich stark fluoreszierend. In den meisten Leydig-Zellen ist diese Reaktion auf einen Zellpol beschränkt, nur in einzelnen Zellen verteilt sich die Reaktion über das gesamte Zytoplasma.

TUB = Tubulus seminiferus contortus, IG = intertubuläres Gewebe

4.14. Bindungsstellen für *Phaseolus vulgaris* L Agglutinin (PHA L)

Für PHA L sind Bindungsstellen im Zytoplasma der Leydig-Zellen zu beobachten. Wie bei PHA E fällt diese Reaktion deutlich positiv aus und beschränkt sich in den meisten Leydig-Zellen auf einen Pol der Zelle. Es ist ebenfalls eine starke Fluoreszenz in der Tunica externa der größeren Arterien festzustellen. Dagegen ist in der Tunica media der Arterien eine nur schwache Anfärbung zu sehen. Das intertubuläre Gewebe, die peritubulären Zellen und das Zytoplasma der Sertoli-Zellen weisen eine schwach positive Reaktion mit PHA L auf.

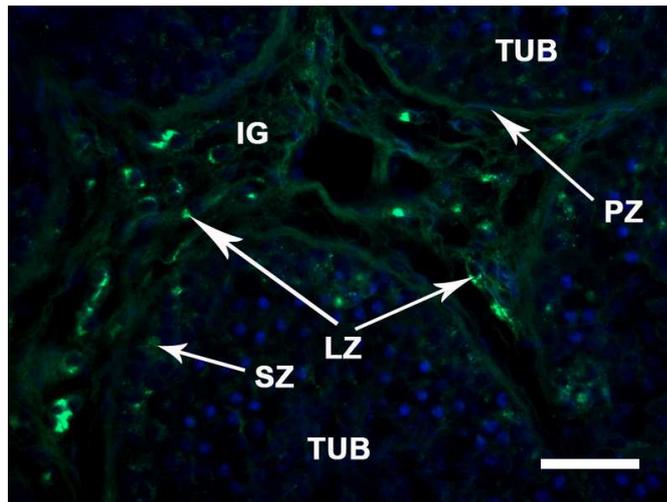


Abbildung 69: Hoden Strauß, Keimepithel und intertubuläres Gewebe.

Bindung von PHA L-FITC

SB = 50 μm

In den Leydig-Zellen (LZ) lassen sich Bindungsstellen für PHA L-FITC nachweisen, man erkennt eine starke Fluoreszenz meist nur an einem Pol der Zelle. Eine nur schwache Reaktion mit PHA L-FITC zeigen das intertubuläre Gewebe (IG), die peritubulären Zellen (PZ) und die Sertoli-Zellen (SZ).

TUB = Tubulus seminiferus contortus

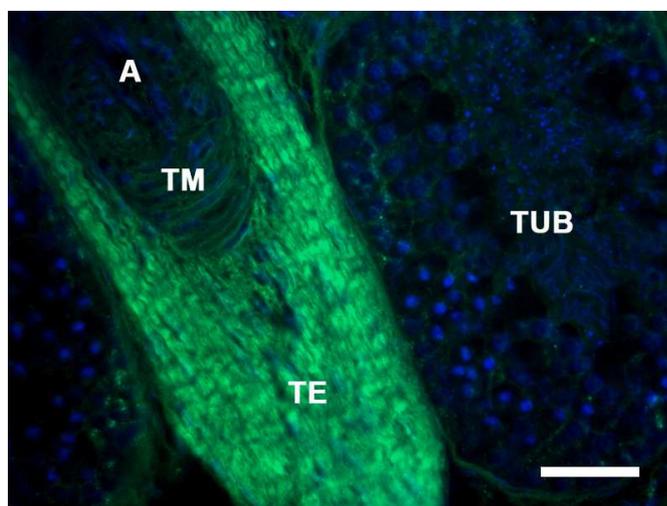


Abbildung 70: Hoden Strauß, Arterie im intertubulären Gewebe, Tubuli seminiferi contorti.

Bindung von PHA L-FITC

SB = 50 μm

In der Tunica externa (TE) der Arterie (A) finden sich viele Bindungsstellen für PHA L-FITC. Die Tunica media (TM) hingegen zeigt nur eine schwache Fluoreszenz.

TUB = Tubulus seminiferus contortus

4.15. Bindungsstellen für *Maacia amurensis* Agglutinin I (MAL-1)

Bei den untersuchten Schnitten des Straußes färben sich mit MAL-1-FITC ausschließlich vereinzelte Zellen im intertubulären Gewebe an. Alle übrigen Strukturen bleiben ohne Anfärbung.

4.16. Bindungsstellen für *Ulex europaeus* Agglutinin I (UEA-1)

Bei dem untersuchten Gewebe kann keinerlei positive Reaktion festgestellt werden. Somit können keine Bindungsstellen für UEA-1-FITC detektiert werden.

Tabelle 26: Übersicht über die Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen

Antikörper	Gewebestruktur												
	SZ	SG	PSP	SSP	SPT	SP	PZ	IG	LZ	GF			K
										TI	T M	TE	
ConA	+++	++	++	++	++	-	-	-	-/+	-	-	-	-
LCA	-	-	-	-	-	-	+ /+++	+	-	-	-	+++	-
PSA	+	+++	+++	+++	+++	-	-	+	-	-	-	-	-
RCA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
PNA	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GSL-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SBA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SJA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SNA	-	-/+	-	-	-	-	-	-/+	-	+	-	-	-
WGA	-	+++	+++	+++	+++	-	-	+ /+++	+++	+++	-	-	-
WGAs	-	+++	+++	+++	+++	-	+++	++	-	+	-	+++	-
PHA E	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
PHA L	+	-	-	-	-	-	+	+	+++	-	+	+++	-
MAL-1	-	-	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-
UEA-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MAL-1, SJA, SNA: biotinylierte Lektine

SZ = Sertoli-Zellen, SG = Spermatogonien, PSP = primäre Spermatozyten, SSP = sekundäre Spermatozyten, SPT = Spermatozyten, SP = Spermien, PZ = peritubuläre Zellen, IG = intertubuläres Gewebe, LZ = Leydig-Zellen, GF = Gefäße, TI = Tunica interna, TM = Tunica media, TE = Tunica externa, K = Kapsel

- = keine Anfärbung, + = schwache Anfärbung, ++ = mäßig bis mittelstarke Anfärbung, +++ = starke Anfärbung

5. Ultrastrukturelle Untersuchungen am Hoden des Straußes

5.1. Ultrastruktur des intertubulären Gewebes

Das zwischen den Tubuli seminiferi contorti liegende Gewebe enthält die Androgene produzierenden Leydig-Zellen. Diese liegen einzeln oder in Gruppen meist in der Nähe von Blutgefäßen. Die Leydig-Zellen sind rund bis polygonal geformt und besitzen einen zentral liegenden runden bis ovalen Zellkern. Dieser beinhaltet neben 1-4 deutlichen Nukleoli viel Euchromatin. Heterochromatin ist diffus im Kern verteilt. Im Zytoplasma finden sich viele Mitochondrien vom Tubulustyp sowie ein deutliches endoplasmatisches Retikulum. (vgl. Abbildung 71) In der Zellkernmembran ist zuweilen eine Kernpore sichtbar. (vgl. Abbildung 71)

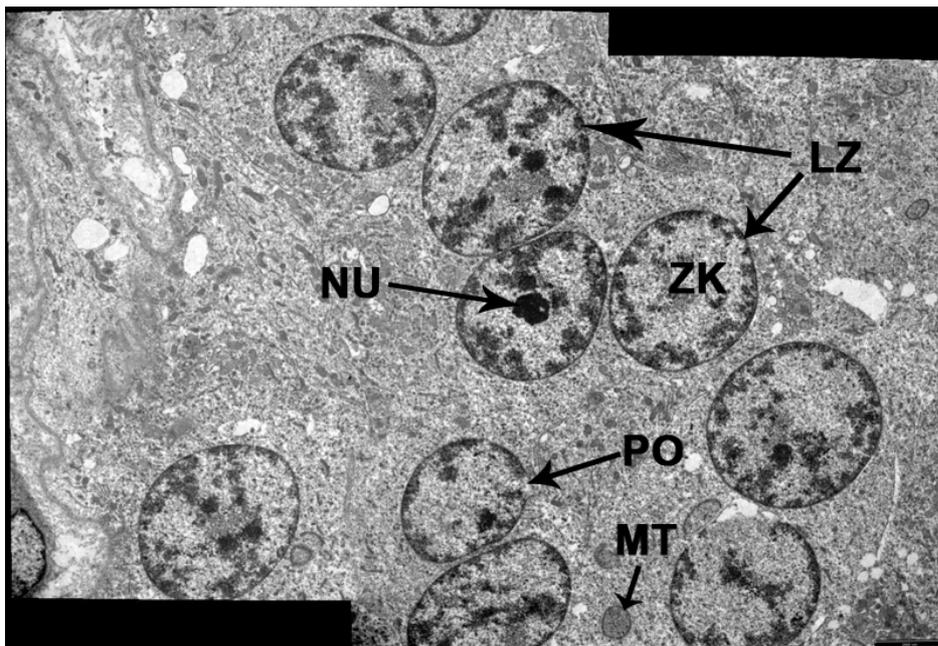


Abbildung 71: Hoden Strauß, Leydig-Zellen.

Transelectronenmikroskopische Aufnahme

SB = 2500 nm

Die Leydig-Zellen (LZ) sind einzeln oder in Gruppen im intertubulären Gewebe anzutreffen. Sie besitzen einen runden bis ovalen Zellkern (ZK). Man findet diffus verteiltes Heterochromatin und einen deutlichen Nukleolus (NU). In manchen Schnitten ist eine Kernpore (PO) sichtbar.

MT = Mitochondrien

5.2. Ultrastruktur der Basalmembran

Unter dem Elektronenmikroskop lässt sich die Basalmembran des Straußes in weitere Schichten unterteilen. Lumenwärts liegt die *Lamina basalis* (Basallamina), die aus einer Schichtung von dunkel erscheinenden *Laminae densae* und hell erscheinenden *Laminae lucidae* besteht. (vgl. Abbildung 72, Abbildung 73 und Abbildung 74) Aussen liegen der Basallamina kollagene Fasern an (vgl. Abbildung 72, Abbildung 73 und Abbildung 74). In der nächsten Schicht befinden sich die peritubulären Muskelzellen. Diese sind spindelförmig und besitzen einen länglichen Zellkern mit einem randständigen Heterochromatinsaum (vgl. Abbildung 72, Abbildung 73 und Abbildung 74). In Richtung intertubuläres Gewebe findet man eine weitere Schicht kollagener Fasern und anschließend Fibroblasten, die die Übergangsschicht zum intertubulären Gewebe darstellen. Diese besitzen wie die peritubulären Myofibroblasten eine spindelartige Form und längliche Fortsätze. Ihr Zellkern ist oval und reich an Euchromatin. An der inneren Kernmembran findet sich ein dünner Heterochromatinsaum. (vgl. Abbildung 75)

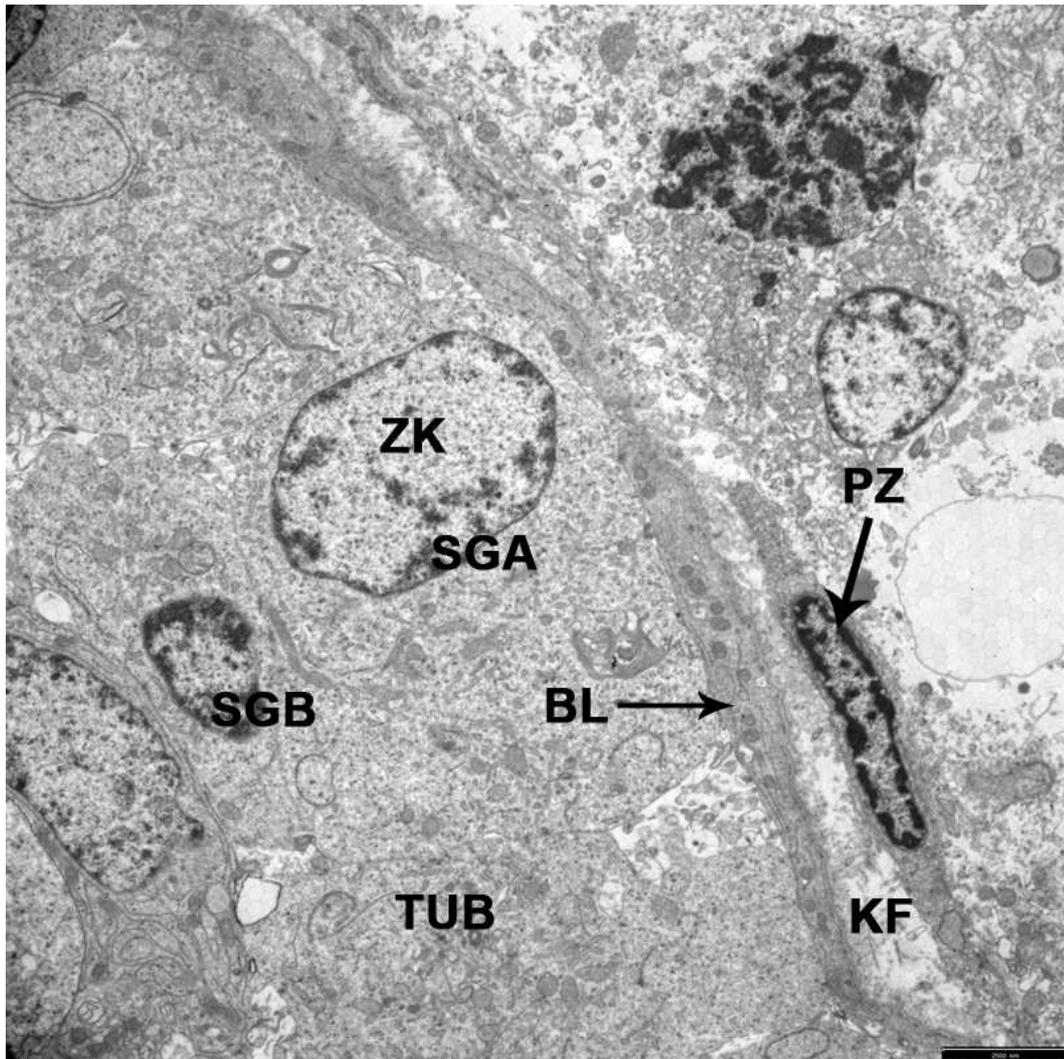


Abbildung 72: Hoden Strauß, Basalmembran.

Transelectronenmikroskopische Aufnahme

SB = 2500 nm

Die Basalmembran besteht aus verschiedenen Schichten. Die Tubulus-begrenzende Basallamina (BL) besteht aus Laminae densae (dunkel) und Laminae lucidae (hell). Der Basallamina anliegend findet man kollagene Fasern (KF) und peritubuläre Zellen (PZ). Im Tubulus seminiferus contortus (TUB) sind beide Spermatogonien-Stadien anzutreffen: die A-Spermatogonie (SGA) liegt der Basalmembran an und besitzt einen größeren Zellkern (ZK) als die B-Spermatogonie (SGB).

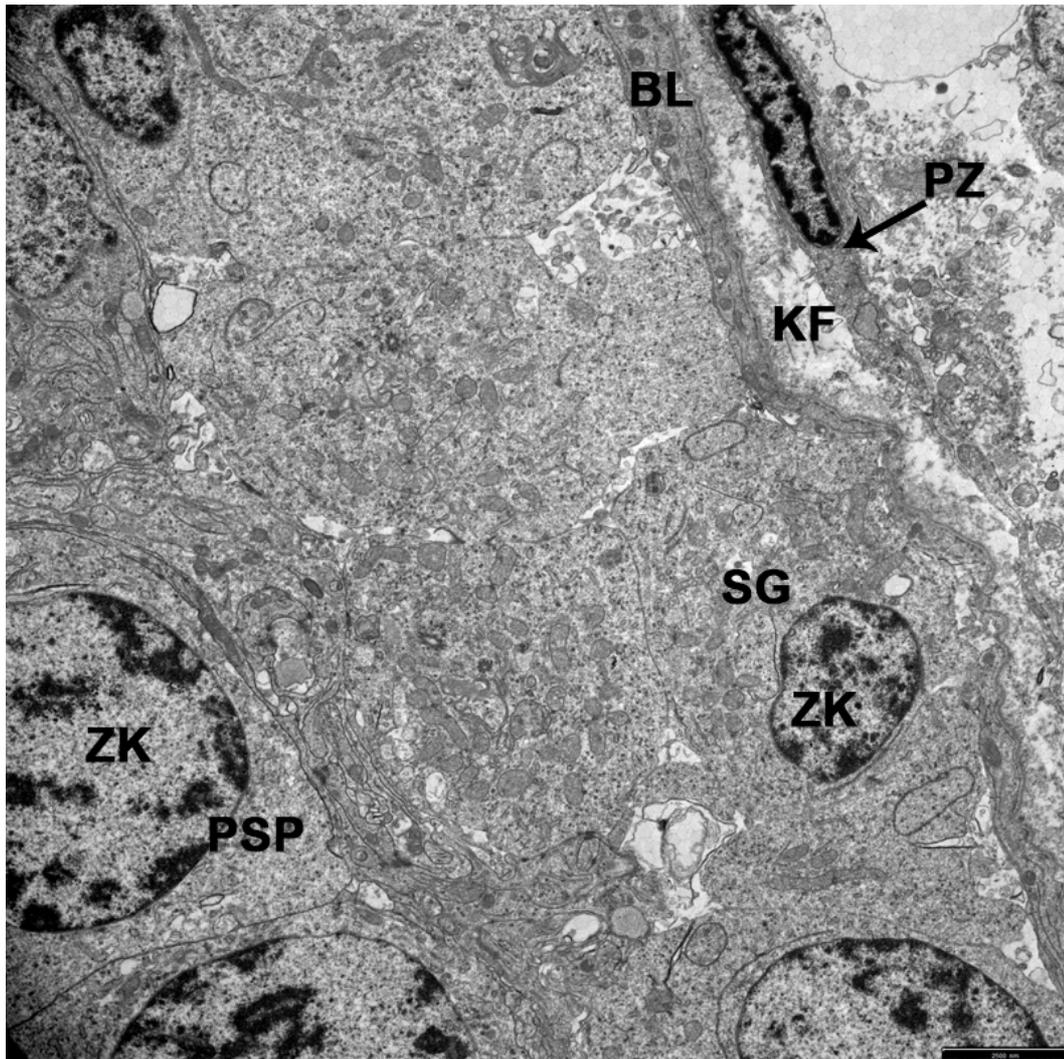


Abbildung 73: Hoden Strauß, Basalmembran, Spermatogonie und primäre Spermatozyten.

