

Aus dem Institut für Anatomie
der Universität Regensburg

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. med. vet. et rer. nat. K.-H. Wrobel

vorgelegt über
Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz
Institut für Tieranatomie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tieranatomie II

**Innervation des Cervidenhodens: Immunhistochemische
Untersuchung am Damhirsch, *Dama dama***

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

von

Eveline Susanne Schenk
aus
Heilbronn

München 2004

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz
Korreferentin: Priv.-Doz. A. Fischer

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1 Bau und Funktion des Hodens	3
1.2 Gefäßversorgung des Hodens	5
1.3 Vegetative Innervation der Beckenorgane und des männlichen Geschlechtapparates	6
1.3.1 Innervation des Hodens	7
1.4.1 Ziel der Arbeit	9
1.4.2 Charakterisierung der verwendeten neuronalen Marker	9
1.4.3 Protein-Gene-Product-9.5 (PGP-9.5)	9
1.4.4 Neuronenspezifische Enolase (NSE)	9
1.4.5 Neurofilament (NF)	10
1.4.6 Growth-associated Protein-43 (GAP-43)	10
1.4.7 Dopamin-beta-hydroxylase (DBH)	11
1.4.8 Tyrosinhydroxylase (TH)	11
1.4.9 Acetylcholinesterase (AChE)	11
1.4.10 Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP)	12
1.4.11 Neuropeptide Y (NPY)	12
1.4.12 Substance P (SP)	12
1.4.13 Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP)	12
1.4.14 Myelin Basic Protein (MBP)	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Materialentnahme	14
2.2 Fixierung	15
2.3 Präparation der Materialblöcke	15
2.4 Herstellung der Kryostatschnitte	17
2.5 Enzymhistochemie	17
2.5.1 Acetylcholinesterase	17
2.6 Immunhistochemie	21

3. Befunde	27
3.1 Allgemeines Innervationsmuster	27
3.2 Spezifische Nervennachweise am Hoden	57
3.2.1 Verteilung adrenerger Nervenfasern	57
3.2.2 Verteilung peptiderger Nervenfasern	58
3.2.3 Verteilung cholinergischer Nervenfasern	60
3.2.4 Vorkommen markhaltiger Nervenfasern	61
4. Diskussion	70
5. Zusammenfassung	82
6. Summary	83
7. Literaturverzeichnis	84
8. Anhang	106
8.1 Abkürzungen	106
8.2 Lebenslauf	107
8.3 Danksagung	108

1. Einleitung

1.1 Bau und Funktion des Hodens

Der Hoden ist bei allen Wirbeltieren als paariges Organ angelegt. Bei den meisten Säugetieren kann er eiförmige bis kugelige Form haben und befindet sich dauerhaft außerhalb der Bauchhöhle im Hodensack, dem Skrotum.

In Längsrichtung lagert sich ihm der Nebenhoden an und ist mit ihm am Margo epididymalis durch ein Gekröse (Mesorchium) eng verbunden. Das Ligamentum testis proprium, ein kurzes, straffes Band, verbindet den Nebenhodenschwanz mit dem kaudalen Hodenpol. Die dem Nebenhoden gegenüberliegende freie Seite des Hodens wird als Margo liber bezeichnet.

Die stark geschlängelte A. testicularis, der venöse Plexus pampiniformis und der Ductus deferens sind die zentralen Leitungsbahnen im Inneren des Samenstranges, der den Hoden - abhängig von seiner Position im Skrotum - nur kranial oder auch am Margo epididymalis kontaktiert.

Der Hoden besitzt einen Bauchfellüberzug (Epiorchium), der fest mit seiner derben Kapsel, der Tunica albuginea, verwachsen ist. In ihr bilden die Verzweigungen der tunikalen Arterien und Venen die Tunica vasculosa. Unter dieser Kapsel befindet sich das Hodenparenchym. Dieses wird von mehr oder weniger deutlich ausgebildeten bindegewebigen Septen, den Septula testis, in denen auch Blutgefäße und Nerven verlaufen, durchzogen. Die Septula testis unterteilen das Parenchym undeutlich in einzelne Läppchen, die Lobuli testis, welche die Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) und das intertubuläre Gewebe mit den Leydigzellen enthalten. Die stark geschlängelten Tubuli seminiferi können beträchtliche Länge erreichen, sind in der Regel haarnadelförmig, und münden meist über zwei Tubuli recti in das intratestikuläre Rete testis, welches in das Mediastinum testis eingebettet ist. Die Ductuli

efferentes leiten die Spermien aus dem Rete testis in den Nebenhodenkanal weiter.

Die hauptsächliche Funktion des Hodens besteht in der Produktion männlicher Keimzellen (Spermatogenese) in den Tubuli seminiferi, sowie der Bildung der männlichen Geschlechtshormone (Androgene) in den Leydigzellen. Beide Prozesse werden durch übergeordnete hormonelle (Hypophyse und Hypothalamus) und lokale Regelkreise, bei denen die Leydigzellen und die Sertolizellen eine Rolle spielen, gesteuert. Es gibt auch Hinweise, dass das autonome Nervensystem direkt in der Regulation der Hodenfunktionen eingreift. Linsenmeyer et al. (1994) untersuchten die Auswirkungen einer Rückenmarksverletzung bei Ratten nach Ablauf von 2 und 4 Wochen. Zwei Wochen nach der Verletzung fand eine komplette Spermatogenese statt, doch waren Anormalitäten in den Tubuli seminiferi zu beobachten. Die Hormonkonzentrationen waren unverändert. Nach 4 Wochen fand in den Tubuli seminiferi der Ratten mit Rückenmarksverletzung bei einigen Tieren eine inkomplette Spermatogenese statt; ferner wurden eine verspätete Spermiation oder teilweise eine unspezifische Regression des Epithels der Tubuli seminiferi beobachtet. Die Testosteronkonzentrationen im Serum der Ratten mit Rückenmarksverletzung waren etwas niedriger, doch die Konzentrationen im Hoden selbst unterschieden sich nicht von der Kontrollgruppe. Plasmatisches Gonadotropin war in beiden Gruppen gleich. Auch bei Rückenmarksverletzungen, die mehr als 4 Wochen bestanden, beobachteten Huang et al. (1998) eine Regression der Spermatogenese bei 70% der Ratten bei normalen Hormonkonzentrationen (FSH, LH, Testosteron). Da diese Regression sich nicht durch eine exogene Zufuhr von Testosteron verhindern liess, vermuten die Autoren weitere nicht-endokrine Kontrollmechanismen bei der Samenzellbildung.

Die Spermatogenese, die in den Tubuli seminiferi stattfindet, beginnt mit Eintritt der Geschlechtsreife und läuft in unterschiedlicher Intensität kontinuierlich oder bei saisonellen Spezies auch unterbrochen durch jahreszeitliche Einflüsse bis zum Lebensende weiter. Das

Keimepithel der Samenkanälchen besteht aus den Keimzellen und den regulativen Sertolizellen. Die Keimzellen durchlaufen unterschiedliche Vermehrungs- und Differenzierungsphasen, bis sie schließlich als Spermien in das Tubuluslumen abgegeben werden.

1.2 Gefäßversorgung des Hodens

Die Blutversorgung des Hodens wird von der Arteria testicularis übernommen, die als Arteria spermatica interna von der Aorta abdominalis abzweigt. Wenn sie den Hoden erreicht, zieht sie bei den Wiederkäuern in der Tunica albuginea am Margo epididymalis zum kaudalen Hodenpol, wo sie sich in mehrere Zweige aufteilt. Diese Arterien ziehen dann wieder nach kranial über den Margo liber des Hodens (Godinho et al. 1972). Auf ihrem Weg zum cranialen Hodenpol geben die tunikalen Arterien Äste ab, die in die Septula testis eintreten und in Richtung Mediastinum ziehen, wo sie bei vielen Spezies charakteristische Arterienkonvoluten ausbilden. Septale Arterien und Konvolutarterien versorgen mit ihren Arteriolen und Kapillaren das Parenchym, sowie das Mediastinum. Als venöser Abfluß dienen hauptsächlich Venen, die zur Organkapsel und von dort in den Plexus pampiniformis ziehen, aber auch solche, die mit den Ductuli efferentes den Hoden am kranialen Pol verlassen. Der Plexus pampiniformis umgibt die A. testicularis im Bereich des Samenstrangs. Die innige topographische Beziehung zwischen Venen und Arterien dient der Temperatur- und Blutdruckregulation, da die Spermatogenese um 2-5° C unter der Körpertemperatur und bei gleichmäßigem Blutfluß stattfindet. Auch ein Androgenaustausch, der für die hohe intratestikuläre Androgenkonzentration mitverantwortlich gemacht wird, kann in diesem Abschnitt zwischen Venen und Arterien stattfinden (Jacks und Setchell 1973; Frankel und Ryan. 1981; Setchell et al. 1983).

1.3 Vegetative Innervation der Beckenorgane und des männlichen Geschlechtsapparates

Die Innervation der Beckenorgane erfolgt über sympathische und parasympathische Anteile des vegetativen Nervensystems. Dazu kommen peptiderge Fasern und afferente Nerven.

Im Hoden, Nebenhoden und Ductus deferens dominiert die sympathische Innervation. Im Unterschied zu anderen sympathisch innervierten Organen liegt hier eine Population von Ganglien oft peripher und nahe dem Effektorgan (Owman und Stjernquist 1988). Die Existenz solcher peripher umgeschalteter Neurone bewies Sjöstrand (1962) anhand einer Reizung des N. hypogastricus nach Einsatz von Ganglienblockern am Ductus deferens des Meerschweinchens, wobei keine Reaktion festzustellen war. Owman und Sjöstrand (1965) bezeichneten diese Neurone als „short adrenergic neurons“. Daneben kommen auch „long adrenergic neurons“ vor.

Die parasympathischen Nervenfasern der inneren männlichen Geschlechtsorgane sind bis jetzt nur in geringem Maße eindeutig nachgewiesen worden. Es gibt eine Reihe von histochemischen Untersuchungen, die indirekt auf eine cholinerge Innervation hindeuten (Risley und Screpetos 1964; El-Badawi und Schenk 1967; Bell und McLean 1973), die aber alle älteren Datums sind und mit suboptimaler Technik durchgeführt wurden.

Eine peptiderge Innervation der Geschlechtsorgane wurde bereits von Baumgarten und Holstein (1971) diskutiert. Doch Alm et al. (1977) beschrieben anhand einer VIP-Immunreaktion erstmals die Präsenz peptiderger Fasern im Urogenitaltrakt. Peptiderge Transmitter treten auch kolokalisiert mit typischen Neurotransmittern der sympathischen und parasympathischen Nerven auf.

Die gesamte autonome Nervenversorgung des männlichen Genitaltraktes wird nach Ursprung, Verlauf und Zielorgan in drei Anteile untergliedert (Mitchell 1935): Nervus spermaticus

superior, Nervus spermaticus intermedius und Nervus spermaticus inferior.

Der Nervus spermaticus superior besteht überwiegend aus Fasern des Plexus mesentericus inferior (Hodson 1970) und begleitet die A. spermatica interna, später A. testicularis, seit ihrem Abgang aus der Aorta, um mit ihr gemeinsam bis zum Hoden zu ziehen. Der Nervus spermaticus inferior folgt und innerviert den Ductus deferens und den kaudalen Nebenhoden und entspringt dem Plexus pelvinus (Hodson 1970). Der Nervus spermaticus intermedius enthält Fasern aus dem N. hypogastricus und ist nur bei einigen Spezies als gesonderter Nerv zu identifizieren (Cross und Glover 1958; Norberg et al. 1967b).

1.4 Innervation des Hodens

Die Angaben über die Nervenversorgung des Hodens sind zum Teil kontrovers, doch einig ist man sich, dass die meisten Nerven gefäßbegleitend oder in der Wand von Gefäßen verlaufen (Hodson 1970). Shioda und Nishida (1966) beschrieben afferente kapselfreie Nervenenden in der Tunica vasculosa des Bullen, wie sie auch beim Menschen vorkommen (Yamashita 1939). In der Tunica albuginea werden die Blutgefäße meist von Nervenfasern begleitet und versorgt (Gray 1947; Risley und Screpetos 1964; Norberg et al. 1967a; Zhu et al. 1995). Von der Tunica albuginea zieht die Mehrzahl der Nervenbündel zusammen mit den Blutgefäßen weiter in die Septula testis. Innerhalb des Hodenparenchyms sind die hier auftretenden Nervenfasern ebenfalls meist mit Blutgefäßen (Arterien) assoziiert. Die Präsenz von Nerven in den Lobuli testis ist speziesspezifisch. Im menschlichen Hoden fanden Nistal et al. (1982) Axone, die sich den intertubulären Gefäßen näherten, aber auch Kontakt zur Lamina propria der Tubuli seminiferi aufnahmen, in diese allerdings nicht vorstießen. Ein ähnlicher Befund wurde auch von anderen Autoren mitgeteilt (Kuntz und Morris 1946; Okkels und Sand 1940; Gray 1947; Stach 1963; Shioda und Nishida 1966; Baumgarten und Holstein 1967). Bei einem in vitro

durchgeführten Versuch beobachteten Miyake et al. (1986) als Reaktion auf Acetylcholin und Noradrenalin eine dosisabhängige Kontraktion isolierter Tubuli seminiferi des Rattenhodens. Die Autoren interpretierten das Ergebnis als einen Hinweis auf eine autonome Innervation der Tubuli seminiferi und eine Steuerung der Kontraktion durch adrenerge Nervenfasern. Im Gegensatz dazu konnten Pholpramool und Triphrom (1984) bei ähnlichen Experimenten unter anderem mit Noradrenalin und Metacholin keine eindeutigen Reaktionen provozieren. Außerdem fanden Norberg et al. (1967) keine adrenergen oder Cholinesterase-positiven Nervenfasern in den Tubuli von Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen. Eine immunohistochemische Untersuchung von Properzi et al. (1991) konnte im Hodenparenchym präpuberaler, puberaler und adulter Ratten ebenfalls keine Nervenfasern nachweisen.

Bei verschiedenen Spezies wird auch von einer Innervation der Leydigzellen in den Lobuli testis berichtet. Baumgarten und Holstein (1968) beschrieben beim Schwan ein Nervengeflecht zwischen den Tubuli seminiferi, das vorwiegend die Leydigzellen umhüllte. Daraus schlossen sie, dass bei dieser Spezies die Zwischenzellen direkt innerviert werden. Ein direkter Kontakt zwischen Leydigzellen und Nervenfasern ist bei anderen Spezies nicht so häufig, wurde aber beim Menschen (Yamashita 1939; Okkels und Sand 1940; Gray 1947; Van Campenhout 1949; Baumgarten und Holstein 1967,1971; Nistal et al. 1982), beim Hund (Stach 1963), bei der Katze (Norberg et al. 1967, Gürtler 2001), bei Reptilien (Unsicker 1974) und beim Rhesusaffen (Mayerhofer et al. 1996) beobachtet.

Im Mediastinum werden nur selten Nervenfasern gefunden (Baumgarten und Holstein 1968). Bei einigen Tierarten werden auch altersbedingte Unterschiede in der Innervation des Hodens beschrieben. So ist die Nervenversorgung im juvenilen Hoden des Rindes und des Schweines intensiver und gleichmäßiger als in späteren Stadien der Geschlechtsentwicklung, wo sie sich immer mehr zurückzieht (Wrobel und Abu-Ghali 1997; Wrobel und Brandl 1998). Beim Esel

beschrieben Wrobel und Moustafa (2000) eine stärkere Innervation am Margo epididymalis . Saleh et al. (2002) wiesen auf saisonale Unterschiede in der Innervation des Kamelhodens hin, wenn man die Nervendichte im Sommer, Herbst, Winter und Frühling vergleicht.

1.5 Ziel der Arbeit

Es liegen bisher keine Untersuchungen über die Innervation des Cervidenhodens vor. Am Modell des Damhirsches soll zunächst das allgemeine Innervationsmuster mit immunhistochemischen und enzymhistochemischen Markern aufgeklärt werden. Ein weiteres Ziel ist die Einteilung der autonomen Nerven in adrenerge, cholinerge, peptiderge und myelinisierte Fasern anhand der spezifischen Immunmarker. Die Ergebnisse sollen mit den Befunden bei anderen Ungulaten verglichen werden.

1.6 Charakterisierung der verwendeten neuronalen Marker

1.6.1 Protein-Gene-Product-9.5 (PGP-9.5)

Protein-Gene-Product-9.5 (PGP-9.5) ist ein neuronales zytoplasmatisches Protein mit unbekannter Funktion. Es wurde von Jackson und Thompson (1981) zunächst beim Menschen als neues hirnspezifisches Protein entdeckt. Sein MG beträgt circa 27 KD, und hat eine Mobilität von 9,5 cm in der eindimensionalen Gelelektrophorese. Ein polyklonaler Antikörper gegen PGP-9.5 erwies sich in vielen Organen und Geweben verschiedener Spezies als genereller zytoplasmatischer Marker für afferente und efferente Nervenfasern (Wilson et al. 1988; Dalsgaard et al. 1989; Wang et al. 1990). Allerdings können auch nicht-neuronale Zellen mit dem Antikörper reagieren. Im Hoden sind das die Zellen des basalen Tubuluskompartimentes (Wrobel et al. 1995)

1.6.2 Neuronenspezifische Enolase (NSE)

Enolasen sind Enzyme der Glykolyse. Analog zu anderen glykolytischen Enzymen sind von der NSE verschiedene Isoenzyme bekannt. Das α -Isoenzym wird als nicht neuronale Enolase bezeichnet (NNE) und überwiegend in Gliazellen des ZNS gefunden (Schmechel et al. 1978). Das γ -Isoenzym wird heute, nachdem es mehrfach umbenannt wurde, als neuronenspezifische Enolase (NSE) bezeichnet. NSE hat ein MG von 78 KD. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten eine positive NSE-IR in Nerven verschiedener Organsysteme wie Harnapparat, weiblicher Geschlechtstrakt, Atemapparat, Herz und Haut von verschiedenen Spezies wie Ratte, Maus, Meerschweinchen, Katze, Schwein, Affe und Mensch. Die Anti- NSE- Immunreaktion kann als genereller neuronaler Marker eingesetzt werden (Alm et al. 1988).

1.6.2 Neurofilament (NF)

Neurofilament besteht aus einem Triplet von Polypeptiden und zeigt speziesspezifische Variationen des Molekulargewichts (68, 150, 200 KD). Es ist als Intermediärfilament im Nervengewebe nachweisbar (Hoffmann und Lasek 1975). Die meisten Zellen und Gewebe neuronalen Ursprungs enthalten alle drei Polypeptide, wie durch immunhistochemische Untersuchungen nachgewiesen wurde (Shaw und Weber 1981; Trojanowski et al. 1986). Gegen NF existieren verschiedene Formen von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern. Erstmals entwickelt wurden Antisera gegen NF von Dahl und Bignami (1977). Hacker et al. (1985) fanden NF in neuronalen Strukturen vom Urogenitalsystem, Atmungssystem, Herz, Pankreas und Haut verschiedener Säugetiere. NF wurde auch im Ductus deferens des Bullen (Kujat et al. 1993) und im Hoden des Bullen, des Ebers, des Esels und des Kamels (Wrobel und Abu-Ghali 1997; Wrobel und Brandl 1998; Wrobel und Moustafa 2000; Saleh et al. 2002) nachgewiesen

1.6.4 Growth-associated-Protein-43 (GAP –43)

GAP-43 ist ein Kalmodulin-bindendes Phosphoprotein und hat eine wichtige Rolle beim axonalen Wachstum inne (Meiri et al. 1988; Skene 1990; Snipes et al. 1987; Zhu and Julien 1999). Weitergehende Untersuchungen zeigen aber, dass dieses Phosphoprotein ebenfalls in vielen Axonen des adulten Nervensystems gefunden wird, so dass es als panneuraler Marker eingesetzt werden kann.

1.6.4 Dopamin-beta-hydroxylase (DBH)

Die Dopamin-Beta-Hydroxylase wandelt Dopamin in Noradrenalin um. Unter Wirkung der Transmethylase wird Noradrenalin zu Adrenalin methyliert (Schmidt 1983). Die DBH-IR hat adrenerge Nervenfasern im Hoden verschiedener Spezies nachgewiesen (Lamano Carvalho et al. 1986; Campos et al. 1990; Tainio 1994; Rauchenwald et al. 1995; Lakomy et al. 1997; Wrobel und Abu-Ghali 1997; Wrobel und Brandl 1998; Wrobel und Moustafa 2000; Gürtler 2001; Saleh et al. 2002)

1.6.5 Tyrosinhydroxylase (TH)

Dieses Enzym katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Anfangsschritt in der Biosynthese der Katecholamine wie Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin. So stellt diese Immunreaktion dopaminerge und adrenerge Neurone und auch chromaffines Gewebe dar (Stryer 1987). TH-positive Nervenfasern haben im Hoden in der Regel die gleiche Lokalisation wie DBH-IR Fasern.

1.6.7 Acetylcholinesterase (AChE)

Die Acetylcholinesterase ist ein Enzym, das die Spaltung von Acetylcholin in Acetat und Cholin katalysiert. In der Literatur ist die Spezifität der histochemischen AChE-Reaktion zum Nachweis cholinergischer Nervenfasern umstritten (Rossier 1975; Eckenstein und Thoenen, 1981; Kimura et al. 1984). In manchen Studien wird AChE als allgemeiner Nervenmarker eingesetzt (Yuri 1990; Järvi und Pelto-Huikko 1990; Crowe et al. 1991). Die Verwendungsmöglichkeit der AChE-Reaktion für den selektiven Nachweis cholinergischer Nervenfasern wird im Kapitel Material und Methoden genauer beschrieben.

1.6.8 Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP)

Dieser Neurotransmitter ist ein Polypeptid aus 28 Aminosäuren und wurde erstmals von Said und Mutt (1970) aus dem Darm des Schweines isoliert.

1.6.9 Neuropeptide Y (NPY)

NPY ist eines der häufigsten Neuropeptide im Nervensystem der Säugetiere und wird aus 36 Aminosäuren gebildet (Tatemoto, 1982). Es findet sich sowohl in Neuronen des zentralen als auch peripheren Nervensystem und ist oft mit Noradrenalin kolokalisiert (Lundberg et al. 1982). Es wurde im Hoden der Ratte, der Katze, des Rindes, des Esels und des Kamels beschrieben (Allen et al. 1989; Wrobel und Abu-Ghali 1997; Gürtler 2001; Wrobel und Moustafa 2000; Saleh et al. 2002).

1.6.10 Substance P (SP)

Substance P wurde erstmals in Darmextrakten des Pferdes entdeckt. Es besteht aus 11 Aminosäuren. Alm et al. (1978) wiesen Substance P-immunopositive Nervenfasern im Urogenitaltrakt nach. SP-positive Nervenfasern sind zumeist afferent (Hökfelt et al. 1975).

1.6.11 Calcitonin-Related Peptide (CGRP)

CGRP ist ein Neuropeptid aus 37 Aminosäuren. Es scheint in der Vermittlung von Schmerzempfindung und in der Modulation des autonomen Nervensystems eingebunden zu sein (Rosenfeld et al. 1983). Außerdem bewirkt es eine Vasodilatation der Blutgefäße im Hoden der Ratte und könnte so an der Regulation des testikulären Blutflusses beteiligt sein (Lissbrant et al. 1997).

1.6.11 Myelin Basic Protein (MBP)

Ungefähr 30 % der myelinisierten Proteinmasse im Zentralnervensystem besteht aus dem Myelin Basic Protein (MBP). Es ist ein wasserlösliches Membranprotein, welches an der zytoplasmatischen Seite der Myelinmembran lokalisiert ist (Omlin et al. 1982). Wir verwenden die immunhistochemische Reaktion gegen MBP als einen Marker zum Nachweis markhaltiger Nervenfasern.

2. Material und Methoden

2.1 Materialentnahme

Das Material wurde von Damwild (Dama dama) aus Gehegehaltung gewonnen. Es wurden insgesamt 14 Tiere verwendet. Alter und Entnahmezeitpunkt werden in der Tabelle 1 dargestellt. Die Hirsche sind nach steigendem Hodenvolumen geordnet.

Tabelle 1: Alter der Hirsche, Entnahmezeitpunkt der Hoden und ermitteltes Hodenvolumen

Alter	Entnahmezeitpunkt	Hodenvolumen des rechten und linken Hodens (in ccm)
6 Monate	Dezember	0,89/1,26
6 Monate	Dezember	1,83/1,50
10 Monate	April	2,79/-
6 Monate	Dezember	3,02/2,68
11 Monate	Mai	7,66/7,42
11 Monate	Mai	12,38/11,76
18 Monate	Dezember	13,92/14,22
13 Monate	Juli	12,98/18,52
18 Monate	Dezember	17,86/14,04
17 Monate	November	22,25/23,28
17 Monate	November	23,76/24,24
21 Monate	März	31,67/28,56
16 Monate	Oktober	49,87/46,75
15 Monate	September	56,55/50,42

Alle Tiere waren in gutem Allgemeinzustand. Die Hoden wurden sofort nach dem Schuss entnommen, ohne dabei die Tunica albuginea zu beschädigen. Länge und Breite der entnommenen Hoden wurden mit einer Schublehre festgestellt. Aus diesen Messwerten wurde nach der Formel für das Volumen des Rotationsellipsoids (V)

$$V = 1/6 \times \pi \times \text{Länge} \times \text{Breite}^2$$

das unkorrigierte Hodenvolumen ermittelt. Da Wiederkäuerhoden geringfügig von der Form

des Rotationsellipsoids abweichen, wurde ein Korrekturfaktor (0,945) eingeführt, der empirisch ermittelt wurde (Wrobel 1990). Für den Transport in das Labor wurden die Hoden in Eis gekühlt. Gewebeproben wurden nach einem festgelegten Schema entnommen (Abb. 1) und anschließend fixiert. Die Probenentnahme aus den kleinen Hoden der 6 Monate alten Tiere wurde entsprechend der Abb. 2 modifiziert.

2.2 Fixierung

Die Fixierung der Proben erfolgte mittels Immersion in Gemischen aus Glutaraldehyd, Formaldehyd und Pikrinsäure.

Fixierlösung I: 1000 ml enthalten:

Glutaraldehyd 25 %	6 ml
Gesättigte Pikrinsäure	150 ml
Paraformaldehyd 15 %	160 ml
Aqua bidest	184 ml
Phosphatpuffer 0,2 M	500 ml

Fixierlösung II: wie Fixierlösung I aber ohne Glutaraldehyd

Die Gewebeproben wurden zunächst 20 Minuten in Lösung I dann für mindestens 2 h in Lösung II fixiert.

