

Histologische und immunhistochemische Untersuchung der
Hoden von zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Improvac®
vakzinierten Ebern

von Victoria Katharina Theresa Hautmann

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

Histologische und immunhistochemische Untersuchung der
Hoden von zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Improvac®
vakzinierten Ebern

von Victoria Katharina Theresa Hautmann

aus München

München 2021

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

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Priv.-Doz. Dr. Rebecca A.-M. Kenngott

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Rebecca A.-M. Kenngott

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Joachim C. Manning

Tag der Promotion: 17. Juli 2021

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.	Fragestellungen dieser Arbeit	3
II.	LITERATURÜBERSICHT	4
1.	Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Hodens..	4
1.1.	Anatomie Hoden	4
2.	Übergeordnete Regulation der Spermatogenese	19
2.1.	GnRH-Aktivität	19
3.	Tight- und Gap-junction-Proteine sowie deren Regulation ...	32
3.1.	Tight-junction-Proteine	32
3.2.	Gap-junction-Proteine	39
4.	Immunologische Kastration mit dem GnRH-Analogen	
	Improvac®	44
III.	MATERIAL UND METHODEN	47
1.	Versuchsaufbau der Studie	47
1.1.	Probenentnahme	48
1.2.	Aufbereitung der Proben	49
1.3.	Histologische Färbemethoden	50
1.4.	Immunhistochemischer Nachweis.....	52
1.5.	Weitere untersuchte und getestete Antikörper	57
1.6.	Auswertung der Schnitte	57
1.7.	Morphometrie und Auszählung für die statistische Auswertung	57
1.8.	Statistische Auswertung	60
IV.	ERGEBNISSE	62
1.	Histomorphologische Befunde am Hoden von intakten Ebern	
	und immunologisch vakzinierten Tieren	62
1.1.	Hämatoxylin-Eosin und Trichrom-Färbung nach Masson und Goldner.....	62
1.2.	Immunhistochemischer Nachweis von Sox-9 im Hoden intakter und vakzinierter Eber	86
1.3.	Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin im Hoden	

	intakter und vakzinierter Eber	98
1.4.	Immunhistochemischer Nachweis von DDX-4 im Hoden intakter und vakzinierter Eber	108
1.5.	Immunhistochemischer Nachweis von Ki67 im Hoden intakter und vakzinierter Eber	120
1.6.	Immunhistochemischer Nachweis von 8-OHG im Hoden intakter und vakzinierter Eber	128
1.7.	Immunhistochemischer Nachweis von Occludin im Hoden intakter und vakzinierter Eber	132
1.8.	Immunhistochemischer Nachweis von Claudin-3 im Hoden intakter und vakzinierter Eber	137
1.9.	Immunhistochemischer Nachweis von Connexin-43 im Hoden intakter und vakzinierter Eber	142
1.10.	Immunhistochemischer Nachweis des Estrogen-Rezeptors α im Hoden intakter und vakzinierter Eber	150
1.11.	Immunhistochemischer Nachweis des Estrogen-Rezeptors β im Hoden intakter und vakzinierter Eber	155
1.12.	Immunhistochemischer Nachweis des FSH-Rezeptors im Hoden intakter und vakzinierter Eber	159
1.13.	Immunhistochemischer Nachweis von Testosteron im Hoden intakter und vakzinierter Eber	164
1.14.	Immunhistochemischer Nachweis des Androgen-Rezeptors im Hoden intakter und vakzinierter Eber	183
V.	DISKUSSION	190
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	235
VII.	SUMMARY.....	238
VIII.	VERZEICHNISSE	240
1.1.	Literaturverzeichnis.....	240
1.2.	Abbildungsverzeichnis	292
1.3.	Graphikverzeichnis.....	299
1.4.	Tabellenverzeichnis.....	301
IX.	ANHANG	303
1.1.	Lösungen für die Fixantien	303

1.2.	Lösungen für die lichtmikroskopischen Färbungen	303
1.3.	Lösungen für die immunhistochemischen Untersuchungen	305
1.4.	Testosteron-Immunhistochemie	306
1.5.	Verzeichnisse für Statistik.....	307
X.	DANKSAGUNG	314

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
8-OHG	8-Hydroxy-Guanosin
ABP	Androgen-binding Protein
AMH	Anti-Müller-Hormon
Aqua dest.	Aqua destillata
AR	Androgen-Rezeptor
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DDX-4	Dead-box-Helikase-4
ER α	Estrogen-Rezeptor α
ER β	Estrogen-Rezeptor β
ERS	Epitop-Retrieval-Solution
ES	Elongierte Spermatozoen
FSH	Follikel-Stimulierendes Hormon
FSH-R	FSH-Rezeptor
G1	Gap Phase 1
G2	Gap Phase 2
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
GnRH2	Gonadotropin-Releasing Hormon 2
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Horseradish Peroxidase
IQR	Interquartilsrange
K 18	Keratin 18
K 8	Keratin 8
L	Leydig-Zellen
LH	Luteinisierendes Hormon
LHR	LH-Rezeptor
LHRH	Luteinisierendes Hormon Releasing Hormon (GnRH)
MAGUK	Membran-assoziiertes-Guanylat Kinase-Homolog
Min.	Minuten
m-RNS	messenger-Ribonukleinsäure
PAS	Periodic-Acid-Schiff-Färbung
PBS	Phosphate-buffered-saline

RS	Runde Spermatozoen
S	Sertoli-Zellkerne
SHBG	Sex-hormone-binding-globulin
Sox-9	Sex-determining-region-Y-like (SRY) Box-Transcription-Factor 9
SP	Spermatogonien
S-Phase	Synthese-Phase
SPZ	Spermatozoen
T3	Trijodthyronin
TGF-β2	Transforming growth factor- β2
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRS	Target-Retrieval-Solution
V₁	Vakzination 1
V₂	Vakzination 2
ZO	Zonula occludens

I. EINLEITUNG

GnRH-Analoga finden nicht nur in der Tiermedizin Anwendung, sondern auch bei Menschen zur Behandlung des Prostata-Adenokarzinoms. Das Prostata-Adenokarzinom ist der zweithäufigste vorkommende Tumor bei Männern, welcher in vielen Fällen mit einer erhöhten Mortalitätsrate einhergeht (Bukhari et al., 2020). Für die Behandlung stehen neben den Alternativen wie der chirurgischen Entfernung der Prostata und der Chemotherapie eine Suppression der GnRH-Aktivität mit Hilfe von GnRH-Agonisten und Antagonisten zur Verfügung (Van Poppel und Abrahamsson, 2020). Die Suppression der GnRH-Aktivität spielt jedoch nicht nur hier eine Rolle, sondern auch noch in anderen Bereichen. Auf der ganzen Welt nimmt die Populationsdichte an Menschen extrem zu (Gerland et al., 2014).

Da dies ein großes Problem in Hinblick auf die Ressourcen der Erde darstellt, ist es nötig, neue Kontrazeptionsmethoden zu finden (Speidel und Grossman, 2011). Dazu gehört jedoch nicht nur die Kontrazeption der Frauen, sondern auch die der Männer. Zurzeit werden mögliche Verfahren eruiert (Griffin et al., 1996; Turner et al., 2003; Thirumalai et al., 2018). Darunter fällt unter anderem die Suppression der GnRH-Aktivität, wodurch es zu einer reduzierten oder fehlenden Ausschüttung von LH und FSH und somit auch zur fehlenden oder verminderten Testosteron-Synthese in den Leydig-Zellen kommt (Yuen et al., 2020). Hierdurch wird die Ausbildung von funktionsfähigen Spermien gehemmt.

In der Tiermedizin wird die Suppression der GnRH-Aktivität bereits seit einiger Zeit angewendet. Unter anderem an Zoo- und Wildtieren wie Elefanten, bei denen es überwiegend zur Reduktion von Aggressionen sowie zur Kontrolle in der fortpflanzungsfähigen Phase dient (De Nys et al., 2010; Somgird et al., 2016). Bei Löwinnen (Bertschinger et al., 2002), wie auch bei männlichen Geparden wird eine Suppression der GnRH-Aktivität in erster Linie zur Reduktion der Fortpflanzungsfähigkeit und somit als Mittel zur Verringerung der Nachkommen verwendet (Bertschinger et al., 2006; Bertschinger, 2010).

Außerdem wurde die GnRH-Vakzination beim Wild beschrieben, in welchen es sowohl bei männlichen als auch den weiblichen Tieren zu einer Unterdrückung der Sexualfunktion kam, welche je nach Impfschema bis zu zwei Jahre anhält und reversibel ist (Miller et al., 2000). Bei Pferden dient eine Suppression der GnRH-Aktivität überwiegend dazu, Trächtigkeiten wild lebender Pferde zu verhindern, aber auch um aggressives Verhalten oder zyklusbedingte Handling- oder Rittigkeitsprobleme zu reduzieren (Stout et al., 2003; Botha et al., 2008; Gray et al., 2010). Ebenso ist es möglich, bei Hengsten, welche das Equine-Arteritis-Virus in sich tragen und nachweislich ausscheiden, das Ausscheiden des Virus durch eine GnRH-Suppression zu unterdrücken. (Fortier et al., 2002; Burger et al., 2006).

Aber nicht nur bei diesen werden GnRH-Analoga verwendet, auch bei Haustieren wie z.B. bei Hunden werden GnRH-Agonisten verabreicht, welche in Form eines Implantates unter die Haut appliziert werden und dort über stetige Ausschüttung für einige Monate zu einer Kastration führen. Dies ist jedoch reversibel, was eine besondere Bedeutung hat, insbesondere wenn mit dem Hund noch gezüchtet werden soll (Trigg et al., 2001; Driancourt und Briggs, 2020).

Auch in der Lebensmittelproduktion können GnRH-Analoga verwendet werden (Bonneau und Enright, 1995; Needham et al., 2017; Gómez et al., 2019). Unter anderem bei Schweinen (Dunshea et al., 2001; Einarsson et al., 2009; Zamaratskaia und Rasmussen, 2015). Diese werden in der Regel kastriert, um den so genannten Ebergeruch bei männlichen Tieren zu verhindern, welcher durch den Verbraucher beim Verzehr von Fleisch als störend empfunden wird (Weiler et al., 2000; Dunshea et al., 2001). Ebenso, um die Aggressivität während der Aufzucht einzudämmen (Brewster und Nevel, 2013). Dies erfolgt zum großen Teil durch die chirurgische Kastration, welche in Deutschland bei unter 8 Tage alten Ferkeln vorgenommen wird. Da dies jedoch sehr schmerzhaft ist (Hay et al., 2003) und seit dem 01.01.2021 ohne Analgesie nicht mehr zulässig ist, bedarf es Alternativen (B.M.E.L., 2020). Eine Alternative ist die immunologische Kastration mit dem GnRH-Analogen Improvac®.

1. Fragestellungen dieser Arbeit

Die wichtigste Fragestellung dieser Arbeit ist, wie sich die chemische Kastration zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf das Hodenepithel von Ebern auswirkt. Aber auch der Einfluss einer immunologischen Vakzination auf die Hormone und deren Rezeptoren soll untersucht werden. Hierbei stehen die lichtmikroskopische und immunhistochemische Untersuchung der Morphologie des Keimepithels, insbesondere der Keimzellen und der Sertoli-Zellen sowie die Morphologie der Leydig-Zellen im Interstitium der Tubuli seminiferi contorti im Vordergrund. Um die Auswirkung der Vakzination mit Improvac® auf die Hormone und deren Rezeptoren zu untersuchen, wurden unter anderem immunhistochemische Untersuchungen mit den Antikörpern gegen den AR, Testosteron, FSH-R, sowie ER α und ER β vorgenommen.

Beantwortet werden sollte auch, wie sich eine Vakzination auf die Tight- und Gap-junction-Komponenten der Blut-Hoden-Schranke auswirkt. Dies diene vor allem dazu, weitere Erkenntnisse im Hinblick auf eine physiologisch ablaufende Spermatogenese zu gewinnen. Zudem wurden die oben genannten Untersuchungen dazu verwendet, die Auswirkung einer Vakzination auf die Regeneration des Keimepithels zu untersuchen. Hierbei stand vor allem im Vordergrund, die Strukturen des Hodenparenchyms mit den oben genannten Methoden zu beschreiben.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Hodens

1.1. Anatomie Hoden

Der paarig angelegte Hoden des Ebers befindet sich im kaudalen Zwischenschenkelspalt und besitzt eine ovale Form (Nickel, 2004). Umgeben wird der Hoden von dem Hodensack (Skrotum), welcher sich aus der äußeren Haut, der Cutis scroti und der Unterhaut (Tunica dartos) zusammensetzt. Weiterführend ist der Hoden von den Hodenhüllen umgeben, welche sich nach dem Descensus testis von der Rumpfwand ableiten lassen (Salomon et al., 2008). Dem Hodenparenchym liegt eine dicke Bindegewebskapsel, die so genannte Tunica albuginea an, wodurch das Parenchym unter Druck gehalten wird (Liebich, 2010). Bindegewebssepten (Septula testis) ziehen von der kollagenhaltigen Tunica albuginea in das Hodenparenchym. Dadurch wird das Hodenparenchym in kleine Läppchen (Lobuli testis) unterteilt. Im Hodeninneren vereinigen sich die Septula testis zu einem Bindegewebskörper, dem Mediastinum testis (Salomon et al., 2008; Liebich, 2010). Das in Läppchen aufgeteilte Hodenparenchym setzt sich zusammen aus den Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti) und dem intertubulären Interstitium (Reddy Dyhana et al., 2016). In den Tubuli seminiferi contorti findet die Keimzellbildung statt. Die Tubuli seminiferi contorti werden während ihres Verlaufs zu geraden, gestreckten Kanälchen und bevor sie in das Hodennetz (Rete testis) eintreten als Tubuli seminiferi recti bezeichnet. Vom Rete testis ausgehend, ziehen - in der Anzahl verschieden – Ductuli efferentes testis durch die Tunica albuginea in den Nebenhodenkopf (Caput epididymidis). Dort bilden sie den dicht geschwungenen Nebenhodenkanal (Ductus epididymidis). Im Ductus epididymidis findet die Reifung der Spermien statt. Dieser zieht durch den Nebenhodenkörper sowie den Nebenhodenschwanz bevor er in den Samenstrang (Ductus deferens) mündet (Salomon et al., 2008; Liebich, 2010). Im Ductus deferens und dem Ductus ejaculatorius findet der Transport der ausgereiften Spermien bis zur Ejakulation statt.

1.1.1. Tubuli seminiferi contorti

In den Tubuli seminiferi contorti findet die Keimzellbildung- und reifung statt. Die Reifung der Keimzellen wird Spermatogenese genannt. Sie wird in vier Phasen aufgeteilt: Proliferation und Differenzierung der Spermatogonien, Meiose der Spermatozyten, Spermiogenese und Freisetzen der Spermatozoen in das Lumen der Tubuli (Bergmann, 2006). In den Tubuli seminiferi contorti befinden sich zusätzlich zu den Keimzellen, welche sich zu Spermatozoa differenzieren, so genannte Nähr-/Stützzellen des Keimepithels, die Sertoli-Zellen (Griswold, 1995; Liebich, 2010).

1.1.1.1. Keimzellen

1.1.1.1.1. Proliferation und Differenzierung der Keimzellen

Auf der Basalmembran liegen die Spermatogonien. Diese können bei den meisten Säugern eingeteilt werden in A-Spermatogonien „dustlike“ und B-Spermatogonien „crustlike“ (Clermont, 1972). A-Spermatogonien können weiterhin unterteilt werden in blasse Spermatogonien (A_{pale}) und in dunkle Spermatogonien (A_{dark}) (Allen, 1918; Swierstra, 1968). Dies ist nicht nur für Schweine und Mäuse beschrieben, sondern auch für Menschen und Primaten (Swierstra, 1968; Clermont, 1972). Frankenhuis et al. (1982) unterscheidet für die Spermatogonien beim Schwein zusätzlich folgende Gruppen: Undifferenzierte Spermatogonien (A_s , A_{pr} , A_{al}) sowie differenzierte Spermatogonien (A_1 , A_2 , A_3 , A_4), intermediäre Spermatogonien (In) und B-Spermatogonien (B).

Dies ist auch für die Maus beschrieben. A_{single} (A_s)-Spermatogonien werden als die Stammzellen des Keimepithels angesehen und induzieren die Keimzellbildung (De Rooij und Russel, 2000). Die A_{single} (A_s)-Spermatogonie teilt sich mitotisch, wodurch zwei Tochterzellen entstehen. Bei einer symmetrischen Teilung entstehen zwei identische A_{single} (A_s)-Tochter-Stammzellen. Bei der asymmetrischen Teilung entsteht eine Tochterzelle, die als Stammzelle dient, die andere Tochterzelle geht weitere mitotische Teilungen ein. Durch die Mitoseteilung entsteht aus einer A_{single} (A_s)-Spermatogonie ein neues Paar A_{paired} -Spermatogonien (A_{pr}). Durch weitere mitotische Teilungen entstehen somit Ketten von Spermatogonien, die ab diesem Zeitpunkt über Zellbrücken miteinander verbunden sind. Diese Spermatogonien werden $A_{aligned}$ (A_{al}) genannt.

Sie differenzieren sich und werden nach weiteren mitotischen Teilungen in differenzierte Spermatogonien A₁, A₂, A₃, A₄ unterteilt (De Rooij und Grootegoed, 1998; De Rooij und Russel, 2000; Costa et al., 2013). Diese können jedoch nicht anhand des Aussehens unterschieden werden. Weiterhin teilen sich die A-Spermatogonien in intermediäre Spermatogonien und weiterhin zu B-Spermatogonien (Frankenhuis et al., 1982). Sowohl für Mäuse, Ratten, Bullen und das Schwein ist das Modell beschrieben, dass sich die A-Spermatogonien in intermediäre Spermatogonien und im Anschluss in B-Spermatogonien differenzieren (Clermont, 1972; Frankenhuis et al., 1982; Izadyar et al., 2002). Beim nichtmenschlichen Primaten hingegen, geht man davon aus, dass es keine intermediären Spermatogonien gibt, sondern dass sich die A₁₊₂-Spermatogonien direkt in B₁₋₄-Spermatogonien differenzieren (Clermont, 1969).

A-Spermatogonien besitzen einen ovalen Zellkern mit einem blassen Nukleoplasma und ein oder zwei Nukleoli. Das Chromatin ist flockenartig und homogen im Zellkern verteilt. Intermediäre Spermatogonien besitzen einen abgeflachten Zellkern, der parallel zur Basalmembran ausgerichtet ist und kleiner ist als der von A-Spermatogonien. Der Zellkern wird stärker mit Heterochromatin angereichert, welches sich flockenartig innerhalb des Zellkerns oder krustenartig an der Zellkernmembran befindet. Ein bis zwei Nukleoli befinden sich innerhalb des Zellkerns. B-Spermatogonien besitzen Heterochromatin, das krustenartig auf der Zellkernmembran angelagert ist. Der Zellkern besitzt eine größere Form als bei den Vorgängerkernzellen und eine runde Form. Im Zellkern ist granuläres Heterochromatin zu finden sowie feine Stränge von Chromatin (Clermont, 1972; Suswillo und Watson, 1990; Kangawa et al., 2016). Die größeren B-Spermatogonien sind von der Basalmembran abgehoben und nur schwer von den frühen Stadien der primären Spermatozyten zu unterscheiden (Clermont, 1972; Suswillo und Watson, 1990). Durch mitotische Teilung gehen aus den B-Spermatogonien Spermatozyten I. Ordnung hervor.

1.1.1.1.2. Meiose der Spermatozyten

Die Meiose I beginnt mit der Prophase. In dieser sind leptotäne Spermatozyten mit feinen Chromatinfäden zu sehen. Im Anschluss daran folgen die Kondensation der Chromosomenfäden und die Paarung der homologen Chromosomenpaare in den zygotänen Spermatozyten. Im Pachytän kommt es zum Crossing-over der stark verkürzten und kondensierten Chromosomen mit Austausch von Genmaterial.

Die Spermatozyten im Diplotän sind die größten Spermatozyten. Dort findet die so genannte Chiasmata-Bildung mit Verbindung der Chromosomenpaare nach dem Crossing-over statt. Nach Eintritt in die Diakenese und dem Auflösen der Zellkernmembran folgen die restlichen Phasen der Meiose I (Metaphase I, Anaphase I, Telophase I) (Clermont, 1972; Suswillo und Watson, 1990; Bergmann, 2006). Die Spermatozyten I. Ordnung entwickeln sich durch die erste Reifeteilung (Miose I) zu Spermatozyten II. Ordnung. Diese sind halb so groß wie ihre Vorläuferzellen (Wrobel et al., 1995). In einer zweiten Reifeteilung (Miose II) gehen aus zwei Spermatozyten II. Ordnung vier Spermatisden mit einem haploiden Chromosomensatz aus der Spermatogonie mit anfänglich diploidem Chromosomensatz hervor (Nishimura und L' Hernault, 2017).

1.1.1.1.3. Spermiogenese

Die runden Spermatisden, welche aus den Spermatozyten II. Ordnung hervorgehen befinden sich an der luminalen Seite der Tubuli seminiferi contorti. Die Differenzierung und Reifung der Spermatisden in Spermatozoa kann in vier Phasen unterteilt werden (Clermont und Leblond, 1955; Bergmann, 2006):

Golgi Phase:

In der Nähe des anfangs runden oder sphärischen Zellkerns der Spermatisden liegt die so genannte Golgi Zone des Golgi-Apparates. Dort verschmelzen mehrere kleine Vesikel zu einem größeren pro-akrosomalen Granulum. (Clermont, 1972; Bergmann, 2006).

Kappenphase:

Im weiteren Verlauf entwickelt sich das pro-akrosomale Granulum zu einem Vesikel mit einem verdichteten Granulum. Dieses legt sich kappenartig über die Zellkernmembran der Spermatisde (Schmidbauer, 2001). Unter der Akrosomenkappe, welche eine äußere und eine innere Membran besitzt, verdichtet sich das Chromatin des Zellkerns. Zwischen Akrosomenkappe und Zellkern befindet sich der subakrosomale Raum. Das Zytoplasma und die Zellorganellen der Spermatisde werden an das andere Ende des Zellkernpols verlagert, der eine längsovale Form annimmt und distal, bedingt durch die Lage des proximalen Zentriols, eine Implantationsgrube bildet (Schmidbauer, 2001; Liebich, 2010).

Akrosomenphase:

In der Akrosomenphase nimmt der kondensierte Zellkern der Spermatozide eine längsovale Form an und wird bis zu 2/3 von dem abgeflachten Akrosom umgeben (Schmidbauer, 2001; Liebich, 2010). Von der Akrosomenmembran zieht eine Manschette bestehend aus Mikrotubuli vom distalen Zellkernpol ab (Schmidbauer, 2001; Bergmann, 2006).

Reifungsphase:

Die Kondensation des Zellkerns nimmt weiter zu und es folgt eine weitere Reduktion des Zytoplasmas (Liebich, 2010). Von der distalen Zentriole ausgehend bildet sich der Geißelschwanz (Flagellum/ Axonema). Dieser wird im proximalen Anteil helikal von Mitochondrien umgeben, gemeinsam bilden sie das Mittelstück (Bergmann, 2006). Die mitochondrienlose Verlängerung des Flagellums stellt das Hauptstück des Spermiums dar. Es besteht aus Außenfibrillen mit einem zentralen Achsenfaden und mündet schließlich im Endstück (Liebich, 2010). Die Spermatozoen besitzen nach Beendigung der Reifungsphase folgenden Aufbau, wie in Abbildung 1 gezeigt wird (Busch und Holzmann, 2001; Schmidbauer, 2001):

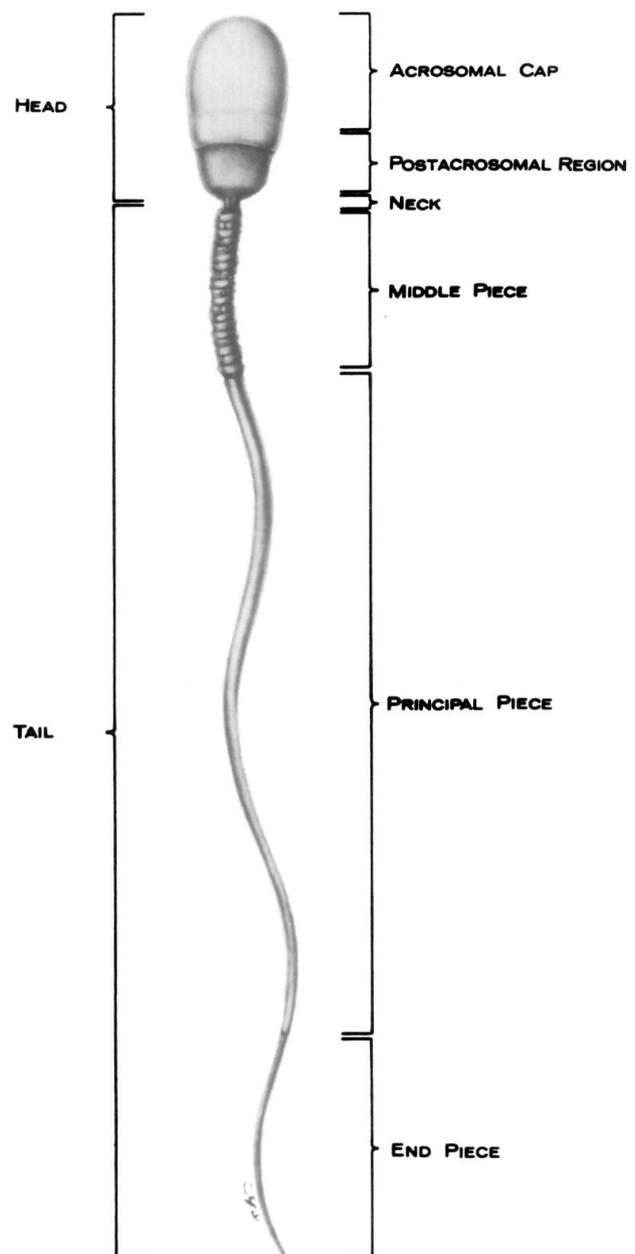


Abbildung 1: Aufbau einer Spermatozoe (Fawcett, 1975).

Das paddelförmige Kopfstück enthält den stark kondensierten Zellkern (Bustos-Obregon und Fléchon, 1975). Beim Schwein ist dieser zu etwa $\frac{3}{4}$ von der Akrosomenkappe bedeckt (Nicander und Bane, 1962). In der Akrosomenkappe befinden sich hydrolytische Enzyme, die für die erfolgreiche Befruchtung der Eizelle nötig sind (Busch und Holzmann, 2001).

An das Akrosom, welches sich in ein vorderes Segment und das Äquatorialesegment, den distalen Anteil des Akrosoms, aufteilen lässt, schließt die post-akrosomale Region an (Bustos-Obregon und Fléchon, 1975; Busch und Holzmann, 2001). Diese besteht aus dem Zellkern und der Zellkernmembran. Dem Spermienkopf schließt sich das Halsstück an. Dieses setzt sich zusammen aus einem gelenkig segmentierten Streifenkörper, in welchem sich die Zellmembran in Falten legt (Nicander und Bane, 1962). Sie besteht aus Glykoproteinen (Busch und Holzmann, 2001). Im Halsstück ist auch das proximale Zentriol zu finden.

Ein zweites Zentriol, auch distale Zentriole genannt, entlässt das Axonema. Dieses besteht aus einem paar zentraler Mikrotubuli mit neun außen anliegenden Doppeltubuli (Fawcett, 1975; Hermo et al., 2010). Diese sind umgeben von Mantelfasern (Busch und Holzmann, 2001). Dem Halsstück schließt sich das Mittelstück an. In diesem befinden sich außen helikal angeordnete Mitochondrien, welche das zentral liegende Axonema umgeben. Das Mittelstück endet mit dem so genannten Schlussring (Annulus) (Bustos-Obregon und Fléchon, 1975; Fawcett, 1975). Das Hauptstück, welches einen großen Anteil des Spermischwanzes ausmacht, enthält zentral das Axonema und Mantelfasern, welche von Fibrillen umgeben sind (Fawcett, 1975; Busch und Holzmann, 2001). Das Endstück enthält einen zentralen Achsfaden, dessen Axonema sich am Ende des Schwanzes in 20 Mikrotubuli aufteilt (Busch und Holzmann, 2001).

Die restlichen Organellen und das Zytoplasma der differenzierten Spermatischen schnüren sich zu einem so genannten Zytoplasmotropfen ab. Nicander und Bane (1962) beschreiben diesen am posterioren Ende des Mittelstücks. Nach dem Freisetzen der Spermatozoen aus der Sertoli-Zelle (Spermiation) verbleibt der Zytoplasmotropfen als Residualkörper in den Sertoli-Zellen (Schmidbauer, 2001).

1.1.1.1.4. Keimepithelzyklus

Die Spermatogenese beschreibt die Bildung sowie Reifung von einer A-Spermatogonie bis hin zum Freisetzen der Spermatozoen. Zusätzlich wird ein Keimepithelzyklus unterschieden. Clermont (1972) beschreibt, dass Keimzellgruppen in den Tubuli seminiferi contorti nach ihrer Bildung nicht unwillkürlich angeordnet sind, sondern ein synchrones Wachstum in festen Assoziationen in der Spermatogenese einnehmen. Die Keimzellen unterscheiden sich in ihrem Entwicklungsstadium und sind bis auf die Stammzellen untereinander durch Zellbrücken miteinander verbunden (Dym und Fawcett, 1971; Mruk und Cheng, 2004). Dies führt dazu, dass man nur an bestimmten Stellen von jedem Querschnitt der Tubuli seminiferi contorti festgelegte Formationen an Zellen findet. Innerhalb der Tubuli seminiferi contorti wiederholen sich die Serien unterschiedlicher Zellformationen zyklisch und in einem bestimmten Zeitabstand (Clermont, 1972). Die festgelegten Zellassoziationen werden als Stadien bezeichnet. Insgesamt wurden beim Eber acht Keimepithelstadien unterschieden (Swierstra, 1968; Clermont, 1972; Suswillo und Watson, 1990; França und Cardoso, 1998; Costa et al., 2013). Vier Zyklen dieser acht Keimepithelstadien sind notwendig, bis aus einer A-Spermatogonie ausgereifte Spermatozoen im Epithelverband gebildet werden (Oakberg, 1956). Garcia-Gil et al. (2002) unterteilt die acht Stadien in prä-meiotische, meiotische und post-meiotische Stadien. Die einzelnen Stadien können mit Hilfe zweier Methoden eingeteilt werden:

1) „Tubular morphology system“:

Dort werden die Lokalisation und die Gestalt der Spermatidennuklei sowie die Meiosestadien und die Spermatozoen im Keimepithelverband betrachtet (Swierstra, 1968).

2) Anhand der Veränderungen des Akrosoms mit Hilfe der PAS-Färbung (Clermont, 1972).

Der gesamte Spermatogenesezyklus von der A-Spermatogonie bis hin zur Spermiation dauert beim Eber im Durchschnitt 34 Tage (Busch und Holzmann, 2001), bei wilden Ebern sogar 41 Tage (Almeida et al., 2006).

1.1.1.2. Sertoli-Zelle

Neben den Keimzellen finden sich in den Tubuli seminiferi contorti die Sertoli-Zellen, welche somatischen Ursprungs sind (Griswold, 1998). Die Sertoli-Zellen sind zwischen den Keimzellen eingebettet und liegen der Basalmembran auf. Man unterscheidet zwei Arten von Sertoli-Zellen: Die immaturen Sertoli-Zellen, welche von der Geburt bis kurz vor der Pubertät vorhanden sind und die maturen Sertoli-Zellen, welche sich zu Beginn der Pubertät differenzieren (França et al., 2000). Die Zellkerne der immaturen Sertoli-Zellen besitzen eine längliche Gestalt mit ein bis zwei Nukleoli (Van Vorstenbosch et al., 1984). Die Zellkerne der maturen Sertoli-Zellen haben eine birnenförmige, aber auch ovale bis elliptische Gestalt mit einem prominenten, dreigelappten Nukleolus (Hess und França, 2005). Die Nuklei können parallel oder senkrecht zur Basalmembran anliegen (Clermont, 1972). Das Zytoplasma der Sertoli-Zellen reicht von basal bis zum Lumen der Tubuli seminiferi contorti und nimmt eine pyramidenähnliche Form an (Liebich, 2010).

Der Sertoli-Zelle werden mehrere äußerst wichtige Aufgaben zuteil (Mruk und Cheng, 2004; Liebich, 2010):

1. Stützfunktion des Keimepithels
2. Nährfunktion des Keimepithels
3. Bildung der Blut-Hoden-Schranke
4. Transport der differenzierten Keimzellen in Richtung Lumen
5. Phagozytose von degenerierten Keimzellen
6. Sekretion der Tubulusflüssigkeit
7. Freisetzen der elongierten Spermatozoen in das Tubuluslumen
8. FSH- und Testosteronregulation (Siehe Endokrinologie der Spermatozoen)

1865 beschrieb Enrico Sertoli zum ersten Mal, dass es zwischen den Keimzellen eine weitere Zellart mit einzigartigen Zytoplasma-Ausläufern gibt, welche die Keimzellentwicklung unterstützen und direkten Einfluss auf diese haben (Sertoli, 1865). Das Zytoplasma der Sertoli-Zellen umgibt oberhalb der basal liegenden Spermatozoen alle Keimzellen bis zum Lumen (Dym und Fawcett, 1970). Sertoli-Zellen sind sowohl untereinander als auch mit den Keimzellen des Keimepithels durch Spezialisierungen verbunden (Mruk und Cheng, 2004). Welche dies genau sind, wird weiter unten aufgeführt.

Dies und ein stark ausgebildetes Zytoskelett führen zu einer hohen Stabilität innerhalb des Keimepithels (Aumüller et al., 1992). Das Zytoskelett der Sertoli-Zellen besteht aus den Aktinfilamenten, den Intermediärfilamenten und den Mikrotubuli (Boekelheide et al., 1989; Vogl et al., 2009). Sertoli-Zellen haben die Aufgabe, Spermatogonien zu translozieren, zu positionieren und zu verankern und Zellen miteinander zu verbinden (Vogl et al., 2009). Die Aktinfilamente befinden sich an der Innenseite der Plasmamembran von Sertoli-Zellen und sind als kleine hexagonal angeordnete Filamentbündel (Abbildung 2) sandwichartig zwischen der Plasmamembran und den Zisternen des endoplasmatischen Retikulums angeordnet (Dym und Fawcett, 1970; Parreira et al., 2002).

Ektoplasmathe Spezialisierungen sowie tubulobulbäre Komplexe sind Sonderformen der Aktinfilamente. Die ektoplasmathe Spezialisierungen können in basale und apikale ektoplasmathe Spezialisierungen eingeteilt werden. Hierbei verbinden die basalen ektoplasmathe Spezialisierungen Sertoli-Zellen untereinander, während die apikalen Spezialisierungen Sertoli-Zellen und Spermatiden miteinander verbinden (Toyama, 1976; Vogl et al., 2009).

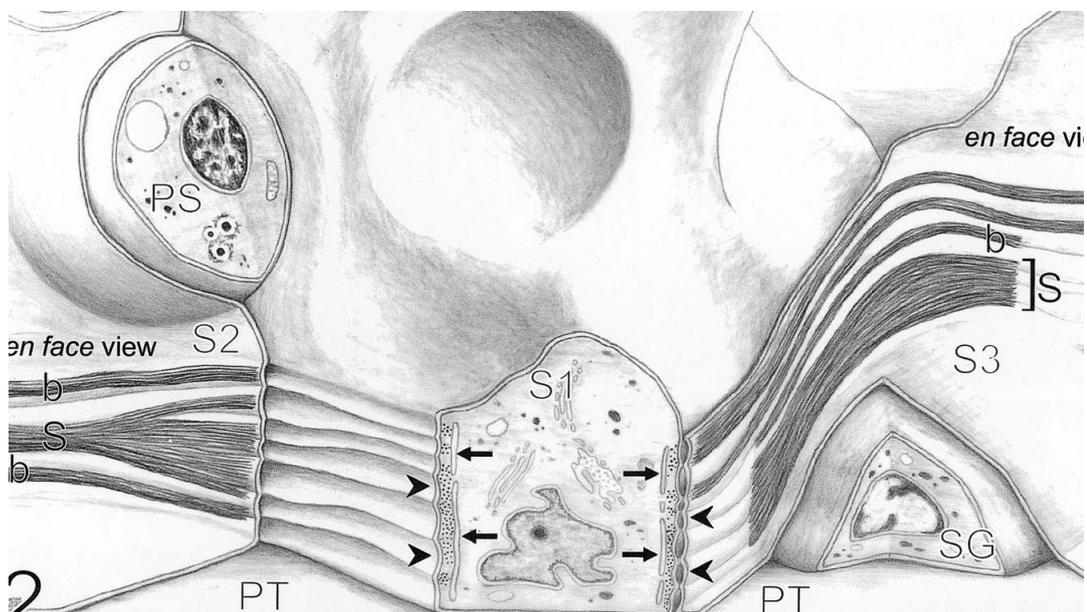


Abbildung 2: Anordnung der Aktinfilamente in Sertoli-Zellen (Parreira et al., 2002).

Die Aktinfilamente der basalen ekto-plasmatischen Spezialisierungen, welche beiderseits von zwei angrenzenden Sertoli-Zellen zu finden sind, werden durch sog. Tight-junctions miteinander verbunden (Abbildung 3) (Parreira et al., 2002; Toyama et al., 2003). Für die tubulobulbären Komplexe wird auch zwischen basalen und apikalen tubulobulbären Komplexen unterschieden.

Die basalen tubulobulbären Komplexe verbinden angrenzende Sertoli-Zellen miteinander. Im Gegensatz zu den apikalen tubulobulbären Komplexen besitzt bei den basalen tubulobulbären Komplexen die Plasmamembran der einen Sertoli-Zelle Fortsätze mit bulbösen Auftreibungen, während die Plasmamembran der anderen Sertoli-Zelle invaginiert (Russell und Clermont, 1976).

Für die Umbauvorgänge während des Spermatogenese-Zyklus beschreiben Vogl et al. (2009) verschiedene Theorien, wie Spermatogonien während der Teilung und Differenzierung zu Spermatozyten von basal nach apikal gelangen können.

Hierbei wird beschrieben, dass die Junction-Proteine, welche an späterer Stelle beschrieben werden, entweder durch Endozytose von der Plasmamembran in das Innere des Sertoli-Zell-Zytosols aufgenommen werden, in den tubulobulbären Komplex gelangen und dann in das Zytosol aufgenommen werden - oder entlang der Plasmamembran von apikal nach basal „wandern“ und hier an Zellen wie z.B. Spermatozyten während der Meiose verbleiben, um dann die Funktion basal der Zelle wieder aufzunehmen (Vogl et al., 2009).

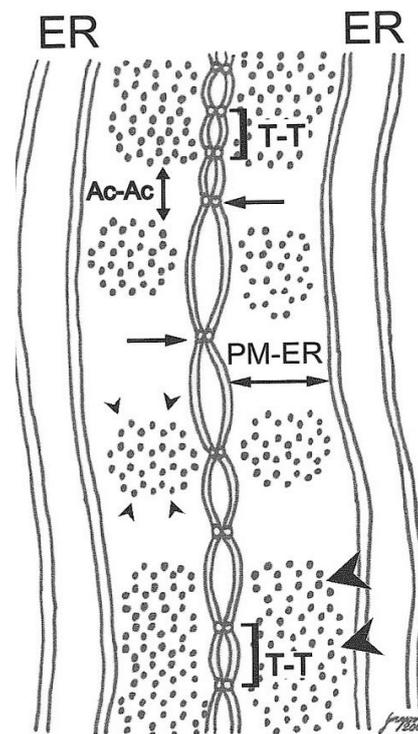


Abbildung 3: Anordnung der Aktinfilamente an zwei angrenzenden Sertoli-Zellen (Parreira et al., 2002).

Bei den apikalen tubulobulbären Komplexen stülpen sich Fortsätze der Plasmamembran von elongierten Spermatisden mit einer „bulbösen Auftreibung“ am Ende der Fortsätze in die invaginierte Plasmamembran von Sertoli-Zellen vor. Diese werden von Aktinfilamentbündeln und Zisternen des endoplasmatischen Retikulums auf der Zellseite des Sertoli-Zellzytoplasmas umgeben (Russell und Clermont, 1976; Russell, 1979). Dies dient zum einen der Verankerung der Spermatisden im Keimepithel, aber auch der Reduktion des Spermatisdenzytoplasmas bei der Spermienreifung. Bei der Spermiation werden die Spermien in das Lumen entlassen und die tubulobulbären Komplexe sowie Residualkörper von der Sertoli-Zelle phagozytiert (Russell und Clermont, 1976; Busch und Holzmann, 2001).

In Sertoli-Zellen gibt es drei verschiedene Intermediärfilamente: Desmin, Vimentin und Keratin (Aumüller et al., 1992). In der adulten Sertoli-Zelle ist Vimentin das dominante Intermediärfilament (Aumüller et al., 1992; Vogl et al., 2009). Es ist in der Nähe des Zellkerns zu finden und verbindet Zellen untereinander über Desmosomen und Hemidesmosomen mit der Basallamina. Zusätzlich haben die Intermediärfilamente Kontakt zu elongierten Spermatisden (Amlani und Vogl, 1988; Boekelheide et al., 1989; Vogl et al., 2009). Mikrotubuli sind apikal des Nukleus lokalisiert und parallel zur Zellachse ausgerichtet, wodurch sie Stabilität verleihen, und apikal der Verankerung und Positionierung von Spermatisden in den Krypten des Keimepithels dienen, sie sezernieren Tubulusflüssigkeit und dienen dem Transport von Zellorganellen und Molekülen (Amlani und Vogl, 1988; Boekelheide et al., 1989; Richburg et al., 1994; Vogl et al., 2009).

Zusätzlich seien noch die Desmosomen erwähnt. Diese werden den Adhesive-junctions zugeteilt und stehen mit Intermediärfilamenten in Verbindung.

1.1.1.2.1. Blut-Hoden-Schranke

Mit Beginn der Pubertät kommt es zur Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke (Morales et al., 2007). Diese ist eine der wichtigsten Formationen für die intakte Spermatogenese (Dym und Fawcett, 1970). Für die Funktion der Blut-Hoden-Schranke ist die Anordnung spezifischer Strukturen essentiell. Dazu gehören die Zellverbindungen zwischen Sertoli-Zellen, Keimzellen sowie diesen Zellen untereinander, welche die Blut-Hoden-Schranke bilden (Abbildung 4). Man unterscheidet derzeit vier verschiedene Varianten dieser spezialisierten Verbindungen. Dazu gehören 1) die Tight-junctions oder auch Occluding-junctions genannt, 2) die Gap-junctions und 3) Anchoring- oder auch Adhering-junctions genannt sowie 4) Desmosomen. Zusätzlich seien noch die bereits oben erwähnten ektoplastischen Spezialisierungen und die tubulobulbären Komplexe genannt. Diese können den Adhering-junctions zugeordnet werden (Mruk und Cheng, 2004, 2015). Die Tight- und Adhering-junctions sind an Aktinfilamente gebunden, desmosomenähnliche Strukturen an die Intermediärfilamente (Pokutta und Weis, 2002). Nebenbei sei erwähnt, dass in der Studie von Domke et al. (2014) keinerlei Nachweise von Desmosomen oder Desmosomenähnlichen Strukturen in den Tubuli seminiferi contorti von Säugern gefunden werden konnten, sondern Adhering-junctions basierend auf N-cadherin.

Durch die Ausbildung und Formation der spezialisierten Verbindungen wird das Keimepithel in ein basales (Spermatogonien, präleptotäne- und leptotäne Spermatozyten) und ein adluminales Kompartiment unterteilt (alle anderen meiotischen und postmeiotischen Keimzellen (Dym und Fawcett, 1970)). Aufgrund der Blut-Hoden-Schranke sind die differenzierteren Keimzellen sowohl von Blut als auch von Lymphe abgetrennt. Makromoleküle können somit nicht in das adluminale Kompartiment gelangen (Griswold, 1995). Dies gilt auch für die Antikörper aus dem Blut, welche die Oberflächenantigene der adluminalen Keimzellen als körperfremd anerkennen und eine Autoimmunreaktion auslösen würden. Die immunologische Barriere der Blut-Hoden-Schranke stellt auf diese Weise ein adluminales Mikromilieu her, welches wichtig für die Keimzellentwicklung ist (Mruk und Cheng, 2004; Mital et al., 2011).

Studien zeigen jedoch, dass nicht nur die Blut-Hoden-Schranke als immunologischer Schutz für differenzierte Keimzellen dient. Im Zytoplasma von Spermato gonien können Defensine gefunden werden, diese sind kationische Peptid-Moleküle, welche eine suppressive Wirkung auf Mikroorganismen haben (Jin et al., 2010). Ebenso reguliert die Blut-Hoden-Schranke die Passage von Wasser, Ionen, Molekülen, Nährstoffen, Hormonen, Elektrolyten und Toxinen (Cheng und Mruk, 2012).

Russell (1977) beschreibt, dass Sertoli-Zellen eine aktive Beteiligung an der Keimzellwanderung Richtung Lumen haben. Der genaue Mechanismus der Spermatozytenmigration von einem Kompartiment in das andere ist bisher ungeklärt. Jedoch geht man davon aus, dass leptotäne Spermatozyten von basalen und apikalen Tight-junctions umgeben werden, bevor sie als zygotäne Spermatozyten durch Ab-, Um-, und Neubildung der Tight-junctions in das adluminale Kompartiment entlassen werden (Smith und Braun, 2012). Elongierte Spermatiden sind durch ihre Zytoplasmaausstülpungen am Spermatidenkopf fest mit der Sertoli-Zelle verbunden (tubulobulbärer Komplex). Während des Ablaufs der Spermatogenese ist die Apoptose von degenerierten Keimzellen ein physiologisches Phänomen (Kerr, 1992). Sertoli-Zellen haben hierbei die Aufgabe, degenerierte Keimzellen und Residualkörper nach der Spermiation mit Hilfe von Lysosomen zu phagozytieren. Häufig ist dies mit einer Anlagerung von Lipidtropfen im Zytoplasma der Sertoli-Zellen verbunden (Wang, H. et al., 2006).

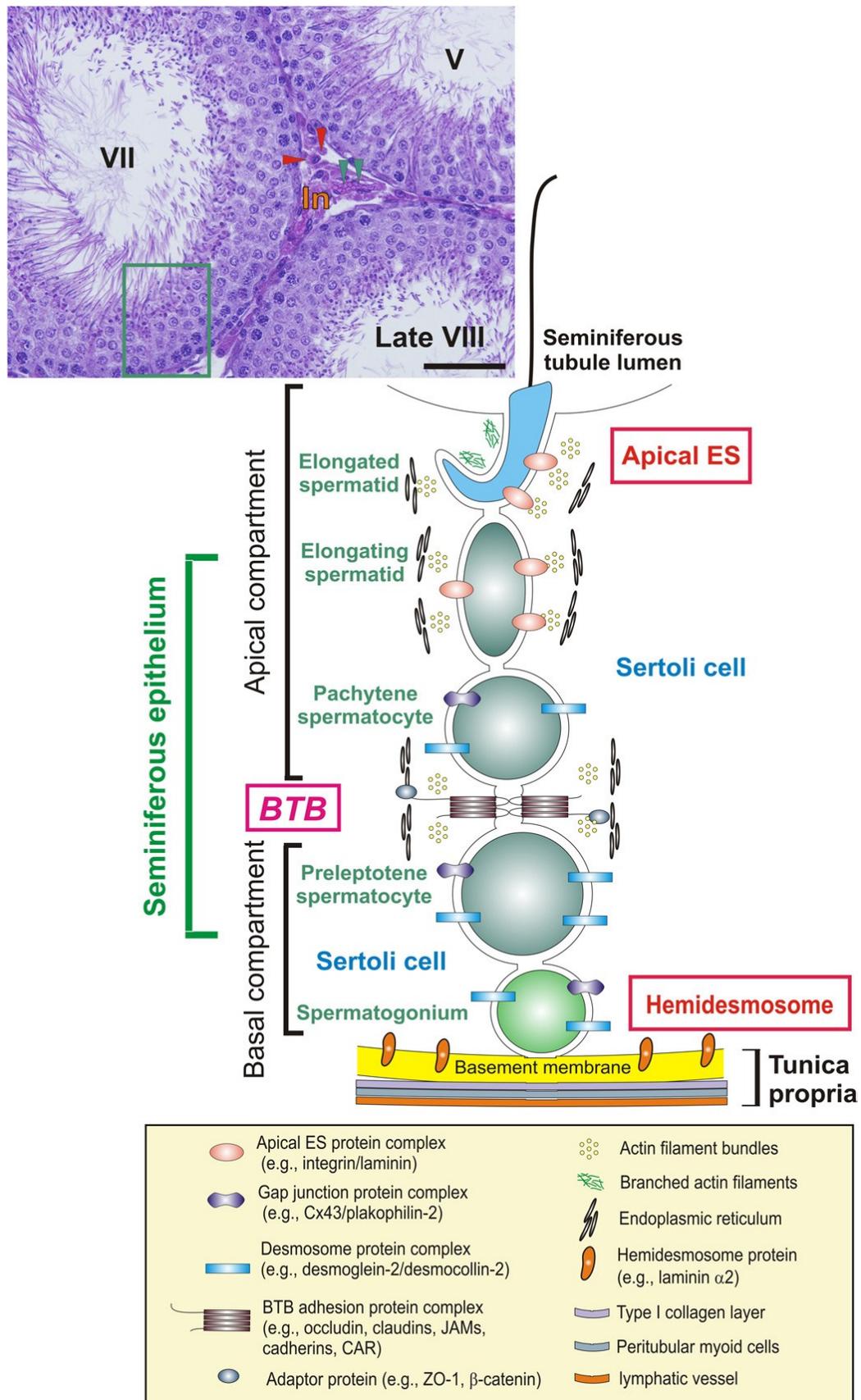


Abbildung 4: Zellverbindungen zwischen Sertoli-Zellen sowie zwischen Sertoli- und Keimzellen (Cheng und Mruk (2012)).

1.1.1.3. Intertubuläres Gewebe und Zellarten

1.1.1.3.1. Interstitielles Bindegewebe

Die Tubuli seminiferi contorti werden von lockerem Bindegewebe umgeben. In diesem sind Blut und Lymphgefäße, Nerven, Makrophagen sowie Fibrozyten zu finden (Liebich, 2010; Reddy Dyhana et al., 2016). Zu den wichtigsten Zellen gehören die sich im Interstitium befindlichen testosteronbildenden Leydig-Zellen (Zirkin und Papadopoulos, 2018).

1.1.1.3.2. Leydig-Zellen

1850 beschreibt der Anatom und Zoologe Franz von Leydig, Zellen im interstitiellen Bindegewebe zwischen den Tubuli seminiferi contorti (Von Leydig, 1850). Diese wurden nach ihm benannt und heißen Leydig-Zellen. Sie besitzen runde oder polygonale Gestalt, sind meist in großen Gruppen angeordnet und nehmen beim Eber zwischen 20-30 % des ganzen Hodenvolumens ein (Awoniyi et al., 1988b; Liebich, 2010). Ihr Nukleus besitzt eine runde oder auch längliche Form mit ein bis zwei prominenten Nukleoli. Der Nukleus befindet sich meist einseitig in der Peripherie des stark ausgeprägten Zytoplasmas (Lunstra et al., 1986). In den Leydig-Zellen findet die Biosynthese der Steroide statt (Ewing et al., 1981). Dazu gehört unter anderem das Hormon Testosteron. Dieses ist essentiell für die Ausbildung und Funktion männlicher Geschlechtsorgane des Ebers (Busch und Holzmann, 2001).

2. Übergeordnete Regulation der Spermatogenese

2.1. GnRH-Aktivität

Die Regulation der Spermatogenese in den Tubuli seminiferi contorti des Hodens erfolgt durch die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (Knol, 1991). Hierbei wird das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) pulsatil freigesetzt. Dieses ist ein Dekapeptid, bestehend aus zehn Aminosäuren, welches in den neuronalen Zellen des rostralen und mediobasalen Hypothalamus produziert wird (Baba et al., 1971; Matsuo et al., 1971; Ojeda et al., 2008; Engelhardt, 2015).

(pyro) Glu – His – Trp – Ser – Tyr – Gly – Leu – Arg – Pro - Gly-NH₂

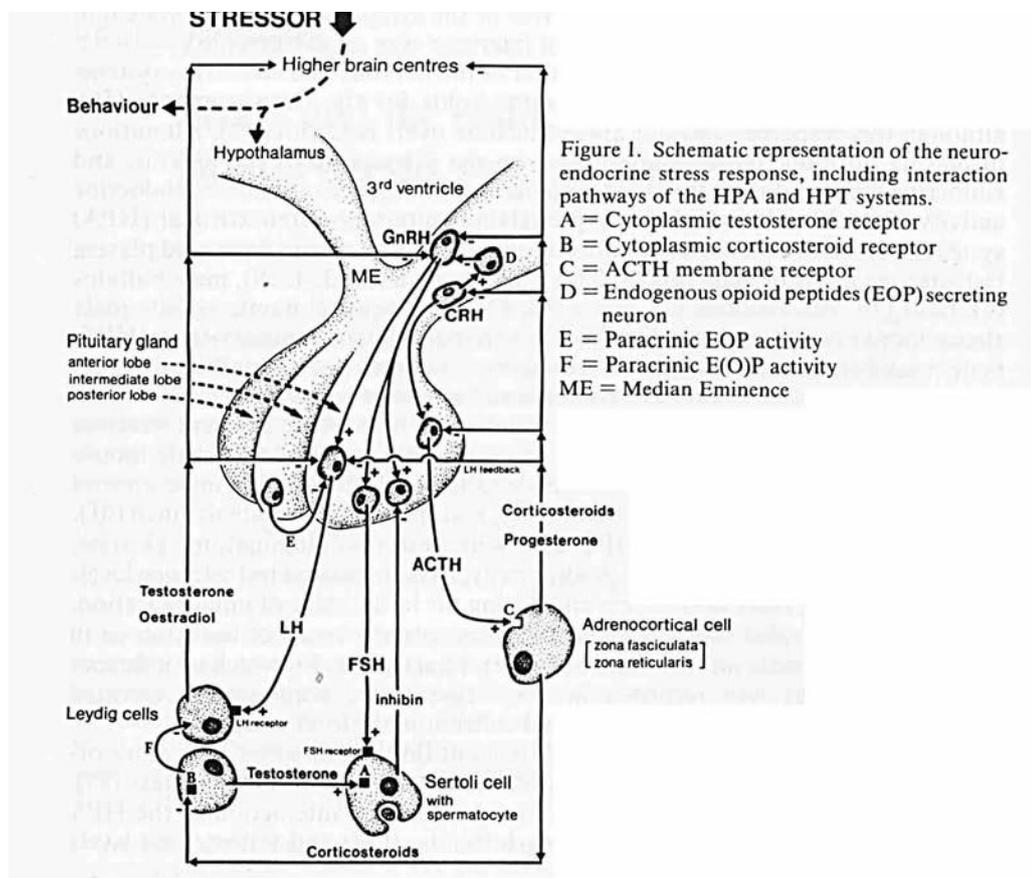


Abbildung 5: Übersicht über die GnRH-Aktivität und dessen Zielzellen (Knol, 1991).

Über die Axone im Hypothalamus gelangt das GnRH an der Eminentia media in das Pfortadersystem der Hypophyse und bewirkt in den gonadotropen Zellen der Adenohypophyse die Bildung und Sekretion der Gonadotropine (Schally et al., 1971; Engelhardt, 2015). Dazu gehören das Follikel-Stimulierende Hormon (FSH) und das Luteinisierende Hormon (LH) (Abbildung 5).

Beim Schwein wird ein weiteres Gen für GnRH (GnRH2) beschrieben. Dieses ist bei den meisten Säugern nicht funktional, bei Schweinen jedoch schon (Stewart et al., 2009). Da GnRH2 und sein Rezeptor, jedoch immunhistochemisch an Leydig-Zellen und in den Tubuli seminiferi contorti im Hoden nachweisbar sind, geht man von der Funktion einer lokalen Testosteronsynthese für dieses aus (Desaulniers et al., 2015). Die genaue Aufgabe ist bisher unbekannt. Aus diesem Grund wird auch nur auf die Funktion und die endokrine Physiologie des GnRH1 eingegangen.

2.1.1. Gonadotropin LH und FSH sowie deren Wirkungsmechanismus

Die Glykoproteine LH und FSH bestehen aus einer gleichen α - und einer spezifischen β -Untereinheit (Pierce und Parsons, 1981). Sowohl LH als auch FSH werden durch positive und negative Feedbackmechanismen der Steroide und Peptide aus dem Hoden reguliert (Brown und McNeilly, 1999). Die beiden Gonadotropine werden über das Blut zu den Hoden geleitet, wo sie ihre Wirkung entfalten.

2.1.2. FSH

FSH besitzt spezifische Rezeptoren an den Sertoli-Zellen und hat dort einen essentiellen Anteil an der Spermatogenese. Es ist jedoch bis heute ungeklärt, welche spezifische Aufgabe dies im Detail ist. Da Tiere auch ohne FSH-Aktivität Spermatogenese zeigen, geht man davon aus, dass es weitaus weniger wichtig für die Spermatogenese ist, sondern vor allem als Regulator der Sertoli-Zellzahlen und als Überlebensfaktor für prämeiotische Zellen dient (Huhtaniemi, 2015).

Im Gegensatz zu den anderen Säugetieren wird beim Eber die Möglichkeit einer zum Teil GnRH-unabhängigen Aktivierung und Sekretion von FSH vermutet, da eine aktive Immunisierung von Ebern gegen GnRH keinen Effekt auf die FSH-Konzentrationen im Blut hatte (Awoniyi et al., 1988a; Wagner und Claus, 2004). Dabei wird vermutet, dass sowohl Aktivin, Inhibin aber auch Follistatin regulatorische Eigenschaften auf das FSH ausüben können.

So soll Aktivin aktivierende, Follistatin und Inhibin hemmende Wirkung auf das FSH ausüben (Padmanabhan und McNeilly, 2001). Ebenso wird hierbei ein alternatives releasing Hormon für FSH oder auch eine separate Steuerung des FSH vermutet (Padmanabhan und McNeilly, 2001). In bovinen Gonadotropinen wurden unter anderem die neuen Rezeptoren GPR30, GPR153 und AMRH2 gefunden. Von den Autoren wird angenommen, dass diese möglicherweise regulierende Einflüsse auf FSH und LH ausüben könnten (Kadokawa, 2020).

Zu den Kontrollmechanismen von FSH gehören unter anderem die Regulation von Inhibin und Aktivin. Diese gehören zur Superfamilie des Transforming growth factor (Barakat et al., 2012). Aktivin bewirkt über einen positiven Feedback-Mechanismus die FSH-Bildung und -Ausschüttung in der Hypophyse (Weiss et al., 1995). Inhibin wirkt antagonistisch zu Aktivin und bewirkt über einen negativen Feedbackmechanismus die Hemmung der FSH-Sekretion (Engelhardt, 2015). Zusätzlich kann die Aktivität des Aktivin durch Bindung des Proteins Follistatin gehemmt werden und bewirkt somit eine Hemmung der FSH-Sekretion und Freisetzung (Patel, 1998).

Beim Schwein kann die Aktivin- und Inhibin- β -Untereinheit, aber auch Follistatin in der Hypophyse exprimiert werden (Li et al., 1997). Da jedoch im Gegensatz zu der Ratte und dem Menschen die α -Untereinheit des Inhibins im Schwein nicht gefunden wird, geht man davon aus, dass Inhibin in der Hypophyse des Schweins keine große Rolle in Bezug auf die FSH-Regulation besitzt (Li et al., 1997). Sowohl Aktivin, Inhibin als auch Follistatin können in den Sertoli-Zellen von Ratten gebildet werden, Aktivin und Follistatin jedoch auch in den Keimzellen. So konnte gezeigt werden, dass die Sertoli-Zellen durch diese Einfluss auf die Keimzellreifung und -entwicklung haben aber auch wichtig für die Sertoli-Zellentwicklung sind (Meehan et al., 2000).

Bei Schweinen kann Inhibin, vor allem die α -Untereinheit bis hin zur Pubertät überwiegend in den Sertoli-Zellen, aber auch schwach in Leydig-Zellen nachgewiesen werden. Zu einem späteren Zeitpunkt auch in elongierten Spermatozyten (Ohnuma et al., 2007). Neben dem Einfluss auf FSH sollen Inhibin, Aktivin und Follistatin jeweils auch eine Wirkung auf die Testosteron-Synthese in den Leydig-Zellen, die Proliferation von Keimzellen und die Entwicklung vom Rattenhoden haben (De Kretser et al., 2001).

Nach der Geburt und noch einmal im Alter von ca. 4 Monaten und somit kurz vor der Pubertät, bewirkt die Ausschüttung von FSH beim Schwein eine Proliferation von immaturren Sertoli-Zellen (França et al., 2000). Da jede Sertoli-Zelle eine bestimmte Anzahl von Keimzellen unterstützt, bestimmt dies den Spermatidenoutput beim erwachsenen Schwein (Orth et al., 1988; França et al., 2000). Mit Beginn der Pubertät stoppt die Sertoli-Zell-Proliferation und es erfolgt deren Reifung (Sharpe et al., 2003). Die Reifung soll unter anderem unter dem Einfluss von Schilddrüsenhormonen stehen (De Franca et al., 1995). Vor allem jedoch soll die T3-abhängige Ausbildung der Androgen-Rezeptoren und T3 sowie die FSH-abhängige Suppression des AMH (Anti-Müller-Hormon) der vorherrschende Faktor für die Sertoli-Zellreifung sein (Arambepola, N. et al., 1998; Arambepola, N.K. et al., 1998).

FSH wirkt jedoch nicht nur an Sertoli-Zellen, sondern auch an runden Keimzellen (Baccetti et al., 1998). Dort konnte es an der Plasmamembran und in endozytotischen Vesikeln nachgewiesen werden. FSH bindet an den FSH-Rezeptor und entfaltet dort seine Wirkung. Die m-RNS des FSH-Rezeptors konnte in der gleichen Studie von Baccetti et al. (1998) im Zytoplasma der oben genannten Zellen gefunden werden, so dass eine Aufnahme von FSH durch Endozytose in das Zytoplasma vermutet wird. Die Expression des FSH-Rezeptors ist abhängig von FSH (Maguire et al., 1997). Eine FSH-Zugabe führt zu einer reduzierten Expression der m-RNS des FSH-Rezeptors, während hypophysectomierte Tiere und damit FSH-negative oder FSH-arme Tiere eine erhöhte Expression der m-RNS des FSH-Rezeptors zeigen. Die Zugabe von Testosteron hat keine Auswirkung auf die Expression des FSH-Rezeptors (Maguire et al., 1997).

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation hypogonadaler Mäuse mit FSH zu einer gesteigerten Proliferation und Reifung von Sertoli- und Keimzellen bis hin zu runden Spermatiden führt. Jedoch kommt es zu einem Arrest der Spermatogenese auf Höhe der elongierten Spermatiden (Haywood et al., 2003). O' Donnell et al. (1996) beschreiben ebenfalls, dass in Abwesenheit von Testosteron runde Spermatiden anwesend, jedoch keine elongierten Spermatiden aufzufinden sind. Hierbei vermuten sie ein Lösen der runden Spermatiden aus dem Tubulusepithel.

Eine gegensätzliche Behandlung von hypogonadalen Mäusen mit Testosteron führt zu einer gesteigerten Meiose mit erhöhten Zahlen an Spermatozyten sowie dem Ausbilden von elongierten Spermatiden. In der gleichen Studie kann eine Anwendung von FSH und Testosteron in Kombination eine synergistische Auswirkung auf die Keimzellreifung mit erhöhten Spermatidenzahlen verdeutlicht werden.

Ähnliche Ergebnisse liefert auch die Studie von Singh und Handelsman (1996). In deren Studie wurde hypogonadalen Mäusen entweder FSH alleine oder in Kombination mit Testosteron appliziert. FSH-Administration alleine hatte vor allem Auswirkungen auf die Proliferation von Spermatogonien und Spermatozyten. Erst mit der Zugabe von Testosteron war eine Proliferation der Sertoli-Zellen und eine vollständige Spermatogenese möglich. Da jedoch die alleinige Gabe von Testosteron zu ähnlichen Ergebnissen führte, schlagen die Autoren eine Bedeutung für FSH und Testosteron bei der Initiation der Spermatogenese, für Testosteron jedoch weiterhin die Aufgabe der Beendigung der Spermatogenese vor.

Es ist nennenswert, dass andere Autoren beschreiben, dass weder FSH, LH noch Testosteron alleine oder in Kombination eine funktionelle Spermatogenese bei hypophysektomierten Ratten aufrecht erhalten können und somit weitere Hormone und Faktoren für eine physiologische Spermatogenese nötig sind (Clermont und Harvey, 1967; Steinberger, 1971).

Gegensätzliches beweisen Oduwale et al. (2018), wo in Abwesenheit von Testosteron eine intakte Spermatogenese möglich ist, wenn die Aktivität des FSH-Rezeptors gesteigert wird. Es ist auch möglich, dass Mäuse mit einem FSH-Rezeptor-Knockout Fertilität entwickeln, jedoch mit einem verspätetem Eintritt in die Pubertät und geringeren Keimzellzahlen, hauptsächlich die runden und elongierten Spermatiden betreffend (Krishnamurthy et al., 2001). Dies wird vor allem auf die reduzierten Testosteronwerte zurückgeführt. Im Vergleich dazu zeigen Mäuse mit einem FSH-Knockout kleinere Hoden, jedoch keine veränderten Testosteronwerte, sowie eine reduzierte Motilität der Spermien und Fertilität. Dies weist darauf hin, dass FSH auch wichtig für die Kommunikation zwischen Sertoli- und Leydig-Zellen ist (Kumar et al., 1997).

Dies zeigen auch die Ergebnisse der Studie von Abel et al. (2009). Hier wurden die Transkriptproteine nach FSH-Applikation in hypogonadalen Mäusen gemessen. Unter anderem wurde eine erhöhte Aktivität der Transkripte in Sertoli-Zellen gemessen, wobei sich das Transkript für den FSH-Rezeptor wie bereits oben erwähnt reduzierte. Aber auch Leydig-Zellen zeigen eine erhöhte Transkriptrate für die Komponenten der Steroidbiosynthese.

Zusätzlich soll FSH die Formation der Tight-junctions, Adherens-junctions und ektoplastischen Spezialisierungen regulieren (Sluka et al., 2006; Abel et al., 2009).

2.1.3. Steroidbiosynthese

Zwischen 5 und 8 Monaten nach der Geburt setzt beim Eber die Geschlechtsreife ein. In dieser Zeit befindet sich die Synthese der Steroidhormone in den Leydig-Zellen auf dem Höhepunkt (Robic et al., 2014). Die Ausschüttung von LH erfolgt ebenso wie bei GnRH pulsatil. Seine Wirkung entfaltet LH an den Leydig-Zellen im intertubulären Bereich des Hodens, indem es an LH-Rezeptoren bindet. Dort bewirkt es die Synthese von Androgenen, 16-Androstenonen und auch Östrogenen (Robic et al., 2014). Zu einem gewissen Anteil können die Steroidhormone auch in der Nebennierenrinde synthetisiert werden (Bun-Ichi, 1973; Huhtaniemi, 1977).

Die Steroidhormone bauen auf dem Grundgerüst des Cholesterols auf. Die Vorstufen von Testosteron (Cholesteryl-Ester) werden in den Leydig-Zellen in Form von kleinen Lipidtröpfchen gelagert und nach deren Autophagie kann Testosteron aus freiem Cholesterol synthetisiert werden (Neaves, 1978; Ma et al., 2018).

Das Cholesterol wird in den Mitochondrien mit Hilfe der Cytochrom-P450 Enzyme zu Pregnonolon umgewandelt und im endoplasmatischen Retikulum der Leydig-Zellen über Zwischenstufen zu Steroidhormonen metabolisiert (Van Der Molen et al., 1979; Miller und Auchus, 2011).

Die Metabolisierung des Cholesterols zu Steroidhormonen kann auf zwei Wegen geschehen:

1. Pregnenolon (C21-Progestagen) kann über 17α -Hydroxypregnenolon (C21-Progestagen) zu Dehydroepiandrosteron (C19-Androgen), Androstenediol (C19-Androgen) und schließlich zu Testosteron (C19-Androgen) metabolisiert werden.
2. Pregnenolon wird über Progesteron (C21-Progestagen) zu 17α -Hydroxyprogesteron (C21-Progestagen) zu Androstenedion (C19-Androgen) in Testosteron metabolisiert.

Aus Testosteron können im Anschluss durch eine Reduktionsreaktion 5α -Dihydrotestosteron (C19, Androgen) oder durch Aromatasereaktion 17β -Estradiol (C18, Estrogene) gebildet werden. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, aus Androstenedion durch Aromatasereaktion Estron (C18, Estrogene) zu metabolisieren, welches ebenfalls zu 17β -Estradiol umgewandelt werden kann (Eik-Nes, 1969; Miller und Auchus, 2011; Engelhardt, 2015). Die meisten der Steroide des Ebers sind inaktiv in ihrer konjugierten Form mit Sulfat- oder Glucuronidgruppenbindung zu finden (Raeside et al., 1992). Durch deren negative Polarität ist keine hormonelle Aktivität mehr möglich, die Metabolite werden wasserlöslich und können über die Nieren ausgeschieden werden (Karlson et al., 1994).

Die Androgene sind verantwortlich für die männlichen Geschlechtsmerkmale. Dazu gehören unter anderem die Ausbildung und Funktion des männlichen Geschlechtsapparates, das maskuline Verhalten, die Libido und der Körperbau (Engelhardt, 2015). Zu den wichtigsten Androgenen gehören Testosteron und Dihydrotestosteron (Kashiwagi et al., 2005).

2.1.4. LH-Aktivität

Nachdem das LH an den LH-Rezeptor gebunden hat, bewirkt es in den Leydig-Zellen die Testosteron-Synthese. Dies kann an Mäusen gezeigt werden, welchen der LH-Rezeptor fehlt und die nur eine geringe Menge an Testosteron aufweisen (Mendis-Handagama, 1997; Zhang et al., 2001). Durch Diffusion verlässt Testosteron die Leydig-Zellen und gelangt von dort aus in das Blut, wo es bei Ratten am ABP gebunden oder bei den anderen Säugern am SHBG, einem Carrier-Protein, gebunden ist (Hammes et al., 2005).

Die beiden Proteine kommen jedoch laut einigen Autoren nicht im Hoden vom Schwein vor (Cook et al., 1977; Jegou und Le Gac-Jegou, 1978).

Interessant ist auch, dass in Keimzellen von Ratten Testosteron synthetisiert werden kann, auch wenn Leydig-Zellen und Sertoli-Zellen abwesend sind, so dass davon ausgegangen werden muss, dass primäre Spermatozyten zu einem gewissen Grad dazu in der Lage sind, Testosteron zu synthetisieren (Salhanick und Turner, 1979).

In den Tubuli seminiferi contorti entfaltet Testosteron seine Wirkung am Androgen-Rezeptor, wo es Steroid-responsive Gene aktiviert (Hammes et al., 2005). Der Androgen-Rezeptor ist wie auch der Estrogen-Rezeptor ein nukleärer Rezeptor (Hammes und Levin, 2007). Diese sind Liganden-abhängig und erhalten durch das Binden eines Liganden eine Konformationsänderung. Anders als andere nukleäre Rezeptoren befindet sich der Androgen-Rezeptor als inaktive Form im Zytoplasma an „heat shock“-Proteine gebunden. Erst wenn Androgene binden, löst er sich von dem „heat shock“-Proteinkomplex und erfährt eine Translokation in den Nukleus (Gelman, 2002; Germain et al., 2006; Dagar et al., 2019). Androgen Rezeptoren werden in Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen und peritubulären Myoidzellen nachgewiesen (Kimura et al., 1993; Bremner et al., 1994; Vornberger et al., 1994).