Transelectronenmikroskopische Aufnahme

SB = 2500 nm

Die Basalmembran begrenzt den Tubulus seminiferus contortus nach aussen. Der Basallamina (BL) lumenwärts anliegend findet man die Spermatogonien (SG), die sich zu den primären Spermatozyten (PSP) weiterentwickeln.

ZK = Zellkern, PZ = peritubuläre Zelle, KF = kollagene Fasern

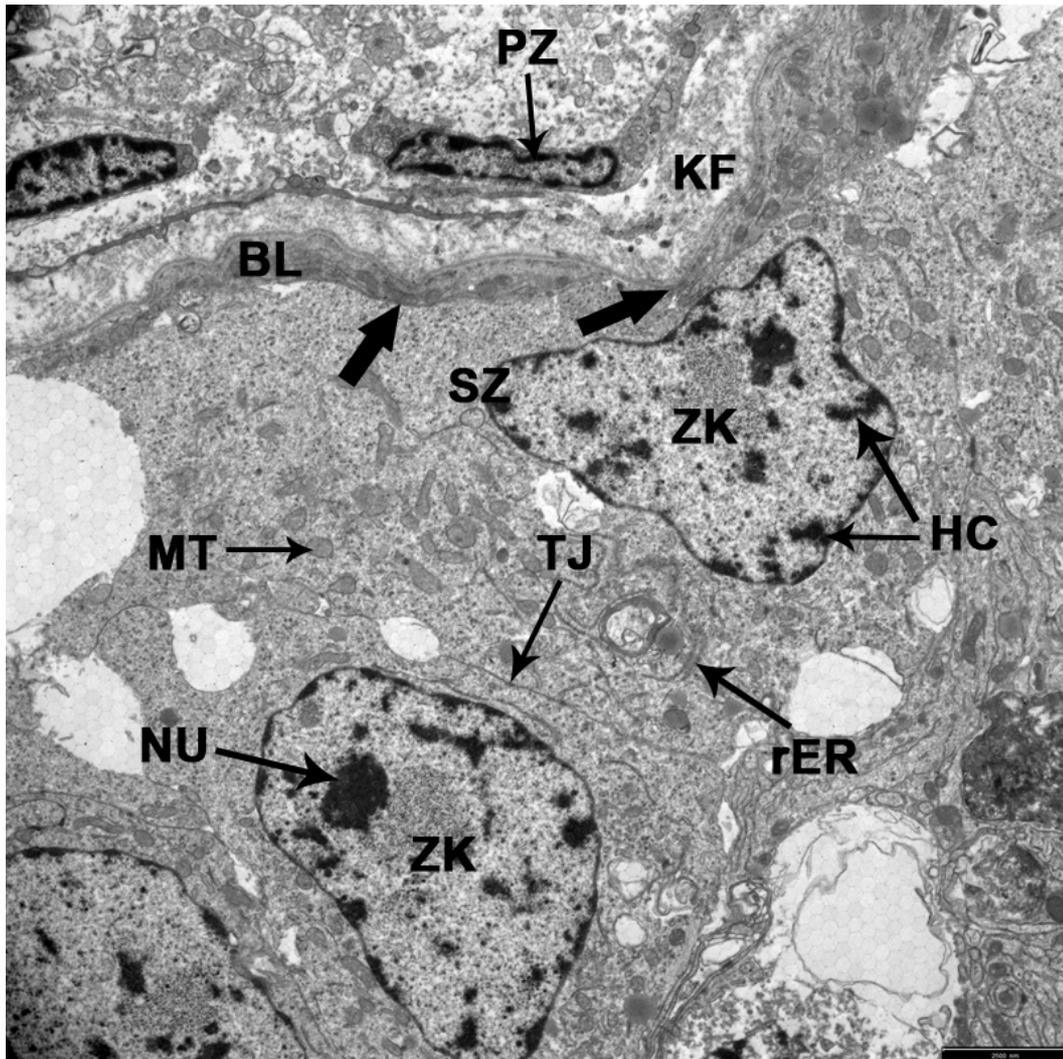


Abbildung 74: Hoden Strauß, Sertoli-Zellen und Basalmembran.

Transelectronenmikroskopische Aufnahme

SB = 2500 nm

Der Basalmembran anliegend sieht man die Sertoli-Zellen (SZ). In manchen Schnitten sind an dieser Stelle Einstülpungen (dicke Pfeile) der Basallamina (BL) sichtbar. Der Zellkern (ZK) der Sertoli-Zellen ist oval bis polygonal und enthält diffus verteilte Heterochromatin-Schollen (HC) und einen deutlichen Nukleolus (NU). Die Sertoli-Zellen stehen untereinander über tight junctions (TJ) in Verbindung.

rER = raues endoplasmatisches Retikulum, MT = Mitochondrium, KF = kollagene Fasern, PZ = peritubuläre Zelle

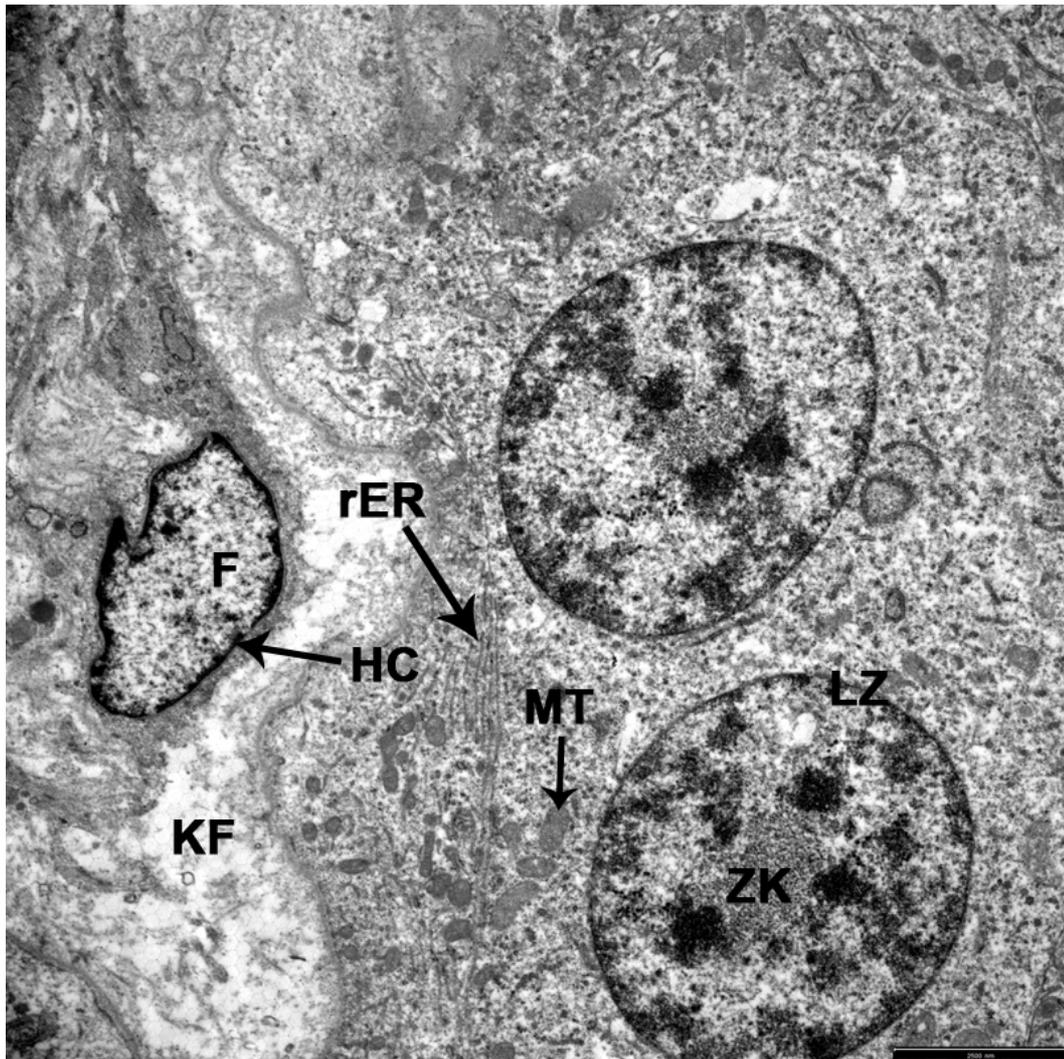


Abbildung 75: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe und Leydig-Zellen.

Transelectronenmikroskopische Aufnahme

SB = 2500 nm

Im intertubulären Gewebe finden sich Leydig-Zellen (LZ) und Fibrozyten (F). Diese besitzen einen Zellkern mit viel Euchromatin und einem dünnen Heterochromatinsaum (HC) an der inneren Kernmembran.

LZ = Leydig-Zelle, KF = kollagene Fasern, ZK = Zellkern, MT = Mitochondrium, rER = raues endoplasmatisches Retikulum

5.3. Ultrastruktur der Tubuli seminiferi contorti

Die Tubuli seminiferi contorti werden nach aussen begrenzt durch die Basalmembran. Der Basalmembran anliegend findet man die Sertoli-Zellen, die dem Keimepithel als Stützzellen dienen. Sie sitzen mit einer breiten Basis auf der Basallamina und entlassen Fortsätze zwischen die Keimzellen. Der Zellkern der

Sertoli-Zellen ist im basalen bzw. mittleren Drittel des Keimepithels zu finden. Er besitzt eine ovale bis polygonale Form und einen deutlichen Nukleolus (vgl. Abbildung 74). Neben viel Euchromatin beherbergt er einige diffus verteilte Heterochromatin-Schollen. Desweiteren findet man reichlich Mitochondrien, Lysosomen und raues endoplasmatisches Retikulum. Die Kommunikation der Sertoli-Zellen untereinander wird durch Zell-Zell-Kontakte, die sogenannten „tight junctions“, ermöglicht (vgl. Abbildung 74).

In die Fortsätze der Sertoli-Zellen eingebettet finden sich die Keimzellen in ihren unterschiedlichen Stadien. Die Spermatogonien sind runde Zellen und besitzen einen runden bis querovalen Zellkern. Die A-Spermatogonien liegen der Basalmembran an, wohingegen sich die B-Spermatogonien etwas weiter lumenwärts befinden. In den A-Spermatogonien ist der Zellkern deutlich größer und exzentrisch platziert, er besitzt viel Euchromatin und 1-2 Nukleoli (vgl. Abbildung 72). Im Gegensatz dazu ist der Zellkern der B-Spermatogonien kleiner und liegt im Zentrum der Zelle (vgl. Abbildung 72)

Weiter lumenwärts trifft man auf die Spermatozyten. Hierbei lassen sich die primären und die sekundären Spermatozyten unterscheiden. Die primären Spermatozyten sind die größten Zellen des Keimepithels und besitzen einen großen, runden Zellkern mit lockerem Chromatin (vgl. Abbildung 76). In manchen Schnitten ist eine Wellung der Zellmembran sichtbar (vgl. Abbildung 77). In einigen Zellkernen ist die Spiralisierung und Paarung der homologen Chromosomenpaare in der Prophase zu beobachten (vgl. Abbildung 77). In der 1. meiotischen Reifeteilung entstehen die sekundären Spermatozyten, die deutlich kleiner sind als ihre Vorgängerstufe und einen kleinen, runden Zellkern beherbergen. Dieser Zellkern enthält viel Euchromatin in der Mitte und ein randständiges Heterochromatingeflecht. Die Kernmembran zeigt sich in dieser Entwicklungsstufe immer noch gewellt. Die Anzahl der Mitochondrien ist deutlich geringer als in den primären Spermatozyten.

Die Spermatiden entwickeln sich in Folge der 2. meiotischen Reifeteilung aus den sekundären Spermatozyten. Diese sind kleine Zellen mit einem anfangs runden, später elongierten Zellkern. Dieser beinhaltet ein feines Chromatingeflecht und einem dünnen Heterochromatinsaum an der Kernmembran. An manchen Stellen ist eine Eindellung in der Kernmembran zu beobachten, in deren Nähe sich ausserhalb des Kerns die akrosomale Vakuole befindet. Diese Vakuole ist in der

Spermiogenese entstanden aus Vesikeln des Golgi-Apparates. Der Inhalt dieser Vakuole verdichtet sich zum akrosomalen Granulum, legt sich im Laufe der Kappenphase flach an den Zellkern an und bildet so die akrosomale Kappe, welche in der Akrosomen-Phase zum Akrosom des fertigen Spermiums wird. Zur gleichen Zeit verdichtet sich der Inhalt des Zellkernes ebenfalls und um ihn herum sammeln sich Mikrotubuli zu einer Manschette (vgl. Abbildung 81). In der folgenden Reifungsphase nehmen die einzelnen Anteile des Spermiums (Akrosom, Kopf und Schwanz) ihre endgültige Form an. In manchen Schnitten lassen sich die einzelnen Bestandteile des Spermischwanzes gut im Längs- und Querschnitt betrachten (vgl. Abbildung 80 und Abbildung 82).

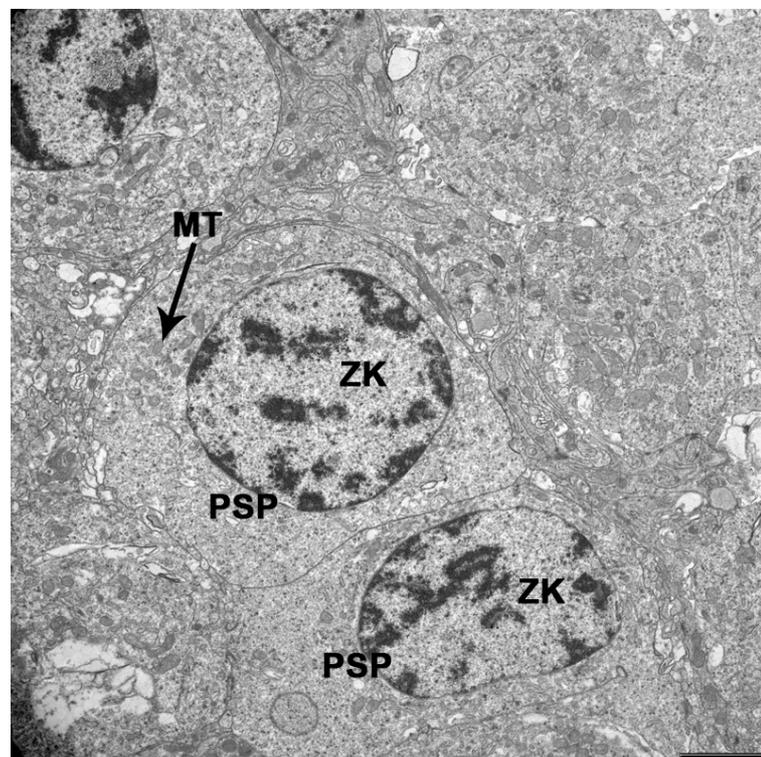


Abbildung 76: Hoden Strauß, primäre Spermatozyten.

Transelectronenmikroskopische Aufnahme

SB = 2500 nm

Die primären Spermatozyten (PSP) sind die größten Zellen im Keimepithel. Sie haben einen großen, runden Zellkern (ZK) mit lockerem Chromatin. Hier sind sie in der Prophase der 1. Reifeteilung zu sehen.