2.3 Präparation der Materialblöcke

Nach der Fixierung wurden die Präparate für das Schneiden im Kryostat vorbereitet. Hierfür wurden sie in Saccharoselösungen aufsteigender Konzentration (10%, 20% ,30% und 40%) und zuletzt in einer Mischung von Saccharose 40% und Tissue-Tek OCT-Compound (Miles, Diatec Hallstadt) gespült. Anschließend wurden sie in Haltevorrichtungen aus Messing gelegt, in Tissue Tek eingebettet und in flüssigem Stickstoff gefroren. Danach wurden die Blöcke

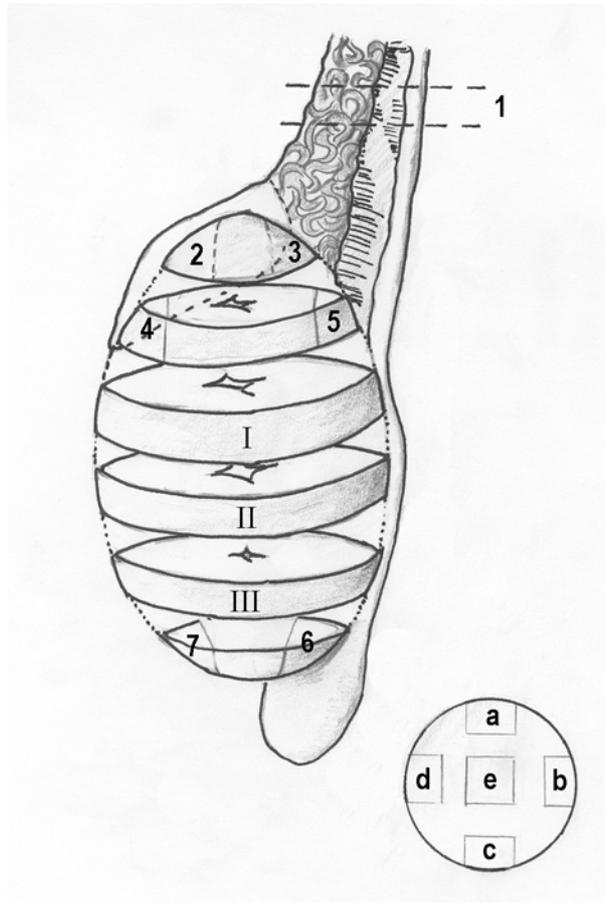


Abb. 1: Schema der Probeentnahme. In der Regel werden pro Hoden 22 Einzelproben entnommen.

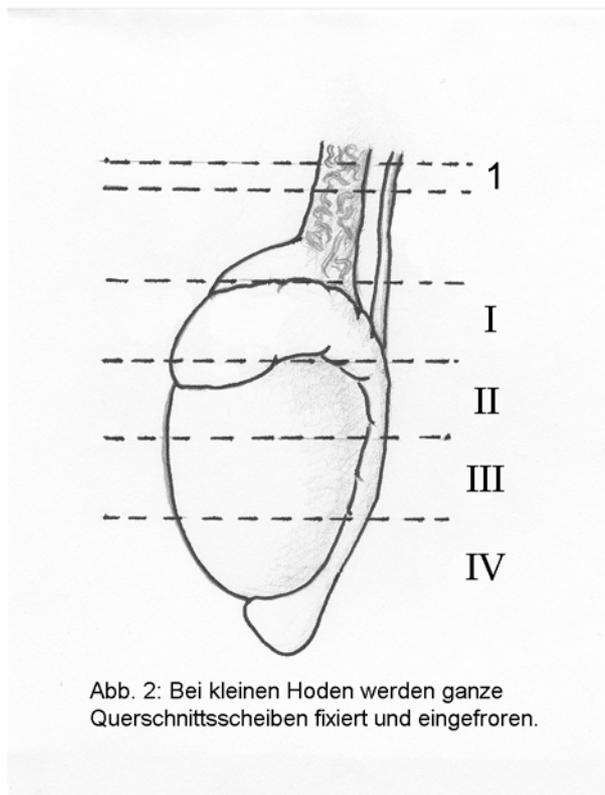


Abb. 2: Bei kleinen Hoden werden ganze Querschnittsscheiben fixiert und eingefroren.

rasch in den Kryostaten überführt und auf geeignete Objekthalter aus Messing mittels einer dünnen Schicht Tissue-Tek aufgefroren.

2.4 Herstellung der Kryostatschnitte

Zur Herstellung der Gefrierschnitte wurde ein Kryostat (Microm HM 500 OM) verwendet. Es wurden histologische Schnitte von 12 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger, die mit Chromgelatine beschichtet waren, aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur 30 min luftgetrocknet und für die Immunhistochemie zusätzlich mit einem PAP-Pen (SCI München) umrahmt, um ein Abfließen der Inkubationsmedien zu vermeiden. Alle nachfolgenden histochemischen Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.5 Enzymhistochemie

2.5.1 Acetylcholinesterase

Zur Darstellung von Nervenfasern im Hodengewebe wurde die AchE-Nachweismethode nach Kujat et al. (1993) verwendet.

Prinzip der Reaktion

Acetylcholinesterase kommt in Erythrozyten, Nervenzellen, Synapsen und den motorischen Endplatten der quergestreiften Muskulatur vor. Außerdem ist die AchE in den Nieren verschiedener Säuger in den Bowman'schen Kapseln und in Endothel- und Mesangiumzellen des Glomerulums nachweisbar (Luppa et al. 1992)

Die Reaktion beruht auf einer festgelegten Reihenfolge zweier Reaktionsschritte:

1. Sulfhydrylgruppen, die durch enzymatische Hydrolyse eines Acetylcholin-Salzes freigesetzt wurden, reduzieren in der Substratlösung Ferricyanid-Ionen (Fe-III) zu Ferrocyanid-Ionen (Fe-II) und werden dabei durch ihre Elektronenabgabe selbst oxidiert.
2. Die Ferrocyanid-Ionen bilden mit in der Inkubationslösung vorhandenen Kupferionen Kupferferrocyanat, einen braunen Niederschlag, der auch als Hachett-Braun bezeichnet wird und die positive Reaktion anzeigt. Der Zusatz von Iso-Ompa (Sigma, Deisenhofen) hemmt selektiv die unspezifischen Esterasen und Cholinesterasen des Gewebes, die ebenfalls Acetylthiocholinchlorid umsetzen können. Iso-Ompa (Tetraisopropylpyrophosphoramid) wird in einer Endkonzentration von 0,01 mM/l hinzugefügt.

Variationen der Versuchsbedingungen

Die Originalmethode zum Nachweis von AchE von Karnovsky und Roots (1964) lieferte nur teilweise zufriedenstellende Ergebnisse. Denn das Medium erwies sich zum einen als wenig stabil (Pearse 1972; Lojda et al. 1976; Romeis 1989) und musste häufig gewechselt werden, zum anderen gelang es offensichtlich nicht, alle im Gewebe vorhandenen Nerven anzufärben. Die Originalmethode wurde deshalb in zweierlei Hinsicht modifiziert (Tsuji und Larabi 1983)

- Kupfersulfat wurde durch Kupferchlorid ersetzt
- Acetylthiocholinjodid wurde durch Acetylthiocholinchlorid ersetzt

Außerdem wurde der Maleatpuffer durch MES-Puffer (SIGMA) ausgetauscht und Karion F (MERCK, Darmstadt) hinzugefügt (Kujat et al. 1993). Der MES-Puffer gehört zu den biologischen Puffern, die sich durch ihre chemische Neutralität auszeichnen. Auch wegen der geringen Kupferionen-Bindungskapazität eignet sich MES-Puffer besonders gut als Teil der

Inkubationslösung bei der Acetylcholinesterasereaktion. (Good et al. 1966). Die Veränderungen in der Zusammensetzung der Inkubationslösung bewirken eine höhere Stabilität gegenüber der Originallösung. Dadurch wird eine längere Inkubationszeit möglich, und die Bildung unspezifischer Komplexe verringert sich. Die Inkubationslösung nach Kujat et al. (1993) ist bei 5°C über mindestens 24 h stabil, fällt nicht aus und bildet keine unspezifischen Präzipitate im Gewebe. Teilweise wurde eine Stabilität der Inkubationslösung bis 72 h erreicht, während der Originalansatz von Karnovsky und Roots (1964) nur wenige Stunden verwendbar ist (Pearse 1972; Lojda et al. 1976; Romeis 1989).

Die bis zu 24 h verlängerte Inkubationszeit ermöglicht es, auch Nervenfasern darzustellen, die sonst nicht oder nur schwach zu erkennen wären.. Eine kurze Inkubationszeit (1-2 h) stellt selektiv die cholinergen, eine lange Inkubation (24 h) die meisten Nervenfasern dar (Kujat et al. 1993).

Lösungen

Spüllösung I: Für 50 ml, entsprechend dem Füllvolumen einer Standküvette, werden benötigt:

MES-Puffer (0,6 M, pH 5,5	4,15 ml
Citratpuffer (0,2 M, pH 5,5)	2,5 ml
Karion F	10,0 ml
Aqua bidest	33,35 ml
Iso-Ompa (0,05 M/l)	100,0 µl

Inkubationslösung : Für 50 ml benötigt man:

MES-Puffer (0,6 M)	4,2 ml
Citratpuffer (0,2 M)	2,5 ml
Karion F	10,0 ml
Aqua bidest	22,0 ml
Kupferchlorid (0,1 M)	1,5 ml
Acetylcholinchlorid (SIGMA)	50,0 mg
In 10 ml Aqua bidest gelöst	
Kaliumferricyanidlösung (0,1 M)	250 µl
Iso-Ompa	100,0 µl

Damit die Kupfercitrationen entstehen, ist die Reihenfolge der Zugabe der einzelnen Substanzen einzuhalten.

Spüllösung II: Diese Lösung entspricht der Spüllösung I, jedoch ohne Iso-Ompa.

Versuchsanordnung

Die Acetylcholinesterasereaktion wurde folgendermaßen durchgeführt:

- Die Präparate wurden nach Lufttrocknung für 10 min in die Spüllösung I übertragen.
- Anschließend wurde für ca. 24 h bzw. 1-2 h bei der kurzen Inkubation, in der Substratlösung bei einem pH-Wert von 5,5 bei 5°C im Kühlschrank inkubiert. Das Medium wurde immer wieder darauf kontrolliert, ob Aufflockungen auftraten, was jedoch nicht der Fall war.

- Schließlich wurden die Präparate in der Spüllösung II für 10 min gespült und danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Depex (SERVA) eingedeckt.

Kontrollen

Die Kontrollen ohne Acetylcholinchlorid als Substrat fielen bei sonstiger Gleichbehandlung negativ aus.

2.6 Immunhistochemie

Prinzip der Methode

Das Prinzip der hier verwendeten Reaktionen beruht auf einer indirekten Avidin-Biotin-Methode. Ein gegen ein nachzuweisendes Antigen gerichteter, unkonjugierter Antikörper bindet an das Epitop des entsprechenden Antigens. Ein mit Biotin konjugierter sekundärer Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, bindet in einem zweiten Reaktionsschritt an den Primärantikörper. Vor der ersten Inkubation wurden die Gefrierschnitte mit Blockingpuffer behandelt, der neben dem fetalen Kälberserum in den meisten Fällen auch Ziegen serum enthielt, um unspezifische Bindungen der Antikörper im Gewebe zu verhindern.

Zur Hemmung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte mit Phenylhydrazin und Wasserstoffperoxid vorbehandelt (Jasani et al. 1986; Wynford-Thomas et al. 1986).

Anschließend erfolgte die Inkubation mit ABC (Avidin-Biotin-Complex). Bei Avidin, welches im Hühnereiweiß enthalten ist (Hsu et al. 1981; Romeis 1989), handelt es sich um ein Glykoprotein mit dem Molekulargewicht von 60 Kilodalton. Die extrem hohe Affinität des Avidinmoleküls zum Vitamin Biotin (Diss. konst. 10^{-15}) wird bei dieser Reaktion ausgenutzt.

Die Reaktion kann sequenziell erfolgen, wobei das mit Biotin konjugierte Avidin an einen mit Biotin konjugierten Antikörper bindet, oder aber Avidin dient als Brücke zwischen einem biotinylierten sekundären Antikörper an einen mit Biotin kovalent gebundenen Enzym (Hsu et al. 1981). Vor allem bei stärkerer Verdünnung der Primärantikörper wurde gegenüber der unspezifischen PAP-Methode (Sternberger 1979) eine signifikante Steigerung der Sensitivität festgestellt (Hsu et al. 1981). Vorversuche mit Streptavidin, einem Protein von *Streptomyces avidinii* und mit Biotin zeigten ebenfalls die Überlegenheit der Inkubation mit ABC (Wrobel und Kujat 1993).

Antikörper

Tabelle 2: Primäre Antikörper

Antikörper	Abkürzung	Spendertier	Verdünnung	Herkunft
Neurofilament	NF	Maus	1:80	Immunotech S.A., Frankreich
Neuron Specific Enolase	NSE	Kaninchen	1:5000	Cambridge Research, Großbritannien
Growth-associated Protein-43	GAP-43	Maus	1:40	Chemicon, Großbritannien
Protein-Gene Product-9.5	PGP-9.5	Kaninchen	1:5000	Ultracclone, Großbritannien
Dopamin-Beta-Hydroxylase	DBH	Maus	1:1000	Chemicon, Großbritannien
Tyrosinhydroxylase	TH	Maus	1:100	Chemicon, Großbritannien
Cholinacetyltransferase	ChAT	Ratte	1:1,75	Boehringer Mannheim, Deutschland
Vasoactive Intestinal Peptide	VIP	Kaninchen	1:5000	Cambridge Research, Großbritannien
Substance P	SP	Kaninchen	1:2000	Eugene Tech International, USA
Calcitonin-Gene-Related-Peptide	CGRP	Kaninchen	1:2000	Biotrend, Köln, Deutschland
Neuropeptide Y	NPY	Kaninchen	1:500	Cambridge Research, Großbritannien
Myelin Basic Protein	MBP	Maus	1:1000	Serotec, Eching, Deutschland

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Konzentration	Spendertier	Verdünnung	Herkunft
Goat-Antirabbit (IgG, biotinyliert)	1,0 mg/ml	Ziege	1:200	Dianova, Hamburg, Deutschland
Goat-Anti-Mouse (IgG, biotinyliert)	1,0 mg/ml	Ziege	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland
Goat-Anti-Rat (IgG, biotinyliert)	1,0 mg/ml	Ziege	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland

Modifikation der Versuchsbedingungen

Die Farbentwicklung der Immunreaktion wurde mit Diaminobenzidin (DAB) durchgeführt.

Dabei wurden die Schwermetalle NiCl_2 und CoCl_2 zugesetzt, um die Intensität der Färbung zu steigern (Hsu et al. 1981; De Jong et al. 1985; Scopsi und Larsson 1986).

Lösungen

Blockingpuffer: 100 ml enthalten:

Aqua bidest	20,0 ml
Tris-Puffer (0,2 M, pH 7,4) (SERVA)	40,0 ml
NaCl	800,0 mg
Thiomersal (SIGMA)	150,0 mg
Triton X-100 4% (SIGMA)	20,0 ml
Normales Ziegen Serum	10,0 ml
Fetales Kälberserum	10,0 ml

Waschpuffer : 520 ml enthalten:

Tris-Puffer (0,2 M, pH 7,4)	130,0 ml
Aqua bidest	390,0 ml
NaCl	4,16 g
Triton X-100 4%	200,0 μl

Avidin-Biotin-Complex (Vector, Burlingame, CA):

5 ml Tris-Puffer (0,1 M, pH 7,4)

80 µl Reagens A (Avidin-DH)

80 µl Reagens B (Biotinyliertes Enzym)

DAB-Kit (Immunotech, Hamburg):

5 ml Aqua bidest

+ 2 Tropfen Pufferlösung

+ 2 Tropfen DAB-Lösung

+ 200 µl NiCl₂ (1%)

+ 10 µl CoCl₂ (1%)

Lösung filtrieren

+ 2 Tropfen H₂O₂ (3%)

Versuchsanordnung

Nach dem Schneiden (Schnittdicke 12 µm) und Umranden mit PAP-Pen wurden die Schnitte folgendermaßen weiterbehandelt:

1. Inkubation mit Blockingpuffer zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 60 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.
2. Inkubation mit dem Primärantikörper (Tabelle 2) in jeweils optimaler Verdünnung (in Blockingpuffer) für 18 h (36 h für Anti-ChAT-IR) in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur (4°C für Anti-ChAT-IR).
3. Dreimaliges Spülen in Waschpuffer für jeweils 10 min in Standküvetten.
4. Inkubation mit dem sekundären biotinylierten Antikörper (Tabelle 3) in ebenfalls optimaler Verdünnung für 60 min in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

5. Zweimaliges Spülen in Waschpuffer für jeweils 10 min in Standküvetten.
6. Inkubation in Phenylhydrazin (1mg Phenylhydrazin (SIGMA) in 50 ml Waschpuffer) für 10 min bei 37°C.
7. Inkubation in Phenylhydrazin (siehe 6.) unter Zusatz von 5 µl H₂O₂ (6%) zur Absättigung der endogenen Peroxidase.
8. Dreimaliges Spülen wie unter 3.
9. Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex für 60 min in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Ansatz mit Tris-Puffer (0,1 M), pH 7,4.
10. Dreimaliges Spülen wie unter 3.
11. Färben der Schnitte mit der DAB-Lösung für 3-10 min bei Raumtemperatur.
12. Mehrmaliges Spülen mit dem Waschpuffer.
13. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und anschließend in Xylol.
14. Eindecken in Depex.

Kontrollen

Inkubationen ohne primären Antikörper (nur Blockingpuffer) fielen negativ aus. Proben aus dem dicht innervierten Musculus retractor penis des Rindes wurden als Positivkontrollen bei den Reaktionen mitgeführt.

3. Befunde

3.1 Allgemeines Innervationsmuster

Für ihre Eignung, die Nerven im Damhirschhoden darzustellen, wurden mehrere panneurale Marker verglichen: Immunreaktionen gegen NF, PGP-9.5, NSE, GAP-43 und die histochemische Acetylcholinesterase-Reaktion (AChE) bei einer Inkubation von 24h. Der Nachweis mit Antiserum gegen NF stellt deutlich die größeren und dickeren Nervenfaszikel dar, doch werden feine Nervenfasern, besonders in den Lobuli testis, nicht in ihrer Gesamtheit markiert (Abb.7). Das kann damit zusammenhängen, dass in den terminalen Nervenendigungen weniger Neurofilament enthalten ist. Die histochemische Reaktion mit Acetylcholinesterase (24h) markiert ebenfalls gut die dickeren Nervenbündel sowohl im Hoden als auch in der Tunica albuginea, doch die Darstellung der dünneren Nervenfasern zwischen den Tubuli seminiferi ist unzureichend. Außerdem wird das Erkennen feinerer Strukturen durch die starke Reaktion der Keimzellen in den Tubuli erschwert. Der Nachweis mit Antiserum gegen NSE stellt wiederum alle großen und dicken Nervenfaszikel und auch manche feineren Nervenstrukturen zufriedenstellend dar, allerdings nicht alle terminalen Nervenfasern in den Lobuli testis (Abb.6). Die Immunreaktion mit GAP-43 zeigt Nerven unterschiedlicher Größenordnung, konzentriert sich aber hauptsächlich auf die Gefäßnerven. Die PGP-9.5- Reaktion weist die besten Ergebnisse von allen panneuralen Nachweismethoden auf, erlaubt eine kontinuierliche Weiterverfolgung der Faszikel in den großen Nervenbündeln bis zu ihren feinsten Verzweigungen und zeigt außerdem eine gleichmäßige Intensität der Reaktionsprodukte bei guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Abb.5). Da PGP-9.5 außerdem sowohl mit den Spermatogonien adulter Hoden als auch mit den

Präspematogonien präpuberaler Hoden reagiert, ist diese Methode nicht nur zur Beschreibung der Nervenverteilung im Hoden von Nutzen, sondern auch für die Identifikation anderer Hodenstrukturen geeignet und ermöglicht somit das Erkennen der genauen topografischen Lage der Nerven.

Aus diesem Grund wurde die Immunreaktion gegen PGP-9.5 als Methode der Wahl für die Beschreibung der allgemeinen Nervenverteilung im Damhirschhoden verwendet. Die übrigen panneuralen Marker wurden lediglich ergänzend zur Erläuterung des Innervationsmusters herangezogen.

PGP-9.5 – Immunreaktion im Hoden

Im Hoden des Damhirsch gibt es keine auffälligen regionalen Unterschiede im Innervationsmuster. Die Nerven sind überwiegend im Stroma des Hodens, also der Tunica albuginea, dem Mediastinum testis und den Septula testis anzutreffen und innervieren dort schwerpunktmäßig die Blutgefäße. Dabei bilden die Nerven ein mehr oder weniger dichtes Netz in der Adventitia-Media-Grenzzone der Arterien und größeren Arteriolen. Kleinere Arteriolen in den Lobuli testis werden von wenigen isoliert verlaufenden Fasern begleitet. Die Venen des Gefäßkonus werden abschnittsweise innerviert, wobei die Fasern bis in die Media des Gefäßes vordringen können. In den anderen Bereichen im Inneren des Hodens werden die venösen Blutgefäße in der Regel überhaupt nicht innerviert. Wenige Nervenfasern ziehen direkt durch die intertubulären Leydigzellgruppen. Die Hodentubuli des Damhirsch haben keine Kontakte mit Nervenfasern.

Wie schon bei anderen Spezies beschrieben, treten die Nerven über drei unterschiedliche Wege an die Gonade heran (Abb.3,4):

1. Ein Teil der Nervenbündel befindet sich im kegelförmigen Abschnitt des Samenstrangs, welcher dem kranialen Hodenpol aufliegt (funikulärer Nervenzuschuß). Diese Fasern entstammen nach herkömmlicher Ansicht dem N. spermaticus superior.
2. Eine andere Nervengruppe zieht in dem Mesodeferens nach kaudal und tritt sukzessive von der epididymalen Seite über das Mesorchium an die Gonade heran (mesorchialer Nervenzuschuß).
3. Zuletzt treten Nerven über das Ligamentum testis proprium zwischen Nebenhodenschwanz und kaudalem Hodenpol in den Hoden ein (kaudaler Nervenzuschuß). Die Fasern des mesorchialen und kaudalen Zuschusses können ihrer Herkunft nach als Äste des N. spermaticus inferior angesehen werden.

Der Gefäßkonus des Samenstrangs, über welchen die funikuläre Nervenversorgung stattfindet, besteht aus der stark gewundenen Arteria testicularis, welche von einem venösen Gefäßnetzwerk, dem Plexus pampiniformis, umgeben wird. Zwischen diesen vaskulären Elementen verlaufen dicke Nervenbündel gerade oder auch wellenförmig nach kaudal und folgen somit nicht den zahlreichen Windungen der Arteria testicularis (Abb. 5, 6). Auf ihrem Weg zum Hoden zweigen von diesen Bündeln kleinere Äste ab, um das umliegende Gewebe zu innervieren. Im intervenösen Bindegewebe des Plexus pampiniformis finden sich einzelne Fasern, die kleine Arterien oder auch punktuell in geringerem Umfang die Wände der Venen des Plexus selbst versorgen, wobei die Nerven hier bis in die Media vordringen (Abb. 7, 8, 9). Auch die Arteria testicularis selbst wird im Samenstrang von einem regional unterschiedlich dichten Netzwerk aus Nervenfasern an der Adventitia-Media-Grenze umgeben (Abb. 10, 11). Dieses Netz erhält kontinuierlich Zuschüsse über Fasern, die aus den dicken Bündeln

abzweigen und sich dem Querschnitt der Arterie rechtwinklig nähern.

Ein Teil der Nerven aus dem funikulären Zugangsweg durchbrechen die Tunica am kranialen Pol, um direkt in das Mediastinum zu ziehen, das beim Damhirsch zentral gelegen ist. Auf ihrem Weg von kranial nach kaudal geben diese Bündel immer wieder Nerven ab, welche die kleinen mediastinalen Blutgefäße und das mediastinale Bindegewebe versorgen. Auch die Konvolutarterien (Abb. 12, 13, 14, 15), die aus den Septalarterien hervorgehen und sich am äußeren Rand des Mediastinums befinden, erhalten einen Nervenanteil, mit dem sie sich in die Lobuli testis aufzweigen. Die mediastinalen Nerven begleiten vor allem die kleinen hier gelegenen Arterien, die aus den Konvolutarterien abzweigen. Enge topographische Beziehungen zwischen den Epithelien des Rete testis und den mediastinalen Nerven kommen beim Damhirsch nicht vor. Allerdings treten einige Axone direkt an die Tubuli recti und vor allem an die Terminalsegmente der Tubuli seminiferi contorti heran (Abb. 16, 17, 18).

Die übrigen Nervenbündel aus dem funikulären Zugangsweg treten am kranialen Hodenpol in die Tunica albuginea über (Abb. 19, 20, 21, 22). Dabei konzentrieren sie sich vor allem auf die epididymale Seite, wo sie die ebenfalls intratunikal verlaufende Arteria testicularis begleiten. Weitere Nervenbündel unterschiedlicher Dicke treten an den übrigen Seiten des Hodens in die Tunica albuginea ein und ziehen meist schräg zur Längsachse des Hodens nach kaudal. Andere tunikale Nerven gelangen über das Mesorchium an die epididymale Seite des Organs. Schließlich gelangen Nervenbündel über die Gewebsbrücke zwischen Nebenhodenschwanz und kaudalem Hodenpol (kaudaler Nervenzuschuß) in die Tunica albuginea zum kaudalen Hodenpol (Abb. 23, 24, 25, 26). Diese Nerven ziehen in der Tunica nach kranial; es gibt aber auch Bündel, welche vermehrt zirkumferent verlaufen. Vergleicht man den Verlauf der Arterien und der Nerven in der Tunica albuginea, so muss man schlussfolgern, dass der Verlauf beider Gebilde weitgehend unabhängig voneinander ist. Die A. testicularis zieht am Margo epididymidis nach kaudal, gabelt sich dort, und die tunikalen Tochtergefäße ziehen,

am Margo liber und den Seitenflächen gelegen, unter weiterer Verzweigung wieder nach kranial. Von diesem intratunikalen Arterienlager, das die Grundlage für das Stratum vasculosum in der Tunica albuginea darstellt, treten die septalen Arterien senkrecht in die sogenannten Septula testis ein, die beim Hirsch allerdings keine flächenhaften Septen sondern rundliche bindegewebliche Stränge sind und in Richtung auf das zentrale Mediastinum testis zu verlaufen.

Durch ihren unabhängigen Verlauf in der Tunica albuginea bedingt, kommen die Nervenbündel und die intratunikalen Arterien nur gelegentlich in näheren Kontakt. Wenn sich beide Gebilde nähern, zweigen kleine Nervenzuschüsse zur Wand der Arterie ab und unterhalten bzw. ergänzen auf diese Weise den regelmäßigen und relativ dichten intramuralen Nervenplexus, den man durchgängig in der Wand aller Tunicaarterien findet (Abb. 27, 28, 29, 30, 31). Dieser Plexus scheint allerdings in der Wand der Arteria testicularis am Margo epididymidis lockerer strukturiert zu sein als in den kleineren intratunikalen Arterienabschnitten.

Im Gegensatz zu den intratunikalen Arterien sind die intratunikalen Venen des Stratum vasculosum beim Hirsch nicht innerviert.