Obwohl viele Autoren beschreiben, dass Keimzellen keinen Androgen-Rezeptor exprimieren, gibt es Autoren, die diesen in Keimzellen nachgewiesen haben (Zhou et al., 1996; Ramesh et al., 2007). In Schweinehoden konnte der Androgen-Rezeptor in Leydig-Zellen, peritubulären Myoidzellen, Sertoli-Zellen, aber auch in den Keimzellen von präpubertären Tieren nachgewiesen werden (Ramesh et al., 2007).

Mäuse mit einer fehlenden LH-Aktivität zeigen Infertilität, reduzierte Testosteronwerte, geringe Hodengewichte, kleine Tubuli seminiferi contorti sowie eine gestörte Spermatogenese, die auf Höhe von runden Spermatisden arretiert (Kumar, 2007). Ein LHR-Knockout in Mäusen führt zu einem normalen Phänotyp, aber auf Grund der verminderten Testosteronsynthese auch dazu, dass die Meiose auf Höhe von runden Spermatisden arretiert und sich keine elongierten Spermatisden ausbilden. Somit sind diese Tiere infertil. Zusätzlich zeigen die Tiere ein Vorhandensein von fetalen Leydig-Zellen.

Da durch eine Substitution von Testosteron nicht die Leydig-Zell-Zahlen von Wildtypen erreicht werden können, und die Tiere nur zum Teil Fertilität wiedererlangen, geht man auch davon aus, dass die LH-Aktivität eine wichtige Komponente bei der Differenzierung von fetalen zu adulten Leydig-Zellen ist (Lei et al., 2004; Pakarainen et al., 2005). Ähnliches beschreiben auch Zhang et al. (2004), die der LH-Signalwirkung an Leydig-Zellen eine entscheidende Rolle bei der endokrinen Regulierung von adulten Leydig-Zellen zuschreiben.

Bei Schweinen konnte gezeigt werden, dass eine Androgen-Rezeptor-Inaktivierung durch Flutamid zu einer gesteigerten Sertoli-Zellproliferation in neonatalen Tieren führt. Somit kann hier die hemmende Funktion des Androgens auf die Sertoli-Zell-Proliferation gezeigt werden (Legacki et al., 2015).

Untersuchungen eines AR-Knockouts in verschiedenen Zellen brachte folgende Ergebnisse: Ein allgemeiner AR-Knockout führt zur Veränderung des Phänotyps, mit einer Verlagerung der Hoden in das Abdomen und einer gestörten Keimzellreifung sowie reduzierten Sertoli-Zellzahlen (De Gendt et al., 2004). Jedoch wird auch beschrieben, dass ein allgemeiner Androgen-Rezeptor-Knockout in Mäusen zu einer kaum gestörten Spermatogenese mit Fertilität führt (Tsai et al., 2006). Im Gegensatz dazu zeigen Tiere mit spezifischem Sertoli-Zell-AR-Knockout zwar einen Hodenabstieg und normale Sertoli-Zellzahlen, jedoch eine gestörte Keimzellzahl auf Grund von erhöhter Apoptose und fehlender Entwicklung von Spermatozyten, sowie runden und elongierten Spermatisden (De Gendt et al., 2004). Die Autoren gehen davon aus, dass die autokrinen Mechanismen von Androgenen in den Sertoli-Zellen essentiell für die Entwicklung reifer Keimzellstadien sind. Holdcraft und Braun (2004) beschreiben eine Störung der Spermatisdenreifung bei der Entwicklung von runden zu elongierten Spermatisden sowie der Spermatisdendifferenzierung kurz vor der Spermiation.

Aus diesem Grund gehen sie davon aus, dass sowohl die Adhäsion der Spermatisden am Keimepithel, als auch die Freisetzung der Spermatisden in das Lumen auf Grund des Androgen-Rezeptor-Knockouts gestört sind (Holdcraft und Braun, 2004).

Zusätzlich beschreiben Willems et al. (2010) das Vorhandensein von immaturren Sertoli-Zellen und einer gestörten Integrität der Blut-Hoden-Schranke bei einem Androgen-Rezeptor-Knockout an Sertoli-Zellen, vermutlich auf Grund fehlender Integrität der Tight-junction-Proteine an den ZO-Proteinen.

Im Vergleich dazu führt ein Knockout des Leydig-Zell-AR zu einem Arrest der Spermatogenese auf Höhe der runden Spermatiden (Tsai et al., 2006). Ein Knockout des Keimzell-AR führt zu fertilen Mäusen, die kaum Unterschiede in den Testosteronwerten im Vergleich zu Kontrollgruppen haben und auch Mausewürfe hervorbringen (Tsai et al., 2006).

In der Studie von Welsh et al. (2009) bewirkt ein Androgen-Rezeptor-Knockout an peritubulären Myoidzellen eine gestörte Spermatogenese mit normaler Ausreifung von Sertoli-Zellen, jedoch reduzierte Keimzellzahlen und Infertilität. Dies wird darauf zurückgeführt, dass auf Grund der fehlenden Androgen-Aktivität die Synthese der Gene von Sertoli-Zellen gestört ist. Ebenso wie die von diesen Zellen produzierte Flüssigkeit für die Tubuli seminiferi contorti. Hierbei wird eine defekte Basalmembran auf Grund von losen Sertoli-Zellen und Keimzellen im Lumen vermutet. In der Studie von O' Hara et al. (2015) wird beschrieben, dass die AR-Aktivität für die Reifung und Regulation der Steroidsynthese in adulten Leydig-Zellen notwendig ist. Sie scheint jedoch nicht essentiell für die Leydig-Zellzahlen zu sein, da diese sich nicht von Kontrolltieren unterscheiden.

Zusätzlich soll die AR-Aktivität in Leydig-Zellen die Degeneration der Keimzellen sowie der Leydig-Zellen verhindern. So scheint die AR-Aktivität wichtig für den Erhalt dieser Zellen sein. Tiere mit einem Leydig-Zell-AR-Knockout zeigen in ihrer Studie hypertrophierte Leydig-Zellen mit großem Zytoplasma und fokale Herde mit Degeneration im Keimepithel. Die Spermatogenese ist jedoch bis zur Spermienreifung intakt. Interessanter Weise führt der Leydig-Zell-AR-Knockout zwar zur Apoptose von adulten Leydig-Zellen, jedoch sind die LH- und Testosteronwerte nicht verändert. Der Estrogen-Rezeptor α hingegen ist erhöht. Vermutet wird hierbei eine fehlende Signalwirkung auf die Estrogene in Folge des Leydig-Zell-AR-Knockouts (O' Hara et al., 2015).

2.1.5. Estrogene

Im Hoden des Ebers werden hohe Mengen an Estrogenen produziert, die anschließend sowohl im Seminal- als auch im Blutplasma zu finden sind (Claus und Hoffmann, 1980; Zduńczyk et al., 2011). Die Estrogene liegen überwiegend in der Form der 17 β - Estradiole und der Estrone vor, von denen vor allem das konjugierte Estronsulfat (inaktive Form) und das unkonjugierte Estron in hoher Konzentration nachweisbar sind (Claus et al., 1985; Hoffmann et al., 2010; Zduńczyk et al., 2011). Die höchste Konzentration an Estrogenen kann in den testikulären Venen gefunden werden, während die Konzentrationen im Seminalplasma und in der Peripherie keine Unterschiede zeigen (Zduńczyk et al., 2011).

Obwohl man davon ausgeht, dass überwiegend die Leydig-Zellen Syntheseort für Estrogene sind, gibt es inzwischen neuere Erkenntnisse, dass auch Keimzellen und Sertoli-Zellen dazu in der Lage sind (Carreau et al., 2007). Estrogene, vor allem Estradiol, binden im Hoden an den Estrogen-Rezeptoren. Hierbei werden der Estrogen-Rezeptor α und der Estrogen-Rezeptor β unterschieden (Sierens et al., 2005). Mutembei et al. (2005) postulieren für die Estrogene eine wichtige Funktion für den Beginn und Erhalt der Spermatogenese. Sie fanden beim Eber Estrogen-Rezeptoren (ER α und ER β) nicht nur in den Sertoli- und Leydig-Zellen, sondern auch in den Keimzellen. Nur in elongierten Spermatisden konnten diese nicht nachgewiesen werden

Im Gegensatz dazu konnten Wagner et al. (2006) den Estrogen-Rezeptor α nur in Spermatisden und vereinzelt weiter differenzierten Keimzellen nachweisen. Lekhkota et al. (2006) wiesen den ER α ebenso in Spermatisden und Spermatisden nach. Rago et al. (2004) fand den ER α nur bei murenen Schweinen in den Leydig-Zellen, Spermatisden und Spermatisden, jedoch nicht in Zellen immaturer Schweine.

In der Studie von Rago et al. (2004) konnte der ER β bei immaturen Schweinen in Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen, Spermatisden und peritubulären Myoidzellen nachgewiesen werden, bei murenen Ebern nur in Spermatisden, Spermatisden und peritubulären Myoidzellen. In einer anderen Studie wurde der ER β auch in Leydig-Zellen und Sertoli-Zellen gefunden (Srisuwatanasagul et al., 2018).

Die großen Unterschiede, vor allem im Nachweis des ER β , lassen auf eine wichtige Funktion bei der Spermatogenese schließen. Jedoch ist bisher die genaue Funktion der Estrogene bei der Spermatogenese unklar. Unter anderem wird vermutet, dass ER β eine wichtige Funktion bei der Apoptose während der Spermatogenese hat, da apoptotische Spermatozyten eine übersteigerte Expression des ER β zeigen (Selva et al., 2004). Jedoch sollte auch erwähnt werden, dass die Verwendung von unterschiedlichen ER β -Antikörpern unterschiedliche Ergebnisse in den Nachweisen liefern können (Selva et al., 2004). Obwohl Estrogen-Rezeptoren in Keimzellen zu finden sind, konnte eine Aromataseaktivität beim Eber nur in den Leydig-Zellen festgestellt werden (Carreau et al., 2001; Fraczek et al., 2001). Dies lässt darauf schließen, dass Estrogene beim Schwein überwiegend in den Leydig-Zellen gebildet werden können (Weng et al., 2005).

Im Menschen und in Nichtprimaten ist der Estrogen-Rezeptor α nicht nachweisbar, der Estrogen-Rezeptor β ist in Leydig-Zellen, peritubulären Myoidzellen, Sertoli-Zellen und Keimzellen zu finden (Saunders et al., 2001). Andere Ergebnisse wurden von Pentikäinen et al. (2000) gefunden. Hier wurden der Estrogen-Rezeptor α und β in Keimzellen wie den pachytänen Spermatozyten und auch in elongierten Spermatischen gefunden. Weiterhin konnten sie zeigen, dass vor allem 17- β -Estradiol und Dihydrotestosteron eine wichtige Rolle bei der Verhinderung von Apoptose spielen und somit einen wichtigen Überlebensfaktor für Keimzellen darstellen.

Ein ER-Knockout in Mäusen führt an den einzelnen Rezeptoren zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während ein ER- α -Knockout zu geringen Hodengewichten, gestörter Spermproduktion und Infertilität führt, zeigen ER- β -Knockout-Tiere Fertilität. Ein gleichzeitiger Knockout beider Rezeptoren hat ähnliche Wirkungen wie der ER- α -Knockout (Walker und Korach, 2004).

Lee et al. (2009) beschreiben eine verfrühte Lumenbildung in den Tubuli seminiferi contorti, mit geringer Keimepithelhöhe an Mäusen mit einem ER- α -Knockout. In der Studie von Mahato et al. (2000), wurden ER- α -Knockout-Mäusen Keimzellen entnommen und in Wildtyp-Mäuse ohne Keimzellen eingesetzt. Da diese Mäuse Nachkommen zeugen, zeigen Mahato et al. (2000) damit, dass der Estrogen-Rezeptor α in Keimzellen nicht notwendig für Fertilität ist. Sie vermuten, dass die Infertilität auf Grund einer gestörten Estrogenwirkung auf die somatischen Zellen besteht.

Weitere Studien beschreiben eine Dilatation der Ductuli efferentes, auf Grund eines ER- α -Knockouts, und eine damit fehlende Reabsorption der Ductulus-Flüssigkeit. Dadurch ist die Fähigkeit, Spermien zu konzentrieren, vermindert, was als hauptsächliche Ursache für Infertilität gesehen wird (Oliveira et al., 2001; Cho et al., 2003). Präpubertäre Eber, welche mit einem Estrogen-Rezeptor-Antagonisten behandelt werden, zeigen eine erhöhte Anzahl von Sertoli-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das lässt darauf schließen, dass die Estrogen-Rezeptor-Aktivität eine wichtige Komponente bei der Regulation der Sertoli-Zellproliferation hat (Berger et al., 2013). Dies konnte auch in der Studie von At-Taras et al. (2006) bewiesen werden, jedoch wurde hier vermutet, dass Estrogene auch eine Rolle bei der Reifung von Sertoli-Zellen spielen. Denn Schweine, welche mit dem Aromatasehemmer Letrozol behandelt wurden zeigen eine verspätete Pubertät mit gesteigerter Proliferation der Sertoli-Zellen und der Ausreifung von Leydig-Zellen. Anfangs noch limitiert, resultiert dies später in größeren Hoden und erhöhten Spermatidenzahlen. Während die Behandlung mit dem Aromatasehemmer keine Unterschiede in der Expression des Estrogen-Rezeptors β im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt, weist der Estrogen-Rezeptor α eine verstärkte Expression auf (At-Taras et al., 2006).

Weitere Funktionen der Estrogene sind unter anderem der Einfluss auf die Libido des Ebers und auf die Sekretionsfähigkeit der akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Joshi und Raeside, 1973). Sie sind ebenfalls im Ejakulat des Ebers zu finden. Claus et al. (1985) vermuten, dass Spermien eine Transportfunktion für Estrogene darstellen, da rund mehr als die Hälfte der Estrogene an Spermien gebunden sind. Nach der Ejakulation im Uterus werden durch Estrogene Prostaglandine im Endometrium des Uterus freigesetzt, wodurch die Uterusaktivität steigt und der Spermientransport zur Eizelle erleichtert wird (Claus, 1990; Langendijk et al., 2005).

3. Tight- und Gap-junction-Proteine sowie deren Regulation

3.1. Tight-junction-Proteine

Tight-junctions bilden in Epithelien und Endothelien eine dichte Barriere (Furuse et al., 1998). Im Hoden liegen sie „gürtelartig“ nahe den ektoplasmatischen Spezialisierungen zwischen den Sertoli-Zellen der Tubuli seminiferi contorti. Durch engen Kontakt der äußeren Zellmembranen verschließen sie den interzellulären Spalt zwischen angrenzenden Sertoli-Zellen. Dies ist jedoch kein starrer Zustand, sondern ein dynamisches Geschehen durch Um-, Ab- und Neuordnung der Tight-junctions (Chalmers und Whitley, 2012). Zu den wichtigsten Tight-junctions gehören die zwei integralen Transmembran-Proteine Occludin und Claudin (Dym und Fawcett, 1970; Mitic et al., 2000; Tsukita et al., 2001; Cheng und Mruk, 2012) sowie die nebenbei erwähnten Junctional-Adhesion-Moleküle (JAM), der Coxsackievirus-Rezeptor und der Adenovirus-Rezeptor (Martín-Padura et al., 1998; Heiskala et al., 2001; Sollerbrant et al., 2003).

Die Claudine und Occludine besitzen eine sehr ähnliche Struktur, mit zwei extrazellulären Schleifen, vier transmembranen Domänen, sowie einer intrazytoplasmatischen Schleife mit N- und C-Endigungen (Furuse et al., 1993; Suzuki et al., 2014). Diese zeigen jedoch keine Sequenzähnlichkeit auf (Furuse et al., 1998).

Die JAMs sind ebenfalls transmembrane Proteine und gehören zu der Familie der Immunglobulin-Superfamilie (Martín-Padura et al., 1998). Sie seien hier nur am Rande erwähnt.

Unterhalb der Zelloberfläche, stehen die Tight-junctions direkt in Kontakt mit den Zonula-occludens, ZO-1, ZO-2 und ZO-3 (Abbildung 6), welche zur Familie der MAGUK-Proteine gehören (Itoh et al., 1999a; Itoh et al., 1999b). In direktem Kontakt stehen die Tight-junction-Proteine mit dem ZO-1. ZO-2 und ZO-3 sind an ZO-1 gebunden. Man geht davon aus, dass diese zwei separate Komplexe bilden, da ZO-2 und ZO-3 keine Verbindung zeigen (Stevenson et al., 1986; Gumbiner et al., 1991; Haskins et al., 1998; Wittchen et al., 1999).

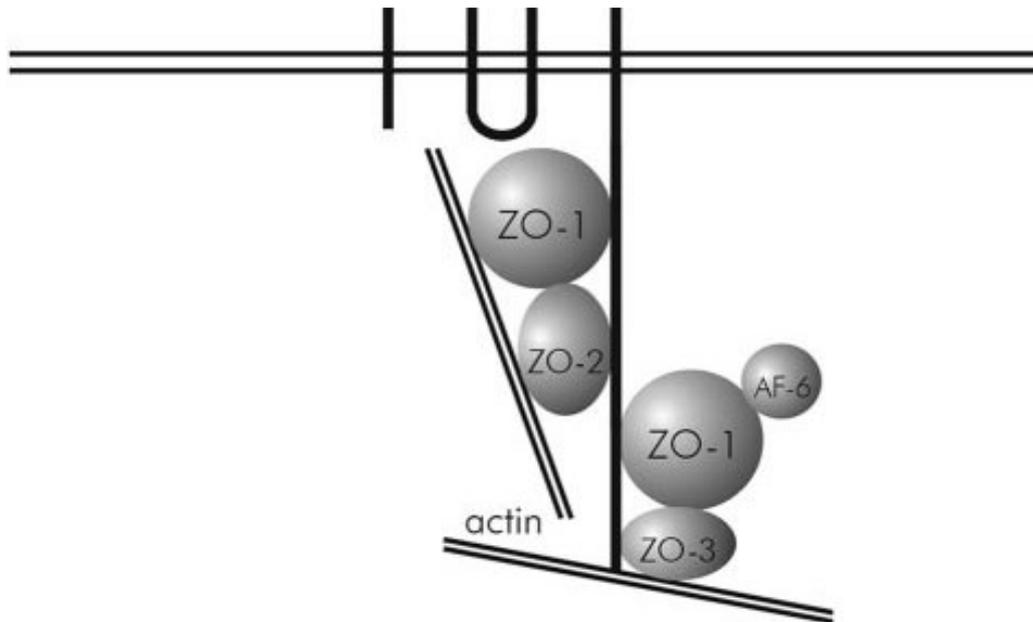


Abbildung 6: Aufbau der Zonula occludens (Wittchen et al., 1999).

Unter der Plasmamembran bilden die Tight-junctions mit den ZO den so genannten Protein-Plaques, zusammen mit anderen Protein-Komponenten wie 7H6 und Cingulin (Zhong et al., 1993; Bazzoni et al., 2000; Heiskala et al., 2001). Durch die ZO werden die Tight-junctions indirekt mit den intrazellulären Aktin-Filamenten des Zytoskeletts verbunden (Fanning et al., 1998; Mitic und Anderson, 1998; Wittchen et al., 1999; Bazzoni et al., 2000). Hierbei soll vor allem ZO-1 über die N-Endigung mit dem Tight-junction-Protein Occludin und ZO-2 in Kontakt stehen und die C-Endigung mit dem Aktin-Zytoskelett in Verbindung stehen (Fanning et al., 1998). Diese Verankerung dient vor allem der Stabilität der Tight-junctions und einer Permeabilität der Blut-Hoden-Schranke (Fanning et al., 2002). Nebenbei soll das Occludin jedoch auch dazu in der Lage sein, eine direkte Verbindung zu den Aktinfilamenten aufzunehmen (Wittchen et al., 1999).

Zwischen den Tight-junction-Proteinen sind nicht nur homologe Verbindungen möglich, sondern auch heterologe Verbindungen zwischen Occludinen, Claudinen und JAM-Proteinen (Nusrat et al., 2005). Diese Verbindungen der Blut-Hoden-Schranke stellen bei weitem kein starres Gebilde dar, sondern sind ein dynamisches Konstrukt, welches sich durch Ab-, Um- und Neubau bei gleichzeitigem Beibehalten der Permeabilität ständig erneuert (Chalmers und Whitley, 2012).

Eine entscheidende Rolle spielt hierbei die Endozytose der Tight-junction-Proteine, welche von der Plasmamembran aus in das Zytoplasma endozytiert werden. Dort werden sie dann entweder wiederverwertet und in der Plasmamembran verankert oder durch Lysosomen phagozytiert (Matsuda et al., 2004; Chalmers und Whitley, 2012).

Für die integrale Funktion der Blut-Hoden-Schranke sind derzeit Claudin-3, -5 und -11 sowie Occludin die wichtigsten und bekanntesten (Morrow et al., 2010).

3.1.1. Claudine

Hinsichtlich der Claudine, welche zu den Tight-junction-Proteinen gezählt werden, können 24 verschiedene Proteinformen unterschieden werden (Mruk und Cheng, 2015). Laut einer neueren Studie können sogar 27 verschiedene Claudine im Menschen gefunden werden (Mineta et al., 2011).

Die verschiedenen Claudine können außer im Hoden, auch in den Epithelien, unter anderem in der Haut, Lunge, Niere, Gehirn, Darm und weiteren Organen sowie zum Teil in Tumoren gefunden werden (Heiskala et al., 2001; Markov et al., 2015).

Die wichtigste Bedeutung in Bezug auf die Blut-Hoden-Schranke besitzen laut Komljenovic et al. (2009) derzeit Claudin-3 und Claudin-11. Claudin-11 zeigt in jungen Mäusen eine zur Basalmembran parallel ausgerichtete Orientierung, wobei es die basalen Spermatogonien bedeckt. Während der Proliferation von Spermatogonien sowie des Lösens von präleptotänen Spermatozyten von der Basalmembran sind die Claudin-11-Formationen senkrecht zur Basalmembran ausgerichtet (Komljenovic et al., 2009). Nach Formation neuer basaler Tight-junctions können die reorganisierten und differenzierten Zellen in eine höhere und tiefere Schicht unterteilt werden. Die Autoren konnten ebenso zeigen, dass sich die zweite Claudin-11-Formation, welche sich luminal befindet und parallel zur Basalmembran orientiert ist, bei der Transformation von leptotänen und zygotänen Spermatozyten öffnet und somit eine Tor-Funktion einnimmt. Damit bestätigen sie das von Russell postulierte Intermediärkompartiment (Russell, 1977).

Da in dieser Dissertation der Schwerpunkt auf der Untersuchung von Claudin-3 lag, wird auch nur auf dieses im Speziellen eingegangen.

3.1.1.1. Claudin-3

Eine funktionierende Blut-Hoden-Schranke bildet sich während der Pubertät, bei Einsetzen der Meiose bzw. wenn Spermatozyten vorhanden sind (Morales et al., 2007; Li et al., 2018). Das Claudin-3-Protein ist ein Bestandteil der Blut-Hoden-Schranke und wird zu den Tight-junction-Proteinen gezählt.

Bisher konnte Claudin-3 im Hoden von Mäusen und Hamstern, jedoch nicht im Hoden von Ratten und Menschen nachgewiesen werden (Tu'uhevaha et al., 2007; Tarulli et al., 2008; Stammeler et al., 2016; Hollenbach et al., 2018). Nach derzeitiger Erkenntnis gibt es noch keine Daten in Bezug auf die Claudin-3-Expression im Hoden von Schweinen.

In den Tubuli seminiferi contorti befindet sich Claudin-3 „gürtelartig“ zwischen angrenzenden Sertoli-Zellen, auf Höhe der Tight-junction-Formationen nahe der Basalmembran (Meng et al., 2005). Im Gegensatz zu den Tight-junction-Proteinen Occludin und Claudin-11, welche auch in späten Stadien der Spermatogenese vorhanden sind, lässt sich Claudin-3 nur in den frühen Stadien nachweisen. Es soll die essentielle Aufgabe haben, eine neue Formation der Blut-Hoden-Schranke zwischen angrenzenden Sertoli-Zellen zu bilden (Meng et al., 2005). Dies steht auch in Zusammenhang mit der Synthese von Testosteron, welches an den Androgen-Rezeptor der Sertoli-Zellen bindet und die Expression von Claudin-3 reguliert (Meng et al., 2005).

Claudin-3 ist jedoch nicht nur an Sertoli-Zellen zu finden, sondern auch an präleptotänen und leptotänen Spermatozyten (Li et al., 2018). Zusätzlich hat Claudin-3 eine essentielle Rolle bei der Migration der Keimzellen. Komljenovic et al. (2009) zeigen in ihrer Studie, dass Claudin-3 an zwei verschiedenen Stellen im Keimepithel vorkommen kann, nämlich basal und luminal. Es überbrückt die auf der Basalmembran liegenden präleptotenen Spermatozyten „gürtelartig“. Nach der Translokation der präleptotenen Spermatozyten in das intermediäre Kompartiment werden diese durch adluminalen und neu geformten Tight-junctions „versiegelt“ (Komljenovic et al., 2009). Zu einem späteren Zeitpunkt ist nur noch die basale Tight-junction-Barriere von Claudin-3 nachzuweisen, welche in weiterer Folge nur schwach oder gar nicht mehr nachweisbar ist. Neben der frühen Formation der Blut-Hoden-Schranke soll es den Transport von Molekülen vom basalen ins adluminalen Kompartiment des Hodens unterstützen. Ein Fehlen von Claudin-3 führt zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hoden-Schranke (Meng et al., 2005).

In der Studie von Willems et al. (2010) führt ein spezifischer Androgen-Rezeptor-Knockout an Sertoli-Zellen zu einer reduzierten Expression von Claudin-3 sowie den ZO. Dies gibt Hinweise darauf, dass diese nicht nur androgenabhängig im Hoden exprimiert, sondern auch lokalisiert werden.

Da Claudin-3 nicht nur zwischen benachbarten Sertoli-Zellen, sondern auch an Keimzellen zu finden ist, geht man davon aus, dass die Keimzellen dazu in der Lage sind, die Testosteronproduktion in den Leydig-Zellen anzuregen (Li et al., 2018).

Eine androgenabhängige Claudin-3-Aktivität wird auch in Hoden hypogonadaler Mäuse beschrieben. Dort fehlt das Claudin-3-Protein, welches auch unter FSH-Aktivität nicht nachgewiesen werden kann. Erst mit der Zugabe von Androgen kann Claudin-3 als Tight-junction-Barriere nachgewiesen werden (McCabe et al., 2012).

In der Studie von Tarulli et al. (2008) konnte im Gegensatz dazu gezeigt werden, dass eine natürliche „Short Day“-GnRH-Suppression und eine damit einhergehende Testosteronreduktion bei Hamstern eine apikale Anlagerung von Claudin-3 in Sertoli-Zellen bedingt. Eine FSH-Substitution bei diesen Tieren, führt anfangs zu einer Verlagerung des Claudin-3-Proteins an den basalen Aspekt von Sertoli-Zellen, die Keimzellen und die Basalmembran umgebend, aber auch mit einer Anreicherung, apikal an neu formatiertem Lumen. Claudin-3 ist nach einigen Tagen in den Tubuli seminiferi contorti mit ausdifferenzierten Keimzellen abwesend. Dies stimmt mit den Aussagen von Meng et al. (2005) und Komljenovic et al. (2009) überein, die für Claudin-3 eine Funktion bei der Neubildung der Blut-Hoden-Schranke sowie dem basalen Verschluss nach Translokation der präleptotänen Spermatozyten von der Basalmembran Richtung adluminal beschreiben.

3.1.2. Occludin

Occludin, ein Tight-junction-Protein, konnte das erste Mal in der Leber von Hühnern als Bestandteil des integralen transmembranen Proteinkomplex von Epithelien und Endothelien gefunden werden (Furuse et al., 1993). Neben dem Hoden und der Leber ist es unter anderem in der Haut, Lunge, im Darm, in der Harnblase und in Endothelien zu finden (Hirase et al., 1997; Pummi et al., 2001; Acharya et al., 2004; Zhang und Guo, 2009; You et al., 2012).

Es ist im Hoden von Mäusen, Ratten, Truthähnen und Hunden jedoch nicht in den Hoden von Menschen und Meerschweinen vorzuweisen (Moroi et al., 1998; Gye, 2004; Stammler et al., 2016; Pardyak et al., 2020).

Ebenso kann Occludin im Hoden von Schweinen gefunden werden, jedoch gibt es hier widersprüchliche Aussagen bezüglich der Aussagekraft des Ergebnisses. In einer Studie wurde Occludin im Hoden von Ebern zwar nachgewiesen, jedoch waren die Ergebnisse nicht eindeutig, weshalb es dazu keine Veröffentlichungen gibt (Hejmej et al., 2012). Im Gegensatz dazu konnte Occludin in der Studie von Zhang et al. (2018) „strangartig“ auf Höhe der Tight-junctions zwischen benachbarten Sertoli-Zellen gefunden werden.

Die Autoren der Studie zeigen auch, dass Occludin nach Hitzebehandlung am Schweinehoden bei 42°C nur schwach in Sertoli-Zellen nachgewiesen werden kann und die Tight-junction-Formation und -Funktion von Occludin durch Temperaturerhöhung möglicherweise gestört wird (Zhang et al., 2018).

Während Occludin vor der Pubertät in den Nagerhoden lateral, zwischen angrenzenden Sertoli-Zellen zu finden ist, so wird es während der Pubertät und mit zunehmendem Alter sowie mit der Ausbildung der But-Hoden-Schranke im basalen Bereich angereichert (Moroi et al., 1998; Cyr et al., 1999). In Hunden ist Occludin auch basal zwischen benachbarten Sertoli-Zellen angelagert. Zusätzlich ist es jedoch auch im Zytoplasma von Sertoli-Zellen zu finden, wodurch ein dynamisches Expressionsmuster in Abhängigkeit von regulatorischen Mechanismen angenommen wird (Gye, 2004).

Im Truthahn wird das so genannte „Yellow Semen Syndrom“ beschrieben. Tiere mit diesem Syndrom zeigen eine perpendikuläre Anordnung von Occludin zur Basalmembran sowie eine reduzierte Expression. Physiologische „White Normal Semen“-Truthähne hingegen, zeigen eine parallele Anordnung von Occludin (Pardyak et al., 2020) zur Basalmembran. Sie vermuten, dass die „Down Regulation“ von Occludin und eine veränderte Anordnung des Occludins zusammen mit Connexin-43 und ZO-1 zu einer gestörten Spermatogenese führt.

Wong et al. (2004) beschreiben in ihrer Studie ebenfalls eine „gürtelartige“ Anordnung von Occludin im basalen Bereich der Sertoli-Zellen auf Höhe der Blut-Hoden-Schranke. Jedoch ist dieses 24h nach einer Behandlung mit Cadmium-Chlorid nicht mehr nachweisbar. In diesem Zusammenhang zeigen die Aktin- und Vimentinfilamente ebenfalls eine Reduktion in der Expression.

Die Cadmium-Chlorid-Gabe führt ebenso zu einem Verlust der Keimzellen, so dass man davon ausgeht, dass die Zelladhäsion zwischen Keimzellen und Sertoli-Zellen gestört wird (Wong et al., 2004). Chung und Cheng (2001) zeigen, dass eine Injektion mit Cadmium-Chlorid in vitro, zu einer Permeabilitätsstörung von Occludin-Verbindungen zwischen Sertoli-Zellen führt, welche durch FSH- und Testosteronzugabe jedoch reversibel ist. Somit wird eine androgenabhängige Komponente zwischen Occludin-Verbindungen und einer intakten Blut-Hoden-Schranke angenommen. Wobei dies weniger auf einer gesteigerten Expression der Occludin-mRNA, als auf eine testosteronabhängige Lokalisation des Occludins an den Zellkontakten beruht (Tu'uhevaha et al., 2007).

Dies wird in Untersuchungen von Yan et al. (2008) bestärkt, wo eine Behandlung von Sertoli-Zellen mit Testosteron zu einer Verlagerung von Occludin an die Zelloberfläche angrenzender Sertoli-Zellen führt.

Im Gegensatz dazu führt eine Behandlung mit dem TGF- β 2 zur Endozytose von Occludin und auch der Adherens-junctions von präleptotänen Spermatozyten mit einer Verlagerung der Junction-Proteine in das Zytosol. Dies soll insbesondere bei der Migration von präleptotenen Spermatozyten vom basalen in das adluminale Kompartiment eine Rolle spielen.

Occludin ist nicht nur testosteronabhängig. Eine FSH-abhängige Occludin-Expression und Lokalisation konnte in folgenden Studien gezeigt werden: Eine Testosteron- und auch FSH-Substitution nach GnRH-Suppression führt zu einem teilweisen Anstieg des Occludins und zur Proliferation von Keimzellen, auch wenn die Blut-Hoden-Schranke noch eine pathologische Permeabilität aufweist (McCabe et al., 2010). In der Studie von Tu'uhevaha et al. (2007) führt weder Testosteron, Estrogen oder FSH zu einer gesteigerten mRNA-Expression von Occludin. Eine Zugabe von FSH während der „short day“-Zeit bei Hamstern führt hingegen zu einer Verlagerung von Occludin. Und zwar von einer starken, ungeordneten Anordnung des Occludins im Sertoli-Zellzytoplasma zu einer Anordnung im basalen und zum Teil auch im apikalen Bereich der Sertoli-Zellen (Tarulli et al., 2008).

Im Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass trotz eines Occludin-Knockouts bei jungen Tieren eine Spermatogenese stattfindet, wobei diese Tiere jedoch keine Würfe hervorbringen. Adulte Tiere hingegen zeigen eine Atrophie des

Hodengewebes mit einem Arrest der Spermatogenese und Sertoli-cell-only Tubuli. Interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass die Tight-junction-Stränge nicht beeinträchtigt waren. Die Autoren vermuten, dass Occludin eher eine Rolle für die Funktion einer intakten Blut-Hoden-Schranke besitzt. Wie dies jedoch genau funktioniert, ist bisher unklar (Saitou et al., 2000). Da Occludin jedoch nicht im menschlichen- oder Meerschwein-Hoden vorkommt, muss es hierfür noch andere regulatorische Mechanismen geben. Denn die Blut-Hoden-Schranke ist hier auch ohne Occludin intakt. Diskutiert wird diesbezüglich entweder ein alternatives integrales Transmembran-Protein oder ein unbekanntes Occludin (Moroi et al., 1998).

3.2. Gap-junction-Proteine

3.2.1. Connexin-43

Connexine, welche zu den Gap-junction-Proteinen gezählt werden, enthalten ähnlich wie die Claudine und Occludine vier transmembrane Domänen mit zwei extrazytoplasmatischen Schleifen sowie intrazytoplasmatische C- und N-Endigungen (Yeager und Gilula, 1992). Derzeit nimmt man an, dass es 20 verschiedene Gap-junction-Proteine im Menschen und 17 in der Ratte gibt (Willecke et al., 2002). Dazu gehören unter anderem Connexin-26, -31, -32, -33, -37 und -43 (Risley et al., 1992; Tan et al., 1996; Mok et al., 1999). Die verschiedenen Connexine können unter anderem in der Haut, in der Brust, in den Nieren, der Leber, im Darm, im Herzen, im Gehirn in Neuronen, in Endothelien und anderen Geweben gefunden werden (Oyamada et al., 2005).

Connexine sind Proteine, welche eine tunnelartige Verbindung basal zwischen den Sertoli-Zellen, aber auch apikal zwischen Sertoli-Zellen (Abbildung 7) und Spermatiden herstellen (Cheng und Mruk, 2012). Dies dient überwiegend dem Austausch von Molekülen durch Diffusion und der Kommunikation zwischen den Zellen. Sechs Connexin-Proteine legen sich in Hexamer-Anordnung zusammen und bilden das Connexon, indem sie einen „Hemi-Tunnel“ von jeder Zellseite ausbilden. Diese können entweder aus den gleichen Connexinen bestehen, dann werden diese als homomer bezeichnet. Bestehen diese aus unterschiedlichen Connexinen, werden sie als heteromer bezeichnet. Zusätzlich kann noch unterschieden werden, ob die beiden „Hemi-Tunnel“ gleich aufgebaut sind und als homotypisch bezeichnet werden oder ob sie aus unterschiedlichen Connexinen

aufgebaut und heterotypisch sind (Hoh et al., 1993; Pointis und Segretain, 2005; Cheng und Mruk, 2012). Mehrere dieser Gap-junction-Tunnel aggregieren in der Plasmamembran und bilden Gap-junction-Plaques (Kumar und Gilula, 1996; Segretain und Falk, 2004). Interessanterweise können zwei Connexon-Halbtunnel, welche zwei Zellen miteinander verbinden, sich nicht mehr separieren, so dass sich der Komplex bestehend aus zwei „Hemi-Tunneln“ nach der Funktion, im Zytoplasma Ringartig zusammen legt und im Anschluss durch Lysosomen und Proteasomen abgebaut wird (Jordan et al., 2001; Segretain und Falk, 2004).

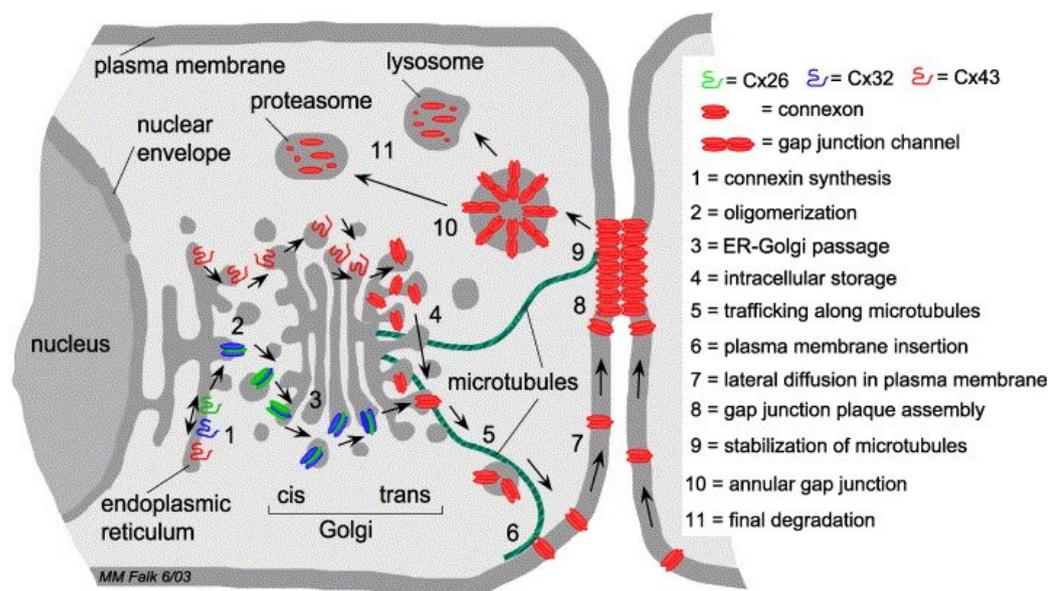


Abbildung 7: Bildung, Wirkungsort und Abbau der Connexine (Segretain und Falk, 2004).

Die Connexin-Proteine werden im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, um dann vom Golgi-Apparat entlang der Mikrotubuli zur Plasmamembran zu gelangen. Dort werden sie peripher an bereits existierenden Gap-junctions als Hemi-Tunnel integriert und verbinden zwei Zellen miteinander, so dass Moleküle passieren können und Zellkommunikation stattfinden kann. Mehrere Gap-junctions bilden an der Plasmamembran den Gap-junction-Plaque, welcher von Mikrotubuli gestützt wird. Vom Zentrum des Gap-junction-Plaques aus, werden die Gap-junctions intrazytoplasmatisch durch Lysosomen und Proteasomen abgebaut (Gaietta et al., 2002; Lauf et al., 2002; Segretain und Falk, 2004).

Von den zahlreichen Connexinen gehört Connexin-43 hierbei zu den vorherrschenden Proteinen. Es ist für die Einleitung und das Aufrechterhalten der Spermatogenese bedeutend (Batias et al., 2000). Lediglich in den Leydig-Zellen ist bisher nur Connexin-43 zu finden (Risley et al., 1992; Varanda und De Carvalho, 1994; Tan et al., 1996). Neben den Leydig-Zellen ist es zwischen Sertoli-Zellen, aber auch zwischen Sertoli- und Keimzellen nachweisbar (Risley et al., 1992; Tan et al., 1996; Batias et al., 2000).

Für Connexin-43 ist ein alters- aber auch ein stadienspezifischer Nachweis beschrieben. So wird Connexin-43 im basalen Bereich des Nagerhodens zwischen angrenzenden Sertoli-Zellen auf Höhe der Tight-junctions beschrieben, aber auch im adluminalen Bereich. Erst mit zunehmendem Alter verlagert sich Connexin-43 lediglich in den basalen Bereich zwischen angrenzenden Sertoli-Zellen. Zusätzlich kann es im Zytoplasma von Spermatogonien und Spermatozyten sowie in Leydig-Zellen gefunden werden (Risley et al., 1992). Dies wird auch in anderen Studien beschrieben (Batias et al., 2000; Decrouy et al., 2004). Pelletier (1995) beschreibt sogar einen Nachweis von Connexin-43 in Abhängigkeit der Spermatozyten-Translokation von basal nach adluminal, wo es je nach Stadium entweder basal, luminal oder beidseits der Spermatozyten auf Höhe der Tight-junctions zu finden ist. In der Studie von Decrouy et al. (2004) wird gezeigt, dass Inter-Sertoli-Verbindungen durch homologe Gap-junctions in Verbindung stehen, während Sertoli- und Keimzellen durch heterologe Gap-junctions kommunizieren.

Sie gehen auch davon aus, dass identische Moleküle gleichzeitig durch die Gap-junctions in unterschiedliche Zellen diffundieren können. Laut Pelletier (1995) ist Connexin-43 in den Leydig-Zellen zu finden, bevor es in den Tubuli seminiferi contorti nachzuweisen ist. In den Leydig-Zellen wird Connexin-43 in der Plasmamembran angrenzender Leydig-Zellen gefunden und steigt mit zunehmendem Alter an (Tan et al., 1996; You et al., 2000).

Für das Schwein ist ein Nachweis von Connexin-43 ebenfalls in angrenzenden Leydig-Zellen beschrieben. Hier insbesondere im Bereich der Plasmamembran (Hejmej et al., 2009). Da dies auch bei neonatalen Ferkeln beschrieben ist, geht man davon aus, dass Connexin-43 eine essentielle Rolle bei der Keimzellreifung einnimmt. (Durlej et al., 2011). Im Menschen kann Connexin-43 luminal von Spermatogonien und basal der angrenzenden Spermatozyten gefunden werden.

Tubuli seminiferi contorti mit einem Arrest der Spermatogenese auf Höhe der Spermatogonien oder mit Sertoli-cell-only-Syndrom sind hingegen immunonegativ für Connexin-43 (Steger, Klaus et al., 1999). Die Autoren gehen davon aus, dass die Connexin-43-Expression hier abhängig von der Sertoli-Zell-Differenzierung ist. In anderen Studien wird zusätzlich beschrieben, dass das Vorhandensein von Keimzellen und Connexin-43 in engem Zusammenhang steht (Batias et al., 2000; Roscoe et al., 2001). In der Studie von Röhrs (2013) kann Connexin-43 basal in den Sertoli-Zellen sowie den Leydig-Zellen von juvenilen Hunden nachgewiesen werden. Hunde, welche mit dem GnRH-Implantat Gonazon® behandelt wurden, zeigen hingegen einen Nachweis von Connexin-43 im adluminalen Bereich der Tubuli seminiferi contorti. Dies weist darauf hin, dass eine Suppression der GnRH-Aktivität eine Funktionsstörung der Blut-Hoden-Schranke mit sich bringt. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass sich die Blut-Hoden-Schranke mit GnRH-Aktivität wieder zurückbildet und zwischen einem basalen und adluminalen Kompartiment unterschieden werden kann.

Da Connexin-43 bis auf wenige Ausnahmen in fast allen Geweben vorkommt (Pointis und Segretain, 2005), führt ein genereller Connexin-43-Knockout an Tieren kurz nach der Geburt zur Letalität. In einer Studie, bei der die Hoden von Connexin-43-Knockout-Mäusen unter die Nierenkapsel transplantiert wurde, fehlen die Keimzellen mit dem Bild eines Sertoli-cell-only-Syndroms. Ebenso kann eine Stimulation der Hoden mit LH keine Veränderung der Androgen-Aktivität hervorbringen, was den Hinweis gibt, dass Connexin keinen Einfluss auf die Androgen-Synthese, jedoch auf die Keimzellreifung und die Spermatogenese an sich hat. (Roscoe et al., 2001).

Ein Connexin-43-Knockout an Sertoli-Zellen, führt zu einem Anstieg der Occludin-Expression (Carette et al., 2010). Dies wird in der Studie von Li et al. (2009) widerlegt, wo ein Connexin-43-Knockout nur an Sertoli-Zellen keine Veränderungen mit sich bringt, während ein Knockout von Connexin-43 und dem Desmosomenprotein Plakophilin-2 (PKP2), eine Lokationsänderung von Occludin und den ZO-1 verursacht.

Histologisch bietet sich bei einem Connexin-43-Knockout an Sertoli-Zellen das Bild, ähnlich eines Sertoli-cell-only-Syndroms, jedoch mit reduzierten Spermatogonien, aber gesteigerten Sertoli-Zellzahlen (Brehm et al., 2007).

Auch hier wird wieder deutlich, dass Connexin-43 essentiell für die Initiation und den Ablauf einer normalen Spermatogenese ist. Und dies insbesondere in Hinblick auf die Versorgung der Keimzellen für die Mitose durch die Sertoli-Zellen sowie in Hinblick auf die Proliferation und Reifung der Sertoli-Zellen selbst (Brehm et al., 2007).

Dass das Connexin-43 im Hoden essentiell für die Fertilität von Tieren ist, kann in einer weiteren Studie gezeigt werden. Tieren, bei welchen - durch ein Connexin-43-Knockin - das Connexin-43 entweder durch Connexin-32 oder Connexin-40 ersetzt wurde, zeigen ein Sertoli-cell-only-Syndrom mit Sterilität. Leydig-Zellen weisen jedoch keine abweichende Morphologie auf (Plum et al., 2000). Dies zeigt die wichtige Aufgabe des Connexins 43 bei der Spermatogenese.

Im Gegensatz dazu, scheint ein Connexin-43-Knockout an Keimzellen keinen Einfluss auf die Fertilität zu haben (Günther et al., 2013). Begründet wird dies damit, dass andere Connexin-Proteine eine Kommunikation zwischen Keimzellen und Sertoli-Zellen ausgleichen.

Da eine Suppression des Androgen-Rezeptors mit Flutamid in neonatalen Schweinen zu keiner Veränderung der Connexin-43-Expression im Hoden führt, wird angenommen, dass eine Regulation des Connexin-43 durch Androgen- bzw. seine Rezeptoraktivität erst mit zunehmendem Alter geschieht (Durlej et al., 2011). Andererseits scheint Connexin-43 keinen Einfluss auf die Androgen-Synthese zu haben, da ein Connexin-43-Knockout an Leydig-Zellen die Androgen-Synthese nicht einschränkt. Jedoch wird auch diskutiert, dass womöglich die Kommunikation zwischen den Leydig-Zellen untereinander nicht beeinträchtigt wird, wenn neben Connexin-43 noch andere Gap-junction-Proteine vorkommen (Kahiri et al., 2006).

Neben der Studie von Iwase et al. (2006) konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Estrogene die Zellkommunikation der Gap-junctions zwischen angrenzenden Leydig-Zellen über den Estrogen-Rezeptor hemmen. Der Zusammenhang zwischen Estrogenen und Connexin-43 in Leydig-Zellen wird von Hejmej et al. (2009) befürwortet, die einen Abfall der Estrogene mit einem erhöhten Signal von Connexin-43 in den Leydig-Zellen in Verbindung bringen.

4. Immunologische Kastration mit dem GnRH-Analogen Improvac®

Eine Alternative zur chirurgischen Kastration ist die Vakzination mit dem GnRH-Analogen Improvac®.

Hierbei wird dem intakten Eber ab einem Alter von 8 Wochen eine Erstvakzination (V₁) von 2ml subkutan in die Nackengegend, kaudal am Ohrgrund, verabreicht. Es werden sowohl Antikörper gegen das injizierte, synthetische GnRH-Analogen gebildet, welches an ein Trägerprotein mit einem wässrigen Adjuvant gebunden ist, als auch gegen das körpereigene GnRH. Die Hodenfunktion ist nach der ersten Vakzination noch voll funktionsfähig. Die zweite Vakzination (V₂), welche mindestens 4 Wochen nach der Erstvakzination stattfindet, stellt eine so genannte „Booster-Vakzination“ dar. Sie dient zur Unterdrückung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse und somit der Unterdrückung der Hodenfunktion sowie einer Reduktion der Steroidbiosynthese. Da es bis zu 3 Wochen dauern kann, bis die Skatol- und Androstenon-Werte nicht mehr im Fett nachweisbar sind, sollte die Schlachtung 4 bis 6 Wochen nach der zweiten Vakzination erfolgen. Tiere, bei denen die zweite Vakzination länger als 8 Wochen zurückliegt, sollten eine dritte Vakzination erhalten und im Anschluss 4 bis 6 Wochen später geschlachtet werden (Zamaratskaia und Rasmussen, 2015; Zoetis Deutschland GmbH, 2021; Zoetis New Zealand Limited, 2021).

Seit 2009 ist die Nutzung des Arzneimittels Improvac® als Alternative zur chirurgischen Kastration in Ländern der Europäischen Union zugelassen (Zamaratskaia und Rasmussen, 2015). Derzeit ist Belgien eines der führenden Länder, welches die erfolgreiche Vakzination mit dem Impfstoff Improvac® zur Kastration von Schweinen anwendet (Bee et al., 2015). Es gibt inzwischen zahlreiche Studien zur Vakzination mit Improvac®. Diese beschäftigen sich vor allem mit der Wirksamkeit der immunologischen Kastration, der Fleischqualität an sich, dem Ebergeruch und der Wirtschaftlichkeit (Dunshea et al., 2001; Zamaratskaia et al., 2008; Pauly et al., 2009; Brunius et al., 2011; Kubale et al., 2013). Da in dieser Studie die Auswirkungen der immunologischen Kastration in Bezug auf die Morphologie des Hodengewebes und die hormonellen Veränderungen untersucht wurden, werden hier Ergebnisse von anderen Autoren bezüglich der Histologie des Hodengewebes vorgestellt.

In vorherigen Studien konnten folgende Ergebnisse nach einer Vakzination mit Improvac® geliefert werden: Die LH-, Testosteron- und Östradiolwerte sinken nach der Vakzination deutlich ab, während FSH mehr oder weniger unverändert bleibt (Wagner und Claus, 2004; Wagner et al., 2006). Awoniyi et al. (1988b) war einer der ersten Autoren, welcher Untersuchungen an dem Hodengewebe der Eber nach einer Vakzination mit einem GnRH-Konjugat vornahm. Verglichen mit neueren Studien, zeigt das Hodengewebe vakzinierter Tiere meist ähnliche Merkmale. Dazu gehören die Reduktion der Hodengröße sowie der Durchmesser der Tubuli seminiferi contorti in den Hoden. Innerhalb der Tubuli seminiferi contorti war meist eine gestörte Spermatogenese zu finden, mit unterschiedlich ausgeprägtem Vorhandensein der Keimzellen im Epithelverband. Leydig-Zellen zeigen meist eine Reduktion in der Zahl sowie in der Größe, weniger Zytoplasma sowie polygonale oder pyknotische Zellkerne (Wagner, 2005; Einarsson et al., 2009; Einarsson et al., 2011; Kubale et al., 2013; Wicks et al., 2013). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass in den Studien verschiedene Impfschemata durchgeführt wurden. Einarsson et al. (2011) untersuchten den Effekt einer frühen Vakzination in der 10. und 14. Lebenswoche im Vergleich zur Vakzination in der 16. und 20. Lebenswoche. Geschlachtet wurden die Tiere in der 25. Lebenswoche. Im Vergleich zu den standardvakzinierten Tieren, zeigen früh kastrierte Tiere eine deutlich stärkere Reduktion der Größe der Tubuli seminiferi contorti. Während die standardvakzinierten Tiere nur einen leichten Keimzellverlust erkennen lassen, ist bei den Früh-Kastraten ein deutlicher Keimzellverlust mit vielen Tubuli, welche nur Spermatozyten und Sertoli-Zellen enthalten, zu sehen. Die Leydig-Zellen besitzen wenig Zytoplasma mit pyknotischen Zellkernen und sind kaum von den Zellkernen des Interstitiums zu unterscheiden. Da die immunologische Kastration reversibel ist, untersuchten Kubale et al. (2013) Tiere, welche 2, 5 und 8 Wochen nach der zweiten Vakzination geschlachtet wurden, im Hinblick auf das Hodengewebe. Mit zunehmendem Zeitintervall zwischen V_2 und der Schlachtung gibt es vermehrt starke Veränderungen im Hodengewebe. Angefangen von milden Zeichen der Atrophie, einem leichten Verlust von Keimzellen, bis hin zu Tubuli seminiferi contorti mit deutlichem Keimzellverlust oder Tubuli mit Sertoli-cell-only-Phänomen. Ebenso ist eine deutliche Abnahme und verringerte Größe der Leydig-Zellen beschrieben. Kein Tier zeigt eine Wiederaufnahme der Hodenfunktion.

Wicks et al. (2013) beschreiben, dass bei einer Vakzination mit Improvac® 8 Wochen nach der zweiten Vakzination die Testosteronwerte ansteigen und 10 Wochen nach V_2 die Regeneration des Hodenepithels wieder aufgenommen wird. Rottner und Claus (2009) beweisen einen Anstieg der Testosteronwerte im Blut 10 Wochen nach der zweiten Vakzination und legen dies als Kriterium für die Wiederaufnahme der Hodenfunktion fest. 26 Wochen nach der zweiten Vakzination haben alle Tiere die Hodenfunktion wiederaufgenommen und zeigen Tubuli mit allen Keimzellstadien.

Wenn man dies als Merkmal setzt, so beschreiben Zamaratskaia et al. (2008) im Gegenzug keine Wiederaufnahme der Hodenfunktion, auch 22 Wochen nach der zweiten Impfung.

In ihrer Studie wiesen Wagner et al. (2006) den Estrogen-Rezeptor α nach einer Immunvakzination in Schweinen vor allem in A- und B-Spermatogonien nach. Dieser ist nur vereinzelt in differenzierteren Keimzellen zu finden. Nicht jedoch in Sertoli- oder interstitiellen Zellen. Der Estrogen-Rezeptor β kann in Leydig-Zellen, Keimzellen und Sertoli-Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu intakten Ebern zeigen vakzinierte Tiere eine stärkere Reaktion des Estrogen-Rezeptors β (Srisuwatanasagul et al., 2018). Androgen-Rezeptoren werden bei immunvakzinierten Tieren vor allem in den somatischen Zellen nachgewiesen (Srisuwatanasagul et al., 2018). Ebenso ist der immunhistochemische Nachweis bei Kastraten stärker als bei intakten Ebern. Hier wird vermutet, dass dies an der Down-Regulation der GnRH-Aktivität liegt.

Abschließend soll erwähnt werden, dass das Arzneimittel Improvac® eine immunologische Kastration hervorruft, es jedoch einzelne Tiere gibt, die keine Reaktion auf eine Vakzination mit Improvac® zeigen (Hilbe et al., 2006; Škrlep et al., 2012; Kubale et al., 2013). Warum dies so ist, konnte bisher nicht geklärt werden.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchsaufbau der Studie

Männlichen Schweinen wird das GnRH-Analogon Improvac® ab einem Alter von 8 Wochen zweimal im Abstand von 4 Wochen injiziert. Die Zweitvakzination sollte jedoch mindestens 4 bis 6 Wochen vor der Schlachtung erfolgen (Zoetis Deutschland GmbH, 2021). Da die Vakzinationszeitpunkte nicht fest vorgeschrieben sind und variieren können, wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Vakzinations- und Schlachtzeitpunkte verwendet.

Ausgangsmaterial für die histomorphologische Untersuchung dieser Arbeit waren Gewebeproben von 29 Schweinen, welche in Kollaboration mit der Klinik für Schweine der LMU München im Lehr- und Versuchszentrum Schwarzenau gehalten wurden.

Die Schweine wurden in fünf Gruppen unterteilt. Intakte Eber (Gruppe 1) und Eber, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten die GnRH-Vakzination mit Improvac® (Zoetis Deutschland GmbH, 2021) appliziert bekamen (Gruppe 2 bis 5, Tabelle 1).

Die Tiere der Gruppe 2 wurden mit 8 und 12 Wochen vakziniert. Auf Grund der Schlachtkapazität des Schlachthofs Schwarzenau, wurden die Tiere der Gruppe 2; 12 und 14 Wochen nach der Zweitvakzination (V_2) geschlachtet. Tiere der Gruppe 3 wurden mit 12 und 16 Wochen immunologisch kastriert. Die Zeit zwischen V_2 und der Schlachtung betrug 10 Wochen. Sowohl Gruppe 4 als auch Gruppe 5 wurden mit 12 und 18 Wochen vakziniert. Während die Gruppe 4 jedoch 8 Wochen nach V_2 geschlachtet wurde, blieben die Tiere der Gruppe 5 für 21 Wochen nach V_2 am Leben (Tabelle 1).

Tabelle 1: Gruppeneinteilung und Vakzinationszeitpunkte

	Vakzination 1 (V₁)	Vakzination 2 (V₂)	Abstand in Wochen zwischen V₂ und Schlachtung
Gruppe 1 (n = 6)	Intakte Eber		23,5 (n=4) 25,5 (n=2)
Gruppe 2 (n = 5)	8. Lebenswoche	12. Lebenswoche	12 (n=3) 14 (n=2)
Gruppe 3 (n = 5)	12. Lebenswoche	16. Lebenswoche	10
Gruppe 4 (n = 6)	12. Lebenswoche	18. Lebenswoche	8
Gruppe 5 (n =7)	12. Lebenswoche	18. Lebenswoche	21

1.1. Probenentnahme

Im Schlachthof des Lehr- und Versuchszentrum Schwarzenau wurden die Gewebeproben im Anschluss der Schlachtung von den Hoden der Eber entnommen. Dies wurde von den Mitarbeitern der Klinik für Schweine der LMU München durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden die Proben aus den mit roten Kreuzen markierten Bereichen des Hodenparenchyms untersucht (Abbildung 8).

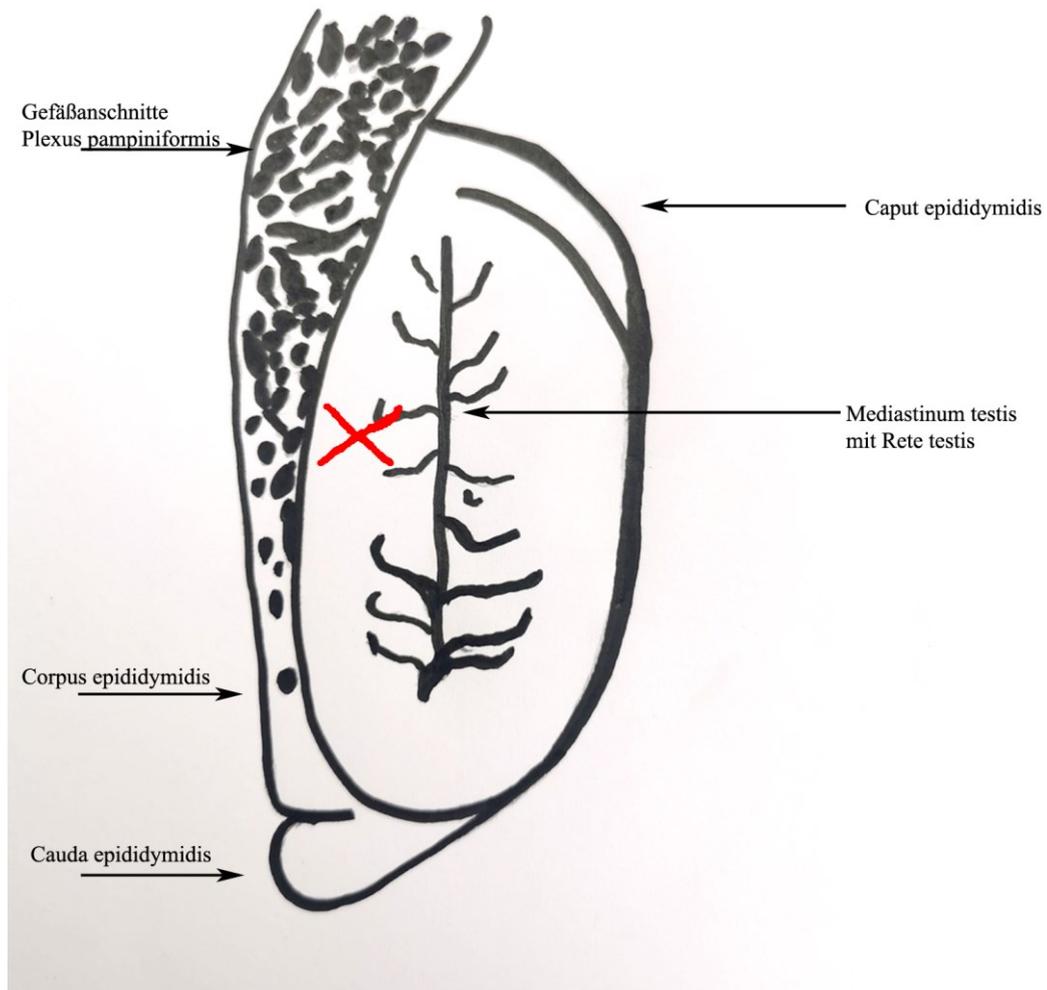


Abbildung 8: Entnahmestelle der Gewebeproben für diese Studie (eigene Darstellung)

1.2. Aufbereitung der Proben

Für die lichtmikroskopische Untersuchung, wurden die am Schlachthof entnommenen Gewebeproben zur Fixierung sowohl in eine Bouin-Lösung als auch in eine 3,7 % Formalin-Lösung gegeben (Mulisch und Welsch, 2015). Dort wurden sie für 24h belassen, im Anschluss zugeschnitten und in kleine Plastikförmchen gegeben. Zur Dehydrierung wurden die Proben für 72 Stunden in ein 70%-Ethanolbad überführt, welches mehrmals gewechselt wurde. Die Formalin-Proben wurden zuvor 60 Min. lang unter fließendem Leitungswasser gespült.

In einem automatisierten Gewebe-Einbettautomaten (Fa. Fisher Scientific, Typ microm stp 120, Schwerte, Deutschland) erfolgte weiterhin die Entwässerung der Hodenproben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80% Ethanol 2x, 96% Ethanol 2x, Isopropanol 2x, Xylol 3x), sowie die Einbettung in Paraplast (Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland).

Die mit Paraplast versehenen Proben wurden im Anschluss ausgeblockt. Mit Hilfe einer Paraffin-Ausgießstation (Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden die Proben mit Paraffin (Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in Eingießrahmen ausgegossen und auf Histokassetten (Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert.

Im Anschluss kühlten diese auf der Kühlplatte aus. Mit einem Rotationsmikrotom (Type RM2245, Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden 3-5µm dicke Schnitte angefertigt, welche im Wasserbad auf unbeschichtete Objektträger (Superfrost, Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland), sowie beschichtete Objektträger (Superfrost Ultra Plus, Menzel GmbH & Co, Braunschweig, Deutschland) gegeben wurden. Dies diente zur weiteren Bearbeitung für histologische Färbungen sowie für immunhistochemische Untersuchungen. Die immunhistochemischen Techniken wurden nach dem Standardprotokoll des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie anhand der modifizierten Methoden nach Mulisch und Welsch (2015) durchgeführt.

1.3. Histologische Färbemethoden

Für die histologischen Färbemethoden wurden Schnitte von allen Tieren der jeweiligen Gruppe angefertigt.

Die angefertigten Schnitte wurden wie bei vorherigen Studien (Kenngott, 2006) des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie der LMU München auf folgende Weise bearbeitet:

1. Entparaffinieren in Xylol (2x10 Min.)
2. Rehydrieren in einer absteigenden Alkoholreihe durch kurzes Schwenken in der Lösung (2x Isopropanol, 96% Ethanol, 70 % Ethanol, Aqua dest.)

Durch folgende Färbungen wurden die Schnitte nach dem Entparaffinieren und weiterbearbeitet:

Die Protokolle werden standardmäßig am Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie verwendet und sind modifiziert nach Mulisch und Welsch (2015).

- Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach dem Rehydrieren in der absteigenden Alkoholreihe wurden die Zellkerne der Schnitte für 1 bis 2,5 Min. in gefiltertem Hämalaun (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Im Anschluss erfolgte das Schwenken in Aqua dest. und das Spülen in Leitungswasser für 10 Min. Danach wurden die Schnitte für 3 Min. in Eosin (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt und in Aqua dest. geschwenkt.

Die H.E.-Färbung dient dazu, die Zellkerne blau-violett und das Zytoplasma sowie restliches Gewebe rosarot anzufärben (Mulisch und Welsch, 2015).

- Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Im Anschluss wurden die Schnitte in einer Eisenhämatoxylin-Färbung für 8 Min. gefärbt. Folgend wurden die Objektträger in einer Azophloxin Lösung für 5 Min., Phosphormolybdänsäure-Orange für 3 bis 4 Min. gefärbt und mit Lichtgrün für 5 Min. gegengefärbt. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Schnitte in 1%-Essigsäure geschwenkt und gespült.

Durch die Färbung nehmen die Zellkerne einen braunen bis schwarzen Farbton an, während das Zytoplasma rot gefärbt wird. Erythrozyten färben sich orange an, Bindegewebe und Schleim sollen eine grüne Färbung aufweisen (Mulisch und Welsch, 2015).

Nach der Färbung erfolgten folgende Schritte:

3. Dehydrieren der gefärbten Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %-Ethanol, 96%-Ethanol, 2x Isopropanol)
4. Baden in Xylol (2x10 Min.)
5. Eindecken mit Eukitt[®] (Riedel-de-Haen AG, Seelze, Deutschland)

1.4. Immunhistochemischer Nachweis

Auch für die immunhistochemische Durchführung wurden Standardprotokolle des Lehrstuhls für Anatomie Histologie und Embryologie verwendet, welche nach Mulisch und Welsch (2015) modifiziert wurden.

Für die immunhistochemischen Nachweise wurden die interessantesten Tiere jeder Gruppe verwendet. Die Mindestanzahl lag bei drei Tieren pro Gruppe. In dieser Studie wurden 13 verschiedene Antikörper untersucht, diese sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Vor den immunhistochemischen Nachweisen (Tabelle 3) und Untersuchungen wurden die Paraffinschnitte für mindestens 12 Stunden in einem Wärmeschrank bei 40°C gelagert.

In Abhängigkeit des verwendeten Antikörpers wurde für die Schnitte zur Vorbehandlung entweder ein TRS-Puffer pH 6 (Fa. Agilent, Waldbronn, Deutschland), ein TRIS-Puffer pH 7,5, ein ERS-Puffer pH 8 (Fa. Leica, Nußloch, Deutschland) oder ein Zitrat-Puffer pH 6 (siehe Anhang) verwendet.

Gespült wurden die Schnitte in einem PBS-Puffer pH 7,4 (siehe Anhang).

Tabelle 2: Untersuchte Antikörper dieser Studie

Primär-Antikörper gegen	Verdünnung	Primär-Antikörper Tierart	Hersteller	Sekundär-Antikörper* Tierart
Vimentin^{*2}	1:400	Maus	Dako	Kaninchen-Anti-Maus
Sox-9^{*2}	1:300	Kaninchen	Abcam	Pferd-Anti-Kaninchen
DDX-4^{*2}	1:500	Kaninchen	Abcam	Schwein-Anti-Kaninchen
Testosteron^{*2}	1:50	Kaninchen	Abcam	Pferd-Anti-Kaninchen
Ki-67	1:100	Maus	Dako	Pferd-Anti-Maus
Occludin	1:300	Kaninchen	Antikoerper-online	Pferd-Anti-Kaninchen
Claudin-3	1:250	Kaninchen	Abcam	Pferd-Anti-Kaninchen
Connexin-43	1:2500	Kaninchen	Abcam	Pferd-Anti-Kaninchen
Estrogen-Rezeptor α	1:100	Kaninchen	Thermo Scientific® RB-1521-P0	Pferd-Anti-Kaninchen
Estrogen-Rezeptor β	1:300	Kaninchen	Abcam	Pferd-Anti-Kaninchen
FSH-Rezeptor	1:100	Kaninchen	Abcam	Pferd-Anti-Kaninchen
Androgen-Rezeptor	1:150	Kaninchen	Abcam	Pferd-Anti-Kaninchen
8-OHG^{*3}	1:3000	Maus	Acris	Pferd-Anti-Maus

*Für jeden untersuchten Antikörper wurde eine Negativ- sowie Positivkontrolle durchgeführt. Für die Negativkontrolle wurde der Primär-Antikörper durch PBS-Puffer ersetzt. Für die Positivkontrolle wurden Gewebe verwendet, in denen der Antikörper nachweislich zu finden ist.

^{*2}Für die Antikörper, außer Vimentin, Sox-9, DDX-4 und Testosteron wurde als Sekundär-Antikörper das Impress Kit der Fa. Vector aus Burlingame, Kalifornien, USA verwendet.

^{*3} 8-OHG (8-Hydroxy-Guanosin)

Die immunhistochemische Aufbereitung wird nachfolgend in Tabelle 3 beschrieben.

Tabelle 3: Immunhistochemische Aufbereitung

1.	Entparaffinieren der Schnitte in Xylol	2x30 Min.
2.	Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe 2x Isopropanol, 1x 96% Ethanol, 1x 70% Ethanol, jeweils Schnitte kurz schwenken bis Aqua dest.	
3.	Waschen in PBS-Puffer	3x5 Min.
4.	Vorbehandlung der einzelnen Antikörper	
	Vimentin: Protease 0,1% (Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland) jeweils 100 µl pro Objektträger, bei Raumtemperatur abkühlen lassen	10 Min.
	Sox-9: TRS-Puffer in der Mikrowelle, bei Raumtemperatur abkühlen lassen	2x15 Min. 20 Min.
	DDX-4: Zitrat-Puffer in der Mikrowelle, bei Raumtemperatur abkühlen lassen	2x15 Min 20 Min.
	Ki67: TRS-Puffer in der Mikrowelle, bei Raumtemperatur abkühlen lassen	2x10 Min 20 Min.
	Occludin: ERS-Puffer pH8 in der Mikrowelle, bei Raumtemperatur abkühlen lassen 20 Min.	2x15 Min. 20 Min.
	Claudin-3: ERS-Puffer pH9 in der Mikrowelle, bei Raumtemperatur abkühlen lassen	2x15 Min. 20 Min.