MT = Mitochondrien

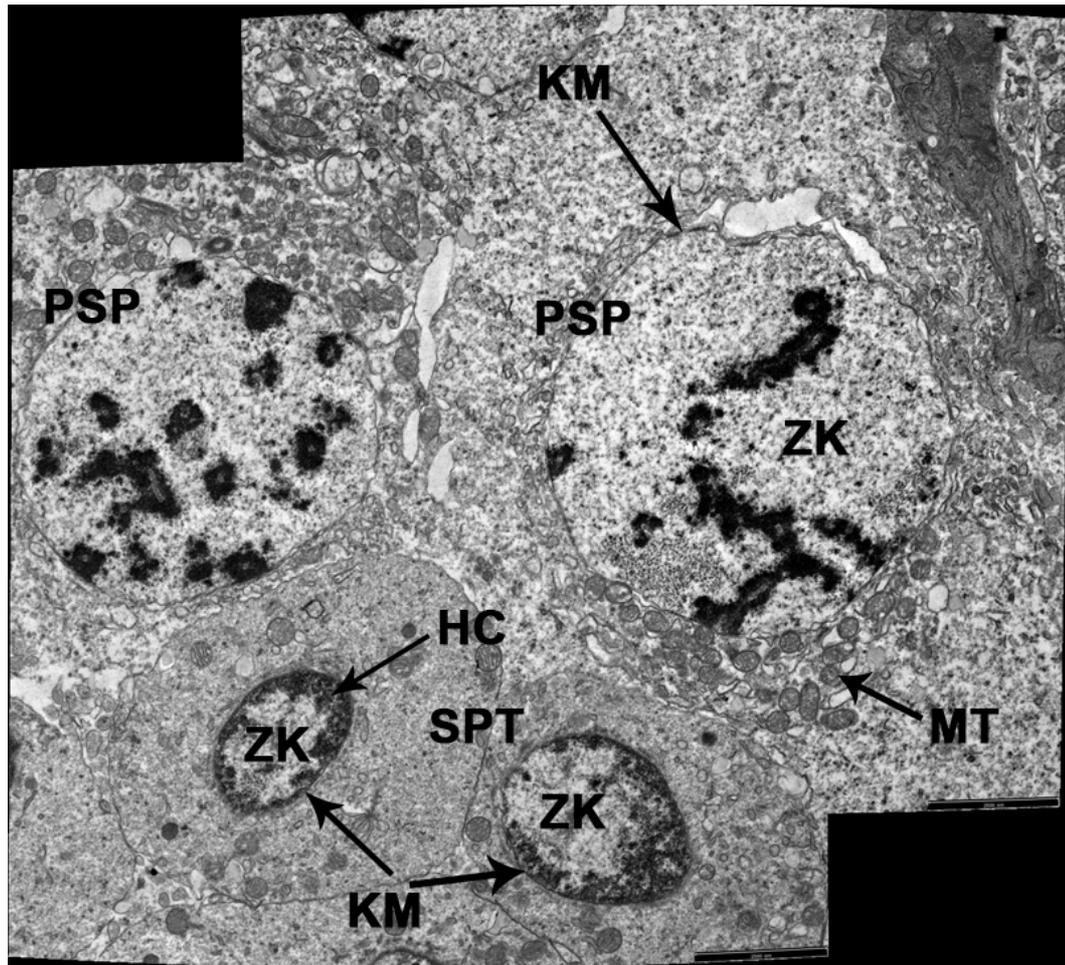


Abbildung 77: Hoden Strauß, primäre Spermatozyten und rundkernige Spermatisden.

Transelectronenmikroskopische Aufnahme

SB = 2500 nm

Die primären Spermatozyten (PSP) besitzen neben ihrem großen, runden Zellkern (ZK) viele Mitochondrien (MT). Hier sind sie in der Prophase der 1. Reifeteilung (Zygotän) zu beobachten. In manchen Schnitten ist eine Wellung ihrer Kernmembran (KM) zu sehen. Die frühen Spermatisden (SPT) haben einen deutlich kleineren, runden Zellkern (ZK) mit viel Euchromatin und einem zarten Heterochromatinsaum (HC) an der Kernmembran (KM). In manchen Schnitten ist eine Eindellung dieser Kernmembran zu sehen, in deren Nähe man ausserhalb des Zellkerns die akrosomale Vakuole findet.

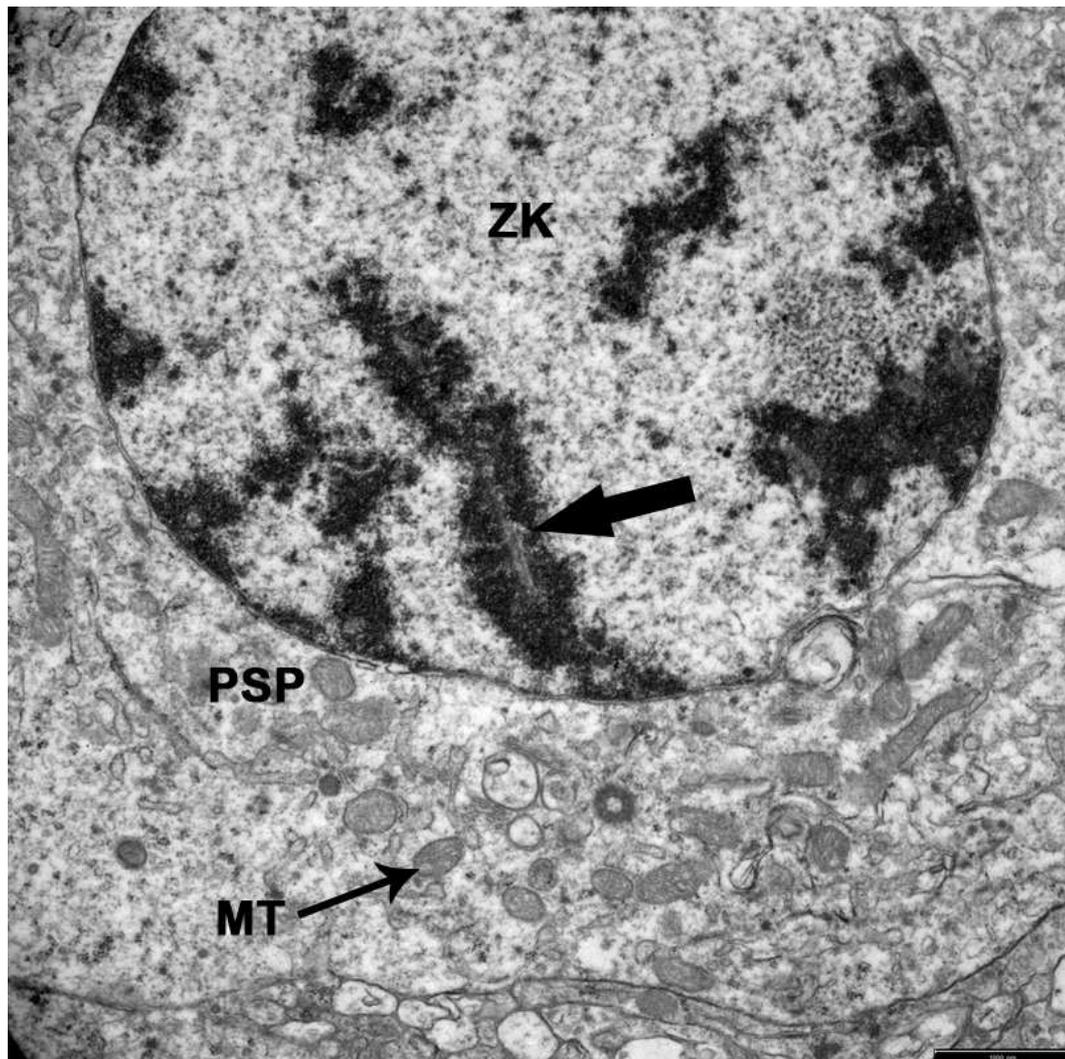


Abbildung 78: Hoden Strauß, primärer Spermatozyt.

Transelectronenmikroskopische Aufnahme

SB = 1000 nm

In einigen primären Spermatozyten (PSP) lässt sich die Spiralisierung und Paarung der homologen Chromosomenpaare (dicker Pfeil) während der Prophase der 1. Reifeteilung (Zygotän) beobachten.

ZK = Zellkern, MT = Mitochondrien

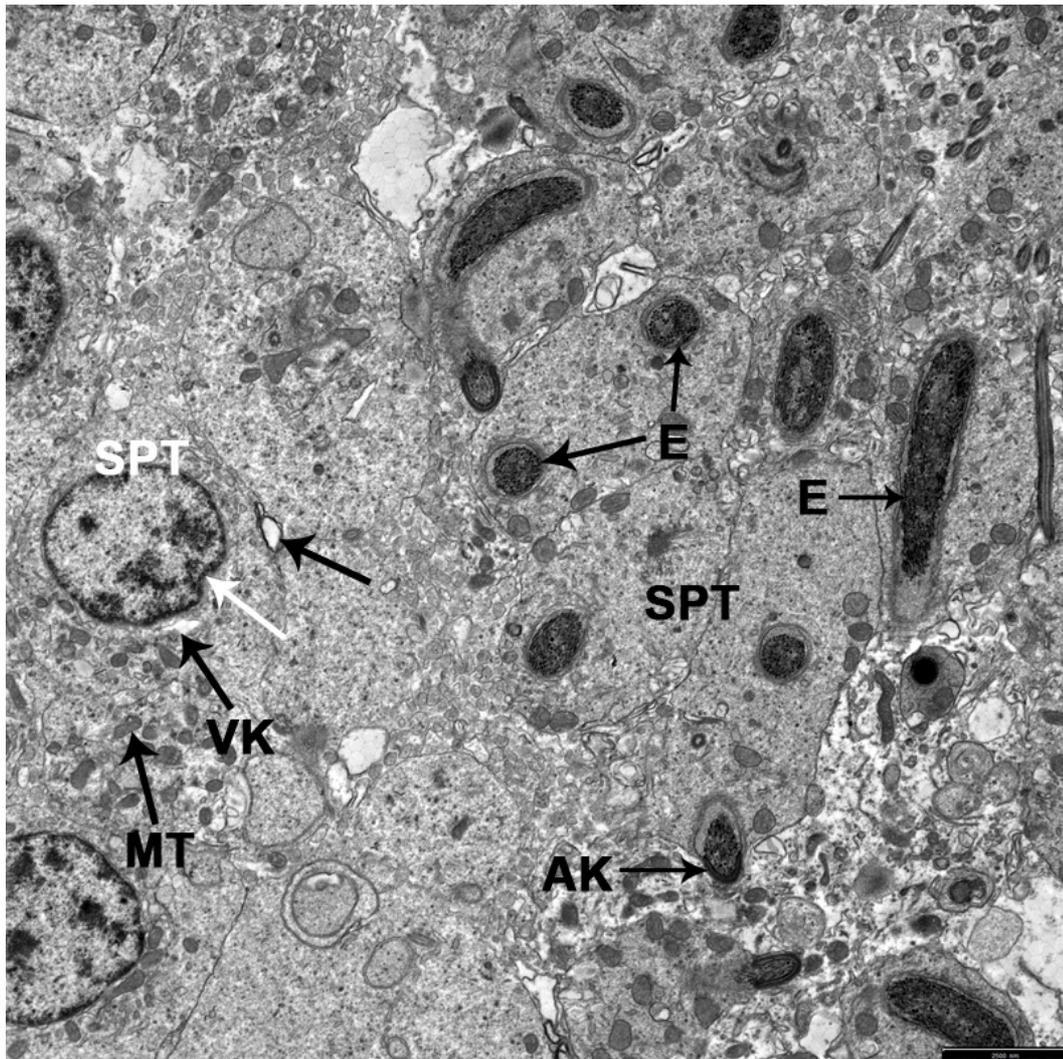


Abbildung 79: Hoden Strauß, Spermatiden.

Transelectronenmikroskopische Aufnahme

SB = 2500 nm

Die Spermatiden (SPT) besitzen einen zuerst runden, später elongierten (E) Zellkern. Die Spermatiden mit elongierten Zellkernen sind im Quer- und Längsschnitt zu sehen. Die Kernmembran der frühen Spermatiden ist an manchen Stellen (weißer Pfeil) eingedellt, meist findet sich in der Nähe davon die akrosomale Vakuole (VK). Diese wird im Laufe der Spermio-genese zur akrosomalen Kappe (AK) und später zum Akrosom. In manchen Bereichen ist eine zytoplasmatische Verbindung zwischen den Spermatiden zu sehen (schwarzer Pfeil).

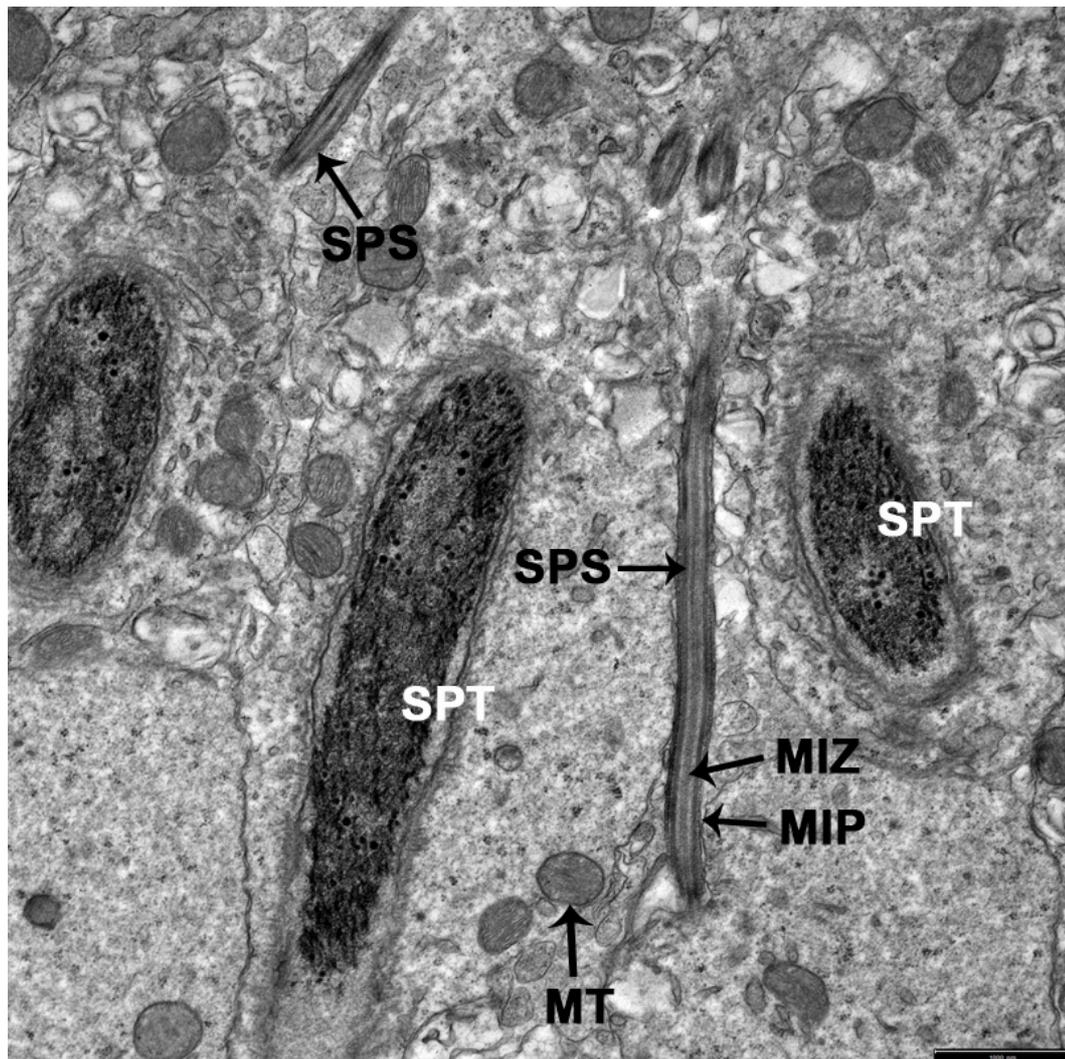


Abbildung 80: Hoden Strauß, Spermatisden und Spermischwanz.

Transelectronenmikroskopische Aufnahme

SB = 1000 nm

In einigen Schnitten sind die elongierten Spermatisden (SPT) im Längs- und im Querschnitt zu sehen. Im Längsschnitt der Spermischwänze (SPS) kann man das Axonema identifizieren, welches sich aus den zentralen (MIZ) und den peripheren (MIP) Mikrotubuli zusammensetzt.

MT = Mitochondrien

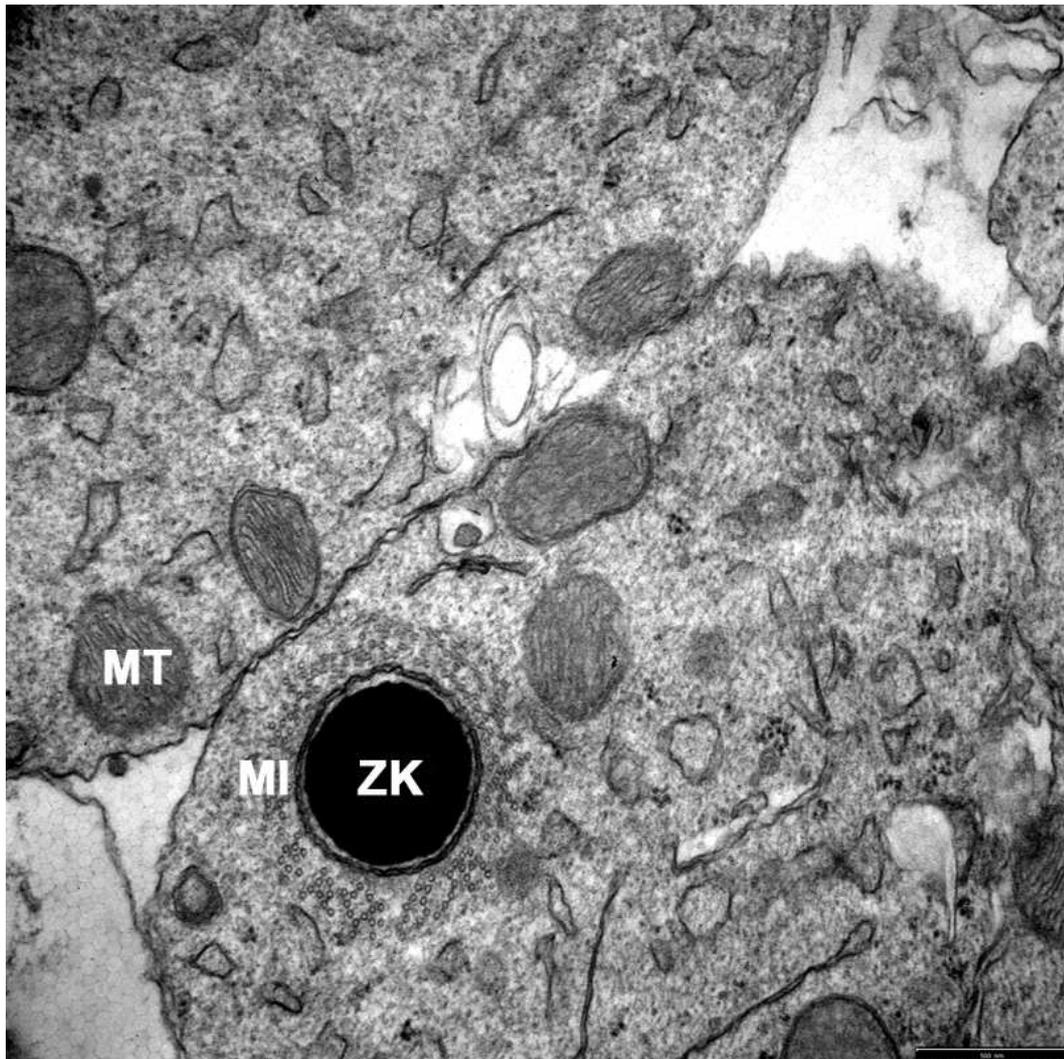


Abbildung 81: Hoden Strauß, Spermium.