In den Septula testis verlaufen Septalarterien und septale Nervenbündel in der Regel parallel, nur in ganz wenigen Septen findet man solitäre Nervenbündel. In der Wand der Septalarterien gibt es ebenfalls einen dichten intramuralen Nervenplexus wie stets an der Adventitia-Media-Grenze (Abb. 32, 33, 34).

Die Arterien innerhalb der Lobuli testis, also des eigentlichen Hodenparenchyms, entstammen zwei Quellen: (1) Auf dem Wege zum Mediastinum geben die Septalarterien laufend kleine Arterien zu den Lobuli ab, die sich dann kontinuierlich weiter verzweigen. (2) Der zentrale Bereich des Parenchyms wird von den zentrifugal verlaufenden Abgängen aus den Arterienkonvoluten, die am äußeren Rand des Mediastinums gelegen sind, versorgt.

Alle größeren intralobulären Arterien und Arteriolen werden grundsätzlich durch einen Nervenplexus versorgt (Abb. 35, 36, 37). Die kleineren Arteriolen besitzen keinen durchgängigen Plexus in der gesamten Zirkumferenz, sondern werden lediglich von 1-2 längsverlaufenden Axonen begleitet.

Die terminalen Nervengeflechte scheinen im Hirschhoden kleine Unterschiede in Abhängigkeit vom funktionellen Zustand der Tubuli seminiferi aufzuweisen. Das Untersuchungsmaterial kann auf dieser Grundlage in 2 Gruppen unterteilt werden.

Die erste Gruppe besteht aus präpuberalen und puberalen Tieren mit einem geringen bis mittleren Hodenvolumen und soliden Tubuli mit kleinen Durchmessern. Hier werden die Arteriolen in den Zwickeln zwischen den Anschnitten der Tubuli seminiferi regelmäßig von relativ langen Axonen begleitet. In den Hoden dieser Gruppe erkennt man außerdem eine größere Nervendichte in der Tunica albuginea und in den Septen.

In der zweiten Gruppe befinden sich puberale bzw. jung adulte Tiere, die im September und Oktober erlegt wurden und ein größeres Hodenvolumen sowie Tubuli mit einem Lumen aufweisen. In den Hoden dieser Hirsche sind die Zwickel zwischen den Profilen der mit einem Lumen versehenen Samenkanälchen in geringerem Maße innerviert als bei der ersten Gruppe. Nicht alle terminalen Arteriolenabschnitte sind von Nervenfasern begleitet. Auch sind die Nervenplexus um die septalen und parenchymalen Arterien nicht ganz so dicht, wie bei der ersten Gruppe (Abb. 38, 39, 40).

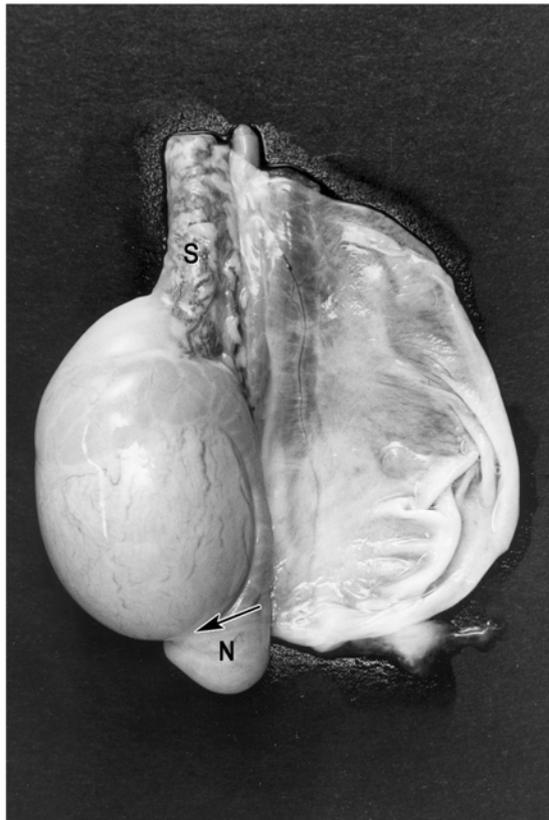


Abb. 3

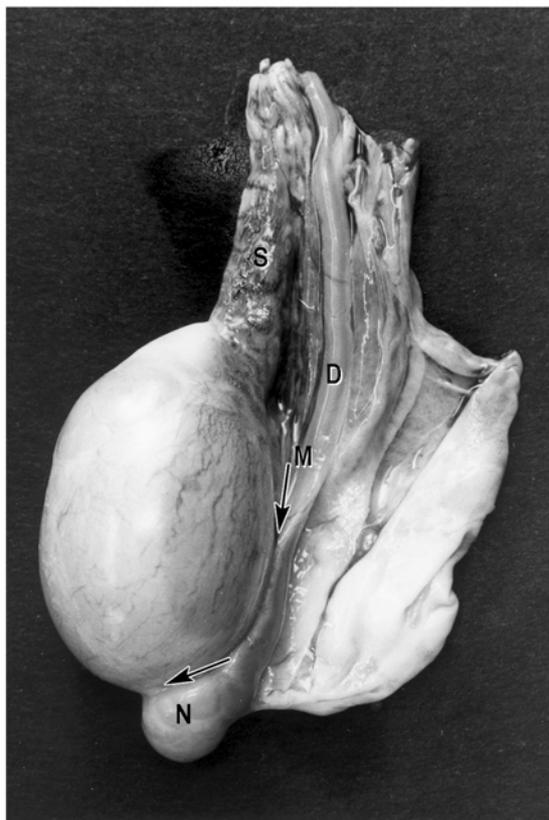


Abb. 4

Abb.3 : Damhirschhoden, laterale Seite. Der Samenstrang (S) liegt dem kranialen Hodenpol auf. Die Nerven, die über diese Route zum Hoden ziehen, entstammen dem Nervus spermaticus superior. Das Ligamentum testis proprium (Pfeil), das vom Nebenhodenschwanz (N) zum Hoden verläuft, bildet eine weitere Brücke, über welche Äste des Nervus spermaticus inferior die Gonade versorgen.

Abb.4: Damhirschhoden, mediale Seite. Über das Mesodeferens (M mit Pfeil) tritt der mesorchiale Nervenzuschluss an den Hoden heran. Der kaudale Nervenzuschluss zieht über das Ligamentum testis proprium (Pfeil) vom Nebenhodenschwanz (N) zum Hoden.

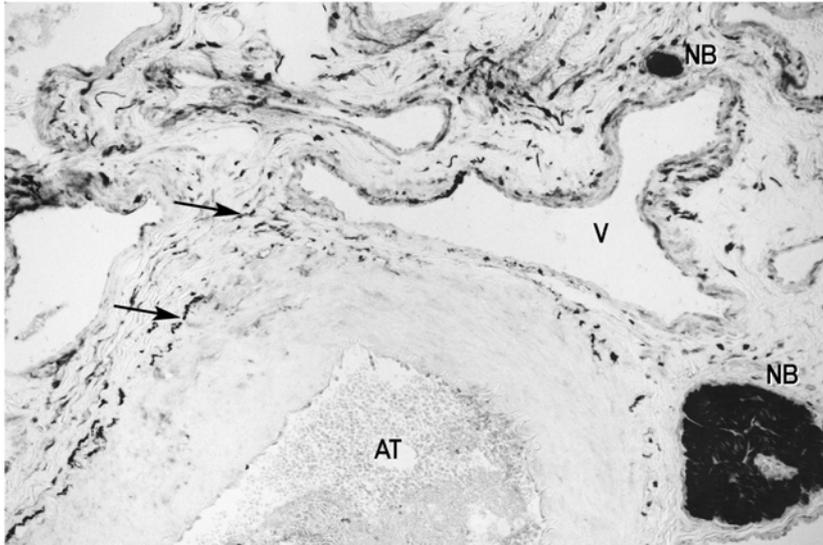


Abb. 5

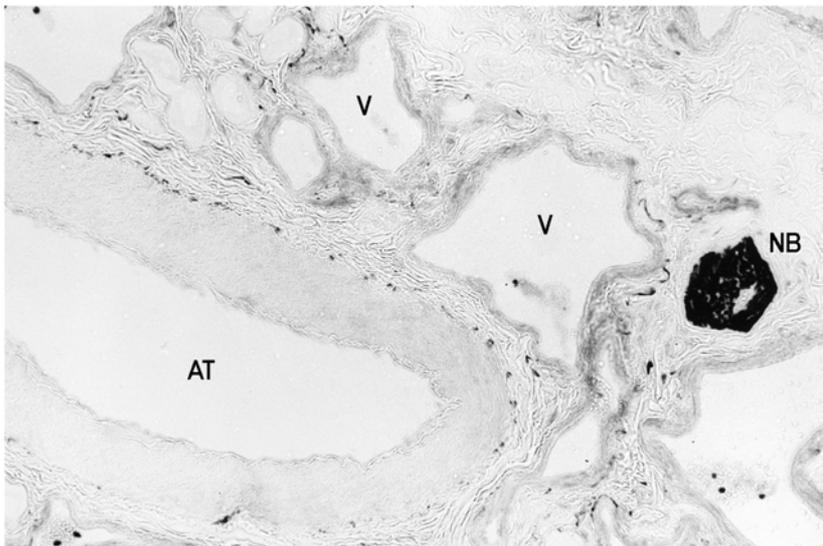


Abb. 6

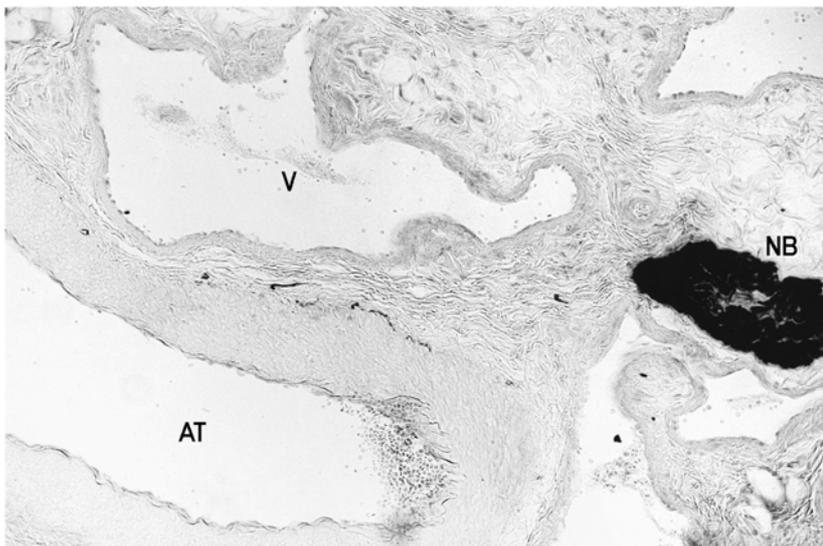


Abb. 7

Abb. 5: Samenstrang, PGP-9.5-Immunreaktion, x 140

Die A. testicularis (AT) weist einen Plexus (Pfeil) in der Adventitia-Media-Grenzzone auf. Auf ihrem Weg zum Hoden wird sie von dicken Nervenbündeln (NB) begleitet, von welchen immer wieder Nervenfasern abzweigen und das umliegende Gewebe des Plexus pampiniformis (V) innervieren.

Abb. 6: Samenstrang, NSE-Immunreaktion, x 140

Auch NSE stellt alle großen und dicken Nervenfaszikel (NB) zufriedenstellend dar, doch reagieren nicht alle feinen Nervenfasern um die Plexusvenen (V) und im Bindegewebe. Der Nervenplexus um die A. testicularis (AT) ist mit dieser Reaktion unvollständig.

Abb. 7: Samenstrang, NF-Immunreaktion, x 140

Die Reaktion stellt deutlich die Nervenfaszikel (NB) dar, doch werden feine Nervenfasern zwischen den Venen (V) oder auch im Nervenplexus der A. testicularis (AT) kaum markiert.

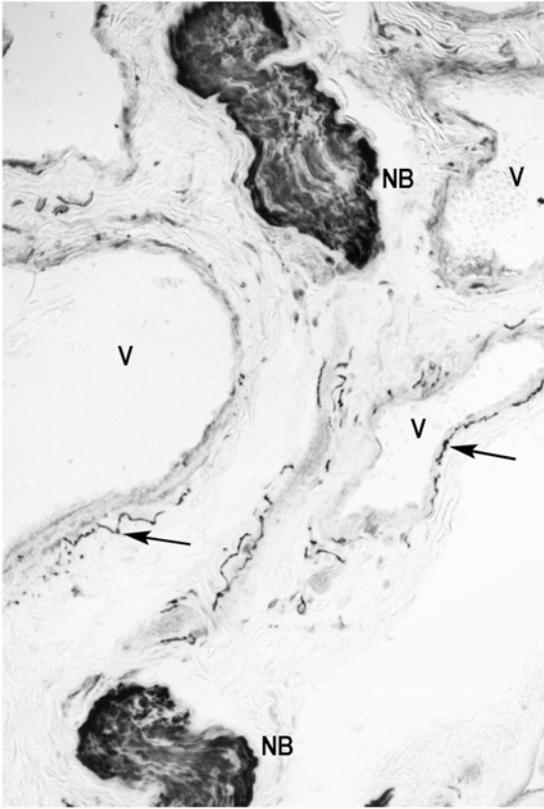


Abb. 8

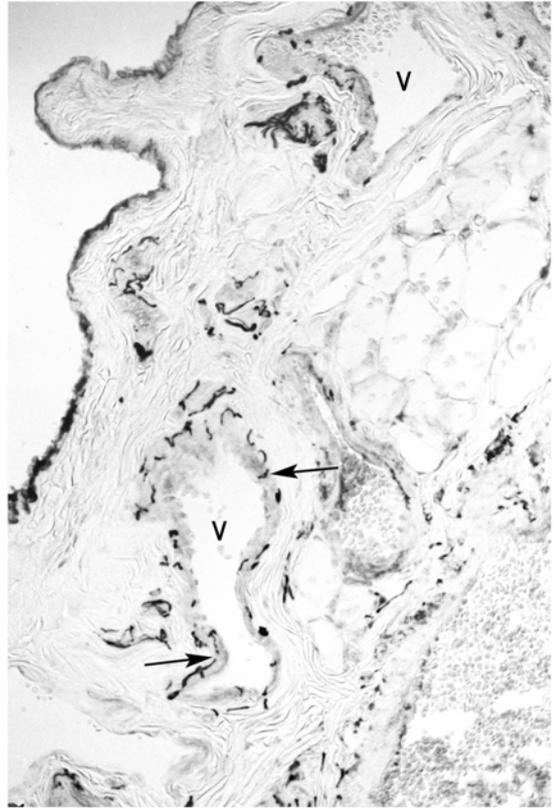


Abb. 9

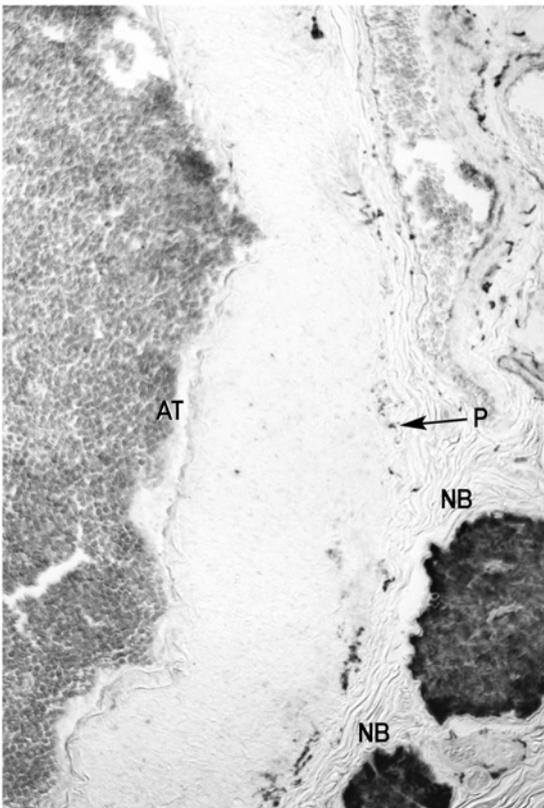


Abb. 10

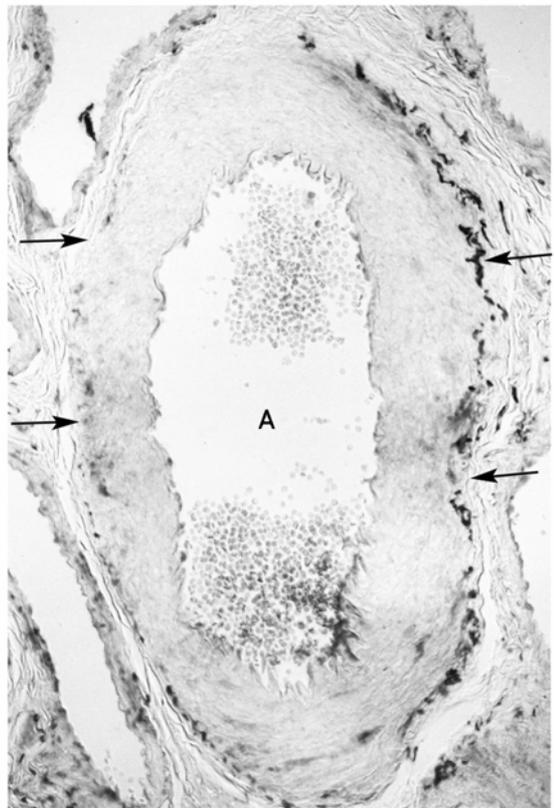


Abb. 11

Abb. 8: Samenstrang; PGP-9.5-Immunreaktion, x 225

Zwischen den Venen (V) des Plexus pampiniformis liegen dicke Nervenbündel (NB). Die Venen sind gut innerviert (Pfeile).

Abb. 9: Plexus pampiniformis; PGP-9.5-Immunreaktion, x 225

Axone dringen bis in die Media der Plexusvenen (V) vor.

Abb. 10: Arteria testicularis im Samenstrang; PGP-9.5-Immunreaktion, x 225

In der Adventitia-Media-Zone der A. testicularis (AT) erkennt man einen unvollständigen Nervenplexus (Pfeil). Das Gefäß wird von Nervenbündeln begleitet (NB).

Abb. 11: Mittelgroße Arterie im Samenstrang; PGP-9.5-Immunreaktion, x 225

Der Nervenplexus in der Adventitia-Media-Grenzzone der Arterie (A) ist auf einer Seite stärker entwickelt als auf der anderen (Pfeile).

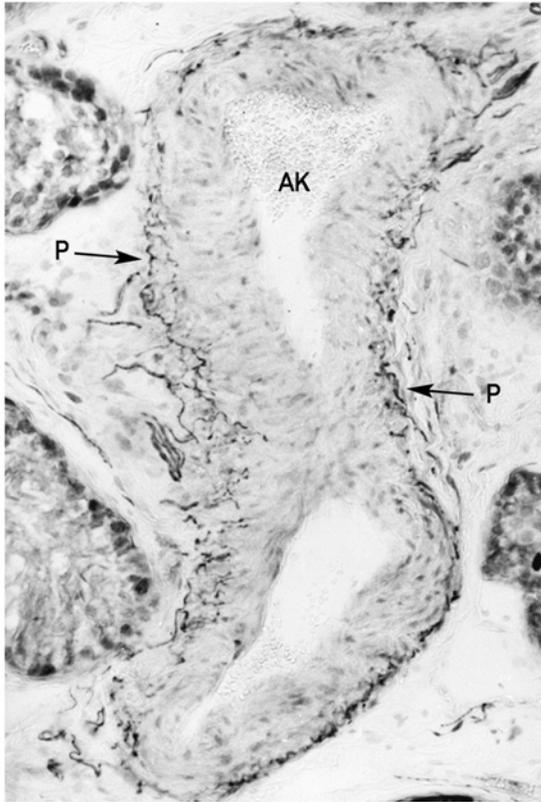


Abb. 12

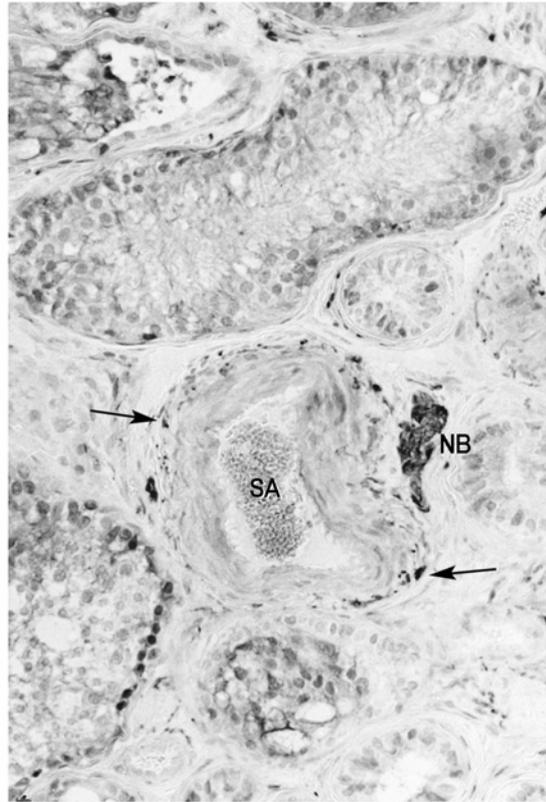


Abb. 13

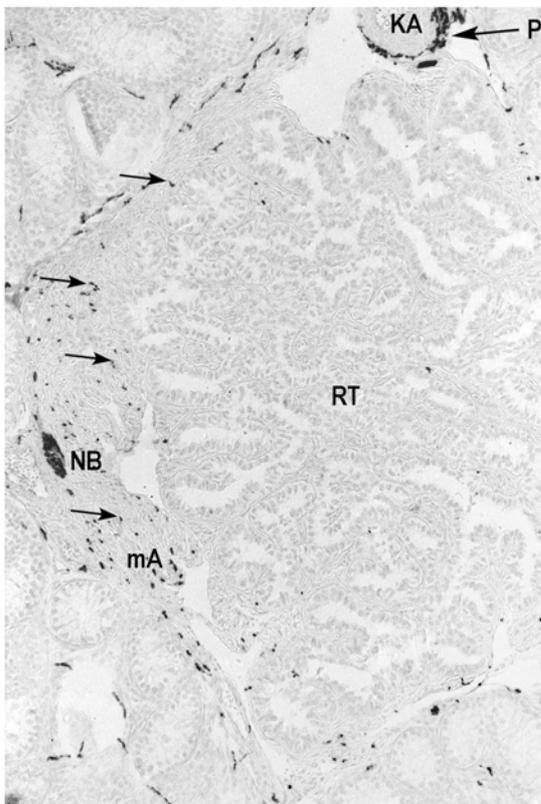


Abb. 14

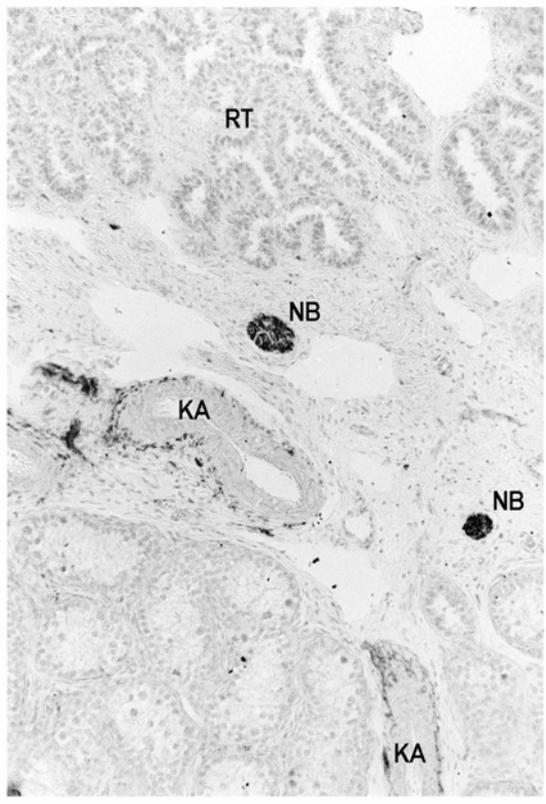


Abb. 15

Abb. 12: Arterienkonvolut (AK) am äußeren Mediastinumrand; PGP-9.5-Immunreaktion, x 225

Auch die Konvolutarterien werden über einen gut ausgebildeten Plexus (Pfeile) in der Adventitia-Media-Grenzzone innerviert.

Abb. 13: Septum testis; PGP-9.5-Immunreaktion, x 225

Dickes Nervenbündel (NB) neben einer Spiralarterie (SA) in einem Septum. Pfeile deuten auf Nervenplexus um die Arterie.

Abb. 14: Mediastinum testis und Rete testis (RT) in der oberen Hodenhälfte; DBH-Immunreaktion, x 140

In der Peripherie des Mediastinums sind Nervenbündel (NB) und auch Einzelfasern (Pfeile) angeordnet, während in der Mitte nur sporadisch Nervenfasern verlaufen. Mediastinale Arteriolen (mA) und Konvolutarterien (KA) werden durch einzelne Nervenfasern oder Nervenplexus (Pfeil mit P) innerviert.