	Connexin-43: TRS-Puffer in der Mikrowelle, bei Raumtemperatur abkühlen lassen	2x10 Min 20 Min.
	FSH-Rezeptor: TRS-Puffer in der Mikrowelle, bei Raumtemperatur abkühlen lassen	2x10 Min 20 Min.
	Androgen-Rezeptor: TRS-Puffer in der Mikrowelle, bei Raumtemperatur abkühlen lassen	2x10 Min 20 Min.
	Testosteron: Siehe Anhang	
	Estrogen-Rezeptor α: TRS-Puffer in der Mikrowelle, bei Raumtemperatur abkühlen lassen	2x10 Min 20 Min.
	Estrogen-Rezeptor β: TRS-Puffer in der Mikrowelle, bei Raumtemperatur abkühlen lassen	2x10 Min 20 Min.
	8-OHG: Proteinase K (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland), bei Raumtemperatur inkubieren	3 Min.
5.	Spülen in PBS-Puffer	3x5 Min.
6.	Endogene Peroxidase hemmen mit Hydrogenperoxid (10%) und inkubieren in Feuchtkammer bei Raumtemperatur (RT)	10 Min.
7.	Fließendes Leitungswasser	10 Min.
8.	Spülen in PBS-Puffer	3x5Min.
9.	Blockieren unspezifischer Bindungen mit Impress Reagent Vector Blocking Serum (Fa. Vector, Burlingame, Kalifornien, USA) und inkubieren in Feuchtkammer bei Raumtemperatur Für Vimentin und DDX-4: Dako Protein-Block-Serum-Free (Fa. Agilent, Waldbronn, Deutschland), inkubieren bei Raumtemperatur, danach abgießen	20 Min. 10 Min.,
10.	Primär-Antikörper auftragen: Jeweils 100 μ l pro Objektträger (AK), siehe Tabelle 2	

	Für Negativkontrolle: Dako antibody diluent (Fa. Agilent, Waldbronn, Deutschland) 100µl pro Objektträger anstatt Antikörper	
11.	Inkubation über Nacht bei 4°C	
12.	Vor der Weiterbehandlung, bei Raumtemperatur inkubieren	1h
13.	Spülen in PBS-Puffer	3x5 Min.
14.	Sekundär-Antikörper auftragen: Jeweils 100µl pro Objektträger inkubieren bei Raumtemperatur (RT),	30 Min.
15.	Spülen in PBS-Puffer	3x5Min.
	Vimentin und DDX-4 Behandlung mit 2 weiteren Zwischenschritten: 1). Markieren des Sekundär-Antikörpers mit Streptavidin-Biotin-HRP-Komplex (Streptavidin-HRP Novocastra, Fa. Leica, Nußloch, Deutschland) Inkubieren bei Raumtemperatur 2) Spülen in PBS-Puffer	30 Min. 3x5Min.
16.	Reaktionsreaktion auslösen in DAB-Lösung (Fa. Agilent, Waldbronn, Deutschland)	3.Min
17.	Schwenken in Leitungswasser	
18.	Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin Gill's Formula (Fa. Vector, Burlingame, Kalifornien, USA)	
19.	Fließendes Leitungswasser	10 Min.
20.	Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe 70% Ethanol, 96% Ethanol, 2x Isopropanol	
21.	Xylolbäder 2x	1x10 Min. 1x20 Min
22.	Eindecken der Schnitte mit Eukitt	
23.	Trocknen im Wärmeschränk bei 40 C°	12h

1.5. Weitere untersuchte und getestete Antikörper

Zusätzlich wurden noch weitere Antikörper getestet. Zu diesen gehören K 18, K 8 und AMH. Diese haben an den Proben des Schweinehodens nicht funktioniert. Aus diesem Grund sind diese auch nicht in der Dissertation aufgeführt.

1.6. Auswertung der Schnitte

Die gewonnenen Schnitte wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Typ 307-148.001, Fa. Leitz, Wetzlar, Deutschland) evaluiert. Zusätzlich wurden die Schnitte mit Hilfe des Precipoint Mikroskops (Typ M8, Fa. Precipoint, Freising, Deutschland) mit Hilfe eines 40 X 0,95 und 60 X 0,95 Objektivs eingescannt und auf dem PC ausgewertet.

1.7. Morphometrie und Auszählung für die statistische Auswertung

1.7.1. Anzahl der Sertoli-Zellen und Flächenbestimmung der Tubuli

Für die Sertoli-Zellzählung und die Bestimmung der Fläche der Tubuli seminiferi contorti wurden Objektträger von mindestens drei Tieren pro Gruppe verwendet. Dazu wurden Bilder, die mit einem 40 x 0,95 Olympus Objektiv des Precipoint Mikroskops (Typ M8, Fa. Precipoint, Freising, Deutschland) aufgenommen wurden, für die Messungen verwendet. Mit Hilfe der Software Image J64 und dem Creative Pen Display Tablet (Typ DTK-1301, Fa. Wacom, Krefeld, Deutschland) wurden zehn runde Querschnitte der Hodentubuli von jedem Eber verwendet. Sertoli-Zellkerne wurden mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen für den Antikörper gegen Sox-9 identifiziert. Die Sertoli-Zell-Nuklei wurden mit dem Kreativstift markiert und die Software Image J64 berechnete die Anzahl der Sertoli-Zellen. Querschnitte der Tubuli seminiferi contorti wurden an der Basalmembran mit dem Kreativstift umrissen und über Image J64 wurde die Fläche jedes Tubulus berechnet.

1.7.2. Anzahl der Mitosen pro Tubulusanschnitt und Tubuli pro Gesichtsfeld

Für den Nachweis der Mitosen wurden Objektträger verwendet, die mit dem Antikörper gegen Ki67 behandelt worden sind. Wie in Abschnitt 1.7.1 beschrieben, wurden die Objektträger mit dem Precipoint-Mikroskop (Typ M8, Fa. Precipoint, Freising, Deutschland) gescannt. Mit Hilfe der Precipoint Slide Viewer Software Viewpoint (Fa. Precipoint, Freising, Deutschland) wurden Gesichtsfelder mit einer Vergrößerung von 200 μ m untersucht. Hierbei wurden so viele Gesichtsfelder untersucht, bis 100 Tubuli seminiferi contorti und die darin vorkommenden Mitosen ausgezählt waren. Nebenbei wurde die Anzahl der Tubuli pro Gesichtsfeld manuell ermittelt. Diese wurden manuell markiert und anschließend ausgezählt.

1.7.3. Anzahl der Leydig-Zellen pro Gesichtsfeld

Das gleiche Verfahren wie in Abschnitt 1.7.2. wurde für das Zählen von 100 Leydig-Zellen verwendet. Für den Leydig-Zell-Nachweis wurden Objektträger verwendet, welche mit dem Antikörper gegen Testosteron behandelt wurden. Die Gesichtsfelder für die Auszählung der Leydig-Zellen wurden bei einer Vergrößerung von 50 μ m untersucht, bis auch hier 100 Leydig-Zellen gezählt waren.

Die Leydig-Zellen wurden nach den Kriterien, wie sie in Tabelle 4 aufgeführt sind, eingeteilt:

Tabelle 4: Klassifikation der Leydig-Zellen

Ausprägung des Zytoplasmas von Leydig-Zellen	
Kein Zytoplasma*	0
Wenig Zytoplasma	1
Mäßig Zytoplasma	2
Viel Zytoplasma	3
Ausprägung des Zellkerns von Leydig-Zellen	
Anzeichen der Degeneration	0
Physiologisches Erscheinungsbild	1

*Lichtmikroskopisch erkennbar

Das Keimepithel sowie die Spermatogonien wurden unter Verwendung von Objektträgern mit dem Antikörper gegen DDX-4 ausgewertet. Mit einer Vergrößerung von 200 μ m pro Gesichtsfeld wurden das Hodenepithel und die Spermatogonien von 100 Hodentubuli nach den in Tabelle 5 und Tabelle 6 beschriebenen Kriterien klassifiziert:

Tabelle 5: Klassifikation des Keimepithels

Keimepithel pro Tubulus Querschnitt		Spermatogonien pro Tubulus Querschnitt	
Keimepithel ohne Keimzellen	0	Keine Spermatogonien	0
Keimepithel mit Spermatogonien und wenigen Spermatozyten.	1	Wenige Spermatogonien (< 5)	1
Keimepithel mit allen Keimzelltypen, jedoch in geringer Anzahl. Ungeordnet, in Reihen oder ohne Reihen-Anordnung.	2	Mäßige Anzahl an Spermatogonien (5-14)	2
Keimepithel mit allen Keimzelltypen in wenigen Reihen angeordnet.	3	Viele Spermatogonien (> 15)	3
Keimepithel mit allen Keimzelltypen in vielen geordneten Reihen.	4		
Keimepithel mit allen Keimzelltypen in sehr vielen geordneten Reihen.	5		

Tabelle 6: Klassifikation für kleine/mittelgroße/große Spermatogonien

Anzahl der Spermatogonien		
Keine,	0 Spermatogonien	0
Wenig,	<5 Spermatogonien	1
Mäßig,	5-14 Spermatogonien	2
Viele,	>15 Spermatogonien	3

1.8. Statistische Auswertung

1.8.1. Testosteronwerte

Die Tiere, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, waren bereits Teil der Dissertation von Herrn Dr. Reiter (Reiter, 2018). Für die Studie von Herrn Dr. Reiter wurde den Schweinen zum Zeitpunkt der Schlachtung Blutproben entnommen und die Testosteronwerte ermittelt. Mit Genehmigung von Frau Dr. Zöls aus der Schweineklinik dürfen diese in der vorliegenden Arbeit verwendet und mit den histologischen Schnitten verglichen werden. Die Testosteronwerte sind der Tabelle 13, Tabelle 22, und der Graphik 11 des Ergebnisteils und des Anhangs zu entnehmen.

1.8.2. Datenerhebung und durchgeführte Tests

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mit der Software SPSS 26.0 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen) durchgeführt.

Die Daten wurden in einem ersten Arbeitsschritt deskriptiv-statistisch aufbereitet. Für kategoriale Daten wurden absolute und relative Häufigkeiten berechnet. Die grafische Darstellung relativer Häufigkeiten erfolgte in Form von gestapelten Balkendiagrammen. Metrische Daten wurden initial mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test auf signifikante Abweichungen von einer Normalverteilung getestet. Dies war bei fast allen vorliegenden Datenreihen der Fall. Als Kenndaten der Verteilung wurden der Median und die Inter-Quartils-Range (IQR) oder bei normalverteilten Daten das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet. Zur grafischen Darstellung der metrischen Daten wurden Box- und Whisker-Plots sowie Dot-Plots genutzt.

Nachfolgend erfolgte die statistische Auswertung der Daten in Form von Gruppenvergleichen. Für den Vergleich der Gruppen von kategorialen Daten wurde der Chi-Quadrat-Test eingesetzt. Um die Ranginformation bei ordinalen Daten in der Analyse zu berücksichtigen wurde in diesen Fällen die Variante Somers-d gewählt. Lagen Wiederholungsmessungen vor, kam das Generalisierte Lineare Model in der Variante für Messwiederholungen (verallgemeinerte Schätzgleichungen = generalized estimating equations) mit dem Modelltyp für Häufigkeiten (Poisson loglinear) oder ordinale Daten (ordinal logistisches Model) zum Einsatz. Für multiple paarweise Vergleiche wurde die Adjustierung nach Bonferroni verwendet.

Zum Gruppenvergleich metrischer Daten wurde der Mann-Whitney U Test verwendet. Der Kruskal-Wallis Test wurde zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen untereinander in Verbindung mit einem post-hoc-Test nach Bonferroni eingesetzt. Zur Berücksichtigung von Wiederholungsmessungen kam wiederum das generalisierte lineare Modell in der Variante für Messwiederholungen zum Einsatz. Bei metrischen Daten wurden die Modelltypen „linear“ oder „ordinal logistisch“ gewählt. Für multiple paarweise Vergleiche erfolgte auch in diesem Fall die Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni. Das Signifikanzniveau wurde für alle Analysen auf $p < 0,05$ festgelegt.

IV. ERGEBNISSE

1. Histomorphologische Befunde am Hoden von intakten Ebern und immunologisch vakzinierten Tieren

1.1. Hämatoxylin-Eosin und Trichrom-Färbung nach Masson und Goldner

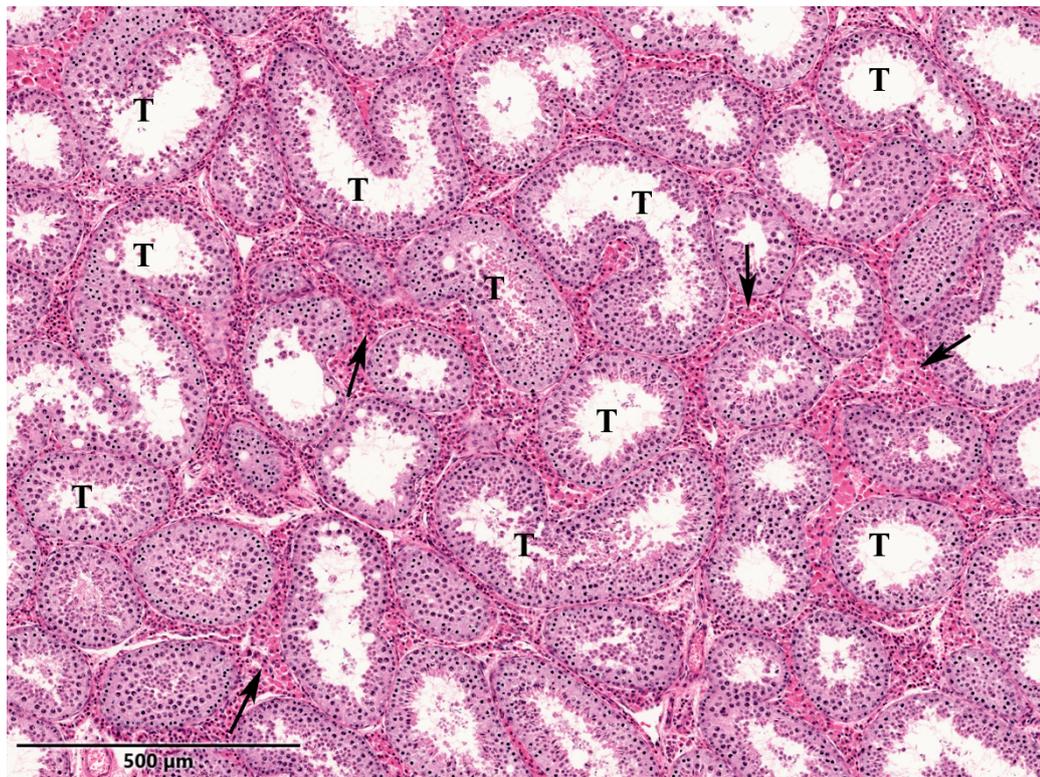


Abbildung 9: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti von intakten Ebern der Gruppe 1. Trichrom-Färbung nach Masson und Goldner.

Die intakten Eber weisen Tubuli seminiferi contorti mit zahlreichen Keimzellen auf. Dazwischen sind große Gruppen an Leydig-Zellen zu erkennen, welche ein stark ausgeprägtes Zytoplasma besitzen.

T: Tubuli, schwarzer Pfeil: Leydig-Zellen.

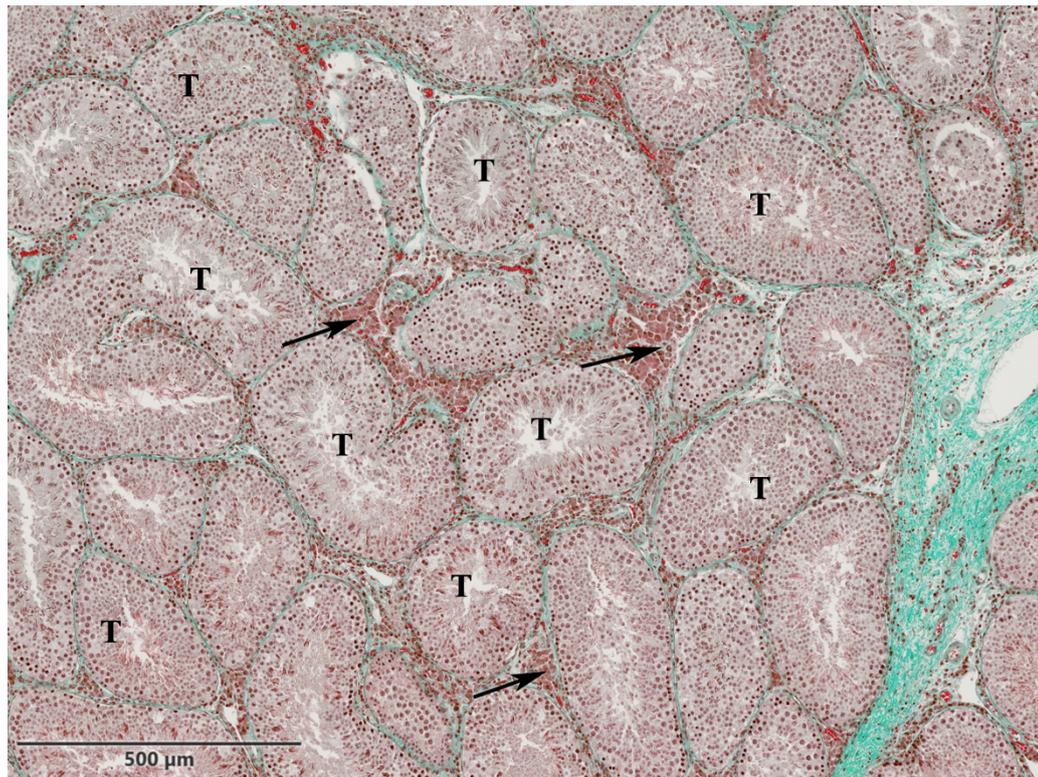


Abbildung 10: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti von intakten Ebern der Gruppe 1. Trichrom-Färbung nach Masson und Goldner.

Die intakten Eber haben Tubuli seminiferi contorti mit zahlreichen Keimzellen. Dazwischen sind große Gruppen an Leydig-Zellen zu erkennen, welche ein stark ausgeprägtes Zytoplasma besitzen.

T: Tubuli, schwarzer Pfeil: Leydig Zellen.

1.1.1. Intakte Eber der Gruppe 1

Im Hoden der intakten Eber sind große Quer- und Längsanschnitte der Tubuli seminiferi contorti zu finden (Abbildung 9, Abbildung 10, Graphik 1, Graphik 2, Graphik 12, Graphik 13). Das Vorkommen sowie die Gestalt der Keim- und Sertoli-Zellen sind physiologisch für das Alter. Von basal in Richtung Lumen ausgehend findet man folgende Keimzellen (Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13):

1. Kleine, runde bis ovale Spermatogonien auf der Basalmembran aufliegend.
2. Junge und reifere Stadien an Spermatozyten.
3. Runde, elongierende und elongierte Spermatisden.

Der Basalmembran anliegend finden sich kleine, runde bis ovale Spermatogonien (Graphik 5, Graphik 16). Dazwischen sind die Sertoli-Zellkerne mit ovaler oder birnenförmiger Gestalt und einem dreigelappten prominenten Nukleolus zu finden (Graphik 4, Graphik 14). Spermatozyten und die Spermatiden sind in mehreren Reihen in den Tubuli seminiferi contorti angeordnet (Graphik 3, Graphik 8, Graphik 15). Im Interstitium lagern sich Gruppen von Leydig-Zellen mit einer polygonalen Form und einem prominenten eosinophilen Zytoplasma in Gruppen zusammen (Abbildung 12, Graphik 9, Graphik 10, Graphik 18, Graphik 19). Für die Anzahl der Sertoli-Zellen, die Fläche der Tubuli seminiferi contorti und die Mitosen siehe Tabelle 7.

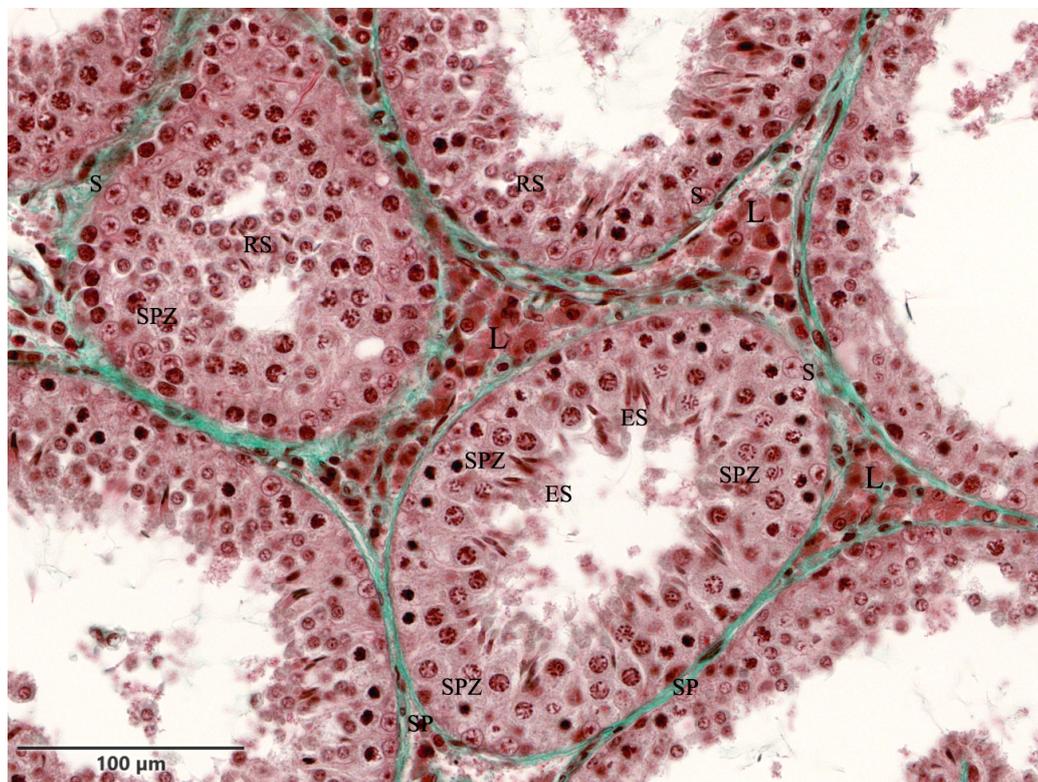


Abbildung 11: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti und Leydig-Zellen im Hoden eines intakten Ebers. Trichrom-Färbung nach Masson und Goldner.

L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden, ES: Elongierte Spermatiden.

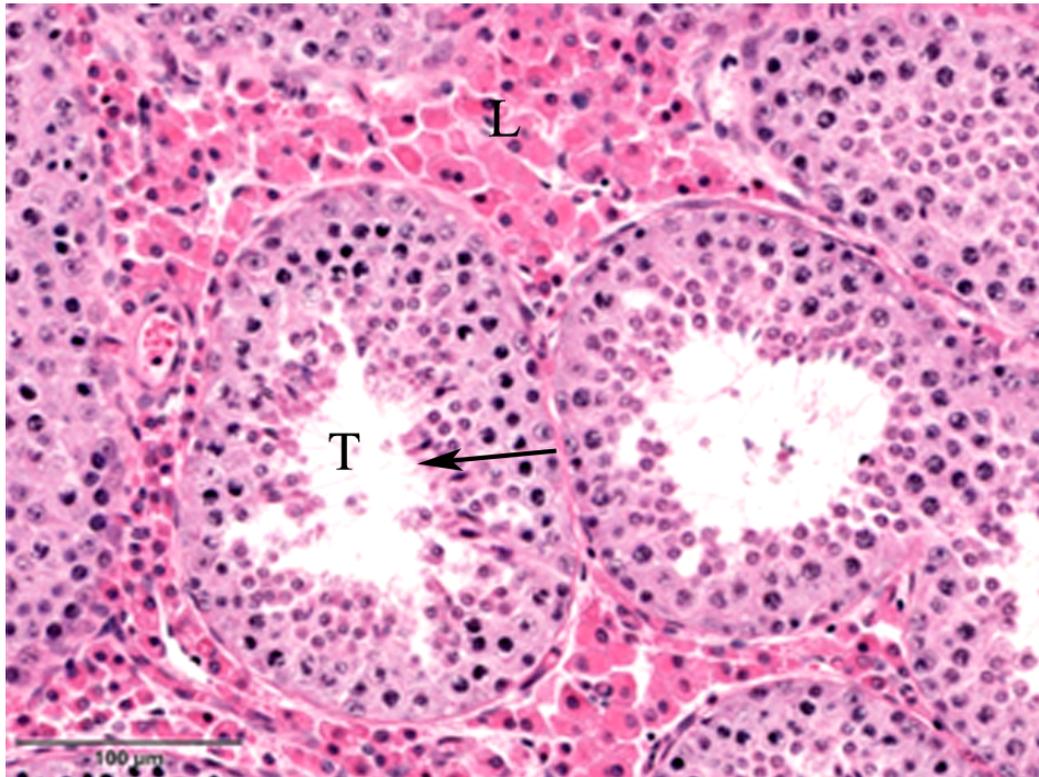
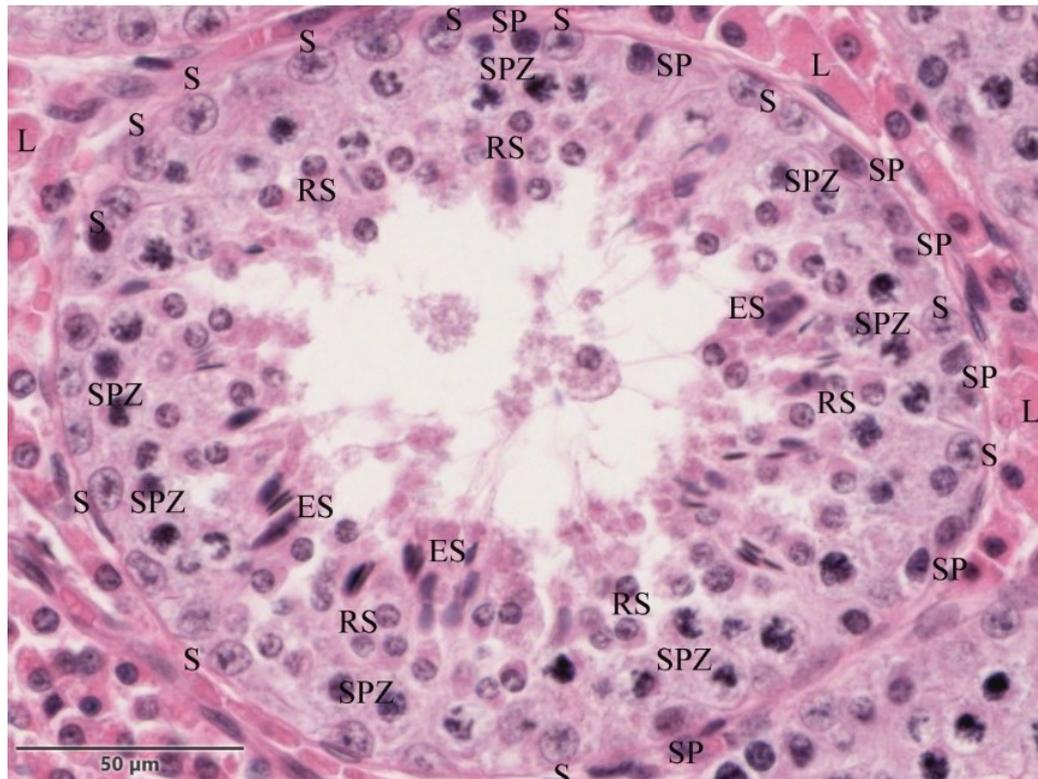


Abbildung 12: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti und Leydig Zellen im Hoden eines intakten Ebers. H.E.-Färbung.

Die Tubuli seminiferi contorti der intakten Eber sind groß und besitzen viele Reihen an Keimzellen (schwarzer Pfeil). Zwischen den Tubuli sind große Gruppen an Leydig-Zellen mit viel eosinophilem Zytoplasma.

T: Tubuli, L: Leydig-Zellen, schwarzer Pfeil: Keimepithel mit Sertoli-Zellen (von basal nach luminal).



**Abbildung 13: Übersichtsaufnahme vom Keimepithel eines intakten Ebers.
H.E. Färbung.**

Im Queranschnitt sind viele Reihen an Keimzellen bis hin zu elongierten Spermatiden zu sehen.

**L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien,
SPZ: Spermatozyten, RS: runde Spermatiden,
ES: Elongierte Spermatiden.**

Tabelle 7: Gruppe 1: Medianwerte für Sertoli-Zellen, Fläche, Mitosen und Tubuli pro Gesichtsfeld

Gruppe 1	Sertoli-Zellen pro Tubulus	Fläche pro Tubulus μm^2	Mitosen pro Tubulus	Tubuli pro Gesichtsfeld
25%	14,00	23795,82	14,00	9,00
50%	19,00	26981,76	27,00	12,00
75%	21,25	34721,77	47,00	13,00

Medianwert = 50%. 25% und 75% beschreiben die IQR (Interquartilsrange), also die berechneten Werte im Bereich zwischen 25% und 75%.

1.1.2. Vakzinierter Tiere der Gruppe 2 und 3

Die vakzinierten Tiere der Gruppe 2 und 3 zeigen eine deutliche Veränderung im Hodenepithel (Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16). Die Hoden der Tiere von Gruppe 2 ($p = 0,002$) und Gruppe 3 ($p < 0,001$) besitzen kleinere Tubuli seminiferi contorti als die intakten Eber (Tabelle 7, Tabelle 8, Tabelle 9, Graphik 1, Graphik 2, Graphik 12, Graphik 13). In den Tubuli seminiferi contorti kommt häufig nur eine prominente Reihe an Zellen vor, welche „perlschnurartig“ der Basalmembran aufliegen (Abbildung 16). Diese Zellreihe besteht aus veränderten Sertoli-Zellkernen, die nicht die typische birnenförmige Gestalt annehmen, sondern eine veränderte runde, ovale Form mit bis zu vier oder auch mehr Nukleoli. Ebenso besitzen Tiere der Gruppe 2 ($p = 0,001$) und 3 ($p < 0,001$) mehr Sertoli-Zellen als die intakten Eber (Tabelle 7, Tabelle 8, Tabelle 9, Graphik 4, Graphik 14). Im Vergleich zu den intakten Ebern besitzen die Tiere der Gruppe 2 ($p < 0,001$) und 3 ($p < 0,001$) häufig große Spermatogonien mit einer veränderten Morphologie (Abbildung 16, Graphik 7, Graphik 17, Tabelle 21). Kleine Spermatogonien, wie sie bei intakten Ebern zu finden sind, kommen nur sehr selten oder gar nicht vor Gruppe 2 ($p = 0,001$), Gruppe 3 ($p < 0,001$) (Graphik 5, Graphik 16, Tabelle 19). Im Lumen befinden sich einzelne Zellen wie Spermatozyten und runde Spermatiden. Zu einem großen Anteil fehlen diese jedoch. Zusätzlich sind im Lumen, nahe an der prominenten Reihe an Sertoli-Zellen und Spermatogonien, morphologisch veränderte große Spermatozyten, welche den Spermatogonien auf der Basalmembran ähneln, erkennbar (Abbildung 16). Einzelne Tiere besitzen in der Ansicht Tubuli seminiferi contorti mit einem Keimepithel, welches dem der intakten Eber von Gruppe 1 ähnelt (Abbildung 18).

Hier scheinen jedoch die Keimzellzahlen im Vergleich reduziert und es entsteht der Eindruck, als wären diese ungeordneter im Vergleich zum Keimepithel der intakten Eber von Gruppe 1 (Graphik 3, Graphik 8, Graphik 15).

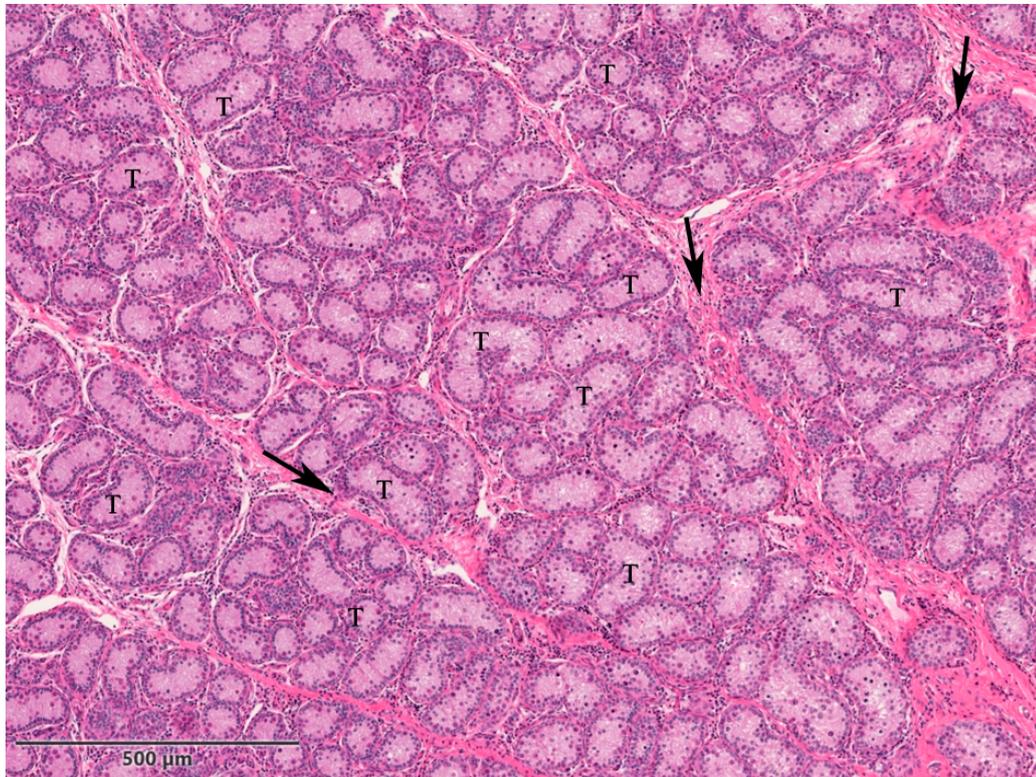


Abbildung 14: Übersichtsaufnahme vakzinierter Tiere aus Gruppe 2. H.E.-Färbung.

Es sind viele kleine Tubuli erkennbar, dazwischen befinden sich starke Bindegewebsstränge.

T: Tubuli, schwarzer Pfeil: Bindegewebe.

Im intertubulären Bereich besitzen die Leydig-Zellen der vakzinierten Eber von Gruppe 2 ($p < 0,001$) und Gruppe 3 ($p < 0,001$) im Vergleich zu den intakten Ebern häufig pyknotische Zellkerne mit kleiner Gestalt oder Anzeichen von Degeneration (Abbildung 17, Graphik 10, Graphik 19, Tabelle 17). Das Zytoplasma ist bei Tieren der Gruppe 2 ($p < 0,001$) und Gruppe 3 ($p < 0,001$) lichtmikroskopisch nicht zu erkennen oder kaum vorhanden (Graphik 9, Graphik 18, Tabelle 16). Vereinzelt kommen Leydig-Zellen mit polygonaler Gestalt und viel Zytoplasma vor. Für die Anzahl der Sertoli-Zellen, die Fläche und die Anzahl der Mitosen der Tubuli seminiferi contorti siehe Tabelle 8 und Tabelle 9.

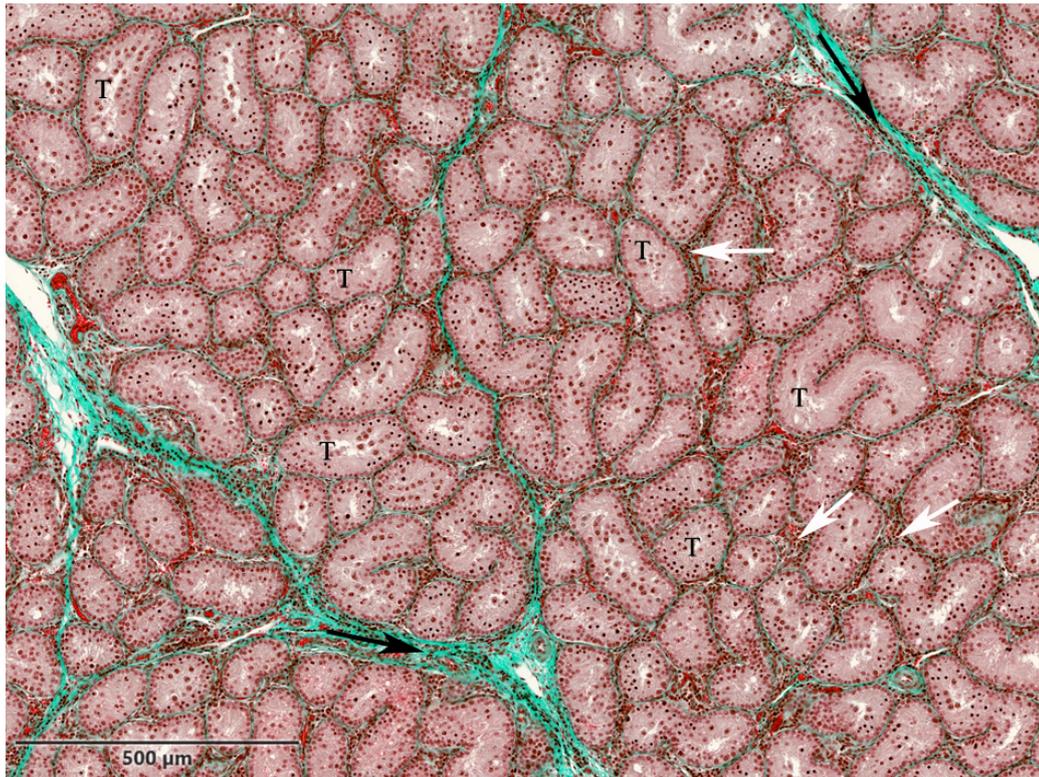


Abbildung 15: Übersichtsaufnahme von vakzinierten Tieren der Gruppe 2. Trichrom-Färbung nach Masson und Goldner.

Zu erkennen sind kleinere Tubuli seminiferi contorti im Vergleich zu den intakten Ebern. Zwischen den Tubuli befinden sich Leydig-Zellen sowie Bindegewebsstränge.

T: Tubuli, schwarzer Pfeil: Bindegewebe (BGW), weißer Pfeil: Leydig-Zellen.

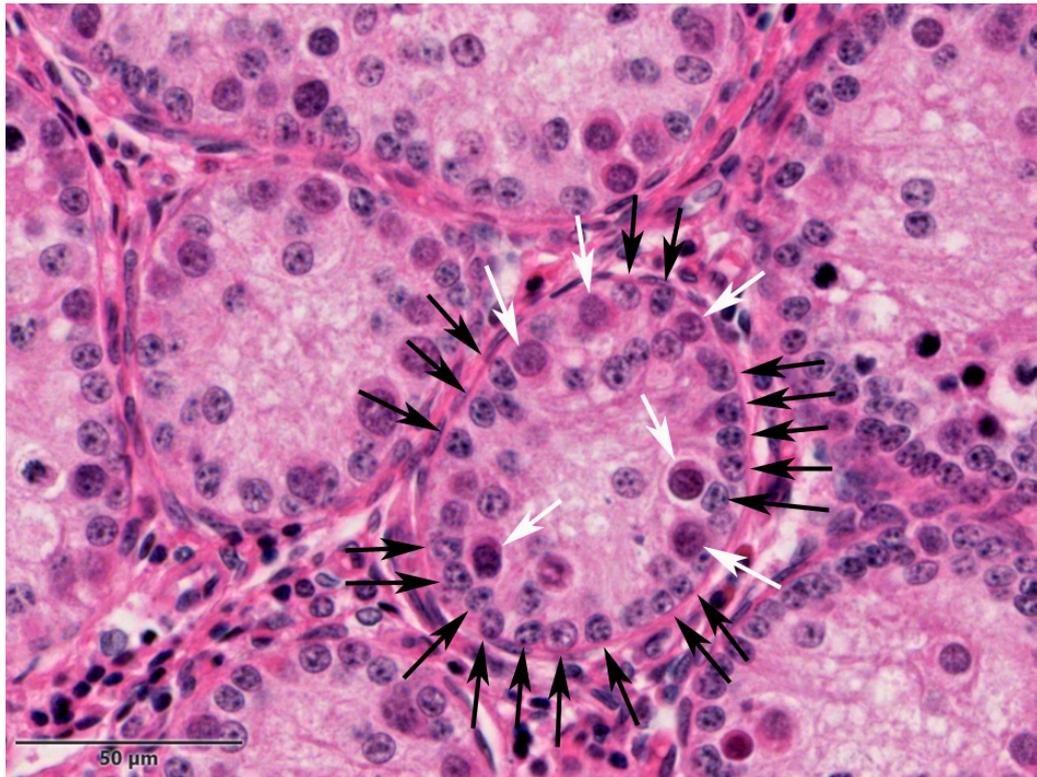


Abbildung 16: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines Tieres aus Gruppe 2. H.E.-Färbung.

Auf der Basalmembran sind veränderte runde/ovale Sertoli-Zellkerne und veränderte große Spermatogonien und Spermatozyten im Lumen. Im intertubulären Bereich sind pyknotischen Leydig-Zellen mit wenig Zytoplasma zu sehen.

Schwarzer Pfeil: veränderte Sertoli-Zellkerne, weißer Pfeil: veränderte Spermatogonien und Spermatozyten.

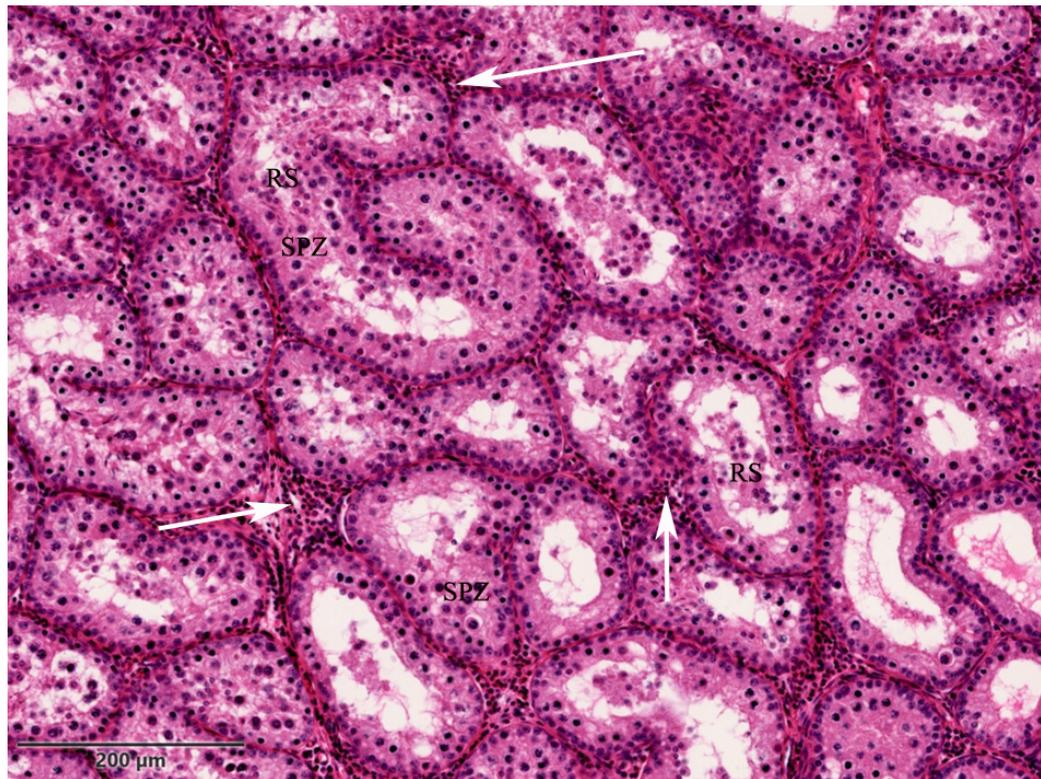


Abbildung 17: Übersichtsaufnahme eines Tieres der Gruppe 3. H.E.- Färbung.
Zu sehen sind wenige Keimzellstadien in den Tubuli seminiferi contorti. SPZ: Spermatozyten, RS: runde Spermatiden, weißer Pfeil: pyknotische Leydig-Zellen.

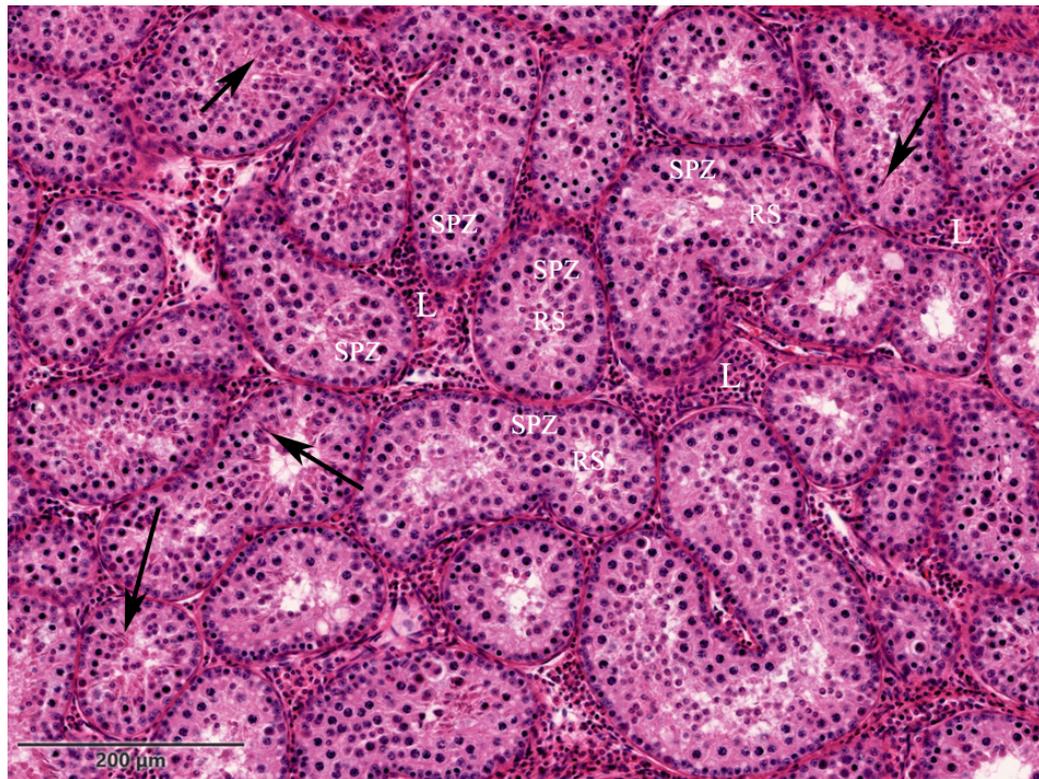


Abbildung 18: Übersichtsaufnahme eines Tieres der Gruppe 3. H.E.-Färbung.

Zu sehen sind Tubuli seminiferi contorti mit vielen Keimzellstadien. L: Leydig-Zellen, SPZ: Spermatozyten, RS: runde Spermatiden, schwarzer Pfeil: Elongierte Spermatiden.

Ein Tier der Gruppe 2 besitzt die gleiche histomorphologische Erscheinung wie die intakten Eber der Gruppe 1 (Abbildung 19).

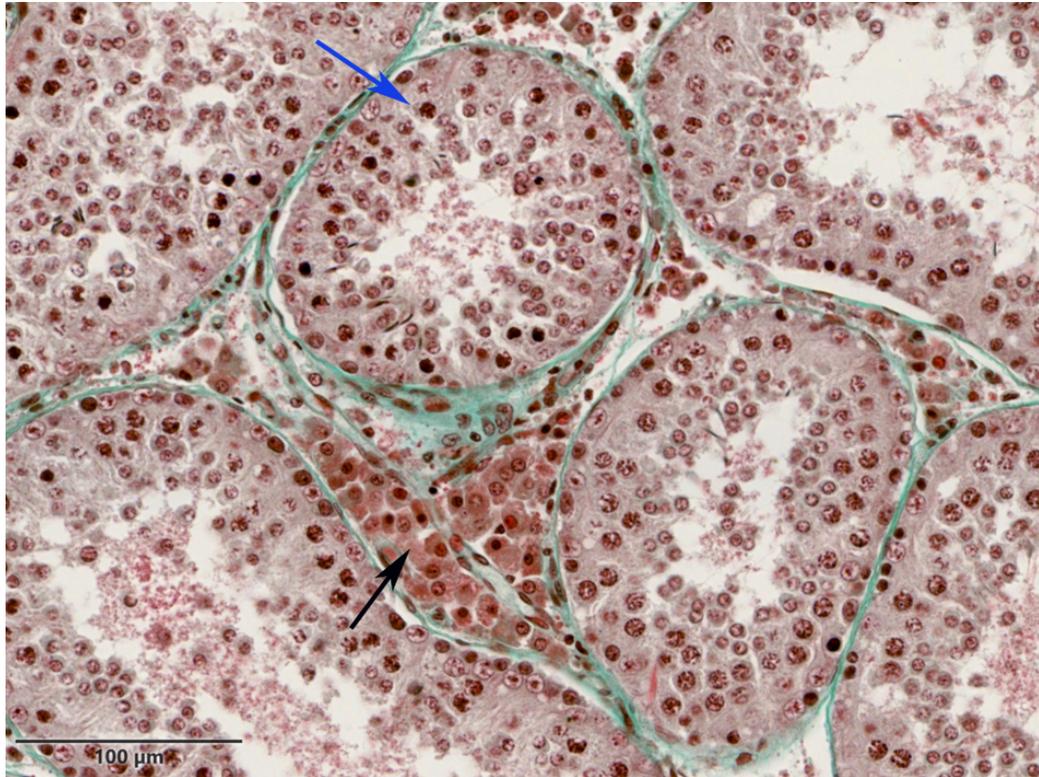


Abbildung 19: Vergrößerungsaufnahme eines Tieres aus Gruppe 2 mit eberähnlichem Aussehen. Trichrom-Färbung nach Masson und Goldner. Im Interstitium sind Leydig-Zellen mit viel Zytoplasma zu erkennen. Die Tubuli seminiferi contorti haben viele differenzierte Keimzellen bis hin zu elongierenden Spermatiden.

Schwarzer Pfeil: Leydig-Zellen, blauer Pfeil: Tubuli mit vielen Keimzellen.

Tabelle 8: Gruppe 2: Medianwerte für Sertoli-Zellen, Fläche, Mitosen und Tubuli pro Gesichtsfeld

Gruppe 2		Sertoli-Zellen pro Tubulus	Fläche pro Tubulus μm^2	Mitosen pro Tubulus	Tubuli pro Gesichtsfeld
	25%	22,00	7907,77	2,00	15,00
	50%	29,00	12497,10	8,00	20,50
	75%	35,00	19775,72	24,00	30,75

Medianwert = 50%, 25% und 75% beschreiben die IQR (Interquartilsrange), also die berechneten Werte im Bereich zwischen 25% und 75%.

Tabelle 9: Gruppe 3: Medianwerte für Sertoli-Zellen, Fläche, Mitosen und Tubuli pro Gesichtsfeld

Gruppe 3		Sertoli-Zellen pro Tubulus	Fläche pro Tubulus μm^2	Mitosen pro Tubulus	Tubuli pro Gesichtsfeld
	25%	26,00	6869,93	0,00	21,50
	50%	30,00	8588,04	2,50	28,00
	75%	33,00	12865,18	6,00	33,00

Medianwert = 50%. 25% und 75% beschreiben die IQR (Interquartilsrange), also die berechneten Werte im Bereich zwischen 25% und 75%.

1.1.3. Vakzinierter Tiere der Gruppe 4

Vier Tiere der Gruppe 4 besitzen eine ähnliche Erscheinung in Bezug auf die Morphologie der Tubuli seminiferi contorti (Graphik 1, Graphik 2, Graphik 12, Graphik 13) und der Leydig-Zellen wie die der Gruppe 2 und 3 (Abbildung 21). Im Gegensatz dazu besitzt die Gruppe 4 jedoch auch Tiere mit Tubuli seminiferi contorti, welche eine hohe Menge an Keimzellen (Abbildung 20, Graphik 3) - aber ungeordneter als die der intakten Eber - sowie häufiger vorkommende kleine Spermatogonien aufweisen. Mittelgroße (Graphik 6) und große Spermatogonien (Graphik 7, Graphik 17) sind auch vorhanden. Besonders in dieser Gruppe (aber auch in den anderen vakzinierten Gruppen) ist visuell zu erkennen, dass die Tubuli seminiferi contorti, welche viele differenzierte Keimzellen enthalten, nicht nur morphologisch veränderte Sertoli-Zellkerne (Graphik 4, Graphik 14), Spermatogonien und Spermatozyten enthalten, sondern auch physiologisch erscheinende birnenförmige Sertoli-Zellkerne sowie kleine Spermatogonien wie es bei den intakten Ebern der Fall ist.

Im Vergleich zu den intakten Ebern besitzen die Tiere der Gruppe 4 ($p < 0,001$) interstitielle Leydig-Zellen, welche pyknotische Erscheinung oder Zeichen von Degeneration besitzen (Abbildung 22, Graphik 10, Graphik 19, Tabelle 17). Ein Zytoplasma ist bei den Tieren der Gruppe 4 ($p < 0,001$) meist wenig oder lichtmikroskopisch erkennbar gar nicht ausgeprägt (Tabelle 16, Graphik 9, Graphik 18). Für die Anzahl der Sertoli-Zellen, die Fläche und die Anzahl der Mitosen der Tubuli seminiferi contorti siehe Tabelle 10.

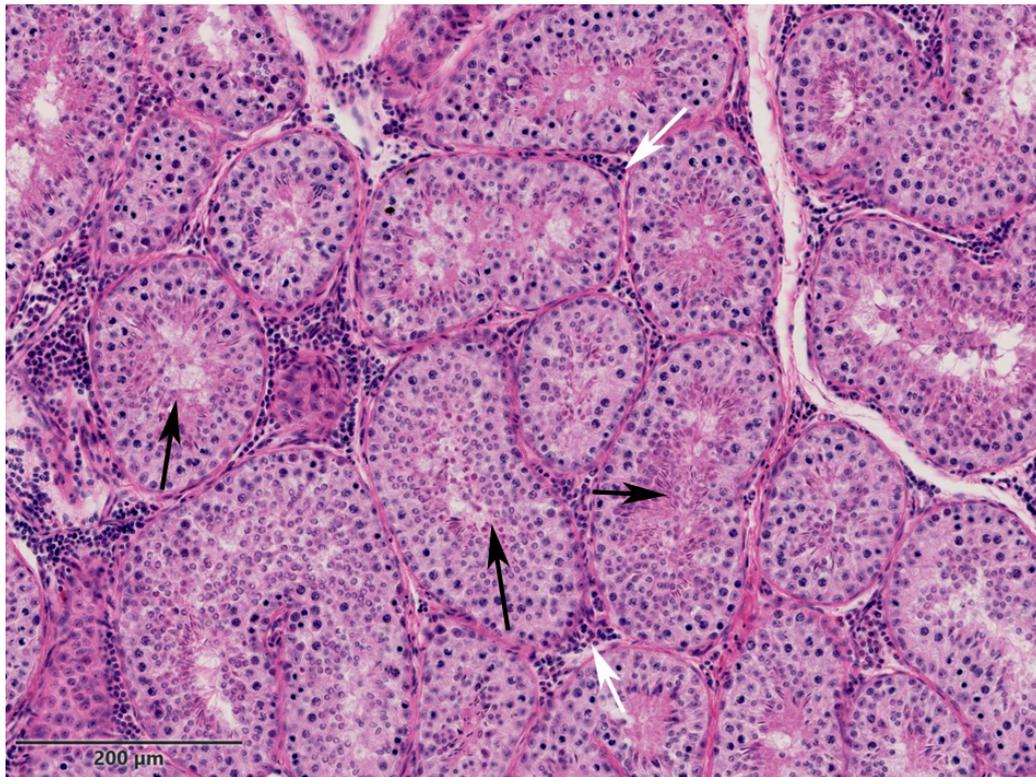


Abbildung 20: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines Tieres aus Gruppe 4. H.E.-Färbung.

Es sind viele differenzierte Keimzellen in den Tubuli seminiferi contorti zu erkennen. Im interstitiellen Bereich sind viele pyknotische Leydig-Zellen mit wenig oder gar keinem Zytoplasma zu sehen. Schwarzer Pfeil: Tubuli, weißer Pfeil: Leydig-Zellen.

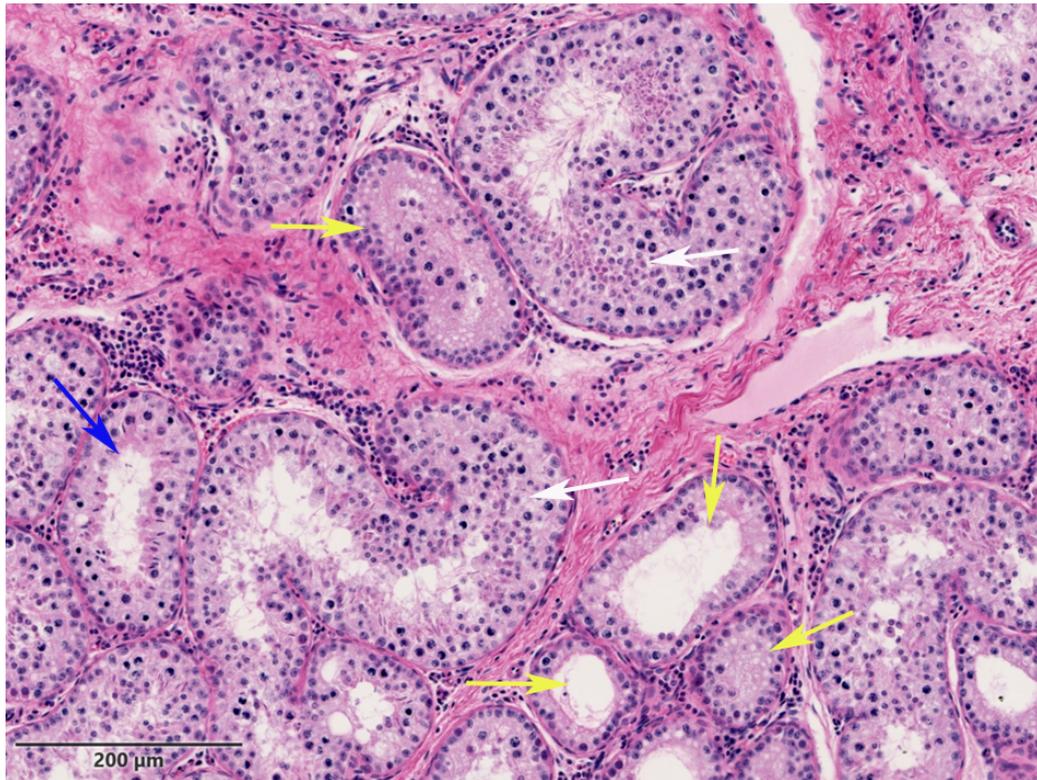


Abbildung 21: Übersichtsaufnahme des gleichen Tieres der Gruppe 4 (Abbildung 20). H.E.-Färbung.

Zu erkennen ist ein deutlich verändertes Keimepithel. Einige Tubuli sehen aus wie die der intakten Eber aus Gruppe 1 (weißer Pfeil). Tubuli seminiferi contorti besitzen häufig wenige differenzierte Keimzellen (blauer Pfeil), aber auch Tubuli seminiferi contorti mit nur einer prominenten Reihe an Sertoli-Zellkernen und veränderten Spermatogonien und Spermatozyten (gelber Pfeil).

**Weißer Pfeil: Tubuli seminiferi contorti mit viel Keimepithel.
Blauer Pfeil: Tubuli mit wenigen differenzierten Keimzellen.
Gelber Pfeil: Tubuli mit überwiegend Spermatogonien und Spermatozyten.**

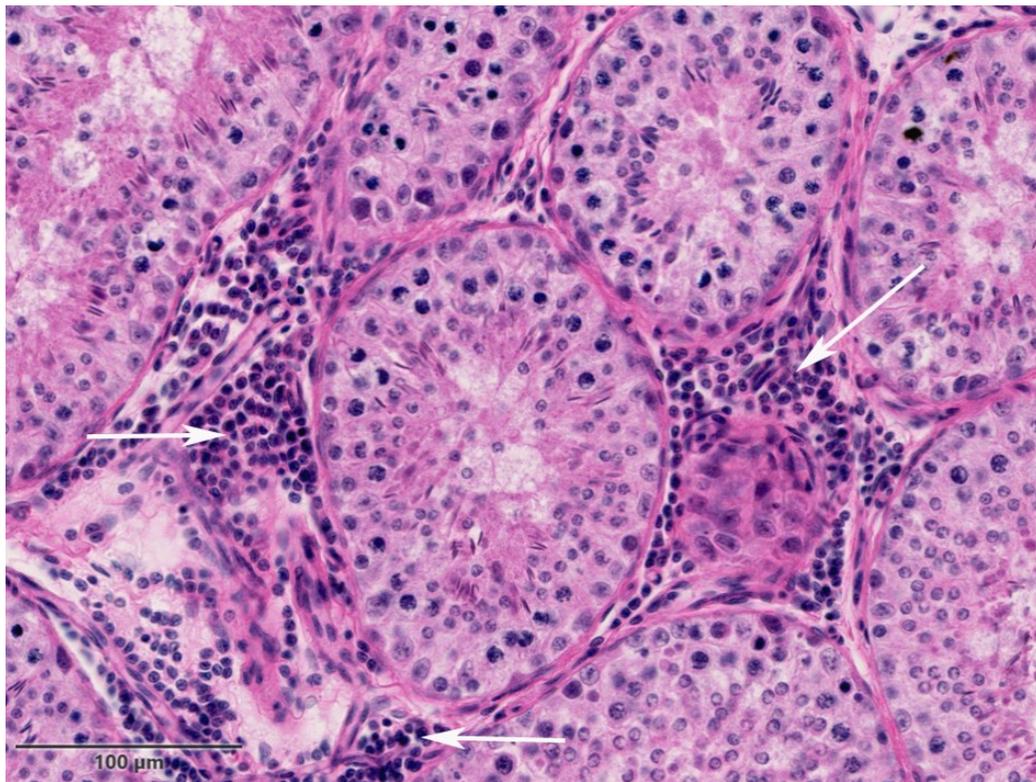


Abbildung 22: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines anderen Tieres aus Gruppe 4. H.E.-Färbung.

Das Keimepithel besitzt viele differenzierte Keimzellen. Leydig-Zellen haben pyknotische Zellkerne, ein Zytoplasma ist gar nicht oder nur wenig enthalten (weißer Pfeil).

Tabelle 10: Gruppe 4, Medianwerte für Sertoli-Zellen, Fläche, Mitosen und Tubuli pro Gesichtsfeld

Gruppe 4		Sertoli-Zellen pro Tubulus	Fläche pro Tubulus μm^2	Mitosen pro Tubulus	Tubuli pro Gesichtsfeld
Perzentile	25%	29,00	9554,91	2,00	15,50
	50%	32,00	15270,08	6,00	18,00
	75%	38,75	25017,85	15,00	24,50

Medianwert = 50%. 25% und 75% beschreiben die IQR (Interquartilsrange), also die berechneten Werte im Bereich zwischen 25% und 75%.

1.1.4. Vakzinierte Tiere der Gruppe 5

Die vakzinierten Tiere der Gruppe 5 können in zwei Gruppen eingeteilt werden:

1. Fünf Tiere der Gruppe 5 (5b) besitzen Tubuli seminiferi contorti und Leydig-Zellen, welche denen der intakten Eber ähneln. Jedoch ist hier ein ausgeprägteres Keimepithel mit größeren Tubuli seminiferi contorti vorhanden (Abbildung 23, Abbildung 24, Graphik 1, Graphik 2, Graphik 3, Graphik 8, Graphik 12, Graphik 13, Graphik 15, Tabelle 12, Tabelle 18).
2. Zwei Tiere der Gruppe 5 (5a) besitzen eine ähnliche Hodenmorphologie wie die vakzinierten Tiere der Gruppen 2 bis 4 (Abbildung 25, Tabelle 11, Tabelle 18).

Die Tiere der Gruppe 5b mit eberähnlichem Aussehen besitzen im Vergleich zu den vakzinierten Tieren der Gruppe 2 bis 5a größere Tubuli seminiferi contorti ($p = 0,165$), weniger Sertoli-Zellen ($p = 0,247$), mehr kleine ($p = 0,027$) und weniger große Spermatogonien ($p = 0,027$) sowie höhere Mitoseraten ($p = 0,105$) und mehr Reihen an Keimepithel ($p = 0,025$). Im Vergleich zu den vakzinierten Tieren der Gruppe 2 bis 5a ähnelt das Leydig-Zellzytoplasma ($p = 0,230$) und der Nukleus eher denen der intakten Eber ($p = 0,129$).

Zusammengefasst ist erkennbar, dass das Keimepithel der vakzinierten Tiere der Gruppen 2 bis 5a, verglichen mit den intakten Ebern, folgende Merkmale aufweist:

3. Kleine Tubuli seminiferi contorti ($p = 0,047$) (Graphik 1, Graphik 2, Graphik 12, Graphik 13).
4. Eine basale Reihe mit veränderten runden/ovalen Sertoli-Zellkernen, die in ihrer Anzahl ($p = 0,032$) erhöht sind (Graphik 4, Graphik 14).
5. Wenige kleine Spermatogonien ($p = 0,004$) (Graphik 5, Graphik 16), dafür jedoch veränderte, große Spermatogonien ($p = 0,004$) (Graphik 7, Graphik 17) und veränderte Spermatozyten. Die veränderten Spermatozyten sehen meist aus wie die großen Spermatogonien auf der Basalmembran, ohne die sonst typischen Chromatinverdichtungen.

6. Verringerte Mitose-Aktivität ($p = 0,021$), sowie weniger Keimzellreihen ($p = 0,014$) in den Tubuli seminiferi contorti (Graphik 3, Graphik 8, Graphik 15).
7. Je nach Ausprägung gibt es Tubuli, die zusätzlich wenige bis viele physiologisch erscheinende Spermatozyten sowie runde Spermatiden enthalten.
8. Die Leydig-Zellen besitzen meist pyknotische oder degenerative Zellkerne mit wenig Zytoplasma (Graphik 9, Graphik 10, Graphik 18, Graphik 19).

Zusätzlich können je nach Menge der differenzierten Keimzellzahlen und -reihen neben großen Spermatogonien (Graphik 7, Graphik 17) auch mittelgroße (Graphik 6, Tabelle 20) und kleine Spermatogonien (Graphik 5, Graphik 16) sowie physiologisch erscheinende birnenförmige Sertoli-Zellkerne beobachtet werden. Für die Anzahl der Sertoli-Zellen, die Fläche und die Anzahl der Mitosen der Tubuli seminiferi contorti siehe Tabelle 11 und Tabelle 12

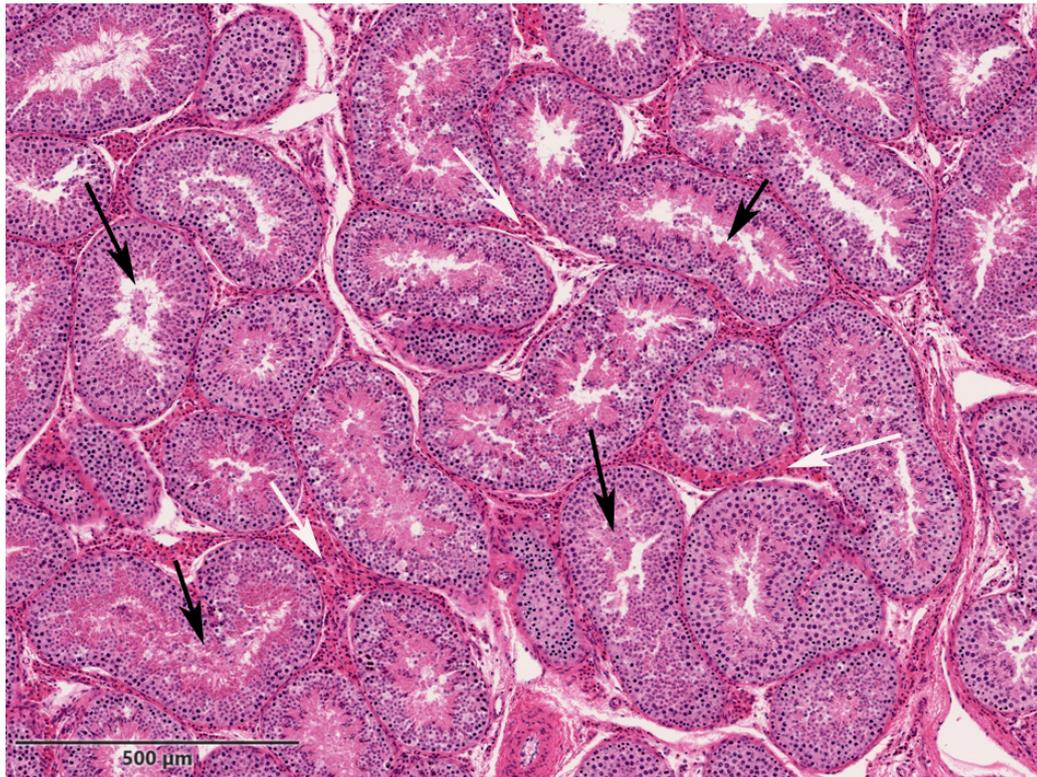


Abbildung 23: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines Tieres aus Gruppe 5. H.E.-Färbung.

Zu sehen sind Tubuli seminiferi contorti mit einem stark ausgeprägten Keimepithel (schwarzer Pfeil). Im Interstitium befinden sich Leydig-Zellen mit viel Zytoplasma und polygonalen Zellkernen (weißer Pfeil). Schwarzer Pfeil: Tubuli, weißer Pfeil: Leydig-Zellen.

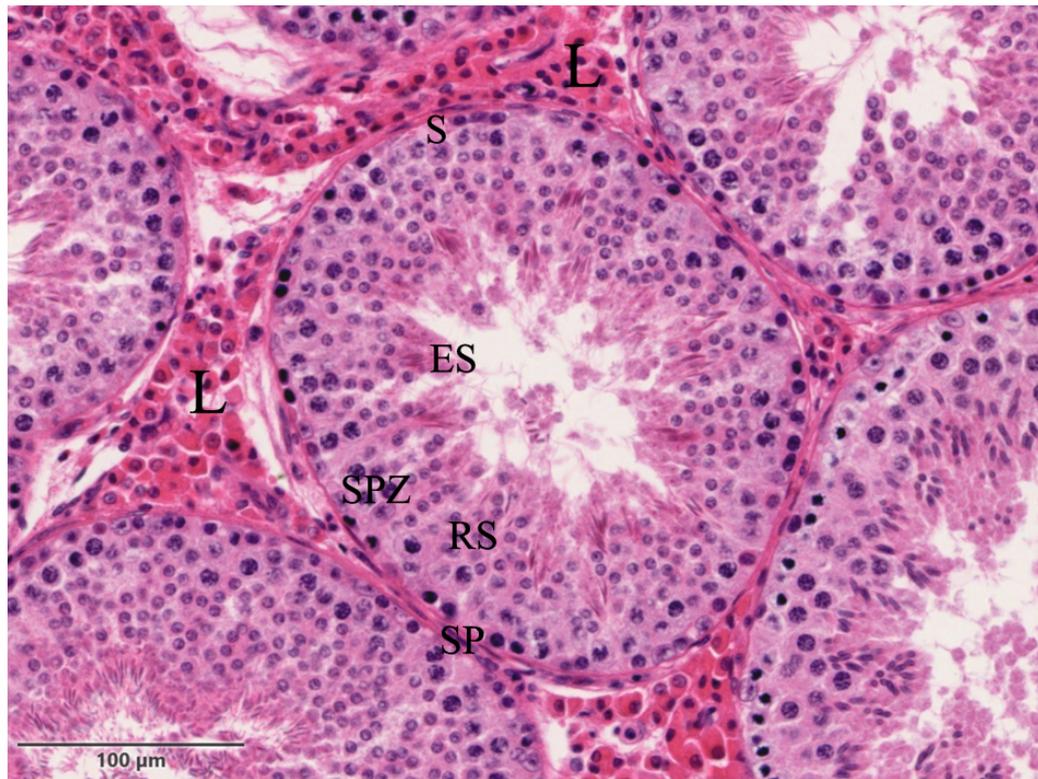


Abbildung 24: Übersichtsaufnahmen der Tubuli seminiferi contorti eines Tieres aus Gruppe 5. H.E.-Färbung.

Dieses Tier hat viele geordnete Reihen an Keimzellen. Große Gruppen an Leydig-Zellen befinden sich im Interstitium. L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden, ES: Elongierte Spermatiden.