Transelectronenmikroskopische Aufnahme

SB = 500 nm

Nach Kondensation des Spermium-Zellkerns (ZK) ist eine Mikrotubuli-Manschette (MI) um den Kern sichtbar.

MT = Mitochondrium

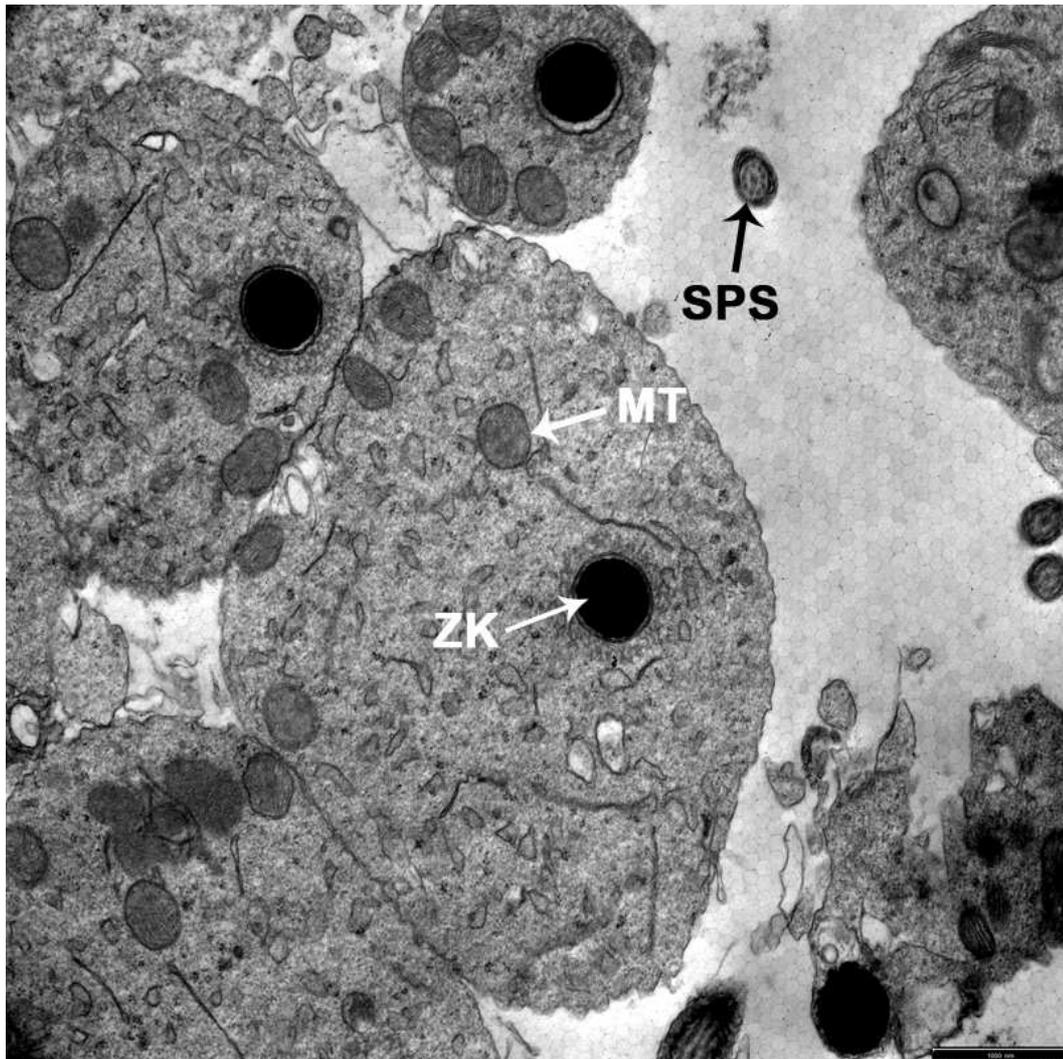


Abbildung 82: Hoden Strauß, Spermienkopf und Spermischwanz.

Transelectronenmikroskopische Aufnahme

SB = 1000 nm

Im Querschnitt des Spermiumschwanzes (SPS) ist die charakteristische 9x2+2-Anordnung der Mikrotubuli deutlich erkennbar.

ZK = Zellkern, MT = Mitochondrium

V. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde das Hodengewebe des Straußes (*Struthio camelus*) mit speziellen morphologischen Methoden untersucht. Hierbei wurden konventionelle Färbeverfahren, immunhistochemische, glykohistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungsmethoden einbezogen. Die Auswertung erfolgte mittels Licht- und Elektronenmikroskopie. Das Untersuchungsmaterial stammte von geschlechtsreifen, männlichen afrikanischen Straußen, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme ca. 15 Monate alt waren. Die zehn untersuchten Tiere waren klinisch frei von Krankheitsmerkmalen.

Die Hoden der untersuchten Straußenhähne lagen wie bei allen Vögeln in der Leibeshöhle zwischen Lunge und Niere. An der dorsalen Wand der Leibeshöhle waren sie mit einem kurzen Gekröse aufgehängt. (Freund 1917; Lake 1957) Sie besaßen eine bohnen- bzw. strangförmige Gestalt. Diese Beschreibung der Form deckt sich nur teilweise mit der Hodenform bei Vögeln in der Literatur: Hummel benennt sie ebenfalls als bohnenförmig, wohingegen bei Waibl und Sinowatz die Form als oval-eiförmig bis rund beschrieben wird. (Hummel 2000; Waibl und Sinowatz 2004) Diese nur geringfügig voneinander abweichenden Angaben lassen sich auf saisonbedingte bzw. jahreszeitliche Formveränderung zurückführen. Die linken Hoden sind bei den untersuchten Straußen mit einer durchschnittlichen Länge von 8,8 cm und einer durchschnittlichen Breite von 3,0 cm größer als die rechten Hoden (durchschnittliche Länge 7,6 cm und durchschnittliche Breite 2,6 cm). Beim Kanarienvogel maß Freund im Jahr 1917 beim linken Hoden eine Länge von 0,75 cm und eine Breite von 0,65 cm und beim rechten Hoden eine Länge von 0,60 cm und eine Breite von 0,55 cm. Beim Vergleich dieser beiden Vogelarten fällt auf, dass der Kanarienvogel im Bezug auf die Körpergröße deutlich größere Hoden als der Strauß besitzt. Marshall führt als mögliche Ursache die Zahl der Nachkommen der verschiedenen Vogelarten an. Er erwähnt hierzu als Beispiel den Vergleich zwischen Meise und Falke; die Meise besitzt relativ zur Körpergröße größere Hoden und zeugt auch mehr Nachwuchs als der Falke. (Marshall 1895) Die untersuchten Straußenhoden waren einheitlich gelblich-weiß gefärbt. Dieses Ergebnis stimmt nur bedingt mit den bisherigen Ergebnissen bei Vogelhoden überein: Waibl und Sinowatz sowie König und Liebich beschreiben die Farbe der Vogelhoden ebenfalls als einheitlich gelblich-

weiß, wohingegen Hummel eine Änderung der Farbe von gelblich zu weiß – bedingt durch sexuelle Aktivitätsänderung – erwähnt. (Waibl und Sinowatz 2004; König und Liebich 2001; Hummel 2000) Salomon zeigt ebenfalls eine Farbänderung auf, von gelblich zu grauweiß. (Salomon 1993) Die untersuchten Straußenhoden zeigten sich alle im Stadium der frühen sexuellen Aktivität, daher könnte die einheitliche Gelblich-Weiß-Färbung darauf zurückzuführen sein. Eine von mehreren Autoren erwähnte häufige Pigmentierung der Vogelhoden konnte bei keinem der untersuchten Straußenhoden festgestellt werden. (Bittner 1925)

Wie bei allen Vögeln umgibt die Hodenkapsel den Straußenhoden und von ihr ausgehend ziehen dünne Bindegewebsstränge in das Hodenstroma. Die Literatur stimmt ebenfalls mit diesen Erkenntnissen überein, dass eine Aufteilung in Septen und ein Mediastinum testis bei Vögeln – und auch beim Strauß – nicht zu finden ist. (Huber 1916; Lake 1957; Waibl und Sinowatz 2004; Wei et al. 2007) Lake beschreibt eine damit verbundene weichere Konsistenz des Hahnhodens im Vergleich zu Säugerhoden. (Lake 1957) Im Gewebe zwischen den Tubuli seminiferi contorti sind die Leydig-Zellen lokalisiert. Sie liegen einzeln oder in Gruppen, oft in Blutgefäßnähe. Die Leydig-Zellen des Straußes lassen sich beschreiben als längliche bis polygonale Zellen. Bei der Wachtel werden die Leydig-Zellen in einer Arbeit von Nicholls und Graham als kugelig-eiförmig definiert. (Nicholls und Graham 1972) Rothwell bezeichnet die Form der Leydig-Zellen beim Hahn ähnlich den Ergebnissen dieser Arbeit als unregelmäßig polygonal. (Rothwell 1973) Laut Waibl und Sinowatz ändert sich die Form abhängig von sexueller Aktivität von schmal zu polygonal. (Waibl und Sinowatz 2004) In einer aktuelleren Studie von Tae et al. wird beim Fasan nach der Brutsaison eine Volumensabnahme der Leydig-Zellen um 74 % beschrieben. (Tae et al. 2005) Somit lässt sich die Vermutung anstellen, dass sich etwaige geringe Formveränderungen auf sexuelle Aktivitätsänderungen zurückführen lassen. Der Kern der Leydig-Zelle liegt beim Strauß zentral und ist rund bis oval. Diese Form wird in den bereits erwähnten Studien von Bakst et al. für die Pute, Rothwell für den Hahn sowie Aire zusätzlich für Perlhuhn, Ente und Wachtel ähnlich beschrieben. Im Zellkern sind beim Strauß 1-4 Nukleoli zu sehen, beim Hahn und der Wachtel konnte hingegen nur ein Nukleolus identifiziert werden. (Bakst et al. 2007; Rothwell 1973; Aire 1997; Nicholls und Graham 1972) Die Tubuli seminiferi contorti des Straußes werden nach aussen hin begrenzt von der

Basalmembran. Diese besteht wie bei allen Vögeln aus der Basallamina, peritubulären Zellen und kollagenen Fasern. (Rothwell und Tingari 1973; Waibl und Sinowatz 2004; Aire und Ozegbe 2007; Bakst et al. 2007) Der Basalmembran anliegend findet man die Sertoli-Zellen, die eine breite Basis besitzen und Richtung Lumen schlanker werden. Beim Strauß beherbergen sie einen ovalen bis polygonalen Zellkern. In dessen Inneren ist ein deutlicher Nukleolus sichtbar. Diese Beschreibung der Sertoli-Zellen trifft ebenfalls bei anderen Vogelarten zu. (Thurston und Korn 2000; Cooksey und Rothwell 1973; Guibert et al. 2011) Neben den Sertoli-Zellen findet man an der Basalmembran die Spermatogonien. Während die A-Spermatogonien an der Basalmembran verbleiben, werden die B-Spermatogonien etwas weiter Richtung Tubuluslumen verlagert. Beide Entwicklungsstadien besitzen beim Strauß eine runde bis querovale Form. Bei Waibl und Sinowatz werden die A-Spermatogonien der Vögel als rundliche Zellen bezeichnet, wohingegen Salomon die Spermatogonien als elliptisch geformt beschreibt. (Waibl und Sinowatz 2004; Salomon 1993) Bei der Pute charakterisieren Bakst et al. die Form der Spermatogonien als weitestgehend kubisch. (Bakst et al. 2007) Bei den untersuchten Straußen ist ein runder Zellkern der A-Spermatogonien exzentrisch liegend zu sehen, der ebenfalls runde Zellkern der B-Spermatogonien befindet sich mittig in der Zelle. Im Innern des Zellkernes sind ein bis zwei Nukleoli sichtbar. In der bereits erwähnten Arbeit über Putenhoden beschreiben Bakst et al. den Kern der A-Spermatogonien als rund bis oval mit 0 bis 3 Nukleoli und den Zellkern der B-Spermatogonien als rund bis pleomorph mit einem oder mehreren Nukleoli. (Bakst et al. 2007) Das nächste Stadium der Keimzellen sind die primären Spermatozyten. Diese Zellen sind beim Strauß und allen anderen Vögeln die größten aller Keimzellen und besitzen einen großen Zellkern. (Zlotnik 1947; Waibl und Sinowatz 2004) Aus den primären Spermatozyten entwickeln sich die sekundären Spermatozyten, welche bei allen Vögeln deutlich kleiner als ihre Vorgänger sind und einen kleinen runden Zellkern besitzen. (Zlotnik 1947; Waibl und Sinowatz 2004) Die aus den sekundären Spermatozyten hervorgehenden Spermatischen sind im luminalen Drittel der Tubuli seminiferi contorti zu sehen. Diese Zellen zeigen sich beim Strauß und den anderen Vögeln als die kleinsten Zellen des Keimepithels. (Nagano 1962; Waibl und Sinowatz 2004) Im Laufe der Spermio-genese entwickeln sich die Spermatischen zu den Spermien. Hierbei ist in den untersuchten Straußenhoden eine Veränderung der Form des Kerns von rund zu länglich zu

beobachten. Im Folgenden entsteht das fertige Spermium mit Akrosom, Kopf und Schwanz.

Die immunhistochemischen Untersuchungen in dieser Arbeit wurden mithilfe der ABC-Methode durchgeführt. Hierbei wurden Antikörper zum Nachweis von α -SMA, Desmin, Vimentin, Panzytokeratin, Myosin, Tubulin, Connexin, Cyclooxygenasen, sowie zum Nachweis von Östrogen- und Androgenrezeptoren verwendet. α -SMA wird in glatten Muskelzellen, Myoepithelzellen und Myofibroblasten exprimiert. Im untersuchten Hodengewebe des Straußes konnte α -SMA in den peritubulären Zellen und in Fibrozyten im intertubulären Gewebe nachgewiesen werden. Eine positive Reaktion konnte ebenfalls in der Tunica media der Gefäße und in einzelnen Fibrozyten innerhalb der Hodenkapsel beobachtet werden. Diese Ergebnisse decken sich mit bisherigen Ergebnissen zum Hodengewebe beim Hahn, Wachtel, Pute, Ente, Taube und einigen Papageienvögeln (Kakadu, Afrikanischer Graupapagei, Ara, Amazonenpapagei und Wellensittich). (Maretta und Marettova 2004; Aire und Ozegbe 2007; Abd-Elmaksoud 2009; Madekurozwa 2013; Reitemeier 2014) Befunde von Aire und Ozegbe sowie Abd-Elmaksoud, dass nur die inneren Zelllagen der Kapsel eine positive Reaktion aufweisen, konnte in dieser Studie beim Strauß nicht nachvollzogen werden. (Aire und Ozegbe 2007) (Abd-Elmaksoud 2009) In einer Arbeit von Reitemeier aus dem Jahr 2014 gelang der Nachweis von α -SMA in den Keimzellen bei Papageienvögeln (Kakadu, Afrikanischer Graupapagei, Ara, Amazonenpapagei und Wellensittich) und in den Leydig-Zellen beim Wellensittich. (Reitemeier 2014) Im Gegensatz dazu zeigten weder die Keimzellen noch die Leydig-Zellen des Straußes eine positive Reaktion. Ein Nachweis von Desmin gelingt in Zellen glatter und quergestreifter Muskulatur sowie in Herzmuskelzellen. In der vorliegenden Arbeit konnte dementsprechend eine deutlich positive Reaktion in den Muskelzellen der Tunica media der Gefäße detektiert werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den bisherigen Ergebnissen bei anderen Vogelarten wie folgt: Maretta und Marettova sowie Madekurozwa erwähnen ebenfalls ein Vorkommen von Desmin in der Gefäßwand von Huhn und Wachtel. (Maretta und Marettova 2004; Madekurozwa 2013) Eine Expression von Desmin in der Kapsel und im peritubulären Gewebe – wie von Aire und Ozegbe bei Huhn, Wachtel, Ente und Pute beschrieben – konnte in der vorliegenden Arbeit für den Strauß nicht bestätigt werden. (Aire und Ozegbe 2007) Das