Abb. 15: Mediastinum testis; TH-Immunreaktion, x 140

Im kranialen Hodenpol ziehen Nervenbündel (NB) vom Nervus spermaticus superior über den Gefäßkonus in das Mediastinum. RT = Rete testis, KA = Konvolutarterie

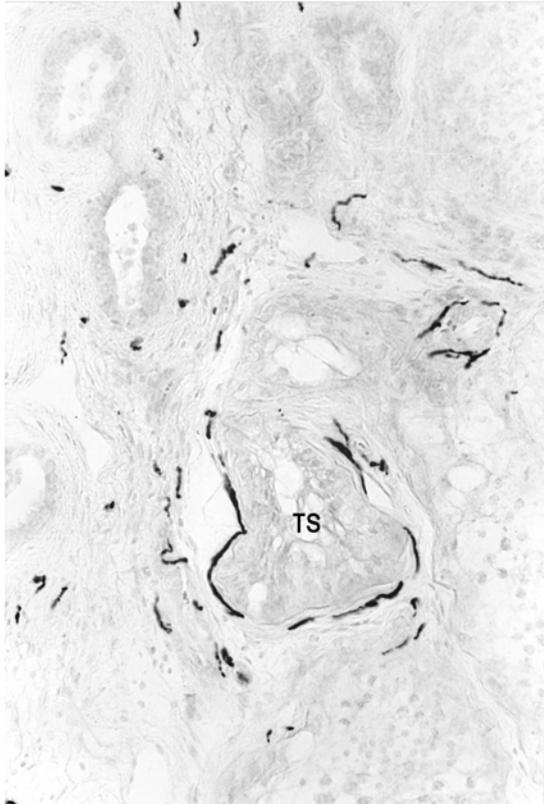


Abb. 16

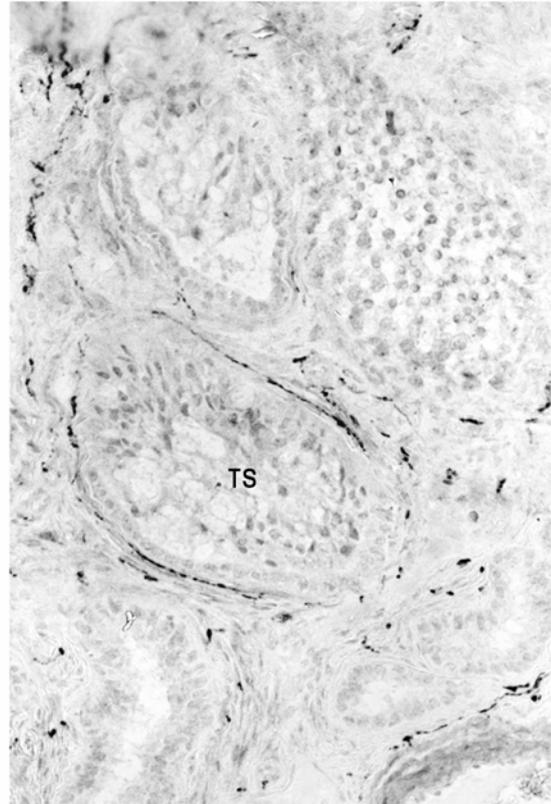


Abb. 17

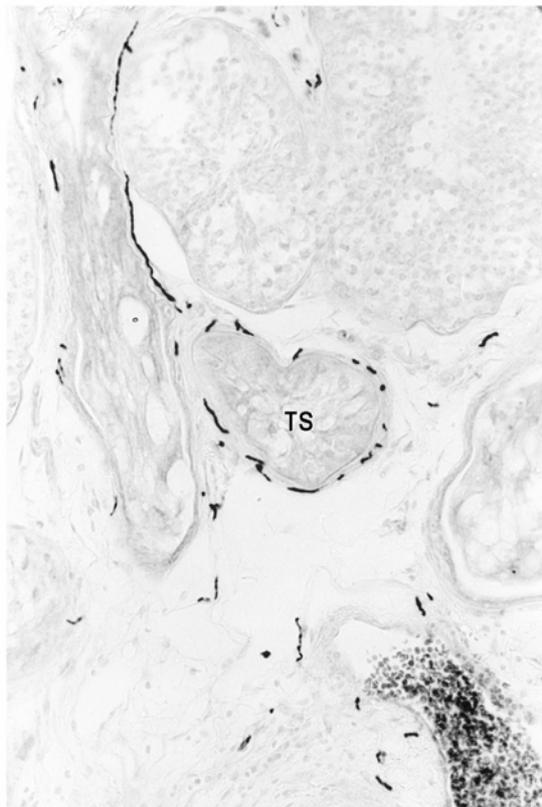


Abb. 18

Abb. 16: Zentrales Hodenparenchym; DBH-Immunreaktion, x 225

In der oberen Hodenhälfte wird ein Terminalsegment (TS) von Nervenfasern umgeben.

Abb. 17: Zentrales Hodenparenchym, NPY-Immunreaktion, x 225

Die Einzelfasern, die die Terminalsegmente (TS) im Cervidenhoden innervieren, beinhalten NPY. Auch zwischen den Hodenkanälchen kann man positive Nervenfasern erkennen.

Abb. 18: Zentrales Hodenparenchym; DBH-Immunreaktion, x 225

Um die Terminalsegmente (TS) ziehen DBH-positive Einzelaxone.

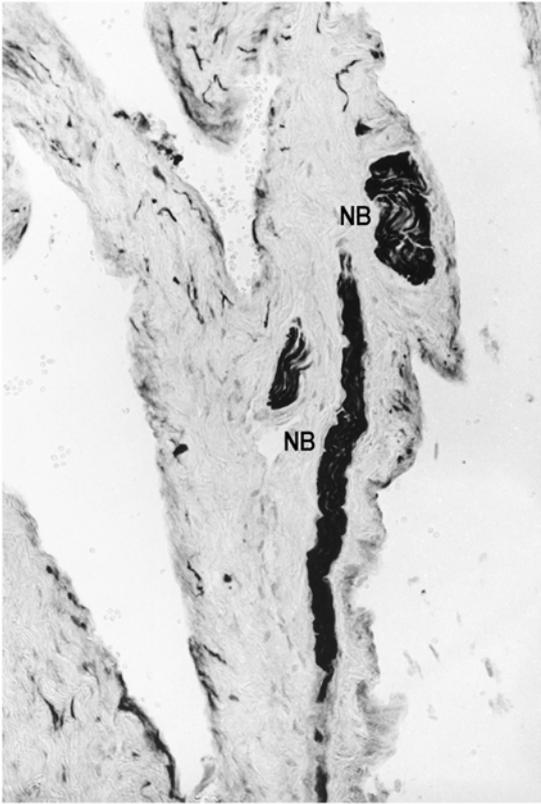


Abb. 19

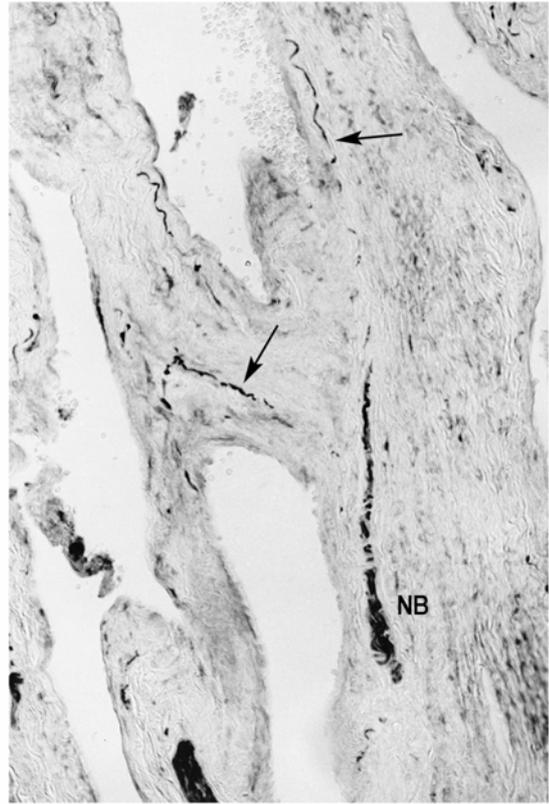


Abb. 20

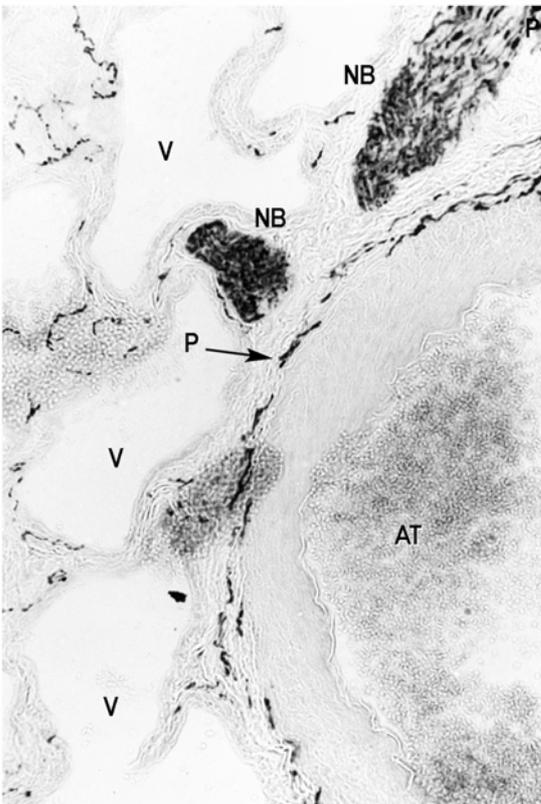


Abb. 21

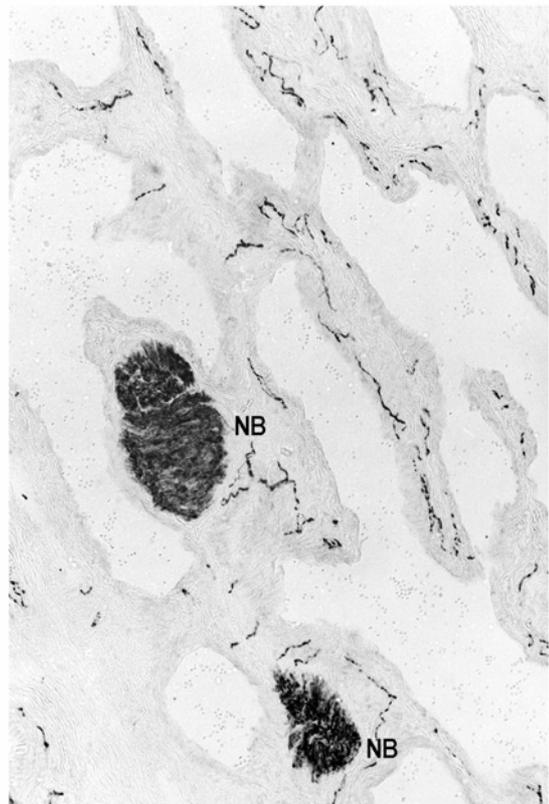


Abb. 22

Abb. 19: Kraniale Tunica albuginea ; PGP-9.5, Immunreaktion, x 225

Ein dicker Nervenfaszikel (NB) zieht schräg von kranial nach kaudal. Andere Nervenbündel verlaufen zirkumferent. Die Venen dieser Region werden noch schwach innerviert.

Abb. 20: Kraniale Tunica albuginea ; PGP-9.5-Immunreaktion, x 225

Einzelfasern (Pfeile) und Nervenbündel (NB) ziehen weitgehend unabhängig von Gefäßen durch das Bindegewebe.

Abb. 21: Tunica albuginea am kranialen Hodenpol; DBH-Immunreaktion, x 225

Zwischen den Venen des Plexus pampiniformis (V) verlaufen DBH-positive Nervenfasern. Die A. testicularis (AT) wird von einem Plexus in der Adventitia-Media-Grenzzone umgeben (Pfeil mit P). Die Nervenbündel (NB) führen DBH-negative Nervenfasern mit, die peptiderger Natur sein könnten.

Abb. 22: Tunica albuginea am kranialen Hodenpol; DBH-Immunreaktion, x 140

Dicke Nervenbündel (NB) verlaufen am kranialen Hodenpol in der Tunica albuginea. In den Bündeln gibt es auch einen kleinen Anteil an DBH-negativen Axonen. Zwischen den Venen verlaufen im Bindegewebe positive Einzelaxone.

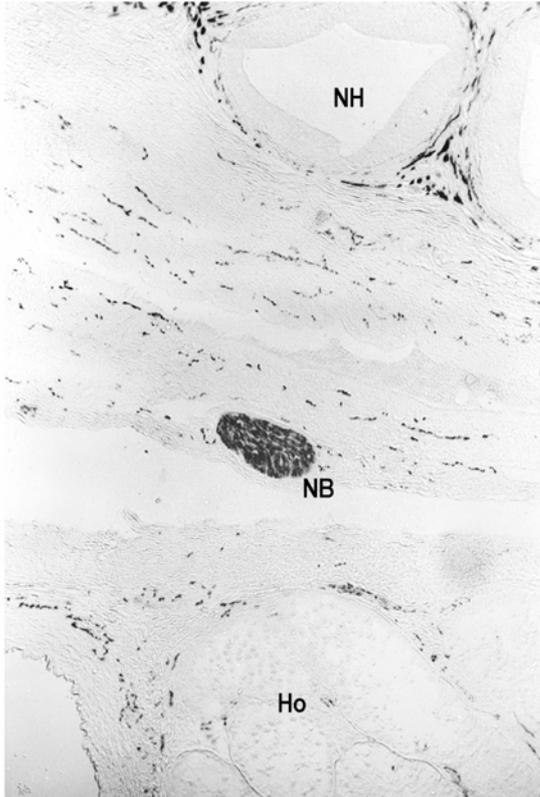


Abb. 23



Abb. 24

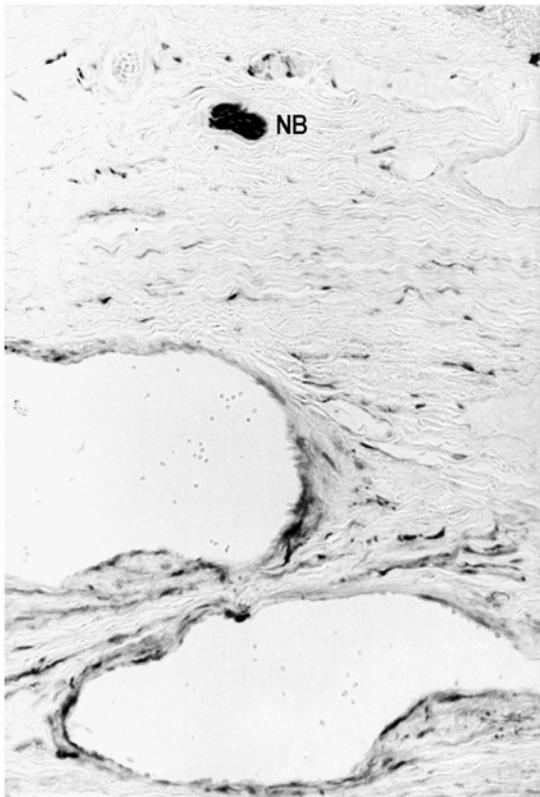


Abb. 25



Abb. 26

Abb. 23: Kaudales Mesorchium; DBH-Immunreaktion, x 90

Nervenbündel (NB) zieht zwischen Nebenhodenkörper (NH) und Hoden (Ho) weiter nach kaudal. Im Bindegewebe liegen viele variköse Einzelfasern.

Abb. 24: Kaudales Mesorchium; DBH-Immunreaktion, x 225

Einzelfasern ziehen in Richtung Hoden (Pfeile). Deutlich sind die Varikositäten der einzelnen Axone zu erkennen.

Abb. 25: Mesorchium; PGP-9.5-Immunreaktion, x 225

Zwischen Nebenhoden und Hoden verlaufen immer wieder Nervenbündel (NB), die den mesorchialen Zuschuß zur Hodeninnervation darstellen.

Abb. 26: Tunica albuginea am kaudalen Hodenpol; PGP-9.5-Immunreaktion, x 225

Dicke Nervenbündel verlaufen zwischen Hoden und Nebenhoden.

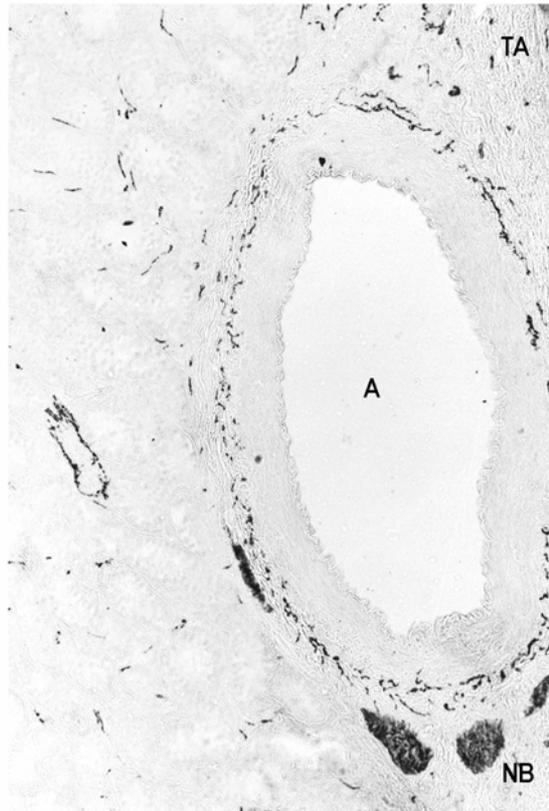


Abb. 27

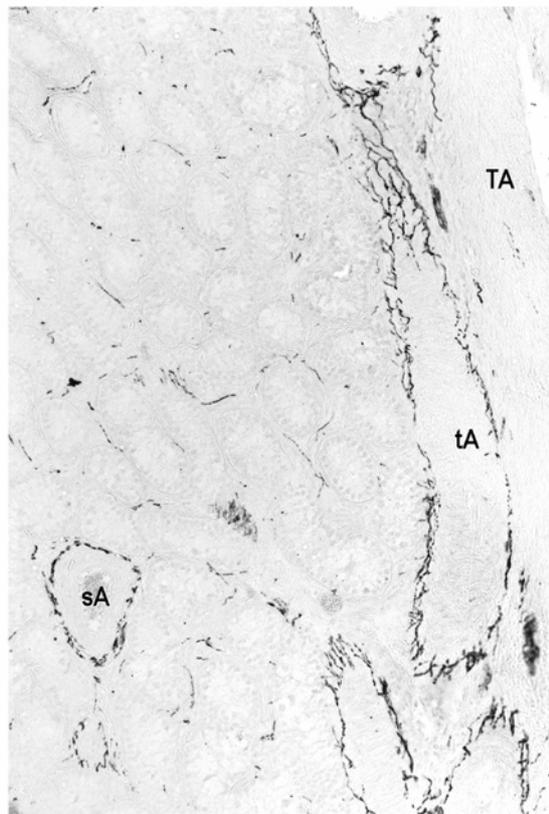


Abb. 28

Abb. 27: Tunica albuginea am Margo epididymalis; DBH-Immunreaktion, x 140

Arterie (A) in der Tunica vasculosa wird von einem intramuralen Plexus umgeben. Auf der Seite der Nervenbündel (NB) ist dieser Plexus etwas dichter.

Abb. 28: Tunica albuginea (TA) am Margo liber; DBH-Immunreaktion, x 140

Die tunikalen und auch septale Arterien (tA/sA) werden von einem dichten Nervenplexus umgeben. Die Innervation in den Lobuli testis ist verhältnismäßig dicht.

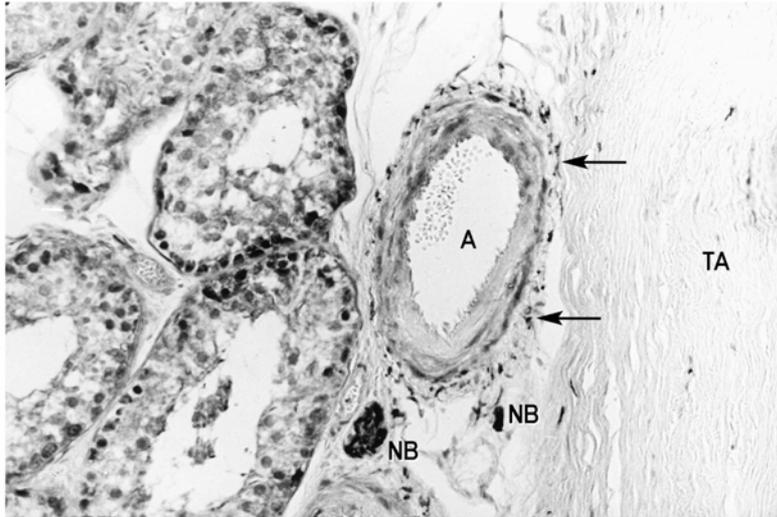


Abb. 29

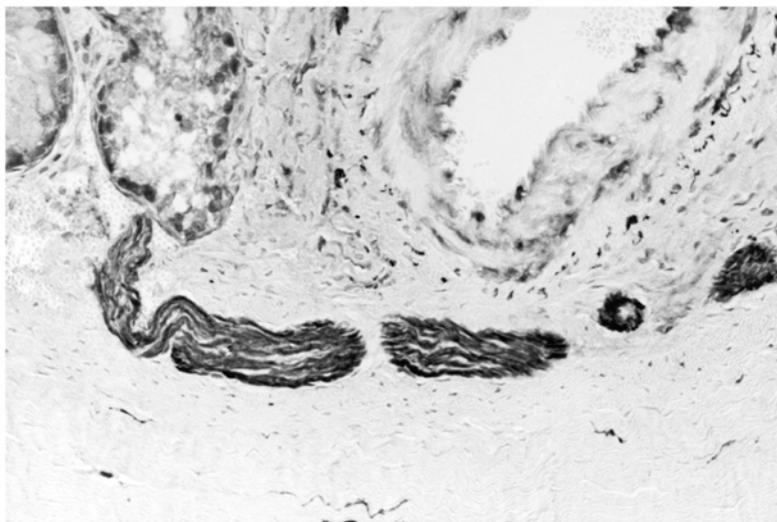


Abb. 30

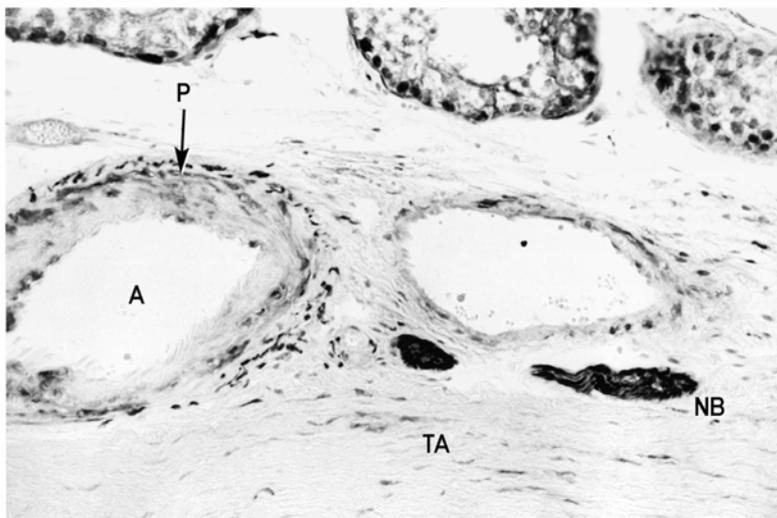


Abb. 31

Abb. 29: Tunica albuginea (TA); PGP-9.5-Immunreaktion, x 225

Eine Arterie (A) und Nervenbündel (NB) in der Tunica vasculosa ziehen in ein Hodenseptum. Der intramurale Nervenplexus (Pfeile) der Arterie ist rundum ausgebildet.

Abb. 30: Kaudale Tunica albuginea; PGP-9.5-Immunreaktion, x 225

Dickes Nervenbündel verläuft zirkumferent im Bindegewebe.

Abb. 31: Kraniale Tunica; PGP-9.5-Immunreaktion, x 225

Die Arterie in der Tunica vasculosa wird von einem Plexus in der Adventitia-Media-Grenzzone (Pfeil mit P) umgeben. Dieser Plexus ist an manchen Stellen unvollständig bzw. weniger dicht. Zwei Nervenbündel (NB) verlaufen in unmittelbarer Nähe.

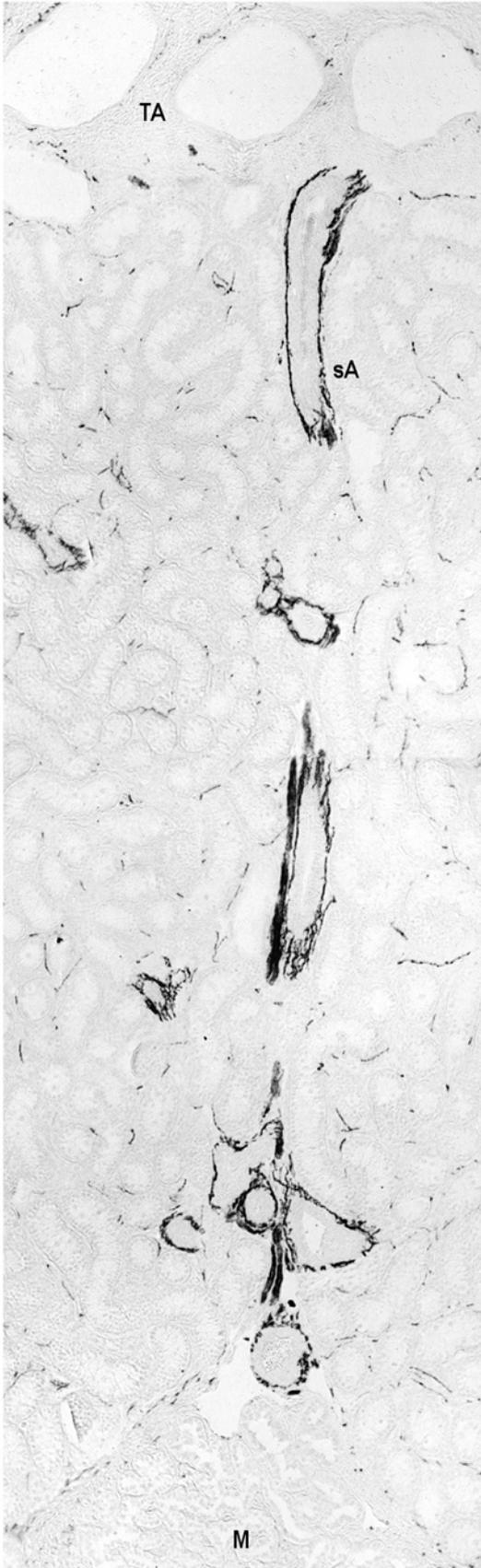


Abb. 32



Abb. 33

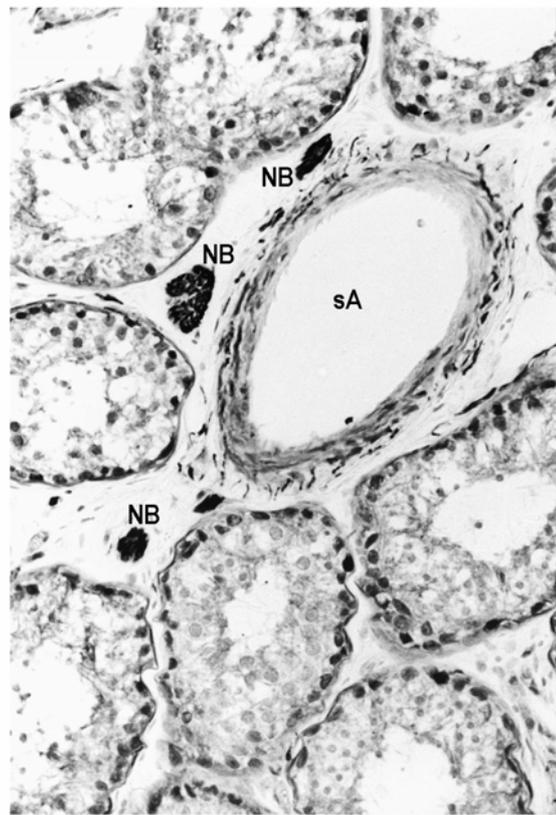


Abb. 34

Abb. 32: Septum testis; DBH-Immunreaktion, x 90

Eine septale Arterie (sA) wird von einem vollständigen intramuralen Plexus umgeben und zieht von der Tunica albuginea (TA) in Richtung Mediastinum testis (M). Auf ihrem Weg gibt sie auch kleinere Arterien ab. Im Bereich des Mediastinums bildet sie Konvolute. In fast jedem Zwickel zwischen den Tubuli seminiferi finden sich Einzelaxone, wohl meist an kleine Blutgefäße assoziiert.