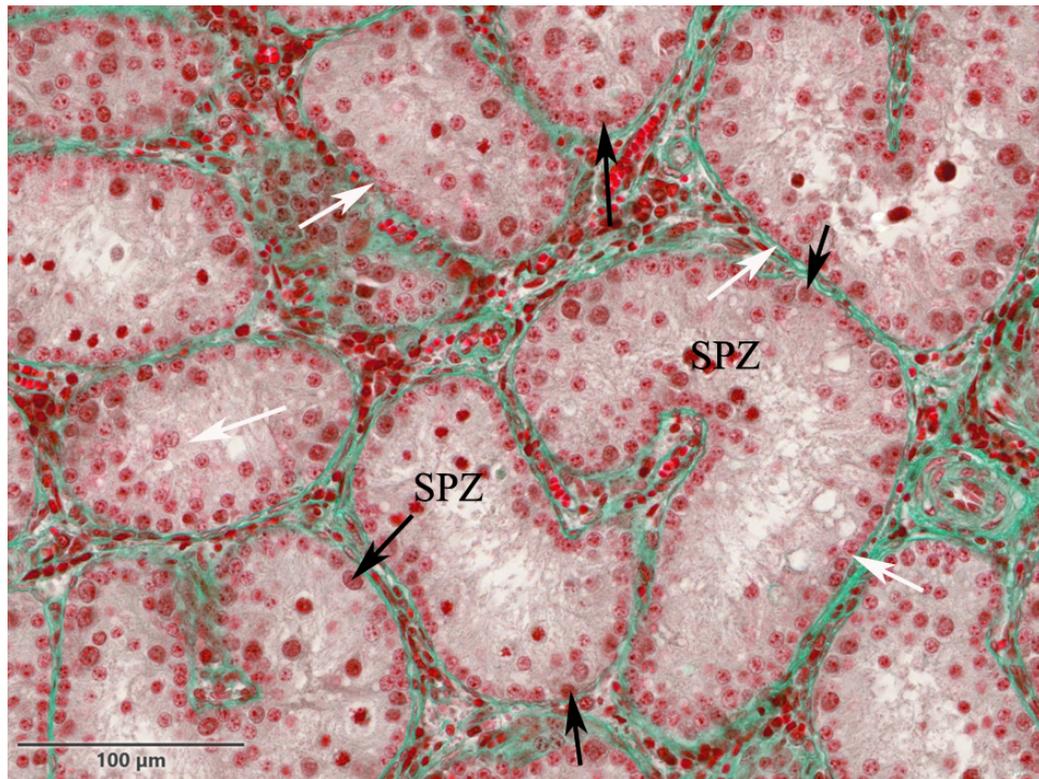


Abbildung 25: Übersichtsaufnahme eines Tieres aus Gruppe 5. Trichrom-Färbung nach Masson und Goldner.

Basal befinden sich „perlschnurartig“ aufgereiht verändert aussehende Sertoli-Zellkerne. Dazwischen liegen veränderte große Spermatogonien sowie veränderte und physiologisch aussehende Spermatozyten im Lumen. Schwarzer Pfeil: veränderte, große Spermatogonien, weißer Pfeil: veränderte Sertoli-Zellkerne, SPZ: Spermatozyten.

Tabelle 11: Gruppe 5a, Medianwerte für Sertoli-Zellen, Fläche, Mitosen und Tubuli pro Gesichtsfeld

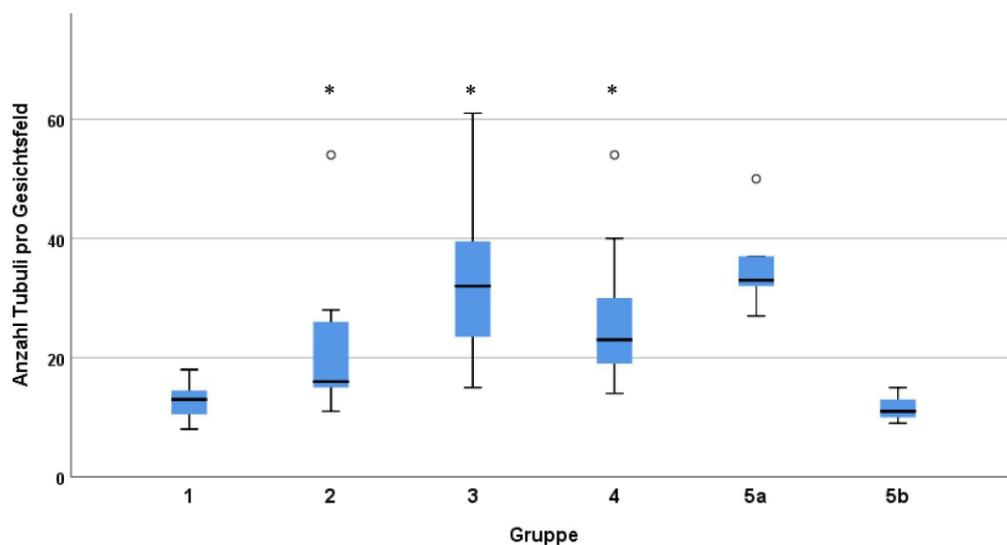
Gruppe 5a	Sertoli-Zellen pro Tubulus	Fläche pro Tubulus μm^2	Mitosen pro Tubulus	Tubuli pro Gesichtsfeld
25%	23,50	12288,22	9,00	11,00
50%	33,00	16913,61	15,00	15,00
75%	38,75	25745,19	26,75	20,00

Medianwert = 50%. 25% und 75% beschreiben die IQR (Interquartilsrange), also die berechneten Werte im Bereich zwischen 25% und 75%.

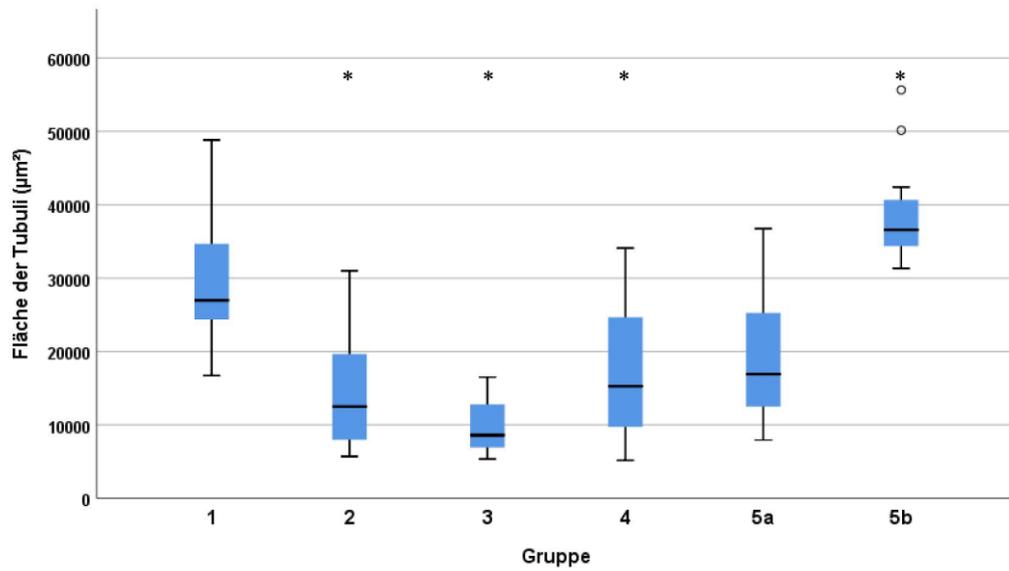
Tabelle 12: Gruppe 5b, Medianwerte für Sertoli-Zellen, Fläche, Mitosen und Tubuli pro Gesichtsfeld

Gruppe 5b	Sertoli-Zellen pro Tubulus	Fläche pro Tubulus μm^2	Mitosen pro Tubulus	Tubuli pro Gesichtsfeld
25%	17,00	34312,05	0,00	10,00
50%	20,50	36581,58	13,50	11,00
75%	22,00	41365,19	87,00	12,25

Medianwert = 50%. 25% und 75% beschreiben die IQR (Interquartilsrange), also die berechneten Werte im Bereich zwischen 25% und 75%.

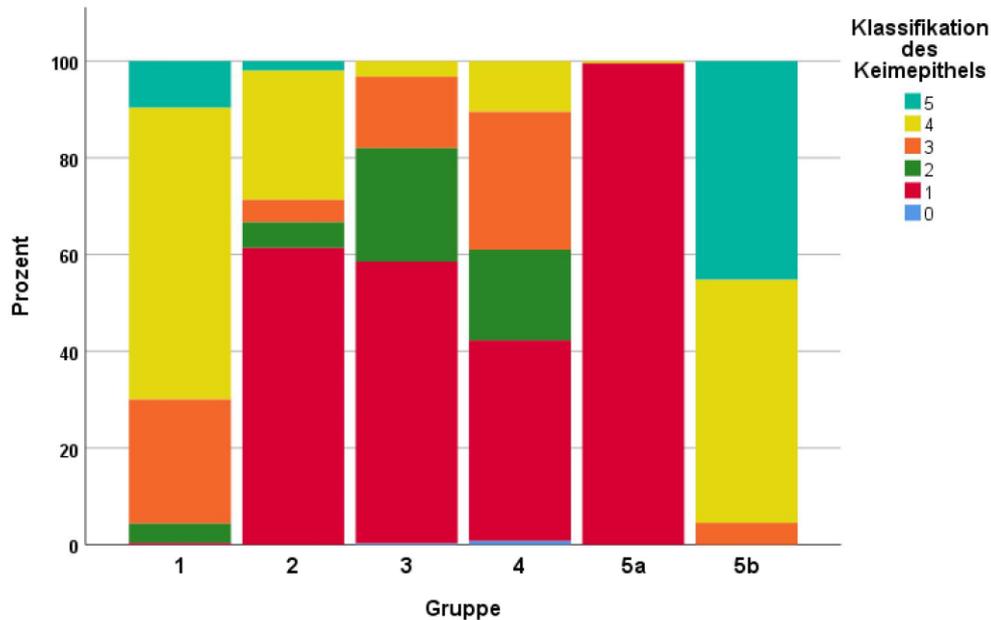


Graphik 1: Anzahl der Tubuli seminiferi contorti pro Gesichtsfeld. Sowohl bei den intakten Ebern als auch bei den vakzinierten Tieren der Gruppe 5b sind weniger Tubuli seminiferi contorti pro Gesichtsfeld vorhanden. Im Gegensatz dazu besitzen die Tiere der Gruppen 2 bis 5a deutlich mehr Tubuli seminiferi contorti pro Gesichtsfeld. *Gruppe 2 ($p = 0,008$), Gruppe 3 ($p < 0,001$) und Gruppe 4 ($p < 0,001$) zeigen hoch-signifikante Unterschiede im Vergleich zur Gruppe 1.



Graphik 2: Fläche der Tubuli seminiferi contorti.

***Tiere der Gruppe 2 ($p = 0,002$), Gruppe 3 ($p < 0,001$) und Gruppe 4 ($p = 0,020$) besitzen signifikant kleinere Tubulusflächen, Gruppe 5b ($p = 0,049$) signifikant höhere Tubulusflächen im Vergleich zu den intakten Ebern.**



Graphik 3: Keimepithel der Tubuli seminiferi contorti.

Zu sehen ist hier der Gehalt an Keimzellen im Keimepithel. Während die vakzinieren Tiere der Gruppe 2 (61,3%), 3 (58,3%) und 4 (41,5%) sowie anteilig die Gruppe 5a (99,5%) ein Keimepithel mit überwiegend Spermatogonien und Spermatozyten besitzen, so haben die intakten Eber ein Keimepithel mit vielen Keimzellen in geordneten Reihen. Vergleichsweise besitzen Tiere der Gruppe 5b sehr viele geordnete Keimepithelreihen (45,2%). Die intakten Eber besitzen im Gegensatz nur zu 9,7% viele geordnete Keimzellreihen. Bis auf Gruppe 2 besitzen alle Tiere signifikante bis hoch-signifikante Unterschiede bezüglich des Keimepithels im Vergleich zu den intakten Ebern der Gruppe 1. Gruppe 2 ($p = 0,054$), Gruppe 3 ($p < 0,001$), Gruppe 4 ($p = 0,001$), Gruppe 5a ($p < 0,001$), Gruppe 5b ($p = 0,010$). Für die Klassifikation siehe Tabelle 5 im Material und Methodenteil sowie Tabelle 18 im Anhang.

1.2. Immunhistochemischer Nachweis von Sox-9 im Hoden intakter und vakzinierter Eber

Der Antikörper gegen Sox-9 zeigt bei allen Tieren im Nukleus, an der Zellkernmembran und im Zytoplasma der Sertoli-Zellen positive Immunreaktionen. Zusätzlich zeigen die Spermatidenköpfe von elongierenden Spermatiden eine positive Sox-9 Reaktion (Tabelle 14, Tabelle 15).

1.2.1. Immunhistochemischer Nachweis von Sox-9 im Hoden intakter Eber der Gruppe 1

Bei den intakten Ebern ist der Nachweis für Sox-9 im Zellkern der Sertoli-Zellen stärker als im Zytoplasma (Abbildung 26). Das Sertoli-Zellzytoplasma, welches die Keimzellen umgibt, besitzt einen schwachen Nachweis für Sox-9. Bei Stellen, an denen das Sertoli-Zellzytoplasma kleinere Spermatogonien auf der Basalmembran umgibt, hat es eine deutlich stärkere Immunreaktion, als das Keimzellen umgebende Sertoli-Zellzytoplasma in anderen Bereichen. In den Sertoli-Zellen sind Sox-9 positive Reaktionen zu erkennen, welche vom Sertoli-Zellkern perpendikulär in Richtung Lumen ziehen (Abbildung 27, Abbildung 28). Elongierende Spermatiden haften diesen an.

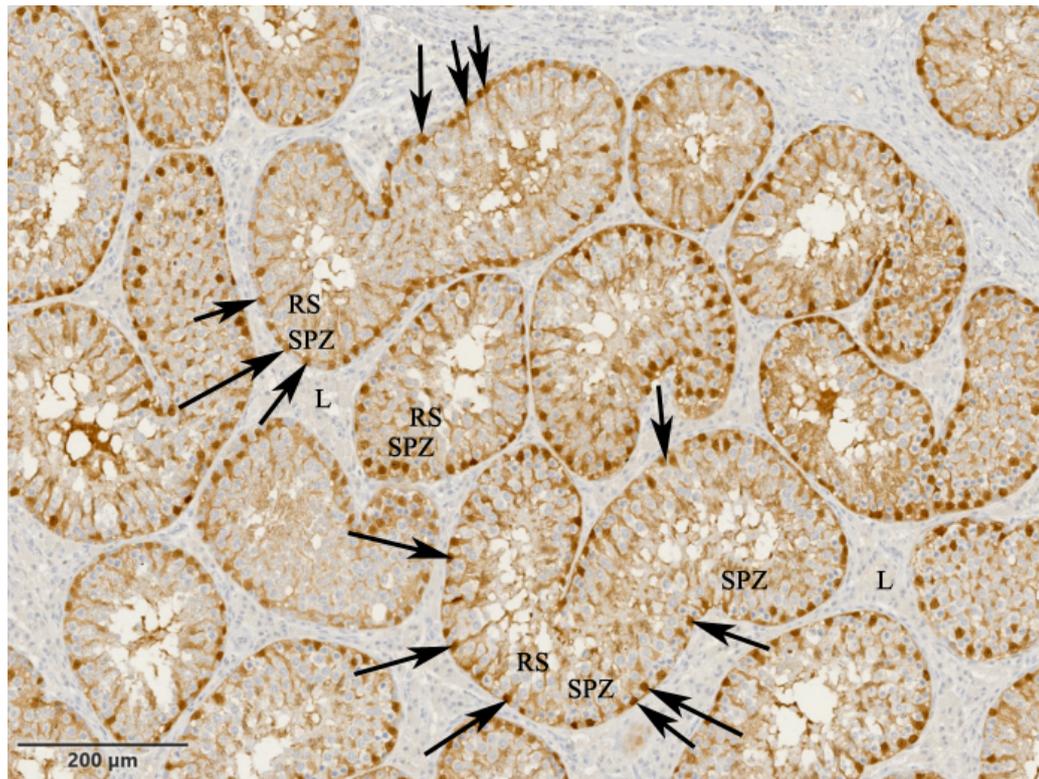


Abbildung 26: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines intakten Ebers; Sox-9.

Zu erkennen sind die stark-positiven Reaktionen für den Antikörper gegen Sox-9 in den Sertoli-Zellkernen sowie im Zytoplasma. Schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellkerne, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatozoen, L: Leydig-Zellen.

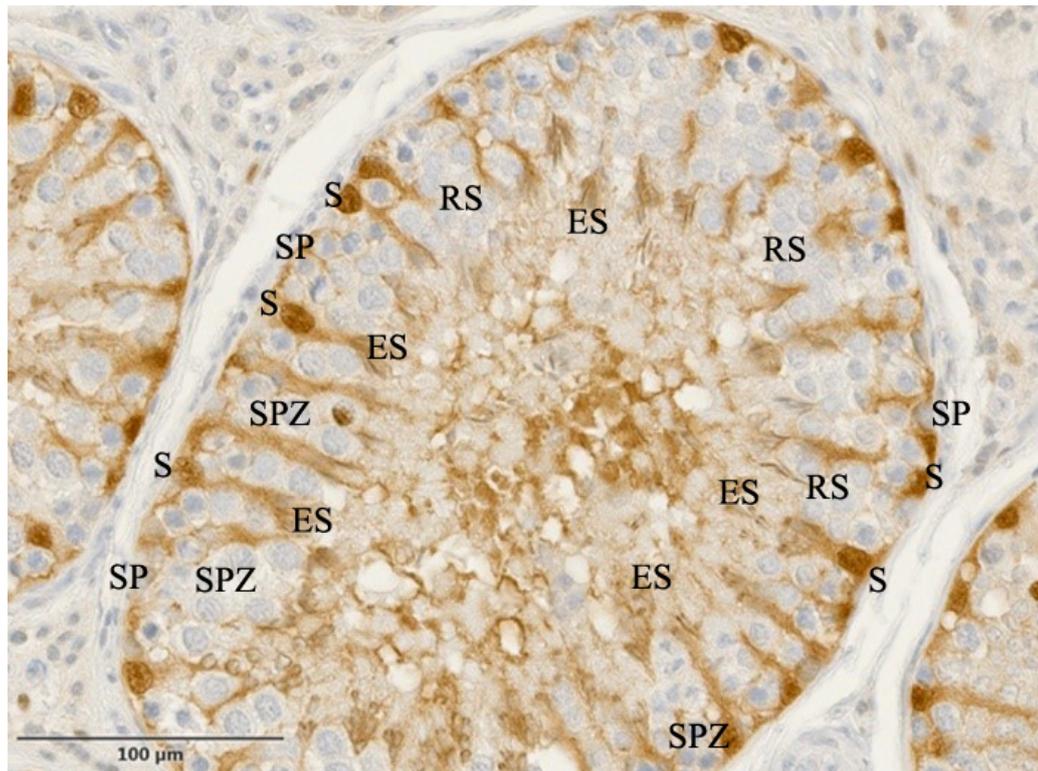


Abbildung 27: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines intakten Ebers; Sox-9.

Zu erkennen ist hier die deutlich- bis stark-positive Sox-9-Reaktion an den Zellkernen sowie im Zytoplasma von Sertoli-Zellen. Elongierte Spermatiden haften am Zytoplasma von Sertoli-Zellen an. S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden, ES: elongierte Spermatiden.

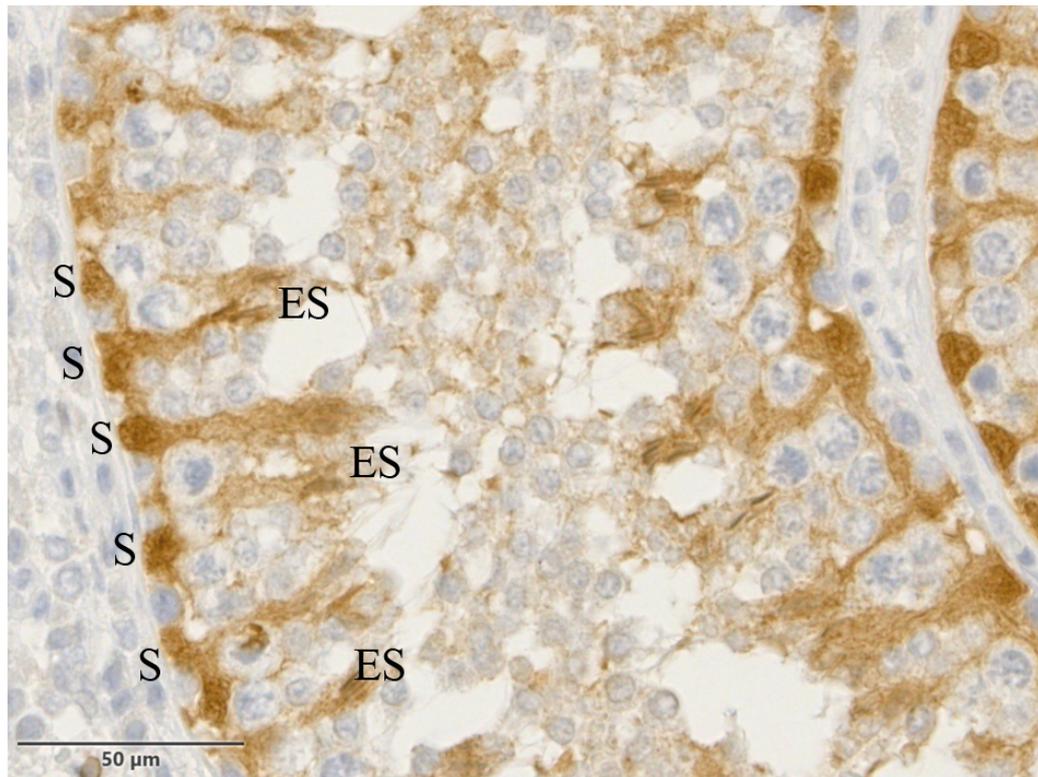


Abbildung 28: Übersichtsaufnahme des Keimepithels eines intakten Ebers; Sox-9.

Sox-9 kann an den Sertoli-Zellkernen und im Zytoplasma mit den perpendikulären Zytoplasmareaktionen, an welchen elongierte Spermatiden haften, nachgewiesen werden. S: Sertoli-Zellkerne, ES: elongierte Spermatiden.

1.2.2. Immunhistochemischer Nachweis von Sox-9 im Hoden immunologisch vakzinierter Eber (Gruppe 2 bis 5)

Im Gegensatz zu den intakten Ebern der Gruppe 1 ist der Zellkern von Sertoli-Zellen bei den vakzinierten Tieren stärker Sox-9-positiv. Besonders in den Gruppen 2 (Abbildung 29) und 3 (Abbildung 30), die im Vergleich zu den intakten Ebern nur wenige oder morphologisch veränderte Keimzellen haben, ist eine starke Sox-9-Immunreaktion im Sertoli-Zellzytoplasma zu finden. Häufig sind positive Sox-9-Nachweise homogen im ganzen Sertoli-Zellzytoplasma zu finden. Ein Lumen ist hier in den Tubuli häufig nicht zu sehen. Zusätzlich sind viele Vakuolen im Sertoli-Zytoplasma zu finden.

Irregulär verlaufende, Sox-9-positive Immunreaktionen sind in Sertoli-Zellen zu erkennen, welche vom Nukleus in alle Richtungen reichen.

Im Allgemeinen ist bei den Tieren der Gruppe 4 (Abbildung 31) eine ähnliche Reaktion wie bei Tieren der Gruppe 2 und 3 in Bezug auf die Tubuli seminiferi contorti zu sehen.

Jedoch haben die Tiere von Gruppe 4 eine subjektive Zunahme der differenzierten Keimzellen und geordnete Keimzellreihen. Im Vergleich zu den Tieren der Gruppe 2 und 3 zeigen Tiere der Gruppe 4 weniger Sertoli-Zellzytoplasma und ein erkennbares Lumen.

Vakzinierte Tiere der Gruppen 2 bis 5a besitzen keine Sox-9-positiven perpendikuläre Sertoli-Zellreaktionen, wie es bei den intakten Ebern der Gruppe 1 zu sehen ist. Hier zeigen die genannten positiven Nachweise eine irreguläre Anordnung. Lediglich ein Tier der Gruppe 2 zeigt ein eberähnliches Aussehen mit ähnlicher Immunreaktion für Sox-9.

Die Tiere der Gruppe 5 können in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Die Gruppe 5b zeigt ein Hodenepithel, welches dem der intakten Eber ähnelt (Abbildung 34, Abbildung 33). Wie auch bei den intakten Ebern und dem Tier aus Gruppe 2 sind hier perpendikuläre Reaktionen vom Sertoli-Zellkern in Richtung Lumen zu erkennen. Spermatidenköpfe sind positiv. Das Sertoli-Zellzytoplasma, welches die Keimzellen umgibt, hat eine schwach-positive Reaktion für Sox-9, während das Sertoli-Zellzytoplasma, welches die Spermatogonien umgibt, stärker positiv ist. Die Gruppe 5a zeigt ein Hodenepithel mit stark-positivem Sertoli-Zell-Nukleus und Zytoplasma sowie ungeordneteren Zytoplasmareaktionen, welche den ganzen Tubulus durchziehen. Zudem treten Vakuolen im Zytoplasma auf (Abbildung 32). Dies gleicht den Tieren der Gruppe 2 bis 4.

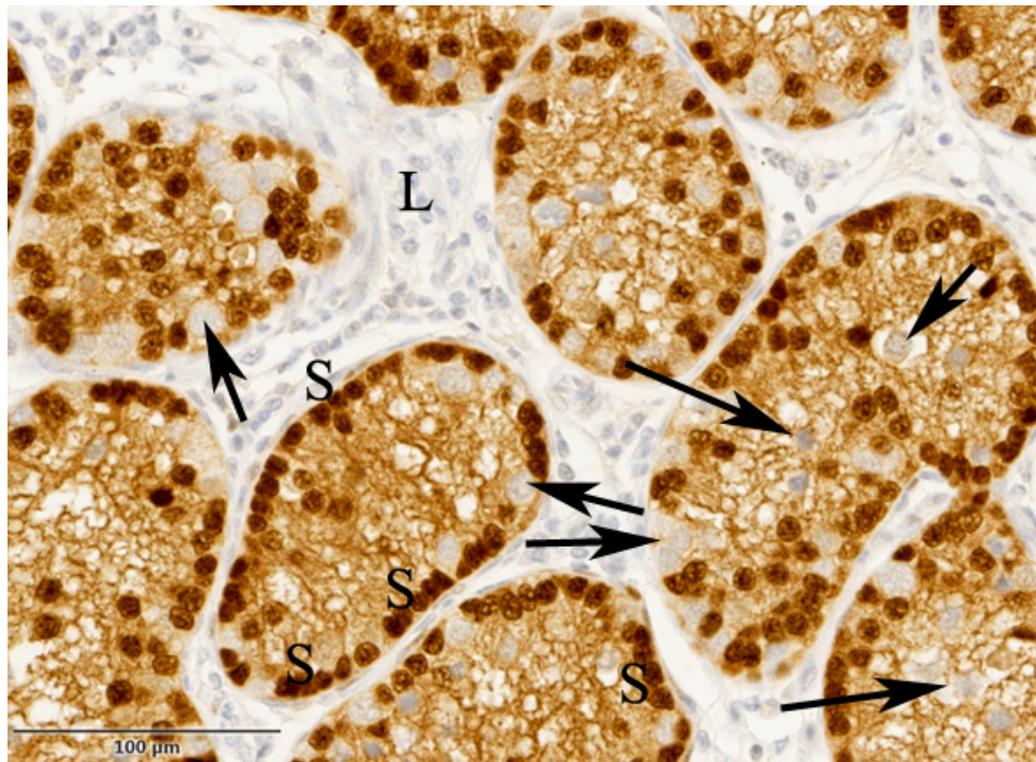


Abbildung 29: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines Tieres aus Gruppe 2; Sox-9.

Die Sertoli-Zellkerne und das Zytoplasma reagieren stark-positiv.

S: Sertoli-Zellkerne, schwarzer Pfeil: veränderte Spermatogonien und Spermatozyten.

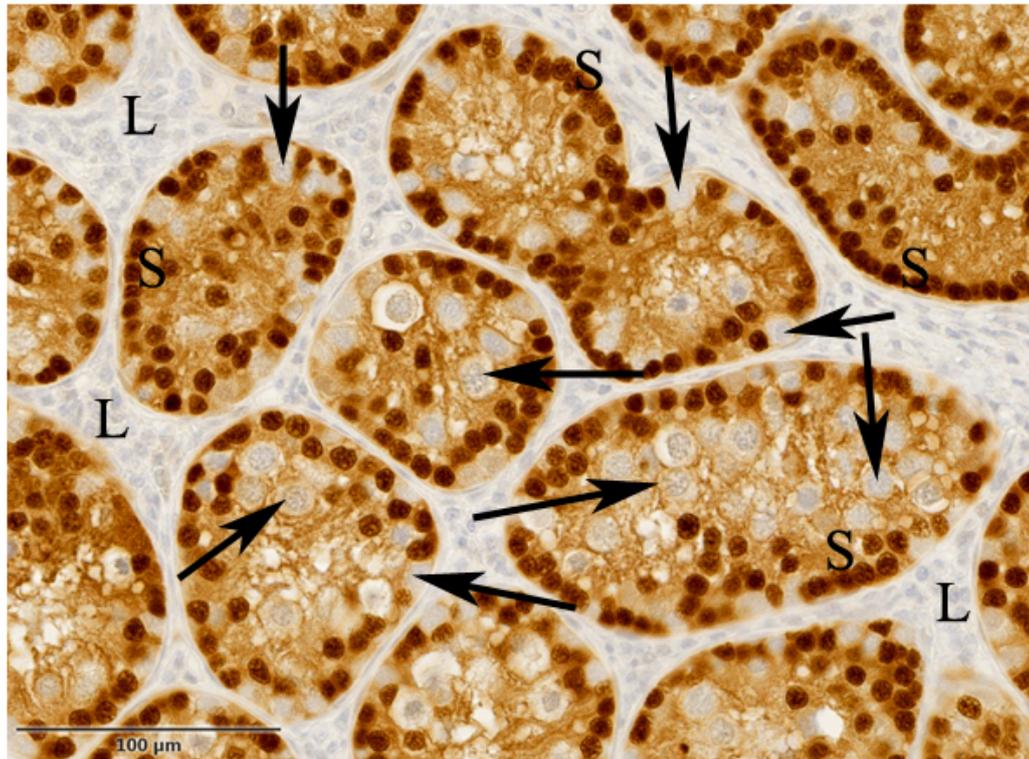


Abbildung 30: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines Tieres aus Gruppe 3; Sox-9.

Auch das Tier der Gruppe 3 zeigt für den Antikörper gegen Sox-9 stark-positive Sertoli-Zellkerne. Zusätzlich sind große Spermatogonien sowie Spermatozyten zu erkennen.

S: Sertoli-Zellkerne. L: Leydig-Zellen, schwarzer Pfeil: veränderte Spermatogonien und Spermatozyten.

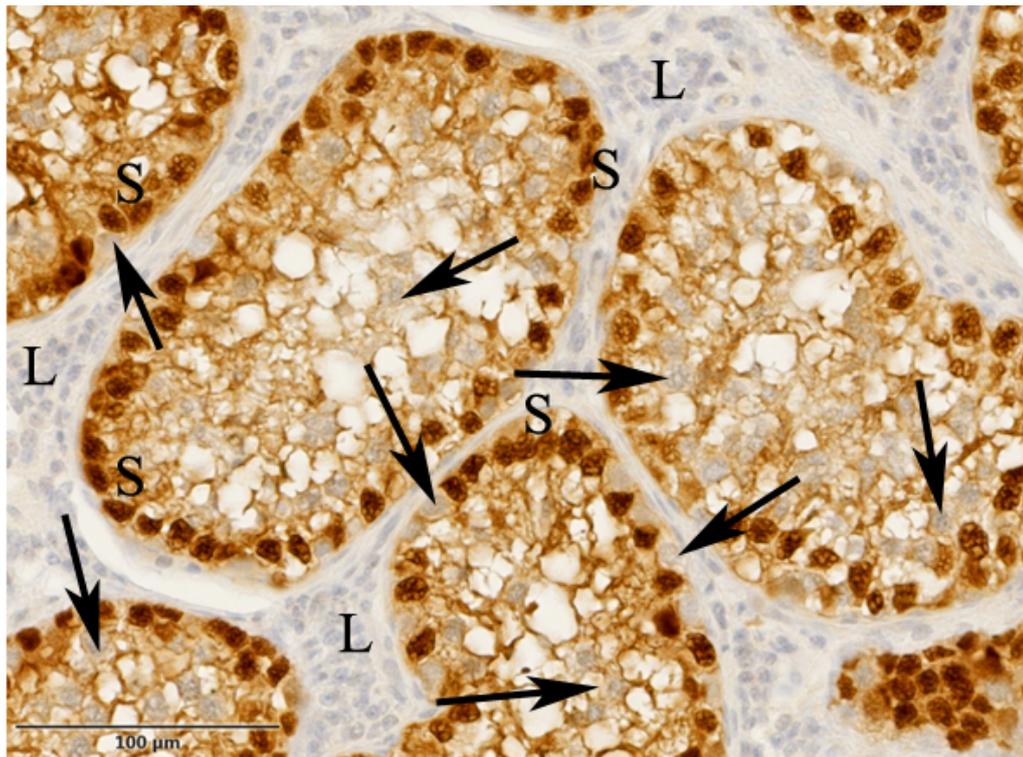


Abbildung 31: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines Tieres aus Gruppe 4; Sox-9.

In dieser Aufnahme sind viele Keimzellen zu erkennen. Das Zytoplasma von Sertoli-Zellen kleidet nicht die kompletten Tubuli aus, sondern ist mit zahlreichen Vakuolen versehen.

S: Sertoli-Zellkerne, L: Leydig-Zellen, schwarzer Pfeil: veränderte Spermatogonien und Spermatozyten.

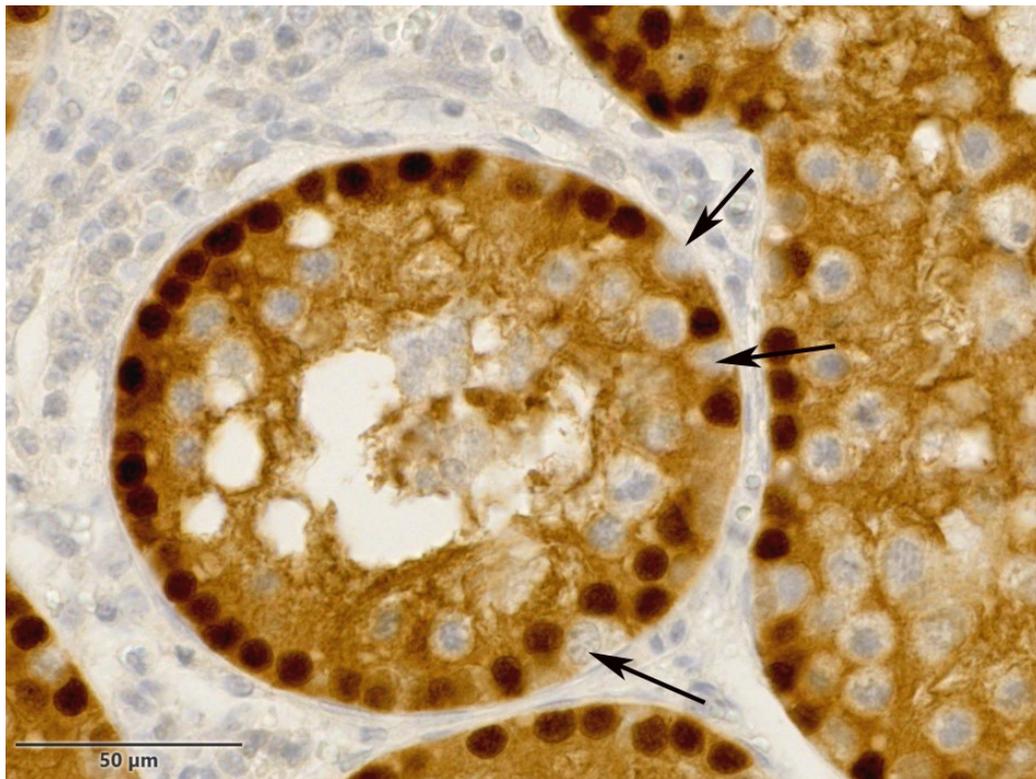


Abbildung 32: Übersichtsaufnahmen der Tubuli seminiferi contorti eines Tieres aus Gruppe 5a; Sox-9.

Die Sertoli-Zellkerne zeigen eine stark-positive Sox-9 Reaktion, ebenso wie das Zytoplasma, welches den Tubulus auskleidet. Auf der Basalmembran sind veränderte Spermatogonien (schwarzer Pfeil) sowie im Lumen Spermatozyten und runde Spermatiden zu erkennen.

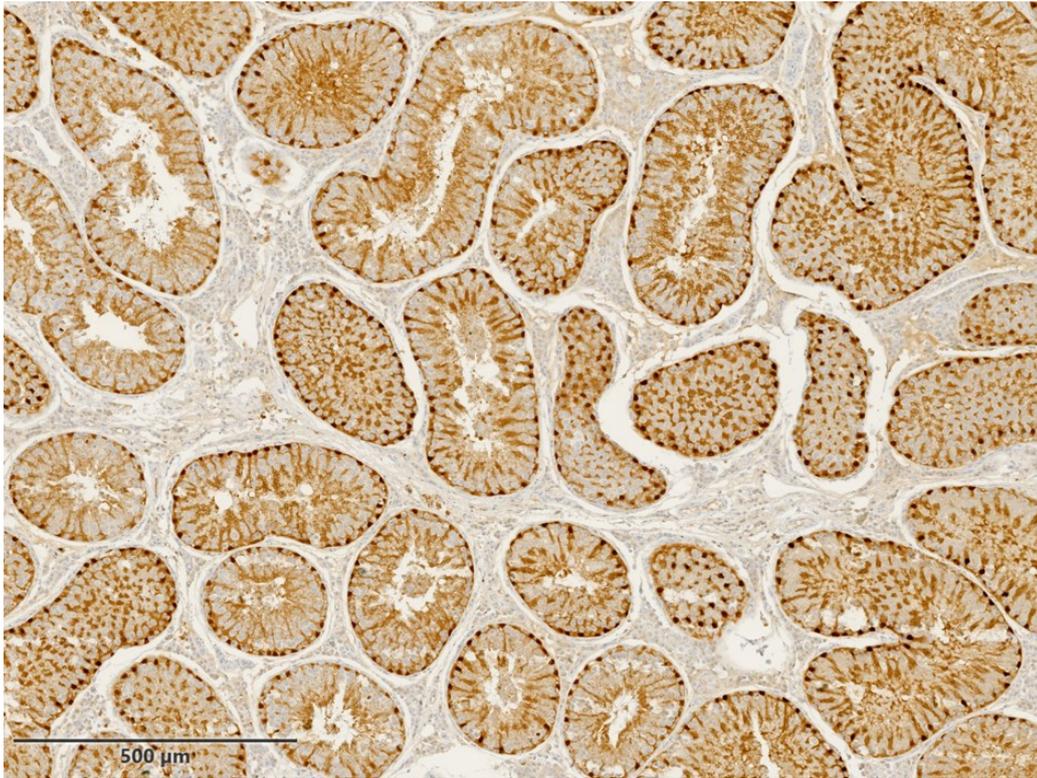


Abbildung 33: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines Tieres aus Gruppe 5b; Sox-9.

Zu erkennen sind die zahlreichen großen Tubuli seminiferi contorti mit starken Sox-9-Reaktionen im Zellkern und im Zytoplasma von Sertoli-Zellen. Es sind viele geordnete Reihen an Keimzellen vorhanden.

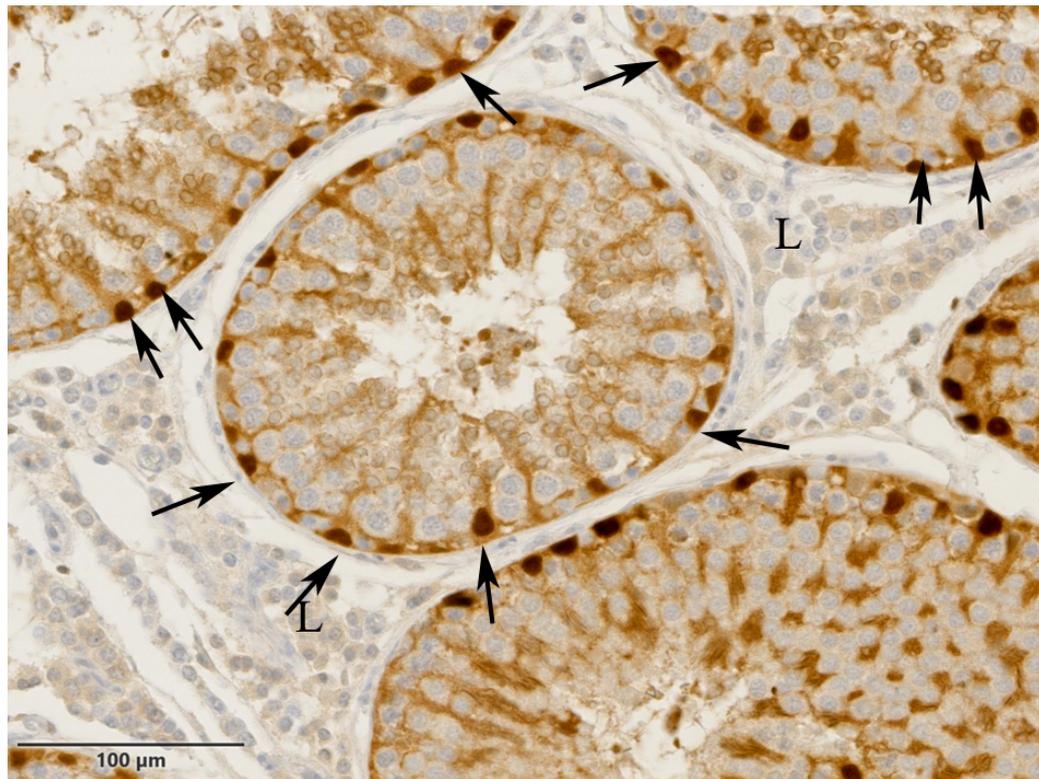
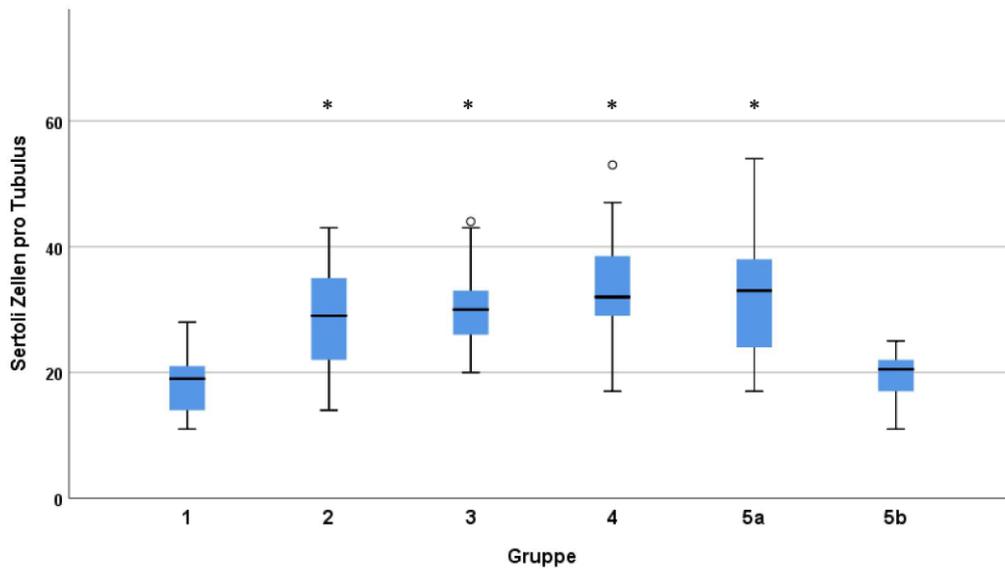


Abbildung 34: Übersichtsaufnahme eines Tieres aus Gruppe 5b; Sox-9. Dieses Tier aus Gruppe 5 ist den intakten Ebern sehr ähnlich. Zu erkennen sind stark-positive Sertoli-Zellkerne (schwarzer Pfeil). Perpendikuläre Sertoli-Zytoplasmareaktionen ziehen Richtung Lumen. Hier befinden sich elongierte Spermatiden. Im Interstitium sind Leydig-Zellen mit polygonalem Zellkern und viel Zytoplasma erkennbar. Schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellkerne, L: Leydig-Zellen.



Graphik 4: Sertoli-Zellen pro Tubulus-Queranschnitt.

Die durchschnittliche Anzahl an Sertoli-Zellen beträgt bei den intakten Ebern 19 Sertoli-Zellen (IQR: 14-21,5) pro Tubulus-Queranschnitt. Das Tier der Gruppe 5b besitzt ebenfalls niedrigere Sertoli-Zellzahlen, ähnlich denen der intakten Eber.

***Bis auf Gruppe 5b besitzen alle Tiere signifikant höhere Sertoli-Zellen als die intakten Eber der Gruppe 1, Gruppe 2 ($p = 0,001$), Gruppe 3 ($p < 0,001$), Gruppe 4 ($p < 0,001$), Gruppe 5a ($p = 0,001$).**

1.3. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin im Hoden intakter und vakzinierter Eber

Vimentin kann in Sertoli-Zellen, peritubulären Myoepithelzellen und Endothelzellen nachgewiesen werden. Zusätzlich sind Vimentin-positive Reaktionen in einzelnen Fibrozyten und Leydig-Zellen zu finden. In den Keimzellen des Hodenepithels kann Vimentin nicht nachgewiesen werden (Tabelle 14, Tabelle 15).

1.3.1. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin im Hoden intakter Eber der Gruppe 1

Die intakten Eber zeigen eine schwache Reaktion für den Antikörper gegen Vimentin in den Sertoli-Zellen (Abbildung 35). Dort umgibt es die Zellkernmembran. Ebenso zeigen sich Vimentin-positive perpendikuläre Zytoplasmareaktionen in Sertoli-Zellen, welche vom Nukleus Richtung Lumen ziehen. Dort haften elongierende Spermatozoen an (Abbildung 36). Meist überragen die Zytoplasmareaktionen eine, aber auch bis zu drei Keimzellreihen. Einige Sertoli-Zellkerne befinden sich nicht auf der Basalmembran aufliegend, sondern sind in Richtung Lumen in das Keimepithel eingebettet. Wenn dies der Fall ist, ziehen die perpendikulären Reaktionen vom Zellkern ausgehend in Richtung der Basalmembran. Peritubuläre Myoepithelzellen besitzen vereinzelt eine positive Reaktion für den Antikörper gegen Vimentin. Im Interstitium zeigen die Leydig-Zellen einen positiven Vimentin-Nachweis. Dies ist besonders an der Zellkernmembran aber auch im Zytoplasma der Leydig-Zellen zu sehen.

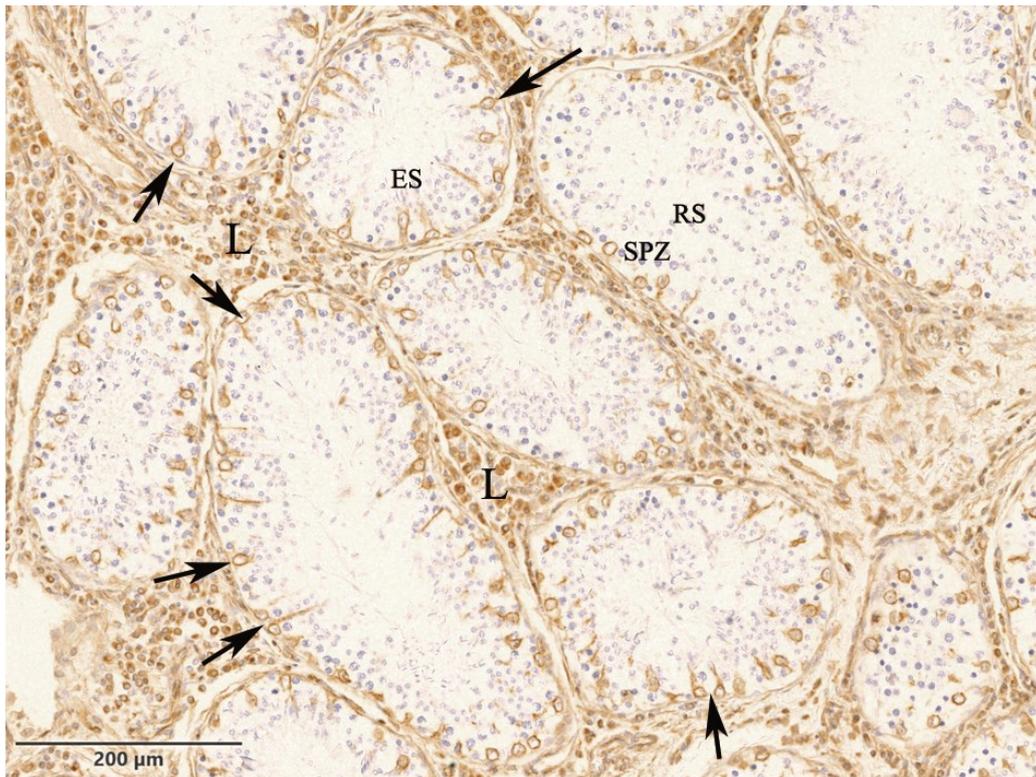


Abbildung 35: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines intakten Ebers; Vimentin.

An den Sertoli-Zellen sind positive Immunreaktionen für den Antikörper gegen Vimentin zu erkennen.

L: Leydig-Zellen, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden, ES: elongierte Spermatiden, schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellkerne.

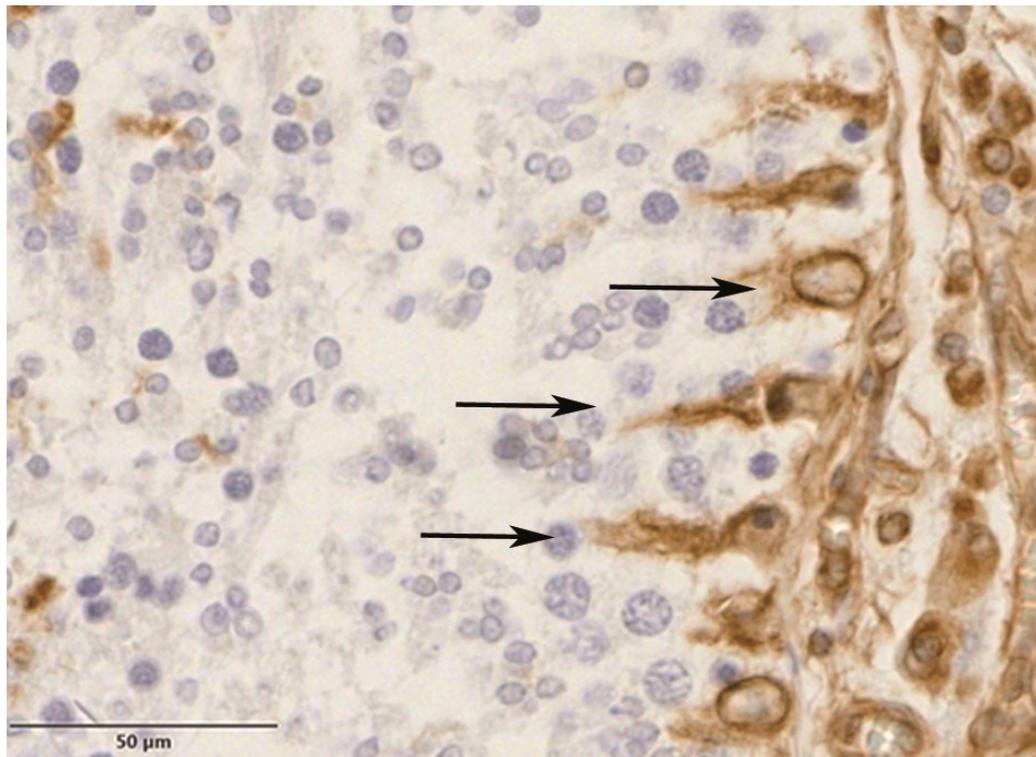


Abbildung 36: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines intakten Ebers aus Gruppe 1; Vimentin.

Zu sehen sind die Vimentin-positiven Immunreaktionen an den Sertoli-Zellen. Besonders ist dies an den Zellkernen und den perpendikulären Zytoplasmareaktionen Richtung Lumen nachzuweisen.

Schwarzer Pfeil: positive Vimentinreaktionen an Sertoli-Zellen.

1.3.2. Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin im Hoden immunologisch vakzinierter Eber (Gruppe 2 bis 5)

Die kastrierten Eber der Gruppe 2 bis 5a, welche nur wenige differenziertere Keimzellstadien besitzen, zeigen im Vergleich zu den intakten Ebern der Gruppe 1 eine starke Vimentin-Reaktion. Auch hier wird Vimentin entlang der Zellkernmembran von Sertoli-Zellen exprimiert. Jedoch zeigen die Vimentin-positiven Sertoli-Zytoplasmareaktionen, die vom Zellkern ausgehen, bei den vakzinierten Tieren eine ungeordnete Orientierung in alle Richtungen und nicht eine perpendikuläre Ausrichtung, wie es bei den intakten Ebern der Fall ist (Abbildung 37, Abbildung 38, Abbildung 39, Abbildung 40).

Ebenso sind die positiven Zytoplasmareaktionen kürzer im Vergleich zu jenen der intakten Eber. Hier durchziehen die Ausläufer meist nur ein oder zwei Reihen an Keimzellen.

In den Tubuli seminiferi contorti von Tieren, bei denen viele verschiedene differenzierte Keimzellstadien geordnet im Keimepithel bis hin zu elongierenden Spermatozoen vorhanden sind, sind auch positive perpendikuläre Zytoplasmareaktionen vom Sertoli-Zellkern in Richtung Lumen zu finden, wie es bei den intakten Ebern der Gruppe 1 der Fall ist. Besonders kann dies in einem Tier der Gruppe 3 gesehen werden, welches die gleiche Erscheinung wie die intakten Eber der Gruppe 1 besitzt. Einige Tiere der Gruppe 4 mit vielen differenzierten Keimzellen sowie ein Teil der Tiere von Gruppe 5b, welche ein Keimepithel wie die intakten Eber besitzen, zeigen positive perpendikuläre Reaktionen vom Sertoli-Zellkern in Richtung Lumen, an welchen elongierende Spermatozoen anhaften. (Abbildung 41, Abbildung 42). Im Vergleich zu den intakten Ebern der Gruppe 1 ist hier die Vimentin Reaktion jedoch stärker.

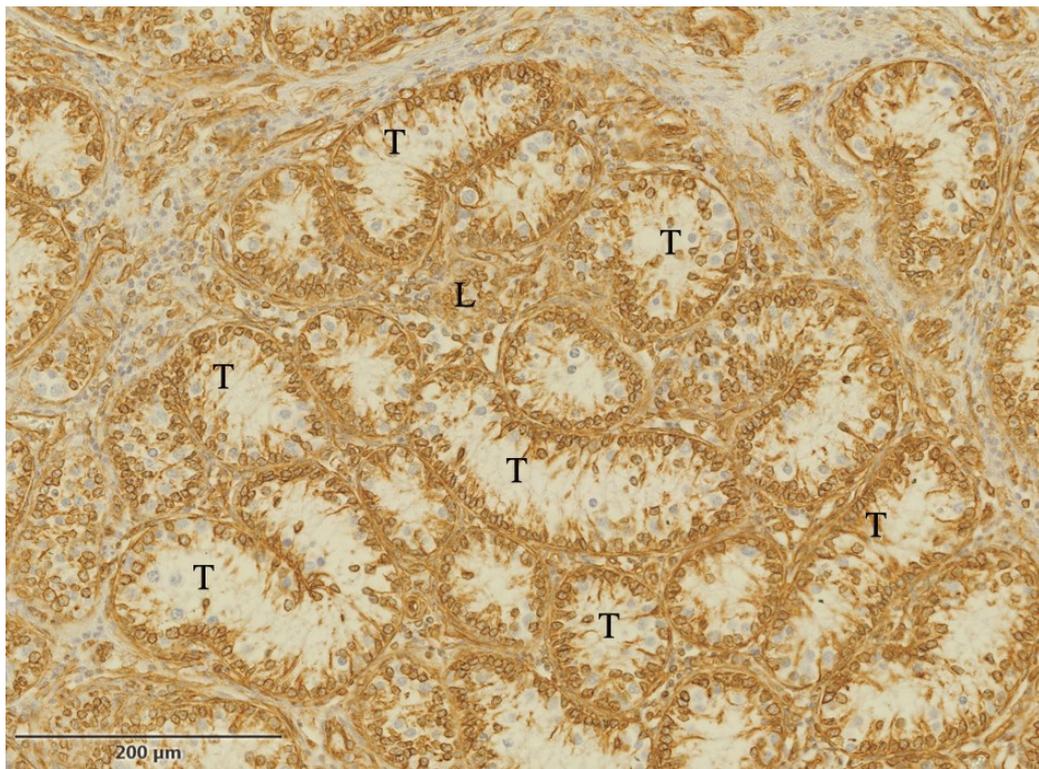


Abbildung 37: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines vakzinierten Ebers aus Gruppe 2; Vimentin.

In den Tubuli seminiferi contorti sind starke Vimentin-Nachweise an den Sertoli-Zellen zu erkennen.

T: Tubuli, L: Leydig-Zellen.

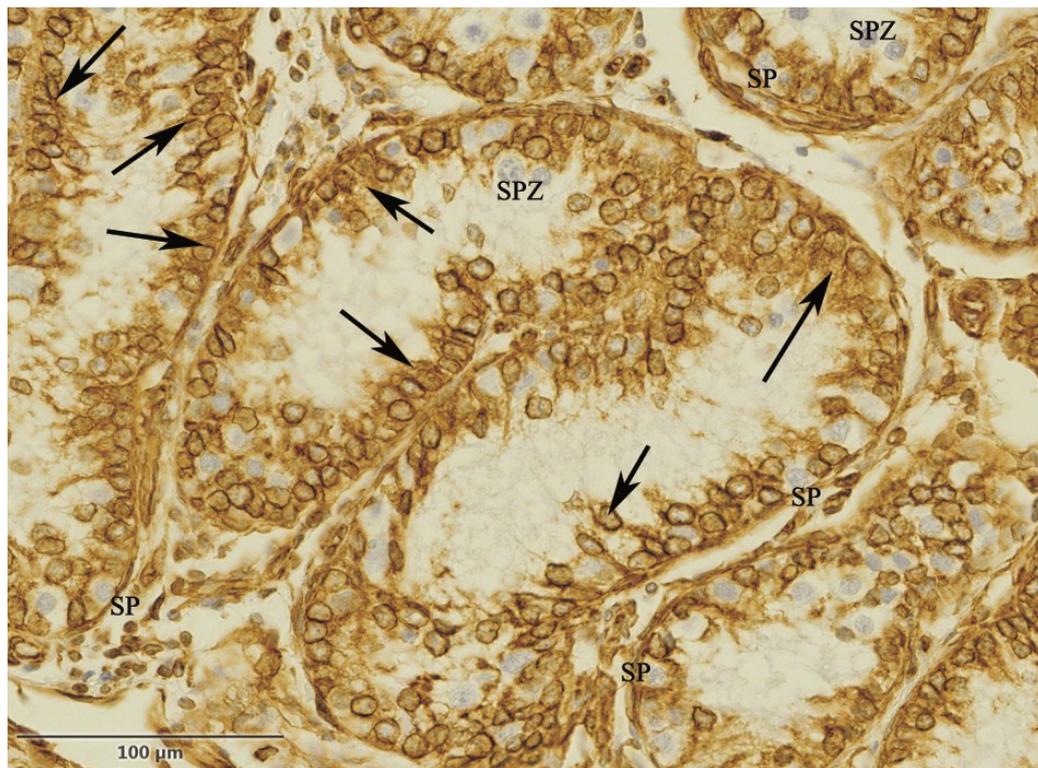


Abbildung 38: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines vakzinierten Ebers der Gruppe 2; Vimentin.

Zu sehen ist eine starke immunhistochemische Reaktion mit dem Antikörper gegen Vimentin an den Sertoli-Zellkernen. Positive Zytoplasmareaktionen ziehen vom Sertoli-Zellkern ungeordnet Richtung Lumen (schwarzer Pfeil). Spermatogonien besitzen keine Reaktion und sind blau gefärbt.

Schwarzer Pfeil: Vimentin-positive Sertoli-Zellreaktionen, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten.

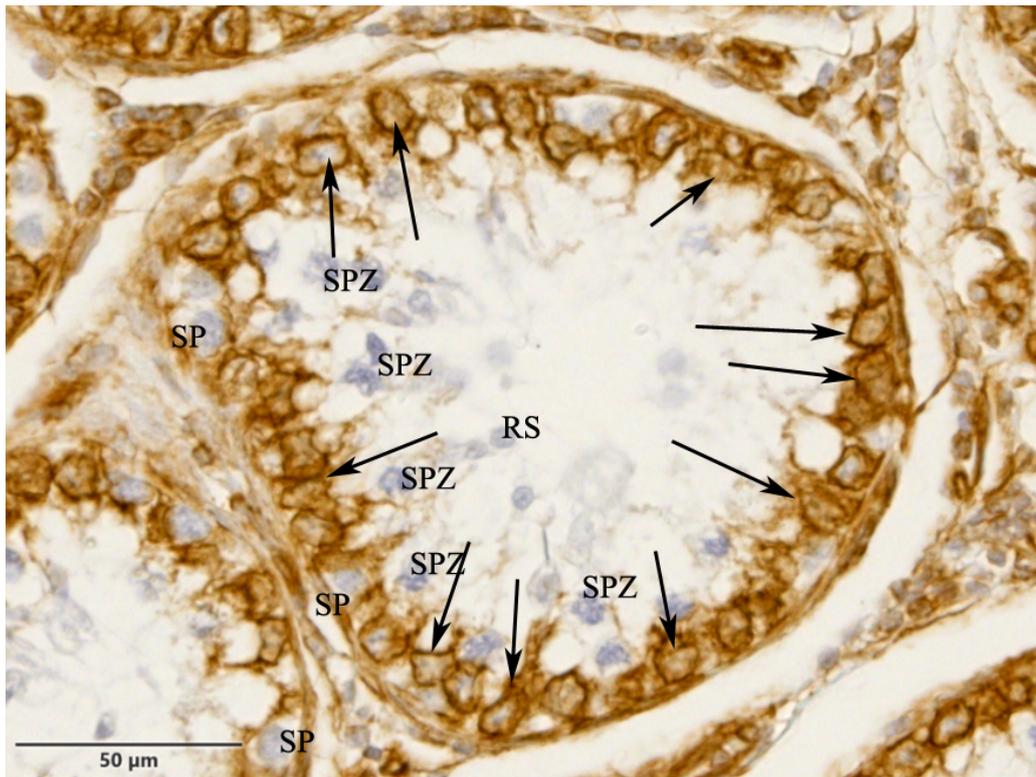


Abbildung 39: Übersichtsaufnahme des Tubulus-Querschnitts eines Tieres aus Gruppe 3; Vimentin.

Auffallend sind hier die stark-positiven und irregulär verlaufenden Vimentin-Reaktionen an den Sertoli-Zellkernen (schwarzer Pfeil). Zwischen den Sertoli-Zellkernen befinden sich blau gefärbte veränderte Spermatogonien. Im Lumen sind einige blau gefärbte Spermatozyten und runde Spermatiden zu sehen.

Schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden.

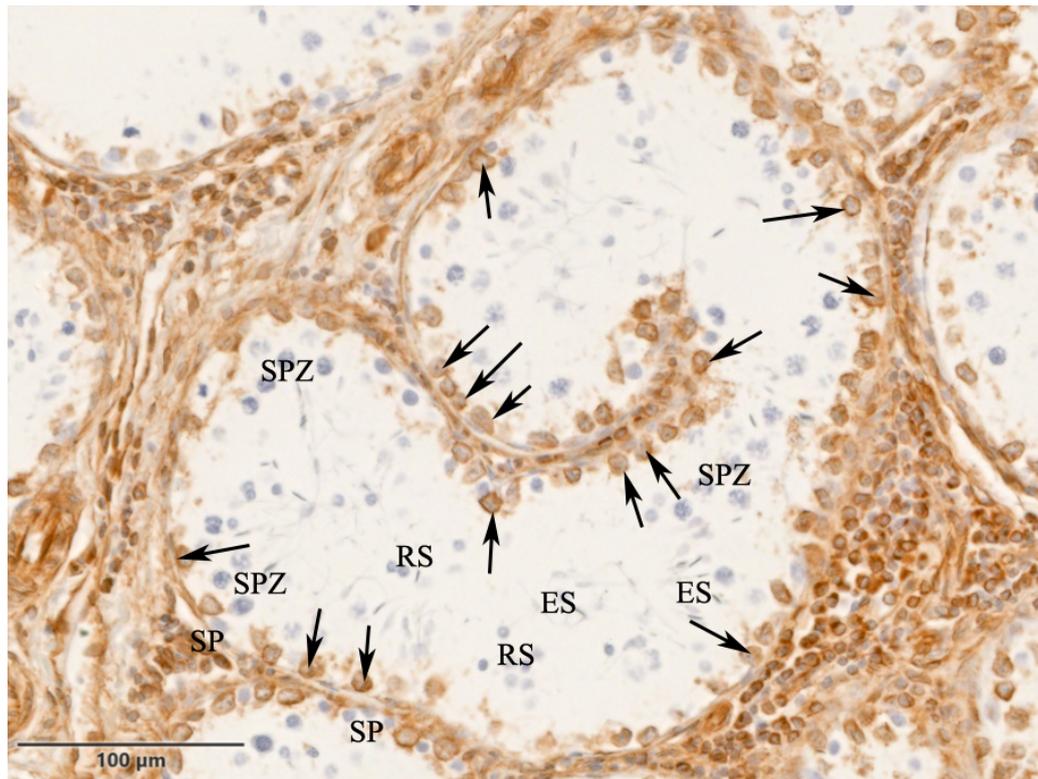


Abbildung 40: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines Tieres der Gruppe 4; Vimentin.

Zu sehen sind zahlreiche differenzierte Keimzellen im Lumen. Im Vergleich zu den anderen Tieren mit wenig Keimzellen sind hier die Vimentin-Reaktionen an den Sertoli-Zellen schwächer. Ebenso sind keine oder nur wenige Zytoplasmareaktionen zu sehen. Hier ist vor allem eine positive Reaktion an der Zellkernmembran und am Nukleus von Sertoli-Zellen zu sehen (schwarzer Pfeil).

Schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellkerne. SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatozoen, ES: Elongierte Spermatozoen.

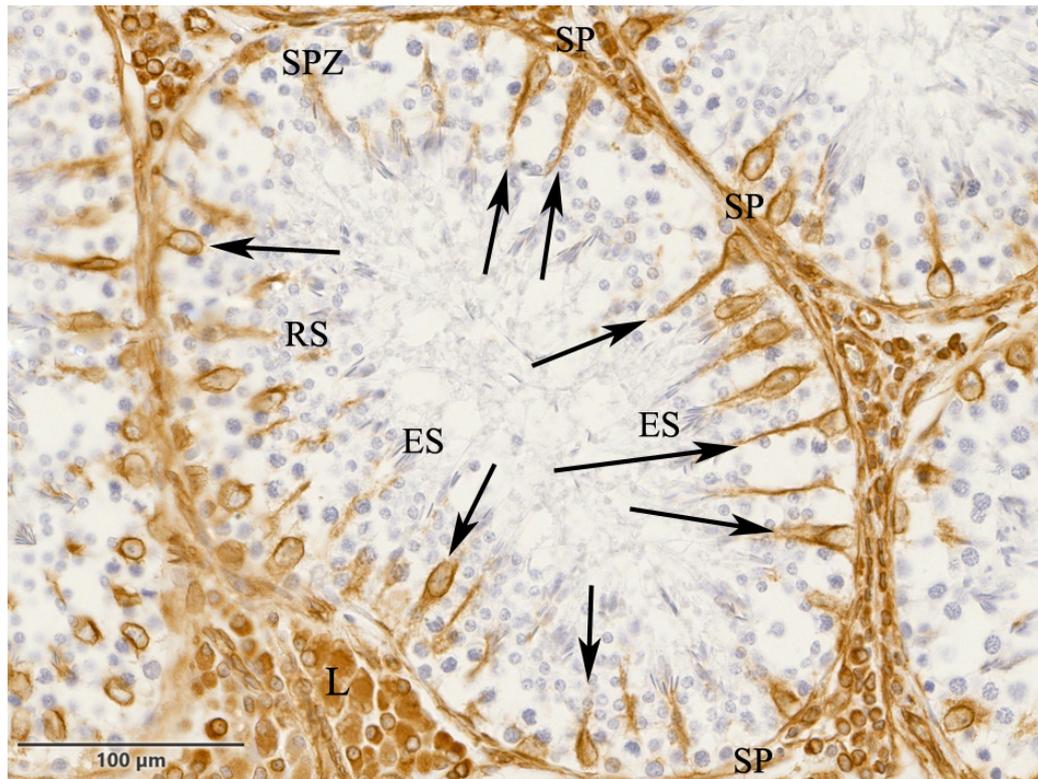


Abbildung 41: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines Tieres aus Gruppe 5b; Vimentin.

Die Sertoli-Zellen haben Vimentin-positive Reaktionen an der Zellkernmembran sowie positive Zytoplasmareaktionen, die vom Nukleus zu elongierten Spermatozoen reichen.

L: Leydig-Zellen, schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellkerne mit positiven Vimentin Reaktionen, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatozoen, ES: elongierte Spermatozoen.

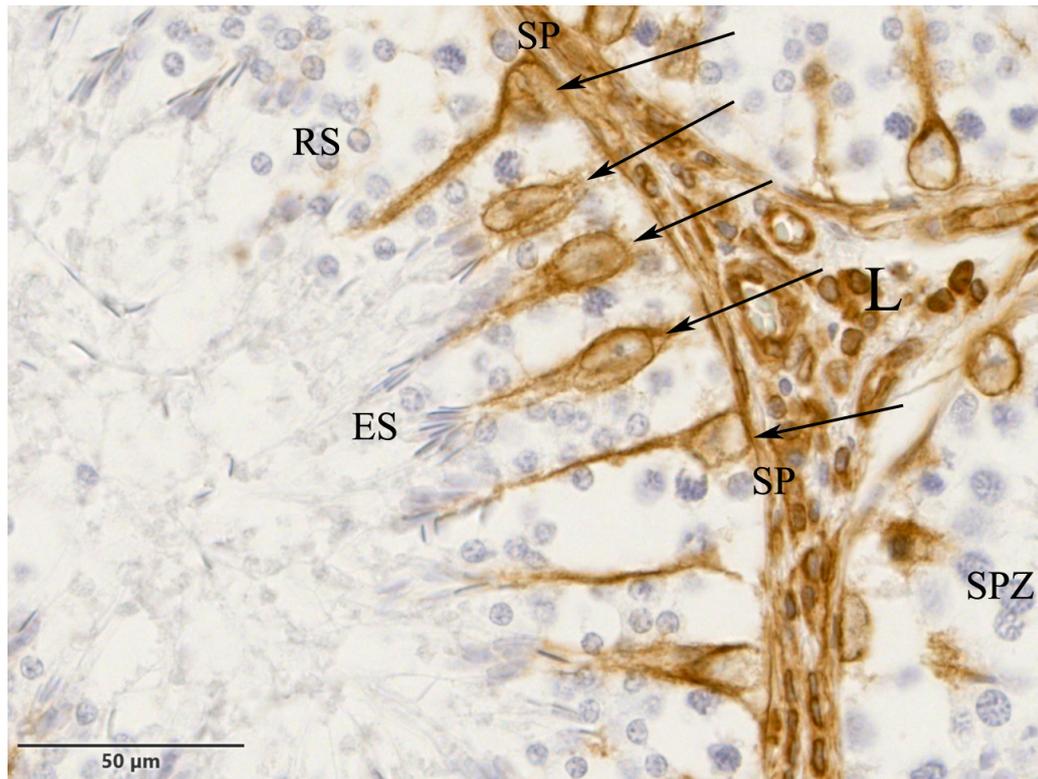


Abbildung 42: Vergrößerungsaufnahme eines Tubulus-Querschnitts eines Tieres aus Gruppe 5b; Vimentin.

Die Tubuli seminiferi contorti besitzen viele ausdifferenzierte Keimzellen. Hier ist sehr deutlich die Verbindung der Vimentinfilamente und das Anhaften der elongierten Spermatozoen zu erkennen.

L: Leydig-Zellen, schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatozoen, ES: Elongierte Spermatozoen.