Intermediärfilament Vimentin ist laut Literatur u.a. in Bindegewebs-, Fett-, Knorpel-, Knochenzellen, Gefäßendothelien, Mesothel und Meningealzellen zu finden. (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012) Im Hodengewebe des Straußes konnte es in einigen Strukturen detektiert werden. Es gelang ein Nachweis in den Fibrozyten der Kapsel und des intertubulären Gewebes, in den Leydig-Zellen, in den Endothelzellen der Gefäße sowie im Zytoplasma der Sertoli-Zellen. Diese Erkenntnisse stimmen mit den bisherigen Studien am Hodengewebe von Wachtel und Pute überein. (Aire und Ozegbe 2007; Madekurozwa 2013) Die Sertoli-Zellen haben unter anderem die Aufgabe, dem Keimepithel Stabilität zu verleihen. Laut Eckes et al. (1998) zeigen Vimentin-lose Zellen eine reduzierte mechanische Stabilität, Motilität und Migrationsfähigkeit. (Eckes et al. 1998) Das Vorhandensein von Vimentin in den Sertoli-Zellen beim Strauß bestätigt deren Stützfunktion. Zytokeratine sind mittels eines Panzytokeratin-Antikörpers in allen Epithelzellen und Zellen epithelialen Ursprungs auffindbar. (Büttner und Thomas 2003) In den untersuchten Hodenschnitten färbten sich einige Zellen im intertubulären Gewebe. In den Leydig-Zellen erfolgte eine Anfärbung nach unterschiedlichem Muster: in manchen Schnitten sieht man eine deutliche Reaktion in vielen Leydig-Zellen, in manchen Schnitten wurden Zytokeratine nur in einzelnen Leydig-Zellen nachgewiesen. Laut Stosiek et al. (1990) fehlen Zytokeratine beim adulten Menschen in den Sertoli-Zellen, im unentwickelten Hodengewebe sind sie noch nachweisbar, so dass sie als Marker für unreifes Gewebe dienen. (Stosiek et al. 1990) In einer Arbeit von Rogatsch et al. werden diese Erkenntnisse bestätigt. (Rogatsch et al. 1996) Diese Tatsache lässt die Vermutung zu, dass Zytokeratine im Laufe der Entwicklung zum erwachsenen Individuum in manchen Zellen weniger werden und letztendlich nicht mehr nachzuweisen sind. Da es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Straußen um bereits geschlechtsreife, aber noch junge Strauße handelt, könnte es sich bei den einzelnen Zytokeratin-positiven Leydig-Zellen als „Reste“ der Entwicklung vom fetalen zum adulten Tier handeln. Um diese Tatsache zu prüfen, wäre es sinnvoll, das Vorhandensein von Zytokeratinen im Hodengewebe deutlich jüngerer und älterer Tiere zu untersuchen. Eine homogen schwache Anfärbung mit Zytokeratin-Antikörpern kann in den Gefäßwänden beobachtet werden, zusätzlich findet man mäßig bis stark reaktive Zellen in der Tunica externa. Die Zytokeratine dienen hier vermutlich der mechanischen Stabilisierung der Gefäße im Hodengewebe. Myosin dient einer Zelle als Motorprotein, es ist ein Teil des Zytoskeletts. Es ist

zu finden in Zellen glatter Muskulatur und Skelettmuskulatur. (Silbernagl und Despopoulos 2003) Beim Strauß findet sich eine schwach positive Reaktion mit Myosin-Antikörpern in der Tunica media der Gefäße, wohingegen sich eine starke Anfärbung in den peritubulären Zellen zeigt. Ebenfalls sind deutlich positiv reagierende Zellen in der Kapsel und im intertubulären Gewebe zu detektieren. Zusätzlich zeigt sich in vereinzelt Tubuli seminiferi contorti eine Anfärbung im Zytoplasma von Sertoli-Zellen und rundkernigen Spermatozyten. In der vorliegenden Literatur wird ausschließlich ein Vorkommen von Myosin in den peritubulären Myofibroblasten des menschlichen Hodengewebes in einer Arbeit von Holstein et al. beschrieben. (Holstein et al. 1996) Tubulin ist ein Teil der Mikrotubuli und somit auch Bestandteil des Zytoskeletts. Im Hodengewebe des Straußes findet man Tubulin im Zytoplasma der Sertoli-Zellen und im Spermium. Diese Ergebnisse stimmen mit Studien bei Maus (Sertoli-Zellen und Spermium), Mensch (Spermium), Schwein (Spermium) und Rind (Sertoli-Zellen) überein. (Fouquet et al. 1997; O'Donnell und O'Bryan 2014; Prigent et al. 1996; Little et al. 1983; Wrobel et al. 1995) In der vorliegenden Arbeit gelang ein Nachweis von Tubulin zusätzlich in den Endothelzellen der Gefäße. Connexine ermöglichen als Bausteine der „gap junctions“ einen Austausch von Signalstoffen, Nährstoffen und Ionen zwischen Zellen. (Karlson et al. 2005) Nieschlag et al. sprechen Connexin-43 eine wichtige Rolle bei der Reifung und Steuerung der Sertoli-Zellen zu. (Nieschlag et al. 2009) Bei den untersuchten Straußen konnte Connexin in Leydig-Zellen und in vereinzelt Sertoli-Zellen detektiert werden. Risley et al. wiesen Connexin-43 ebenfalls in Leydig-Zellen und Sertoli-Zellen nach, aber zusätzlich auch in Spermogonien, Spermatozyten und in peritubulären Zellen von Ratten und Mäusen. (Risley et al. 1992) Zusätzlich konnte in der vorliegenden Studie eine Reaktion im Gefäßendothel beobachtet werden. Die Cyclooxygenasen gehören zu einer Gruppe von Enzymen, die sich an der Prostaglandinsynthese beteiligen. (DeWitt und Smith 1995) Cox-1 kommt in den meisten Zellen vor, Cox-2 jedoch erst durch Beteiligung von Entzündungsmediatoren. (Löscher et al. 2014) In den untersuchten Schnitten gelang ein Nachweis von Cox-1 in den Spermatozyten. Cox-2 konnte im Zytoplasma der Sertoli-Zellen und der Leydig-Zellen gefunden werden. Die Tunica media und Tunica intima der Gefäße zeigen sich ebenfalls positiv. Frungieri et al. bestätigen eine Expression von Cox-2 in den Leydig- und den Sertoli-Zellen der Maus. (Frungieri et al. 2015) Balaji et al. schreiben Cox-2

aufgrund ihres Vorkommens in den Leydig-Zellen des Mäusehodens eine gewisse Rolle bei der Testosteronsynthese zu. (Balaji et al. 2007) Diese These kann durch die bereits erwähnte Expression von Cox-2 in den Leydig-Zellen des Straußes bekräftigt werden. Durch das Vorkommen von Cox-2 in den Sertoli-Zellen und der Gefäßwand könnte man eine zusätzliche Beteiligung von Prostaglandinen auch bei anderen Vorgängen im Hoden wie der Keimzellbildung und der Testosteron-Freisetzung in die Blutbahn vermuten. Die Rolle von Cox-2 bei diesen Vorgängen bedarf weiterer Untersuchungen. Auch beim weiblichen Strauß wurden bereits Unterschiede zu anderen Vogelarten nachgewiesen: In einer aktuellen Studie von Rodler und Sinowatz aus dem Jahr 2015 wurde in Ovarien von Straußen ein Expressionsmuster von Cox-1 und Cox-2 detektiert, welches sich sehr stark von dem des Huhnes unterscheidet. Aufgrund dieser Tatsache vermuten die Autoren, dass beim Strauß – im Gegensatz zum Huhn – die Cyclooxygenasen nicht in die Vorgänge der Ovulation und der Oviposition involviert sind. (Rodler und Sinowatz 2015) Östrogene werden im Hoden von den Sertoli-Zellen, den Leydig-Zellen und den Keimzellen synthetisiert und steuern die Resorption von Flüssigkeit im Tubuluslumen. (Hess et al. 1997; Hess et al. 2001) In der vorliegenden Studie wurde ausschließlich das Vorhandensein von ER α im Straußenhoden untersucht. ER α gehört zu den Rezeptoren für Östrogene im Gewebe. (Schmidt und Lang 2007) Untersuchungen mit männlichen ER α -Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass ER α essentiell für die Fertilität sind. (Hess et al. 2001) In der vorliegenden Studie gelang der Nachweis von ER α im Hodengewebe des Straußes ausschließlich in vereinzelt Leydig-Zellen. Mit diesem Ergebnis stimmen die Ergebnisse von Reitemeier (2014) bei Kakadu und Ara überein, beim Afrikanischen Graupapagei, dem Amazonenpapagei und dem Wellensittich wurde keine positive Reaktion in den Leydig-Zellen beobachtet. Reitemeier beschreibt außerdem ein Vorkommen von ER α in den Keimzellen und in den Gefäßen bei verschiedenen Papageienvögeln. (Reitemeier 2014) Beim Strauß konnten diese Beobachtungen nicht nachvollzogen werden. Interessant wäre es, das Straußengewebe auf die Expression von ER β zu untersuchen, um alle Wirkungsstätten von Östrogenen im Straußenhoden zu definieren. Testosteron sowie andere Androgene sind männliche Sexualhormone. Ein Wirken dieser Hormone setzt das Vorhandensein spezifischer Rezeptoren voraus. Im untersuchten Gewebe ist eine schwache Reaktion in der Tunica interna und Tunica media der Gefäße zu sehen. Reitemeier konnte Androgenrezeptoren

ebenfalls in den Gefäßen des Afrikanischen Graupapageis und des Amazonenpapageis nachweisen. (Reitemeier 2014) Für die übrigen Strukturen des Hodengewebes bei Vögeln beschreibt die bisherige Literatur sehr unterschiedliche Ergebnisse: Leska et al. und Dornas et al. gelang der Nachweis in den Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen und den myoiden Zellen von Gans und Huhn (Leska et al. 2012; Dornas et al. 2008), Reitemeier stellte bei den Papageienvögeln eine Expression von Androgenrezeptoren in den Leydig-Zellen (Afrikanischer Graupapagei, Amazonenpapagei und Wellensittich), in den Keimzellen (Kakadu, Afrikanischer Graupapagei, Amazonenpapagei und Wellensittich) und in der Kapsel (Ara) fest. (Reitemeier 2014)

Die Lektin histochemie ermöglicht es, durch die Auswahl geeigneter Lektine, bestimmte Kohlehydrate und Glykoproteine in einem Gewebe zu identifizieren. (Mulisch und Welsch 2010) Um die Spezifität der Reaktionen zu überprüfen, wurde jeweils mit einem spezifischen Hemmzucker ein Hemmzuckertest durchgeführt. Bei den Untersuchungen mit den 16 Lektinen (ConA, WGA, WGAs, LCA, DBA, RCA, PSA, UEA-1, PHA E, PHA L, GSL-1, SBA, SJA, PNA, MAL-1 und SNA) wurde bei allen ausser DBA, GSL-1, SBA, SJA und UEA-1 ein spezifisches Anfärbemuster beobachtet. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Studien wurden D-Mannose, D-Glukose, N-Acetyl-Glukosamin und D-Galaktose in bestimmten Strukturen nachgewiesen. Es war zu beobachten, dass ein Teil der FITC-markierten Lektine in Abhängigkeit von der Fixierungsart Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zeigten. So waren bei WGAs und SNA die Formalin-fixierten Gewebeschnitte schwächer gefärbt als die Bouin-fixierten Schnitte. Mit den FITC-markierten Lektinen RCA, PSA, PHA E, PHA L, PNA und MAL-1 war bei den Formalin-fixierten Hodenschnitten keine Fluoreszenz nachzuweisen, wohingegen sich bei den Bouin-fixierten Proben ein charakteristisches Bindungsmuster zeigte. Zusätzlich lässt sich zum Bindeverhalten der Lektine sagen, dass es teilweise sehr deutliche Unterschiede zu anderen Vogel- bzw. Tierarten aufweist. Bereits Söderström et al. (1984) schrieben Bouin-fixierten Gewebeschnitten eine höhere Lektinaffinität im Vergleich zu Formalin-fixierten Schnitten zu. (Söderström et al. 1984) So könnten tierartige Unterschiede u. a. auf unterschiedlichen Fixierungsarten beruhen. Um dies zu prüfen, ist es wichtig, die verschiedensten Fixierungsprotokolle bei dem Vergleich unterschiedlicher Ergebnisse miteinzubeziehen. Montkowski hat in

einer Arbeit die möglichen Ursachen von Unterschieden bei Lektin-Untersuchungen erörtert. Er teilt diese ein in „innere“ und „äußere“ Faktoren. Einer dieser „inneren“ Faktoren ist die Struktur des Zuckers, der unterschiedliche Bindungen (α - oder β -glykosidische) eingehen kann. Zu den „äußeren“ Faktoren gehört u. a. die Art der Fixierung eines Gewebes vor der Untersuchung. (Montkowski 1992) D-Mannose wurde mithilfe der Lektine ConA, LCA und PSA detektiert. Im Hodengewebe des Straußes wurden Bindungsstellen für ConA im Zytoplasma der Sertoli-Zellen und aller Keimzellstadien (Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatiden) aufgezeigt. Ebenso konnte im Zytoplasma vereinzelter Leydig-Zellen eine Anfärbung sichtbar gemacht werden. Ballesta et al. fanden bei Tauben ebenfalls Bindungsstellen in den Sertoli-Zellen. Innerhalb des Keimepithels der Tauben fiel der Nachweis ausschließlich in den Spermatogonien positiv aus. (Ballesta et al. 1991) Im untersuchten Gewebe wurden Bindungsstellen für LCA-FITC im intertubulären Gewebe und den peritubulären Zellen sichtbar. Eine Anfärbung der Tunica externa der Arterien ist ebenfalls zu beobachten. Die Keimzellen des Straußes weisen keinerlei Bindungsstellen für LCA-FITC auf. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Untersuchungen am Dromedar, am Rind und am Kaninchen eine positive Reaktion in den Keimzellen: beim Dromedar färbten sich die Spermatogonien und den Spermatozyten, beim Rind die Spermatozyten und die Spermatiden und beim Kaninchen sämtliche Keimzellstadien positiv. Bei diesen drei Tierarten zeigt sich die Lamina propria ebenfalls positiv, bei Dromedar und Rind zusätzlich die Leydig-Zellen. Bei Rind und Kaninchen fluoreszieren die Sertoli-Zellen und das Bindegewebe bei Dromedar und Kaninchen. (Abd-Elmaksoud et al. 2008; Abd-Elmaksoud 2005; Gebendorfer 2014) Somit zeigt sich bei den einzelnen Tierarten ein sehr unterschiedliches Bindungsverhalten von LCA-FITC. Diese Abweichungen könnten in saisonalen Unterschieden ihren Ursprung haben. Abd-Elmaksoud hat diese Theorie bereits bei seinen Untersuchungen am Dromedarhoden geprüft, er fand jedoch im Bezug auf das Bindungsverhalten von LCA-FITC keinerlei Unterschiede zwischen den innerhalb und den außerhalb der Paarungszeit entnommenen Hoden. (Abd-Elmaksoud et al. 2008) In dieser Arbeit wurde desweiteren das Bindungsverhalten für PSA als ebenfalls Mannose-bindendes Lektin untersucht. Bindungsstellen wurden im Zytoplasma der Sertoli-Zellen sichtbar gemacht. Die Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatiden reagieren bei diesen Untersuchungen ebenfalls mit einer positiven Reaktion.

Somit entspricht das Bindeverhalten von PSA im Bezug auf Sertoli-Zellen und die Keimzellen dem von ConA. Somit fanden sich in diesen Zellen Glukose- und Mannose-haltige Zuckerstrukturen. Bei PSA ist zusätzlich eine schwach homogene Anfärbung im intertubulären Gewebe zu beobachten. Zu den eingesetzten Lektinen, die Galaktose binden, gehören RCA und PNA. Das Hodengewebe des Straußes zeigt bei den glykohistochemischen Untersuchungen mit RCA-FITC positive Bereiche nur in der Kapsel und in der Tunica externa der Arterien. Für PNA sind in den untersuchten Hodenschnitten ausschließlich in den Spermatogonien und primären Spermatozyten Bindungsstellen nachweisbar. Bakst et al. konnten bei Putenhoden ebenfalls eine Anfärbung der Spermatogonien und der primären Spermatozyten erkennen. (Bakst et al. 2007) Bei Keskin und Ili wird eine schwache Anfärbung mit PNA-FITC in den Keimzellen, im intertubulären Gewebe, in der Basalmembran und in den Sertoli-Zellen des Denizli-Hahnes erwähnt. (Keskin und Ili 2011) Die N-Acetyl-D-Galaktosamin bindenden Lektine DBA, GSL-1, SBA und SJA wurden in dieser Arbeit mit den folgenden Ergebnissen untersucht: Die Untersuchung auf Bindungsstellen für DBA verlief ohne Reaktion. Im Hoden des Straußes konnten in dieser Arbeit ebenso keine Bindungsstellen für GSL-1, SBA und SJA sichtbar gemacht werden. Somit finden sich im Straußenhoden keine Glykokonjugate mit N-Acetyl-D-Galaktosamin-Resten. Im Gegensatz dazu erwähnen Bakst et al. in ihrer Arbeit ein Vorkommen von Bindungsstellen für SBA in einzelnen Zellen im intertubulären Gewebe und in der Basalmembran der Pute. (Bakst et al. 2007) Das Lektin SNA wurde verwendet, um Bindungsstellen für Galaktose und N-Acetyl-D-Galaktosamin im Straußengewebe zu ermitteln. SNA-FITC konnte in einigen Zellen des intertubulären Gewebes und in vereinzelt Spermatogonien eine Fluoreszenz hervorrufen. Das Endothel der Gefäße lässt sich ebenfalls mit SNA-FITC anfärben. In einer Studie von Keskin und Ili werden diese Erkenntnisse nur bedingt bestätigt: das Hodengewebe des Denizli-Hahnes wies Bindungsstellen für SNA im intertubulären Gewebe, in der Basalmembran, in den Sertoli-Zellen und in den Keimzellen auf. (Keskin und Ili 2011) Um ein Bindungsmuster für N-Acetyl-Glukosamin im Straußenhoden erkennbar zu machen, wurden in dieser Arbeit die Lektine WGA und WGAs verwendet. WGA und WGAs binden beide an N-Acetyl-Glukosamin, WGAs bindet aber im Gegensatz zu WGA nicht an N-Acetyl-D-Neuraminsäure. (Monsigny et al. 1980) Die in dieser Arbeit untersuchten Hodenschnitte zeigten eine Affinität für WGA in Spermatogonien,