Abb. 33: Hodenparenchym; DBH-Immunreaktion, x 225

Von einer septale Arterie (sA) zweigt eine Arteriole in einen Lobulus testis ab.

Abb. 34: Septum testis; PGP-9.5-Immunreaktion, x 225

Septale Arterie(sA) nahe dem Mediastinum testis. Sie wird in der Adventitia -Media-Zone von einem Nervenplexus umgeben und von mehreren Nervenbündeln (NB) begleitet.

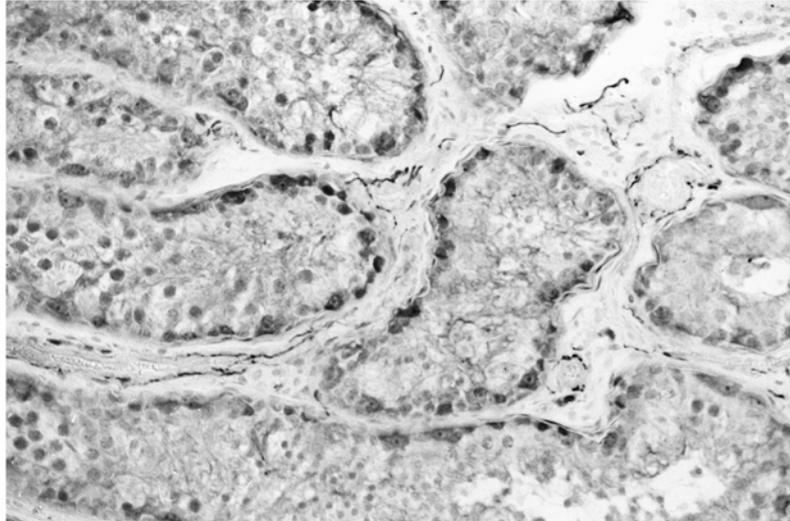


Abb. 35

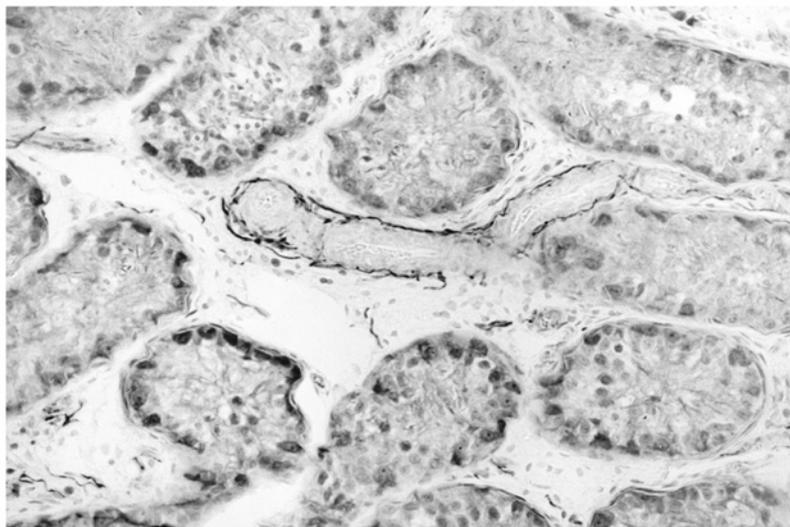


Abb. 36

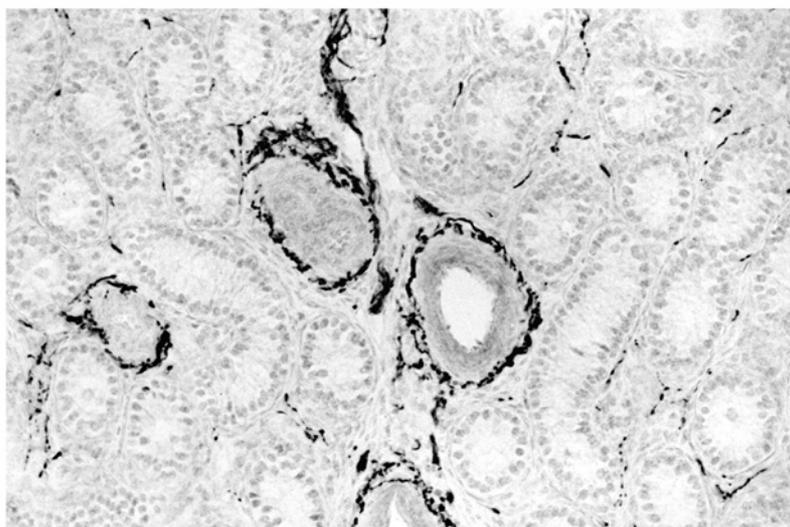


Abb. 37

Abb. 35: Hodenparenchym; PGP-9.5-Immunreaktion, x 225

Auch in den Lobuli testis verlaufen Nervenfasern überwiegend an Gefäße assoziiert. Solitäre Axone sind eher die Ausnahme.

Abb. 36: Kraniales Hodenparenchym ; PGP-9.5-Immunreaktion, x 225

Intralobuläre Arteriole wird von Nervenfasern begleitet. Solitäre Einzelfasern gibt es nur vereinzelt.

Abb. 37: Septulum testis; NPY-Immunreaktion, x 225

Der intramurale Plexus der septalen Arterie ist besonders dicht innerviert. Zwischen den Tubuli seminiferi erkennt man eine große Anzahl von Einzelaxonen.

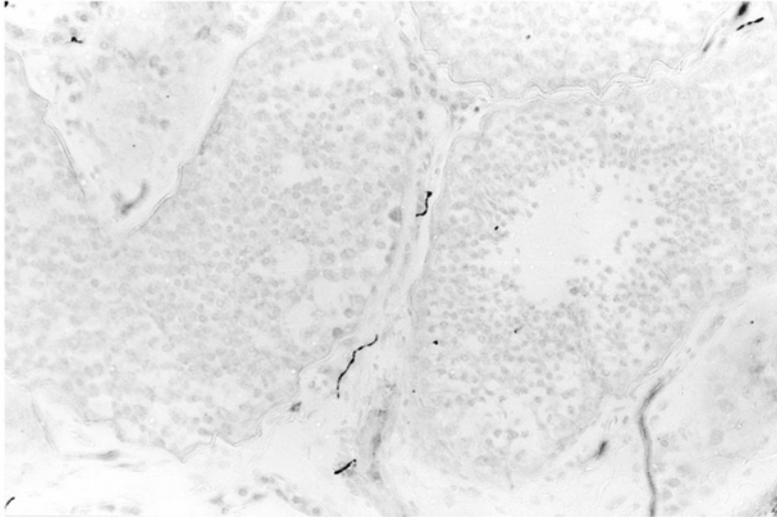


Abb. 38

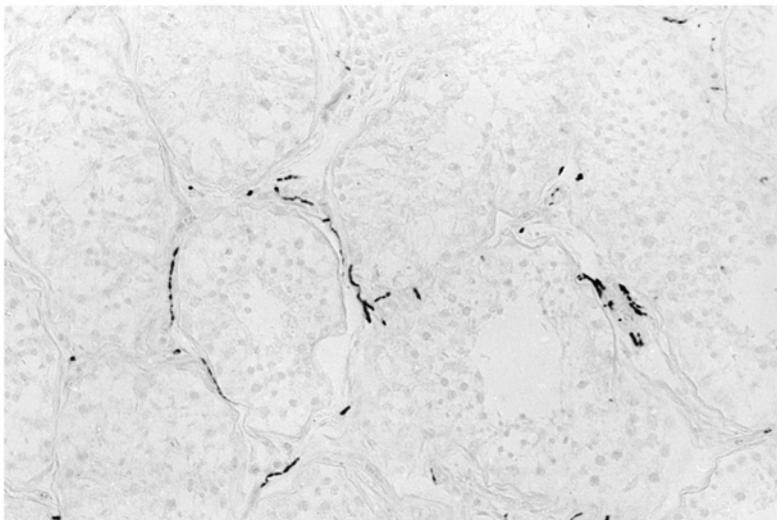


Abb. 39

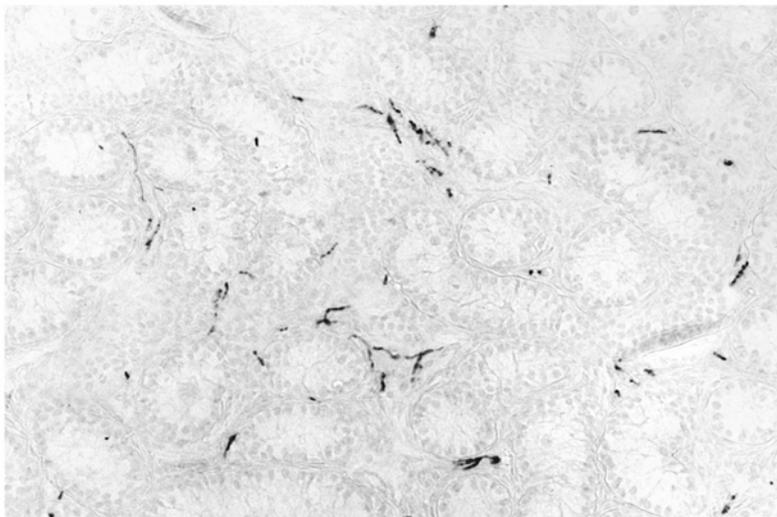


Abb. 40

Abb. 38: Hodenparenchym; DBH-Immunreaktion, x 225

Das Hodenvolumen nimmt deutlich zu, wenn sich das Tier in aktiver Spermatogenese befindet. Dieses Größenwachstum der Tubuli seminiferi führt zu einer flächenmäßig gesehenen geringeren Innervation in den Lobuli testis.

Abb. 39: Hodenparenchym; DBH-Immunreaktion, x 225

Größere Hodentubuli mit Lumen. Zwischen den Hodenkanälchen befinden sich in den meisten Zwickeln Einzelfasern.

Abb. 40: Hodenparenchym; DBH-Immunreaktion, x 225

Kleine, solide Tubuli seminiferi ohne Spermatogenese; Zwischen den Tubuli seminiferi liegen verhältnismäßig viele Nervenfasern

3.2 Spezifische Nervennachweise am Hoden

3.2.1 Verteilung adrenerger Nervenfasern:

DBH – Immunreaktion

Diese immunhistochemische Reaktion stellt vor allem die transmitterhaltigen Varikositäten der einzelnen Axone gut dar, und die DBH-positiven Nervenfasern sind auf Grund der schwachen Hintergrundfärbung besonders gut zu erkennen. Ihre Lokalisation ähnelt der von PGP-9.5 weitgehend: Im Samenstrang reagieren die dicken Nervenbündel, die Nervenfasern im intervenösen Bindegewebe und auch solche, welche die Wände der Venen und der A. testicularis oder der kleineren Arterien versorgen (Abb. 41). Die Nervenbündel in den unterschiedlichen Bereichen der Tunica albuginea sind ebenfalls überwiegend positiv, bis auf ganz wenige, kleine negative Fasern im Inneren. Die Reaktion von PGP-9.5 und DBH deckt sich auch annähernd bei den intramuralen Gefäßnerven in der Tunica, in den Septen, im Mediastinum und innerhalb der Lobuli testis. Beim Damhirsch mit größtem Hodenvolumen sieht man auch bei dieser Reaktion deutlich eine geringere Nervendichte als bei den anderen Exemplaren.

TH- Immunreaktion

Die Verteilung der TH-immunreaktiven Fasern ist mit der von DBH zu vergleichen. Doch die Reaktion der Fasern im Inneren der Nervenbündel im Samenstrang und in der Tunica albuginea ist stellenweise negativ. Die Gefäßnerven der A. testicularis, der Kapselarterien, der septalen und parenchymalen Gefäße werden mit der TH-Immunreaktion in geringerem Maße markiert, und auch Nerven im intervenösen Bindegewebe des Plexus pampiniformis reagieren in geringerem Umfang als bei DBH (Abb. 42). Im Mediastinum werden annähernd nur die

Hälfte der Axone um die Konvolutarterien dargestellt. Nervenfasern im mediastinalen Bindegewebe sind überwiegend negativ, während die dort befindlichen dickeren Nervenbündel positiv reagieren. Auch intertubuläre Nerven in den Lobuli testis werden anhand einer TH-Immunreaktion nur zum Teil markiert. Als Nebenbefund ist festzustellen, dass mit diesem Antikörper in den Tubuli seminiferi auch die Kerne der Keimzellen von den pachytänen Spermatozyten bis hin zu elongierten Spermatiden gegen TH reagieren (Abb. 43).

3.2.2 Verteilung peptiderger Nervenfasern:

NPY- Immunreaktion

Diese Reaktion deckt sich weitgehend mit der von DBH, wobei die positiven Einzelaxone im allgemeinen dünner sind als mit der DBH- Reaktion. Es reagieren schätzungsweise etwa drei Viertel der in dickeren Nervenbündeln enthaltenen Nervenfasern (Abb. 42). Auch die intramuralen Gefäßnerven um A. testicularis, Kapselarterien, Septalarterien und Konvolutarterien (Abb. 46,47) bestehen zu einem großen Teil aus NPY- positiven Nervenfasern. Ebenso innervieren positive Axone kleinere Arterien und Arteriolen in Tunica albuginea, Septula testis, Mediastinum und in den Lobuli testis (Abb. 48, 49, 50). Einige NPY- positive Fasern erreichen die Wände des venösen Plexus pampiniformis.

VIP-Immunreaktion

Im Samenstrang reagieren in den Nervenbündeln um den Ductus deferens einzelne Axone VIP-positiv. Auch in der Muskulatur des Ductus deferens gibt es VIP-positive Nervenfasern, überwiegend im subepithelialen Nervennetz. Die Gefäßnerven um die A. ductus deferentis weisen nur wenige oder bis überhaupt keine positiven Fasern auf. Der Gefäßkonus des

Samenstranges mit A. testicularis und Plexus pampiniformis ist VIP negativ. Die Nervenbündel in der Tunica albuginea enthalten wenige positive Fasern, wobei kleinere Nervenbündel manchmal einen höheren Anteil an positiven Axonen beinhalten.

Im Bindegewebe der Tunica albuginea selbst werden mit Hilfe der VIP-Immunreaktion feine, variköse Axone dargestellt, die überwiegend zirkumferent verlaufen. Die intramuralen Gefäßnerven der Kapselarterien und der septalen Arterien sind in der Regel VIP-negativ, bis auf wenige Fälle, bei denen 1-2 Fasern im Plexusbereich positiv reagieren. Im kaudalen Hodenabschnitt werden allerdings manchmal auch kleine Arteriolen von VIP-positiven Axonen umgeben. In den Hodenläppchen reagieren einzelne variköse Axone VIP-positiv, die intertubulär oder auch in der Nähe von kleineren Blutgefäßen lokalisiert sind. Am Mediastinumrand werden ebenfalls positive Fasern dargestellt. Grundsätzlich nimmt nach kaudal die Anzahl an positiven Nerven zu. Dies fällt besonders im Hodeninneren und bei dem Tier mit dem größten Hodenvolumen auf. Bei jungen Tieren (6 Monate) konzentrieren sich die Nervenfasern zwischen den Hodenkanälchen besonders auf den subtunikalen Bereich (Abb. 48,49,50,51).

CGRP-Immunreaktion

Manche Nervenbündel um den Ductus deferens weisen vereinzelt CGRP-positiv Nervenfasern auf, während andere komplett negativ sind. In der Muskulatur des Ductus deferens lassen sich mit Hilfe der CGRP-Immunreaktion wenige, feine Nervenfasern darstellen. Auch Nervenbündel im Plexus pampiniformis enthalten in ihrem Inneren einige wenige positive Axone. Der Nervenplexus um die A. testicularis besitzt sporadisch CGRP-positiv Fasern. Es gibt kleine Arteriolen, die von CGRP-positiven Nervenfasern begleitet werden. Im Bindegewebe um Plexus pampiniformis und Ductus deferens verlaufen kleinere Nervenbündel, die mit der CGRP-Immunreaktion markiert werden.

Am Margo epididymidis oder im Meso zum Nebenhoden erkennt man kleinere Nervenbündel, die fast komplett positiv reagieren. In diesem Bereich gibt es kaudal auch etwas mehr positive Nervenfasern im Bindegewebe der Tunica.

In der Tunica albuginea stellt diese Immunreaktion wenige, feine Einzelfasern im Bindegewebe dar, und auch in den größeren Bündeln gibt es wenige positive Axone. Die Reaktion der Gefäßnerven in den Kapselarterien ist in der Regel negativ (bis auf wenige positive Axone bei manchen Arterien), doch um kleinere Arteriolen sind vereinzelt positive Axone anzutreffen. Am Mediastinumrand in der oberen Hodenhälfte sind vereinzelt Axone zu sehen, das Parenchym ist CGRP-negativ (Abb. 52,53,54).

Substance-P-Immunreaktion

In den Nervenbündeln um den Ductus deferens sind nur zwei bis drei Axone SP-positiv und in der Muskulatur nahe dem Lumen sind ebenfalls vereinzelt positive Fasern zu erkennen. Das restliche Gewebe des gesamten Samenstrangs ist SP-negativ. Auch im Inneren des Hoden selbst gibt es keine SP-positive Innervation. Im Bindegewebe der Tunica albuginea finden sich sporadisch positive Nervenfasern.

3.2.3 Verteilung cholinergischer Nervenfasern:

ACHE-Reaktion nach zweistündiger Inkubation (Enzymhistochemie)

Positiv reagierende Nervenfasern befinden sich in Nervenbündeln des Samenstranges und im subepithelialen Nervennetz des Ductus deferens. Sporadisch werden positive Axone in Nervenbündeln der Tunica albuginea, insbesondere in der Nähe der Gewebebrücke zum Nebenhoden gesehen. Der Nervenplexus in der Wand septaler und tunikaler Gefäße besitzt

keinen cholinergen Nervenanteil. Demgegenüber enthalten die großen Konvolutarterien in der Peripherie des Mediastinums wieder einige positive Fasern.

ChAT-Immunreaktion

Mit dieser Immunreaktion konnten wir keine Nervenfasern nachweisen.

3.2.4 Verteilung markhaltiger Nervenfasern:

MBP-Immunreaktion

Beim Damhirsch konnten mit Hilfe dieses Antikörpers einige positive Nervenfasern in Nervenbündeln, die sich im Samenstrang sowie in kranialen, mittleren und kaudalen Abschnitten der Tunica albuginea befinden, dargestellt werden. Doch ist die Reaktion nicht bei allen Tieren von gleicher Intensität (Abb. 55,56).

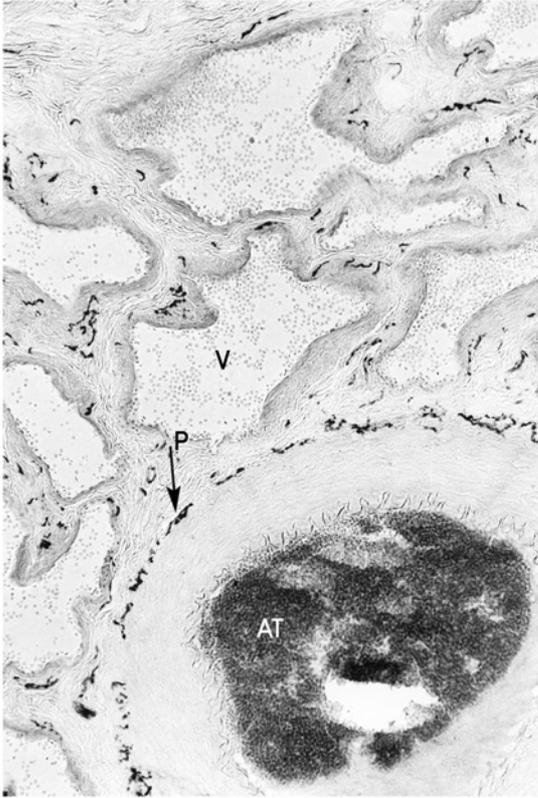


Abb. 41

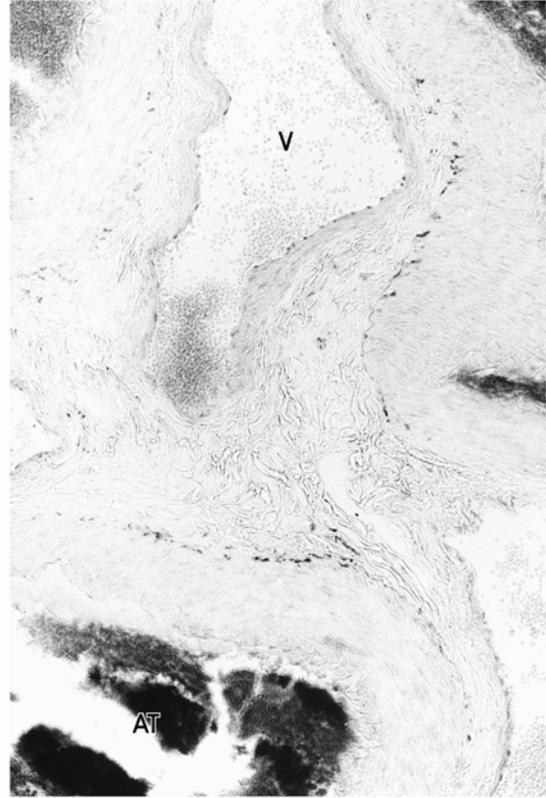


Abb. 42

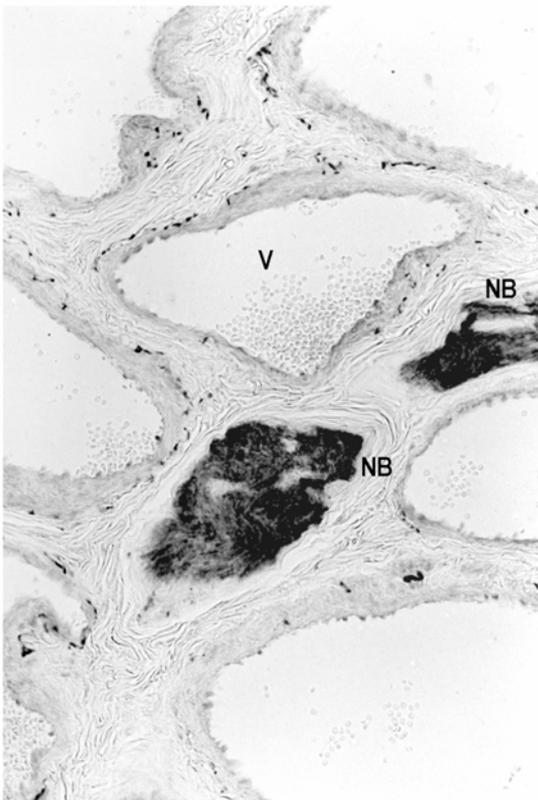


Abb. 43

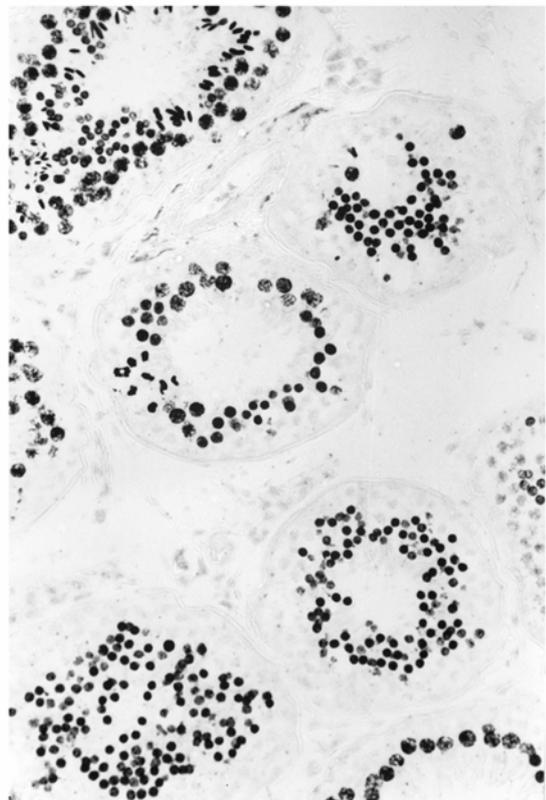


Abb. 44

Abb. 41: Samenstrang; DBH-Immunreaktion, x 140

Nahezu alle mit panneuralen Markern dargestellten Gefäßnerven um die A. testicularis (AT) und Venen (V) des Plexus pampiniformis sind DBH-positiv. Auch der Nervenplexus (Pfeil mit P) der A. testicularis wird mit diesem neuronalen Marker deutlich dargestellt.

Abb. 42: Samenstrang; TH-Immunreaktion, x 140

Die Gefäßnerven der A. testicularis (AT) und auch die Nerven im intervenösen Bindegewebe und um die Venen (V) des Plexus pampiniformis werden mit dieser Methode in geringerem Maße erfasst als mit der DBH-Reaktion.

Abb. 43 : Samenstrang; TH-Immunreaktion, x 225

Ein dickes Nervenbündel (NB) ist weitgehend positiv, doch die Intensität der Reaktion ist an einigen Stellen geringer als bei den Einzelaxonen, die sich um die Venen (V) des Plexus pampiniformis befinden.

Abb. 44: Hodenparenchym; NPY-Immunreaktion, x 225

Bei der TH-Immunreaktion reagieren in den Tubuli seminiferi auch die Kerne von Keimzellen in dem Zeitraum vom Pachytän der primären Spermatozyten bis zu elongierten Spermatiden.