1.4. Immunhistochemischer Nachweis von DDX-4 im Hoden intakter und vakzinierter Eber

Positive Immunreaktionen für den Antikörper gegen DDX-4 können in allen Keimzellen, außer in elongierten Spermatisden, nachgewiesen werden (Tabelle 14, Tabelle 15).

1.4.1. Immunhistochemischer Nachweis von DDX-4 im Hoden intakter Eber der Gruppe 1

Im Zytoplasma, und teilweise auch im Nukleus oder der Zellkernmembran von runden bis ovalen Spermatogonien sowie jungen Spermatozyten ist ein schwacher Nachweis für DDX-4 zu erkennen. Im Gegensatz dazu besitzen reifere Spermatozyten-Stadien und runde Spermatisden einen stark-positiven DDX-4-Nachweis (Abbildung 44). Das Keimepithel wirkt insgesamt geordnet (Abbildung 43).

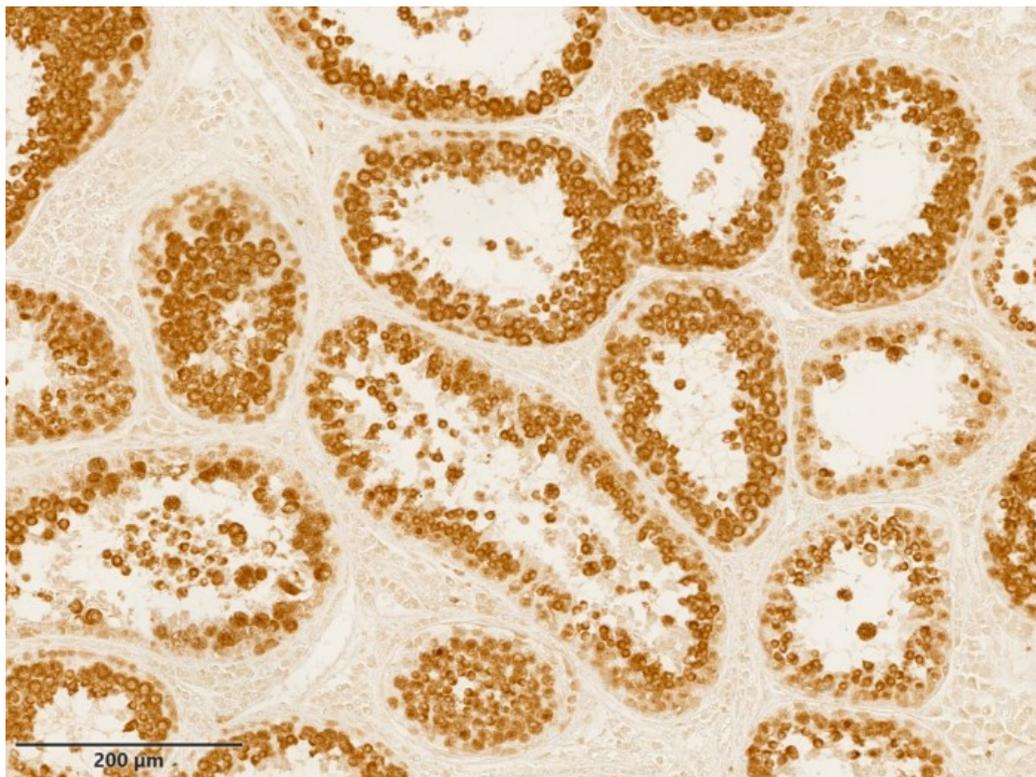


Abbildung 43: Übersichtsaufnahme des Hodenepithels eines intakten Ebers der Gruppe 1; DDX-4.

In den Tubuli seminiferi contorti sind positive Immunreaktionen in allen Keimzelltypen bis auf elongierte Spermatisden zu erkennen.

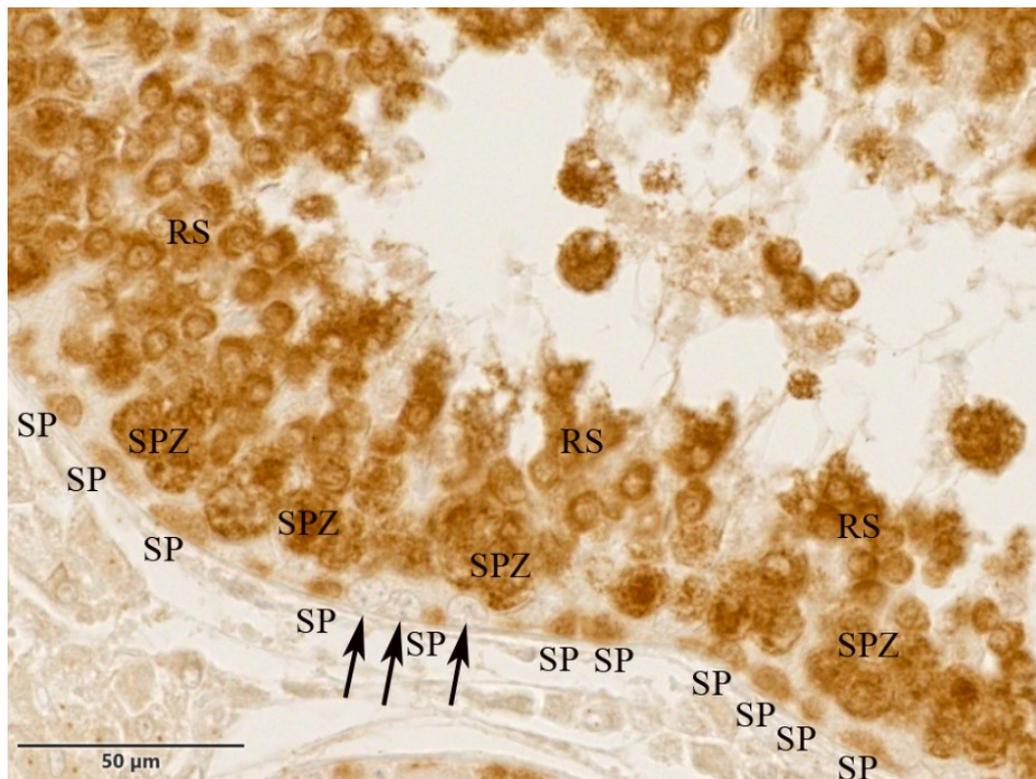


Abbildung 44: Vergrößerungsaufnahme eines Tubulus-Anschnitts eines intakten Ebers aus Gruppe 1; DDX-4

Zwischen den Sertoli-Zellen sind kleine runde Spermatogonien angeordnet. Weiter luminal befinden sich differenzierte Spermatozyten und runde Spermatiden.

Schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden.

1.4.2. Immunhistochemischer Nachweis von DDX-4 im Hoden immunologisch vakzinierter Eber (Gruppe 2 bis 5)

Im Gegensatz zu den kleinen, physiologisch aussehenden Spermatogonien der intakten Eber von Gruppe 1 zeigen die veränderten großen Spermatogonien der vakzinierter Tiere von Gruppe 2 bis 5a eine starke DDX-4-positive Reaktion im Nukleus und im Zytoplasma (Abbildung 45, Abbildung 46, Abbildung 47, Abbildung 49). Wenn Spermatozyten und runde Spermatiden vorhanden sind, so zeigen diese wie auch bei den intakten Ebern der Gruppe 1 eine starke immunhistochemische Reaktion für den Antikörper gegen DDX-4.

Vakzinierte Tiere mit vielen differenzierten Keimzellen, bei welchen auch kleinere physiologisch aussehende Spermatogonien im Keimepithel vorkommen, zeigen wie auch die Spermatogonien der intakten Eber von Gruppe 1 eine schwächere immunhistochemische Reaktion für DDX-4 im Vergleich zu den Spermatozyten und elongierten Spermatiden (Abbildung 48). Dies ist besonders gut bei den Tieren der Gruppe 5b zu erkennen, welche den intakten Ebern ähneln (Abbildung 50).

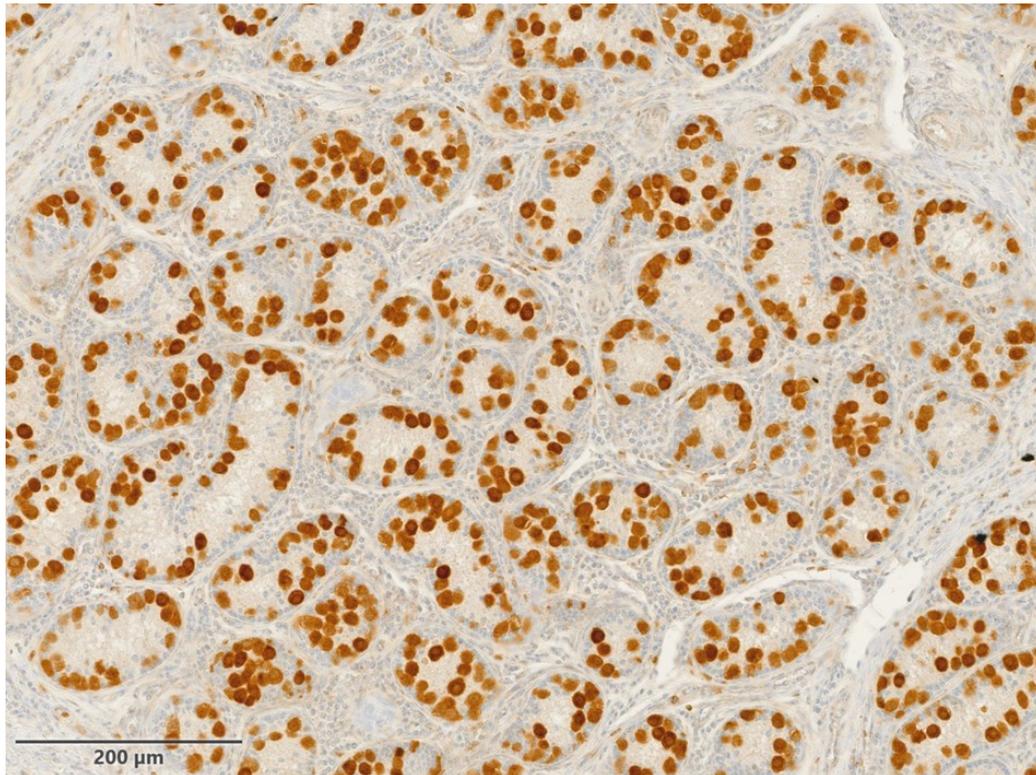


Abbildung 45: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines vakzinierten Ebers aus Gruppe 3; DDX-4.

Zu erkennen sind zahlreiche kleine Tubuli seminiferi contorti mit deutlich- bis stark-positiven großen Spermatozyten und Spermatozyten.

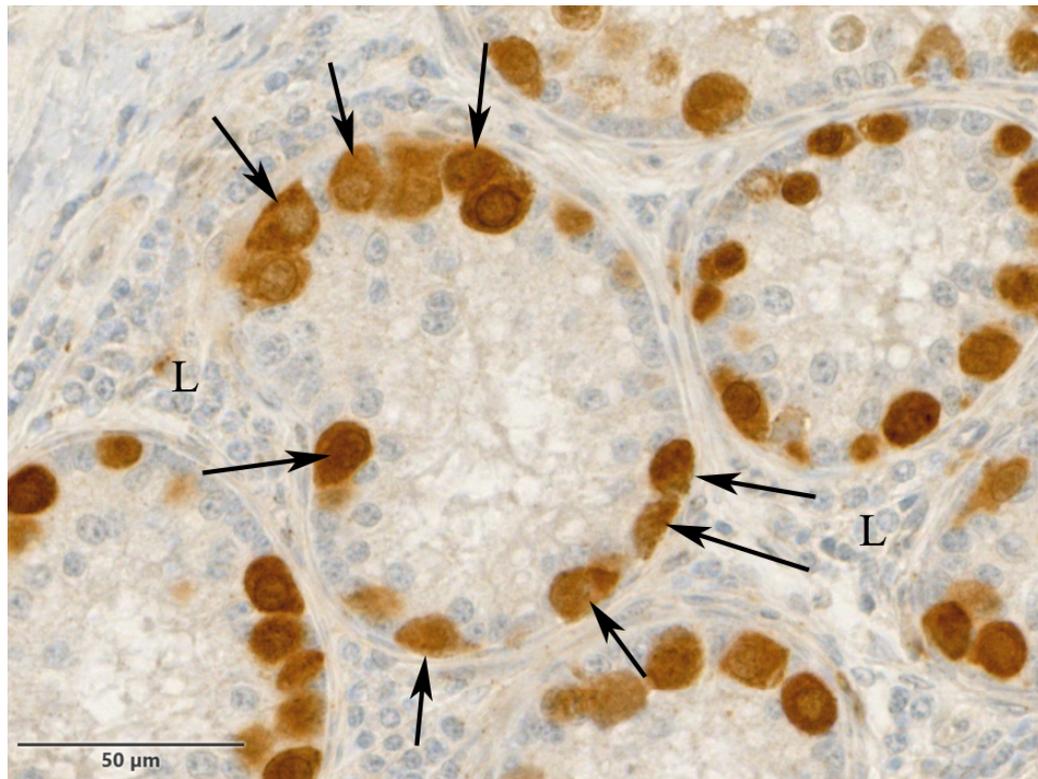


Abbildung 46: Vergrößerung des Hodenepithels eines Tieres aus Gruppe 3; DDX-4.

Man beachte die stark DDX-4-positiven und veränderten Spermatogonien und Spermatozyten (schwarzer Pfeil). Auf der Basalmembran und auch im Lumen befinden sich veränderte, runde bis ovale blau gefärbte Sertoli-Zellkerne mit mehreren Nukleoli. Im Interstitium befinden sich Leydig-Zellen.

Schwarzer Pfeil: veränderte Spermatogonien und Spermatozyten, L: Leydig-Zellen.

Besonders bei den Tieren der Gruppe 4 ist zu erkennen, dass sich Spermatogonien in drei Gruppen einteilen lassen:

- 1) Gruppe 1: Veränderte, große Spermatogonien. Diese sind häufig zu finden, wenn wenige oder keine Keimzellen vorhanden sind sowie bei Vorhandensein von veränderten, kleinen runden/ovalen Sertoli-Zellkernen mit mehreren Nukleoli.
- 2) Gruppe 2: Mittelgroße Spermatogonien, welche jedoch die gleiche Gestalt wie die kleinen physiologischen runden/ovalen Spermatogonien von intakten Ebern besitzen.
- 3) Gruppe 3: Kleine physiologisch Aussehende runde oder ovale Spermatogonien. Diese kommen meist vor, wenn ein ausgeprägtes Keimepithel mit vielen differenzierten Keimzellstadien vorhanden ist und physiologisch aussehende birnenförmige Sertoli-Zellkerne in den Tubuli seminiferi contorti vorhanden sind.

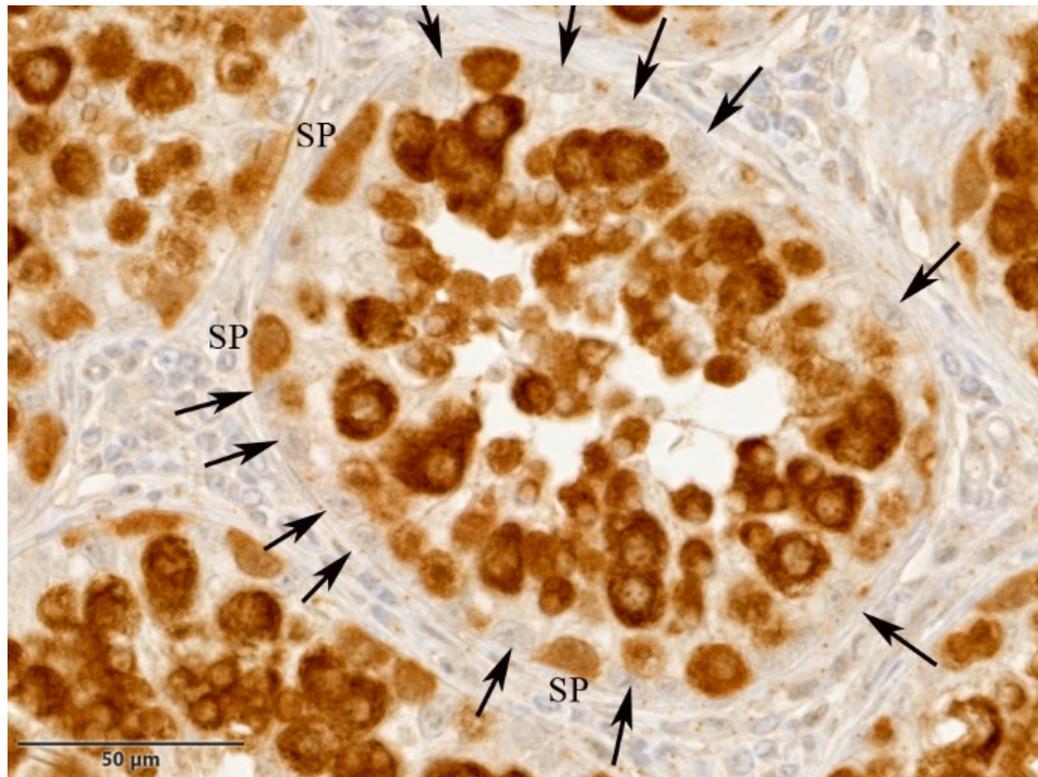


Abbildung 47: Übersichtsaufnahme eines Tubulus-Querschnitts eines Tieres aus Gruppe 4; DDX-4.

Vergleichsweise mittelgroße bis große Spermatogonien liegen auf der Basalmembran. Dazwischen befinden sich birnenförmige Sertoli-Zellkerne. Schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien.

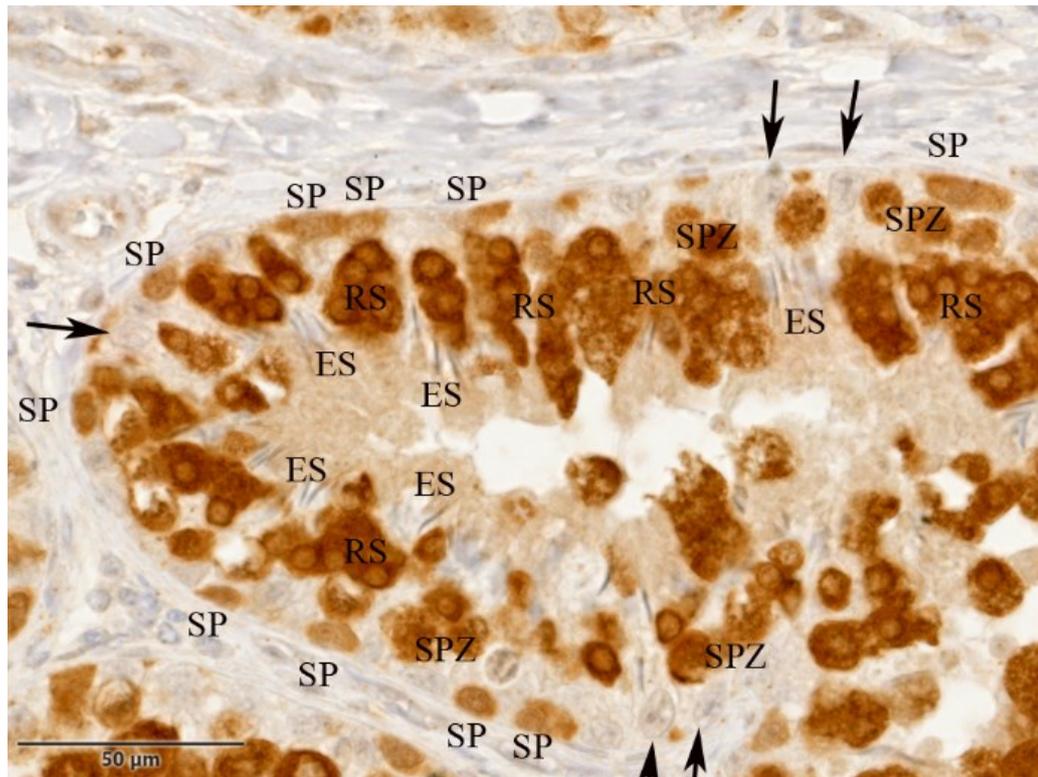


Abbildung 48: Übersichtsaufnahme des Keimepithels eines Tieres aus Gruppe 4; DDX-4.

Hier sind vor allem kleine und zum Teil mittelgroße Spermatogonien zu sehen. Dazwischen befinden sich birnenförmige Sertoli-Zellkerne:

Schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, RS: Runde Spermatiden, ES: elongierte Spermatiden.

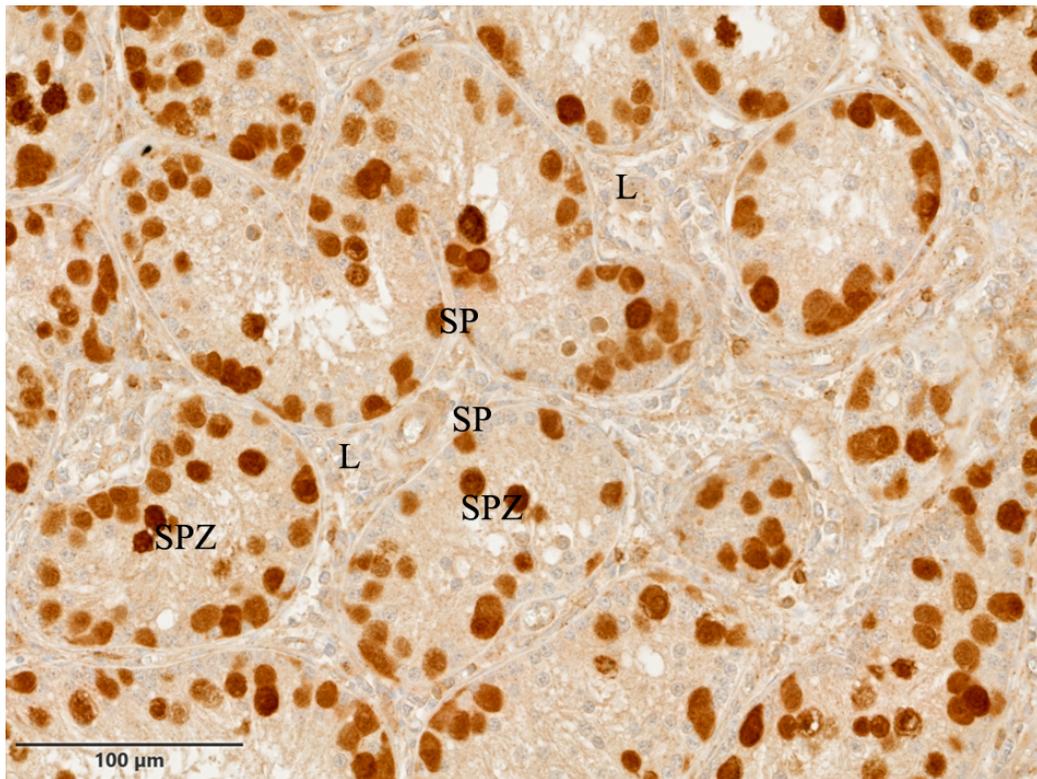


Abbildung 49: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines Tieres aus Gruppe 5a; DDX-4.

Zu erkennen sind vor allem die stark DDX-4-positiven großen Spermatogonien auf der Basalmembran und den Spermatozyten in Richtung Lumen.

L: Leydig-Zellen, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten.

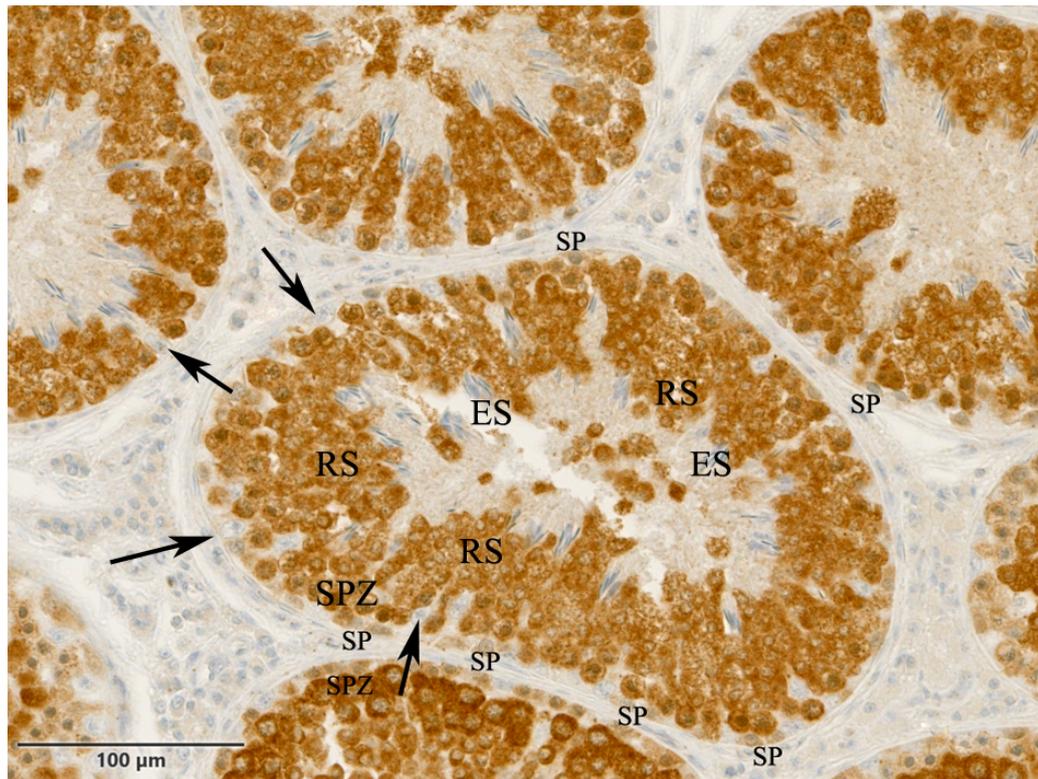
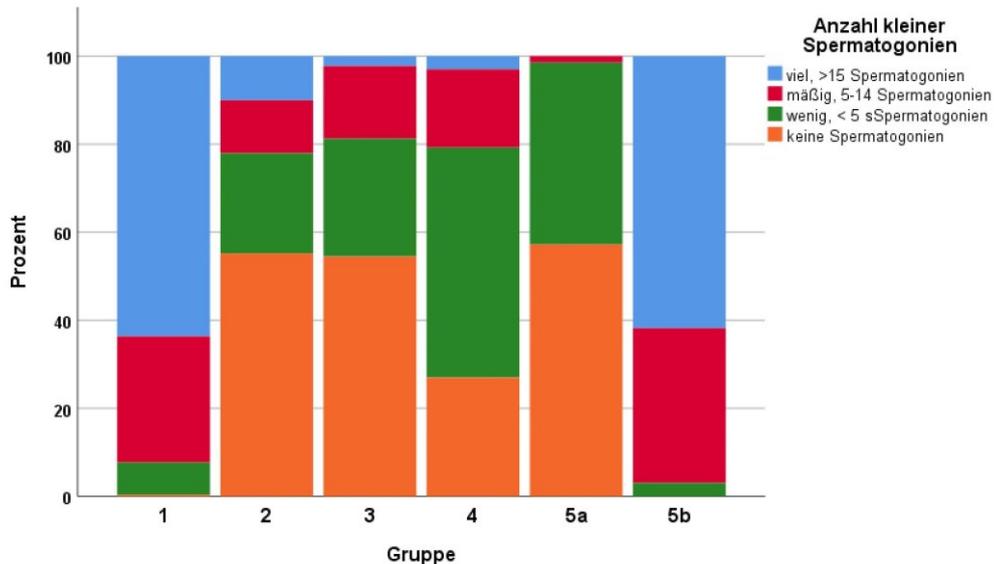


Abbildung 50: Übersichtsaufnahme des Keimepithels eines Tieres aus Gruppe 5b; DDX-4.

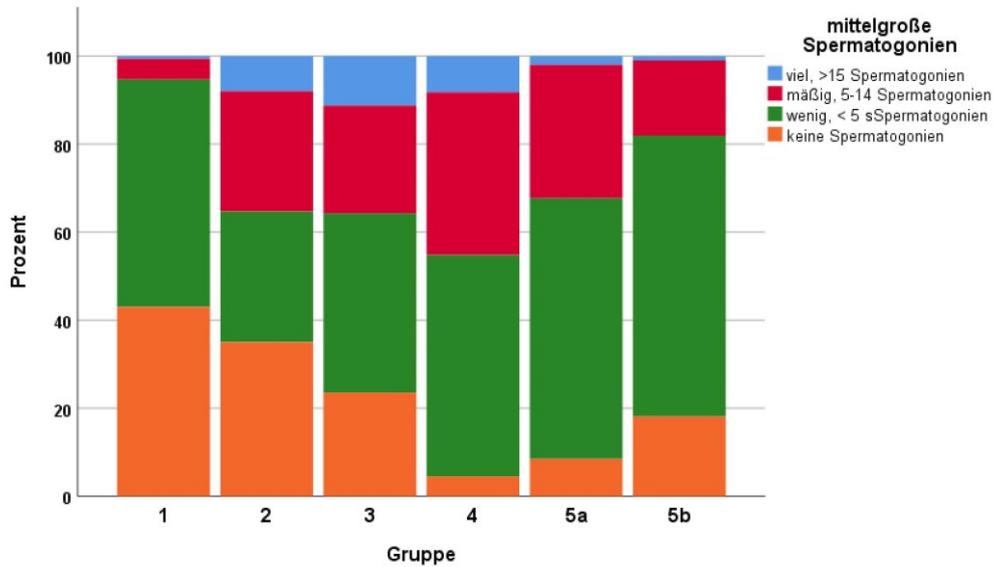
Viele geordnete Keimzellreihen sowie kleine runde und ovale Spermatogonien, ähnlich wie bei den intakten Ebern, sind bei diesem Tier aus Gruppe 5 zu erkennen.

Schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien,
SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatozoen,
ES: Elongierte Spermatozoen.

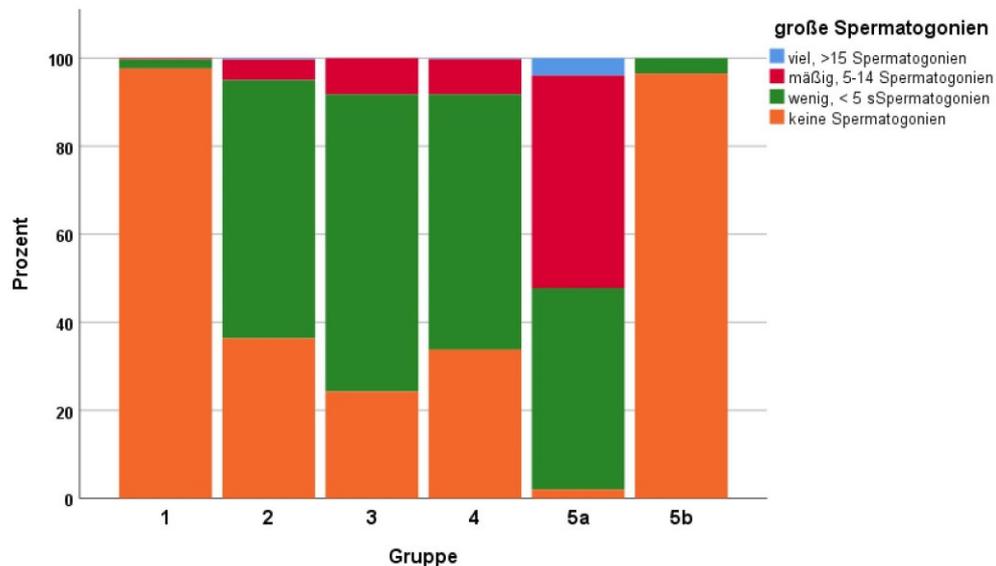


Graphik 5: Relative Häufigkeiten der kleinen Spermatogonien.

Vor allem die intakten Eber der Gruppe 1 enthalten viele kleine Spermatogonien (63,7%) im Tubulus-Querschnitt. Bei Tieren der Gruppe 2, 3 und 4 sind vor allem keine bis hin zu mäßig vielen kleinen Spermatogonien im Tubulusepithel vorhanden. Die Gruppe 5a besitzt ein ähnliches Erscheinungsbild wie Gruppe 2 und 3. Gruppe 5b besitzt Ähnlichkeiten zu den intakten Ebern mit einer Höhe von 61,8% an vielen kleinen Spermatogonien (Tabelle 19 im Anhang). Im Vergleich zu den intakten Ebern zeigen bis auf die Gruppe 5b alle vakzinierten Tiere signifikante Unterschiede in Bezug auf das Vorkommen von kleinen Spermatogonien. Gruppe 2 ($p = 0,001$), Gruppe 3 ($p < 0,001$), Gruppe 4 ($p < 0,001$), Gruppe 5a ($p < 0,001$), Gruppe 5b ($p = 0,991$). Siehe Tabelle 19 im Anhang.



Graphik 6: Relative Häufigkeiten der mittelgroßen Spermatogonien. Vor allem in den Gruppen 2, 3, 4, aber auch 5a kommen häufiger viele mittelgroße Spermatogonien vor, als bei den intakten Ebern der Gruppe 1 und Tieren der Gruppe 5b (Tabelle 20 im Anhang). Gruppe 4 ($p < 0,001$), Gruppe 5a ($p < 0,001$), und Gruppe 5b ($p < 0,001$) zeigen signifikante Unterschiede im Vorkommen von mittelgroßen Spermatogonien im Vergleich zu den intakten Ebern. Siehe Tabelle 20 im Anhang.



Graphik 7: Relative Häufigkeiten der großen Spermatogonien.

Die intakten Eber besitzen keine (97,7%) oder wenige (2%) große Spermatogonien. Im Gegensatz dazu kommen bei den vakzinierten Tieren der Gruppe 2, 3 und 4 öfter, wenige bis mäßig viele große Spermatogonien in den Tubuli vor (Tabelle 21 im Anhang). Die Tiere der Gruppe 5a besitzen zu 4% viele große Spermatogonien, was bei den Tieren der anderen Gruppen nicht der Fall ist. Im Vergleich zur Gruppe 1 besitzen die Tiere der Gruppe 2 bis 5a ($p < 0,001$) signifikant mehr große Spermatogonien. Siehe Tabelle 21 im Anhang.

1.5. Immunhistochemischer Nachweis von Ki67 im Hoden intakter und vakzinierter Eber

1.5.1. Immunhistochemischer Nachweis von Ki67 im Hoden intakter Eber der Gruppe 1

Das Ki67-Protein kann im Chromatin aller Keimzellen, außer in den elongierten Spermatiden, gefunden werden (Abbildung 51, Abbildung 52, Abbildung 53, Tabelle 14). Sertoli-Zellen besitzen in der Regel keine positive Immunreaktion für Ki67. Peritubuläre Myoidzellen reagieren vereinzelt positiv mit dem Antikörper gegen Ki67. Die Leydig-Zellen im Interstitium haben einen schwach-positiven Nachweis für Ki67 im Zytoplasma. Auch einzelne Zellkerne der Leydig-Zellen zeigen eine positive Immunreaktion.

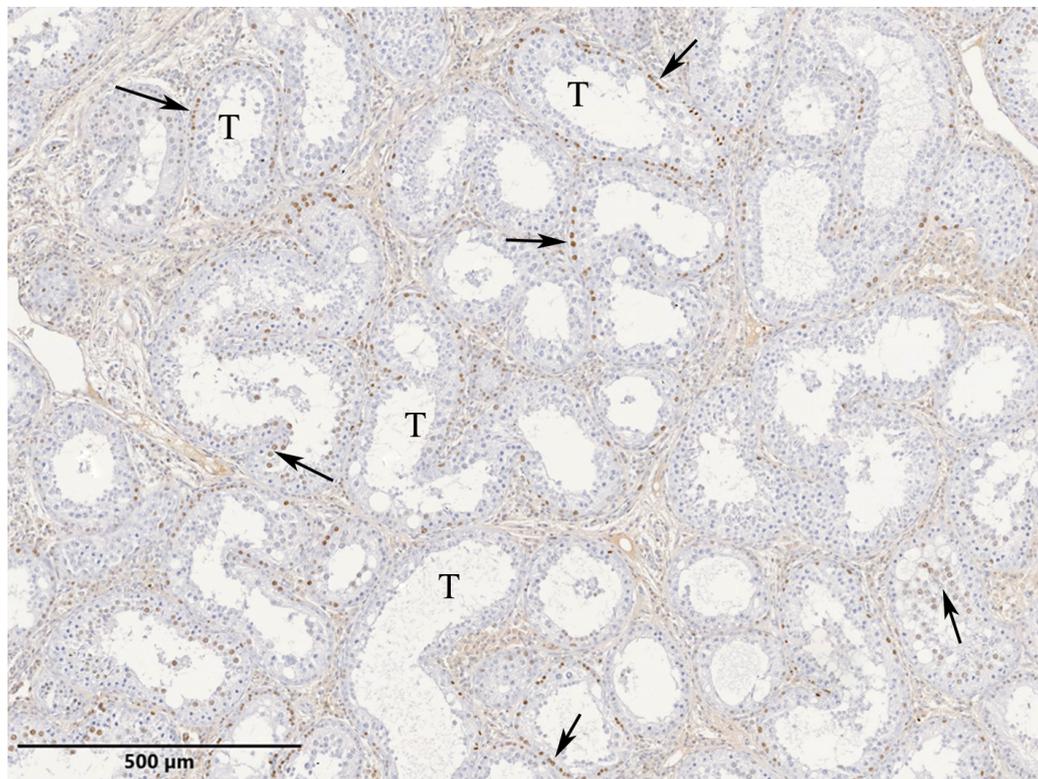


Abbildung 51: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines intakten Ebers; Ki67.

Zu sehen ist eine Übersichtsaufnahme der Immunreaktionen für den Antikörper gegen Ki67. Die Ki67-positiven Reaktionen lassen sich in allen Keimzellen bis auf elongierte Spermatiden nachweisen.

T: Tubuli, schwarzer Pfeil: Ki67-positive Keimzellen.

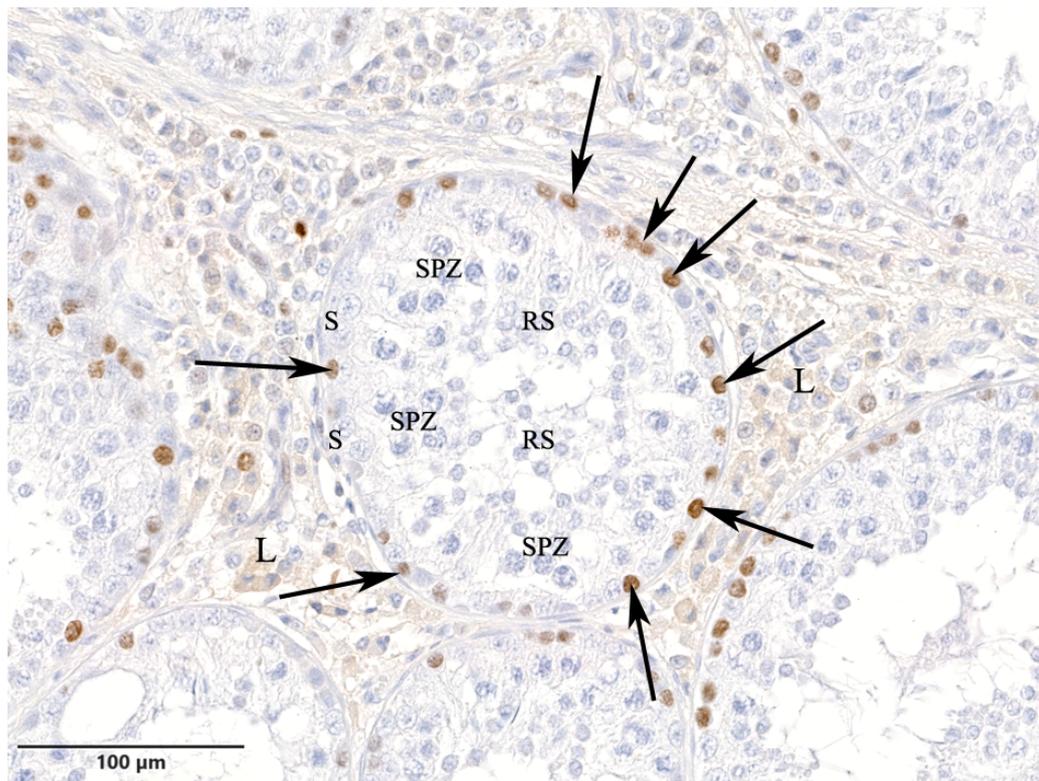


Abbildung 52: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines intakten Ebers; Ki67.

In diesem Ausschnitt haben die Spermatogonien auf der Basalmembran deutlich-positive Immunreaktionen für den Antikörper gegen Ki67.

Schwarzer Pfeil: Spermatogonien, S: Sertoli-Zellkerne, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden, L: Leydig-Zellen.

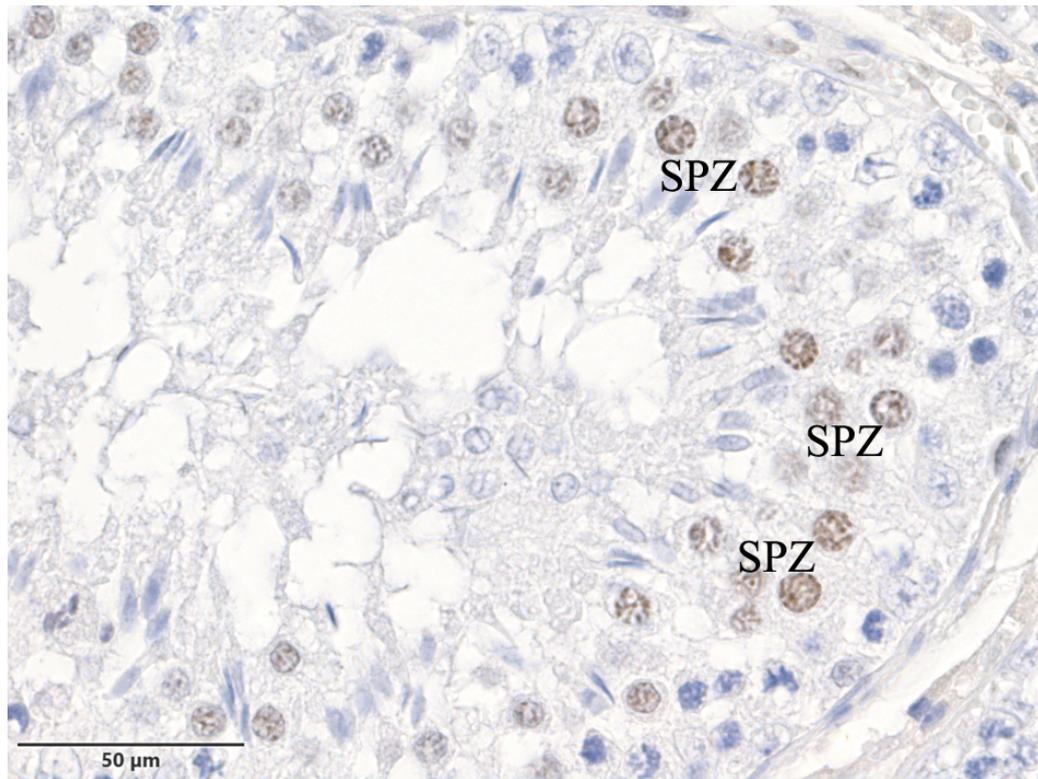


Abbildung 53: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines intakten Ebers; Ki67.

Dieser Ausschnitt zeigt besonders die Mitose-Aktivität in den Spermatozyten.

SPZ: Spermatozyten.

1.5.2. Immunhistochemischer Nachweis von Ki67 im Hoden immunologisch vakzinierter Eber (Gruppe 2 bis 5)

Im Gegensatz zu den intakten Ebern zeigen die Tiere der Gruppen 2 bis 5a deutlich weniger Mitosen. Veränderte Spermatogonien und Spermatozyten, welche vor allem in Tubuli mit wenig Keimepithel vorkommen, besitzen einen schwach-positiven Ki67-Nachweis (Abbildung 54, Abbildung 55, Tabelle 15). In den Tubuli von Tieren der Gruppe 2 bis 5 mit mehreren Keimzellen und auch Keimzellreihen zeigen alle Keimzelltypen (bis auf elongierende Spermatiden) einen Nachweis von Ki67 und sind somit mitotisch aktiv.

Da es teilweise sehr schwierig war, zwischen den veränderten Sertoli-Zellen, aber auch den Spermatogonien zu unterscheiden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch einzelne Sertoli-Zellen Ki67-positive Nachweise aufweisen. Dies war unter anderem vereinzelt bei Tieren der Gruppe 4 zu sehen.

Die Tiere der Gruppe 5a können in zwei Gruppen aufgeteilt werden und besitzen entweder ein ähnliches Aussehen wie die vakzinierten Tiere der Gruppen 2 bis 4 (Abbildung 56) oder wie die Gruppe der intakten Eber (Abbildung 57).

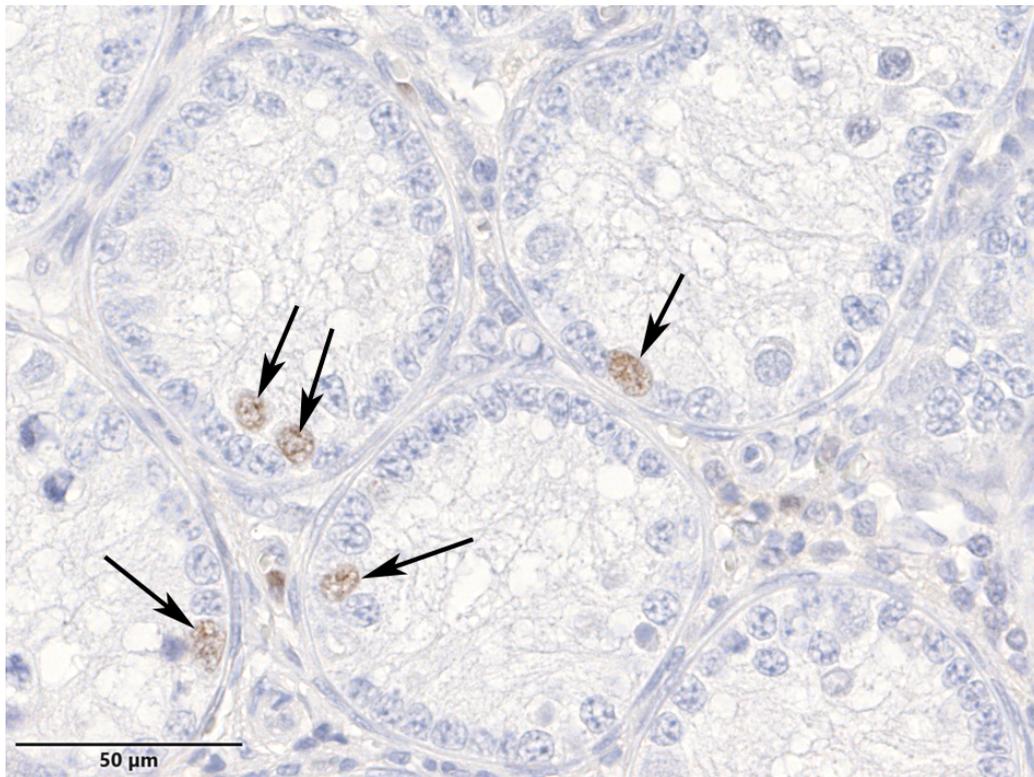


Abbildung 54: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines vakzinierten Tieres aus Gruppe 2; Ki67.

Große abnormale Spermatogonien und Spermatozyten im Lumen zeigen Mitose-Aktivität (schwarzer Pfeil).

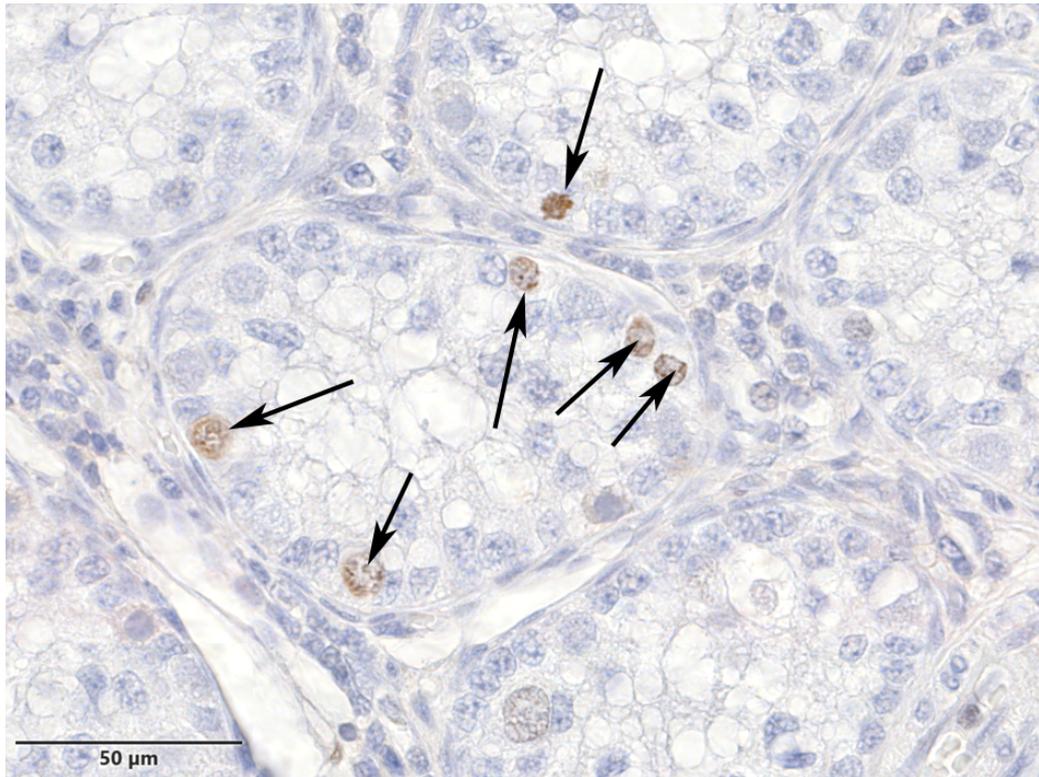


Abbildung 55: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines vakzinierten Tieres aus Gruppe 3; Ki67.

Auch dieses Tier zeigt positive Reaktionen in den veränderten großen Spermatogonien (schwarzer Pfeil).

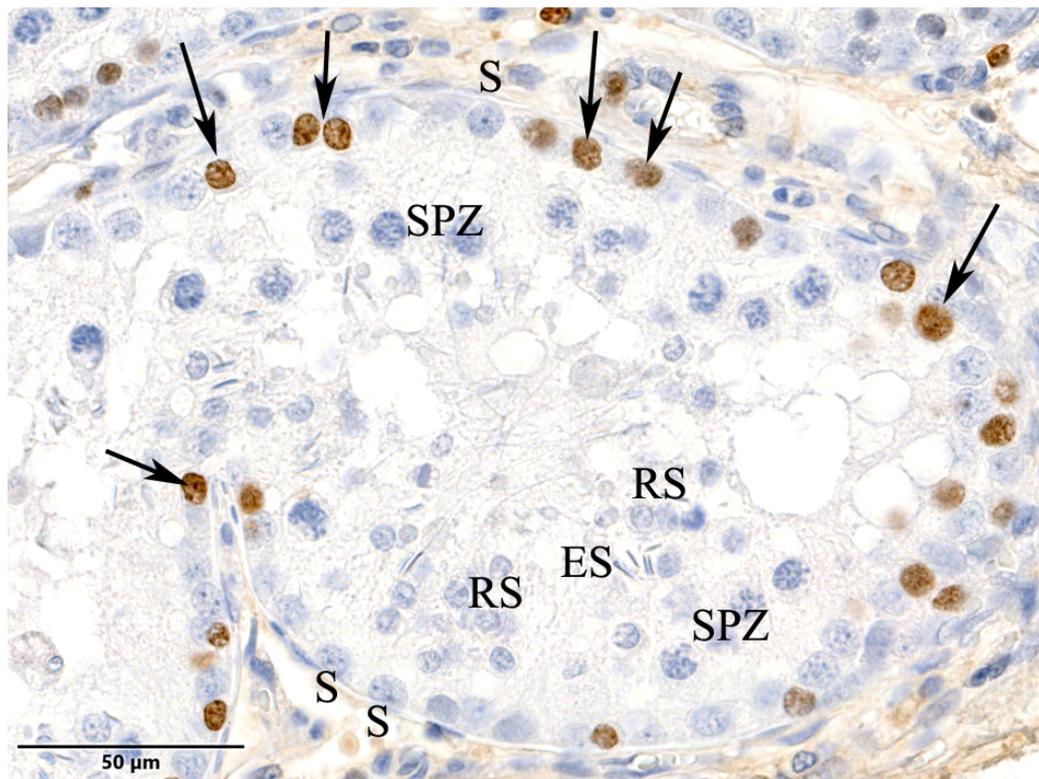


Abbildung 56: Vergrößerungsaufnahme von einem Tubulus Abschnitt eines Tieres aus Gruppe 5; Ki67.

Insbesondere bei den Spermatogonien sind Mitosen zu erkennen (schwarzer Pfeil). Spermatozyten und runde Spermatiden zeigen hier keine Mitose-Aktivität.

Schwarzer Pfeil: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden.

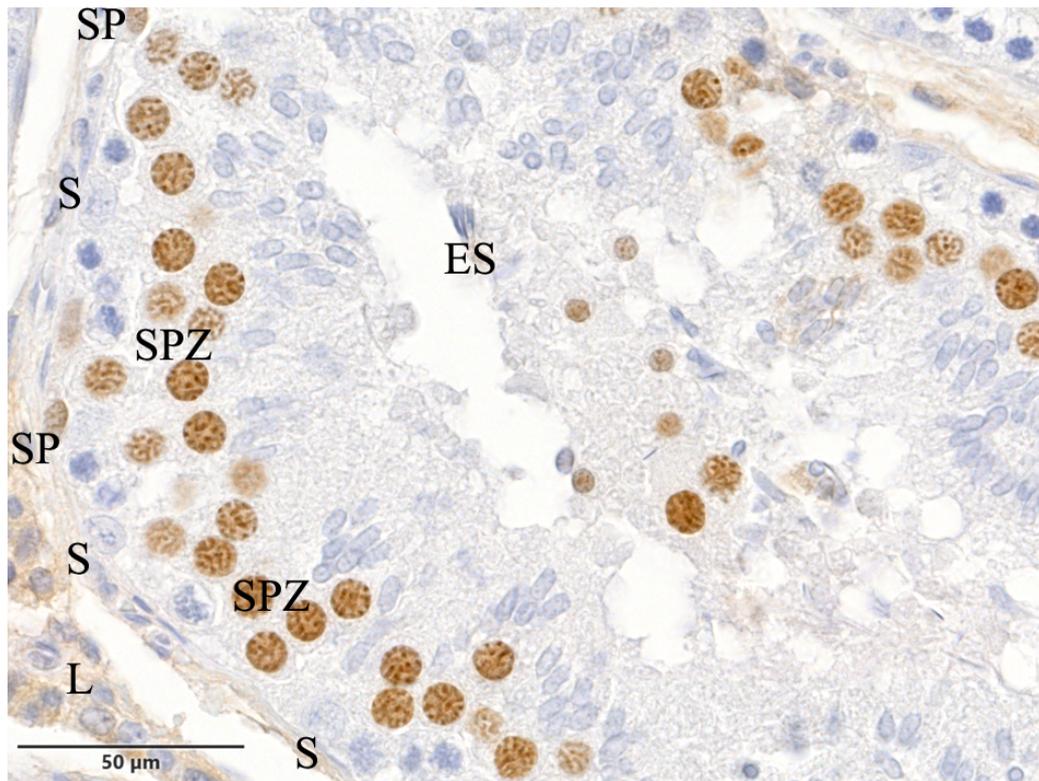
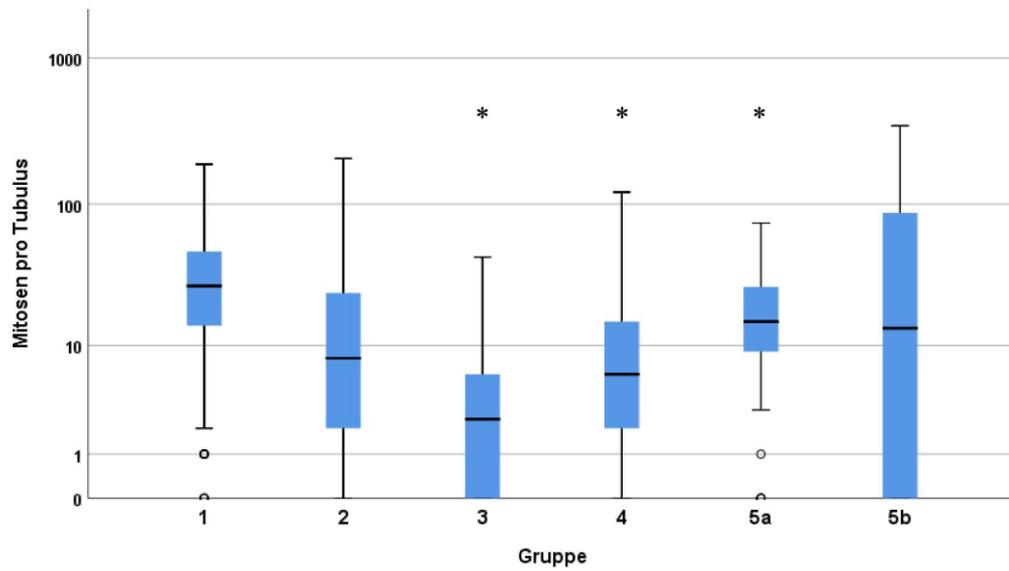


Abbildung 57: Vergrößerungsaufnahme von einem Tubulus Anschnitt eines anderen Tieres aus Gruppe 5; Ki67.

Vor allem die Spermatozyten zeigen positive Ki67-Reaktionen, aber auch einzeln Spermatozyten auf der Basalmembran und runde Spermatozyten im Lumen.

L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatozyten, SPZ: Spermatozyten, ES: Elongierte Spermatozyten.



Graphik 8: Mitosen pro Tubulus-Querschnitt.

Intakte Eber besitzen deutlich mehr Mitose-aktive Zellen, als vakzinierte Tiere der Gruppe 2 ($p = 0,177$), 3 ($p < 0,001$), 4 ($p = 0,002$), sowie 5a ($p < 0,001$).

1.6. Immunhistochemischer Nachweis von 8-OHG im Hoden intakter und vakzinierter Eber

1.6.1. Immunhistochemischer Nachweis von 8-OHG im Hoden intakter Eber der Gruppe 1

8-OHG-positive Reaktionen können in den Zellkernen und zum Teil auch im Zytoplasma von Spermatogonien, Spermatozyten, runden Spermatiden sowie Sertoli- und Leydig-Zellkernen nachgewiesen werden (Tabelle 14). Auch die Nukleoli der genannten Zellen zeigen positive 8-OHG-Nachweise. Besonders auffallend ist jedoch, dass vor allem die Spermatozyten eine positive immunhistochemische Reaktion für 8-OHG zeigen (Abbildung 58). Elongierte Spermatiden sind negativ für den Antikörper gegen 8-OHG.

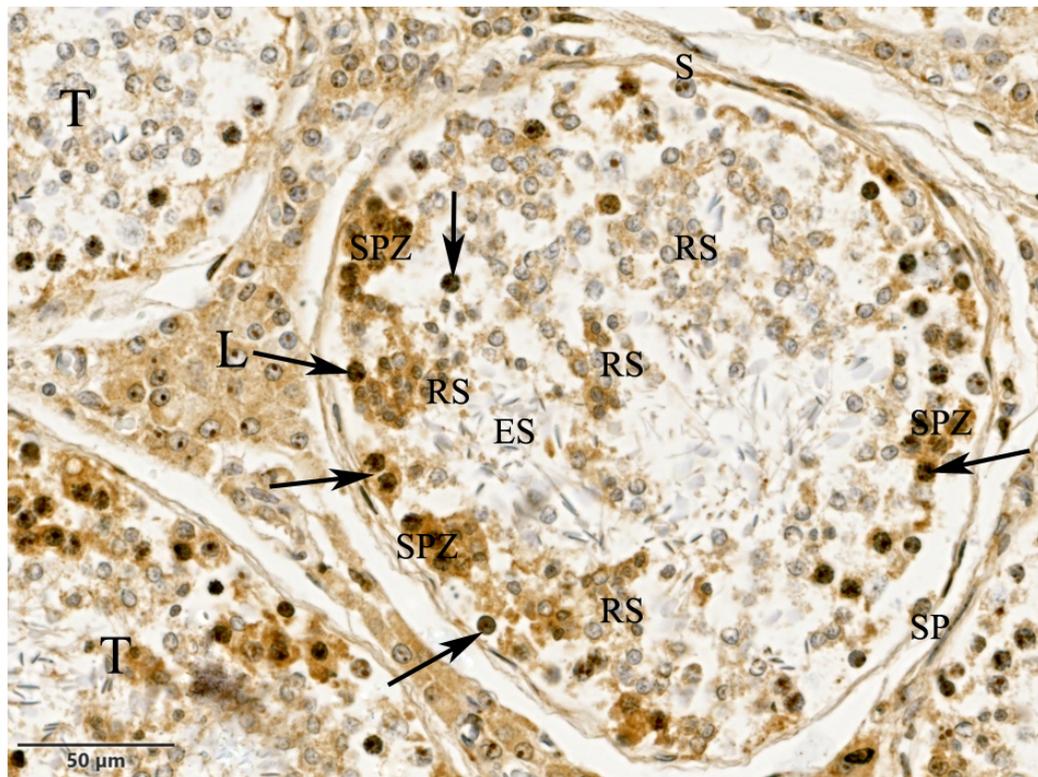


Abbildung 58: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines intakten Ebers; 8-OHG.

In diesem Anschnitt der Tubuli seminiferi contorti haben vor allem die Spermatozyten positive Reaktionen für 8-OHG (schwarzer Pfeil). L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden, ES: Elongierte Spermatiden.

1.6.2. Immunhistochemischer Nachweis von 8-OHG im Hoden vakzinierter Eber (Gruppe 2 bis 5)

Vor allem pyknotische oder degenerative Leydig-Zellkerne im Interstitium sind häufig deutlich- bis stark-positiv für 8-OHG. Aber auch einzelne veränderte große Spermatogonien sowie Spermatozyten zeigen schwache bis deutliche 8-OHG- positive Reaktionen (Abbildung 59, Tabelle 15). Wenn vorhanden, so zeigen auch runde und elongierte Spermatischen positive Immunreaktionen gegen 8-OHG. Ebenso sind Sertoli-Zellen 8-OHG-positiv. Besonders auffällig ist jedoch die stärkere immunhistochemische Reaktion der jungen physiologisch erscheinenden Spermatozyten im Vergleich zu den restlichen Zelltypen (Abbildung 60). Auf Grund der starken Keimzellverluste bei den vakzinierten Tieren ist es schwierig zu sehen, ob der 8-OHG bei den vakzinierten Tieren vermehrt vorkommt, ohne diese zu zählen. Die 8-OHG-Reaktionen bei den vakzinierten Tieren aus Gruppe 2 bis 5a sind nur subjektiv höher.

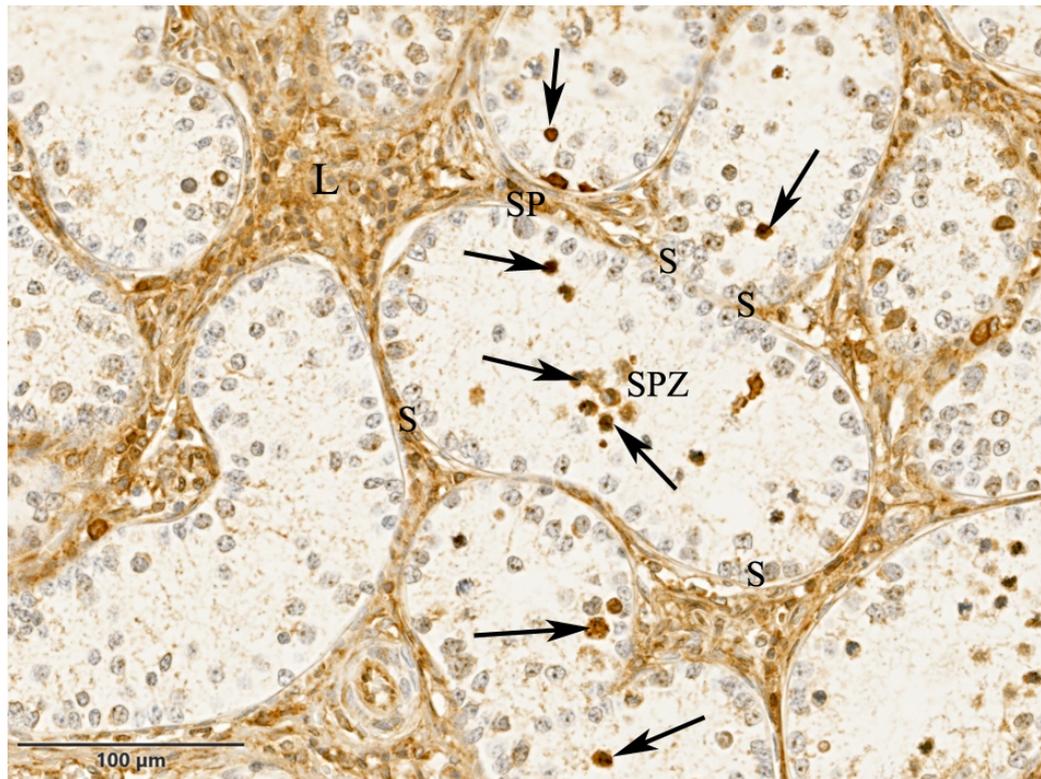


Abbildung 59: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines vakzinierten Tieres aus Gruppe 2; 8-OHG.

In diesem Anschnitt sind vor allem die Spermatozyten im Lumen stark-positiv für den Antikörper gegen 8-OHG (schwarzer Pfeil).

L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten.

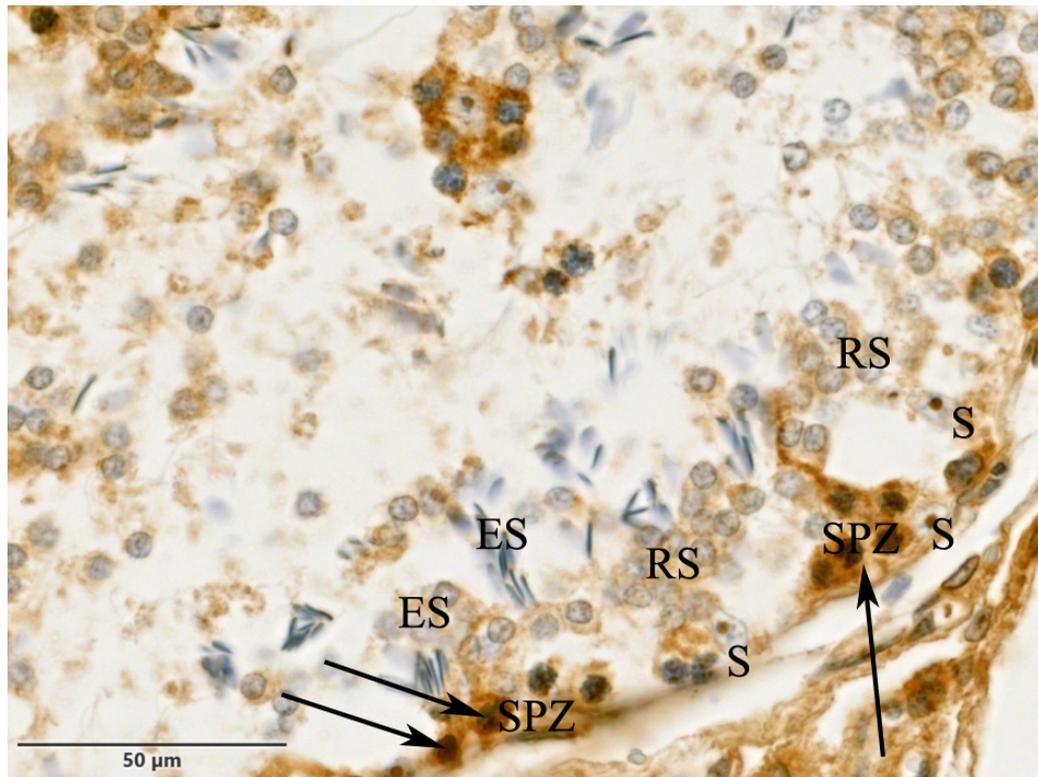


Abbildung 60: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines vakzinierten Tieres aus Gruppe 5; 8-OHG.

Auch hier lässt sich 8-OHG an den Spermatozyten nachweisen (schwarzer Pfeil).

L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden, ES: Elongierte Spermatiden.

1.7. Immunhistochemischer Nachweis von Occludin im Hoden intakter und vakzinierter Eber

Bei den intakten Ebern der Gruppe 1 ist eine positive Reaktion für den Antikörper gegen Occludin häufiger in den Zellkernen von Spermatogonien auf der Basalmembran zu finden (Abbildung 61 und Abbildung 62). Runde Spermatiden weisen oft im akrosomalen Vesikel oder im Kopf der elongierenden Spermatiden eine positive Occludin-Reaktion auf. Spermatozyten sind nur vereinzelt Occludin-positiv. Häufig sind die Zellkerne der Keimzellen nur sehr schwach oder gar nicht positiv, während das Zytoplasma eine positive Immunreaktion zeigt. Vereinzelt können Reaktionen für den Antikörper gegen Occludin auch in den Nuklei von Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen gefunden werden. Rund um die Zellkerne von Sertoli-Zellen ist ab und zu ein verstärkter „linienartiger“ Nachweis für Occludin an der Zellkernmembran zu erkennen. Das Sertoli-Zellzytoplasma ist bei allen Tieren positiv für den Antikörper gegen Occludin, feine „Occludin-Linien“ sind an angrenzenden Sertoli-Zellen zu finden. Das Zytoplasma von Leydig-Zellen sowie Fibrozyten und Endothelzellen besitzen ebenfalls eine positive Reaktion für den Occludin-Antikörper. Insgesamt gibt es keine auffälligen Unterschiede zwischen den Nachweisen der intakten Eber von Gruppe 1 sowie den vakzinierten Tieren der Gruppe 2 bis 5. Jedoch zeigen die intakten Eber der Gruppe 1 ein eher gleichmäßiges Reaktionsmuster (Abbildung 61, Tabelle 14, Tabelle 15).

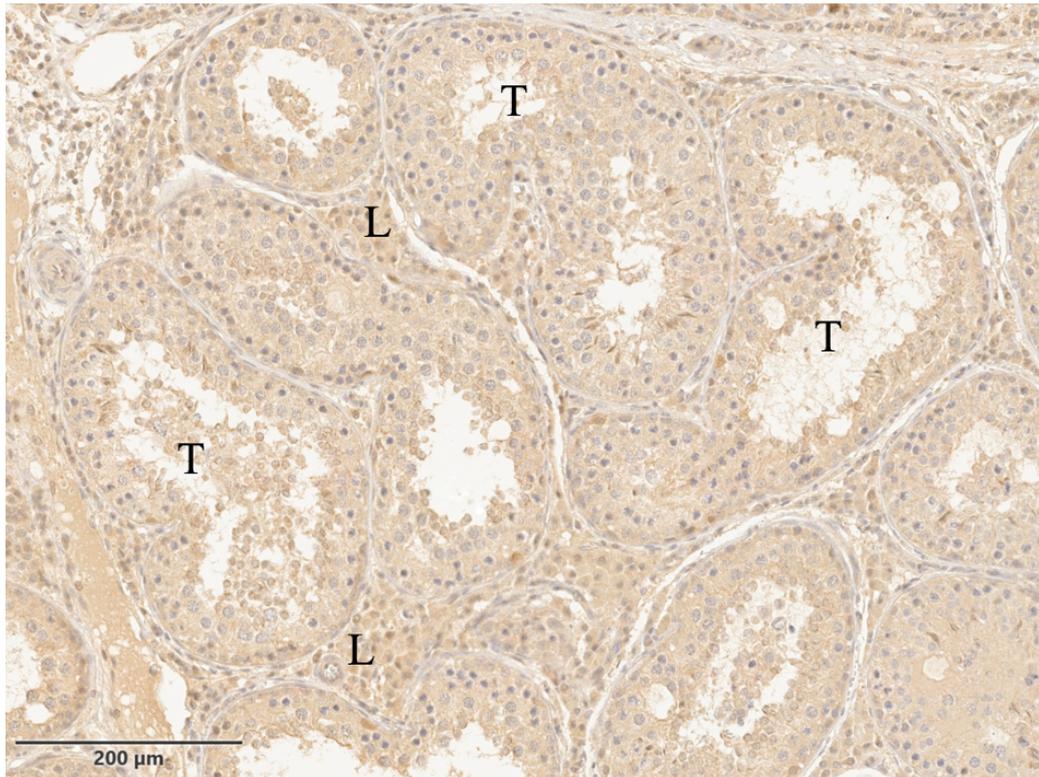


Abbildung 61: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines intakten Ebers; Occludin.