den Spermatozyten, den Spermatiden und den Leydig-Zellen. Ballesta et al. konnten diese Tatsache nur im Bezug auf die Spermatogonien bei der Taube bestätigen. (Ballesta et al. 1991) Das intertubuläre Gewebe und die Tunica intima der Gefäße färben sich ebenfalls mit WGA-FITC an. Bakst et al. beobachteten eine positive Reaktion auf WGA-FITC in den Sertoli-Zellen der Pute, welche in den Sertoli-Zellen des Straußes während dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. (Bakst et al. 2007) Bindungsstellen für WGAs zeigten sich in der vorliegenden Arbeit in den Spermatogonien, den Spermatozyten und den Spermatiden und in den peritubulären Zellen sowie in mäßiger Zahl im intertubulären Gewebe. In den Gefäßen konnte eine Anfärbung der Tunica intima und der Tunica externa beobachtet werden. Zusammenfassend für das Bindevverhalten von WGA und WGAs im Hodengewebe des Straußes lässt sich feststellen, dass in den Spermatogonien, den Spermatozyten, den Spermatiden, der Tunica interna der Gefäße und dem intertubulären Gewebe des Straußes Glykokonjugate mit viel N-Acetyl-D-Glukosamin detektiert werden, wohingegen in den Leydig-Zellen Glykokonjugate mit viel N-Acetyl-D-Neuraminsäure nachgewiesen werden konnten. Das Hodengewebe des Straußes weist eine positive Reaktion mit PHA E- und PHA L-FITC im Zytoplasma der Leydig-Zellen auf. Bei den Untersuchungen mit PHA L ist eine Anfärbung der Tunica externa und Tunica media der größeren Arterien festzustellen. Ebenso findet man eine positive Reaktion mit PHA L im intertubulären Gewebe, in den peritubulären Zellen und im Zytoplasma der Sertoli-Zellen. Zu diesen Ergebnissen konnte aufgrund fehlender Literatur kein Vergleich mit anderen Tierarten durchgeführt werden. Bindungsstellen für MAL-1 konnten im Hodengewebe des Straußes ausschließlich in einzelnen Zellen des intertubulären Gewebes nachgewiesen werden. Keskin und Ili fanden beim Denizli-Hahn ebenfalls Bindungsstellen im intertubulären Gewebe, zusätzlich noch in der Basalmembran, in den Sertoli-Zellen und in den Keimzellen. (Keskin und Ili 2011) In den untersuchten Gewebeschnitten des Straußes konnten keine Bindungsstellen für UEA-1-FITC und somit keine Existenz von L-Fucose im Straußenhoden detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich in früheren Studien bei Hamster, Schwein, Rind und Katze eine Anfärbung der Membrana propria. (Pastor et al. 2003; Calvo et al. 2000; Arya und Vanha-Perttula 1985; Desantis et al. 2006) Zusätzlich wurden beim Hamster Bindungsstellen für UEA-1 in den Spermischwänzen beobachtet. (Pastor et al. 2003) In einer Studie von Abd-Elmaksoud am Hoden des Rindes

zeigte sich je nach Fixierung ein unterschiedliches Bindungsverhalten von UEA-1: in Aceton-fixierten Schnitten färbte sich die Basalmembran an, wohingegen sich in den Bouin-fixierten Schnitten keine positive Reaktion hervorrufen ließ. (Abd-Elmaksoud 2005) Dies lässt die Vermutung zu, dass sich Unterschiede im Bindungsmuster von UEA-1 auf die Fixierung des Hodengewebes zurückführen lassen. In der vorliegenden Arbeit wurden bereits zwei unterschiedliche Fixierungen (Formalin und Bouin) angewendet, in denen übereinstimmend keine Bindungsstellen nachgewiesen werden konnten. An früherer Stelle in dieser Arbeit wurde bereits erwähnt, dass das Bindemuster von Lektinen durch die Art der Fixierung beeinflusst werden kann. Interessant wäre es, entsprechende Untersuchungen mit UEA-1 an Aceton-fixierten Hodenschnitten durchzuführen.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen in dieser Arbeit dienten der Darstellung von zellulären Feinstrukturen des Straußenhodens. Die der Basalmembran anliegenden Sertoli-Zellen enthalten in ihrem Zytoplasma einen ovalen bis polygonalen Zellkern mit einem deutlichen Nukleolus. Bei Waibl und Sinowatz wird die Form des Sertoli-Zellkerns mit oval, manchmal birnenförmig beschrieben. (Waihl und Sinowatz 2004) Dieser Zellkern befindet sich im basalen bis mittleren Drittel der Zelle und enthält viel Euchromatin und einige Heterochromatin-Schollen. In den Sertoli-Zellen sind desweiteren viele Mitochondrien, Lysosomen und raues endoplasmatisches Retikulum zu finden. Bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind „tight junctions“ zwischen den Zellen erkennbar. Die Spermatogonien beherbergen einen runden bis querovalen Zellkern mit viel Euchromatin und 1-2 Nukleoli. Der Zellkern der primären Spermatozyten ist rund und besitzt lockeres Chromatin, wohingegen der Zellkern der sekundären Spermatozyten deutlich kleiner aber dennoch rund ist. Ebenso findet man die sekundären Spermatozyten bei Waibl und Sinowatz sowie Salomon et al. beschrieben. (Waihl und Sinowatz 2004; Salomon 1993) In diesem Zellkern ist mittig viel Euchromatin und Heterochromatin am Rand zu sehen. Der Gehalt an Mitochondrien ist in den primären Spermatozyten geringer als in den sekundären. Die nächste Entwicklungsstufe der Keimzellen, die Spermatisden, besitzt am Beginn der Spermiogenese einen runden, dann einen elongierten Zellkern mit feinem Chromatin und zusätzlich einem dünnen randständigen Heterochromatinsaum. In manchen Schnitten ist die akrosomale Vakuole sichtbar, die zum späteren Akrosom des Spermiums wird. Im Laufe der

Spermienentwicklung sammeln sich Mikrotubuli um den Zellkern und bilden eine Manschette, anschließend entwickelt das Spermium seine endgültige Form mit Akrosom, Kopf und Schwanz.

Durch die in dieser Arbeit angewandten immun- und glykohistochemischen Verfahren in Kombination mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten bisherige Erkenntnisse über das Hodengewebe des Straußes im Bezug auf histologische und funktionelle Beobachtungen verifiziert und ergänzt werden. Hierbei konnten viele Ähnlichkeiten zu anderen Vogelarten festgestellt werden, aber auch Unterschiede wurden nachgewiesen. Einige dieser Unterschiede könnten auf saisonale Unterschiede hindeuten, dies bedarf jedoch ergänzender Untersuchungen mit Straußen verschiedener Altersgruppen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung des Hodengewebes des Afrikanischen Straußes (*Struthio camelus*) mithilfe konventioneller Färbeverfahren sowie immunhistochemischer, glykohistochemischer und elektronenmikroskopischer Methoden. Für die Untersuchungen wurden Hoden von zehn geschlechtsreifen, klinisch gesunden Straußen verwendet.

Die anatomische Lage der Hoden in der Leibeshöhle entspricht der von anderen Vögeln. Die Hoden des Straußes sind bohnen- bzw. strangförmig, somit weicht die Form nur geringfügig von der in der Literatur beschriebenen Hodenform bei anderen Vogelarten ab. Die Straußenhoden sind im Vergleich zu anderen Vogelarten wie z. B. dem Kanarienvogel im Bezug auf die Körpergröße deutlich kleiner, wobei aber, wie bei allen bisher untersuchten Vogelarten der linke Hoden größer als der rechte ist. Die Farbe der Hoden weicht teilweise leicht von der Beschreibung bei anderen Vogelarten ab, was eventuell auf saisonale Unterschiede hindeuten könnte. Wie bei allen Vögeln ist kein Mediastinum testis ausgebildet.

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen wurde die ABC-Methode angewandt. Für alle untersuchten Antikörper (α -SMA, Desmin, Vimentin, Panzytokeratin, Myosin, Tubulin, Connexin, Cox-1, Cox-2, ER α und AR) konnte ein charakteristisches Bindungsmuster nachgewiesen werden. Zytokeratine ließen sich in den Leydig-Zellen in unterschiedlicher Konzentration beobachten. Cox-2 wird im untersuchten Gewebe in den Sertoli-Zellen, den Leydig-Zellen und der Gefäßwand (Tunica intima und media) exprimiert, wodurch beim Strauß eine Beteiligung von Prostaglandinen bei der Testosteron-Synthese und -Freisetzung in die Blutgefäße angenommen werden kann. Beim Strauß konnte der Östrogenrezeptor ER α ausschließlich in vereinzelt Leydig-Zellen beobachtet werden. Dies ist ein Unterschied zu vielen anderen Vogelarten.

Die lektinhistochemischen Untersuchungen wurden mit 16 verschiedenen FITC-markierten Lektinen (ConA, WGA, WGAs, LCA, DBA, RCA, PSA, UEA-1, PHA E, PHA L, GSL-1, SBA, SJA, PNA, MAL-1 und SNA) durchgeführt. Bei den Lektinen ConA, WGA, WGAs, LCA, RCA, PSA, PHA E, PHA L, PNA, MAL-1 und SNA konnte ein spezifisches Bindungsmuster nachgewiesen werden.

So wurden Glykostrukturen mit D-Mannose (Sertoli-Zellen, Keimzellen, intertubuläres Gewebe, peritubuläre Zellen, Tunica externa der Gefäße), N-Acetyl-Glukosamin (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatisden, intertubuläres Gewebe, Tunica intima der Gefäße) und D-Galaktose (Kapsel, Tunica externa der Gefäße, Spermatogonien und primäre Spermatozyten) im Hodengewebe des Straußes nachgewiesen. Im Straußenhoden finden sich jedoch keine Glykokonjugate mit N-Acetyl-D-Galaktosamin. Bei den glykohistochemischen Untersuchungen zeigte sich für die Lektine WGAs, SNA, RCA, PSA, PHA E, PHA L, PNA und MAL-1 in Abhängigkeit von der Fixierung ein unterschiedliches Bindeverhalten: Bei WGAs und SNA war nach Fixierung mit Formalin keine Bindung an das Gewebe möglich, bei den anderen Lektinen zeigte sich nach Bouin-Fixierung ein stärkeres Bindeverhalten als nach Formalin-Fixierung.

VII. SUMMARY

The aim of this study was to investigate testicular tissue of the African ostrich (*Struthio camelus*) using light- and electronmicroscopic methods and immunohistochemical and glycohistochemical techniques. For my study testes of ten mature, clinical healthy ostriches were used.

The anatomical position of the testes in the abdominal cavity of the ostriches corresponds to that of other birds. The form of the ostrich testes (bean- or strand-shaped) differs only slightly from that described in other species of birds. The size of the testes is, compared to other species of birds (e.g. in relation to the body size) significantly smaller, but the left testis is larger than the right one, as seen for all other avian species investigated so far. The color of the testes partly deviates slightly from the description in other avian species, which may be due to seasonal influences. As in all bird species no mediastinum testis is formed.

In my immunohistochemical studies, the Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex method has been applied. For all investigated antibodies (α -SMA, desmin, vimentin, pancytokeratin, myosin, tubulin, connexin, Cox-1, Cox-2, ER α and AR) a characteristic binding pattern could be detected. Cytokeratins could be observed in the Leydig cells, which is surprising as Leydig cells have a mesenchymal origin. Cox-2 is expressed in the Sertoli cells, the Leydig cells and the vascular wall (tunica intima and media), whereby the involvement of prostaglandins in testosterone synthesis and release into the blood vessels can be assumed. The expression of ER α shows a very different binding pattern within several species of birds. In the ostrich testis ER α was observed only in single Leydig cells – as seen in the cockatoo and the macaw.

The glycohistochemical studies were performed with 16 different FITC-labeled lectins (ConA, WGA, WGAs, LCA, DBA, RCA, PSA, UEA-1, PHA E, PHA L, GSL-1, SBA, SJA, PNA, MAL-1 and SNA). In the cases of ConA, WGA, WGAs, LCA, RCA, PSA, PHA E, PHA L, PNA, MAL-1 and SNA a specific binding pattern could be detected. Therefore glycostructures with D-mannose (Sertoli cells, germinal cells, intertubular tissue, peritubular cells, tunica externa of the vessels), N-acetyl-glucosamine (spermatogonia, spermatocytes, spermatids, intertubular tissue, tunica intima of the vessels) and D-galactose (capsule, tunica

externa of the vessels, spermatogonia und primary spermatocytes) were detected in the ostrich testes. No glycoconjugates with N-acetyl-D-galactosamine were found in the ostrich testes. For the lectins WGAs, SNA, RCA, PSA, PHA E, PHA L, PNA and MAL-1 the glycohistochemical studies showed a different binding behaviour according to the fixation method: After fixation with formalin no binding for WGAs and SNA was found. The other lectins showed a more intense binding behaviour after Bouin fixation compared to formalin fixation.

VIII. VERZEICHNISSE

1. Literaturverzeichnis

Abd-Elmaksoud, A. (2005)

Morphological, glykohistochemical and immunohistochemical Studies on the embryonic and adult bovine testis. Dissertation. Ludwig-Maximilian-Universität, München.

Abd-Elmaksoud, A.; Sayed-Ahmed, 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. In: *Acta Histochemica* 110 (2), S. 124–133.

Abd-Elmaksoud, A. (2009)

Comparative expression of laminin and smooth muscle actin in the testis and epididymis of poultry and rabbit. In: *J Mol Histol* 40 (5-6), S. 407–416.

Aire, T. A. (1997)

The structure of the interstitial tissue of the active and resting avian testis. In: *Onderstepoort J Vet Res* 64 (4), S. 291–299.

Aire, T. A.; Ozegbe, P. C. (2007)

The testicular capsule and peritubular tissue of birds: morphometry, histology, ultrastructure and immunohistochemistry. In: *J Anatomy* 210 (6), S. 731–740.

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

Lectin-binding pattern of bull testis and epididymis. In: *J Androl* 6 (4), S. 230–242.

Bakst, M. R.; Akuffo, V.; Trefil, P.; Brillard, J. P. (2007)

Morphological and histochemical characterization of the seminiferous epithelial and Leydig cells of the turkey. In: *Anim Reprod Sci* 97 (3-4), S. 303–313.

Balaji, T.; Ramanathan, M.; Padmanabhan Menon, V. (2007)

Localization of cyclooxygenase-2 in mice testis and assessment of its possible role through suppressing its expression using nimesulide: a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor. In: *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 76 (6), S. 341–348.

Ballesta, J.; Martinez-Menarguez, J. A.; Pastor, L. M.; Aviles, M.; Madrid, J. F.; Castells, M. T. (1991)

Lectin binding pattern in the testes of several tetrapode vertebrates. In: *Eur J Basic Appl Histochem* 35 (2), S. 107–117.

Bergmann, M.; Schindelmeiser, J. (1987)

Development of the blood-testis barrier in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). In: *Int J Androl* 10 (2), S. 481–488.

Bittner, H. (1925)

Pigmentierte Hoden beim Hausgeflügel. In: *Berl. Tierärztl. Wschr.* 1925 (41), S. 533-538.

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

Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). In: *Science* 119 (3091), S. 419.

Büttner, R.; Thomas, C. (2003)

Allgemeine Pathologie. 3. Auflage. Stuttgart: Schattauer.

Calvo, A.; Pastor, L. M.; Bonet, S.; Pinart, E.; Ventura, M. (2000)

Characterization of the glycoconjugates of boar testis and epididymis. In: *J Reprod Fertil* 120 (2), S. 325–335.

Campbell, N. A. (1997)

Biologie. Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akad. Verl. (Spektrum-Lehrbuch).

Chu, P.G; Weiss, L. M. (2009)

Modern Immunohistochemistry: Cambridge University Press.

Cooksey, E. J.; Rothwell, B. (1973)

The ultrastructure of the Sertoli cell and its differentiation in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). In: *J Anat* 114 (3), S. 329–345.

Desantis, S.; Ventriglia, G.; Zubani, D.; Deflorio, M.; Megalofonou, P.; Acone, F.; Zarrilli, A.; Palmieri, G.; Metrio, G. de (2006)

Histochemical analysis of glycoconjugates in the domestic cat testis. In: *Histol Histopathol* 21 (1), S. 11–22.

DeWitt, D.; Smith, W. L. (1995)

Yes, but do they still get headaches? In: *Cell* 83 (3), S. 345–348.

Disselhorst, R. (1908)

Gewicht und Volumenzunahme der männlichen Keimdrüsen bei Vögeln und Säugern in der Paarungszeit. In: *Anat Anz*, 1908 (32), S. 113–117.

Dornas, R. A. P.; Oliveira, A. G.; Dias, M. O.; Mahecha, G. A. B.; Oliveira, C. A. (2008)

Comparative expression of androgen receptor in the testis and epididymal region of roosters (*Gallus domesticus*) and drakes (*Anas platyrhynchos*). In: *Gen Comp Endocrinol* 155 (3), S. 773–779.