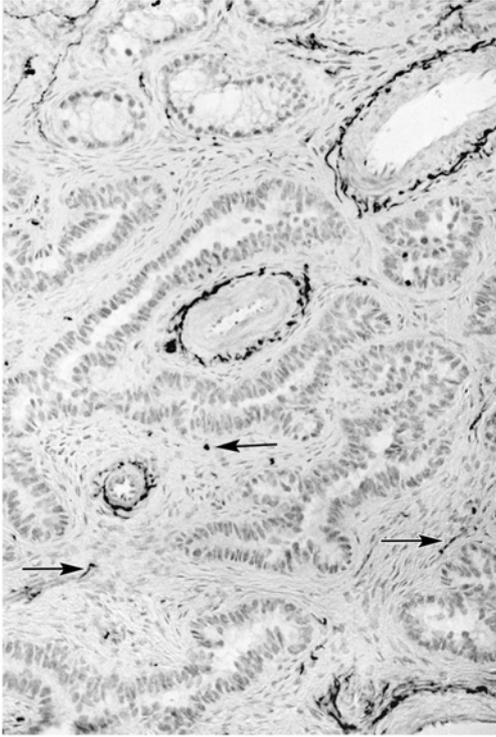


Abb. 45

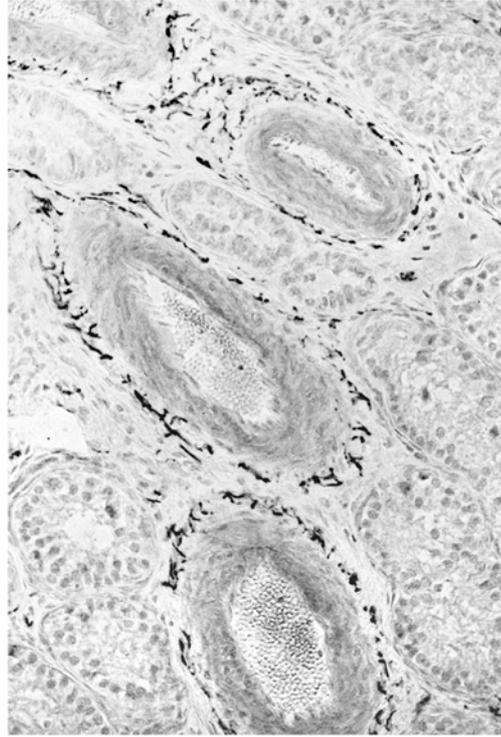


Abb. 46

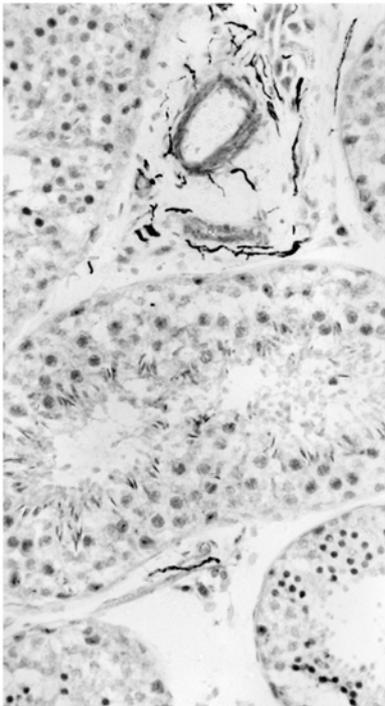


Abb. 47

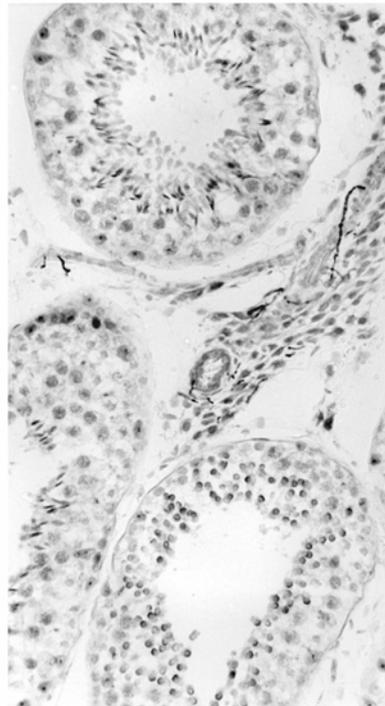


Abb. 48

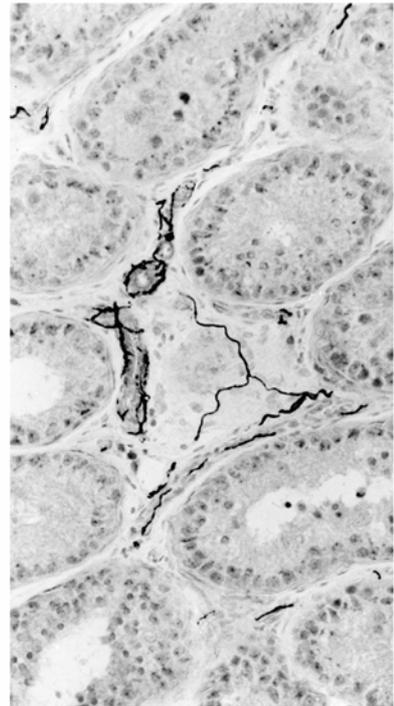


Abb. 49

Abb. 45: Mediastinum in der oberen Hodenhälfte; NPY-Immunreaktion, x 225

Eine Konvolutarterie entlässt Zweige ins Mediastinum. Im Bindegewebe des Mediastinums sind auch Einzelaxone zu erkennen (Pfeile).

Abb. 46: Mediastinum testis; NPY-Immunreaktion, x 225

Konvolutarterie, aus der ein kleinerer Zweig (oben) abgeht. Der Nervenplexus in der Adventitia-Media-Grenzzone ist vollständig ausgebildet.

Abb. 47: Kaudales Hodenparenchym ; NPY-Immunreaktion, x 225

Der Hoden befindet sich in aktiver Spermatogenese. In den Tubuli sind Spermatiden zu erkennen. Die Nervendichte pro Fläche ist geringer als bei Tieren in präpuberalem Stadium.

Abb. 48: Hodenparenchym; NPY-Immunreaktion, x 225

In den Tubuli sind Spermatiden zu erkennen. In dieser Phase gibt es im intertubulären Bereich nur eine schwache Nervenversorgung.

Abb. 49: Hodenparenchym; NPY-Immunreaktion, x 225

Es handelt sich um das Parenchym eines präpuberalen Tieres. Die Nervendichte zwischen den Tubuli seminiferi ist höher als bei den Tieren mit kompletter Spermatogenese.

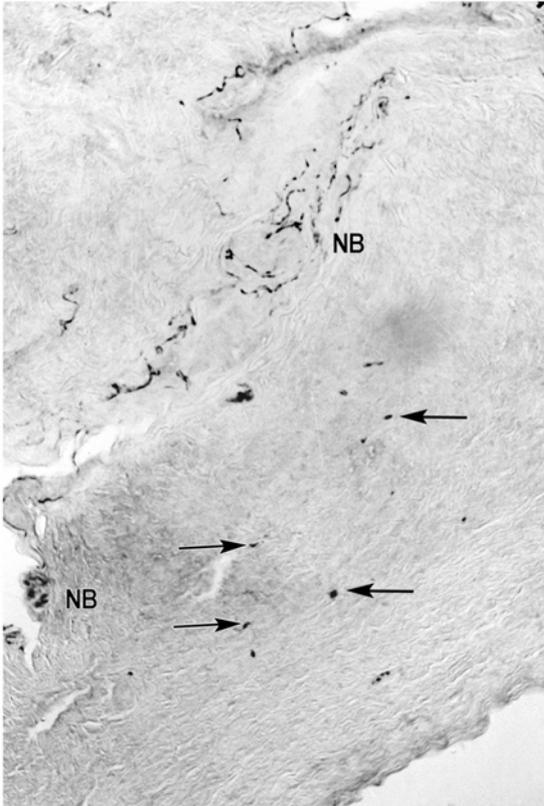


Abb. 50

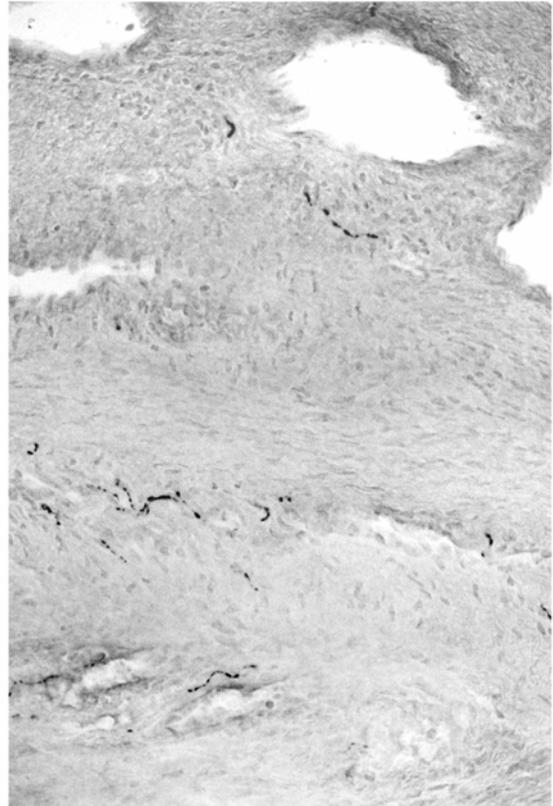


Abb. 51

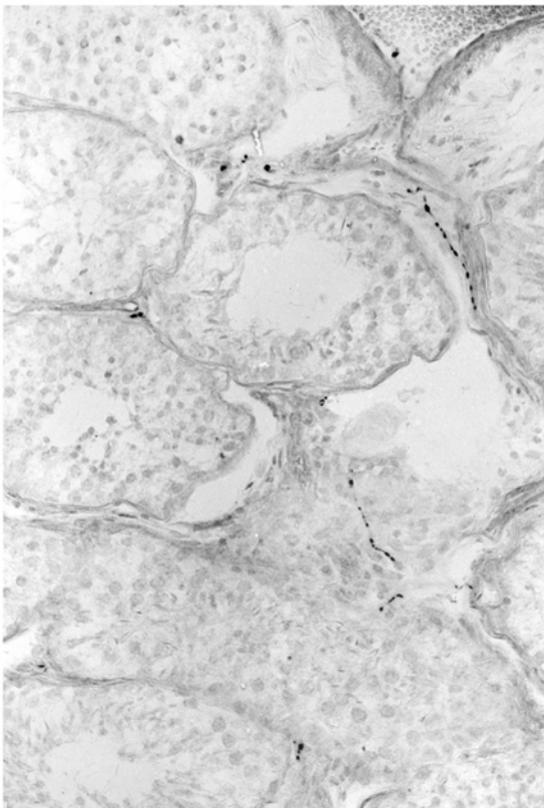


Abb. 52

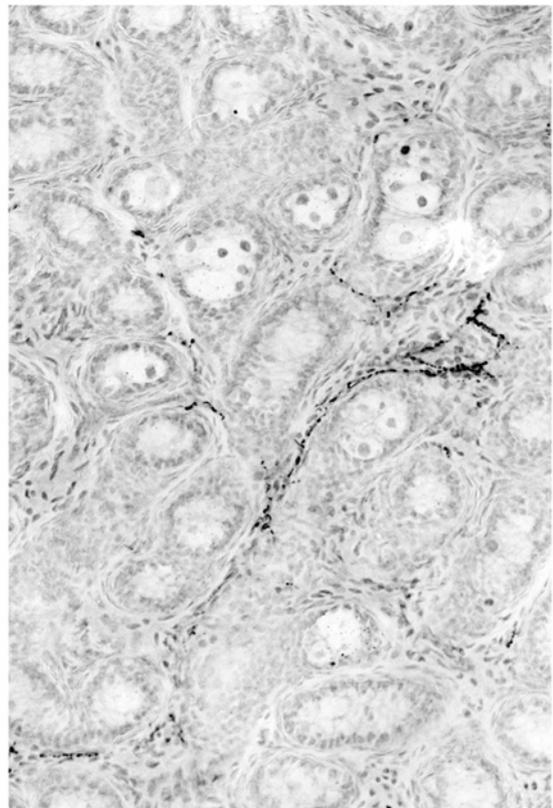


Abb. 53

Abb. 50: Kaudale Tunica albuginea; VIP-Immunreaktion, x 225

In einem dicken Nervenbündel (NB) erkennt man positive Einzelfasern. Es liegen auch VIP-IR Axone (Pfeile) im Bindegewebe der Tunica.

Abb. 51: Mesorchium; VIP-Immunreaktion, x 225

Im Meso zwischen Hoden und Nebenhoden ziehen VIP-positive Einzelfasern. Sie stellen Anteile des mesorchialen Zuschuss dar.

Abb. 52: Hodenparenchym; VIP-Immunreaktion, x 225

Zwischen den Hodenkanälchen sind variköse Einzelfasern zu erkennen.

Abb. 53: Hodenparenchym; VIP-Immunreaktion, x 225

Bei präpuberalen Tieren sind in fast jedem Zwickel positive Nervenfasern zu erkennen.

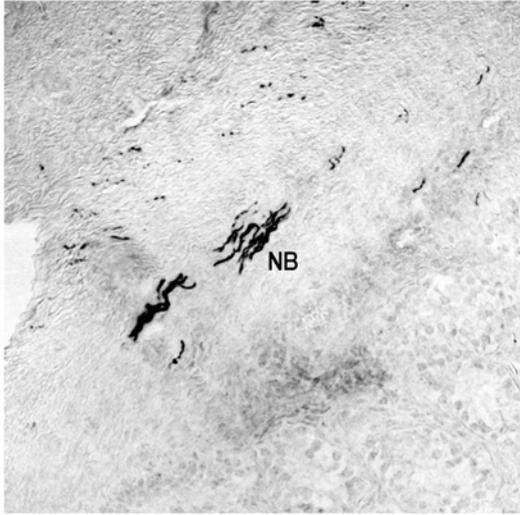


Abb. 54

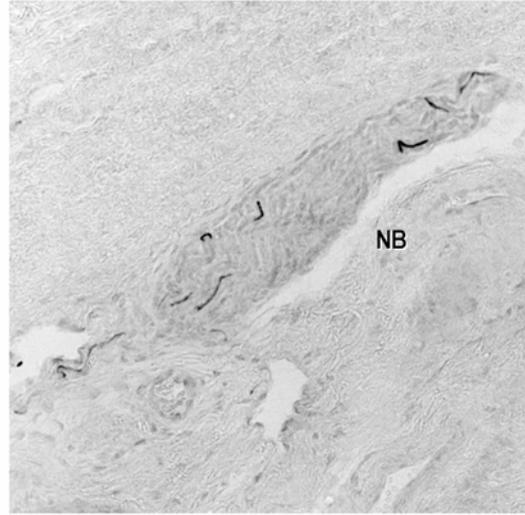


Abb. 55

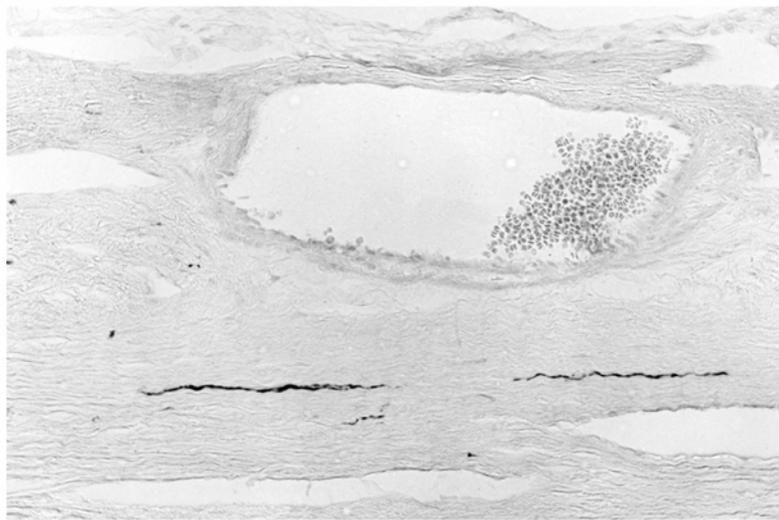


Abb. 56



Abb. 57

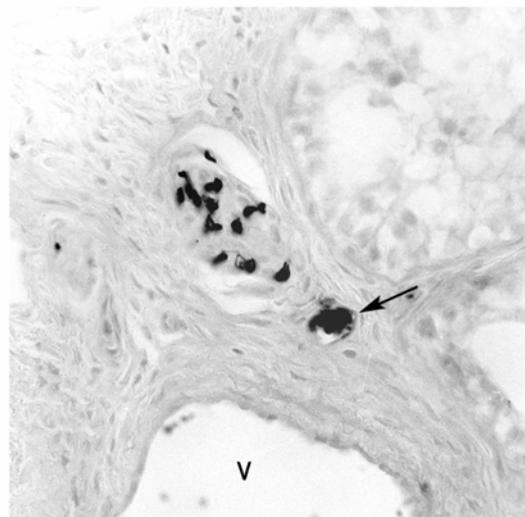


Abb. 58

Abb. 54: Kaudale Tunica albuginea; CGRP-Immunreaktion, x 225

In einem Nervenbündel reagieren einige Axone CGRP-positiv. Auch Einzelaxone sind CGRP-positiv. Im Hodeninneren zwischen den Hodentubuli sind keine CGRP-IR Fasern zu erkennen.

Abb. 55: Tunica albuginea am Margo liber; CGRP-Immunreaktion, x 225

In dem Nervenbündel (NB) sind nur Einzelaxone CGRP-positiv.

Abb. 56 : Tunica albuginea; CGRP-Immunreaktion, x 225

Im Bindegewebe der Tunica verlaufen einzelne Nervenfasern. Meist stehen diese Axone nicht in engem Kontakt mit Blutgefäßen.

Abb. 57: Tunica albuginea des Margo lateralis; MBP-Immunreaktion, x 350

Im Bindegewebe zieht eine positive Einzelfaser mit Ranvier'schem Schnürring.

Abb. 58: Tunica albuginea am Margo lateralis; MBP-Immunreaktion, x 350

In einem Nervenbündel erkennt man positive Axone. Direkt neben dem Bündel befindet sich ein kleines Blutgefäß (Pfeil), dessen Erythrozyten dunkel angefärbt sind. Die roten Blutkörperchen in der Vene (V) sind nicht angefärbt.

4. Diskussion

Die autonome Nervenversorgung im Damhirschhoden wird über den Nervus spermaticus superior (NSS) und den Nervus spermaticus inferior (NSI) gewährleistet. Der Nervus spermaticus superior begleitet die A. testicularis, während der Nervus spermaticus inferior neben dem Ductus deferens verläuft (Hodson 1970). Die Abgänge aus diesen Nerven erreichen die Gonade über drei Hauptwege. Die Nervenbündel, die dem NSS entspringen, ziehen im Gefäßkonus des Samenstranges zum kranialen Hodenpol und bilden den funikulären Nervenzuschuß. Anteile des NSS, aber überwiegend des NSI ziehen im Mesodeferens nach kaudal und treten sukzessive von der epididymalen Seite über das Mesorchium an die Gonade heran und repräsentieren den mesorchialen Nervenzuschuß. Zuletzt ziehen Nervenfasern des NSI nach kaudal, um über das Ligamentum testis proprium in die kaudale Tunica albuginea vorzudringen. Die Arbeiten von Mitchell (1935), Kuntz und Morris (1946), Hodson (1970) und Peterson und Brown (1973) kamen noch zu dem Schluß, dass die Innervation des Hodens ausschließlich über die funikulären Nervenbündel des NSS stattfindet. Doch weitere Untersuchungen von Santamaría et al. (1990), sowie Zhu et al. (1995) stimmen darin überein, dass außerdem Nerven über den Nebenhodenschwanz zum kaudalen Hodenpol in die Tunica albuginea ziehen. Durch die Studien an großen Ungulaten wie Rind (Wrobel und Abu-Ghali 1997), Esel (Wrobel und Moustafa 2000) und Kamel (Saleh et al. 2002) wurden dann die drei Hauptwege für die Innervation des Hodens etabliert. In der Gonade des jungen Schweins (Wrobel und Brandl 1998) erfolgt die Innervation ebenfalls über funikuläre, mesorchiale und kaudale Nervenzuschüsse, während im adulten Tier nur noch die funikuläre Route von Bedeutung ist, und sich die Innervation der männlichen Gonade vor allem auf den Gefäßanteil im Samenstrang konzentriert.

Beim Damhirsch verlaufen die Nerven des funikulären Zuschusses im Gefäßkonus unabhängig von der sich stark windenden Arteria testicularis. Sie teilen sich nach kaudal in Zweige auf, die zum einen den Plexus um die A. testicularis bilden, zum andern die Venen des Plexus pampiniformis innervieren. Diese Verteilung der Nerven im Samenstrang wurde auch bei anderen Spezies, wie Rind, Esel und Schwein beobachtet, während beim Kamel die Venen des Plexus pampiniformis wie alle übrigen Hodenvenen nicht innerviert sind (Saleh et al. 2002).

Das Mediastinum wird überwiegend von Bündeln funikulärem Ursprungs versorgt, welche sich aufzweigen und insbesondere die kleinen mediastinalen Blutgefäße innervieren. Auch Konvolutarterien, die aus den Septalarterien hervorgehen, erhalten einen Nervenanteil. Enge topographische Beziehungen zwischen den Epithelien des Rete testis und den mediastinalen Nerven kommen beim Damhirsch nicht vor. Saleh et al. (2002) beobachteten im Mediastinum des Kamels einzelne Nervenfasern in direktem Kontakt mit dem Epithel des Rete testis.

In der Tunica albuginea, in den Septula testis und in den Lobuli testis beobachtet man im Hirschhoden eine weitgehend kontinuierliche Innervation. Die Nerven sind meist mit Arterien assoziiert und bilden einen Plexus in der Adventitia-Media-Zone. Bis auf wenige peptiderge und myelinisierte Fasern sind die meisten Nerven DBH-positiv und postganglionärer sympathischer Natur. Sie erfüllen vasomotorische Aufgaben, indem sie auf die glatte Muskulatur in den Arterienwänden einwirken. Die Venen werden nur im Plexus pampiniformis regelmäßig von Nervenendigungen versorgt. Beim Kamel ist das ganze venöse Gefäßsystem, inclusive des Plexus pampiniformis, frei von jeder Innervation (Saleh et al. 2002). Beim Bullen und Kater wiederum werden auch die Venen des Stratum vasculosum der Tunica albuginea sporadisch von einzelnen Nervenfasern versorgt (Wrobel und Abu-Ghali 1997; Gürtler 2001).

Die Hoden des Hirsches durchlaufen jahreszeitliche Veränderungen (Chapman and Chapman

1970; Chaplin und White 1972; Asher et al. 1987, 1989), die sich im Hodenvolumen, im Durchmesser der Hodenkanälchen, in der Spermatogeneseaktivität und auch im Grad der intertubulären Vaskularisation widerspiegeln. Diese Veränderungen werden von Schwankungen in der intralobulären Nervendichte begleitet. Bei Tieren mit kleinen und soliden Tubuli, typisch für die Reproduktionspause und auch für den Zeitraum um die Pubertät, erkennt man bei allen intralobulären Arterien bis hin zu den Kapillaren eine dichte und kontinuierliche Innervation. Während der Fortpflanzungsphase sind sowohl das Hodenvolumen als auch der Tubulusdurchmesser maximal. Im gesamten Hoden vollzieht sich die Spermatogenese und die Leydigzellpopulation ist vergrößert. Das Gefäßsystem passt sich dieser Entwicklung an, indem die Arterien in den Septula testis und Lobuli testis an Länge zunehmen, größere Gefäßdurchmesser erreichen und die Muskulatur in der Media verstärkt ist. Allerdings werden diese Anpassungen der Gefäße an eine erhöhte Hodenfunktion von den Nerven nicht in gleicher Weise mitvollzogen. Im Gegenteil, während dieser Phase, sind die meisten intra- und interlobulären Arterien, teilweise sogar septale Arterien in allen Bereichen des Hodens geringer innerviert. Saleh et al. (2002) stellte beim Kamel, das ebenfalls einem jahreszeitlichen Reproduktionszyklus unterliegt, ähnliche Veränderungen in der Nervendichte fest. Bei dieser Spezies beginnt das Volumenwachstum der Gonade in den Wintermonaten und die maximale Größe wird im Frühjahr erreicht. Daraufhin verringert sich das Hodenvolumen wieder während des Sommers bis in den Winter. Die Innervationsdichte in den Septula testis und in den intertubulären Bereichen ist im Winter und Frühling am geringsten, doch steigt sie in den Sommer- und Herbstmonaten. Die Ergebnisse beim Hirsch- und Kamelhoden untermauern auf den ersten Blick die Untersuchungen von Molenaar et al. (1997) und Sienkiewicz et al. (2000), die darauf hinweisen, dass eine umgekehrte Relation zwischen der Innervation und endokrinen Aktivität des Hodens besteht. Doch die geringe Dichte, die kleine Zellgröße und die verringerte 3β -HStDH-Aktivität der Leydigzellen beim

Kamel zusammen mit sehr wenigen intertubulären Nerven im Frühling kann nicht im Sinne von Molenaar et al. (1997) erklärt werden. Auch beim Schwein gibt es keine umgekehrte Beziehung zwischen der wellenförmigen Aufstockung der Leydigzellpopulation während der normalen postnatalen Entwicklung (Dierichs et al. 1973; Wrobel et al. 1973) und der Innervation des Schweinehodens. Die Hoden von 3- 5 Wochen alten Ferkeln haben die dichteste Innervation aller untersuchter Altersgruppen bei gleichzeitiger präpuberaler Hypertrophie der Leydigzellen (Wrobel und Brandl 1998).

Der funktionelle und entwicklungsabhängige Status der Tubuli seminiferi hingegen korreliert ziemlich gut mit den alters- und jahreszeitlichen Veränderungen in der Nervendichte, die bei den meisten Säugetieren existieren. Hoden mit soliden und kleinen Tubuli, wie man sie in der präpubertären Phase der Säugetiere und während der Fortpflanzungspause mancher Säuger sieht, sind meist besser innerviert, als solche mit expandierten Tubuli, die sich in aktiver Spermatogenese befinden. Diese Annahme wird durch mehrere Beobachtungen bestätigt. Nistal et al. (1982) fanden mehr Nervenfasern um Tubuli seminiferi von Kindern und Erwachsenen mit Hypogonadismus als um die Hodenkanälchen von normalen Männern. Auch von Prince (1996) wurde die Präsenz von Nervenendigungen in der menschlichen Lamina propria der Tubuli seminiferi nur während der Kindheit (3-10 Jahre) nachgewiesen. Mayerhofer et al. (1996) wiesen eine große Anzahl von TH-IR Nervenfasern im Hoden juveniler Rhesusaffen nach, doch nur wenige zwischen den Tubuli seminiferi der erwachsenen Affen.

Der Rückzug der intrinsischen Innervation des Ungulatenhodens tritt während der puberalen und postpuberalen Expansion seines Parenchyms klar hervor. Die Hoden junger Ferkel von 3- 5 Wochen sind noch stark innerviert, doch fehlten dem sehr großen Hoden eines erwachsenen Ebers (2-3 Jahre) fast jede innere Innervation (Wrobel und Brandl, 1998). Die Hoden 5-25 Wochen alter Kälber weisen noch Nervenfasern in der gesamten Länge des Mediastinums auf,

während sich die Innervation des Mediastinums beim adulten Bullen nur auf die obere Hodenhälfte erstreckt. (Wrobel und Abu-Ghali 1997).

Ebenso beim Esel erkennen Wrobel und Moustafa (2000) regionale Unterschiede in der Innervation des Hodens. Die Nerven konzentrieren sich in der Tunica albuginea, den Septula testis und in den Lobuli testis auf den kranialen und kaudalen Pol, sowie auf die epididymale Seite des Hodens. Die Bereiche zwischen Margo liber und dem zentral lokalisierten Mediastinum bleiben frei von Nerven. Das Mediastinum selbst wird in seiner gesamten Ausdehnung innerviert. Dieses Innervationsmuster im Hoden von jung adulten Eseln könnte darauf hindeuten, dass hier ein Rückzug der Nerven im Gange ist, während parallel dazu Hodenwachstum und Expansion der Tubuli seminiferi noch während der ersten 5 Lebensjahre stattfinden (Nipken und Wrobel 1997).