Die Nachweise für den Antikörper gegen Occludin zeigen sowohl in den Tubuli als auch an den Leydig-Zellen eine homogene Reaktion.

T: Tubuli, L: Leydig-Zellen.

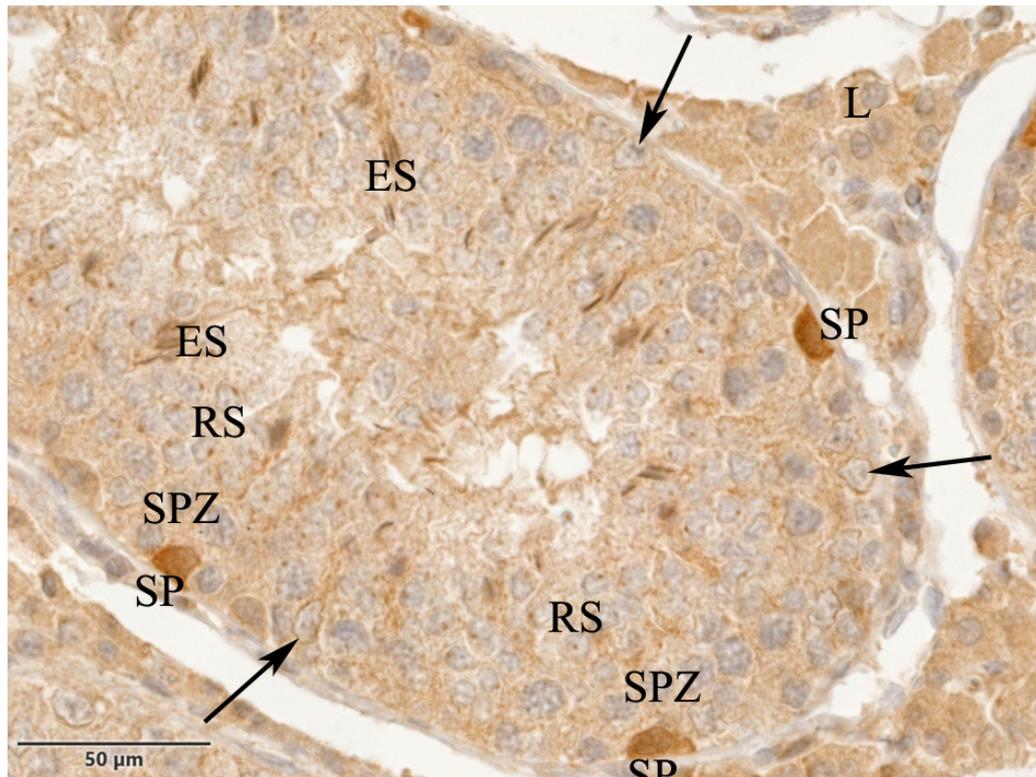


Abbildung 62: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines intakten Ebers; Occludin.

Stark-positiv reagierenden Spermatogonien sind auf der Basalmembran zu finden. Das Zytoplasma von Sertoli-Zellen hat eine homogene Reaktion für den Antikörper gegen Occludin.

L: Leydig-Zellen, schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatozoen, ES: Elongierte Spermatozoen.

Bei den vakzinierten Tieren der Gruppe 2 bis 5a weisen vor allem veränderte Spermatogonien und Spermatozyten eine stärkere Occludin-Reaktion auf (Abbildung 63). Dort vor allem im Zytoplasma, aber im Vergleich zu den intakten Ebern und deren physiologischen Spermatogonien und Spermatozyten haben veränderte große Spermatogonien und Spermatozyten der Kastraten oft eine positive Reaktion für den Antikörper gegen Occludin im Nukleus. Bei Tieren, der Gruppe 4 mit sehr vielen Keimzellreihen bis hin zu runden Spermatozoen sind vor allem das Zytoplasma und auch der Nukleus von Spermatogonien positiv für den Antikörper gegen Occludin.

Irregulär verlaufende Occludin-positive Sertoli-Zytoplasmareaktionen sind ebenfalls zu finden. Auch bei den Tieren der Gruppe 5b mit Ähnlichkeiten zu den intakten Ebern zeigen eine deutlichere Reaktion der physiologisch erscheinenden Spermatogonien und zum Teil auch der Spermatozyten.

Zusätzlich ist bei Tieren der Gruppe 5b in einigen Tubuli ein positiver Nachweis für Occludin punktchenartig im Zytoplasma zwischen angrenzenden Sertoli-Zellen zu finden. Dort ist es entlang des Zellkerns von Sertoli-Zellen, bis hin zu elongierenden Spermatiden, welche im Sertoli-Zytoplasma haften, zu erkennen. Rund um die anhaftenden Spermatidenköpfe ist der Nachweis für den Antikörper gegen Occludin zum Teil stärker (Abbildung 64).

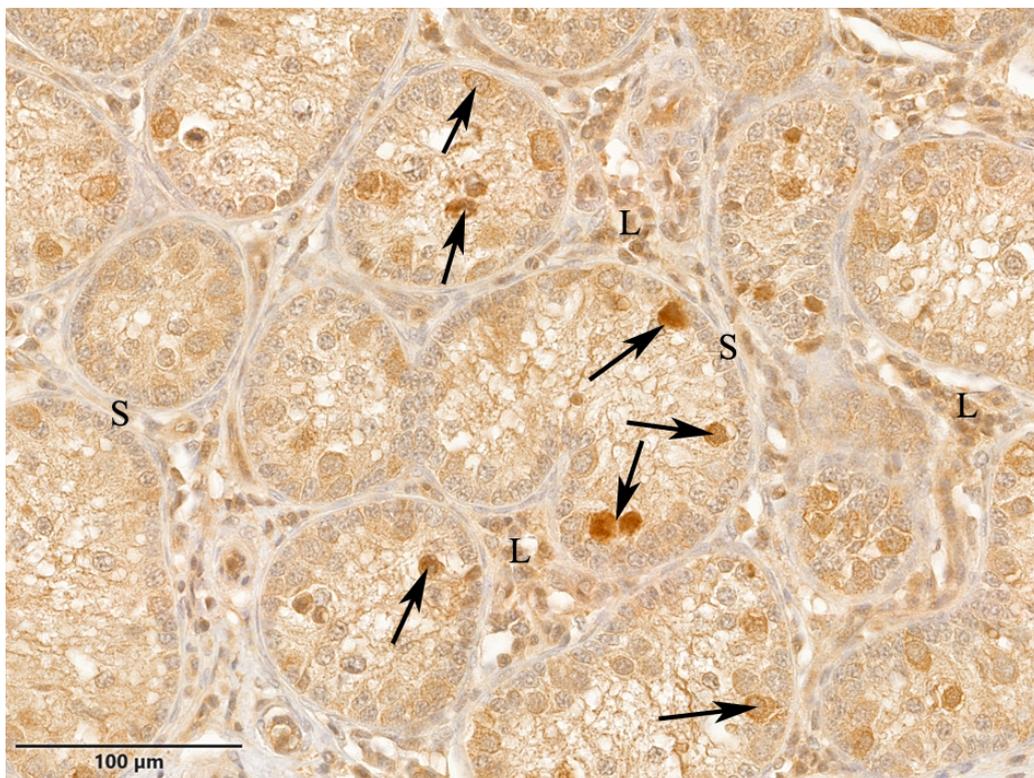


Abbildung 63: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines vakzinierten Tieres aus Gruppe 2; Occludin.

Occludin besitzt starke Nachweise in den Spermatozyten im Lumen (schwarzer Pfeil).

L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellkerne.

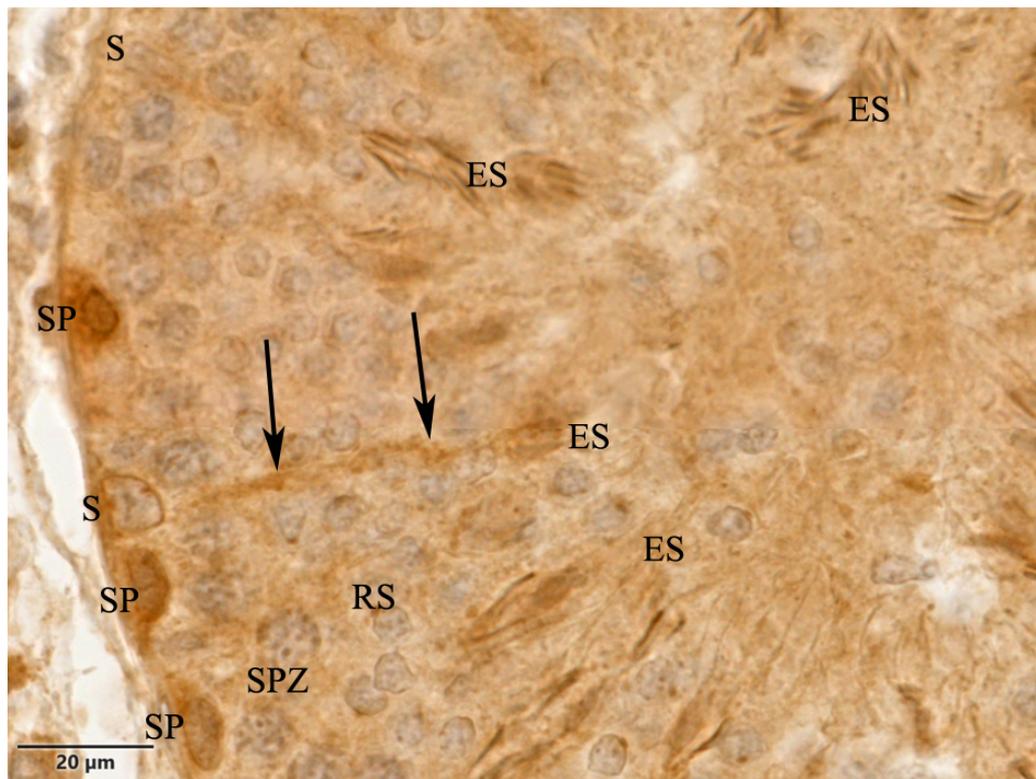


Abbildung 64: Übersichtsaufnahme des Keimepithels eines Tieres aus Gruppe 5b; Occludin.

Auf der Basalmembran sind stark-positive Spermatogonien zu erkennen. Zwischen diesen ist eine Sertoli-Zelle erkennbar, deren Zellkern eine positive Occludin-Umrandung besitzt. Vom Sertoli-Zellkern ausgehend, sind positive Occludin-Granula (schwarzer Pfeil) zu erkennen, welche vom Nukleus zu den elongierten Spermatiden ziehen. Im akrosomalen Vesikel von runden Spermatiden ist ebenfalls ein positiver Nachweis für Occludin zu erkennen.

S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden, ES: elongierte Spermatiden.

1.8. Immunhistochemischer Nachweis von Claudin-3 im Hoden intakter und vakzinierter Eber

1.8.1. Immunhistochemischer Nachweis von Claudin-3 im Hoden intakter Eber der Gruppe 1

Bei den intakten Ebern der Gruppe 1 kann eine positive Reaktion für Claudin-3 im Nukleus von einzelnen Leydig-Zellen gefunden werden. Sertoli-Zellen zeigen meist einen schwachen bis deutlich-positiven Nachweis von Claudin-3 in den Nuklei und auch im Zytoplasma. Zusätzlich sind in den Sertoli- und auch den Leydig-Zellen kleine Claudin-3-positiv gefärbte Granula zu finden. Spermatogonien zeigen meist eine schwach bis deutlich-positive Claudin-3-Immunreaktion im Zytoplasma und auch in den Nuklei. Junge Spermatozyten zeigen häufiger eine negative Claudin-3-Reaktion, während reifere Spermatozyten, die Richtung basal angeordnet sind, eine schwach-positive Reaktion im Nukleus und/oder im Zytoplasma aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigen reifere Spermatozyten nahe den luminalen runden Spermatiden häufig eine schwache bis stark-positive Immunreaktion für den Antikörper gegen Claudin-3 (Abbildung 66). Runde und elongierte Spermatiden weisen meist einen deutlichen bis starken immunhistochemischen Nachweis für Claudin-3 auf.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Reaktionen (Tabelle 14), können, horizontale Claudin-3-Immunreaktionen gefunden werden. Spermatogonien und jüngere Spermatozyten werden von den positiven Nachweisen in einem horizontalen „Band“ von luminal und lateral umgeben (Abbildung 65).

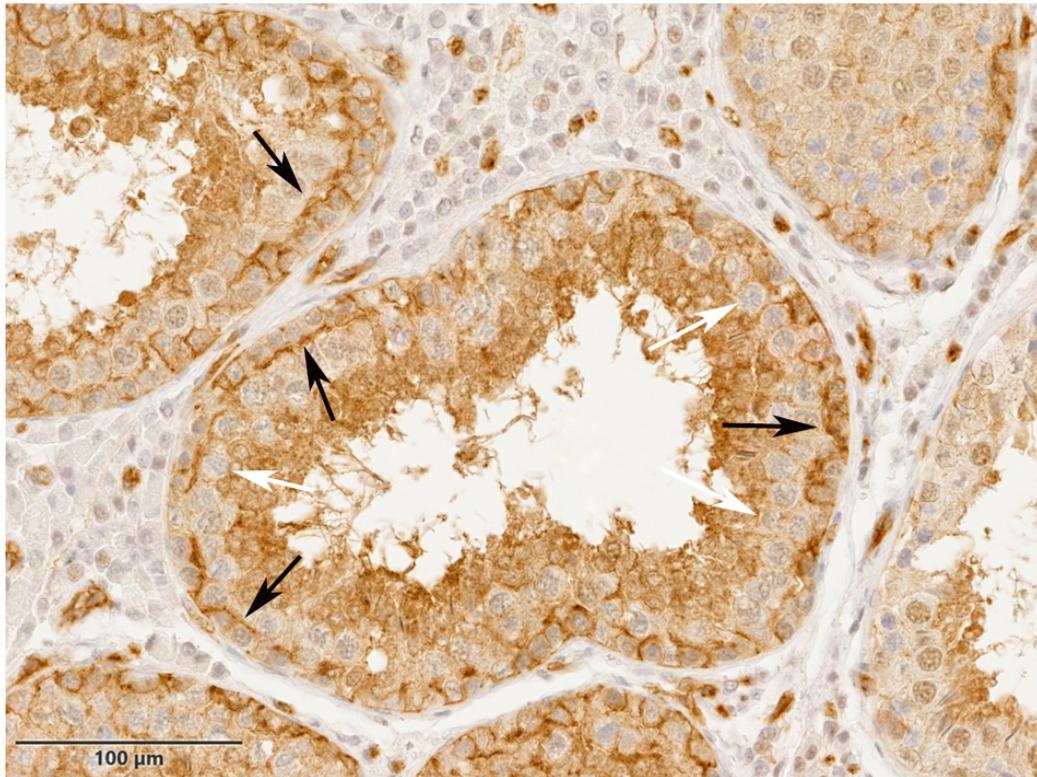


Abbildung 65: Übersichtsaufnahme eines Tubulus-Querschnitts von einem intakten Eber; Claudin-3.

Zu erkennen ist der horizontale Claudin-3-Nachweis, welcher Spermatogonien und junge Spermatozyten von lateral und luminal umgibt (schwarzer Pfeil). Junge Spermatozyten sind im Vergleich zu den Spermatischen negativ oder nur schwach gefärbt (weißer Pfeil).

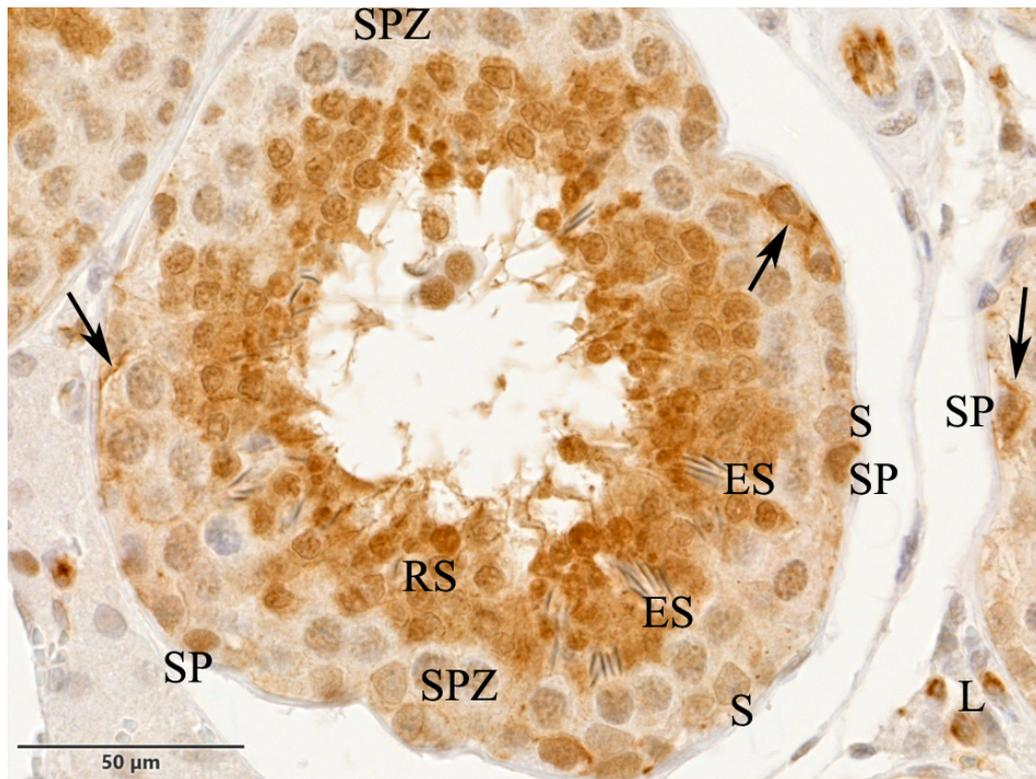


Abbildung 66: Übersichtsaufnahme eines Tubulus-Querschnitts eines intakten Ebers; Claudin-3.

Bemerkenswert ist die starke apikale Claudin-3-Anreicherung in den runden Spermatiden verglichen mit den Spermatozyten. Vereinzelt ist Claudin-3 auf Höhe der Spermatogonien zu finden (schwarzer Pfeil).

L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden, ES: Elongierte Spermatiden.

1.8.2. Immunhistochemischer Nachweis von Claudin-3 im Hoden vakzinierter Eber (Gruppen 2 bis 5)

Die vakzinierten Tiere der Gruppen 2 und 3 zeigen insgesamt ein ähnliches Reaktionsbild für den Antikörper gegen Claudin-3 wie die intakten Eber der Gruppe 1 (Tabelle 14, Tabelle 15). Sertoli-Zellen besitzen eine schwache bis deutliche Claudin-3-Reaktion im Nukleus aber auch im Zytoplasma. Wegen der reduzierten Anzahl an Keimzellen wirkt das Zytoplasma der Sertoli-Zellen stellenweise unterbrochen oder auch „löchrig“.

Im Gegensatz zu den intakten Ebern der Gruppe 1 besitzen sie jedoch Zytoplasmareaktionen der Sertoli-Zellen, welche Sertoli-Zellkerne, Spermatogonien und auch Spermatozyten von basal, lateral und luminal umgeben.

Diese reichen sogar von den Sertoli-Zellkernen bis hin zu im Lumen liegenden Keimzellen, wo diese von den positiven Zytoplasmareaktionen umgeben werden (Abbildung 67). Jedoch gibt es auch Tubuli ohne diese positiven Zytoplasmareaktionen.

Weiterhin haben die Keimzellnuklei der vakzinierten Tiere eine stärkere Immunreaktion von Claudin-3 im Vergleich zu den intakten Ebern. Junge, aber auch einzelne reifere Spermatozyten zeigen häufig eine fehlende Claudin-3-Reaktion. Die Tiere der Gruppe 4 zeigen je nach Anzahl der vorhandenen Keimzellen ein ähnliches Erscheinungsbild wie die intakten Eber der Gruppe 1 (viele Keimzellen) oder - wenn wenige Keimzellen im Keimepithel vorhanden sind - ein ähnliches Erscheinungsbild wie die vakzinierten Tiere der anderen Gruppen. Im Gegensatz zu den vakzinierten Tieren der Gruppe 2 und 3 haben die Tiere der Gruppe 4 keine oder weniger Zytoplasmareaktionen der Sertoli-Zellen. Diese umgeben die Keimzellen von basal nach luminal. Zusätzlich wirkt das Zytoplasma der Sertoli-Zellen von Tieren der Gruppe 4 unterbrochener und hat in den meisten Tubuli eine schwächere Färbung im Vergleich zu den anderen vakzinierten Tieren.

Zwei der vakzinierten Tiere von Gruppe 5b besitzen ein ähnliches Erscheinungsbild wie die intakten Eber der Gruppe 1. Das andere untersuchte Tier der Gruppe 5a sieht ähnlich aus wie die Hoden der Tiere aus Gruppe 4 mit schwacher Zytoplasmareaktion der Sertoli-Zellen. Aber auch wenige oder auch gar keine irregulären Zytoplasmareaktionen, wie es bei den intakten Ebern der Fall ist kommen vor.

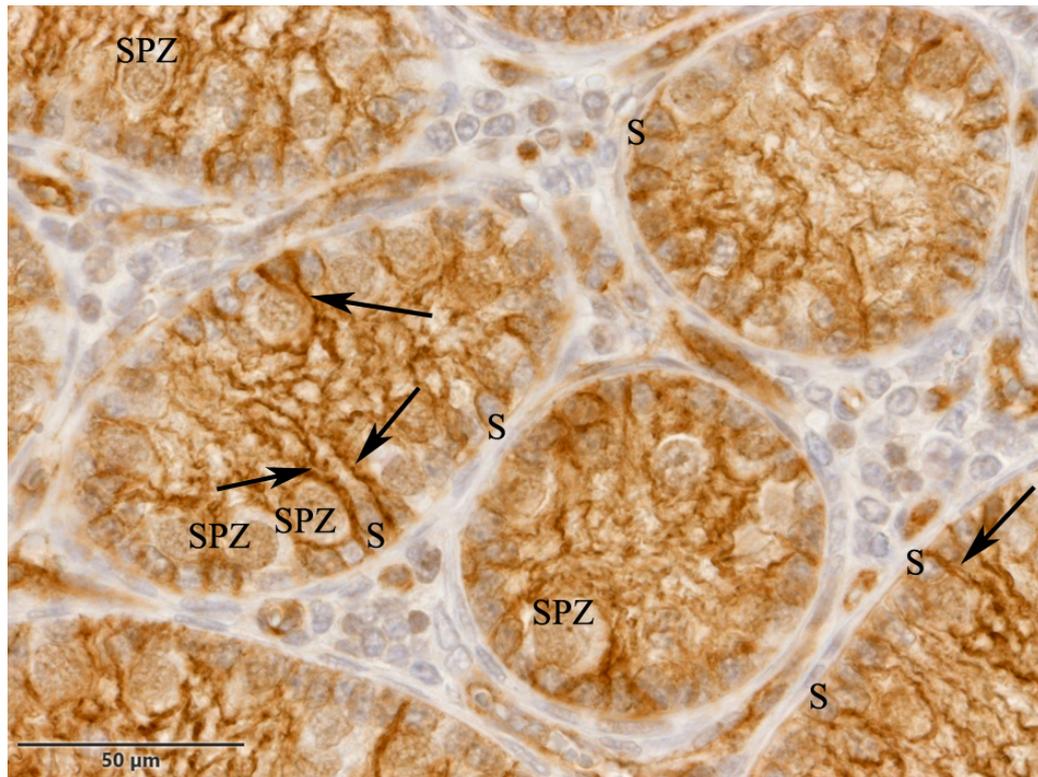


Abbildung 67: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines vakzinierten Tieres aus Gruppe 2; Claudin-3.

Die Claudin-3-Zytoplasmareaktionen haben eine ungeordnete Ausrichtung (schwarzer Pfeil). Positive Claudin-3 Reaktionen, welche die Spermatogonien von luminal umgeben, sind nicht zu sehen.

Schwarzer Pfeil: ungeordnete positive Sertoli-Zellzytoplasmareaktionen, S: Sertoli-Zellkerne, SPZ: Spermatozyten.

1.9. Immunhistochemischer Nachweis von Connexin-43 im Hoden intakter und vakzinierter Eber

1.9.1. Immunhistochemischer Nachweis von Connexin-43 im Hoden intakter Eber der Gruppe 1

Im Zytoplasma von Leydig-Zellen intakter Eber ist eine positive Reaktion für den Antikörper gegen Connexin-43 erkennbar. Zusätzlich sind auch feine positive Granula im Zytoplasma anzutreffen. Auch in der Zellmembran von Leydig-Zellen lässt sich Connexin-43 vereinzelt nachweisen (Abbildung 68).

In den Tubuli seminiferi contorti weisen die Sertoli-Zellen im Zytoplasma Connexin-43-positive Reaktionen auf, welche vom Nukleus perpendikulär bis in Richtung der elongierenden Spermatozyten im Lumen reichen. Zusätzlich sind feine Connexin-43-positive Linien mit feinen Granula zu erkennen, welche Spermatozyten und junge Spermatozyten von horizontal, aber auch basal und lateral umgeben (Abbildung 68, Abbildung 69).

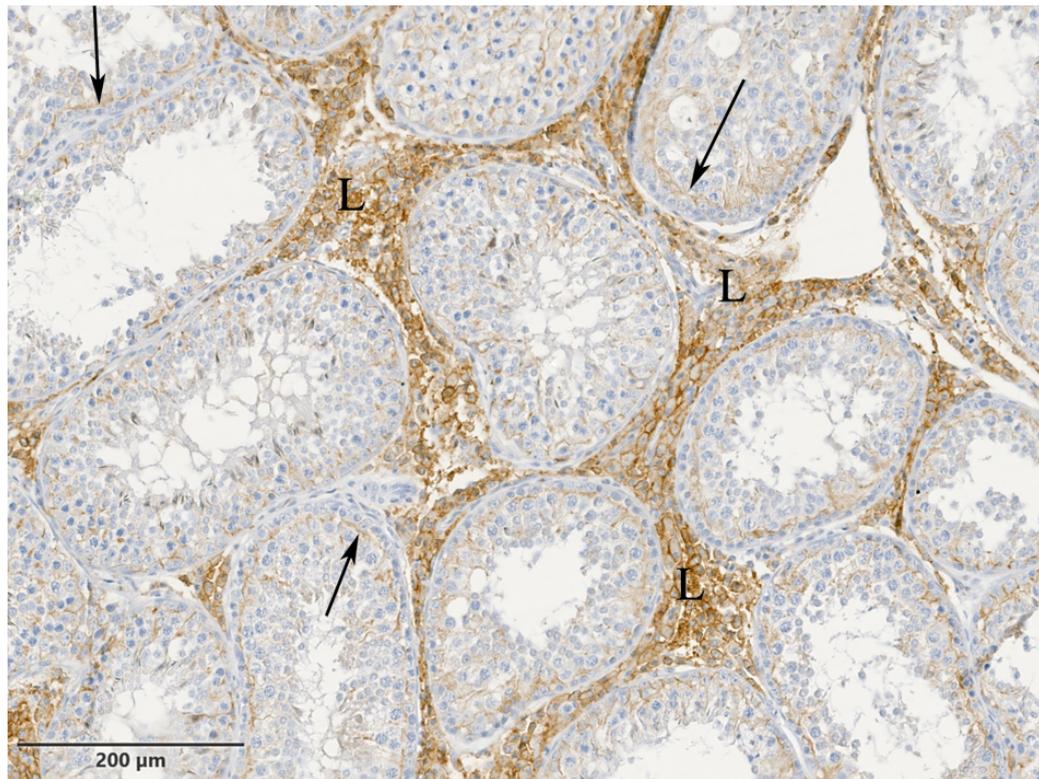


Abbildung 68: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines intakten Ebers aus Gruppe 1; Connexin-43.

Im Interstitium sind Gruppen von Leydig-Zellen, mit positiven Immunreaktionen. Spermatogonien und junge Spermatozyten werden luminal von positiven Connexin-43-Reaktionen umgeben (schwarzer Pfeil). L: Leydig-Zellen.

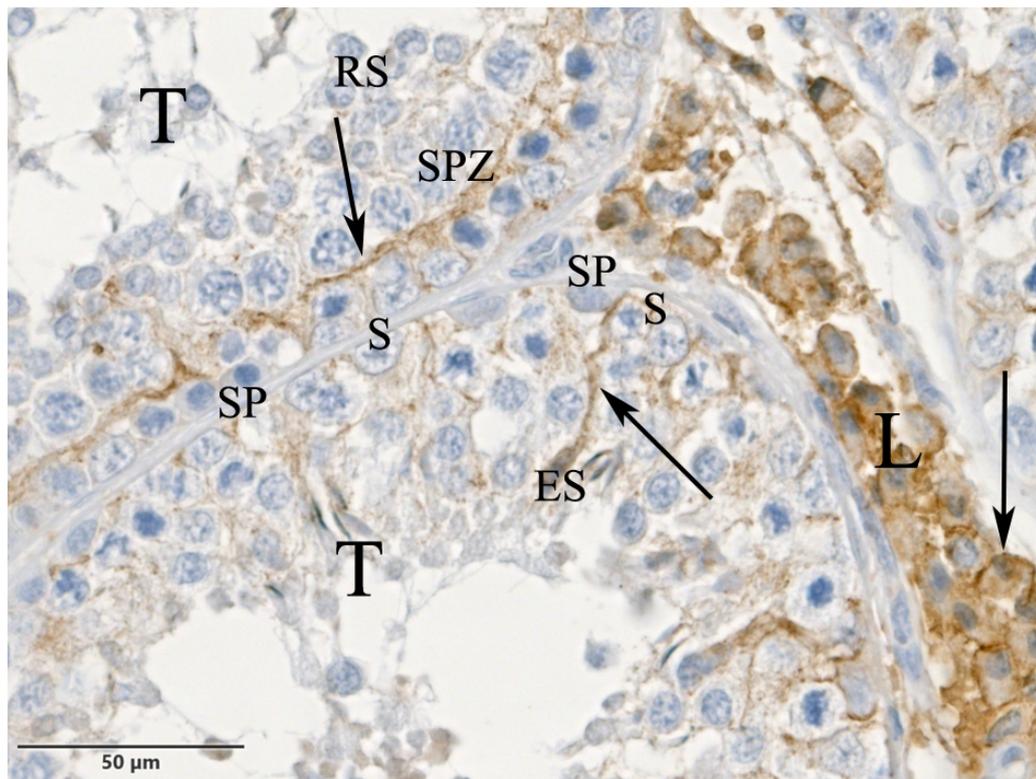


Abbildung 69: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines intakten Ebers aus Gruppe 1; Connexin-43.

An den Leydig-Zellen sind positive Nachweise für Connexin-43 im Zytoplasma, aber auch an der Zellmembran zu finden (schwarzer Pfeil). In den Tubuli ist Connexin-43 in einem „horizontalen Band“ luminal von Spermatogonien und jungen Spermatozyten zu erkennen (schwarzer Pfeil). Ebenso sind positive Connexin-43-Nachweise zwischen angrenzenden Sertoli-Zellen zu finden, die vom Sertoli-Zellkern Richtung Lumen zu elongierten Spermatozoen reichen.

T: Tubuli, L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozoen, RS: Runde Spermatozoen, ES: elongierte Spermatozoen.

1.9.2. Immunhistochemischer Nachweis von Connexin-43 im Hoden vakzinierter Eber (Gruppe 2 bis 5)

Die vakzinierten Tiere der Gruppen 2 bis 5a zeigen ein ähnliches Reaktionsmuster wie die intakten Eber der Gruppe 1 (Tabelle 14, Tabelle 15). Im Gegensatz zu den intakten Ebern besitzen die meisten vakzinierten Tiere nur sehr selten eine durchgehend positive Reaktion für den Antikörper gegen Connexin-43 an der Leydig-Zellmembran (bis auf Gruppe 5b) (Abbildung 70). Wenn diese positiv reagiert, wirkt sie oft unterbrochen.

In den Tubuli seminiferi contorti zeigen die Sertoli-Zellen Connexin-43-positive Zytoplasmareaktionen mit einer schwach- bis deutlich-positiven Reaktion. Im Gegensatz zu den intakten Ebern sind diese bei vakzinierten Tieren irregulär rund um den Sertoli-Zellkern angeordnet (Abbildung 71). Wie auch bei den intakten Ebern sind feine positive Granula im Zytoplasma zu finden. Diese sind meist in der Nähe des Nukleus zu erkennen. Besonders die Tiere der Gruppe 3 haben viele Zytoplasmareaktionen, welche von jedem Sertoli-Zellkern irregulär zum Lumen ziehen. Zusätzlich sind bei den Tieren der Gruppe 3 deutliche, Connexin-43-positive Granula in der Region zweier angrenzender Sertoli-Zellen zu erkennen. Diese reichen in einer Linie von basal nach luminal.

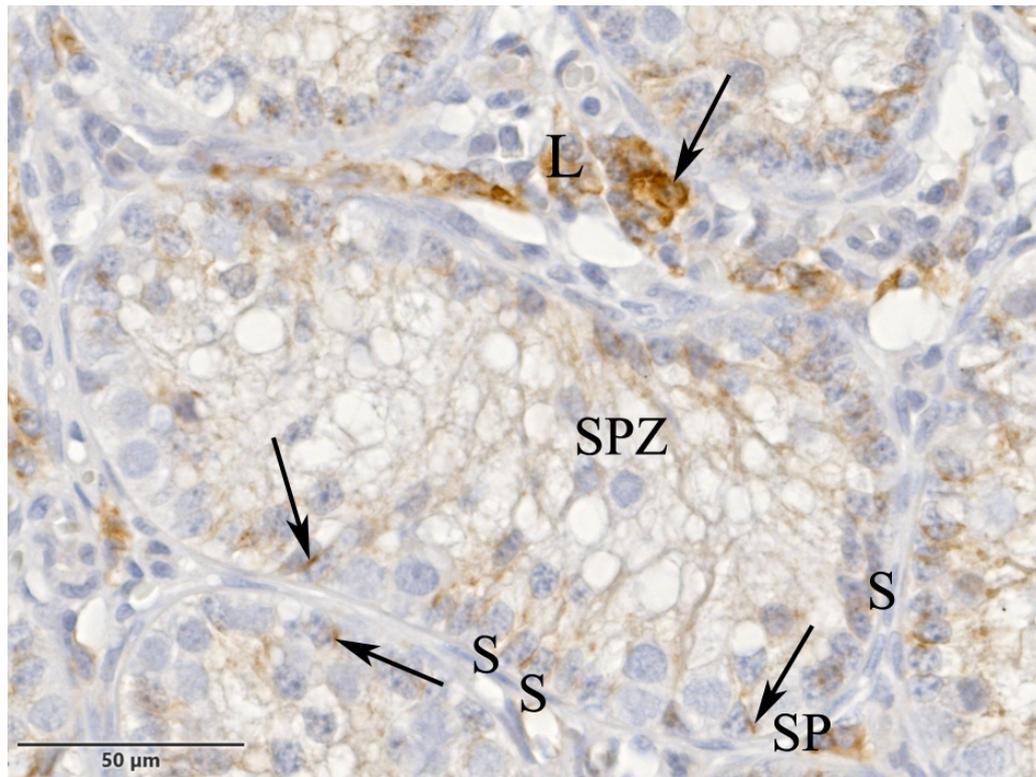


Abbildung 70: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines vakzinieren Tieres aus Gruppe 2; Connexin-43.

Im Interstitium sind Leydig-Zellen mit zum Teil pyknotischen oder degenerativen Zellkernen zu erkennen. Auch hier sind positive Connexin-43-Nachweise an Zytoplasma und Zellmembran zu finden (schwarzer Pfeil). In den Tubuli seminiferi contorti befinden sich, der Basalmembran aufliegend zahlreiche Sertoli-Zellkerne. Lateral der Sertoli-Zellnuklei (schwarzer Pfeil) sind zum Teil positive Connexin-43-Nachweise (schwarzer Pfeil) zu finden, die zum Teil Richtung Lumen ziehen.

L: Leydig-Zellen, **S:** Sertoli-Zellkerne, **SP:** Spermatogonien, **SPZ:** Spermatozyten.

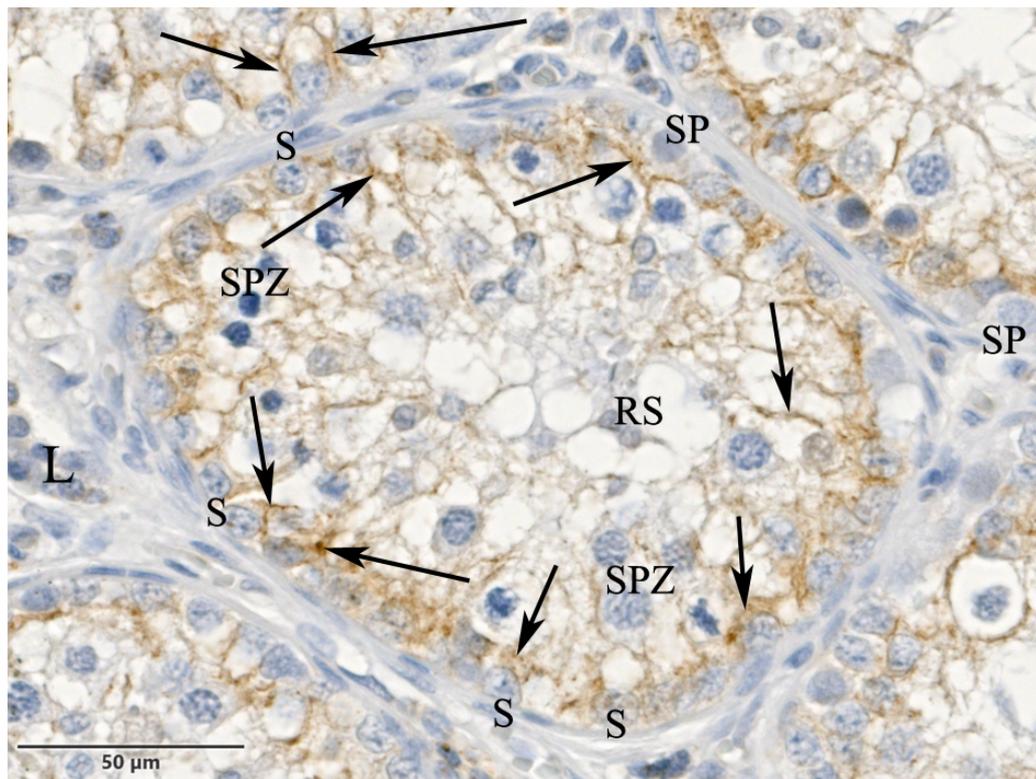


Abbildung 71: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines vakzinierten Tieres aus Gruppe 3; Connexin-43.

Die Connexin-43-positiven Zytoplasmareaktionen (schwarzer Pfeil), welche ungeordnet Richtung Lumen reichen sind hier zahlreicher als bei dem Tier aus Gruppe 2 (Abbildung 70).

L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden.

Die Tiere der Gruppe 4 besitzen nur einzelne bis wenige Leydig-Zellen mit einem positiven Connexin-43-Nachweis und positiven Granula im Zytoplasma.

In den Tubuli seminiferi contorti mit vielen Keimzellen besitzen die Zytoplasmareaktionen der Sertoli-Zellen ein ähnliches Reaktionsmuster wie bei den intakten Ebern, während bei den Tubuli mit wenigen Keimzellen im Lumen die Zytoplasmareaktionen einen irregulären Verlauf wie bei den Tieren der Gruppe 2 und 3 besitzen.

Die Tiere der Gruppe 5 können auch hier in zwei Gruppen aufgeteilt werden: Die Gruppe 5a zeigt eine ähnliche Morphologie wie vakzinierte Tiere der Gruppen 2 bis 4, die Gruppe 5b hat ein Erscheinungsbild, welches dem der intakten Eber ähnelt. Die Tiere der Gruppe 5b weisen positive Reaktionen im Sertoli-Zellzytoplasma auf, welche perpendikulär vom Nukleus zu elongierten Spermatiden reichen. Ebenso sind horizontale Linien welche Spermatogonien und junge Spermatozyten umgeben, vorhanden (Abbildung 72, Abbildung 73). Auch hier sind wieder viele Connexin-43-positive Granula im Zytoplasma zu erkennen.

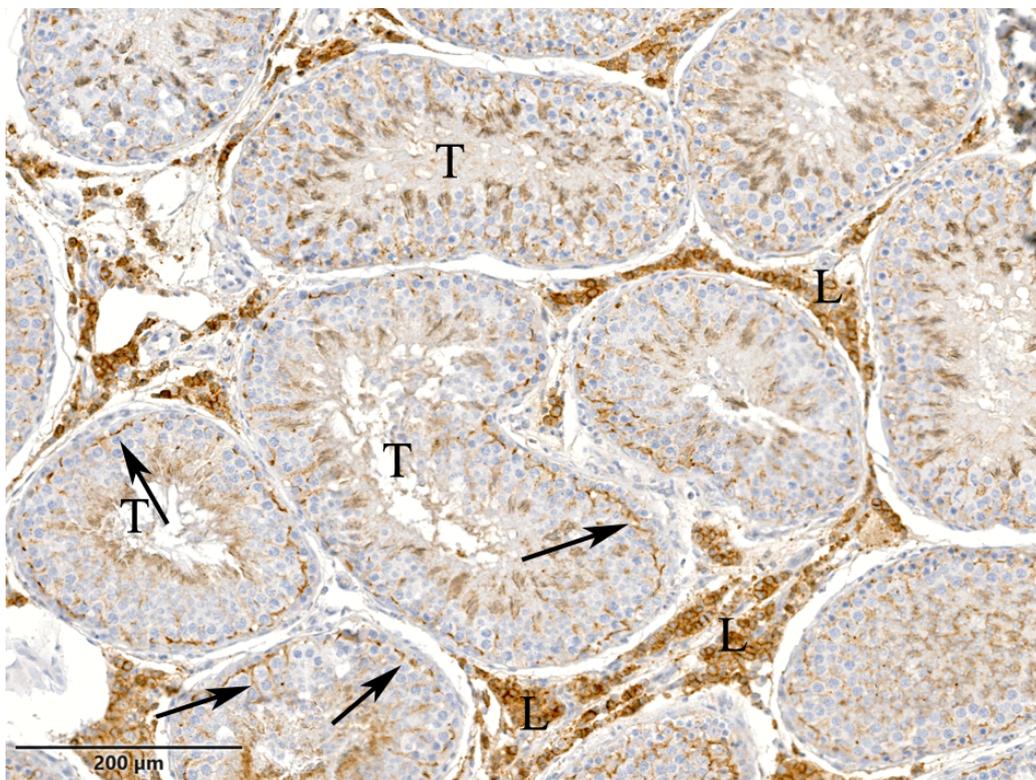


Abbildung 72: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines vakzinierten Tieres aus Gruppe 5b; Connexin-43.

Hier ist die Ähnlichkeit zu den intakten Ebern (Abbildung 65) zu erkennen.
L: Leydig-Zellen, T: Tubuli, schwarzer Pfeil: positiver Connexin-43-Nachweis in einem horizontalen „Band“, welches Spermatogonien und junge Spermatozyten von luminal umgibt.

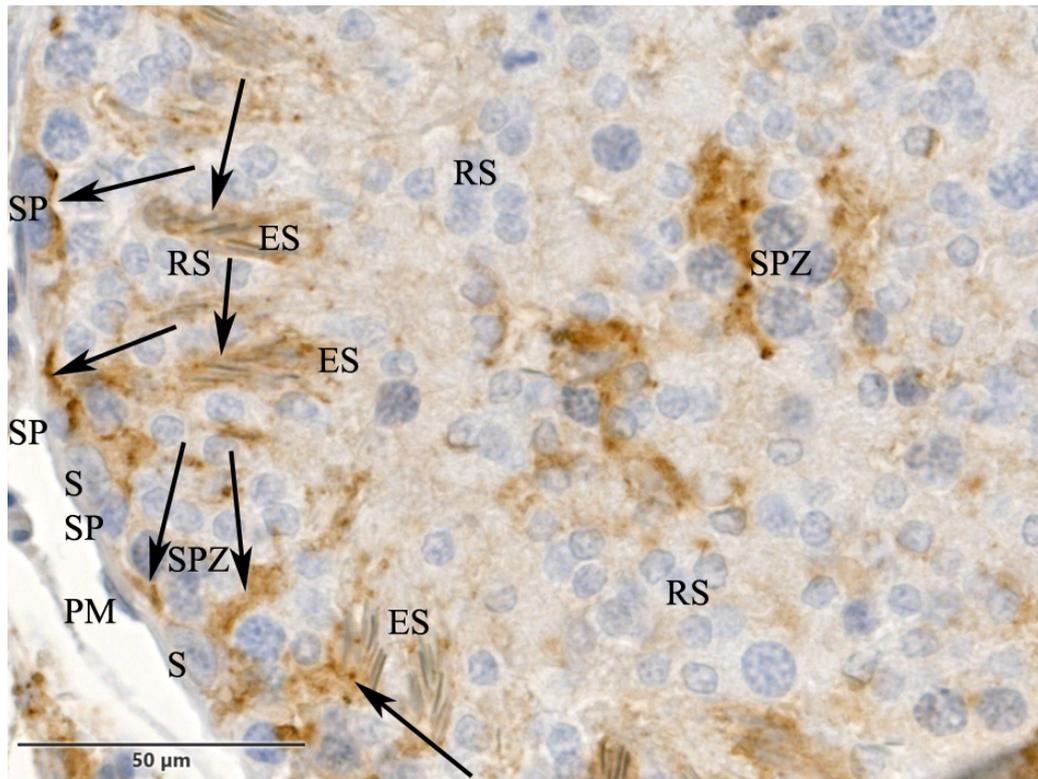


Abbildung 73: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines vakzinierten Tieres aus Gruppe 5b; Connexin-43.

Auch hier sind Connexin-43-positive Reaktionen (schwarzer Pfeil) zu erkennen. Diese umgeben die Spermatogonien. Ebenso sind positive Zytoplasmareaktionen in Sertoli-Zellen zu finden, die von den Sertoli-Zellkernen in Richtung elongierte Spermatozoen reichen (schwarzer Pfeil).

S: Sertoli-Zellkerne, **SP:** Spermatogonien, **SPZ:** Spermatozyten, **RS:** Runde Spermatozoen, **ES:** Elongierte Spermatozoen.

1.10. Immunhistochemischer Nachweis des Estrogen-Rezeptors α im Hoden intakter und vakzinierter Eber

Der Estrogen-Rezeptor α kann immer im Zytoplasma von Leydig-Zellen nachgewiesen werden. Bei allen Tieren der unterschiedlichen Gruppen variiert der Nachweis des Estrogen-Rezeptors α im Sertoli-Zellkern und -Zytoplasma zwischen einer negativen bis deutlich positiven Immunreaktion (Tabelle 14, Tabelle 15).

1.10.1. Immunhistochemischer Nachweis des Estrogen-Rezeptors α im Hoden intakter Eber der Gruppe 1

Die Keimzellen, aber auch die Sertoli-Zellen der intakten Eber zeigen meist eine negative oder nur schwache Reaktion des Estrogen-Rezeptors α . Einzelne Spermatogonien und Spermatozyten zeigen einen deutlich-positiven Nachweis für den Estrogen-Rezeptor α vor allem im Zytoplasma, zum Teil aber auch im Nucleus. Im Gegensatz dazu ist auffällig, dass sowohl die Leydig-Zellen, vor allem im Zytoplasma und teilweise im Nucleus, aber auch die Spermaköpfe einen deutlichen bis starken Nachweis des Estrogen-Rezeptors α im Vergleich zu den restlichen Zellen besitzen (Abbildung 74 und Abbildung 75). Runde Spermaköpfe haben vor allem im akrosomalen Vesikel, aber auch am Spermakopf eine positive Immunreaktion gegen den Estrogen-Rezeptor α (Abbildung 74).

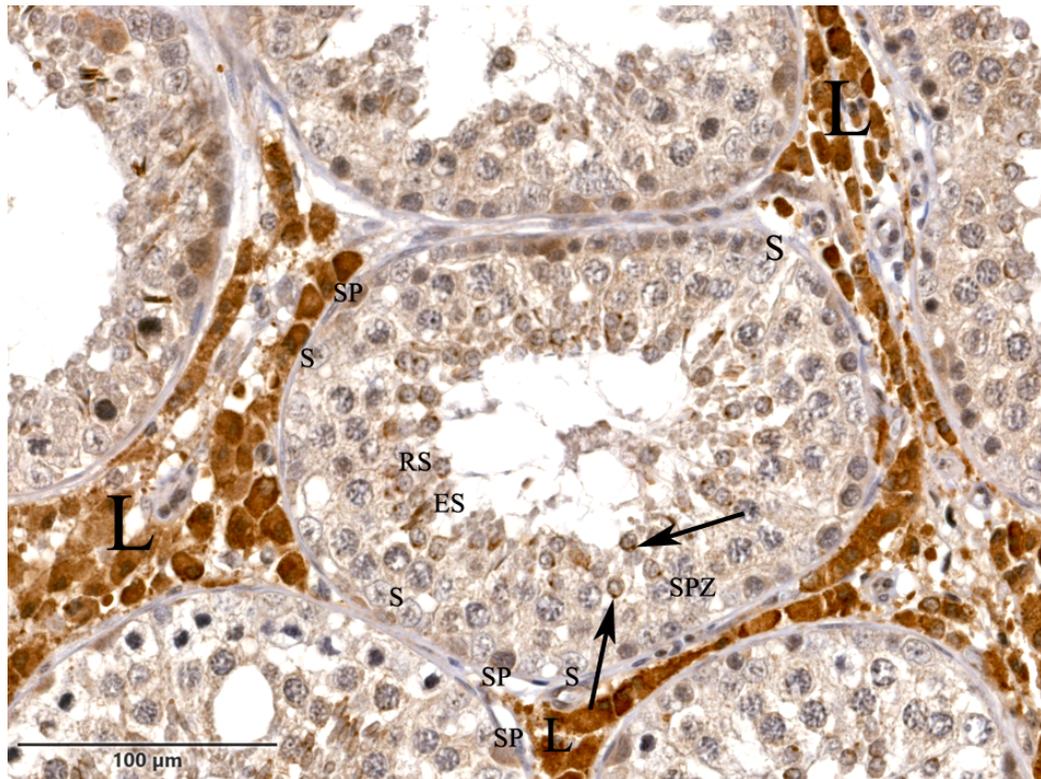


Abbildung 74: Übersichtaufnahme von einem Querschnitt der Tubuli seminiferi contorti eines intakten Ebers; Estrogen-Rezeptor α .

Die Leydig-Zellen besitzen eine stark-positive Immunreaktion für den Antikörper gegen Estrogen α . Die Spermatiden haben einen positiven Nachweis in den akrosomalen Vesikeln (schwarzer Pfeil)

L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden, ES: Elongierte Spermatiden.

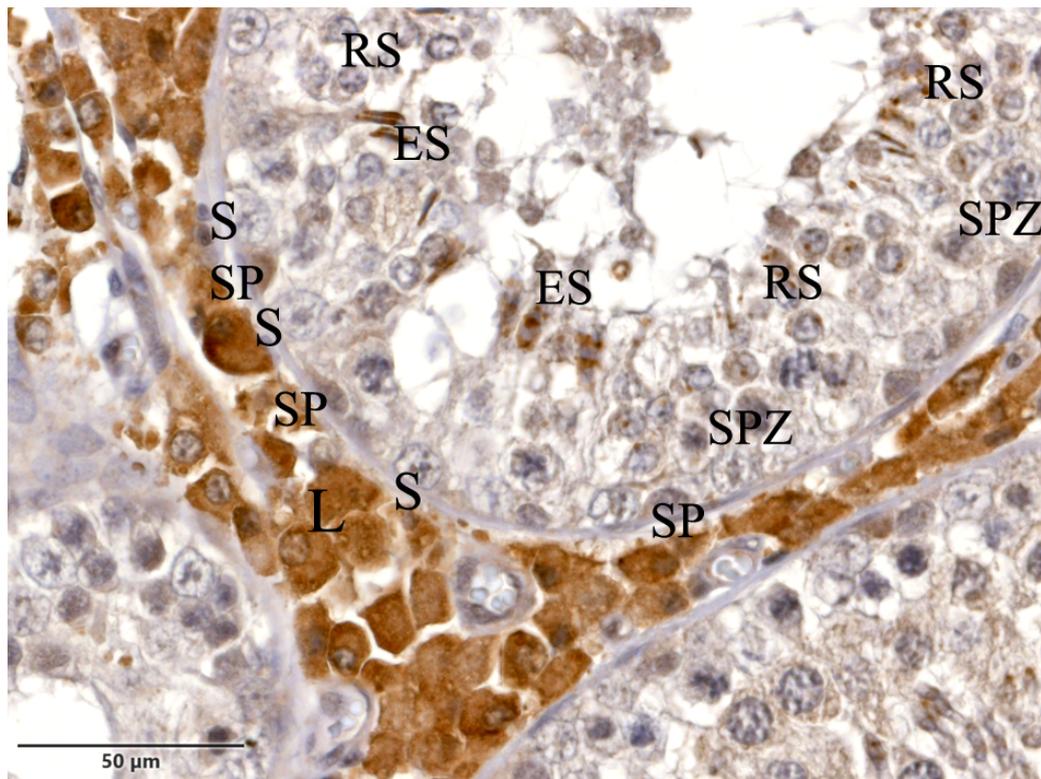


Abbildung 75: Vergrößerungsaufnahme von einem Tubulus-Querschnitt eines intakten Ebers; Estrogen-Rezeptor α .

Leydig-Zellen haben eine stark-positive Immunreaktion für den Antikörper gegen Estrogen-Rezeptor α . Auch die runden und elongierten Spermatiden zeigen eine positive Immunreaktion.

L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden, ES: Elongierte Spermatiden.

1.10.2. Immunhistochemischer Nachweis des Estrogen-Rezeptors α im Hoden vakzinierter Eber (Gruppe 2 bis 5)

Die vakzinieren Tiere der Gruppen 2 bis 5a zeigen eine stärkere positive Reaktion der Leydig-Zellen im Zytoplasma, aber zum Teil auch im Nukleus. Im Vergleich zu den intakten Ebern reagieren vor allem das Sertoli-Zellzytoplasma, die Spermato gonien und Spermatozyten im Zytoplasma und auch im Nukleus der meisten vakzinieren Tiere aus Gruppe 2 bis 5a stärker positiv. Vergleichsweise zeigen einige Tiere der Gruppe 3 und 4 eine deutlich positivere immunhistochemische Reaktion für den Antikörper gegen Estrogen-Rezeptor α in allen Zellen, als die Gruppe 2 (Abbildung 76, Abbildung 77).

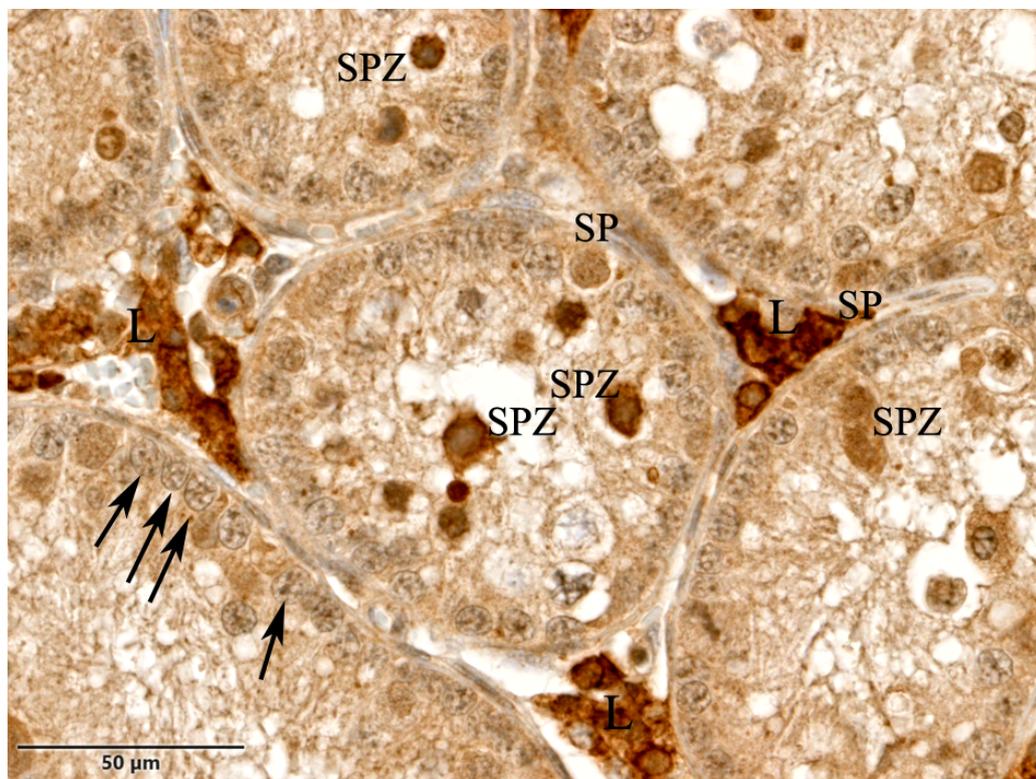


Abbildung 76: Querschnitt der Tubuli seminiferi contorti eines Tieres der Gruppe 3; Estrogen-Rezeptor α .

Zu erkennen sind stark-positive Immunreaktionen. Vor allem im Zytoplasma, aber zum Teil auch in den Nuklei der Leydig-Zellen. Ebenso im Zytoplasma sowie teilweise in den Nuklei von Spermatozyten im Lumen. L: Leydig-Zellen, schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden, ES: Elongierte Spermatiden.

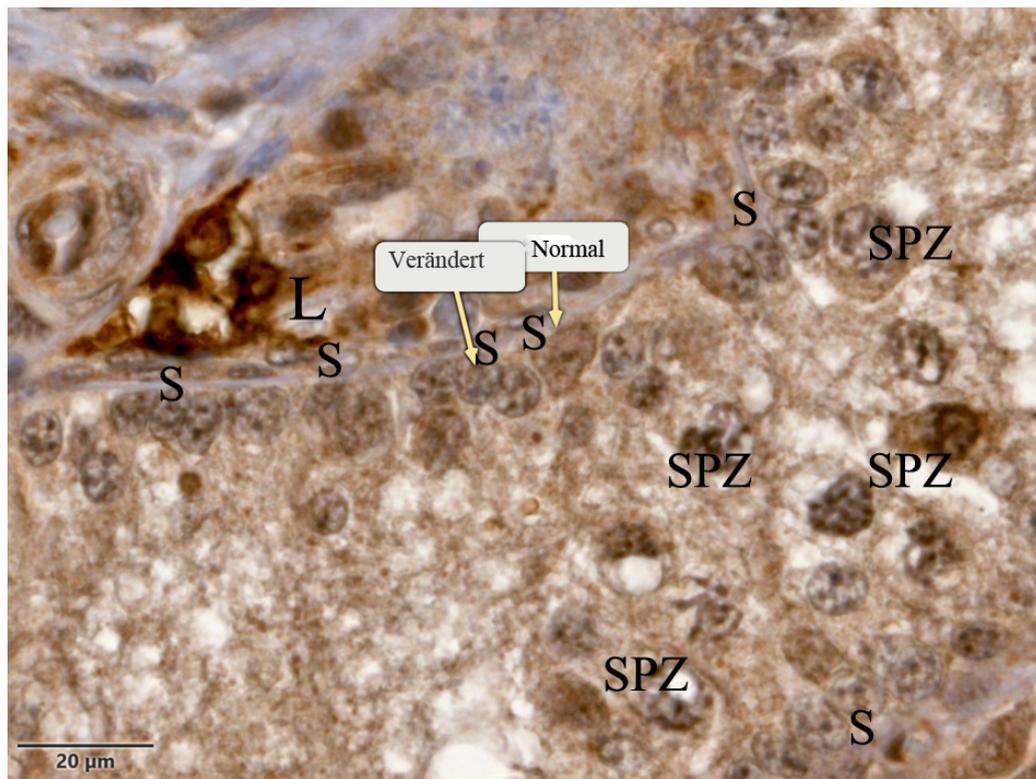


Abbildung 77: Tubulus-Anschnitt eines Tieres der Gruppe 2; Estrogen-Rezeptor α .

Das Sertoli-Zellzytoplasma, die Zellkerne der Sertoli-Zellen, und die vorhandenen Nuklei der Keimzellen haben einen stark-positiven Nachweis für den Estrogen-Rezeptor α . Auf der Basalmembran sind überwiegend veränderte Sertoli-Zellkerne mit kleiner ovaler/runder Gestalt. In dieser Abbildung hat ein Sertoli-Zellkern physiologisches Aussehen wie es bei den intakten Ebern zu sehen ist.

L: Leydig-Zellen, schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden, ES: Elongierte Spermatiden

Zwei Tiere der Gruppe 5 (5b) besitzen eine ähnliche Immunreaktion - bezogen auf die starke Reaktion der Leydig-Zellen und der Spermatiden - wie die intakten Eber. Insgesamt sind diese jedoch deutlicher gefärbt. Die Tiere der Gruppe 5a besitzen ein Erscheinungsbild, welches denen der vakzinierten Tiere von Gruppe 2 bis 4 ähnelt.

1.11. Immunhistochemischer Nachweis des Estrogen-Rezeptors β im Hoden intakter und vakzinierter Eber

Der Antikörper gegen den Estrogen-Rezeptor β kann bei den intakten Ebern in den Spermatogonien, Spermatozyten, runden Spermatiden und teilweise auch in elongierten Spermatiden nachgewiesen werden (Abbildung 78, Tabelle 14). Eine schwache bis stark-positive Reaktion ist vor allem in den Keimzellkernen, teilweise auch im Zytoplasma der Keimzellen zu erkennen. Die Zellkerne der Sertoli-Zellen haben unterschiedliche Reaktionsmuster, von negativ bis deutlich-positiv. Das Sertoli-Zellzytoplasma ist häufig schwach-positiv für den Estrogen-Rezeptor β . Die Reaktionen im Leydig-Zellkern variieren von negativ bis stark-positiv, das Zytoplasma zeigt meistens stark-positive Reaktionen.

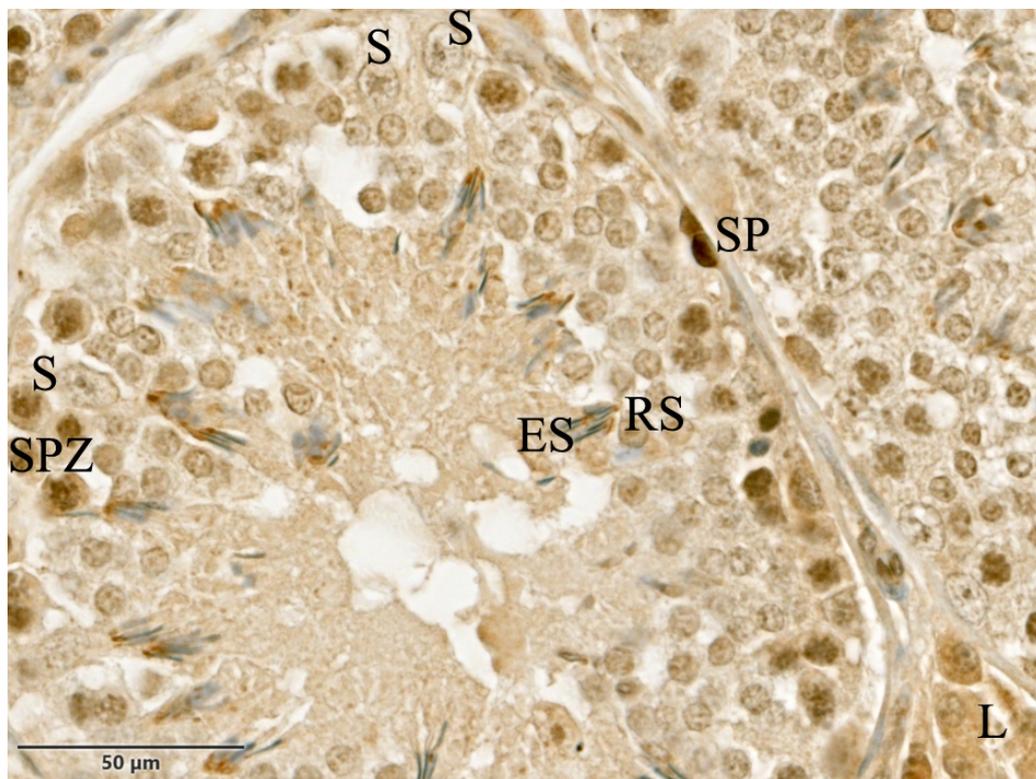


Abbildung 78: Übersichtsaufnahme von einem Tubulus-Querschnitt eines intakten Ebers; Estrogen-Rezeptor β .

Die Spermatogonien und teilweise auch Spermatozyten sind stark-positiv im Vergleich zu den restlichen Keimzellen.

L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellen, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden, ES: Elongierte Spermatiden.

1.11.1. Immunhistochemischer Nachweis des Estrogen-Rezeptors β im Hoden vakzinierter Eber (Gruppe 2 bis 5)

Die vakzinierten Tiere der Gruppe 2 bis 5a weisen im Gegensatz zu den intakten Ebern oft eine schwache oder negative Reaktion für den Estrogen-Rezeptor β in allen Keimzelltypen und auch den Leydig-Zellen auf (Tabelle 15). Dort vor allem in den Nuklei. Im Leydig-Zellzytoplasma sind schwach bis deutlich positive Reaktionen zu erkennen. Das Sertoli-Zellzytoplasma reagiert häufig schwach- bis deutlich-positiv für den Antikörper gegen den Estrogen-Rezeptor β , der Sertoli-Zellkern zeigt Variationen von schwach- bis deutlich-positiv. Veränderte Spermatogonien und Spermatozyten sind meist schwach- bis deutlich-Estrogen-Rezeptor- β -positiv, sowohl im Zytoplasma, aber zum Teil auch im Nukleus (Abbildung 79).

Wenn physiologische Spermatozyten und runde Spermatiden vorhanden sind, so besitzen diese meistens einen negativen Nukleus mit variierenden Reaktionen im Zytoplasma bis hin zu deutlich-positiv reagierendem Zytoplasma. Die Tiere der Gruppe 4 zeigen, wenn in den Tubuli seminiferi contorti viele physiologische Keimzellen bis hin zu elongierten Spermatiden vorhanden sind, oft eine negative Reaktion in den Nuklei von Keimzellen. Das Zytoplasma ist schwach- bis deutlich-positiv. Wenn in den Tubuli seminiferi contorti überwiegend Sertoli-Zellen sowie veränderte große Spermatogonien und Spermatozyten vorkommen, so haben die Spermatogonien und Spermatozyten oft eine starke Reaktion im Zytoplasma, zum Teil jedoch auch im Nukleus.

Eine Ausnahme in Bezug auf die Keimzellen stellt jeweils ein Tier aus Gruppe 5a und ein Tier aus Gruppe 6 dar, welche überwiegend Spermatogonien und Spermatozyten haben. Sie weisen eine stark-positive Reaktion in allen Keimzellen, dort vor allem im Nukleus und Zytoplasma sowie in Sertoli-Zellen (Zytoplasma und Nukleus) und in Leydig-Zellen (Nukleus und Zytoplasma) auf.

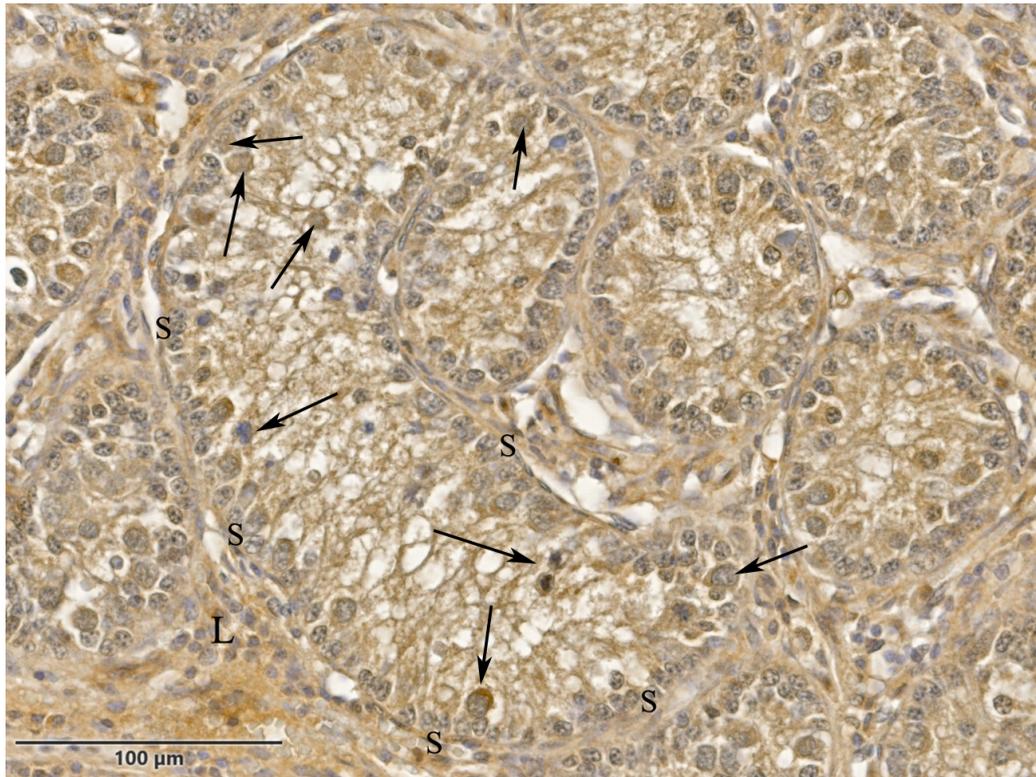


Abbildung 79: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines Tieres aus Gruppe 2; Estrogen-Rezeptor β .

Auf der Basalmembran sind große veränderte Spermatogonien und im Lumen Spermatozyten zu erkennen. Das Zytoplasma von Sertoli-Zellen hat eine stark-positive Immunreaktion.

Schwarzer Pfeil: Spermatogonien und Spermatozyten mit zum Teil positiven Immunreaktionen, vor allem im Zytoplasma.

S: Sertoli-Zellkern, L: Leydig-Zellen.

Die Tiere der Gruppe 5 können in zwei Gruppen aufgeteilt werden: Die Gruppe 5b, welche den intakten Ebern ähnelt, und die Gruppe 5a, welche ein ähnliches Erscheinungsbild wie die vakzinierten Tiere der Gruppe 2 bis 4 aufweist. Beide Gruppen haben eine deutlich- bis stark-positive Reaktion im Zytoplasma und zum Teil auch im Nukleus der Leydig-Zellen. Tiere der Gruppe 5b können in allen Keimzellen - vor allem in Spermatozyten bis zu Spermatischen - negativ bis schwach-positive Estrogen-Rezeptor- β -Reaktionen in den Nuklei, aber auch im Zytoplasma haben. Dies ist bei den intakten Ebern nicht der Fall.

1.12. Immunhistochemischer Nachweis des FSH-Rezeptors im Hoden intakter und vakzinierter Eber

Der FSH-Rezeptor kann in allen Zellen, außer den elongierten Spermatisden nachgewiesen werden (Tabelle 14, Tabelle 15).