Eckes, B.; Dogic, D.; Colucci-Guyon, E.; Wang, N.; Maniotis, A.; Ingber, D.; Merckling, A.; Langa, F.; Aumailley, M.; Delouveée, A.; Koteliansky, V.; Babinet, C.; Krieg, T. (1998)

Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. In: *J Cell Sci* 111 (13), S. 1897–1907.

Fouquet, J. P.; Kann, M. L.; Pechart, I.; Prigent, Y. (1997)

Expression of tubulin isoforms during the differentiation of mammalian spermatozoa. In: *Tissue Cell* 29 (5), S. 573–583.

Freund, L. (1917)

Keimdrüsen und Kastration der männlichen Vögel. In: *Naturw. Wschr.*, 1917 (41), S. 569–571.

Frungieri, M. B.; Calandra, R. S.; Mayerhofer, A.; Matzkin, M. E. (2015)

Cyclooxygenase and prostaglandins in somatic cell populations of the testis. In: *Reproduction* 149 (4), S. R169–80.

Gabius, H. J. (2009)

The sugar code. Fundamentals of glycosciences. Weinheim, Chichester: Wiley-VCH.

Gabius, H. J.; Andre, S.; Jimenez-Barbero, J.; Romero, A.; Solis, D. (2011)

From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. In: *Trends Biochem Sci* 36 (6), S. 298–313.

Gabius, H. J.; Gabius, S. (1993)

Lectins and glycobiology. Berlin, New York: Springer-Verlag.

Gallagher, J. T. (1984)

Carbohydrate-binding properties of lectins: a possible approach to lectin nomenclature and classification. In: *Biosci Rep* 4 (8), S. 621–632.

Gebendorfer, S. (2014)

Lichtmikroskopische, ultrastrukturelle, glykohistochemische und immunhistochemische Untersuchungen am Hoden des nicht-geschlechtsreifen und des geschlechtsreifen Kaninchens (*Oryctolagus cuniculus* f. dom). Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München.

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

The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. In: *Advanced Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (35), S. 127–340.

Goldstein, I. J.; Hughes, R. C.; Monsigny, M.; Osawa, T.; Sharon, N. (1980)

What should be called a lectin? In: *Nature* 285 (5760), S. 66.

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

Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: I. E. Liener, N. Sharon und I. J. Goldstein (Hg.): *The lectins. Properties, functions, and applications in biology and medicine*. Orlando: Academic Press (Molecular biology), S. 33–247.

Guibert, E.; Briere, S.; Pelletier, R.; Brillard, J. P.; Froment, P. (2011)

Characterization of chicken Sertoli cells in vitro. In: *Poultry Science* 90 (6), S. 1276–1286.

Hennemann, H. H. (1991)

Hämatologie und internistisch-onkologische Zytologie. Lehrbuch und Atlas. Stuttgart, New York: Schattauer.

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

Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract - a review. In: *Mol Cell Endocrinol* 178 (1-2), S. 29–38.

Hess, R. A.; Bunick, D.; Lee, K.-H; Bahr, J.; Taylor, J. A.; Korach, K. S.; Lubahn, D. B. (1997)

A role for oestrogens in the male reproductive system. In: *Nature* 390 (6659), S. 509–512.

Holstein, A. F.; Maekawa, M.; Nagano, T.; Davidoff, M. S. (1996)

Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. In: *Arch Histol Cytol* 59 (2), S. 109–125.

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

Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. In: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 29 (4), S. 577–580.

Huber, G. C. (1916)

A note on the morphology of the seminiferous tubules of birds. In: *Anat Rec*, 1916 (2), S. 177–180.

Hummel, G. (2000)

Anatomie und Physiologie der Vögel. Stuttgart: Ulmer.

Kamar, G. A. R. (1960)

Development of the testis tubule in the fowl. In: *Quart. J. microsc. Sci.*, 1960 (101), S. 401–406.

Karlson, P.; Doenecke, D.; Koolman, J.; Fuchs, G.; Gerok, W. (2005)

Karlsons Biochemie und Pathobiochemie. Stuttgart: Thieme.

Keskin, N.; Ili, P. (2011)

Glycohistochemical Study on the Denizli Cock Testis. In: *J. of Animal and Veterinary Advances* 10 (10), S. 1327–1331.

König, H. E.; Liebich, H.-G. (2001)

Anatomie und Propädeutik des Geflügels. Stuttgart: Schattauer.

Lake, P. E. (1957)

The male reproductive tract of the fowl. In: *J Anat* 91 (1), S. 116–129.

Leska, A.; Kiezun, J.; Kaminska, B.; Dusza, L. (2012)

Seasonal changes in the expression of the androgen receptor in the testes of the domestic goose (*Anser anser f. domestica*). In: *General and Comparative Endocrinology* 179 (1), S. 63–70.

Linß, W. (1999)

Histologie. Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie. Berlin: de Gruyter.

Little, M.; Rohricht, C.; Schroeter, D. (1983)

Pig sperm tail tubulin. Its extraction and characterization. In: *Exp Cell Res* 147 (1), S. 15–22.

Löscher, W.; Richter, A.; Potschka, H. (2014)

Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. 9. Auflage. Stuttgart: Enke.

Lüllmann-Rauch, R.; Paulsen, F. (2012)

Taschenlehrbuch Histologie. 4. Auflage: Thieme.

Madekurozwa, M.-C. (2013)

Post-hatch changes in the immunoexpression of desmin, smooth muscle actin and vimentin in the testicular capsule and interstitial tissue of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). In: *Anat. Histol. Embryol.* 42 (5), S. 369–378.

Maretta, M.; Marettova, E. (2004)

Immunohistochemical demonstration of myoid cells in the testis and its excurrent ducts in the domestic fowl. In: *Br Poult Sci* 45 (5), S. 585–589.

Marshall, W. (1895)

Der Bau der Vögel. Leipzig: Weber.

McIntosh, J. R.; Porter, K. R. (1967)

Microtubules in the spermatids of the domestic fowl. In: *J Cell Biol* 35 (1), S. 153–173.

Monsigny, M.; Roche, A. C.; Sene, C.; Maget-Dana, R.; Delmotte, F. (1980)

Sugar-lectin interactions: how does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates? In: *Eur J Biochem* 104 (1), S. 147–153.

Montkowski, A. (1992)

Lichtmikroskopische, ultrastrukturelle und glykohistochemische Untersuchungen am Hoden des Hundes (*Canis familiaris*). Inaugural-Dissertation. Ludwig-Maximilian-Universität, München.

Mulisch, M.; Welsch, U. (2010)

Romeis - Mikroskopische Technik. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Munk, K. (2008)

Biochemie – Zellbiologie. Stuttgart: Thieme.

Nagano, T. (1959)

Spermatogenesis of the domestic fowl studied with the electron microscope. In: *Arch. Histol. Jap., Arch. Histol. Jpn* 16 (2), S. 311–345.

Nagano, T. (1962)

Observations on the fine structure of the developing spermatid in the domestic chicken. In: *J Cell Biol* 14, S. 193–205.

Nicholls, T. J.; Graham, G. P. (1972)

Observations on the ultrastructure and differentiation of Leydig cells in the testis of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). In: *Biol Reprod* 6 (2), S. 179–192.

Nieschlag, E.; Behre, H. M.; Nieschlag, S. (2009)

Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. Berlin, Heidelberg: Springer.

O'Donnell, Liza; O'Bryan, Moira K. (2014)

Microtubules and spermatogenesis. In: *Semin Cell Dev Biol* 30, S. 45–54.

Osman, D. I.; Ekwall, H.; Ploen, L. (1980)

Specialized cell contacts and the blood-testis barrier in the seminiferous tubules of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). In: *Int J Androl* 3 (5), S. 553–562.

Pastor, L. M.; Morales, E.; Polo, L. A.; Calvo, A.; Pallares, J.; La Viesca, S. de (2003)

Histochemical study of glycoconjugates in active and photoperiodically-regressed testis of hamster (*Mesocricetus auratus*). In: *Acta Histochem* 105 (2), S. 165–173.

Prigent, Y.; Kann, M. L.; Lach-Gar, H.; Pechart, I.; Fouquet, J. P. (1996)

Glutamylated tubulin as a marker of microtubule heterogeneity in the human sperm flagellum. In: *Mol Hum Reprod* 2 (8), S. 573–581.

Pschyrembel, W. (2002)

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 259. Aufl. Berlin, New York: de Gruyter.

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

Römpp Kompakt Lexikon. Biochemie und Molekularbiologie. Stuttgart, New York: Thieme (Römpp Lexikon).

Reitemeier, S. (2014)

Morphologische und immunzytochemische Charakterisierung der Gonaden männlicher Papageienvögel. Inaugural-Dissertation. Universität Leipzig, Leipzig.

Reynolds, E. S. (1963)

The use of lead nitrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. In: *J Cell Biol* (17), S. 208–212.

Richardson, R. L.; Hinton, D. M.; Campion D. R. (1983)

An improved method for storing and using stains in electron microscopy. In: *J. Electron Microsc.* (32), S. 216–218.

Risley, M. S.; Tan, I. P.; Roy, C.; Saez, J. C. (1992)

Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. In: *J Cell Sci* 103 (Pt 1), S. 81–96.

Rodler, D.; Sinowatz, F. (2015)

Expression of prostaglandin synthesizing enzymes (cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2) in the ovary of the ostrich (*Struthio camelus*). In: *Acta Histochemica* 117 (1), S. 69–75.

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. In: *Virchows Arch* 427 (5), S. 497–502.

Rothwell, B. (1973)

The ultrastructure of Leydig cells in the testis of the domestic fowl. In: *J Anat* 116 (2), S. 245–253.

Rüdiger, H.; Gabius, H. J. (1993)

Lectinologie - Geschichte, Konzepte und pharmazeutische Bedeutung. In: *Deutsche Apotheker Zeitung* 133 (26), S. 15–25.

Salomon, F.-V. (1993)

Lehrbuch der Geflügelanatomie. Jena, Stuttgart: G. Fischer.

Schmidt, R. F.; Lang, F. (2007)

Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie: Springer London, Limited.

Silbernagl, S.; Despopoulos, A. (2003)

Taschenatlas Physiologie. 5. Aufl. Stuttgart: Thieme.

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

Binding of fluorescein isothiocyanate conjugated lectins to rat spermatogenic cells in tissue sections. Enhancement of lectin fluorescence obtained by fixation in Bouin's fluid. In: *Histochemistry* 80 (6), S. 575–579.

Solger, B. (1885)

Über Ungleichheiten der Hoden beider Körperhälften bei einigen Vögeln. In: *Archiv f. mikrosk. Anatomie*. 26 (1), S. 334–336.

Steinegger, E.; Hänsel, R. (2013)

Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmazie: Springer Berlin Heidelberg.

Stosiek, P.; Kasper, M.; Karsten, U. (1990)

Expression of cytokeratins 8 and 18 in human Sertoli cells of immature and atrophic seminiferous tubules. In: *Differentiation* 43 (1), S. 66–70.

Sumner, J. B.; Howell, S. F. (1936)

Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. In: *J Bacteriol* 32 (2), S. 227–237.

Tae, H. J.; Jang, B. G.; Ahn, D. C.; Choi, E. Y.; Kang, H. S.; Kim, N. S. et al. (2005)

Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karpowi*) during the breeding and non-breeding seasons. In: *Vet Res Commun* 29 (7), S. 629–643.

Thurston, R. J.; Korn, N. (2000)

Spermiogenesis in commercial poultry species: anatomy and control. In: *Poult Sci* 79 (11), S. 1650–1668.

Tingari, M. D. (1973)

Observations on the fine structure of spermatozoa in the testis and excurrent ducts of the male fowl, *Gallus domesticus*. In: *J Reprod Fertil* 34 (2), S. 255–265.

Waibl, H.; Sinowatz, F. (2004)

Anatomie der Vögel. In: B. Vollmerhaus (Hrsg.): Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band V. 3. Aufl. Stuttgart: Parey.

Wei, L.; Peng, K.; Luo, L.; Song, H.; Wang, Y.; Li, S. et al. (2007)

Morphological Study on the Reproductive Tract of the Male Ostrich Chicks. In: *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences* 8, 2007 (38), S. 851–855.

Wrobel, K. H.; Bickel, D.; Kujat, R. (1995)

Distribution pattern of F-actin, vimentin and alpha-tubulin in the bovine testis during postnatal development. In: *Acta Anat (Basel)* 153 (4), S. 263–272.

Zierz, S.; Jerusalem, F. (2003)

Muskelerkrankungen: Thieme.

Zlotnik, I. (1947)

The Cytoplasmic Components of Germ-cells during Spermatogenesis in the domestic fowl. In: *Quart. J. microsc. Sci.*, 1947 (88), S. 353–360.

2. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1:</i>	<i>Afrikanischer Straußenhahn auf der Straußenfarm Donaumoos</i>	<i>1</i>
<i>Abbildung 2:</i>	<i>Hoden in der Leibeshöhle des Straußes</i>	<i>2</i>
<i>Abbildung 3:</i>	<i>Hoden des Straußes</i>	<i>3</i>
<i>Abbildung 4:</i>	<i>Schema der Probennahme am Hoden</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 5:</i>	<i>Schema der ABC-Methode (nach Mulisch und Welsch 2010) .</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 6:</i>	<i>Hoden Strauß, Kapsel und angrenzendes Hodenparenchym... </i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 7:</i>	<i>Hoden Strauß, Hodenparenchym.</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 8:</i>	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 9:</i>	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 10:</i>	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 11:</i>	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 12:</i>	<i>Hoden Strauß, peritubuläres Gewebe mit Basalmembran.....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 13:</i>	<i>Hoden Strauß, Tubulus seminiferus contortus und peritubuläres Gewebe.</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 14:</i>	<i>Hoden Strauß, peritubuläres Gewebe.</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 15:</i>	<i>Hoden Strauß, Keimepithel.</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 16:</i>	<i>Hoden Strauß, Keimepithel.</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 17:</i>	<i>Hoden Strauß, Keimepithel.</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 18:</i>	<i>Hoden Strauß, Keimepithel.</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 19:</i>	<i>Hoden Strauß, Keimepithel.</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 20:</i>	<i>Hoden Strauß, Keimepithel.</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 21:</i>	<i>Hoden Strauß, Tubulus seminiferus contortus.</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 22:</i>	<i>Hoden Strauß, Keimepithel.</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 23:</i>	<i>Hoden Strauß, Keimepithel.</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 24:</i>	<i>Hoden Strauß, Keimepithel.</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 25:</i>	<i>Hoden Strauß, Keimepithel.</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 26:</i>	<i>Hoden Strauß, Keimepithel.</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 27:</i>	<i>Hoden Strauß, Keimepithel.</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 28:</i>	<i>Hoden Strauß, peritubuläres Gewebe.</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 29:</i>	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 30:</i>	<i>Hoden Strauß, Hodenkapsel.....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 31:</i>	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.</i>	<i>58</i>

Abbildung 32:	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.....</i>	58
Abbildung 33:	<i>Hoden Strauß, Kapsel.</i>	59
Abbildung 34:	<i>Hoden Strauß, intertubulären Gewebe.</i>	60
Abbildung 35:	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.....</i>	60
Abbildung 36:	<i>Hoden Strauß, Keimepithel und intertubuläres Gewebe.....</i>	61
Abbildung 37:	<i>Hoden Strauß, Tubuli seminiferi contorti.</i>	61
Abbildung 38:	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.....</i>	62
Abbildung 39:	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.....</i>	63
Abbildung 40:	<i>Hoden Strauß, Keimepithel und intertubuläres Gewebe.....</i>	64
Abbildung 41:	<i>Hoden Strauß, Hodenkapsel.....</i>	64
Abbildung 42:	<i>Hoden Strauß, Keimepithel.</i>	65
Abbildung 43:	<i>Hoden Strauß, Tubuli seminiferi contorti.</i>	66
Abbildung 44:	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.....</i>	66
Abbildung 45:	<i>Hoden Strauß, Keimepithel und intertubuläres Gewebe.....</i>	67
Abbildung 46:	<i>Hoden Strauß, Keimepithel und intertubuläres Gewebe.....</i>	68
Abbildung 47:	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.....</i>	68
Abbildung 48:	<i>Hoden Strauß, Keimepithel.</i>	69
Abbildung 49:	<i>Hoden Strauß, Tubuli seminiferi contorti.</i>	70
Abbildung 50:	<i>Hoden Strauß, Tubuli seminiferi contorti und intertubuläres Gewebe.....</i>	71
Abbildung 51:	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.....</i>	71
Abbildung 52:	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.....</i>	72
Abbildung 53:	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.....</i>	73
Abbildung 54:	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.....</i>	73
Abbildung 55:	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.....</i>	74
Abbildung 56:	<i>Hoden Strauß, Tubulus seminiferus contortus.....</i>	76
Abbildung 57:	<i>Hoden Strauß, Keimepithel.</i>	77
Abbildung 58:	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.....</i>	78
Abbildung 59:	<i>Hoden Strauß, Arterie im intertubulären Gewebe.</i>	78
Abbildung 60:	<i>Hoden Strauß, Keimepithel und intertubuläres Gewebe.....</i>	79
Abbildung 61:	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.....</i>	81
Abbildung 62:	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.....</i>	82
Abbildung 63:	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe, Keimepithel.....</i>	82
Abbildung 64:	<i>Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.....</i>	83
Abbildung 65:	<i>Hoden Strauß, Tubuli seminiferi contorti.</i>	84