Im vollentwickelten und spermatogenetisch aktiven Damhirschhoden umgibt ein lockerer Nervenplexus die Terminalsegmente der Tubuli seminiferi. Diese Nervenfasern sind DBH-positiv. Der Übergang der Tubuli seminiferi contortii zu den Tubuli recti ist bei den Säugern wie eine Schleuse aufgebaut, um einen Rückfluß des Inhalts vom Rete testis in die Tubuli seminiferi zu verhindern (Tuck et al. 1970; Kormanó 1974). Eine Regulation des Tubuluslumens im Bereich der Terminalsegmente liegt nahe, und bei einigen Säugetieren gibt es tatsächlich spezielle sphinkter-ähnliche Vorrichtungen. Beim Hamster, beschrieben Cavicchia und Burgos (1977) einen Ring kontraktiler Zellen auf der Grenze zwischen Tubuli seminiferi und Tubuli recti, und beim Bullen wird jedes Terminalsegment von einem manschettenähnlichen Gefäßplexus umgeben (Wrobel et al. 1978). Die Konzentration von Nervenfasern in diesem Bereich des Damhirschhodens könnte ebenfalls Regulationsaufgaben dienen.

Nistal et al. (1982) beschrieb Axone, die die Tubuli seminiferi im menschlichen Hoden innervieren. Eine solche Beobachtung wurde beim Hirsch nicht gemacht. In dieser Studie

wurden auch keine Hinweise darauf gefunden, dass die Leydigzellen im Hirschhoden innerviert werden. Auch bei anderen Ungulaten, wie Rind (Wrobel und Abu-Ghali 1997) und Schwein (Wrobel und Brandl 1998) werden die Leydigzellen generell nicht innerviert. Indessen wurde beim Menschen die Innervation von Leydigzellen durch mehrere Autoren bestätigt (Yamashita 1939; Okkels und Sand 1940; Gray 1947; Van Campenhout 1949; Baumgarten und Holstein 1967; Nistal et al. 1982; Prince 1992; Feldmeier 1998). Die genaue Beschreibung der Kontakte zwischen Nervenendigungen und der Leydigzellmembran anhand einer elektronenmikroskopischen Analyse veröffentlichte Prince (1992). Dabei lagen zwischen den Nerven und Leydigzellen in menschlichen Hoden im Alter von 4 Monaten bis 19 Jahren meist indirekte Kontakte vor. Auch beim Hund (Stach 1963), bei der Katze (Norberg et al. 1967a; Gürtler 2001), bei Vögeln (Baumgarten und Holstein 1968, 1974), bei Reptilien (Unsicker 1973) und beim Rhesusaffen (Mayerhofer et al. 1996) werden direkte Kontakte zwischen den Leydigzellen und Nervenfasern dokumentiert.

Charakterisierung der Hodennerven

Adrenerge Innervation des Hodens

Die PGP-9.5-Immunreaktion zeigt im Hinblick auf seine Eigenschaften als panneuraler Marker im Damhirschhoden das vollständigste Bild und wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit zur Beschreibung der allgemeinen Innervation herangezogen. Fast alle PGP-9.5-positiven Hodennerven des Damhirsches sind auch DBH-positiv, somit von sympathischer postganglionärer Qualität. Die sympathischen Nervenfasern dominieren auch in den Hoden der anderen untersuchten Spezies (Campos et al. 1990; Tainio 1994; Rauchenwald et al. 1995; Lakomy et al. 1997; Wrobel und Abu-Ghali 1997; Wrobel und Brandl 1998; Wrobel und

Moustafa 2000; Gürtler 2001; Saleh et al. 2002). Sie haben vasokonstriktorische Eigenschaften und beteiligen sich an der Regulation des Blutflusses sowie der Thermoregulation des Hodens (Hodson 1970). Zum anderen modulieren anscheinend die adrenergen Hodennerven wie auch zirkulierende Katecholamine die Leydigzellfunktionen (Mayerhofer et al. 1989), da außer den Sertolizellen auch die Leydigzellen über β -adrenerge Rezeptoren verfügen (Heindel et al. 1981; Heindel und Treinen 1989).

Cholinerge Innervation des Hodens

Der Hoden des Damhirsches enthält nur wenige cholinerge Nervenfasern. Die cholinergen Fasern von NSS und NSI enden größtenteils in den Nervenbündeln im Bindegewebe des Gefäßkonus und in der Wand des Ductus deferens. In Untersuchungen am Hoden von Rind (Wrobel und Abu-Ghali 1997), Schwein (Wrobel und Brandl 1998), Esel (Wrobel und Moustafa 2000) und Kamel (Saleh et al. 2002) wurden keine cholinergen Nervenfasern dokumentiert. Allerdings beschrieben Wrobel und Gürtler (2001) im Katerhoden mit der gleichen histochemischen Methode einen relativ hohen Anteil cholinerg Fasern, welche im kaudalen Mediastinum, in den Septen und im intertubulären Bindegewebe teilweise gefäßassoziiert sind. Ihr Ziel sind auffällig stark innervierte Arteriolen, deren cholinerge Nerven durch die starke Muskelschicht bis an das Endothel ziehen. Vermutlich haben die Gefäßnerven hier eine besondere Rolle bei der Regulation der Mikrozirkulation. Der genaue Wirkungsmechanismus cholinerg Fasern auf Blutgefäße ist unklar. Nach McMahon und Kadowitz (1992) bewirkte das neuronal freigesetzte Acetylcholin in pulmonalen Blutgefäßen der Katze eine endothelabhängige Kaskade biochemischer Prozesse, die schließlich eine Vasodilatation herbeiführt.

In früheren Veröffentlichungen wird oftmals eine reiche cholinerge Innervation des Säugetierhodens beschrieben (Risley und Skrepetos 1964; El-Badawi und Schenk 1967; Bell und McLean 1973; Langford und Silver 1974), doch sind die Befunde fraglich, da mit nicht

optimalen Acetylcholinesterase-Nachweisen erhoben. Letztlich muß der Nachweis cholinergener Innervation mit moderner adäquater Technik getrennt für jede Säugetierspezies neu erbracht werden.

Peptiderge Innervation des Hodens

Im männlichen Geschlechtsapparat werden hohe Konzentrationen von NPY beschrieben (Adrian et al. 1984), und NPY-haltige Nervenfasern befinden sich überall im männlichen Geschlechtstrakt (Forsgren 1989). NPY-positive Nerven erreichen den Hoden über den NSS und NSI (Properzi et al. 1992; Rauchenwald et al. 1995; Zhu et al. 1995). Mehr als die Hälfte der Fasern, die in den dicken Nervenbündeln des Damhirsches enthalten sind, reagieren mit der NPY-Immunreaktion positiv. NPY stellt somit die am meisten vertretene peptiderge, neuronale Komponente bei dieser Spezies dar. Gleiches wurde auch bei Rind (Wrobel und Abu-Ghali 1997), Schwein (Wrobel und Brandl 1998), Esel (Wrobel und Moustafa 2000), Kamel (Saleh et al. 2002), Meerschweinchen und Ratte (Lamano Carvahlo et al. 1986) beobachtet. Allen et al. (1989) beschrieben NPY-IR Nerven in der Hodenkapsel der Ratte, doch das Hodeninnere war frei von NPY-haltigen Fasern. Im Froschhoden bilden NPY-positive Nerven einen dichten Plexus um die Gefäße (Achi et al. 1995). Aufgrund der großen Menge an NPY-Fasern und deren Lokalisation kann man annehmen, dass NPY und DBH größtenteils kolokalisiert sind. Diese Kolokalisation wurde auch für andere Organe nachgewiesen (Greenberg et al. 1985; Lamano Carvalho et al. 1986; Kannisto et al. 1986; Allen et al. 1989; Järvi und Petto-Hiukko 1990; Majewski und Heym 1991; Li und Welsh 1991; Wrobel und Kujat 1993; Majewski et al. 1995; Luff 1996). Bei den NPY-Rezeptoren werden zumindest drei Subtypen (Y_1, Y_2, Y_3) beschrieben (Wahlestedt et al. 1992), wobei NPY die Mitose glatter Gefäßmuskelzellen in Zellkulturen über den Y_1 -Rezeptor stimuliert

(Erlinge et al. 1994). NPY bewirkt auch eine Vasokonstriktion im Hoden, wahrscheinlich über die Einwirkung auf NPY Y1-Rezeptoren, die sich in den intratestikulären Arteriolen befinden (Collin et al. 1998). Die gleiche Wirkung wird auch auf Blutgefäße in anderen Organen beschrieben (Han et al. 1998). Die Stimulation von NPY Y1-Rezeptoren im Hodengewebe führt zusammen mit Noradrenalin zu einer Vasokonstriktion oder hebt eine VIP-induzierte Vasodilatation auf (Larsen et al. 1981; Polak und Bloom 1984; Kopp et al. 1997).

Es wurden relativ wenige VIP-positive Nervenfasern im Damhirschhoden gefunden, wobei VIP-positive Fasern am kaudalen Pol stärker vertreten sind als in der kranialen Hodenhälfte und dort die Tunica albuginea innervieren. Saleh et al. (2002) beschrieben beim Kamel die Präsenz von VIP-positiven Fasern nur im Nervenzuschuß über das Ligamentum testis proprium und im Bereich des kaudalen Hodenpols. Bei der Ratte bestätigten Zhu et al. (1995) ebenfalls, dass VIP-IR Axone über den NSI den unteren Hodenpol innervieren. Ähnlich verhält es sich im Hoden des Bullen, wo Wrobel und Abu-Ghali (1997) feststellten, dass einige VIP-positive Fasern die Tunica albuginea über das Lig. testis proprium und das kaudale Mesodeferens erreichen. Diese VIP-positiven Nerven waren noch relativ zahlreich beim 5-wöchigen Kalb, doch nahmen sie mit fortschreitendem Alter ab und waren im Hoden des erwachsenen Rindes inexistent. Suburo et al. (2002) stellten fest, dass im NSI des Katers die VIP-positiven Fasern den größten Anteil an peptidergen Fasern darstellten. Die meisten erreichten hiervon allerdings nicht den Hoden selbst (Gürtler 2002). Im Hoden des Mannes und des Esels (Vaalasti et al. 1986; Wrobel und Moustafa 2000) wurden keine VIP-IR Fasern beobachtet. Das Verteilungsmuster terminaler VIP-Nerven im Urogenitaltrakt des Katers (Alm et al. 1977) führen zu der Vermutung, dass sie an der Regulierung der Aktivität glatter Muskulatur und unter Umständen auch auf die Funktion epithelialer Zellen einwirken. Auch Larsen et al. (1981) kamen zu dem Schluß, dass VIP eine Rolle in der Aktivität glatter

Muskulatur des männlichen Urogenitaltraktes spielen könnte. Lissbrant und Bergh (1997) bewiesen in einem Experiment die vasodilatierende Wirkung dieses Neuropeptids, indem sie steigende Konzentrationen an VIP in den Hoden erwachsener Ratten injizierten. So führte auch die elektrische Stimulation des NSI, der überwiegend VIP-positive Nervenfasern enthält (Suburo et al. 2002), zu einem erhöhten Blutfluß im Hoden (Chiocchio et al. 1999). VIP-positive Axone, die im Katerhoden unabhängig von Blutgefäßen oder zwischen Leydigzellgruppen verlaufen (Suburo et al. 2002) oder nicht-gefäßbezogene Fasern in anderen Teilen des Urogenitalsystems (Dixon et al. 1994; Rösch et al. 1997) könnten durchaus auch sensitive Qualität haben.

CGRP-IR Nervenfasern haben eine Reihe biologischer Funktionen. Zusammen mit anderen vasoaktiven Peptiden spielt CGRP eine Rolle in der neurogenen Inflammation der Haut (Wallengren 1997; Ansel et al. 1997; Holzer 1998; Scholzen et al. 1998). Eine Versuchsreihe von Anouar et al. (1998) am trächtigen und nicht-trächtigen Uterus bei der Ratte dokumentierte eine relaxierende Wirkung auf das Myometrium. In den Koronararterien der Ratte (Sheykhzade und Nyborg 1998), vom Schwein (Yoshimoto et al. 1998) und in Knochenarterien (Lundgaard et al. 1997) wirkte CGRP direkt auf die glatten Muskelzellen der Blutgefäße. Die CGRP-induzierte Vasodilatation von isolierten Knochenarterien bestand auch nach einer Inhibition der NO-Synthase sowie der Prostaglandinsynthese (Lundgaard 1997). In der Aorta der Ratte hob CGRP den endothelialen Kalziumgehalt an und aktivierte die NO-Synthase. Es kam zu einer NO-Abgabe ohne eine direkte hemmende Wirkung auf die glatte Aortamuskulatur (Yoshimoto et al. 1998). Lissbrant et al. (1997) kamen in ihrer Studie zum Schluß, dass CGRP zu einer Vasodilatation der Gefäße im Hoden der Ratte führte und somit wahrscheinlich in der lokalen Regulation des testikulären Blutflusses von Bedeutung sein könnte. Schließlich werden CGRP-positive Nervenfasern mit Sensorik (Häppöla und Lakomy 1989) und Schmerzempfindung (Csilik et al. 1993) in Verbindung gebracht. Die wenigen im

Hirschhoden vorkommenden CGRP-positiven Axone gehören offenbar zum afferenten Funktionskreis, weil der überwiegende Anteil keine vaskuläre Lokalisation aufweist. Es werden etwas mehr CGRP-IR Nerven im NSI beobachtet als im NSS. Die Mehrheit dieser Axone enden in Nervenbündeln um den Ductus deferens und in der Wand desselben, zwischen den Windungen des Ductus epididymidis und im Bindegewebe des Plexus pampiniformis. Im Gefäßkonus werden die A. testicularis und ihre Zweige mit wenigen Axonen intramural versorgt. Die CGRP-Fasern, die den eigentlichen Hoden erreichen, kommen über alle drei Routen und verteilen sich in der Tunica albuginea meist unabhängig von den Arterien der Tunica vasculosa. Im Inneren des Hodens findet man sie sporadisch am oberen Mediastinumrand. Lamano Carvalho et al (1986) dokumentieren im Hoden von Meerschweinchen und Ratte nur wenige CGRP-positive Nervenfasern. Auch bei Rind, Schwein, Esel und Kamel (Wrobel und Abu-Ghali 1997; Wrobel und Brandl 1998; Lakomy et al. 1997; Wrobel und Moustafa 2000; Saleh et al. 2002) wurden CGRP-positive Fasern in geringen Mengen gefunden. Im Gegensatz zu den vorher genannten Spezies sind im Katerhoden vergleichbar höhere Anteile an CGRP-Fasern nachzuweisen (Wrobel und Gürtler 2002). Beim Menschen ist der Transmitter nur in der Hodenkapsel vorhanden (Tainio 1994).

SP ist ein weiteres Neuropeptid, welches von sensorischen Nervenfasern der Haut freigesetzt wird und an der neurogenen Inflammation bei z. B. der Psoriasis oder atopischen Dermatitis beteiligt ist (Wallgren 1997; Ansel et al. 1997; Scholzen et al. 1998). Außerdem bewirkte der Transmitter Vasodilatation an Arteriolen der Lunge der Katze. Diese Gefäßerweiterung konnte selektiv über einen Blocker der NO-Synthese verhindert werden. In Zellkulturen reduzierte SP die Anzahl von LH-Rezeptoren auf Leydigzellen von Hamstern (Kanchev et al. 1995) und bremste die Testosteronproduktion (Angelova et al. 1991).

Im NSS des Hundes wurde die Koexistenz von SP und CGRP nachgewiesen (Tamura et al. 1996). SP ist primär in sensiblen Neuronen lokalisiert (Hökfelt et al. 1975). Auch im

Cervidenhoden sind SP-IR Nerven aufgrund ihrer Lokalisation eher Fasern sensibler Qualität zuzuordnen. Die Innervation des Damhirschhodens mit SP- positiven Nervenfasern ist sporadisch. Sie befinden sich im NSI und verlaufen als einzelne Axone im Bereich des Ductus deferens und im Nebenhodenschwanz. Solitäre SP-positive Fasern sind auch gelegentlich im Bindegewebe der Tunica albuginea vorhanden. Alm et al. (1978) untersuchte das Vorkommen SP-positiver Nerven in Anzahl und Verteilung im Urogenitaltrakt von Katze, Meerschweinchen und Ratte und stellte fest, dass diese Nerven im Vergleich mit adrenergen, cholinergen und VIP-positiven Fasern in geringer Anzahl und separat auftreten. Bei Rind, Schwein, Esel und Kamel wurden ebenfalls nur wenige positive SP- Nervenfasern im Hoden beobachtet (Wrobel und Abu-Ghali 1997; Wrobel und Brandl 1998; Wrobel und Moustafa 2000; Saleh et al. 2002). So ist CGRP im allgemeinen wohl der wichtigste Neurotransmitter in sensiblen, afferenten Nervenfasern bei den Ungulaten.

Die Nerven, die zum Säugetierhoden ziehen, sind meist nicht myelinisierter Natur. Allerdings entdeckte man mit Hilfe des Elektronenmikroskops in den großen Nervenbündeln des NSS im supratestikulären Bereich des Samenstranges bei Kater und Kamel eine geringe Anzahl an schwach myelinisierten Nervenfasern (Peterson und Brown 1973; Saleh et al. 2002).

Beim Kater machen solche Faseranteile weniger als 3,6% aus. Sie sind afferent mit einer Konduktionsgeschwindigkeit zwischen 3.0 und 52.5 m/sec (Peterson und Brown 1973) und scheinen im Samenstrang zu enden, da die MBP-Reaktion in der Gonade selbst negativ verläuft (Wrobel und Gürtler 2001). Im Gegensatz zum Rind, Schwein und Esel (Wrobel und Abu-Ghali 1997; Wrobel und Brandl 1998; Wrobel und Moustafa 2000) stellt die MBP-Immunreaktion im Damhirschhoden einzelne myelinisierte Nervenfasern im Samenstrang und in der Tunica albuginea dar. Sie müssen zu den afferenten Fasern gezählt werden, obwohl beim Hirschhoden eingekapselte korpuskuläre Nervenendigungen, wie sie in der menschlichen Tunica albuginea beschrieben werden (Yamashita 1939; Kreutz 1964), fehlen.

5. Zusammenfassung

Die Innervation des Hirschhodens wurde bei 14 Damhirschen unterschiedlichen Alters untersucht. Zur Bestimmung des allgemeinen Innervationsmuster wurde der panneurale Marker Protein Gene Product 9.5 (PGP-9.5) verwendet. Nervenbündel des Nervus spermaticus superior (NSS) und Nervus spermaticus inferior (NSI) erreichen den Hoden über drei Wege (funikulär, mesorchial und kaudal). Die Nerven haben im Hirschhoden meist die Hodenarterien zum Ziel. Venen werden nur im Plexus pampiniformis regelmäßig mit Nervenfasern versorgt. Auch in den Lobuli testis sind die Axone größtenteils gefäßbezogen, und eine Innervation der Leydigzellen kann bei dieser Spezies nicht bestätigt werden. Aufgrund der starken Dopamin-beta-hydroxylase (DBH)-Immunreaktion lässt sich schließen, dass alle vaskulären Nerven postganglionärer sympathischer Natur sind. Neuropeptide Y (NPY) ist in den DBH-IR Nervenfasern meist kolokalisiert. Es gibt nur sporadisch cholinerge Nerven. Mit Hilfe der Myelin Basic Protein (MBP)-Immunreaktion wurden myelinisierte Nervenfasern im Samenstrang und in der Tunica albuginea dargestellt, die den afferenten Nerven zuzuordnen sind. Die sensorische Qualität in der intrinsischen Hodeninnervation erfolgt über Calcitonin gene-related Protein (CGRP)-positive Nerven, die unabhängig von Blutgefäßen verlaufen und im Bindegewebe des Samenstranges und der Tunica albuginea enden. Der Hirschhoden enthält eine geringe Menge an Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP)-positiven Axonen, die den kaudalen Hodenpol über den NSI erreichen und sensorischer Qualität sein dürften. Die Nervendichte in den Lobuli testis ist regional homogen, doch sind sowohl alters- als auch jahreszeitliche Veränderungen zu beobachten, die mit dem Entwicklungsstadium und auch dem funktionellen Status der Tubuli seminiferi in Zusammenhang stehen. Kleine Hoden mit soliden Tubuli seminiferi, wie sie in der präpuberalen Gonade und auch während der Fortpflanzungspause auftreten, werden stärker innerviert als große Hoden mit expandierten und spermatogenetisch aktiven Tubuli seminiferi.

6. Summary

The innervation of the cervine testis: Immunohistochemical studies in the fallow deer, *Dama dama*

In this investigation, the innervation in the testis of 14 specimens of fallow deer of different age was studied. To obtain a picture of the general innervation pattern the immunoreaction to the panneural marker PGP-9.5 was the first choice. Bundles of the superior and inferior spermatic nerves reach the testis via three access routes (funicular, mesorchial and caudal). The nerves in the cervine testis are generally associated with the testicular arteries. From the veins to the testis, only those in the pampiniformis plexus display an intrinsic innervation. In the testicular parenchyma, the nerve fibers are also associated to arterial blood vessels. There is no evidence of an innervation of Leydig cells in this species. The vascular fibres represent postganglionic sympathetic axons displaying a strong dopamine-beta-hydroxylase (DBH) activity, mostly co-expressed with neuropeptide Y (NPY). There are only a few cholinergic nerves in the cervine testis. Myelinated fibres occur in the spermatic cord and the tunica albuginea as shown by Myelin-Basic-Protein (MBP)-immunoreaction and are regarded as afferent. The viscerosensory quality in the testicular intrinsic innervation is mediated by Calcitonin Gene-Related Protein (CGRP)-positive nerves that run independently from vessels and end in the connective tissue of spermatic cord and tunica albuginea. The cervine testis contains a little amount of Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP)-positive axons which reach the caudal pole of testis as parts of the inferior spermatic nerve and via lig. testis proprium. The nerve density in the interior of the testicular lobules shows no regional differences, but age- and season-related changes that correlate well with the developmental and functional state of the seminiferous tubules. Small testes with solid and narrow tubules, as seen in the prepuberal phase and during seasonal reproductive quiescence, are better innervated than large testes with expanded and spermatogenetically active seminiferous tubules.

7. Literaturverzeichnis

Achi MV, Figueroa JM, González Nicolini V, Villar MJ, Tramezzani JH (1995) NPY- and CGRP-like immunoreactive nerve fibers in the testis and mesorchium of the toad (*Bufo arenarum*). *Cell Tiss Res* 281: 375-378

Adrian TE, Gu J, Allen JM, Tatemoto K, Polak JM, Bloom SR (1984) Neuropeptide Y in the human male genital tract. *Life Sciences* 35: 2643-2648

Allen LG, Wilson FJ, MacDonald GJ (1989) Neuropeptide Y-containing nerves in rat gonads: Sex difference and development. *Biol Reprod* 40: 371-378

Alm PJ, Alumets J, Brodin E, Hakanson R, Nilsson G, Sjöberg N-O, Sundler F (1978) Peptidergic (Substance P) nerves in the genito-urinary tract. *Neurosci* 3: 419-425

Alm P, Alumets J, Hakanson R, Sundler F (1977) Peptidergic (Vasoactive intestinal peptide) nerves in the genito-urinary tract. *Neurosci* 2: 751-754

Alm P, Alumets J, Hakanson R, Owman CH, Sjöberg NO, Sundler F, Walles B (1980) Origin and distribution of VIP (Vasoactive Intestinal Peptide)-nerves in the genitourinary tract. *Cell Tissue Res* 205: 337-347

Alm P, Lundberg LM, Wharton J, Polak JM (1988) Ontogenetic development of the guinea pig uterine innervation. *Histochemistry* 90: 19-24

Angelova PA, Davidoff MS, Kanchev LN (1991) Substance P-induced inhibition of Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Andrologia* 23: 325-7

Anouar A, Schirar A, Germain G (1998) Relaxant effect of the calcitonin gene-related peptide (CGRP) on the nonpregnant and pregnant rat uterus. Comparison with vascular tissue. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357: 446-453

Ansel JC, Armstrong CA, Song I, Quinlan KL, Olerud JE, Langhman SW, Burnett NW (1997) Interactions of the skin and nervous system. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2: 23-26

Abu-Ghali N (1997) Die autonome Innervation des Hodens beim Rind (*Bos taurus*). Inaug. Diss. Regensburg

Anakwe OO, Moger WH (1984) β -adrenergic stimulation of androgen production by cultured mouse testicular interstitial cells. *Life Sci* 35: 2041-2047

Anakwe OO, Murphy PR, Moger WH (1985) Characterization of beta-adrenergic binding sites on rodent Leydig cells. *Biol Reprod* 33: 815-826

Anderson JB, Williamson RCN (1986) The fate of human testes following unilateral torsion of the spermatic cord. *Br J Urol* 58: 698-704

Asher GW, Day AM, Barrell GK (1987) Annual cycle of lightweight and reproductive changes of farmed male fallow deer (*Dama dama*) and the effect of daily oral administration of melatonin in summer on the attainment of seasonal fertility. *J Reprod Fert* 79: 353-362

Asher GW, Peterson AJ, Bass JJ (1989) Seasonal pattern of LH and testosterone secretion in adult male fallow deer (*Dama dama*). *J Reprod Fert* 85: 657-665

Baumgarten HG, Holstein AF (1967) Catecholaminhaltige Nervenfasern im Hoden des Menschen. *Z Zellforsch* 79: 389-395

Baumgarten HG, Holstein AF (1968) Adrenerge Innervation im Hoden und Nebenhoden vom Schwan. *Z Zellforsch* 91 402-410

Baumgarten HG, Holstein AF (1971) Noradrenerge Nevenfasern im Hoden von Mammaliern und anderen Vertebraten. *J Neuro-visceral Rel (Suppl)* 10: 563-572

Baumgarten HG, Holstein AF, Rosengren E (1971) Arrangement, unltrastructure and adrenergic innervation of smooth musculature of the ductuli efferentes, ductus epididymidis and ductus deferens of man. *Z Zellforsch* 120: 37-79

Barrios VE, Nelson AG, Toombs CF (1998) BIBP3226 inhibits neuropeptide Y and pancreatic polypeptide potentiated neurogenic vasoconstriccion. *Life Sci* 62: 525-532

Bell C, McLean JR (1973) The autonomic innervation of the rat testicular capsule. *J Reprod Fert* 32: 253-258

Campos MB, Vitale ML, Ritta MN, Chiocchio SR, Calandra RS (1990) Catecholamine distribution in adult rat testis. *Androl* 22: 247-250

Cavicchia JC, Burgos MH (1977) Tridimensional reconstruction and biology of the intratesticular seminal pathway in the hamster. *Anat Rec* 187: 1-10

Chaplin RE, White RWG (1972) The influence of age and season on the activity of the testes and epididymides of the fallow deer, *Dama dama*. *J Reprod Fert* 30: 361-369

Chapman DI, Chapman NG (1970) Preliminary observations on the reproductive cycle of male fallow deer (*Dama dama*, L.) *J Reprod Fert* 21: 1-8

Chiocchio SR, Suburo AM, Vladucic E, Zhu BC, Charreau E, Décima EE, Tramezzani JH (1999) Differential effects of superior and inferior spermatic nerves on testosterone secretion and spermatic blood flow in cats. *Endocrinology* 140: 1036-1043