1.12.1. Immunhistochemischer Nachweis des FSH-Rezeptors im Hoden intakter Eber der Gruppe 1

Bei intakten Ebern kann der FSH-Rezeptor im Zytoplasma von Leydig-Zellen nachgewiesen werden, im Zytoplasma und Nukleus von Sertoli-Zellen, Spermatogonien, Spermatozyten und runden Spermatisden (Abbildung 81). Eine Ausnahme stellen vor allem die Nuklei von jüngeren Spermatozyten dar, welche des Öfteren negative oder schwach-positive Immunreaktionen für den FSH-Rezeptor zeigen. Bis auf die elongierten Spermatisden besitzen alle Zelltypen feine positive Granula im Nukleus. Daher erscheint der Nukleus meist deutlicher positiv im Vergleich zum Zytoplasma.

Sertoli-Zellkerne zeigen häufig eine negative bis schwach-positive Immunreaktion des FSH-Rezeptors im Nukleus, das Zytoplasma variiert bis zu deutlich positiv. Es finden sich deutlich positive Granula im Sertoli-Zellnukleus, nahe den Nukleoli.

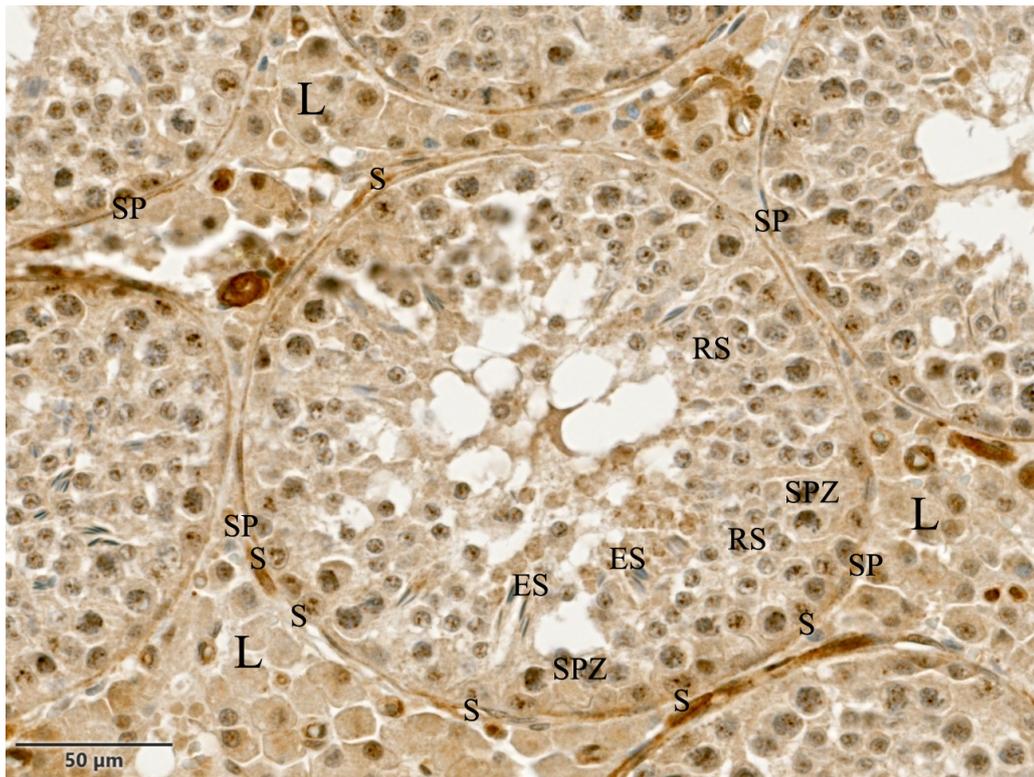


Abbildung 81: Übersichtsaufnahme eines Tubulus von einem Tier aus Gruppe 1; FSH-Rezeptor.

Im Interstitium sind sowohl Leydig-Zellkerne als auch das Zytoplasma positiv für den FSH-Rezeptor. In den Tubuli zeigen bis auf die elongierten Spermatiden alle Keimzellen eine positive Reaktion des FSH-Rezeptors. Insbesondere im Zellkern der Sertoli- und Keimzellen sind positive FSH-Rezeptor-Nachweise zu erkennen.

L: Leydig-Zellen, **S:** Sertoli-Zellkerne, **SP:** Spermatogonien, **SPZ:** Spermatozyten, **RS:** Runde Spermatiden, **ES:** Elongierte Spermatiden.

1.12.2. Immunhistochemischer Nachweis des FSH-Rezeptors im Hoden vakzinierter Eber (Gruppe 2 bis 5)

Im Gegensatz zu den intakten Ebern weisen die vakzinieren Tiere der Gruppen 2 bis 5a häufig einen deutlich-FSH-Rezeptor-positiven Sertoli-Zellkern sowie ein deutlich-positives Zytoplasma auf. Die Tiere der Gruppe 2 und 3 scheinen weniger positive Granula im Sertoli-Zellkern zu besitzen, während die Tiere der Gruppe 4 wieder mehr positive Sertoli-Zellgranula aufweisen.

Auch die Keimzellen (Spermatogonien, Spermatozyten - und wenn vorhanden - runde Spermatiden der vakzinierten Tiere von Gruppe 2 bis 5a zeigen eine schwache bis deutliche Reaktion im Nukleus (Abbildung 83 und Abbildung 84).

Besonders veränderte große Spermatogonien und Spermatozyten besitzen deutlich-positive FSH-Rezeptor-Reaktionen im Zytoplasma und im Nukleus (Abbildung 82). Leydig-Zellen haben Variationen von negativen, bis meistens deutlich-positiven Reaktionen im Nukleus. Wenn Zytoplasma vorkommt, so ist es positiv.

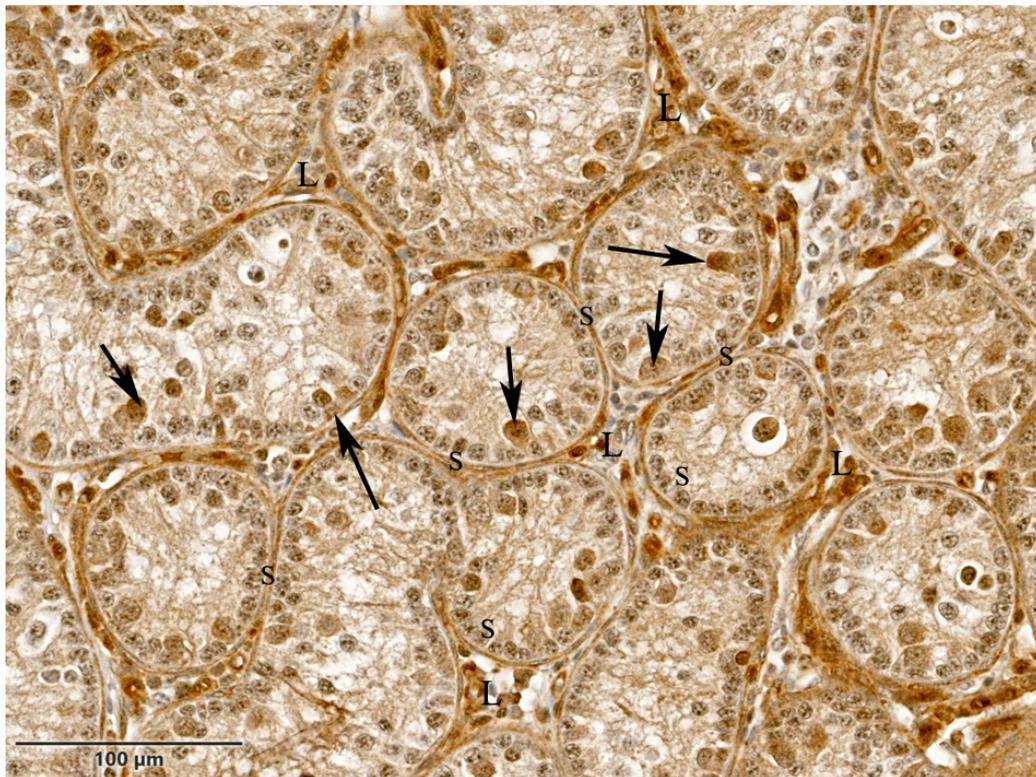


Abbildung 82: Übersichtsaufnahme eines Tieres aus Gruppe 2; FSH-Rezeptor.

Zu erkennen ist der stark-positive Nachweis in den veränderten Spermatogonien auf der Basalmembran (schwarzer Pfeil) und Spermatozyten im Lumen (schwarzer Pfeil). Sertoli-Zellen sind ebenfalls positiv für den Antikörper gegen den FSH-Rezeptor. S: Sertoli-Zellkerne, L: Leydig-Zellen.

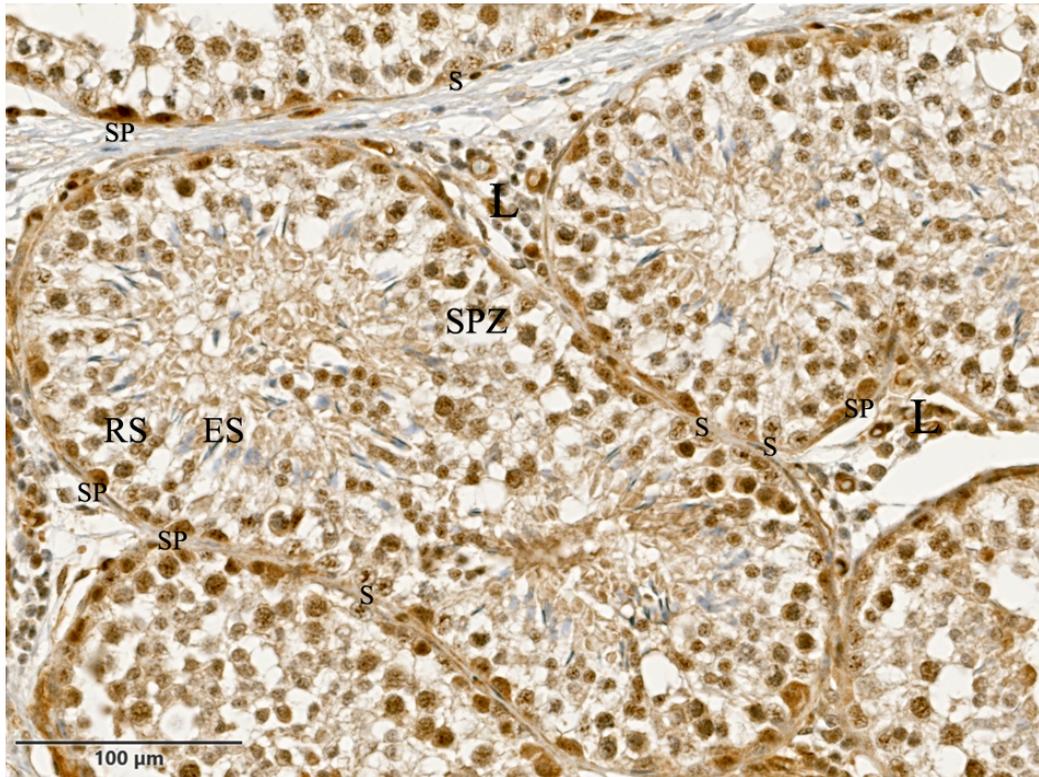


Abbildung 83: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines Tieres aus Gruppe 4; FSH-Rezeptor.

Das Tier der Gruppe 4 hat wie auch die intakten Eber der Gruppe 1 viele Keimzellreihen bis hin zu elongierten Spermatiden. Auf der Basalmembran sind physiologisch aussehende Sertoli-Zellen und Spermatogonien zu finden.

L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden, ES: Elongierte Spermatiden.

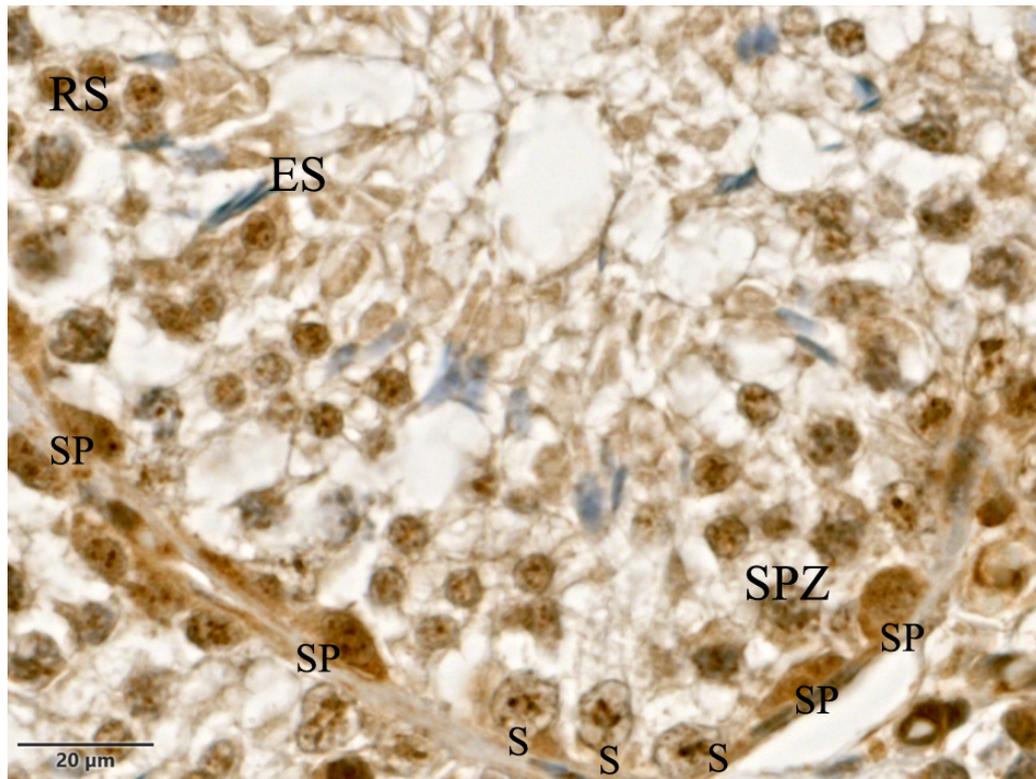


Abbildung 84: Übersichtsaufnahme eines Tubulus seminiferus contortus eines Tieres aus Gruppe 4; FSH-Rezeptor.

Spermatogonien, Spermatozyten und runde Spermatozoen sowie die Sertoli-Zellen haben eine positive Immunreaktion für den Antikörper gegen den FSH-Rezeptor. Elongierte Spermatozoen sind negativ für den FSH-Rezeptor.
L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatozoen, ES: Elongierte Spermatozoen.

Die Gruppe 5 kann aufgeteilt werden in zwei Gruppen: Die Gruppe 5b ähnelt den intakten Ebern. Die Gruppe 5a ähnelt den vakzinierten Tieren der Gruppe 2 bis 4, welche im vorherigen Abschnitt beschrieben wurden. Die Tiere der Gruppe 5b zeigen wie auch die intakten Eber eine positive Reaktion im Zytoplasma der Leydig-Zellen, Nuklei variieren zwischen negativ und positiv. Die Keimzellen von Spermatogonien bis hin zu den runden Spermatozoen zeigen sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma positive Reaktionen. Nur die elongierten Spermatozoen sind negativ. Sertoli-Zellkerne und Zytoplasma sind schwach- bis deutlich-positiv für den Antikörper gegen den FSH-Rezeptor. Insgesamt wirkt die Immunreaktion in der Gruppe 5b in allen positiven Zellen stärker im Vergleich zu den intakten Ebern.

1.13. Immunhistochemischer Nachweis von Testosteron im Hoden intakter und vakzinierter Eber

Die Reaktionen für den Antikörper gegen Testosteron sind im Zytoplasma von Leydig-Zellen positiv. Ebenso sind positive Nachweise im Zytoplasma von Sertoli-Zellen zu finden (Tabelle 14, Tabelle 15).

1.13.1. Immunhistochemischer Nachweis von Testosteron im Hoden intakter Eber der Gruppe 1

Neben den bereits oben geschilderten Nachweisen in den Leydig-Zellen (Abbildung 85 und Abbildung 86) sowie den Sertoli-Zellen, kann eine positive Reaktion für den Antikörper gegen Testosteron auch im Zytoplasma von Spermatogonien sowie einzelnen jüngeren Spermatozyten gefunden werden. Die Reaktionen zeigen sich häufig in Form von kleinen Granula in den bisher genannten Zellen. Einige Sertoli-Zellen der intakten Eber weisen Testosteron-positive Granula auf, welche sich linienartig vom Nukleus bis zu den elongierenden Spermatischen anordnen (Abbildung 86).

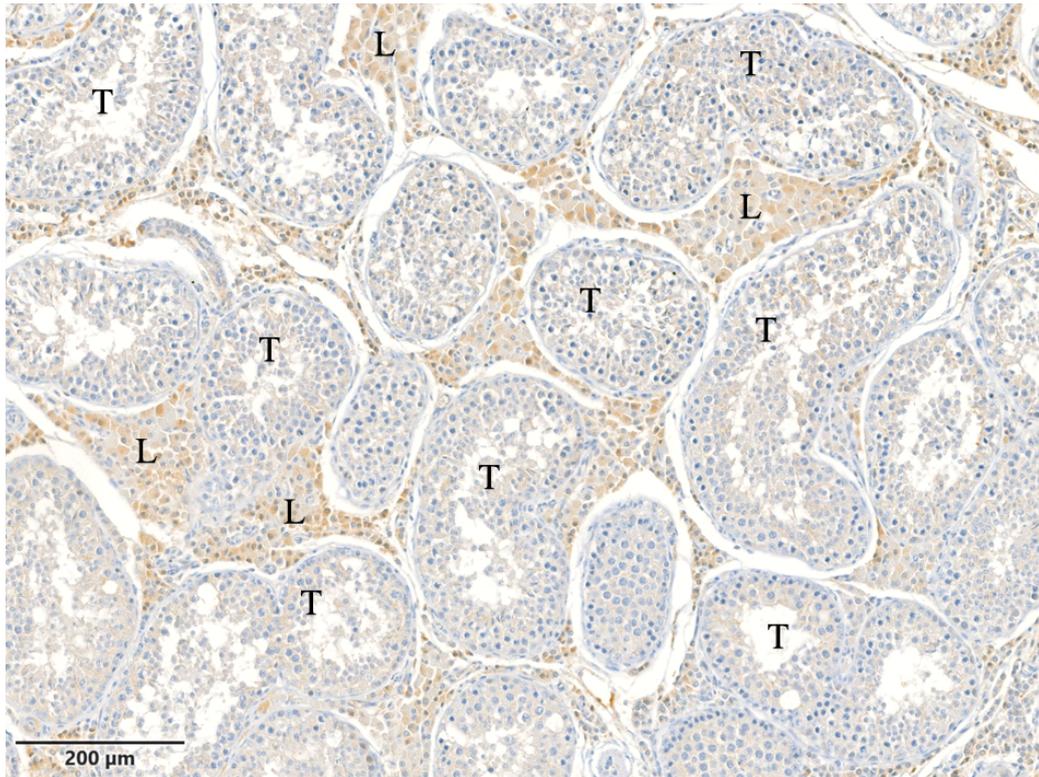


Abbildung 85: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines intakten Ebers; Testosteron.

Im Hodenparenchym ist eine homogene Reaktion des Antikörpers gegen Testosteron zu sehen.

T: Tubuli, L: Leydig-Zellen.

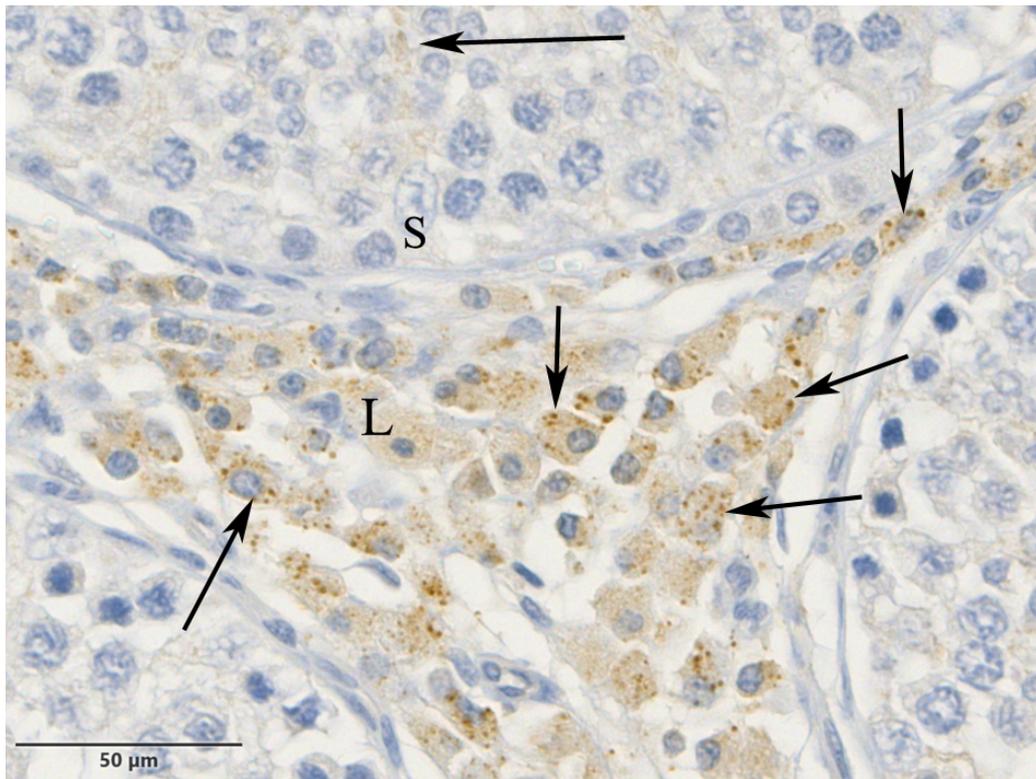


Abbildung 86: Übersichtsaufnahme vom Interstitium eines intakten Ebers; Testosteron.

Zu erkennen sind deutliche Testosteron-Granula (schwarzer Pfeil) in den Leydig-Zellen, aber auch in den Tubuli seminiferi contorti im Sertoli-Zellzytoplasma.

S: Sertoli-Zellkerne, L: Leydig-Zellen.

1.13.2. Immunhistochemischer Nachweis von Testosteron im Hoden vakzinierter Eber (Gruppe 2 bis 5)

Auch bei den vakzinierten Tieren der Gruppe 2 bis 4 ist ein ähnliches immunhistochemisches Reaktionsmuster für den Antikörper gegen Testosteron wie bei den intakten Ebern zu finden. Hervorzuheben ist der deutlich-positive Nachweis von Testosteron im Zytoplasma von Leydig-Zellen (Abbildung 88). Hin und wieder sind auch hier schwach bis deutlich positive Testosteron-Granula zu finden. Im Gegensatz zu den intakten Ebern besitzen die vakzinierten Tiere der Gruppe 2 bis 4 keine kleinen Granula in den Sertoli-Zellen, sondern immer wieder Testosteron-Nachweise in Form von großen „blasenähnlichen“ Strukturen im Sertoli-Zellzytoplasma (Abbildung 87).

Testosteron-positive Reaktionen können auch im Zytoplasma von veränderten großen Spermatogonien und Spermatozyten gefunden werden. Im Gegensatz zu den Tieren der Gruppe 2 und 3 besitzen die Tiere der Gruppe 4 subjektiv weniger Sertoli-Zellzytoplasma und teilweise auch weniger positive Nachweise für Testosteron.

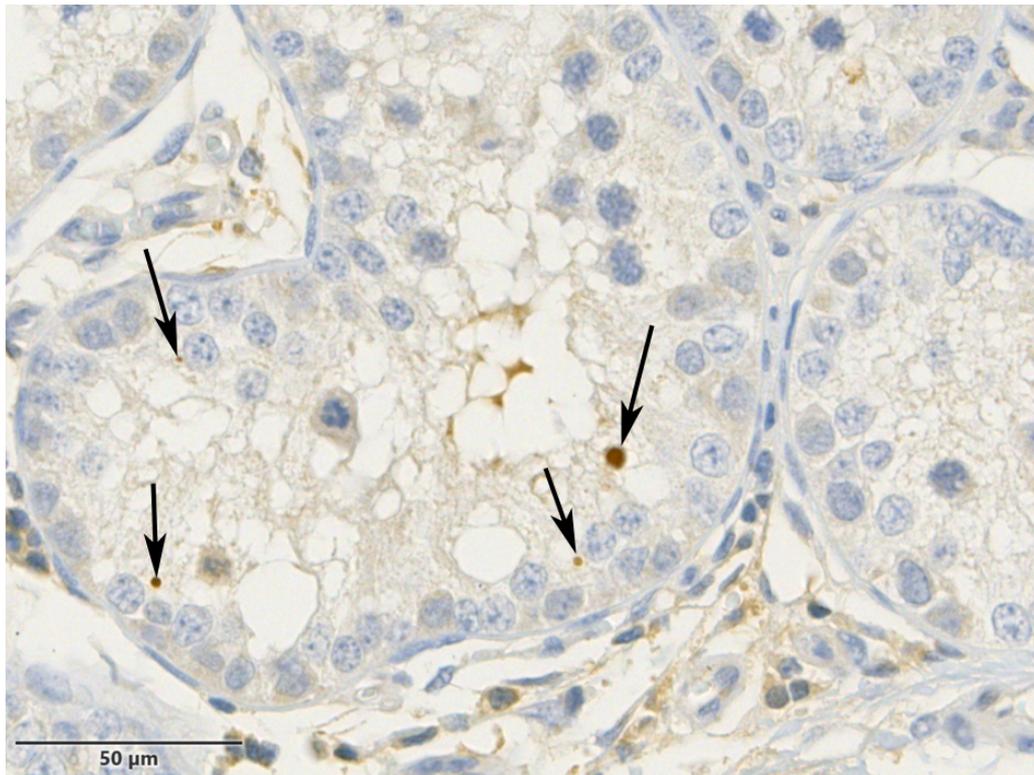


Abbildung 87: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines vakzinierten Ebers der Gruppe 2; Testosteron.

Im Zytoplasma der Sertoli-Zellen ist Testosteron in Form von „blasenähnlichen“ Strukturen (schwarzer Pfeil) zu finden. Auch im Zytoplasma der Leydig-Zellen ist ein schwach-positiver Nachweis für Testosteron zu erkennen.

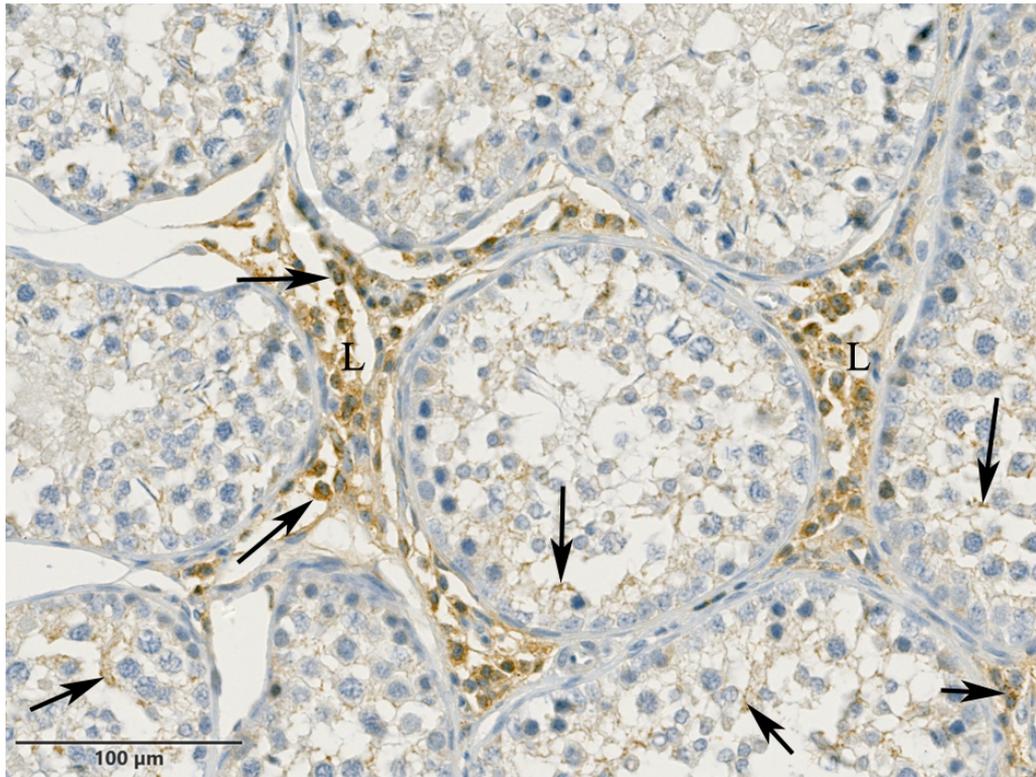


Abbildung 88: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines vakzinierten Tieres aus Gruppe 4; Testosteron.

Im Zytoplasma der Leydig-Zellen sind positive Nachweise für Testosteron zu finden sowie kleine Granula (schwarzer Pfeil). Auch im Zytoplasma von Sertoli-Zellen ist eine positive Immunreaktion (schwarzer Pfeil) für den Antikörper gegen Testosteron zu erkennen.

L: Leydig-Zellen.

Zwei Tiere der Gruppe 5a haben das gleiche Erscheinungsbild wie die vakzinierten Tiere der Gruppe 2 bis 4. Jedoch sind die Schnitte negativ für den Antikörper gegen Testosteron (Abbildung 90).

Ein weiteres Tier besitzt ein ähnliches Erscheinungsbild wie die intakten Eber. Jedoch ist hier Testosteron lediglich schwach-positiv im Leydig-Zellzytoplasma zu finden oder sogar negativ. In den Tubuli ist Testosteron bei diesem Tier nur spärlich im Sertoli-Zellzytoplasma oder gar nicht nachzuweisen.

Das weitere Tier der Gruppe 5b mit eberähnlichem Aussehen besitzt die gleiche Immunreaktion wie die intakten Eber. Jedoch ist der Nachweis für Testosteron in den Leydig-Zellen und den Sertoli-Zellen stärker als bei den intakten Ebern.

In den Leydig-Zellen sind subjektiv weniger Testosteron-positive Granula als bei intakten Ebern zu finden. Sertoli-Zellen besitzen viele Granula, welche die Keimzellen von basal bis luminal umgeben. Zusätzlich sind auch hier linienartig Testosteron-positive Granula vom Sertoli-Zellkern bis hin zu den elongierenden Spermatisden angeordnet (Abbildung 89).

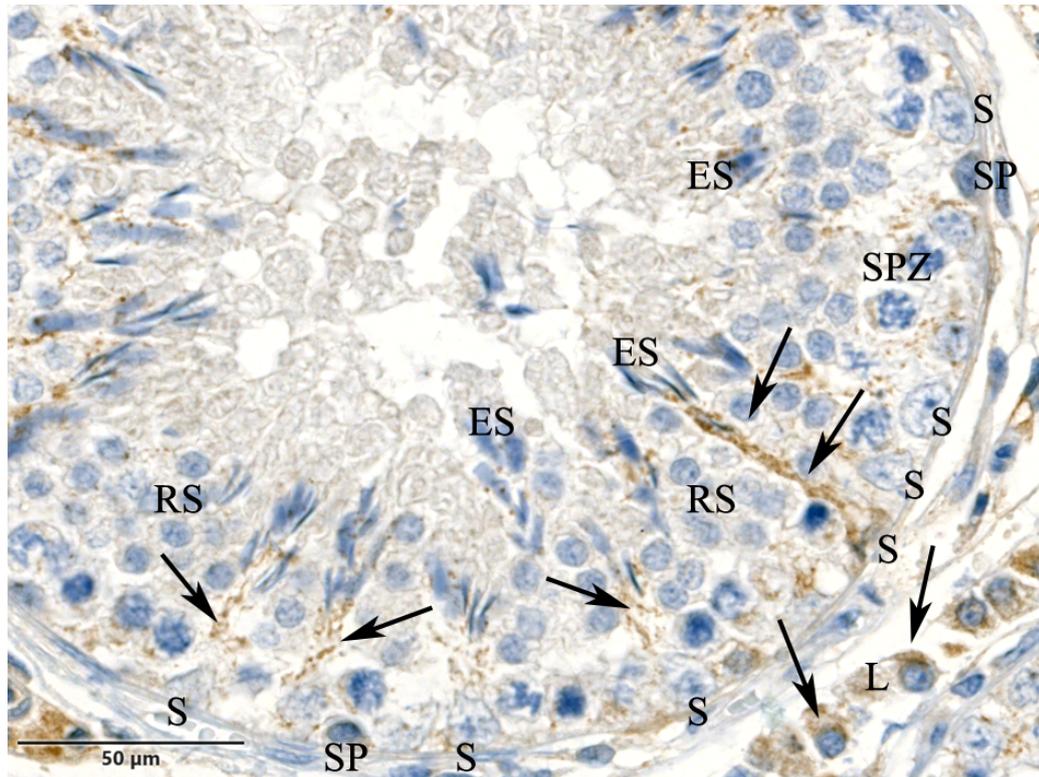


Abbildung 89: Übersichtsaufnahme von einem Tubulus-Querschnitt eines vakzinierten Ebers der Gruppe 5; Testosteron.

Die für Testosteron-positiven Granula ziehen linienartig vom Sertoli-Zellkern im Zytoplasma zu den elongierten Spermatisden (schwarzer Pfeil). Auch im Zytoplasma der Leydig-Zellen ist ein positiver Nachweis (schwarzer Pfeil) für Testosteron zu erkennen.

L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatisden, ES: Elongierte Spermatisden.

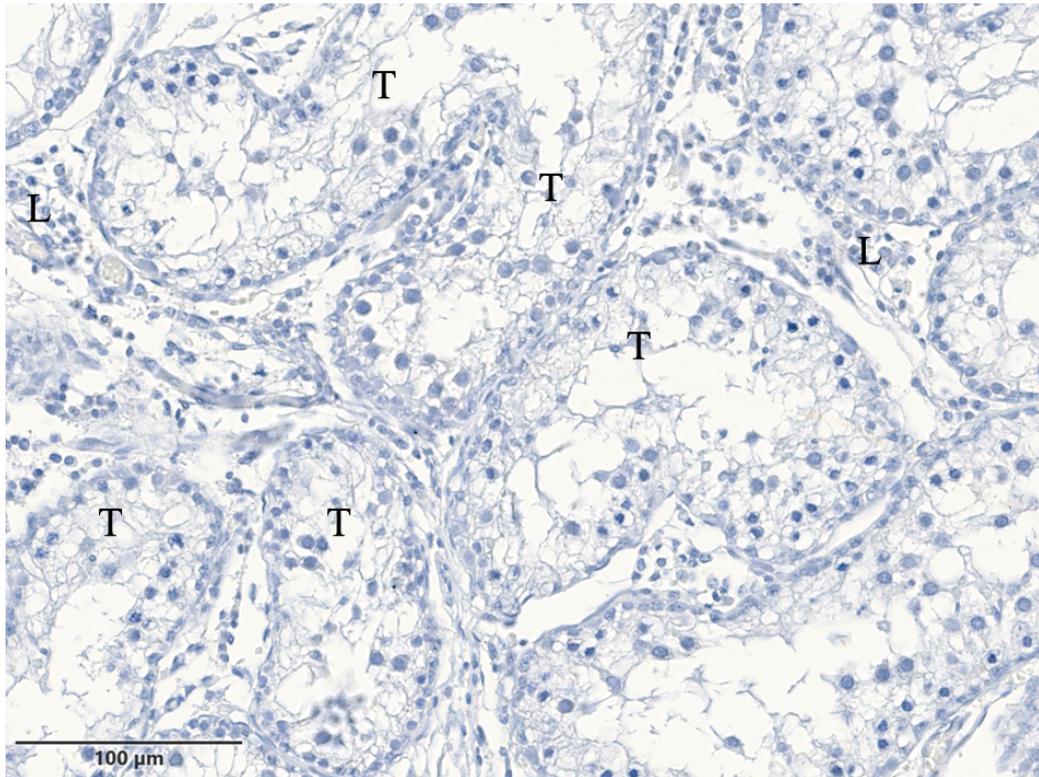
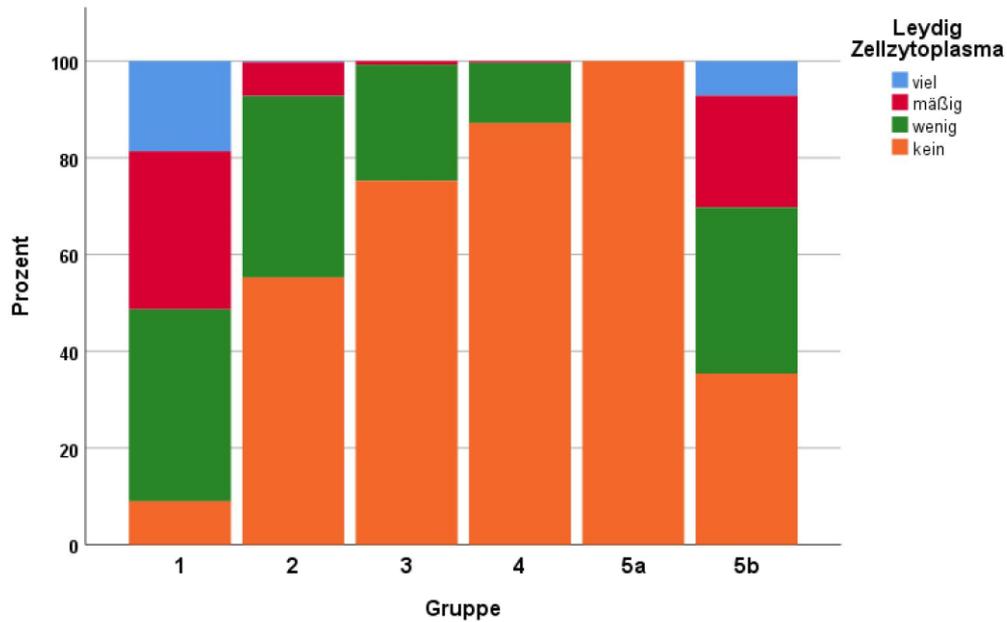


Abbildung 90: Übersichtsaufnahme eines Tieres aus der Gruppe 5a; Testosteron.

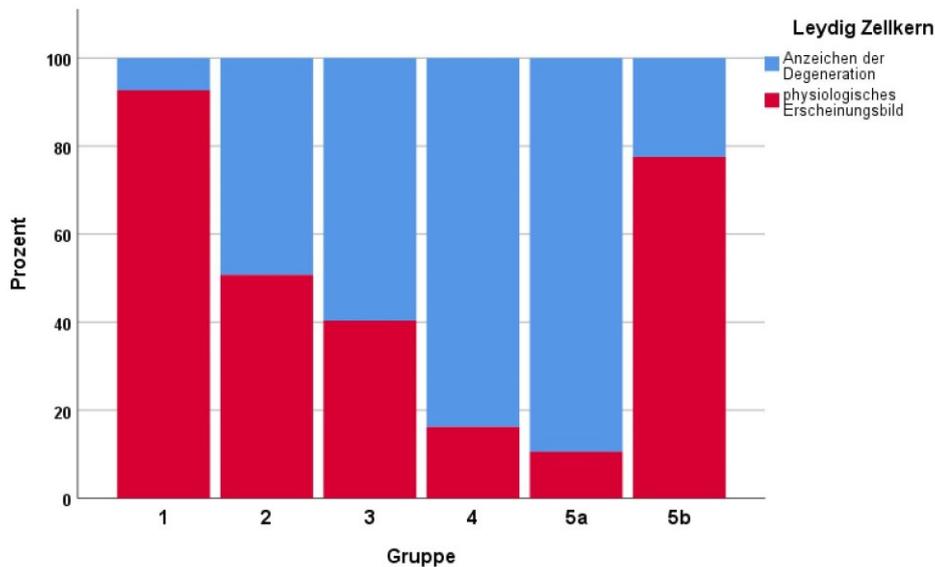
Dieses Tier besitzt in Bezug auf die Morphologie des Hodenparenchyms Ähnlichkeiten mit den vakzinierten Tieren aus Gruppe 2 bis 4. Insbesondere in Bezug auf die Morphologie der Sertoli-Zellen, der Keimzellen und der Leydig-Zellen. Jedoch ist hier kein positiver Nachweis für Testosteron erkennbar.

L: Leydig-Zellen, T: Tubuli.



Graphik 9: Gestapeltes Balkendiagramm Leydig-Zellzytoplasma.

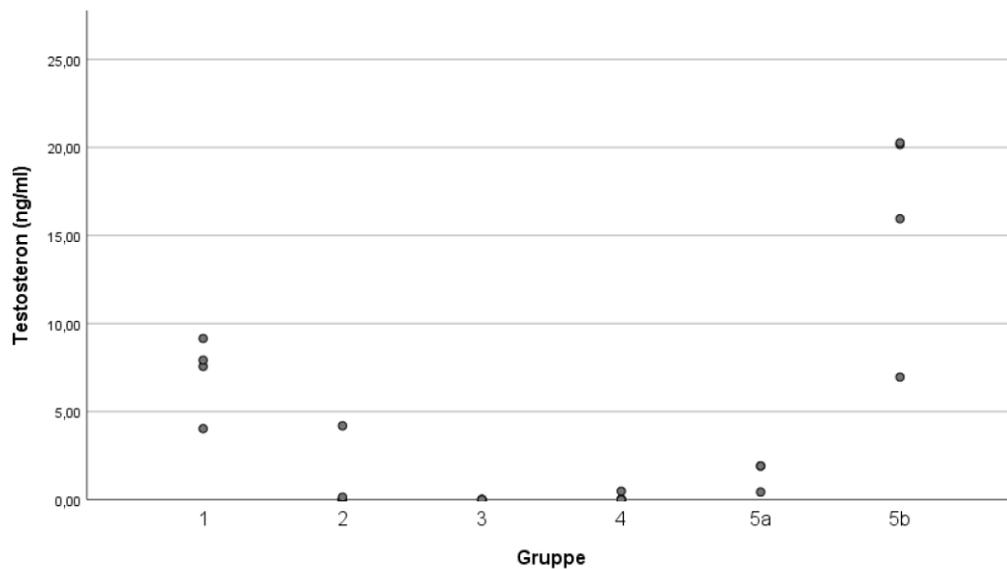
Zu erkennen ist hier, dass vor allem bei den vakzinierten Tieren der Gruppe 2, 3 und 4 viele Leydig-Zellen ohne oder mit nur wenig lichtmikroskopisch erkennbarem Zytoplasma vorkommen. Dies wird vor allem in der Gruppe 4 und 5a deutlich. Tiere der Gruppe 5b hingegen besitzen häufiger (35,2%) als die intakten Eber (9%) Leydig-Zellen mit lichtmikroskopisch nicht erkennbarem Zytoplasma. Jedoch zeigen die Tiere der Gruppe 5b (7,1%) auch Stellen mit viel Leydig-Zellzytoplasma im Vergleich zu den intakten Ebern (18,7%) (Tabelle 16 im Anhang). Die Tiere der Gruppen 2 bis 5a besitzen hoch-signifikant weniger Leydig-Zellzytoplasma als die intakten Eber der Gruppe 1 ($p < 0,001$).



Graphik 10: Gestapeltes Balkendiagramm Leydig-Zellnukleus.

Der Leydig-Zellnukleus erscheint bei den intakten Ebern zu 92,7% in einer physiologischen, polygonalen Form. Tiere der Gruppe 2 (49,3%), 3 (59,6%) und 4 (83,8%) besitzen oft pyknotische Zellkerne oder Anzeichen der Degeneration. Tiere der Gruppe 5b besitzen im Vergleich zu den intakten Ebern nur zu (77,6%) physiologisch erscheinende Leydig-Zellnuklei. Im Vergleich zu den intakten Ebern besitzen die Gruppe 2 ($p < 0,001$), Gruppe 3 ($p < 0,001$), Gruppe 4 ($p < 0,001$), sowie Gruppe 5a ($p < 0,001$) und 5b ($p = 0,012$) signifikante höhere Anzeichen der Degeneration des Leydig-Zellkerns (Tabelle 17 im Anhang).

Um die morphologisch- sowie immunhistochemisch-untersuchten Kriterien mit den Testosteronwerten aus dem Blutplasma der Eber vergleichen zu können, sind im Folgenden die Testosteronwerte der Eber übersichtlich dargestellt (Tabelle 13, Graphik 11)



Graphik 11: Testosteronwerte in den unterschiedlichen Gruppen.

Die intakten Eber enthalten Testosteronwerte* unter 10 ng/ml. Die vakzinieren Tiere der Gruppe 2 bis 4 besitzen bis auf zwei Tiere in Gruppe 2 und ein Tier in Gruppe 4 alle 0 ng/ml Testosteron im Blutplasma. Tiere der Gruppe 5b haben höhere Testosteronwerte. Die Tiere der Gruppe 2 ($p < 0,001$), Gruppe 3 ($p < 0,001$), Gruppe 4 ($p < 0,001$) und Gruppe 5a ($p = 0,001$) besitzen signifikant niedrigere Testosteronwerte als die intakten Eber. Die Tiere der Gruppe 5b ($p < 0,001$) besitzen signifikant höhere Testosteronwerte als Tiere der Gruppe 1. Zum Vergleich siehe Tabelle 13 und Tabelle 22.

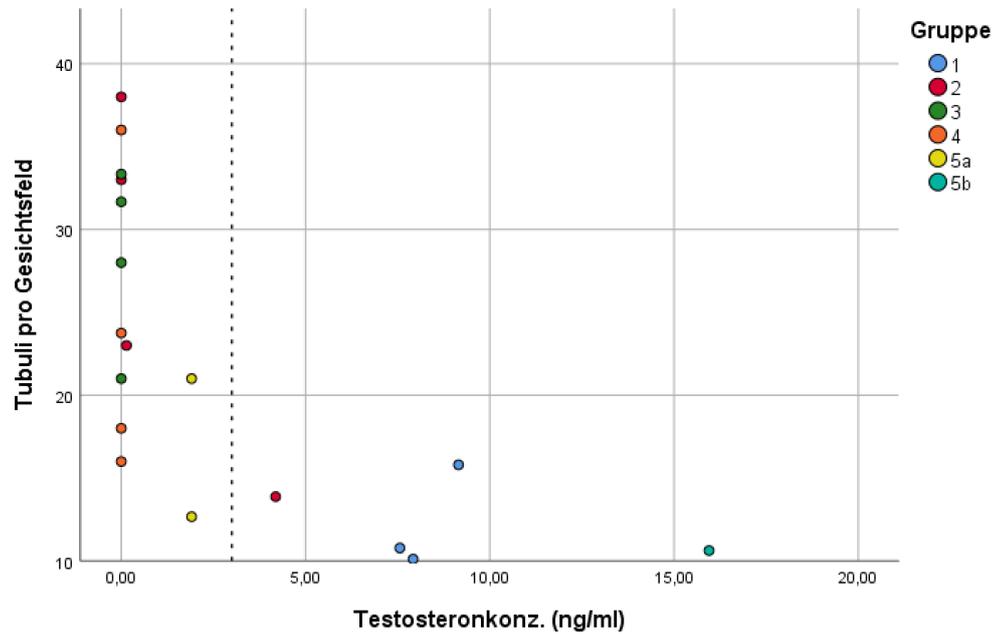
* Die Testosteronwerte wurden für eine Dissertation aus der Klinik für Schweine (Reiter, 2018) gewonnen. Da es nicht möglich war, von allen intakten Ebern Blutplasmaproben zu erhalten, sind in dieser Tabelle nur die Daten von Tieren verarbeitet, von denen Proben für die vorliegende Arbeit gewonnen werden konnten.

Tabelle 13: Testosteronwerte der verschiedenen Gruppen

Gruppe	N	Mittelwert	Standard- Abweichung	Median	Minimum	Maximum
1	4	7,16	2,19	7,74	4,03	9,15
2	5	0,86	1,85	0,00	0,00	4,19
3	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	6	0,08	0,19	0,00	0,00	0,48
5a	3	1,41	0,85	1,91	0,43	1,91
5b	4	15,83	6,24	18,05	6,96	20,26
Insgesamt	27	3,74	6,16	0,14	0,00	20,26

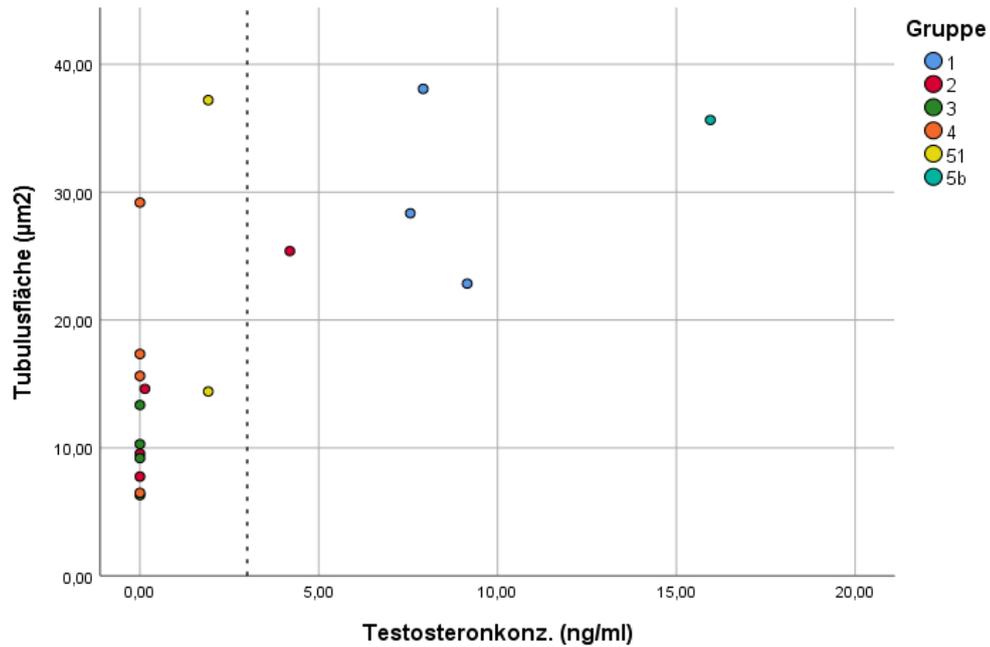
***Die Testosteronwerte wurden für eine Dissertation aus der Klinik für Schweine (Reiter, 2018) gewonnen. Da es nicht möglich war, von allen intakten Ebern Blutplasma Proben zu erhalten, sind in dieser Tabelle nur die Daten von Tieren verarbeitet, von denen Proben für die vorliegende Arbeit gewonnen werden konnten.**

Folgend sind Streudiagramme zu sehen, welche die Abhängigkeit zwischen den Testosteronwerten sowie definierten morphologischen Komponenten des Hodenparenchyms beschreiben. Als Grenzwert wurde ein Testosteronwert von 3 ng/ml festgelegt.



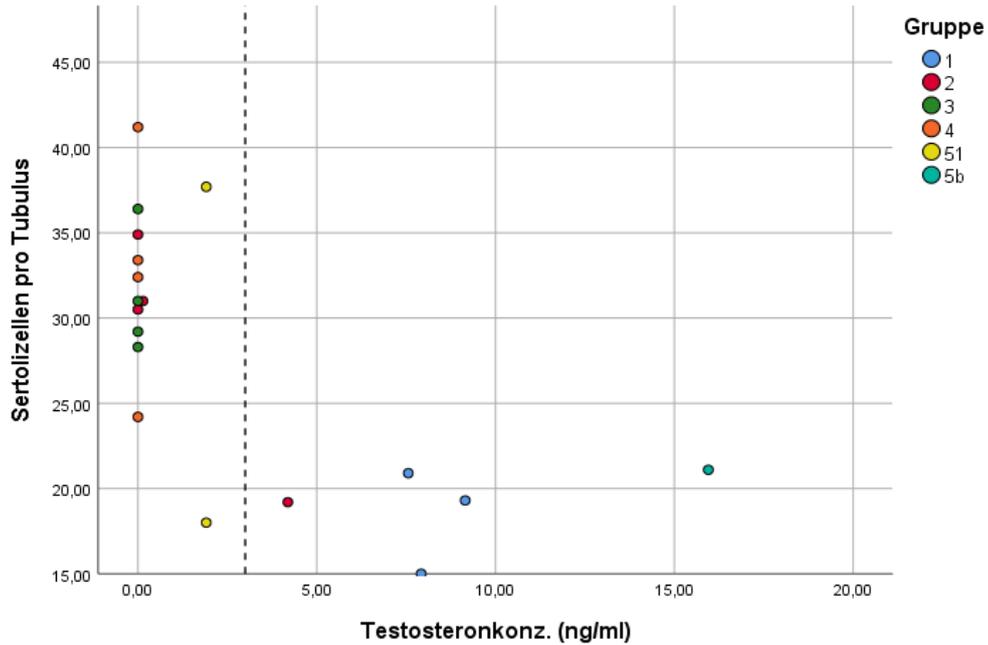
Graphik 12: Anzahl der Tubuli pro Gesichtsfeld in Abhängigkeit der Testosteron-Konzentrationen.

Tiere mit hohen Testosteronwerten besitzen eine geringere Anzahl an Tubuli seminiferi pro Gesichtsfeld ($p = 0,001$). Als Grenzwert wurden 3 ng/ml Testosteron im Blutplasma festgelegt.



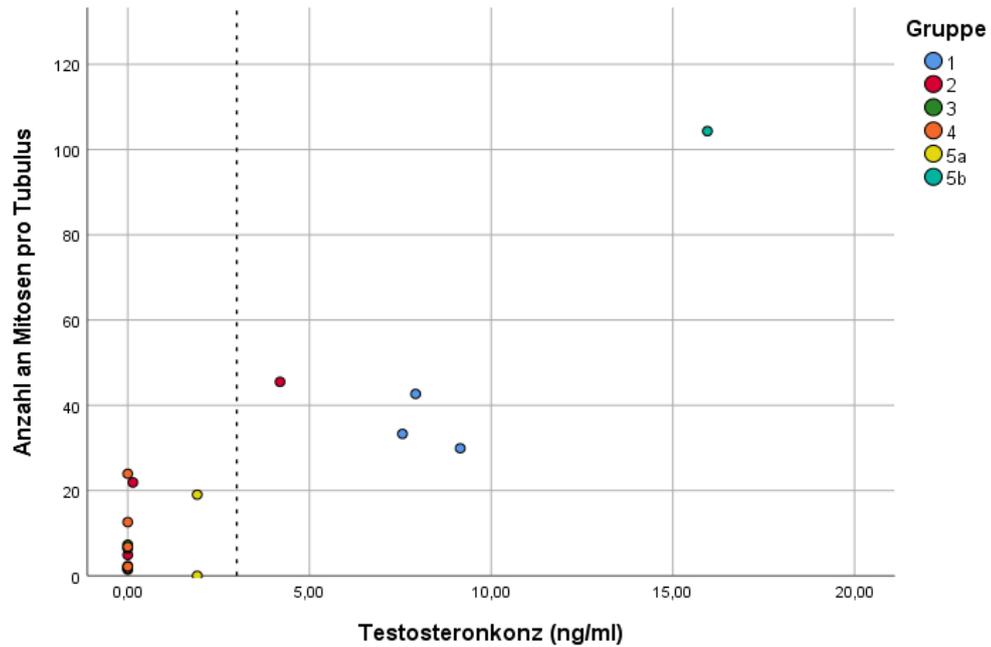
Graphik 13: Größe der Tubulus-Querschnittsfläche in Abhängigkeit der Testosteron-Konzentrationen.

Tiere mit hohen Testosteronwerten besitzen signifikant größere Tubulus-Querschnittsflächen als Tiere mit niedrigen Tubulusquerschnitten ($p = 0,010$). Als Grenzwert wurden 3 ng/ml festgelegt.



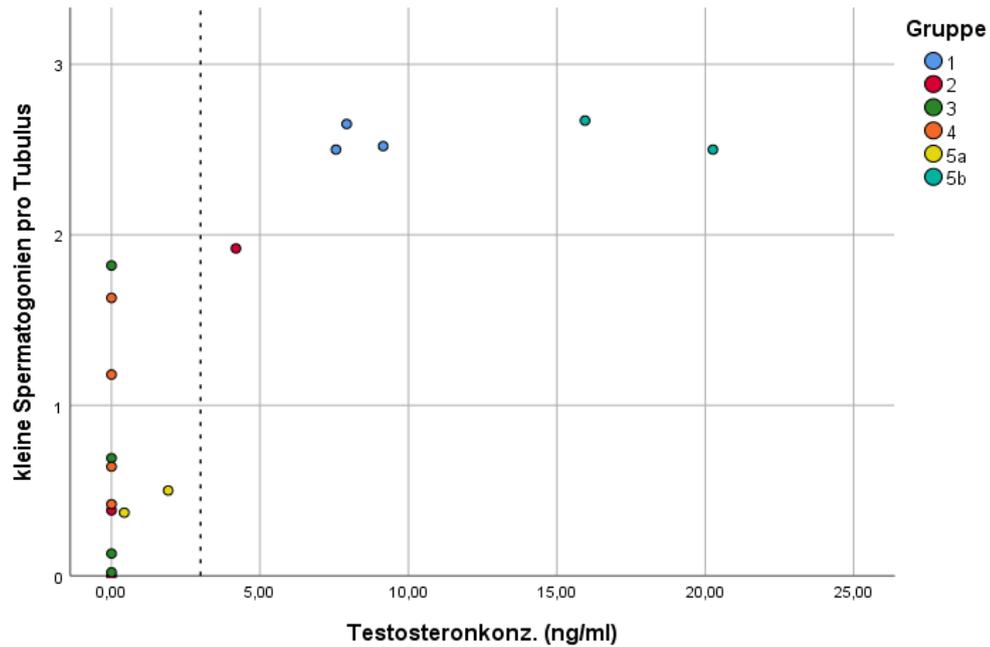
Graphik 14: Anzahl der Sertoli-Zellen in Abhängigkeit der Testosteron-Konzentrationen.

Tiere mit hohen Testosteronwerten besitzen niedrigere Sertoli-Zellzahlen ($p = 0,003$) pro Tubulus-Querschnitt. Wenn ein Grenzwert von 3 ng/ml verwendet wird, so haben Tiere mit Werten über 3 ng/ml durchschnittlich 19 Sertoli-Zellen pro Tubulus. Bei vakzinierten Tieren, mit Testosteronwerten unter 3 ng/ml im Durchschnitt 31 Sertoli-Zellen pro Tubulus. Das sind 63% mehr Sertoli-Zellen pro Tubulus-Querschnitt.



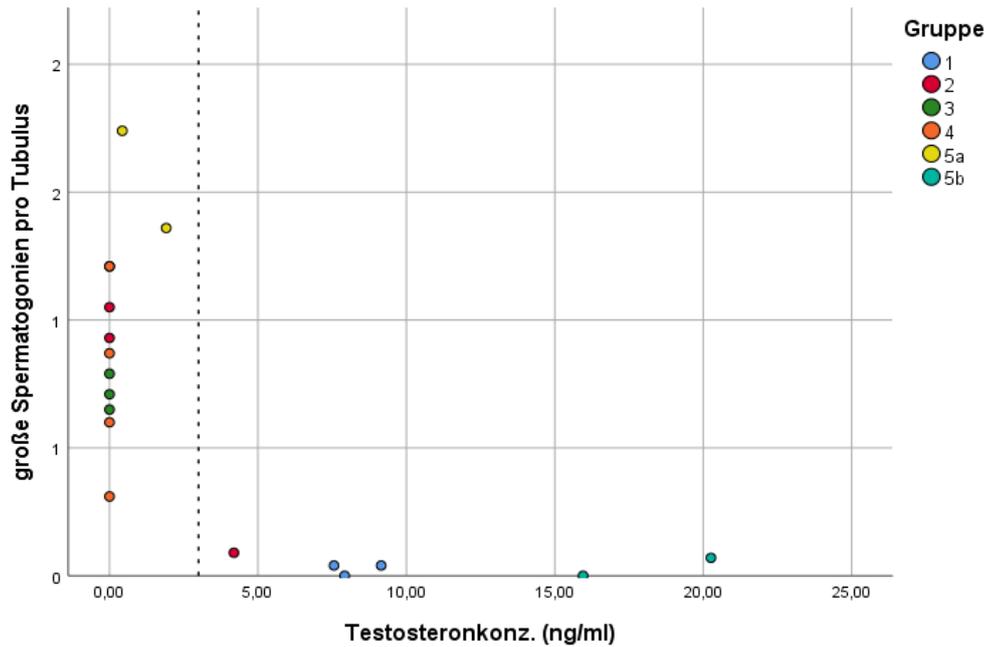
Graphik 15: Anzahl der Mitosen in Abhängigkeit der Testosteron-Konzentrationen.

Tiere mit hohen Testosteronwerten besitzen eine höhere Anzahl an Mitosen ($p < 0,001$). Als Grenzwert wurden 3 ng/ml Testosteron im Blutplasma festgelegt.



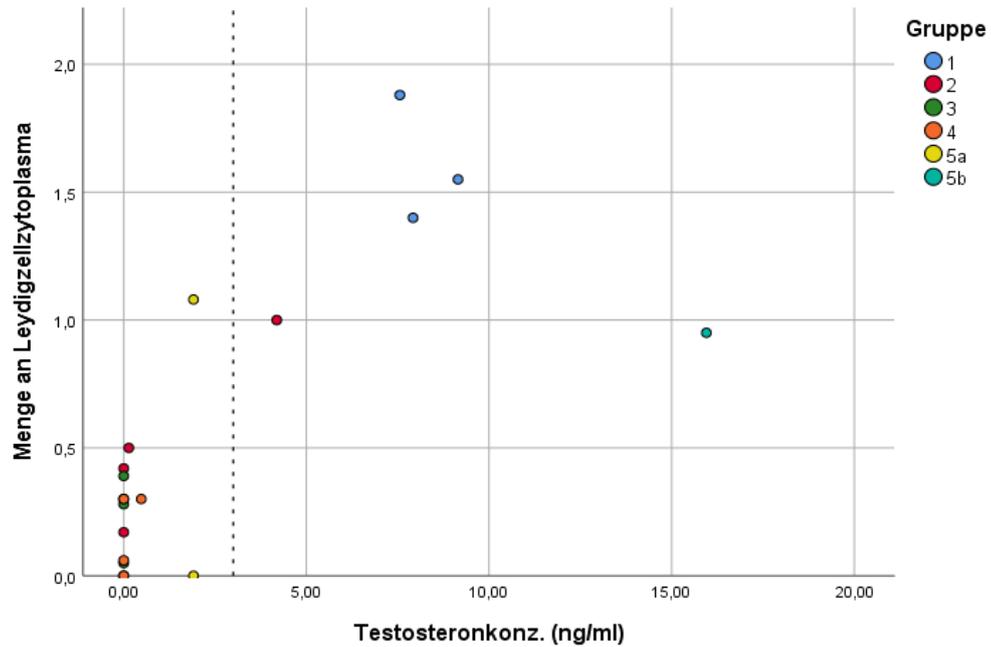
Graphik 16: Vorkommen kleiner Spermatogonien in Abhängigkeit der Testosteron-Konzentration.

Tiere mit hohen Testosteronwerten besitzen häufiger kleine Spermatogonien ($p < 0,001$). Als Grenzwert wurden 3 ng/ml Testosteron im Blutplasma festgelegt.



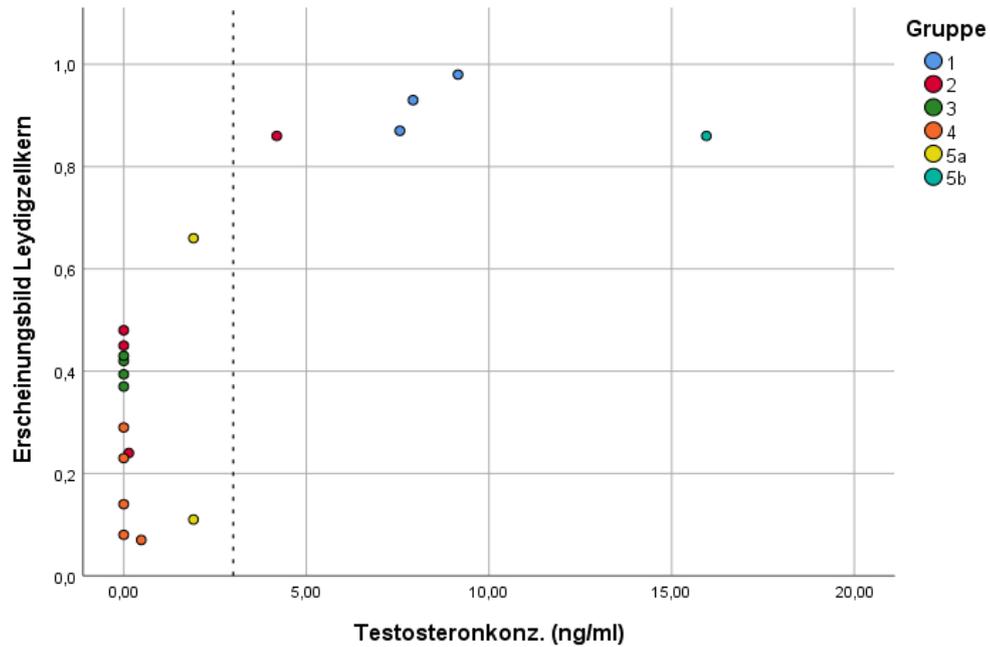
Graphik 17: Vorkommen großer Spermatogonien in Abhängigkeit der Testosteron-Konzentrationen.

Tiere mit niedrigen Testosteronwerten besitzen häufiger große Spermatogonien ($p < 0,001$). Als Grenzwert wurden 3 ng/ml Testosteron im Blutplasma festgelegt.



Graphik 18: Vorkommen des Leydig-Zellzytoplasmas in Abhängigkeit der Testosteron-Konzentrationen.

Tiere mit hohen Testosteronwerten besitzen mehr Leydig-Zellzytoplasma als Tiere mit niedrigen Testosteronwerten ($p = 0,001$).



Graphik 19: Klassifikation des Leydig-Zellnukleus in Abhängigkeit der Testosteron-Konzentration.

Tiere mit hohen Testosteronwerten besitzen häufiger physiologische, polygonale Leydig-Zellnuklei ($p < 0,001$). Als Grenzwert wurden 3 ng/ml Testosteron im Blutplasma festgelegt.

1.14. Immunhistochemischer Nachweis des Androgen-Rezeptors im Hoden intakter und vakzinierter Eber

1.14.1. Immunhistochemischer Nachweis des Androgen-Rezeptors im Hoden intakter Eber der Gruppe 1

Bei den intakten Ebern der Gruppe 1 kann der Androgen-Rezeptor schwach-positiv im Zytoplasma von Leydig-Zellen nachgewiesen werden. Keimzellen zeigen eine negative bis schwach-positive Immunreaktion des Androgen-Rezeptors sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma. Vereinzelt Spermato gonien und junge Spermatozyten weisen eine schwache bis deutliche Färbung im Zellkern und Zytoplasma auf. Sertoli-Zellen sind entweder negativ oder schwach-positiv im Nukleus und Zytoplasma (Abbildung 92). Für die Gesamtübersicht siehe Abbildung 91.

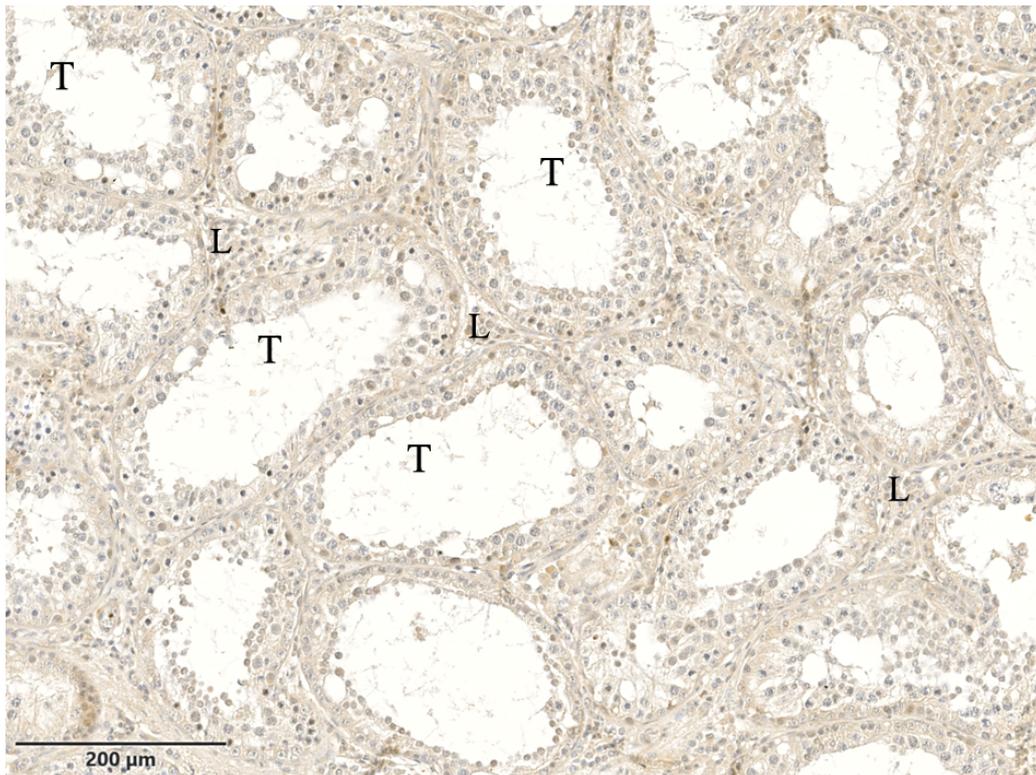


Abbildung 91: Übersichtsaufnahme der Tubuli seminiferi contorti eines intakten Ebers; Androgen-Rezeptor.

Sowohl in den Tubuli, als auch in den Leydig-Zellen im Interstitium findet sich eine homogene Reaktion für den Antikörper gegen den Androgen-Rezeptor.

T: Tubuli, L: Leydig-Zellen.

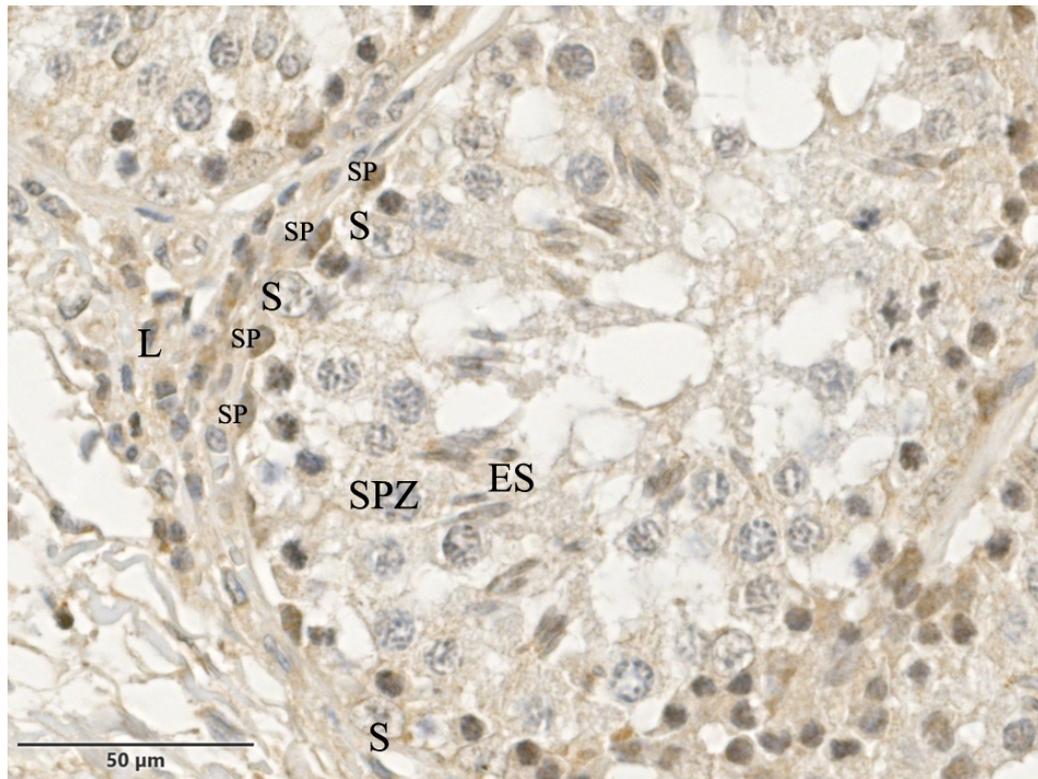


Abbildung 92: Übersichtsaufnahme von einem Tubulus-Querschnitt eines intakten Ebers; Androgen-Rezeptor.