<i>Abbildung 66: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe, Tubuli seminiferi contorti.</i>	84
<i>Abbildung 67: Hoden Strauß, Arterie im intertubulären Gewebe.</i>	85
<i>Abbildung 68: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe.</i>	86
<i>Abbildung 69: Hoden Strauß, Keimepithel und intertubuläres Gewebe.</i>	87
<i>Abbildung 70: Hoden Strauß, Arterie im intertubulären Gewebe, Tubuli seminiferi contorti.</i>	87
<i>Abbildung 71: Hoden Strauß, Leydig-Zellen.</i>	89
<i>Abbildung 72: Hoden Strauß, Basalmembran.</i>	91
<i>Abbildung 73: Hoden Strauß, Basalmembran, Spermatogonie und primäre Spermatozyten.</i>	92
<i>Abbildung 74: Hoden Strauß, Sertoli-Zellen und Basalmembran.</i>	93
<i>Abbildung 75: Hoden Strauß, intertubuläres Gewebe und Leydig-Zellen.</i>	94
<i>Abbildung 76: Hoden Strauß, primäre Spermatozyten.</i>	96
<i>Abbildung 77: Hoden Strauß, primäre Spermatozyten und rundkernige Spermatisden.</i>	97
<i>Abbildung 78: Hoden Strauß, primärer Spermatozyt.</i>	98
<i>Abbildung 79: Hoden Strauß, Spermatisden.</i>	99
<i>Abbildung 80: Hoden Strauß, Spermatisden und Spermischwanz.</i>	100
<i>Abbildung 81: Hoden Strauß, Spermium.</i>	101
<i>Abbildung 82: Hoden Strauß, Spermienkopf und Spermischwanz.</i>	102

3. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i>	<i>Phasen der 1. Reifeteilung (Meiose I).....</i>	<i>6</i>
<i>Tabelle 2:</i>	<i>Zuckerbindungsspezifität der Lektine</i>	<i>14</i>
<i>Tabelle 3:</i>	<i>Protokoll Formalin-Fixierung</i>	<i>18</i>
<i>Tabelle 4:</i>	<i>Protokoll Bouin-Fixierung nach der ersten Probenentnahme.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabelle 5:</i>	<i>Protokoll Bouin-Fixierung nach der zweiten Probenentnahme....</i>	<i>19</i>
<i>Tabelle 6:</i>	<i>Programm der Einbettungsautomaten</i>	<i>20</i>
<i>Tabelle 7:</i>	<i>Protokoll HE-Färbung</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 8:</i>	<i>Protokoll PAS-Färbung</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 9:</i>	<i>Protokoll Alcian-Färbung mit pH 1,0.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 10:</i>	<i>Protokoll Alcian-Färbung mit pH 2,5.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 11:</i>	<i>Vorgehensweise Toluidinblau-Färbung.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 12:</i>	<i>Protokoll Trichromfärbung nach Masson und Goldner</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 13:</i>	<i>Protokoll Resorcinfuchsin-Färbung nach van Gieson.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 14:</i>	<i>Übersicht Primärantikörper.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 15:</i>	<i>Übersicht Sekundärantikörper</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 16:</i>	<i>Protokoll immunhistochemische Untersuchungen.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 17:</i>	<i>Übersicht über die verwendeten Lektine.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 18:</i>	<i>Verwendete Lektine- und Hemmzuckerkonzentrationen,</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 19:</i>	<i>Protokoll für glykohistochemische Färbung.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 20:</i>	<i>Protokoll für glykohistochemische Färbung.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 21:</i>	<i>Vorbereitung zur Einbettung der Proben.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 22:</i>	<i>Nachkontrastierung der Proben.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 23:</i>	<i>Form der Hoden.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 24:</i>	<i>Länge und Breite der Hoden.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 25:</i>	<i>Übersicht über die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen.....</i>	<i>75</i>
<i>Tabelle 26:</i>	<i>Übersicht über die Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen.....</i>	<i>88</i>

IX. ANHANG

1. Alkohol-Lösungen

Alkohol-Lösungen

50%ige Alkohol-Lösung	96%ige Alkohol-Lösung	1000 ml
	DEPC-Wasser (für Formalin-Lösung) oder Aqua dest. (für Bouin-Lösung)	958,90 ml
70%ige Alkohol-Lösung	96%ige Alkohol-Lösung	1000 ml
	DEPC-Wasser (für Formalin-Lösung) oder Aqua dest. (für Bouin-Lösung)	381,50 ml
80%ige Alkohol-Lösung	96%ige Alkohol-Lösung	1000 ml
	DEPC-Wasser (für Formalin-Lösung) oder Aqua dest. (für Bouin-Lösung)	209,50 ml

DEPC-Wasser

DEPC ² (Diethylpyrocarbonat)	1000 µl
Aqua dest.	1000 ml
autoklavieren	

2. Fixierlösungen (Lichtmikroskopie)

2.1. Formalin-Lösung

Formalin-Lösung

37% Formaldehydlösung ²	100 ml
PBS (Phosphat buffered saline)-Puffer ¹ , 10x-konzentriert, steril	90 ml
DEPC-Wasser	810 ml

PBS-Puffer, pH 7,5 für die Herstellung der Formalin-Lösung

PBS-10x-Konzentrat ¹ , steril	10 ml
DEPC-Wasser	90 ml

2.2. Bouin-Lösung

Bouin-Lösung

Pikrinsäurelösung ¹ (gesättigt, wässrig), filtriert	100 g
37 % Formaldehydlösung ²	250 ml
100 % Essigsäure ²	50 ml

Pikrinsäurelösung

Pikrinsäure ¹ (gesättigt, wässrig), filtriert	750 ml
37 % Formaldehydlösung ²	250 ml
100 % Essigsäure ²	50 ml

3. Reagenzien für die lichtmikroskopischen Untersuchungen

3.1. Hämalun-Eosin (HE)-Färbung

Saures Hämalun nach Mayer

Hämatoxylin ³ , krist.	1 g
Natriumjodat NaJO ₃ ³	0,2 g
Kalialun ³ p. A. (Aluminiumkaliumsulfat AlK (SO ₄) x 12 H ₂ O)	50 g
Chloralhydrat C ₂ H ₃ Cl ₃ O ₂ ³	50 g
Zitronensäure-Monohydrat ² , krist.	1 g
ad Aqua dest.	1000 ml
vor Gebrauch filtrieren	

Wässriges Eosin 0,09 %

1 % Stammlösung:	Eosin, gelblich ³	2 g	1 Teil
	ad Aqua dest.	ad 200 ml	
	Formaldehydlösung ² , 37 %	5 Tropfen	
Aqua dest.			10 Teile
100 % Essigsäure ²			1-5 Tropfen / 100 ml

3.2. Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach McManus (PAS-Färbung)

0,5 % Perjodsäure

Perjodsäure H ₅ JO ₆ , ² > 99 %, p.a.	1 g
Aqua dest.	ad 200 ml

SO₂-Wasser (Sulfitwasser)

Salzsäure, 1,2 N	30 ml
10%ige Natriumdisulfit-Lösung	30 ml
Aqua dest.	ad 600 ml

Salzsäure, 1,2 N

Konzentrierte Salzsäure (37%) ²	3 ml
Aqua dest.	27 ml

10 % Natriumdisulfitlösung

Natriumdisulfit in Pulverform, Na ₂ S ₂ O ₅ ³	3,0 g
Aqua dest.	ad 30 ml

Schiff'sches Reagenzfertige Gebrauchslösung: Schiff's Reagenz²**3.3. Alcianblau-Färbung****1 % Alcianblaulösung, pH 1,0**

Alcianblau 8GS ²	1 g
Salzsäure, 0,1 N ²	ad 100 ml
filtrieren und Thymolkristall ³ zusetzen	

1 % Alcianblaulösung, pH 2,5

Alcianblau 8GS ²	1 g
3 % Essigsäure	ad 100 ml
filtrieren und Thymolkristall ³ zusetzen	

3 % Essigsäure

100 % Essigsäure ²	30 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung

5 %ige Aluminiumsulfatlösung	5 g
ad Aqua dest.	100 ml
Kernechtrot ³	0,1 g
unter Erhitzen auflösen, abkühlen und filtrieren	

5 %ige Aluminiumsulfat-Lösung

Aluminiumsulfat ³ , krist., rein	5 g
Aqua dest.	ad 100 ml

3.4. Toluidinblau-Färbung**1% Toluidinblau-Lösung*, pH 4,5**

Toluidinblau	1 g
Aqua dest.	ad 100 ml
vor Gebrauch filtrieren	

3.5. Trichromfärbung nach Masson und Goldner**Azophloxin-Lösung**

Azophloxin ⁴	0,5 g
Aqua dest.	100 ml
100 % Essigsäure ²	0,2 ml
vor Gebrauch filtrieren	

Phosphormolybdänsäure-Orange G-Lösung

Phosphormolybdänsäure ³ , p.A.	4 g
Aqua dest.	ad 100 ml
Orange G ³	2 g
stets frisch ansetzen	

Lichtgrün-Lösung

Lichtgrün, gelblich ³	0,2 g
Aqua dest.	ad 100 ml
100 % Essigsäure ²	0,2 ml
vor Gebrauch filtrieren	

1 % Essigsäure

100 % Essigsäure ²	10 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

Eisenhämatoxylin nach Weigert

Stammlösung A		1 Teil
Hämatoxylin ³ , krist.	1 g	
95 % Ethanol ⁵	100 ml	
eine Woche reifen lassen		
Stammlösung B		1 Teil
Eisen(III)-chlorid ³ , p.A.	2,48 g	
Aqua dest.	ad 100 ml	
Salzsäure ² konzentriert , rauchend 37%	1 ml	

3.6. Resorcinfuchsin-Färbung nach van Gieson**Eisenhämatoxylin nach Weigert**

siehe Trichromfärbung nach Masson und Goldner

Pikrinsäure-Thiazinrot-Lösung

1 % Thiazin-Lösung, wässrig		7,5 ml
Thiazinrot R ⁶	0,1 g	
Aqua dest.	ad 10 ml	
Pikrinsäure, gesättigt, wässrig		100 ml

Resorcinfuchsin-Lösung

Schritt	Zutat/Vorgehen
1	Lösung A zum Kochen bringen
2	Lösung B unter Schwenken dazugeben, auf kleiner Flamme 5 min kochen
3	Auf Raumtemperatur abkühlen lassen, filtrieren und Niederschlag auffangen
4	Filter mit Niederschlag mit ca. 350 ml 95 %igem Ethanol ⁵ übergießen, bis zum Siedepunkt erhitzen und lösen
5	Auf RT abkühlen lassen und 2,8 ml 37 %iger Salzsäure ² (konzentriert) zugeben, filtrieren
Lösung A	
Fuchsin ³	2 g
Resorcín ³ , p.A.	4 g
Aqua dest.	ad 200 ml
unter Erwärmen lösen	
Lösung B	
Eisen(III)-chlorid ³ , p.A.	8 g
Aqua dest.	ad 40 ml

4. Reagenzien für die immunhistochemischen Untersuchungen

PBS-Lösung (Phosphate-Buffered-Saline-Solution), pH 7,4-7,6

Natriumchlorid ³ (NaCl)	42,5 g
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ³	6,35 g
Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat ³	1,95 g
Aqua dest.	ad 5 l

Citratpuffer, pH 6,0

Stammlösung A: Zitronensäure 0,1 M	Zitronensäure-Monohydrat ³	21,01 g	9 ml
	Aqua dest.	ad 1000 ml	
Stammlösung B: Natriumcitrat 0,1 M	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ³	29,41 g	41 ml
	Aqua dest.	ad 1000 ml	
Aqua dest.			ad 450 ml

Dakopuffer, pH 6,1

Dako Target Retrieval Solution 10x Concentrate ⁷	20 ml
---	-------

Aqua dest.	ad 180 ml
------------	-----------

7,5 % Wasserstoffperoxid-Lösung

30 % Wasserstoffperoxid-Lösung ³	50 ml
Aqua dest.	ad 150 ml

DAB-Wasserstoffperoxid-Lösung

DAB-Lösung	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB), 10mg/Tablette	6 Tbl.	60 ml
	Aqua dest.	60 ml	
	Tabletten mit dem Magnetrührer vollständig lösen		
Wasserstoffperoxid-Stammlösung	PBS-Lösung	5 ml	400 µl
	30 % Wasserstoffperoxid ³	15 µl	

Protease 0,1 %¹**Trypsin¹**

5. Reagenzien für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen

Gepufferte Paraformaldehyd (PFA)-Lösung

10 % Paraformaldehyd-Lösung	Paraformaldehyd ⁸	10 g	10 ml
	Aqua dest. (60 -70°C)	ad 100 ml	
	Natriumhydroxid ² 1 N, bis Lösung klar ist	1 – 2 Trpf	
Natriumcacodylatpuffer 0,2 M	Natriumcacodylat ⁹ , 98 %	3,2 g	25 ml
	Aqua dest.	ad 50 ml	
	Salzsäure ² , 0,1 N	bis pH 7,2	
	Aqua dest.	ad 100 ml	
Kalziumchlorid ¹⁰ , wasserfrei, rein			0,025 g

Gebrauchslösung (2,51% PFA und 3,02% GA)

Gepufferte Paraformaldehydlösung	35 ml
25 % Glutaraldehyd ¹¹ , EM-Grade	4,8 ml

Natriumcacodylatpuffer 0,05 M

Natriumcacodylatpuffer 0,1 M, pH 7,2	Natriumcacodylat 0,2 M, pH 7,2	50 ml	25 ml
	Aqua dest.	ad 100 ml	
Aqua dest.			ad 100 ml

Osmiumtetroxid-Kaliumferrocyanid-Lösung

2% Osmiumtetroxid-Lösung			1 Teil
	4% Osmiumtetroxidlösung ¹¹ , 4%	2 ml	
	Natriumcacodylatpuffer 0,05 M	2 ml	
3% Kaliumferrocyanid-Lösung			1 Teil
	Kaliumferrocyanid ¹	0,3 g	
	Natriumcacodylatpuffer 0,05 M	ad 10 ml	

Färbelösung nach Richardson

Methylenblau-Lösung		100 ml
1% Methylenblau ³ (1g auf 100ml Aqua dest.)	1 g	
Aquadest.	ad 100 ml	
1% Borax-Lösung		100 ml
1% Borax (Natriumtetraboratdecahydrat ¹⁰)	1 g	
Aqua dest.	ad 100 ml	
1% Azur II-Lösung		200 ml
Azur II ³	2 g	
Aqua dest.	ad 200 ml	

Bleicitrat nach Reynolds

Blei(II)nitrat ¹ , ACS-Reagenz	1,33 g
Natriumcitrat tribasisch Dihydrat ¹ , ACS-Reagenz	1,76 g
Aqua bidest.	ad 50 ml
Lösung 1 Min stark schütteln, dann 30 min nur ab und zu schütteln	
Natriumhydroxid ¹ 1 N dazutropfen, bis Lösung durchsichtig ist	ca. 8 ml
Aqua bidest.	ad 50 ml

Epon Epoxidharz

1,2,3-Propanetriol, Polymer mit Chlormethyloxiran (Poly/Bed 812) ¹¹	10 ml
Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid ¹¹	8 ml
Methyl Nadic Anhydrid ¹¹	5 ml
Benzyl dimethylamin ¹¹	1 ml

Uranylacetat-Lösung

98% Uranylacetat ¹¹ , ACS-Reagenz	1 g
Aqua bidest.	ad 50 ml
vor Verwendung filtrieren	

Bezugsquellen:

- ¹ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- ² Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- ³ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- ⁴ Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co., Köngen, Deutschland
- ⁵ Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach am Main, Deutschland
- ⁶ Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co., Stuttgart-Untertürkheim, Deutschland
- ⁷ Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
- ⁸ Agar Scientific Elektron Technology UK Ltd, Stansted, UK
- ⁹ MP Biomedicals Germany, Eschwege, Deutschland
- ¹⁰ Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- ¹¹ Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland

X. DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz für die Überlassung des Themas, für wissenschaftliche Betreuung als Doktorvater bei der Erstellung dieser Arbeit und für die Bereitstellung der Materialien und des Arbeitsplatzes bedanken. Desweiteren danke ich ihm für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Ich möchte mich ebenfalls bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie für die Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen bedanken. Besonderer Dank gilt Herrn Y. Gök für die freundliche Betreuung bei den lichtmikroskopischen und glykohistochemischen Untersuchungen und für die geduldige Einarbeitung in die Schneidetechnik am Mikrotom. Frau W. Scholz danke ich ebenfalls für die Anfertigung der Schnitte für die Elektronenmikroskopie und ihr persönliches Engagement bei der Erstellung meiner Arbeit. Frau G. Rußmeier möchte ich danken für die Anleitung zu den immunhistochemischen Untersuchungen. Herrn F. Habermann danke ich für seine Einarbeitung in die Mikroskopiertechnik und die Bearbeitung der Abbildungen. Frau A. Servatius danke ich ebenfalls für die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

Frau M. Kazior danke ich für die Betreuung in organisatorischen Angelegenheiten.

Bei Familie Engelhardt von der Straußenfarm Donaumoos in Leipheim möchte ich mich herzlich bedanken für die freundliche Unterstützung bei der Gewinnung der Proben, die kostenlose Überlassung des Untersuchungsmaterials und für die Einführung in die Lebensweise der Straußen.

Hiermit möchte ich auch all meinen Freunden danken, die jahrelang ein offenes Ohr für mich übrig hatten.

Besonders danken möchte ich meinem Freund Marlon, der mich bedingungslos unterstützt hat während Erstellung dieser Arbeit. Dafür, dass er mich seit Jahren begleitet und mir den Rücken gestärkt hat. Ich bin unglaublich glücklich und dankbar, dass Du an meiner Seite bist.

Meinen Schwestern Madeleine und Marie möchte ich ebenfalls danken für die aufbauenden Worte und die Unterstützung in dieser Zeit.

Meiner Mama widme ich meine Disseration aus riesigem Dank für die Ermöglichung dieser Arbeit und für ihren stetigen Rückhalt. Ich danke dir von ganzem Herzen, dass Du mich stets mit Deinem großen Vertrauen unterstützt und immer für mich da bist!