Collin O, Enfält E, Aström M, Lissbrant E, Bergh A (1998) Unilateral injection of neuropeptide Y decreases blood flow in the injected testis but may also increase blood flow in the contralateral testis. *J Androl* 19: 580-584

Crowe R, Chapple CR, Burnstock G (1991) The human prostata gland: a histochemical and immunohistochemical study of neuropeptides, serotonin, dopamin- β -hydroxylase and acetylcholinesterase in autonomic nerves and ganglia. *Br J Urol* 68: 53-61

Cross BA, Glover TD (1958) The hypothalamus and seminal emission. *J Endocrinol* 16: 385-395

Csillik B, Tatje L, Kovács T, Kukla E, Rakic P, Knyihár-Csillik E (1993) Distribution of calcitonin gene-related peptide in vertebrate neuromuscular junctions: relationship to the acetylcholine receptor. *J Histochem Cytochem* 41: 1547-1555

Dahl D, Bignami A (1977) Preparation of antisera to neurofilament protein from chicken brain and human sciatic nerve. *J Comp Neurol* 176: 645-658

Dalsgaard CJ, Rydh M, Hoegerstrand A (1989) Cutaneous innervation in man visualized with protein gene product 9.5 (PGP-9.5) antibody. *Histochemistry* 92: 385-389

De Jong ASH, Van Kessel-Van Vark M, Raap AK (1985) Sensitivity of various visualization methods for peroxidase and alkaline phosphatase activity in immunoenzyme histochemistry. *Histochem J* 17: 1119-1130

Dierichs R, Wrobel KH, Schilling E (1973) Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Leydigzellen des Schweins während der postnatalen Entwicklung. *Z Zellforsch* 143: 207-227

Dixon JS, Lanning DA, Gearhart JP, Gosling JA (1994) An immunohistochemical study of the innervation of the ureterovesical junction in infancy and childhood. *Br J Urol* 73: 292-297

Eckenstein F, Thoenen H (1982) Production of specific antisera and monoclonal antibodies to

cholin acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons. EMBO J 1: 361-368

El-Badawi A, Schenk EA (1967) The distribution of cholinergic and adrenergic nerves in the mammalian epididymis. A comparative histochemical study. Am J Anat 121: 1-13

Erlinge D, Brunkwall J, Edvinsson L (1994) Neuropeptide Y stimulates proliferation of human vascular smooth muscle cells: cooperation with noradrenaline and ATP. Reg Pept 50: 259-265

Feldmeier F (1998) Immunhistochemische Untersuchungen am menschlichen Hoden mit besonderer Berücksichtigung des Keimepithels. Inaug. Diss. Regensburg

Forsgen S (1989) Neuropeptide Y-like immunoreactivity in relation to the distribution of sympathetic nerve fibers in the heart conduction system. J Mol Cell Cardiol 21: 279-290

Frankel AI, Ryan EL (1981) Testicular innervation is necessary for the response of plasma testosterone levels to acute stress. Biol Reprod 24: 491-495

Greenberg J, Forssmann WG, Gorgas K (1985a) Morphology and innervation of the testicular "rete mirabile" in the guinea pig. Anat Embryol 173: 225-235

Godinho HP, Cardoso FM, Nogueira JC (1973) Patterns of parenchymal ramification of the testicular artery in some ruminants. Anat Anz 133: 118-124

Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Jzawa S, Sicgh RMM (1966) Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 5: 467-477

Gray DJ (1947) The intrinsic nerves of the testis. *Anat Rec* 96: 378-383

Gürtler A (2001) Zur Innervation von Hoden und Nebenhoden der Katze. Eine enzym- und immunhistochemische Untersuchung. Inaug. Diss. München

Hacker GW, Polak JM, Springall DR, Ballesta J, Cadieux A, Gu J, Trojanowski JQ, Dahl, Marangos PJ (1985) Antibodies to neurofilament protein and other brain proteins reveal the innervation of peripheral organs. *Histochemistry* 82: 581-593

Häpplölä O, Lakomy M (1989) Immunohistochemical localization of calcitonin gene-related peptide and bombesin/gastrin-releasing peptide in nerve fibers of the rat, guinea pig and pig female genital organs. *Histochemistry* 92: 211-218

Han S, Yang CL, Chen X, Naes L, Cox BF, Westfall T (1998) Direct evidence for the role of neuropeptide Y in sympathetic nerve stimulation-induced vasoconstriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 274: H290-H294

Heindel JJ, Steinberger A, Strade SJ (1981) Identification and characterization of a β_1 -adrenergic receptor in the rat Sertoli cell. *Mol Cell Endocrin* 22: 349-358

Heindel JJ, Treinen KA (1989) Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Toxicol Pathol* 17: 411-445

Hodson N (1970) The nerves of the testis, epididymis and scrotum. In: Johnson, A.D.; Gomes W.R.; Van Demark N.L. (eds) The testis. Academic Press, New York, pp. 47-100

Hökfelt T, Keller TH, Nilsson G, Pernow B (1975) Experimental immunohistochemistry studies on the localisation and distribution of Substance P in cat primary sensory neurons. Brain Research 100: 235-252

Hoffman PN, Lasek RL (1975) The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons. J Cell Biol 66: 351-366

Holzer P (1998) Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. Gen Pharmacol 30: 5-11

Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) producers. J Histochem Cytochem 29: 577-580

Huang HF, Linsenmeyer TA, Anesetti R, Giglio W, Ottenweller JE, Pogach L (1998) Suppression and recovery of spermatogenesis following spinal cord injury in the rat. J Androl 19: 72-80

Jacks F, Setchell BP (1973) A technique for studying the transfer of substances from the venous to arterial blood in the spermatic cord of the wallabies and rams. Proc Physiol Soc Olsztyn 179 (Suppl): 17P-18P

Jackson GD, Thompson RJ (1981) The demonstration of new human brain-specific proteins by high-resolution two dimensional polyacrylamide gel-electrophoresis. *J Neurol Sci* 49: 429-438

Järvi R, Pelto-Huikko M (1990) Localisation of neuropeptide Y in human sympathetic ganglia: correlation with met-enkephalin, tyrosine hydroxylase and acetylcholinesterase. *Histochem J* 22: 87-94

Jasani B, Wynford-Thomas D, Thomas ND, Newman GR (1986) Broad spectrum, nondeleterious inhibition of endogenous peroxidase: LM and EM application. *Histochem J* 18:56 (abstr)

Kanchev LN, Konakchieva R, Angelova PA, Davidoff MS (1995) Substance P modulating effect on the binding capacity of hamster Leydig cell LH receptors. *Life Sci* 56: 1631-1637

Kannisto P, Ekblad E, Helm G, Owman C, Sjöberg NO, Stjernquist M, Sundler F, Wallis B (1986) Existence and co-existence of peptides in nerves of the mammalian ovary and oviduct demonstrated by immunocytochemistry. *Histochemistry* 86: 24-25

Karnovsky MJ, Roots L (1964) A „direct-coloring“ thiocholine method for cholinesterases. *J Cytochem* 12: 219-221

Kimura H, McGeer PL, Peng JH (1984) Cholinacetyltransferase containing neurons. In: *Handbook of chemical neuroanatomy. Classical transmitters and transmitter receptors in the CNS.* Björkland A, Hökfelt T, Kuhar MJ. (eds) Elsevier; Amsterdam, New York, Oxford, pp. 51-67

Kopp J, Zhang X, Hokfelt T (1997) Neuropeptide Y1 receptors in the rat genital tract. *Reg Pept* 70: 149-160

Kormano M (1974) Untersuchungen über den Bau und die Funktion der Wand des intratestikulären Kanälchensystems. *Verh Anat Ges* 68: 193-196

Kreutz W (1964) Über das Vorkommen korpuskulärer Nervenendigungen in der Tunica albuginea testis beim Menschen. *Anat Anz* 115: 27-34

Kujat R, Rose C, Wrobel KH (1993) The innervation of the bovine ductus deferens: comparison of a modified acetylcholinesterase-reaction with immunoreactivities of cholinacetyltransferase and panneural markers. *Histochemistry* 99: 231-239

Kuntz A and Morris RE (1946) Components and distribution of the synaptic nerves and the nerves of the vas deferens. *J Comp Neurol* 85: 33

Lakomy M, Kaleczyc J, Majewski M (1997) Noradrenergic and peptidergic innervation of the bovine testis and epididymis in the male pig. *Folia Histochem Cytobiol* 35:1927

Lamano Carvalho TL, Hodson NP, Blank MA, Watson PF, Mulderry PK, Bishop AE, GU J, Bloom SR, Polak JM (1986) Occurrence, distribution and origin of peptide-containing nerves of guinea pig and rat male genitalia and the effects of denervation on sperm characteristics. *J Anat* 149: 121-141

Langford GA, Silver A (1974) Histochemical localization of acetylcholinesterase-containing

nerve fibres in the testis. *J Physiol* 242: 9-10

Larsen JJ, Ottesen B, Fahrenkrug J, Fahrenkrug L (1981) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the male genitourinary tract: concentration and motor effect. *Invest Urol* 19: 211-213

Li K, Welsh MG (1991) Tyrosine hydroxylase and Neuropeptide Y-immunoreactivity in pineal glands developing in situ and in pineal grafts. *Cell Tissue Res* 264:515-527

Linsenmeyer TA, Pogach LM, Ottenweller JE, Huang HF (1994) Spermatogenesis and the pituitary-testicular hormone axis in the rats during the acute phase of spinal cord injury. *J Urol* 152. 1302-1307

Lissbrant E, Bergh A (1997) Effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the testicular vasculature of the rat. *Intern J Androl* 20: 356-360

Lissbrant E, Collin O, Bergh A (1997) Localisation and effects of calcitonin gene-related peptide in the testicular vasculature of the rat. *J Androl* 18: 385-392

Lojda Z, Gossrau R, Schiebler TH (1976) *Enzymhistochemische Methoden*. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York.

Luff SE (1996) Ultrastructure of sympathetic axons and their structural relationship with vascular smooth muscle. *Anat Embryol* 193: 515-531

Lundberg JM, Terenius L, Hökfelt T, Martling CR, Tatemoto K, Mutt V, Polak J, Bloom S, Goldstein M (1982) Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic

neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta Physiol Scand* 116: 477-480

Lundgaard A, Aalkjaer C, Bjurholm A, Mulvany MJ, Hansen ES (1977) Vasorelaxation in isolated bone arteries. Vasoactive intestinal peptide, substance P, calcitonin gene-related peptide and bradykinin studied in pigs. *Acta Orthop Scand* 68: 481-489

Luppa H, Alabdalla M, Andrä J, Weiß J (1992) Histochemische Untersuchungen zur Lokalisation von Acetylcholinesterase in der Niere ausgewählter Vertebraten. *Acta Histochem* 92: 147-159

McMahon TJ, Kadowitz PJ (1992) Methylene blue inhibits neurogenic cholinergic vasodilatator responses in the pulmonary vascular bed of the cat. *Am J Physiol* 263: 575-584

McMahon TJ, Kadowitz PJ (1993) Analysis of responses to substance P in the pulmonary vascular bed of the cat. *Am J Physiol* 264: 394-402

Majewski M, Heym C (1991) The origin of ovarian neuropeptide Y (NPY)-immunoreactive nerve fibers from the inferior mesenteric ganglion in the pig. *Cell Tissue Res* 266: 591-596

Majewski M, Kaleczyc J, Sienkiewicz W, Lakomy M (1995) Existence and co-existence of vasoactive substances in nerve fibres supplying the abdomino-pelvic arterial tree of the female pig and cow. *Acta Histochem* 97: 235-256

Mayerhofer A, Bartke A, Steger RW (1989) Catecholamine effects on testicular testosterone

production in the gonadally active and in the gonadally regressed adult golden hamster. *Biol Reprod* 40: 752-761

Mayerhofer A, Danilchik M, Francis Pan KY, Lara HE, Russell LD, Ojeda SR (1996) Testis of prepubertal Rhesus monkeys receives a dual catecholaminergic input provided by the extrinsic innervation and an intragonadal source of catecholamines. *Biol Reprod* 55:509-518

Mitchell GAG, (1935) The innervation of the kidney, ureter, testicle and epididymis. *J Anat* 70: 10-32

Miyake K, Yamamoto M, Mitsuya H (1986) Pharmacological and histological evidence for adrenergic innervation of the myoid cells in the rat seminiferous tubule. *Tohoku J Exp Med* 149: 79-87

Molenaar GJ, Sienkiewicz W, Lakomy M, Meloen RH (1997) New data on the nervous influence on male fertility and testis functions- inverse relation between nervous and endocrine activities. *Ann Anat (Suppl)* 179: 10-11

Nipken C, Wrobel KH (1997) A quantitative morphological study of age-related changes in the donkey testis in the period between puberty and senium. *Andrologia* 29: 149-161

Nistal M, Paniagua R, Abaurrea MA (1982) Varicose axons bearing "synaptic" vesicles on the basal lamina of the human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res* 226: 75-82

Norberg KA, Risley PL, Ungerstedt U (1967a) Adrenergic innervation of the reproductive

ducts in some mammals. 1. The distribution of adrenergic nerves. *Z Zellforsch* 76: 278-286

Norberg KA, Risley PL, Ungerstedt U (1967b) Adrenergic innervation of the reproductive ducts in some mammals. 2. The effect of vasectomy and castration. *Experientia* 23: 392

Okkels H, Sand K (1940) Morphological relationship between testicular nerves and Leydig cells in man. *J Endocrinol* 2: 38-46

Omlin FX, Webster HD, Palkovitz CG, Cohen SR (1982) Immunocytochemical localisation of basic protein in major dense line regions of central and peripheral myelin. *J Cell Biol* 95:242-248

Owman C, Sjöstrand NO, (1965) Short adrenergic neurons and catecholamine-containing cells in the vas deferens and accessory male genital glands of different mammals. *Z Zellforsch* 66: 300-320

Owman C, Stjernquist M (1988) Origin and distribution and functional aspects of aminergic and peptidergic nerves in the male and female reproductive tracts. In: *Handbook of chemical neuroanatomy. The peripheral nervous system.* Björklund A, Hökfelt T, Owman C, (eds) Elsevier; Amsterdam, New York, Oxford, pp. 445-468

Pearse AGE (1972) *Histochemistry. Theoretical and applied.* 3rd edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, New York.

Peterson DF, Brown AM (1973) Functional afferent innervation of testis. *J Neurophysiol* 36: 325-433

Pholpramool C, Triphrom N (1984) Effects of cholinergic and adrenergic drugs on intraluminal pressures and contractility of the rat testis and epididymis in vivo. *J Reprod Fert* 71: 181-188

Prince FP (1996) Ultrastructural evidence of adrenergic, as well as cholinergic nerve varicosities in relation to the lamina propria of the human seminiferous tubules during childhood. *Cell Tissue Res* 269: 383-390

Polak JM, Bloom SR (1984) Localisation and measurement of VIP in the genitourinary system of man and animals. *Pepides* 5: 225-230

Properzi G, Cordeschi G, Francavilla S (1991) Postnatal development and distribution of peptide-containing nerves in the genital system of the male rat. An immunohistochemical study. *Histochemistry* 97: 61-68

Rauchenwald M, Steers WD, Desjardins C (1995) Efferent innervation of the rat testis. *Biol Reprod* 52: 1136-1143

Risley PL, Skrepetos CN (1964) Histochemical distribution of cholinesterases in the testis, epididymis and vas deferens of the rat. *Anat Rec* 148: 231-249

Rösch W, Andrea C, Strauss B, Schrott KM, Neuhuber WI (1997) Comparison of preoperative innervation pattern and postreconstructive urodynamics in the extrophy-epispadias complex. *Urol Int* 59: 6-15

Romeis B (1989) Mikroskopische Technik. 17. Aufl.; Urban und Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore.

Rosenfeld MG, Mermod JJ, Anara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW, Evans RM (1983) Production of a novel neuropeptide encoded by calcitonin gene via tissue-specific RNA processing, *Nature* 304: 129-135

Rossier J (1975) Immunochemical localisation of choline acetyltransferase: real or artefact ? *Brain Res* 98: 619-922

Said SI, Mutt V (1970) Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut. *Nature* 225: 863-864

Saleh AMM, Alameldin MA, Abdelmoniem ME, Hassouna EM, Wrobel KH (2002) Immunohistochemical investigations of the autonomous nerve distribution in the testis of the camel (*Camelus dromedarius*) *Ann Anat* 184: 209-220

Santamaría L, Reoyo A, Regadera J, Paniagua R (1990) Histochemistry and ultrastructure of nerve fibres and contractile cells in the tunica albuginea of the rat testis. *Acta Anat* 139: 126-133

Schmechel DE, Marangos PJ, Zis AP, Brightman M, Goodwin FK (1978) The brain enolase as specific marker of neuronal and glial cells. *Science* 199: 313-315

Schmidt RF (1983) Erregungsübertragung von Zelle zu Zelle. In: Physiologie des Menschen. 21. Aufl. Ed.: Schmidt RF, Thews G, Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, pp. 54-75

Scholzen T, Armstrong CA, Burnett NW, Luger TA, Oleruda JE, Ansel JC (1998) Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol* 77: 81-96

Scopsi L, Larson LI (1986) Increased sensitivity in peroxidase immunohistochemistry. A comparative study of a number of peroxidase visualization methods employing a model system. *Histochemistry* 84: 221-230

Setchell BP, Laurie MS, Flint APF, Heap RB (1983) Transport of free and conjugated steroids from the boar testis in lymph, venous blood and rete testis fluid. *J Endocrinol* 96: 127-136

Shaw G, Weber K (1981) The distribution of the neurofilament triplet proteins within the individual neurons. *Exp Cell Res* 136: 119-125

Sheykhzade M, Nyborg NC (1998) Characterization of calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors in intramural coronary arteries from male and female Sprague Dawley rats. *Br J Pharmacol* 123: 1464-1470

Shioda T, Nishida S (1966) Innervation of the bull testis. *Jap J Vet Sci* 28: 251-157

Sienkiewicz W, Molenaar GJ, Kaleczyc J, Talkowsky J, Lakomy M (2000) Has active immunization against gonadotropin-releasing hormone any effect on testis innervation in the pig? An Immunohistochemical study. *Anat Histol Embryol* 29: 247-254

Sjöstrand NO (1962) Inhibition of ganglion blocking agents of the motor response of the isolated guinea pig vas deferens to hypogastric nerve stimulation. *Acta Physiol Scand* 54: 306-315

Stach W (1963) Zur Innervation von Leydigischen Zwischenzellen im Hoden. *Z Mikr Anat Forsch* 69: 569-584

Sternberger LA (1979) *Immunohistochemistry* 2nd. Ed.: John Wiley; New York

Stryer L (1987) *Biochemie*, 4. Aufl. Vieweg und Solm; Braunschweig, Wiesbaden

Suburo AM, Chiochio SR, Canto Soler MV, Nieponice A, Tramezzani JH (2002) Peptidergic innervation of blood vessels and interstitial cells in the testis of the cat. *J Androl* 23:121-134

Tainio H (1994) Peptidergic innervation of the human testis and epididymis. *Acta Histochem* 96: 415-420

Tamura R, Mizamura K, Kumazawa T (1996) Coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P-like immunoreactivity in retrogradely labelled superior spermatic neurons in the dog. *Neurosci Res* 25: 293-299

Tatemoto K (1982) Neuropeptide Y : complete amino acid sequence of the brain peptide. Proc Natl Acad Sci USA 79: 5485-5489

Trojanowsky JQ, Walkenstein N, Lee VMY (1986) Expression of neurofilament subunits in neurons of the central and peripheral nervous system: An immunohistochemical study with monoclonal antibodies. J Neurosci 6: 650-660

Tsuji S, Larabi Y (1983) A modification of thiocholine-ferricyanide method of Karnovsky and Roots for localisation of acetylcholinesterase activity without interference by Koelle's copper thiocholine iodide precipitate. Histochemistry 78: 317-323

Tuck RR, Setchell BP, Waites GMH, Young JAC (1970) The composition of fluid collected by micropuncture and catheterization from seminiferous tubules and rete testis of rats. Eur J Physiol 318: 225-243

Unsicker K (1974) Zur Innervation von Leydigzellen bei Reptilien. Verh Anat Ges 68: 273-276

Vaalasti A, Tainio H, Pelto-Huikko M, Hervonen A (1986) Light and electron microscope demonstration of VIP- and enkephalin-immunoreactive nerves in the human male genitourinary tract. Anat Rec 215: 21-27

Van Campenhout E (1949) Les relations nerveuses de la glande interstitielle des glandes génitales chez les mammifères. Rev Can Biol 8 : 374-429

Wallgren J (1997) Vasoactive peptides in the skin. *J Invest Dermat Symp Proc* 2: 49-55

Wang L, Hillieges M, Jernberg T, Wiegleb-Edström D, Johansson O (1990) Protein-gene-product-9.5-immunoreactive nerves fibers and cells in human skin. *Cell Tissue Res* 261: 25-33

Wilson PO, Barber PC, Hamid QA, Power BF, Dhillon AP, Rock J, Day IN, Thompson RJ, Polak JM (1988) The immunolocalization of protein gene product 9.5 using rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies. *Br J Exp Pathol* 69: 91-104

Wrobel KH (1990) The postnatal development of the bovine Leydig cell population. *Reprod Dom Anim* 25: 51-60

Wrobel KH, Abu-Ghali N (1997) Autonomic innervation of the bovine testis. *Acta Anat* 160:1-14

Wrobel KH, Bickel D, Kujat R, Schimmel M (1995) Configuration and distribution of bovine spermatogonia. *Cell Tissue Res* 279: 277-289

Wrobel KH, Bickel D, Kujat R, Schimmel M (1995) Evolution and ultrastructure of the bovine spermatogonia precursor cell line. *Cell Tissue Res* 281: 249-259

Wrobel KH, Brandl B (1998) The autonomous innervation of the porcine testis in the period from birth to adulthood. *Ann Anat* 180: 145-156

Wrobel KH, Gürtler A (2001) The nerve distribution in the testis of the cat. *Ann Anat* 183: 1-12

Wrobel KH, Kujat R (1993) The bovine tubouterine junction: general innervation pattern and distribution of adrenergic, cholinergic and peptidergic nerve fibers. *Cell Tissue Res* 274: 493-501

Wrobel KH, Moustafa MNK (2000) On the innervation of the donkey testis. *Ann Anat* 182: 1322

Wrobel KH, Schilling E, Dierichs R (1973) Enzymhistochemische Untersuchungen an den Leydigzellen des Schweines während der postnatalen Ontogenese. *Histochemie* 36: 321-333

Wrobel KH, Sinowatz F, Kugler P (1978) Zur funktionellen Morphologie des Rete testis, der Tubuli recti und der Terminalsegmente der Tubuli seminiferi des geschlechtsreifen Rindes. *Zbl Med C Anat Histol Embryol* 7: 320-335

Wynford-Thomas D, Jasani B, Newman GR (1986) Immunohistochemical localisation of cell surface receptors using a novel method permitting simple, rapid and reliable LM/EM correlation. *Histochem J* 18: 387-396

Yamashita K (1939) Histologische Studien zur Innervation des Hodens und Nebenhodens beim Menschen. *J Orient Med* 30: 150-152

Yoshimoto R, Mitsui-Saito M, Ozaki H, Karaki H (1998) Effects of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide on contractions of the rat aorta and porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* 123: 1645-1654

Yuri K (1990) Immunohistochemical and enzyme histochemical localization of peptidergic, aminergic and cholinergic nerve fibers in the rat seminal vesicle. *J Urol* 143: 194-198

Zhu BC, Chiochio SR, Suburo AM, Tramezzani JH (1995) Monoaminergic and peptidergic contributions of the superior and inferior spermatic nerves to the innervation of the testis in the rat. *J Anrol* 16: 248-258

Zhu Q, Julien JP (1999) A key role for GAP-43 in the retinotectal topographic organization. *Exp Neurol* 155: 228-242

8. Anhang

8.1 Liste der verwendeten Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex
AchE	Acetylcholinesterase
CGRP	Calcitonin-Gen-Related-Peptide
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DBH	Dopamin-beta-hydroxylase
GAP-43	Growth-Associated-Protein-43
h	Stunde(n)
IR	Immunreaktion
Iso-Ompa	Tetraisopropylpyrophosphoramide
MBP	Myelin-Basic-Protein
M	Molar
min	Minute(n)
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
mm	Millimeter
MES	2-Morpholinoethanesulfonic acid and monohydrate
nm	Nanometer
NF	Neurofilament
NPY	Neuropeptide Y
NSE	Neuron specific enolase
PGP-9.5	Protein-Gen-Product-9.5
PBS	Phosphate Buffered Saline
SP	Substance P
TH	Tyrosinhydroxylase
VIP	Vasoactive Intestinal Polypeptide

8.2. Lebenslauf

Name: Eveline Schenk

Anschrift: Hauptstr. 1, 94351 Feldkirchen

Geburtsdatum: 10.01.1964

Geburtsort: Heilbronn

Familienstand: verheiratet, 4 Kinder

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Eltern: Johannes und Luzia Schenk, geb. Schäfer

Schulbildung: 1970-74 Grundschule in Darmstadt-Eberstadt und Zwingenberg an der Bergstraße
1974-83 Gymnasium der Liebfrauenschule, Bensheim

Schulabschluss: Abitur

Studium: 1985-92 Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Universidad de Chile in Santiago, Chile

Abschluss: 1992 Staatsexamen an der Universidad de Chile
1993 III. Staatsexamen an der Justus-Liebig-Universität, Gießen
1994 Approbation als Tierärztin

Berufliche Tätigkeiten: 1.01.1995- 4.05.1998 Mitarbeiterin bei Bayer S.A., Chile
Seit Mai 1998 wegen Kinder nicht mehr beruflich tätig

Fortbildung: 1995 VII. Internationaler Kurs für Kleintiermedizin und Chirurgie, Santiago de Chile
1996 Internationale Tagung Innere Medizin für Veterinärmediziner, Santiago de Chile
1997 2. Internationale Tagung Innere Medizin für Veterinärmediziner, Santiago de Chile

Sonstiges: September 1983-September 1984 Aufenthalt als Au-pair in Frankreich

8.2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. K.-H. Wrobel gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und der Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die Unterstützung, Interesse, Beratung und Diskussionsbereitschaft bei der Erstellung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz (Institut für Anatomie II der LMU München) danke ich für die Einreichung der Arbeit.

Ein Dankeschön geht an die vielen Damwildzüchter, insbesondere Herrn Kammermeier, für die Bereitstellung des Materials.

Für die freundliche Zusammenarbeit und wertvolle Hilfe im Labor bedanke ich mich herzlich bei Frau Elke Stauber, bei Frau Ingeborg Hees und Frau Ute Schmidt. Ebenso möchte ich Frau Margit Schimmel, Frau Köberlein und allen weiteren Mitarbeitern des Lehrstuhls für Anatomie der Universität Regensburg, die mich während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben, meinen Dank aussprechen.

Frau Zenker und Herrn Maurer danke ich für die Ausführung der fotografischen Arbeiten.

Schließlich möchte ich meinem Mann Claudio für die moralische Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit danken.