Beachtenswert sind die starken Nachweise in den Spermatogonien im Vergleich zu den Spermatozyten und den runden Spermatiden.

L: Leydig-Zellen, S: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, ES: Elongierte Spermatiden.

1.14.2. Immunhistochemischer Nachweis des Androgen-Rezeptors im Hoden vakzinierter Eber (Gruppe 2 bis 5)

Die vakzinierten Tiere der Gruppen 2 bis 5a besitzen eine stärkere immunhistochemische Reaktion für den Androgen-Rezeptor im Vergleich zu den intakten Ebern. Dies betrifft insbesondere die Keimzellen wie Spermatogonien, Spermatozyten sowie runde Spermatozoen. Bei diesen Zellen variiert die Immunreaktion im Zellkern zwischen negativ bis deutlich-positiv, während das Zytoplasma der Keimzellen häufig deutlich-positiv ist. Sertoli-Zellen haben sowohl im Zytoplasma aber auch im Nukleus positive Reaktionen für den Antikörper gegen den Androgen-Rezeptor. (Abbildung 93). Im Vergleich zu den intakten Ebern zeigen die vakzinierten Tiere der Gruppen 2 bis 5a eine stärkere Reaktion der Keimzellnuklei.

Dies kann an den physiologisch aussehenden Keimzellen, aber auch an den veränderten großen Spermatogonien und Spermatozyten gesehen werden. Wenn Leydig-Zellzytoplasma vorhanden ist, so zeigt dies meistens eine schwache bis deutlich-positive Immunreaktion, die Zellkerne sind oft negativ. Die Tiere der Gruppe 5 können in zwei Gruppen unterteilt werden und zeigen entweder ein ähnliches Aussehen wie das der intakten Eber (Gruppe 5b) oder das der vakzinierten Tiere von Gruppe 2 bis 4 (Gruppe 5a). Im Gegensatz zu den intakten Ebern besitzt das Tier aus Gruppe 5a jedoch eine deutlichere Immunreaktion des Androgen-Rezeptors in Sertoli-Zellen und im Keimzellzytoplasma. Keimzellnuklei weisen meist eine negative Reaktion für den Androgen-Rezeptor auf. Vereinzelt sind auch hier Spermatogonien und Spermatozyten schwach bis deutlich-positiv (Zytoplasma und Nukleus) (Abbildung 94).

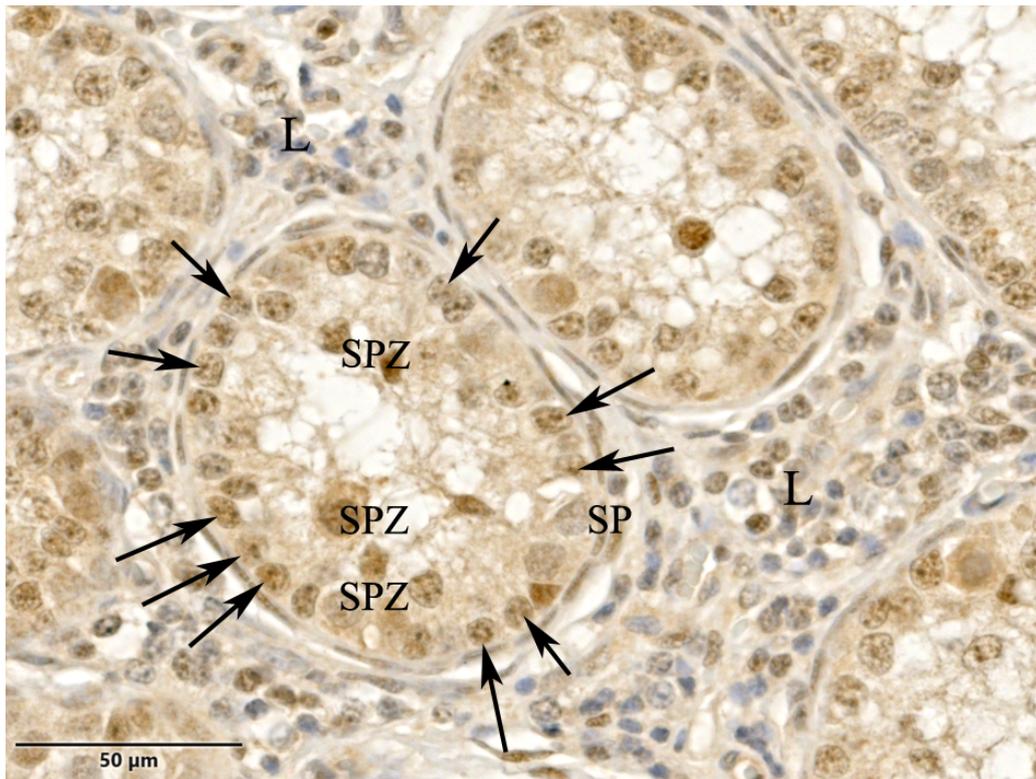


Abbildung 93: Übersichtsaufnahme der Tubuli eines Tieres aus Gruppe 3; Androgen-Rezeptor.

Sertoli-Zellen, sowie die Spermatogonien und Spermatozyten besitzen eine deutlich stärkere positive Immunreaktion im Nukleus aber auch im Zytoplasma der genannten Zellen im Vergleich zu den intakten Ebern. Die Leydig-Zellen im Interstitium haben häufig einen negativen bis deutlich-positiven Nukleus.

L: Leydig-Zellen, schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellkerne, **SP:** Spermatogonien, **SPZ:** Spermatozyten.

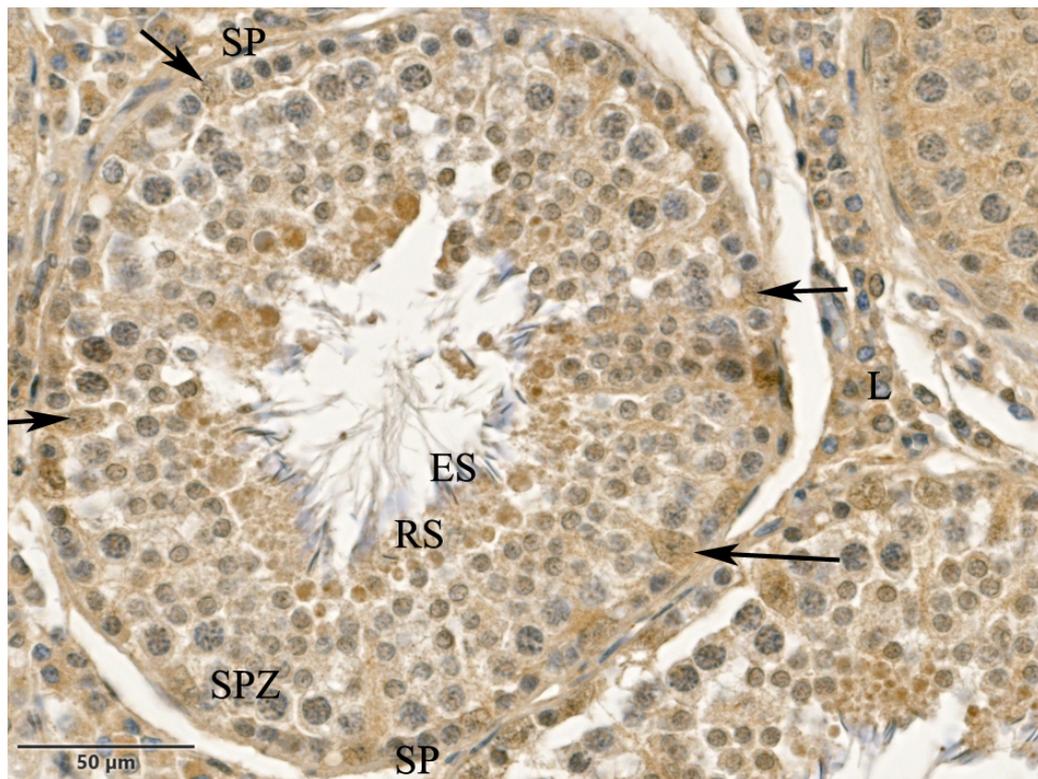


Abbildung 94: Übersichtsaufnahme eines Tubulus seminiferus contortus eines Tieres aus Gruppe 5b; Androgen-Rezeptor.

Der Tubulus-Querschnitt zeigt die hohe Menge an geordneten Keimzellreihen mit Spermatogonien, Spermatozyten sowie runden und elongierten Spermatiden. Die Keimzellen besitzen eine schwache bis deutliche Immunreaktion im Nukleus aber auch im Zytoplasma. Ebenso das Zytoplasma und der Nukleus von Sertoli-Zellen. Das Zytoplasma der Leydig-Zellen ist deutlich positiv.

L: Leydig-Zellen, schwarzer Pfeil: Sertoli-Zellkerne, SP: Spermatogonien, SPZ: Spermatozyten, RS: Runde Spermatiden, ES: Elongierte Spermatiden.

Tabelle 14: Immunhistochemische Nachweise verwendeter Antikörper bei intakten Ebern

	Sertoli-Zellen	Spermatogonien	Spermatozyten	Runde Spermatozyten*	Elongierte Spermatozyten*	Leydig-Zellen
Vimentin	+	-	-	-	-	+
Sox-9	+	-	-	-	+	-
DDX-4	-	+	+	+	-	-
Testosteron	+	+	+	-	-	+
Ki67	-	+	+	+	-	+
Occludin	+	+	-/+ bis +	-/+ bis +	+	+
Claudin-3	+	+	+	+	+	+
Connexin-43	+	-	-	-	-	+
Estrogen-Rezeptor α	-/+ bis +	-/+ bis +	-/+ bis +	+	+	+
Estrogen-Rezeptor β	-/+ bis +	+	+	+	-/+	+
FSH-Rezeptor	+	+	+	+	-	+
Androgen-Rezeptor	-/+ bis +	-/+ bis +	-/+ bis +	-/+	-	-/+ bis +
8-OHG	+	+	+	+	-	+

+ = Ja, - = Nein, -/+ Sporadisch

* Wenn vorhanden.

Die Tabelle stellt einen groben Überblick über die Auswertungsergebnisse der verschiedenen immunhistochemischen Reaktionen dar.

Tabelle 15: Immunhistochemische Nachweise verwendeter Antikörper bei vakzinierten Ebern

	Sertoli-Zellen	Spermatogonien	Spermatozyten	Runde Spermatozyten*	Elongierte Spermatozyten*	Leydig-Zellen
Vimentin	+	-	-	-	-	+
Sox-9	+	-	-	-	+	
DDX-4	-	+	+	+	-	-
Testosteron	+	+	+	-	-	+
Ki67	-/+	+	+	+	-	-/+
Occludin	+	+	+	-/+ bis +	+	+
Claudin-3	+	+	+	+	-/+	+
Connexin-43	+	-	-	-	-	+
Estrogen-Rezeptor α	+	-/+ bis +	+	+	+	+
Estrogen-Rezeptor β	-/+	-/+ bis +	-/+ bis +	-/+ bis +	-/+ bis +	-/+ bis +
FSH-Rezeptor	+	+	+	+	-	+
Androgen-Rezeptor	+	+	+	-/+ bis +	-	-/+
8-OHG	+	+	+	+	-	+

+ = Ja, - = Nein, +/- Sporadisch

* Wenn vorhanden.

Die Tabelle stellt einen groben Überblick über die Auswertungsergebnisse der verschiedenen immunhistochemischen Reaktionen dar.

V. DISKUSSION

Die chirurgische Kastration männlicher Ferkel ohne Analgesie ist für diese ein stressiger und auch schmerzhafter Eingriff. Aus diesem Grund darf ab dem 01.01.2021 die Kastration von unter 7 Tage alten Ferkeln nicht mehr ohne Analgesie stattfinden (B.M.E.L., 2020). Daher besteht die Notwendigkeit, alternative Kastrationsmethoden zu finden.

In dieser Studie wurden männliche Schweine in fünf Gruppen unterteilt. Vier dieser Gruppen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem GnRH-Analogen Improvac® vakziniert. Eine Kontrollgruppe (intakte Eber) diente zum Vergleich. Die Tiere der Gruppe 2 wurden in der 8. und 12. Lebenswoche vakziniert, Tiere der Gruppe 3 mit 12 und 16 Wochen, Tiere der Gruppe 4 sowie Gruppe 5 mit 12 und 18 Wochen.

Die wichtigste Fragestellung dieser Arbeit war, welche Auswirkungen eine GnRH-Suppression zu verschiedenen Vakzinationszeitpunkten auf das Hodenparenchym hat. Insbesondere lag hier der Fokus auf der Morphologie des Keimepithels – vor allem auf den Sertoli-Zellen, aber auch auf den Keimzellen. Ebenso wurden die Leydig-Zellen des Interstitiums untersucht. Das Hodenepithel wurde anhand von 13 relevanten Antikörpern untersucht. Hier wurde evaluiert, wie sich die Vakzination mit Improvac® auf die Hormonrezeptoren, wie z.B. den FSH-Rezeptor, Androgen-Rezeptor und die Estrogen-Rezeptoren α und β , aber auch auf das Hormon Testosteron auswirkt. Eine weitere Fragestellung in dieser Arbeit war, welche Auswirkungen die GnRH-Suppression auf die Gap- und Tight-junction-Komponenten der Blut-Hoden-Schranke hat. Hierfür wurden in der vorliegenden Studie die Antikörper gegen Occludin, Claudin-3 und Connexin-43 untersucht.

Das Schwein als Großtiermodell kann wichtige Informationen für den humanmedizinischen Bereich liefern (Schook et al., 2005; Forster et al., 2010; Kuzmuk und Schook, 2011). So zum Beispiel für die Behandlung des humanen Prostata-Karzinoms mit einem GnRH-Agonisten oder Antagonisten. Die Folgen einer medikamentösen Therapie des Prostata-Karzinoms sind unter anderem Inkontinenz, Impotenz und Infertilität (Boyd et al., 2006).

Hier könnte die Untersuchung vakzinierter Eber als vergleichendes Modell in Bezug auf die Regenerationsfähigkeit des Keimepithels dienen. Denn in dem wissenschaftlichen Artikel von Boyd et al. (2006), wird beschrieben, dass sich gerade jüngere Männer mit Prostata-Karzinomen Sorgen in Bezug auf die Fertilität machen, wenn diese durch GnRH-Suppression behandelt werden.

Des Weiteren, könnte das Schwein auch als Modell für Erkrankungen des Hodens wie z.B. das testikuläre Dysgenese-Syndrom beim Mann dienen. Das testikuläre Dysgenese-Syndrom beschreibt eine Fehlentwicklung der Hoden auf Grund einer fetal fehlenden oder verminderten Androgen-Aktivität. Dies hat zahlreiche Erkrankungen wie eine verminderte Samenqualität, eine gestörte Spermatogenese, Kryptorchidie, Hypospadie, aber auch die Ausbildung von testikulären Keimzelltumoren zur Folge (Skakkebak et al., 2001; Sharpe und Skakkebak, 2008; Wohlfahrt-Veje et al., 2009). Neben einer genetischen Komponente werden für das testikuläre Dysgenese-Syndrom auch umweltbedingte Einflüsse wie z.B. die maternale Exposition gegenüber Chemikalien angenommen (Olesen et al., 2007; Wohlfahrt-Veje et al., 2009). Dies konnte bereits im Rattenmodell geprüft werden (Fisher et al., 2003).

Beim Schwein beginnen sich die Gonozyten – auch Vorläuferzellen der Spermatogonien genannt – ab einem Alter von 4 Wochen in undifferenzierte Spermatogonien zu transformieren. Dieser Prozess soll mit ca. 8 Wochen abgeschlossen sein (Almunia et al., 2018). Im Gegensatz dazu wird in der Studie von Avelar et al. (2010) beschrieben, dass in einem Alter von 8 Wochen noch zu 30% Gonozyten in den Tubuli seminiferi contorti der Eber vorhanden sind. Ebenso sind laut den Autoren in diesem Alter zwei verschiedene Formen an Sertoli-Zellen vorhanden. Immature Sertoli-Zellen mit ovalem/elongiertem Nukleus und zerstreutem Heterochromatin sowie mature runde/ovale Sertoli-Zellkerne mit nur einem Nukleolus (Avelar et al., 2010). Im neonatalen Alter bis hin zur 4. Lebenswoche und noch einmal in einem Alter von ca. 3 bis 5 Monaten, also kurz vor der Pubertät, soll es beim Schwein eine FSH-abhängige Proliferation der Sertoli-Zellen geben (Swanlund et al., 1995; França et al., 2000).

Avelar et al. (2010) beschreiben eine Proliferationsphase der Sertoli-Zellen bis zu einem Alter von 75 Tagen. Laut França et al. (2000) proliferieren die Keimzellen des Schweins bis zum 4. Lebensmonat kontinuierlich, um mit 4 bis 5 Monaten einen starken Proliferationsanstieg zu erfahren. Dieser stabilisiert sich in einem Alter von

ca. 8 Monaten (França et al., 2000). Ebenso wird von Avelar et al. (2010) ein Vorkommen von elongierten Spermatiden im Alter zwischen 3 und 4 Monaten beschrieben.

Die Reifungsphasen der Leydig-Zellen besitzen beim Schwein zwei Peaks. Einmal perinatal sowie in einem Alter von ca. 3 Monaten (Van Straaten und Wensing, 1978; França et al., 2000). Dies soll auch in Korrelation mit den FSH- und Testosteronwerten stehen (França et al., 2000).

Verwendet man diese Kriterien, so kann vermutet werden, dass die Eber dieser Arbeit, welche mit 8 und 12 Wochen vakziniert wurden, bei Erstvakzination zum Teil noch Gonozyten und unter Umständen auch undifferenzierte Sertoli-Zellen in den Tubuli seminiferi contorti hatten. Bei den Tieren, die mit 12 und 16 sowie mit 12 und 18 Wochen vakziniert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass diese zum Zeitpunkt der ersten Vakzination zumindest schon mature Sertoli-Zellen mit einem Keimepithel bis hin zu elongierten Spermatiden ausgebildet hatten. Welche Auswirkungen dies möglicherweise auf das Keimepithel hat, wird auf den folgenden Seiten diskutiert.

Betrachtet man das Keimepithel der vakzinierten Gruppen, so weisen vor allem die Tiere der Gruppen 2 bis 5a im Vergleich zu den intakten Ebern eine beeinträchtigte Spermatogenese auf. Insbesondere die Tubuli seminiferi contorti und das darin vorkommende Keimepithel sind in der Morphologie teilweise stark verändert. Dazu zählen im Überblick: Kleine Tubuli seminiferi contorti mit einem milden bis starken Keimzellverlust, verringerte Mitoseraten sowie morphologische Veränderungen der Sertoli-Zellen und Spermatogonien. Weiterhin zeigen Leydig-Zellen im Interstitium Anzeichen der Degeneration.

Die Ergebnisse dieser Studie stimmen zum großen Teil mit anderen Studien einer GnRH-Suppression überein, welche an Ebern (Awoniyi et al., 1988b; Hilbe et al., 2006; Einarsson et al., 2009; Einarsson et al., 2011; Kubale et al., 2013; Wicks et al., 2013; Sladek et al., 2018), aber auch an Böcken (Han et al., 2015) und kryptorchiden Tieren wie Ratten, Mäusen, Kaninchen und Ebern (Antich et al., 1995; De Rooij et al., 1999; Zhang et al., 2002; Bernal-Mañas et al., 2005) vorgenommen wurden.

Wenn man den Einfluss, den die Vakzination auf die Tubuli seminiferi ausübt, in zwei Hauptkriterien unterteilt, so ist in den Tubuli seminiferi und im Interstitium bei den hier untersuchten Tieren folgendes zu sehen:

Die Tubuli seminiferi contorti enthalten meist eine, auf der Basalmembran aufliegende, prominente Zellreihe. Die perlschnurartig aufgereihten Sertoli-Zellkerne, mit einem veränderten ovalen bis runden Nukleus und mehreren Nukleoli unterscheiden sich deutlich von den sonst birnenförmigen Sertoli-Zellkernen der intakten Eber. Zwischen den Sertoli-Zellen befinden sich veränderte große Spermatogonien, sowie vereinzelte Spermatozyten im Lumen.

Das andere Hauptkriterium sind Tubuli seminiferi contorti mit nur wenigen Veränderungen im Keimepithel. Hierbei ist ein milder bis deutlicher Verlust von Keimzellen insbesondere den Spermatozyten sowie den runden und elongierten Spermatiden zu erkennen. Die Zellkerne der Spermatogonien können entweder das gleiche Aussehen wie intakte Eber besitzen, nämlich klein und rund/oval oder morphologisch verändert mit mittelgroßer und großer Gestalt. Sertoli-Zellkerne sind entweder birnenförmig mit einem prominenten Nukleus oder haben eine rund/ovale Gestalt mit mehreren Nukleoli. In dieser Studie scheinen die kleinen und runden Spermatogonien sowie birnenförmige Sertoli-Zellkerne vor allem mit Auftreten von vielen Keimzellen vorzukommen.

Die Hauptfunktion der Sertoli-Zelle als Stütz- oder Ammenzelle ist die Keimzellregulation und somit das Aufrechterhalten einer intakten Spermatogenese (Wrobel und Schimmel, 1989; De Kretser et al., 1998; Johnson et al., 2008).

Die Aufgabe von Sertoli-Zellen ist unter anderem die nährnde Funktion der Keimzellen, die Verankerung von Keimzellen im Keimepithel, wenn diese von basal nach luminal transformieren, die Phagozytose apoptotischer Keimzellen und Residualkörper sowie das Entlassen elongierter Spermatiden in das Lumen, das Bilden der Blut-Hoden-Schranke und die Regulation von FSH und Testosteron durch die entsprechenden Rezeptoren (Russell, 1977; Sharpe et al., 2003; Mruk und Cheng, 2004; Bernal-Mañas et al., 2005; Johnson et al., 2008).

Auch wenn adulte Sertoli-Zellen in Säugern nicht mehr proliferieren (Sharpe et al., 2003; Meachem et al., 2005; Johnson et al., 2008) sind die Sertoli-Zellzahlen in dieser Studie bei vakzinierten Tieren erhöht. In der Studie von Sladek et al. (2018) werden nach einer GnRH-Vakzination mit Improvac® auch viele Sertoli-Zellen mit

einem runden/ovalen Zellkern gefunden, die an immature Sertoli-Zellen erinnern (Sladek et al., 2018). Auch Hilbe et al. (2006) beschreiben in ihrer Studie große Spermatogonien, die zwischen Sertoli-Zellen liegen. Ebenso wird in den Untersuchungen von (Kauffold et al., 2010) beschrieben, dass Eber nach der Kastration mit einem Deslorelin-Implantat Tubuli seminiferi contorti mit vielen Sertoli-Zellen, einzelne Spermatogonien sowie Spermatozyten aufweisen.

Während die intakten Eber dieser Studie durchschnittlich 19 Sertoli-Zellkerne pro Tubulus-Querschnitt besitzen, so haben die Tiere der Gruppe 2 durchschnittlich 29 Sertoli-Zellkerne ($p = 0,001$), Tiere der Gruppe 3 durchschnittlich 30 Sertoli-Zellkerne ($p < 0,001$), Tiere der Gruppe 4 durchschnittlich 32 Sertoli-Zellkerne ($p < 0,001$), Tiere der Gruppe 5a durchschnittlich 33 Sertoli-Zellkerne ($p = 0,001$) und Tiere der Gruppe 5b durchschnittlich 20,5 Sertoli-Zellkerne pro Tubulus-Querschnitt. Damit liegen die Sertoli-Zellen bei den vakzinierten Tieren deutlich höher als bei den intakten Ebern und den Tieren aus Gruppe 5b. França et al. (2000) beschreibt für Schweine im Alter von einem Tag bis 30 Tagen nach der Geburt einen durchschnittlichen Wert von 24 Sertoli-Zellkernen pro Tubulus-Querschnitt. 120 Tage alte Schweine besitzen durchschnittlich 30 Sertoli-Zellkerne pro Tubulus-Queranschnitt. 150 Tage alte Schweine besitzen meist 22 Sertoli-Zellkerne und ältere Tiere mit 240 Tagen 13 Sertoli-Zellkerne pro Queranschnitt.

Vergleicht man die Sertoli-Zellzahlen intakter Eber dieser Untersuchung mit den Zellzahlen 150 Tage alter Tiere aus der Studie von França et al. (2000), so fällt auf, dass die Tiere bei gleichem Alter ähnliche Sertoli-Zellzahlen besitzen. Wenn man den Zeitpunkt der Zweitvakzination von Gruppe 2 sowie die Erst- und auch Zweitvakzinationen der Gruppen 3 und 4 als Referenzpunkt verwendet, so befinden sich diese Tiere bei der Vakzination in einem ähnlichen Alter wie die 120 Tage alten Schweine aus der Studie von França et al. (2000).

Geht man davon aus, dass sich das Keimepithel nach der Zweitvakzination und unter Umständen auch nach der Erstvakzination nicht weiter differenziert hat, so könnte die Anzahl der Sertoli-Zellzahlen der vakzinierten Tiere in der vorliegenden Studie bereits zum Zeitpunkt der ersten und auch zweiten Vakzination durchschnittliche Werte von ca. 30 Sertoli-Zellen pro Tubulus-Querschnitt haben. Geht man davon aus, dass die Erst- und vor allem die Zweitvakzination einen Proliferations-Stop des Keimepithels bewirkt, so könnten die vakzinierten Tiere

zum Zeitpunkt der Schlachtung die gleiche Anzahl an Sertoli-Zellen haben wie bereits bei der Erst- oder auch Zweitvakzination. Eine weitere Möglichkeit wäre, die De-Differenzierung mit Proliferation der Sertoli-Zellzahlen. Dies wird in einem späteren Abschnitt genauer erläutert. Vergleicht man die intakten Eber mit den vakzinierten Ebern der Gruppe 5b, die in der vorliegenden Studie untersucht wurden, so besitzen diese auch wieder ähnliche Sertoli-Zellzahlen pro Tubulus.

Das Phänomen erhöhter Sertoli-Zellzahlen in den Tubuli seminiferi contorti kann auch bei Tieren beobachtet werden, die sich jahreszeitlich fortpflanzen (Johnson et al., 1994; Meachem et al., 2005). Oder bei Tieren mit einer erhöhten Zellproliferation auf Grund von Hypophysektomie, GnRH-Suppression und Androgen-Rezeptor-Inaktivierung (Ghosh et al., 1992; Johnson et al., 1996; Tarulli et al., 2013; Legacki et al., 2015). Viele Autoren beschreiben einen Zusammenhang der Sertoli-Zellzahlen mit der Anzahl der Spermatogonien, was in Folge auch Auswirkungen auf die Keimzellzahlen und somit auf die Spermatogenese hat (Johnson et al., 1984; Johnson et al., 1994; Chaudhary et al., 2005; Oatley et al., 2011).

Dies liegt daran, dass die Sertoli-Zelle nur eine bestimmte Anzahl an Keimzellen unterstützen kann, was wiederum den Spermatidenoutput beeinflusst (Orth et al., 1988; Johnson et al., 1994; Griswold, 1995). Johnson et al. (1994) beschreiben, dass in Pferden, die einen saisonal polyöstrischen Zyklus besitzen, während der Zuchtsaison eine Erhöhung der Sertoli-Zellzahlen und der Spermatogonien erfolgt.

Im Gegensatz dazu beschreiben Ghosh et al. (1992) ansteigende Sertoli-Zellzahlen und morphologische Veränderungen dieser, einhergehend mit Keimzelldegenerationen, wenn Mäuse hypophysektomiert werden. Russell und Clermont (1977) zeigen, dass hypophysektomierte Ratten eine Degeneration der Keimzellen, mit anschließender Nekrose aufweisen, welche im Anschluss von den Sertoli-Zellen phagozytiert werden. Dieses betrifft überwiegend mid-pachytäne Spermatozyten sowie Spermatiden (Russell und Clermont, 1977). Weiterhin kann in der Studie von De Rooij et al. (1999) beschrieben werden, dass kryptorchide Mäuse nur undifferenzierte Spermatogonien aufweisen, die sich nicht differenzieren können. Die Studie von Bernal-Mañas et al. (2005) zeigt, dass bei kryptorchiden Ebern ein Verlust des Keimepithels durch einen Proliferations-Stopp der Spermatogonien auftritt.

Damit sich Keimzellen zu ausgewachsenen Spermatozoen differenzieren können, die in das Lumen abgegeben werden, ist eine funktionierende Interaktion zwischen den Keimzellen und Sertoli-Zellen notwendig (Russell, 1977; D'Agostino et al., 1984; Cheng und Mruk, 2002; Sharpe et al., 2003; Mruk und Cheng, 2004).

Auch in der vorliegenden Studie kann eine erhöhte Anzahl der Sertoli-Zellzahlen bei vakzinierten Ebern im Vergleich zu den intakten Ebern bestätigt werden. Welche Mechanismen zu diesen unterschiedlichen Phänomenen führen, ist bisher unklar. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Anzahl der Sertoli-Zellen in dieser Studie wäre ein von GnRH-unabhängiger Einfluss des FSHs auf die Sertoli-Zellen und einer damit einhergehenden Proliferation der Stützzellen (Awoniyi et al., 1988a; França et al., 2000; Wagner und Claus, 2004). Eine GnRH-unabhängige FSH-Sekretion wird auch von Awoniyi et al. (1988a) und im Review von Padmanabhan und McNeilly (2001) vermutet.

Ein weiterer Grund für die erhöhten Sertoli-Zellzahlen könnte der starke Keimzellverlust im Epithel sein, so dass vermehrt Sertoli-Zellen im Tubulus-Querschnitt sichtbar sind.

Ebenso ist es möglich, dass die ausgezählten Sertoli-Zellzahlen in den Tubuli seminiferi contorti bereits zum Zeitpunkt der Vakzination vorlagen und sich mit der Vakzination auf Grund des fehlenden GnRH-Einflusses nicht mehr weiter differenziert haben. Gleiches gilt für die Spermatogonien.

Des Weiteren sind in der Humanmedizin verschiedene Sertoli-Zell-Veränderungen auf Grund von unterschiedlichen Pathologien bekannt (Mora, 1998). Von Mora (1998) werden fünf verschiedene Sertoli-Zelltypen unterschieden. 1) Runde dunkle Zellkerne mit einem Nukleolus. Mora (1998) beschreibt diese Sertoli-Zellen als infantil. 2) Morphologisch physiologische Sertoli-Zellen mit einem blassen dreigeklappten Zellkern und einem Nukleolus. 3) Sertoli-Zellkerne mit Einstülpungen, dichtem Chromatin und einem Nukleolus, wie es bei alternden Männern zu sehen ist. 4) Runde Sertoli-Zellkerne, reich an Euchromatin mit einem Nukleolus und Vakuolen im Zytoplasma. Dies ist vor allem bei de-differenzierten Sertoli-Zellen zu finden. 5) Runde bis ovale Sertoli-Zellkerne mit vermehrtem Vorkommen an Heterochromatin und erhöhten Sertoli-Zellzahlen durch Fehldifferenzierung, wie es bei Orchidopexie der Fall ist (Mora, 1998).

Werden die runden bis ovalen Sertoli-Zellkerne und die erhöhte Anzahl an Sertoli-Zellen in der vorliegenden Dissertation mit den Ergebnissen von Mora (1998) verglichen, so weisen diese am meisten Ähnlichkeiten zu den fehldifferenzierten Sertoli-Zellen auf, wie es von Mora (1998) beschrieben wird. Da sich das Keimepithel bei den Tieren in der vorliegenden Studie zum Zeitpunkt der Erst- und Zweitvakzination noch in der Differenzierungsphase befindet, wäre eine Fehldifferenzierung durchaus möglich (França et al., 2000; Avelar et al., 2010).

Bei den Tieren, welche in einem Alter von 8 und 12 Wochen vakziniert wurden, aber auch bei den anderen vakzinierten Gruppen in dieser Dissertation, wäre eine Fehldifferenzierung sehr wahrscheinlich. Eine De-Differenzierung sollte jedoch auch diskutiert werden (Steger, K et al., 1999; Brehm et al., 2007).

Ob es sich bei den Sertoli-Zellen der vakzinierten Tiere in der vorliegenden Untersuchung um immature oder morphologisch veränderte Sertoli-Zellen handelt, ist nicht ganz einfach festzustellen. Das Vorhandensein von Anti-Müller Hormon (AMH) und Keratin 18 (K 18), sowie die Abwesenheit des AR ist ein Hinweis für immature Sertoli-Zellen (Maymon et al., 2002; Sharpe et al., 2003).

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Antikörper gegen AMH und K18 haben an den Proben des Schweinehodens nicht funktioniert.

In der Studie von Klobucar et al. (2003) konnte AMH noch in einem Alter von 12 Wochen bei Schweinen im Hoden nachgewiesen werden. In einer anderen Studie mit Ebern, welche mit 9 und 19, sowie mit 15 und 19 Wochen mit Improvac® vakziniert wurden, können starke AMH-Nachweise in Sertoli-, Keim-, und auch Leydig-Zellen nachgewiesen werden. Dies wird von den Autoren als Zeichen von Immaturität gesehen (Srisuwatanasagul et al., 2020). In der Studie von Srisuwatanasagul et al. (2018) konnte der Androgen-Rezeptor ebenfalls, bei mit Improvac® vakzinierten Ebern nachgewiesen werden. Da bei bis zu 21 Tage alten Schweinen neben K18 bereits der Androgen-Rezeptor im Hoden eine positive Immunreaktion aufweist (Caires et al., 2008), kann der Androgen-Rezeptor beim Schwein unter Umständen nicht als Marker für Maturität verwendet werden.

Generell sind in allen vakzinierten Gruppen sowohl Tubuli seminiferi contorti mit hohen Sertoli-Zellzahlen und dazwischen vorkommenden großen Spermatogonien und Spermatozyten im Lumen zu finden. Aber auch kleine Tubuli mit milden bis starken Keimzellverlusten, verringerten Mitoseraten sowie kleine Spermatogonien,

mittelgroße und große Spermato gonien sowie birnenförmige und runde/ovale Sertoli-Zellkerne kommen vor.

Da die morphologischen Veränderungen nach der Impfung mit Improvac® in dieser Dissertation bisher anhand der Vakzinationszeitpunkte diskutiert wurden, sollte in diesem Zusammenhang auch das Zeitintervall zwischen der Zweitvakzination (V_2) und der Schlachtung betrachtet werden.

Insbesondere mit den damit verbundenen Gruppen-Unterschieden in der Morphologie der Tubuli seminiferi contorti.

Aus diesem Grund wird an dieser Stelle noch einmal vergleichend auf die Morphologie der Hoden vakzinierter Tiere eingegangen. Tiere der Gruppe 2 wurden in einem Abstand von 12 und 14 Wochen, Tiere der Gruppe 3 10 Wochen und Tiere aus Gruppe 4 8 Wochen nach der zweiten Vakzination geschlachtet.

Besonders die Tiere der Gruppe 2 und 3 zeigen Tubuli seminiferi contorti mit hohen Sertoli-Zellzahlen und dazwischen vorkommenden großen Spermato gonien und Spermato zyten im Lumen. Aber auch hier gibt es Tubuli mit nur milden bis starken Keimzellverlusten. Gruppe 4 enthält zum Teil Tiere, welche sich morphologisch kaum von den intakten Ebern unterscheiden. Die Leydig-Zellen im Interstitium der Tiere aus Gruppe 4 besitzen oft einen pyknotischen Zellkern, welcher eine Verdichtung des Chromatins besitzt. Zusätzlich sind Anzeichen der Degeneration mit einer Hypertrophie des Zellkerns zu erkennen. Das Zytoplasma der Leydig-Zellen ist meist kaum vorhanden. Aber auch polygonale Zellkerne mit Zytoplasma sind vorhanden. Vergleicht man die Nuklei der Leydig-Zellen vakzinierter Tiere mit denen der intakten Eber, so besitzen die Tiere der Gruppe 2 bis 5a ($p < 0,001$) signifikant höhere Anzahlen an Degenerationen im Vergleich zu den intakten Ebern.

In der Studie von Wicks et al. (2013), in welcher Eber in einem Alter von 2 und 5 Monaten vakziniert wurden und die Schlachtung 10 Wochen nach V_2 erfolgte, kommen Tubuli vor, welche sich nicht von denen intakter Ebern unterscheiden.

Jedoch sind dort auch Tiere gelistet, welche kleinere Tubuli seminiferi contorti besitzen und kleinere Sertoli- und Leydig-Zellen sowie eine beeinträchtigte Spermato genese zeigen (Wicks et al., 2013).

Einarsson et al. (2011) untersuchten Eber, welche mit 10 und 14 Wochen, sowie mit 16 und 20 Wochen vakziniert sowie in der 25. Lebenswoche geschlachtet wurden. Frühzeitig vakzinierte Tiere zeigen auch dort 38% kleinere Tubuli seminiferi contorti mit einem starken Verlust an Keimzellen. Häufig sind Tubuli seminiferi contorti zu sehen, welche nur Sertoli-Zellen und Keimzellen bis hin zu wenigen Spermatozyten im Lumen enthalten. Es sind jedoch auch Tubuli seminiferi contorti vorhanden, welche ein Sertoli-cell-only-Phänomen zeigen.

Die Tiere, welche zu einem späteren Zeitpunkt vakziniert wurden, besitzen 18% kleinere Tubuli seminiferi contorti mit einem milden bis starken Keimzellverlust. Diese unterschiedlichen Auswirkungen, welche von den Autoren benannt wurden, decken sich mit den Ergebnissen der evaluierten Tiere dieser Untersuchung.

In einer weiteren Studie wurden Eber mit 8 und 14 Wochen vakziniert und 8 sowie 15 Wochen nach der Zweitinjektion geschlachtet (Sladek et al., 2018). Die Autoren beschreiben, dass Tiere, die 8 Wochen nach V_2 untersucht wurden, kleinere Tubuli seminiferi contorti mit einer abwesenden Spermatogenese und atrophische Leydig-Zellen mit pyknotischen Zellkernen zeigen. Im Gegensatz zu den nach 8 Wochen geschlachteten Tieren zeigen die Tiere, welche 15 Wochen nach V_2 geschlachtet wurden, größere Tubuli seminiferi contorti, mehrere Lagen an Keimepithel und mehr Leydig-Zellen (Sladek et al., 2018). Die Autoren wollten damit zeigen, dass der Effekt einer frühen Kastration durch eine späte Schlachtung nach V_2 vermindert wird. Da auch nur ein Tier anhand morphologischer Kriterien eine Regeneration der Spermatogenese zeigt, befürworten sie einen Vakzinationseffekt bis zu 15 Wochen nach der Zweitvakzination (Sladek et al., 2018).

Der Hersteller von Improvac® gibt an, dass Tiere bis zu 10 Wochen nach der zweiten Vakzination geschlachtet werden können. Sollte das Intervall zwischen Schlachtung und V_2 darüber hinausgehen, würde der Anteil an Tieren, welche zur Normalfunktion zurückkehren, steigen, so dass eine dritte Impfung nötig ist (Zoetis Deutschland GmbH, 2021; Zoetis New Zealand Limited). Der neuseeländische Hersteller empfiehlt sogar eine erneute Vakzination 8 Wochen nach V_2 (Zoetis New Zealand Limited, 2021).

Betrachtet man die Zeitintervalle zwischen V_2 und der Schlachtung, welche in dieser Untersuchung verwendet wurden, so übersteigt die frühvakzinierte Gruppe 2 mit einer Schlachtung 12 und 14 Wochen nach V_2 den Zeitraum der empfohlenen Herstellerangaben. Da sich die Tiere der Gruppe 2 trotz des unterschiedlichen Intervalls zwischen V_2 und Schlachtung im Vergleich zu den anderen Tieren kaum unterscheiden, wurde nicht zwischen den beiden Schlachtzeitpunkten differenziert und die Gruppe 2 als eine Gruppe gewertet.

Ein Tier der Gruppe 2 besitzt das gleiche Aussehen in Bezug auf das Hodenparenchym wie die intakten Eber. Auch beträgt der Testosteronwert dieses Ebers 4,19 ng/ml im Blutplasma. Dieser Wert liegt etwas unterhalb des durchschnittlichen Testosteronwerts, der in dieser Studie verwendeten intakten Eber. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich bei diesem Tier der Gruppe 2 um einen Impfausreißer handelt, was auch in anderen Studien von mit Improvac® kastrierten Ebern beschrieben wird (Hilbe et al., 2006; Kubale et al., 2013). Die Impfausreißer werden von Hilbe et al. (2006) anhand der Hodengewichte und der Ausprägung der Spermatogenese sowie von Kubale et al. (2013) anhand der Hodengewichte und der Testosteronwerte beschrieben. Weiterhin könnte sich das Keimepithel des Tieres aus Gruppe 2 regeneriert haben. Da dieses Tier 12 Wochen nach der zweiten Vakzination geschlachtet wurde, liegt das Zeitintervall für die Vakzination somit über den regulären Angaben des Herstellers. Eine Wiederaufnahme der Hodenfunktion ist in einigen Studien bereits beschrieben worden (Rottner, 2012; Wicks et al., 2013).

Da die restlichen vakzinierten Tiere der Gruppe 2 sowie Tiere der Gruppe 3 und 4 jedoch kleinere Tubuli seminiferi contorti, morphologische Veränderungen sowie erhöhte Sertoli-Zellzahlen, morphologisch veränderte Spermatogonien und eine verringerte Mitoserate im Vergleich zu den intakten Ebern haben, ist es möglich, dass durch eine frühe Vakzination in der 8. Lebenswoche ein Zeitintervall von mehr als 10 Wochen zwischen V_2 und der Schlachtung überschritten werden kann.

Denn die zu unterschiedlichen Zeitpunkten vakzinierten und geschlachteten Tiere zeigen untereinander insgesamt sehr ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die morphologischen Änderungen in den Tubuli seminiferi contorti, im Interstitium sowie anhand der Testosteronwerte, wenn diese mit den intakten Ebern verglichen werden.

Die Tiere der Gruppe 5a weisen ebenfalls kleinere Tubuli seminiferi contorti, morphologische Veränderungen der Sertoli-Zellen sowie erhöhte Zellzahlen der Sertoli-Zellen, morphologisch veränderte Spermatogonien sowie eine verringerte Mitoserate im Vergleich zu den intakten Ebern auf. Die Tiere der Gruppe 5b besitzen ein Erscheinungsbild ähnlich zu jenem der intakten Eber. Dazu gehören große Tubuli seminiferi contorti, hohe Mitoseraten, viele Reihen an differenzierten Keimzellen (Spermatogonien, Spermatozyten, runde und elongierte Spermatiden), birnenförmige Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen mit einem polygonalen Zellkern sowie das Vorhandensein von viel Zytoplasma. Anhand dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Tiere der Gruppe 5 eine beginnende oder eine bereits wieder aufgenommene Spermatogenese-Aktivität besitzen.

Eine wieder beginnende Testosteronaktivität, und damit eine beginnende Regeneration des Keimepithels, ist beim Eber bereits 10 Wochen nach der zweiten Vakzination möglich (Rottner und Claus, 2009; Wicks et al., 2013). Rottner und Claus (2009) legen einen Testosteronwert von 0,5 ng/ml im Blutplasma als Wert für eine beginnende Testosteronaktivität im Hoden fest.

Die Schweine der Studie von Wicks et al. (2013) besitzen bereits 8 Wochen nach V_2 ansteigende Testosteronwerte im Blutplasma. Ebenso hat in deren Studie das Keimepithel bis auf wenige Tiere die Erscheinung wie bei intakten Ebern (Wicks et al., 2013). Nur zwei von den geimpften Tieren der Gruppe 5 aus der vorliegenden Untersuchung zeigen ein ähnliches Erscheinungsbild wie die Tiere aus den anderen vakzinierten Gruppen. Dazu gehört eine erhöhte Anzahl an Sertoli-Zellen und eine deutliche Abnahme der Keimzellen.

In ihrer Dissertation beschreibt Rottner (2012) neben Ebern mit einem „Rebound-Phänomen“ auch, dass es Schweine gibt, die auch mehrere Wochen nach V_2 nicht wieder die ursprünglichen Testosteronwerte erreichen konnten.

Auch in der hier vorliegenden Studie gibt es zwei vakzinierte Eber, welche 21 Wochen nach V_2 niedrige Testosteronwerte mit weniger als 2 ng/ml im Blutplasma besitzen. Das Keimepithel dieser Eber ähnelt dem der vakzinierten Tiere von Gruppe 2 bis 4. Weshalb die beiden Tiere niedrigere Testosteronwerte im Vergleich zu den intakten Ebern besitzen, ist schwierig zu sagen. Es scheint jedoch tierabhängige Unterschiede für die Wiederaufnahme der Hodenfunktion zu geben. So wird von verschiedenen Autoren gezeigt, dass eine Vakzination mit Improvac®

bis zu 22 Wochen nach V_2 anhält (Zamaratskaia et al., 2008; Einarsson et al., 2009). Ebenso beschreibt Rottner (2012) erst 24 Wochen nach Zweitvakzination eine Wiederaufnahme der Hodenfunktion mit Testosteronwerten von mehr als 0,5 ng/ml. Wenn man nach diesen Kriterien vorgeht, so liegt nur ein Tier der Gruppe 5 mit 0,43 ng/ml nur knapp unter dem Referenzwert für eine Wiederaufnahme der Testosteronaktivität. Die anderen vakzinierten Tiere aus Gruppe 5 haben somit die Hodenfunktion wieder aufgenommen.

In der hier untersuchten Studie wurde ein Referenzwert von 3 ng/ml Testosteron im Blutplasma verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen der Tubulusfläche, der Anzahl der Tubuli pro Gesichtsfeld, der Mitoseraten, der Ausprägung des Keimepithels sowie die morphologischen Veränderungen von Sertoli-Zellen und deren Zellzahlen sowie morphologische Veränderungen der Spermatogonien und Leydig-Zellen zu beschreiben. Darauf wird im Abschnitt über die immunhistochemische Untersuchung des Antikörpers gegen Testosteron weiter eingegangen.

DDX-4 wird zur Familie der dead-box-RNA-Helikase-Proteine gezählt und dient dem Nachweis von Keimzellen (Cordin et al., 2006; Kim et al., 2015; Park und Tilly, 2015). Während der pränatalen Keimzellentwicklung, zeigt der Antikörper gegen DDX-4 durchgehend positive Reaktionen im Zytoplasma von Primordial-Keimzellen des bovinen Ovars mit einer zunehmenden Reaktionsintensität im Zytoplasma von sich entwickelnden Keimzellen bis hin zu Sekundärfollikeln (Kenngott et al., 2014). Ebenso wird das Vorkommen des DDX-4-Proteins in sich entwickelnden fetalen Keimzellen der Keimzelleiste, aber auch in den adulten Keimzellen beschrieben. Hier weist es vor allem positive Immunreaktionen in den Spermatozyten männlicher Tiere und in den Oozyten weiblicher Tiere auf (Castrillon et al., 2000; Stoop et al., 2005).

Der Antikörper gegen DDX-4 wurde in der vorliegenden Studie verwendet, um Keimzellen von Sertoli-Zellen im Keimepithel zu unterscheiden (Albert et al., 2010; Goel et al., 2010; Langenstroth et al., 2014; Lee et al., 2017). In der Studie von Lee et al. (2017) weisen Spermatogonien im pubertären und postpubertären Schwein keine Immunreaktivität für den Antikörper gegen DDX-4 auf, Spermatozyten und runde Spermatiden jedoch schon. Im Gegensatz dazu besitzen die Spermatogonien der präpubertären Schweine eine positive Immunreaktivität für den Antikörper gegen DDX-4 (Lee et al., 2017). Sie beschreiben DDX-4 als einen

spezifischen Marker für undifferenzierte Spermatozoen im präpubertären Eber und für differenzierte Spermatozyten im postpubertären Eber (Lee et al., 2017). Ebenso wird das DDX-4-Protein von Kenngott et al. (2014) und Hickford et al. (2011) als wichtige Komponente bei der Keimzellproliferation und Differenzierung gesehen.

Bei Spezies wie Affen und Büffeln konnte DDX-4 sowohl in undifferenzierten Keimzellen präpubertärer und in differenzierten Keimzellen von adulten Tieren mit Hilfe der Immunfluoreszenz und immunhistochemischen Methoden nachgewiesen werden (Albert et al., 2010; Goel et al., 2010; Langenstroth et al., 2014).

Die intakten Eber dieser Arbeit weisen in den Tubuli seminiferi contorti nur eine geringe Immunreaktivität für den Antikörper gegen DDX-4 zum Teil im Zellkern, aber vor allem im Zytoplasma von kleinen runden/ovalen Spermatozoen auf.

Spermatozyten und runde Spermatozoen hingegen besitzen eine starke Immunreaktivität für den Antikörper gegen DDX-4 im Zytoplasma, zum Teil jedoch auch im Zellkern. Geimpfte Tiere dieser Dissertation mit einer beeinträchtigten Spermatozoenbildung haben dagegen eine eher starke DDX-4-Reaktion in mittelgroßen und großen Spermatozoen. Dort sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma.

Betrachtet man die Größenunterschiede der Spermatozoen, so ist zu erkennen, dass bei den vakzinierten Tieren häufig veränderte große Spermatozoen vorkommen und diese nicht die kleine runde/ovale Gestalt haben wie es bei den intakten Ebern zu 63,7% der Fall ist. Lediglich die Gruppe 5b zeigt zu 61,8% viele kleine Spermatozoen im Vergleich zu den intakten Ebern.

Im Gegensatz zu den intakten Ebern haben die Tiere der Gruppen 2 bis 5a ($p < 0,001$) signifikant mehr große Spermatozoen. Verwendet man die Einteilung nach Lee et al. (2017), könnte man bei den Spermatozoen von den intakten Ebern (Gruppe 1) dieser Doktorarbeit vermuten, dass es sich um differenzierende Spermatozoen handelt, wie sie beim post-pubertären Eber zu sehen sind (Lee et al., 2017). Im Gegensatz dazu könnten die großen Spermatozoen von geimpften Tieren der Gruppen 2 bis 5a undifferenziert sein, wie es beim präpubertären Eber zu sehen ist (Lee et al., 2017).

Vimentin, ein Intermediärfilament, ist Teil des Zytoskeletts der Sertoli-Zellen (Show et al., 2003; Vogl et al., 2009; Willems et al., 2010; Wu et al., 2021). In der vorliegenden Untersuchung kann das Vimentin-Protein rund um die Zellkernmembran von Sertoli-Zellen, in peritubulären Zellen, in der Wand von Blutgefäßen, in einigen Fibrozyten und auch im Zytoplasma von Leydig-Zellen nachgewiesen werden. Diese Auswertungen decken sich mit ähnlichen Befunden in den Hoden des kleinen Mäusehirsches (Sasaki et al., 2010), in Mäusehoden (Kurohmaru und Kanai, 1992), in Rinderhoden (Devkota et al., 2006), in Widder- und Stierhoden (Steger et al., 1994), in Bärenhoden (Komatsu, Yamamoto et al. 1998) und in den Hoden von Schafen (Steger und Wrobel, 1994).

Die vakzinierten Eber dieser Untersuchung zeigen eine Zunahme der Vimentin-Expression um die Kernmembran und auch im Zytoplasma. Außerdem reichen verzweigte Zytoplasmareaktionen ungeordnet von der Zellkernmembran zu allen Seiten, vor allem aber zum Lumen hin. Meist erreichen die Zytoplasmareaktionen nur die Höhe von einer oder mehreren Zellreihen.

Lediglich bei Tieren mit einer Zunahme von differenzierten Spermatogonien und einem funktionierenden Keimepithel sind die Vimentin-positiven Zytoplasmareaktionen senkrecht zum Lumen gerichtet.

Dies korreliert mit Studien von Devkota et al. (2006), in denen Sertoli-Zellen in der Zeit des Übergangs vom präpubertären zum adulten Tier eine Zunahme der Vimentin-Expression um den Zellkern zeigen und nur adulte Tiere eine „flammenartige“ Umrandung zum Lumen hin aufweisen (Kurohmaru und Kanai, 1992; Steger et al., 1994; Komatsu et al., 1998; Devkota et al., 2006).

Komatsu et al. (1998) fanden heraus, dass in der reproduktiven Nebensaison japanischer Schwarzbären der Antikörper gegen Vimentin in der perinukleären Region von Sertoli-Zellen nachgewiesen werden kann, auch wenn sich das Hodenepithel im Zustand der Regression befindet. Im Keimepithel älterer Männer, welches Regression zeigte, wird ein erhöhter Nachweis für Vimentin durch Immunogold-Partikel in der Nähe der Nuklei von Sertoli-Zellen beschrieben (De Miguel et al., 1997). Der Grund für die erhöhten Vimentin-Nachweise ist nicht bekannt. Die Autoren vermuten jedoch eher weniger einen erhöhten Vimentin-Nachweis auf Grund einer morphologischen Änderung der Sertoli-Zellen, als auf Grund von Keimzellverlusten oder einer erhöhten FSH-Stimulation mit

verminderter Testosteronaktivität (de Miguel, Bethencourt et al. 1997).

Weiterhin zeigen Aumüller, Steinbrück et al. (1988), dass im Hoden von Männern mit einem Meiose-Stillstand subjektiv mehr Sertoli-Zellen mit einer positiven Immunreaktivität für Vimentin zu finden sind. Die Form der Sertoli-Zellkerne untereinander nimmt hierbei unterschiedliche Gestalt an. Hingegen beschreiben die gleichen Autoren Sertoli-cell-only-Tubuli mit einer „perlschnurartigen“ Kette von Sertoli-Zellen mit ähnlichen Gestalten des Zellkerns.

Sie gehen davon aus, dass die Veränderung der Sertoli-Zellform mit einer regulatorischen Änderung dieser einhergeht, die insbesondere für die Spermiation wichtig ist (Aumüller et al., 1988).

Die Ergebnisse der oben genannten Studie in Kombination mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lassen die Vermutung zu, dass die Vakzination mit Improvac® zu einer Konformationsänderung der Vimentinfilamente führt. Ob dies auf Grund der morphologischen Veränderung von Sertoli-Zellen, auf Grund der fehlenden Keimzellen oder einer Kombination aus beidem beruht, lässt sich anhand dieser Auswertungen nicht feststellen.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Untersuchung ein immunhistochemischer Nachweis für Sertoli-Zellen durch den Antikörper gegen Sox-9, einem Transkriptionsfaktor, der die Ausbildung des Hodens von Säugetieren steuert, vorgenommen (Koopman, 1999; Chaboissier et al., 2004). Die Funktion des Sox-9 Proteins soll überwiegend die Sertoli-Zelldifferenzierung und die Expression des AMH sein (Kent et al., 1996; De Santa Barbara et al., 1998).

Im Sertoli-Zellkern kann eine starke Reaktion für den Antikörper gegen Sox-9 nachgewiesen werden. Das Zytoplasma der Sertoli-Zellen, welches die Keimzellen von intakten Ebern (Gruppe 1) und geimpften Tieren mit vielen Schichten von Keimzellen umgibt, zeigt eine schwache Sox-9-Immunreaktivität. Vom Sertoli-Zellkern ziehen zytoplasmatische, straßenartige Sox-9-Reaktionen senkrecht zum Lumen. Im Gegensatz dazu zeigen Tiere mit einem deutlichen Verlust an Keimzellen (Gruppe 2, 3, 4 und 5a) ein starkes Sox-9-Expressionsmuster im Zytoplasma. Verzweigte Sox-9-positive Zytoplasmareaktionen füllen meist ungeordnet den gesamten Tubulus aus. Außerdem erscheint das Zytoplasma der Sertoli-Zellen löchrig.

Fröjdman et al. (2000) beschreiben, dass Hoden von Ratten eine stark-positive Reaktion für den Antikörper gegen Sox-9 im Zellkern und auch im Zytoplasma aufweisen. Sie vermuten, dass Sox-9 eine wichtige Rolle bei der Keimzellendifferenzierung spielt, da es eine starke Immunreaktivität in Phasen der embryonalen Hodenausbildung, aber auch während der Pubertät und damit in mitotisch und meiotisch aktiven Phasen zeigte (Fröjdman et al., 2000).

In der vorliegenden Studie kann vermutet werden, dass mit dem Auftreten von perpendikulären Zytoplasmareaktionen, die senkrecht zum Lumen reichen, auch das Auftreten von differenzierten Keimzellen einhergeht.

Hierauf lassen auch die Ergebnisse der Untersuchungen mit den Antikörpern gegen Sox-9 und Vimentin schließen. Da Sox-9-mRNA-Nachweise bei pränatalen Ebern stärker sind als bei älteren Tieren, vermuten Chen et al. (2019) eine kritische Rolle für Sox-9 bei der Hodenentwicklung. Es scheint jedoch ein Zusammenhang zwischen der Veränderung der Funktion, Morphologie und Struktur der Sertoli-Zellen und der Keimzellendifferenzierung zu bestehen (Ghosh, Bartke et al. 1992, Cheng und Mruk 2002, Sharpe, McKinnell et al. 2003, Lardenois, Chalmel et al. 2010). Martinova et al. (1989) beschreiben, dass in den Hoden älterer Männer die Sertoli-Zellen anders als normal aussehen, jedoch denjenigen Hoden im Zustand von nach der Geburt bis hin zur Pubertät ähneln. Der Zellkern dieser Sertoli-Zellen besitzt eine ovale nicht-lobulierte Gestalt mit homogen angeordnetem Chromatin im ganzen Zellkern (Martinova et al., 1989).

Dabei ist anzunehmen, dass Tubuli, die nur Sertoli-Zellen und Spermatogonien aufweisen, immature Sertoli-Zellen und Spermatogonien enthalten, während Tubuli mit vorhandenen Spermatozyten mature Sertoli-Zellen enthalten. Bei Vorkommen von Spermatozyten, zeigen die Sertoli-Zellen einen lobulierten Nukleus mit einem dreiteiligen Nukleolus (Martinova et al., 1989).

Die Hypothese der oben genannten Autoren könnte sich zum Teil auch mit den Ergebnissen decken, die in dieser Dissertation evaluiert wurden. Tubuli, welche runde/ovale und „perlschnurartig“ auf der Basalmembran aufliegende Sertoli-Zellkerne aufweisen, besitzen meist nur große Spermatogonien und wenige Spermatozyten im Lumen. Jedoch gibt es auch Tubuli, welche wenige physiologische Spermatozyten und einige runde Spermatisden im Lumen aufweisen. Auch dort kommen jedoch die veränderten Sertoli-Zellen sowie große und mittelgroße Spermatogonien vor. In der vorliegenden Studie scheint erst mit dem

Vorhandensein von mehreren differenzierten Keimzellstadien wie Spermatozyten und runden Spermatiden auch das Vorkommen von birnenförmigen Sertoli-Zellkernen sowie kleinen runden und ovalen Spermatogonien einherzugehen.

Ob die morphologischen Veränderungen der Sertoli- und Keimzellen vorliegen, weil Tiere mit einem bei der Vakzination bereits vollkommen ausgebildeten Keimepithel einen Keimzellverlust erleiden und des Weiteren bei sehr starkem Keimzellverlust eine Konformations- und auch Funktionsänderung der Sertoli-Zellen und Spermatogonien stattfindet oder ob die Tiere durch den Mangel an Maturität zum Zeitpunkt der Vakzination eine Fehldifferenzierung erleiden, muss noch geklärt werden.

Steger, K et al. (1999) berichten, dass auf Grund genetischer Dysfunktionen bei Menschen, eine Reifung der Sertoli-Zellen von immaturen zu maturen Sertoli-Zellen beeinträchtigt sein kann. Ebenso beschreiben sie, dass die funktionelle Sertoli-Zelle essentiell für die Spermatogenese ist. Diese wiederum spielt eine wichtige Rolle für die Differenzierung der Sertoli-Zellen (Steger, K et al., 1999).

Sie beschreiben auch, dass nicht nur eine fehlende Differenzierung, sondern auch eine De-Differenzierung der postpubertären Sertoli-Zellen möglich ist. Beim Menschen sind die Differenzierungsmarker CK18 und AMH nicht in adulten Sertoli-Zellen nachweisbar. Bei de-differenzierten Sertoli-Zellen würden diese zum Teil wieder eine positive Reaktion zeigen (Steger, K et al., 1999). Dies kann mit der Expression von Markern für unreife Sertoli-Zellen wie dem AMH und Keratin 18 nachgewiesen werden (Steger, K et al., 1999). Die in dieser Studie verwendeten Antikörper gegen AMH und K18 haben nicht funktioniert. Aus diesem Grund können bezüglich des Differenzierungsstatus der Hoden nur Vermutungen angestellt werden.

Auf Grund der morphologisch großen Spermatogonien und runden/ovalen Sertoli-Zellen kann jedoch vermutet werden, dass die Vakzination zu einer Fehl- oder auch De-Differenzierung des Hodenepithels führt. De Franca et al. (1995) beschreiben eine verzögerte Reifung von Sertoli-Zellen auf Grund eines Hypothyreodismus, einhergehend mit dem Bild von immaturen Sertoli-Zellen, was die fehlende Differenzierung und Proliferation der Keimzellen im Hodenepithel zur Folge hat. Sie schließen deshalb auf eine Kontrollfunktion der Sertoli-Zelle im Hoden.

Da in der vorliegenden Untersuchung die Sertoli-Zellkerne der vakzinierten Eber eine physiologische birnenförmige Gestalt besitzen, wenn ein ausgeprägtes Keimepithel vorhanden ist, kann auch hier vermutet werden, dass die Morphologie und die Funktion der Sertoli-Zelle essentiell für eine intakte Spermatogenese ist. Ob in dieser Dissertation eine Vakzination der Eber zu einer morphologischen und funktionellen Veränderung der Spermatogonien oder der Sertoli-Zellen und damit zu einer fehlenden Proliferation der Keimzellen führt oder ob ein starker Keimzellverlust eine Veränderung an den Sertoli-Zellen und Spermatogonien verursacht, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Ki67 ist ein Protein, das sowohl in der G1-Phase, S-Phase, G2-Phase als auch in der Mitosephase des Zellzyklus aktiv ist (Gerdes et al., 1984; Bruno und Darzynkiewicz, 1992; Sobecki et al., 2017).

In dieser Studie wurde Ki67 verwendet, um die Mitoserate vor allem der Keimzellen bei intakten und vakzinierten Ebern zu untersuchen. Bei intakten Ebern der Gruppe 1 ist das Ki67-Protein in allen Zelltypen mit Ausnahme der elongierten Spermatiden zu finden. Bei vakzinierten Tieren sind vergleichsweise weniger proliferierende Keimzellen in den Tubuli seminiferi contorti zu finden. Hierbei wurde nicht zwischen den einzelnen Keimzellstadien unterschieden.

So zeigen intakte Eber durchschnittlich 27 Mitosen pro Tubulus. Im Vergleich zu den intakten Ebern zeigt Gruppe 2 durchschnittlich 8 Mitosen ($p = 0,177$), Gruppe 3 durchschnittlich 2,5 Mitosen ($p < 0,001$), Gruppe 4 ($p = 0,002$) durchschnittlich 6 Mitosen und Gruppe 5a durchschnittlich 15 Mitosen ($p < 0,001$) und Gruppe 5b durchschnittlich 13,5 Mitosen pro Tubulus-Anschnitt.

Viele Keimzellen sind bei den vakzinierten Tieren im Vergleich zu den intakten Ebern vermindert. So zeigen die Tiere der Gruppe 2 zu 61,3%, Tiere der Gruppe 3 zu 58,3%, Tiere der Gruppe 4 zu 41,5% sowie Tiere der Gruppe 5a zu 99,5% ein Keimepithel mit überwiegend Spermatogonien und Spermatozyten. Die Gruppe 5b besitzt mit 45,2% viele geordnete Keimzellreihen. Bis auf die Gruppe 2 zeigen alle Gruppen signifikante Unterschiede bezüglich des Keimepithels im Vergleich zu den intakten Ebern. Die Tiere der Gruppe 3 ($p < 0,001$), 4 ($p = 0,001$), und 5a ($p < 0,001$), weil sie weniger Keimepithel haben, die Gruppe 5b ($p = 0,010$), weil sie mehr Keimepithel als die intakten Eber besitzt.

Spermatogonien, Spermatozyten und runde Spermatiden sind nur vereinzelt positiv für den Antikörper gegen Ki67. Diese Ergebnisse ähneln denen früherer Studien (Srisuwatanasagul et al., 2018; Monleón et al., 2020). So zeigen in der Studie von Srisuwatanasagul et al. (2018) intakte Eber durchschnittlich 16,5 positive Zellen und die vakzinierten Eber, die mit 9 und 19 sowie 14 und 18 Wochen vakziniert wurden, durchschnittlich 5,8 Ki67-positive Zellen. Auch in deren Studie kann erkannt werden, dass die Mitoserate nach Vakzination deutlich abnimmt.

Jedoch haben Srisuwatanasagul et al. (2018) im Gegensatz zu der vorliegenden Studie alle Zellen pro histologischem Schnitt durch alle Ki67-positiven Zellen geteilt, um auf das Ergebnis zu kommen. In dieser Dissertation wurden nur die Ki67-positiven Keimzellen pro Tubulusanschnitt für 100 Tubuli gezählt.

Wagner et al. (2006) haben in ihrer Studie ebenso anhand von 100 Tubuli die Mitoserate der Keimzellen ausgezählt. Diese liegt bei den intakten Ebern durchschnittlich bei 17,2 Ki67 positiven Zellen, bei den vakzinierten Ebern durchschnittlich bei 5,7 Ki67-positiven Zellen (Wagner et al., 2006). Anhand dieser Studien ist deutlich zu erkennen, dass die Mitoserate in den Tubuli seminiferi contorti nach Vakzination mit Improvac® sinkt, auch wenn sich die Daten unterscheiden. In der vorliegenden Dissertation kann ebenso erkannt werden, dass die untersuchte Mitoserate bei den Tieren in Gruppe 5a und 5b wieder zunimmt. Dies weist auf die Regeneration des Keimepithels hin.

Die Höhe der Mitoserate spiegelt sich auch in der Fläche der Tubuli seminiferi contorti wider. So besitzen die Tiere der Gruppe 2 ($p = 0,002$), Gruppe 3 ($p < 0,001$), Gruppe 4 ($p = 0,020$) mit niedrigen Mitoseraten der Keimzellen signifikant kleinere Tubulus-Querschnittsflächen, während die Tiere der Gruppe 5b ($p = 0,049$) im Vergleich zu intakten Ebern signifikant höhere Tubulus-Querschnittsflächen haben.

In der vorliegenden Studie zeigen auch die großen Spermatogonien und Spermatozyten der vakzinierten Tiere positive Ki67-Reaktionen. Dies liefert Hinweise, dass es sich bei diesen Zellen nicht um degenerative, sondern um proliferierende Zellen handelt. Darüber hinaus scheinen auch vereinzelte Sertoli-Zellen bei einigen vakzinierten Tieren positiv für den Antikörper gegen Ki67 zu sein. Dies weist auf eine Proliferation der Sertoli-Zellen hin.

Da der Antikörper gegen Ki67 jedoch nur bei einzelnen Sertoli-Zellen gefunden wird, weisen diese Ergebnisse mit den erhöhten Sertoli-Zellzahlen, in Kombination

mit den Ki67-positiven großen Spermatogonien, eher auf eine mögliche Fehldifferenzierung nach der Vakzination mit Improvac® hin. Ebenso wäre eine De-Differenzierung der Hoden möglich. In der Studie von Tarulli et al. (2013) wird beim Menschen nach GnRH-Suppression, mit Hilfe von Immunfluoreszenz und immunhistochemischen Nachweisen, eine erhöhte Aktivität Ki67-positiver Sertoli-Zellen in Kombination mit einer Downregulation des Androgen-Rezeptors beschrieben. Die Autoren erläutern, dass im adulten Menschen nach GnRH-Suppression eine fokale De-Differenzierung von adulten in immature Sertoli-Zellen möglich ist.

Da jedoch nur ein Teil der Sertoli-Zellen Proliferation und somit eine Down-Regulation zeigen, nehmen Tarulli et al. (2013) an, dass sich nicht alle Sertoli-Zellen de-differenzieren. Sie vermuten einen gemischten Phänotyp mit adulten und de-differenzierten Sertoli-Zellen in den Hoden der GnRH-supprimierten Menschen (Tarulli et al., 2013).

Diese Ergebnisse decken sich auch mit den Untersuchungen in der vorliegenden Dissertation. Neben den morphologisch stark veränderten Tubuli mit erhöhten runden/ovalen Sertoli-Zellkernzahlen und großen Spermatogonien kommen auch Tubuli vor, die alle Keimzellstadien sowie birnenförmige Sertoli-Zellkerne und kleine runde Spermatogonien von maturer Gestalt besitzen. Dieses Bild könnte an den gemischten Phänotyp erinnern. Jedoch sind in der vorliegenden Studie im Gegensatz zu der Studie von Tarulli et al. (2013) erhöhte Sertoli-Zellzahlen nach GnRH-Suppression vorhanden. Dies könnte möglicherweise an dem Speziesunterschied, aber auch an dem Alter bei GnRH-Suppression liegen. Rottner und Claus (2009) konnten keine Proliferation in Sertoli-Zellen von mit Improvac® geimpften Schweinen feststellen. Das könnte jedoch darauf zurückzuführen sein, dass sie das Keimepithel erst nach erneuter Testosteronbildung untersuchten.

Dies kann auch in den Untersuchungen der vorliegenden Studie gesehen werden. Tiere der Gruppe 5b wurden 21 Wochen nach der zweiten Vakzination (V₂) geschlachtet. Fünf von sieben Tieren hatten zu diesem Zeitpunkt sehr hohe Testosteronwerte von teilweise mehr als 15 ng/ml, ein intaktes Hodenepithel mit hohen Mitoseraten und Sertoli-Zellen ohne positive Nachweise für Mitose-Aktivität.

Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass bei den Tieren der Gruppe 5b voll differenzierte und mature Sertoli- sowie Keimzellen in den Tubuli seminiferi contorti vorkommen und wieder eine intakte Spermatogenese vorhanden ist. Diese kann zum Teil die der Eber überschreiten.

Zusätzlich wurde ein Marker verwendet, der die oxidative Schädigung der DNS nachweisen sollte. Während oxidativer Stoffwechselfvorgänge im Zellorganismus, zum Beispiel in den Mitochondrien, bei Phagozytose von Makrophagen, bei der Oxidation von Aminosäuren aber auch von Fettsäuren sowie durch exogene Faktoren wie die UV-Strahlung, werden Sauerstoffradikale freigesetzt (Wagner und Jahreis, 2000; Dizdaroglu und Jaruga, 2012).

Dazu gehören unter anderem Superoxidanionen, Hydroxylradikale und Sauerstoff (Wagner und Jahreis, 2000; Dizdaroglu und Jaruga, 2012). 8-Hydroxyguanin (8-OHG) ist ein Reaktionsprodukt der DNS, welches entsteht, wenn freie Radikale eine Schädigung der DNS durch Hydroxylierung auf Grund des niedrigen Reduktionspotentials an der Guanin-Base des C8 bewirken (Floyd et al., 1986; Cheng et al., 1992; Dizdaroglu und Jaruga, 2012). Die Folge der Basenschädigung kann die induzierte Apoptose (Cheng et al., 1992), bei fehlender Reparatur jedoch auch Kanzerogenität sein.

In Hoden von Ratten konnte gezeigt werden, dass bei der Hodenpathologie der Varikozele oxidativer Stress die Ursache einer gestörten Spermatogenese und damit auch von Infertilität ist (Ishikawa et al., 2007). Im Vergleich zu Kontrollgruppen kann in Rattenhoden mit Varikozele 8-OHG biochemisch in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden. (Tuğcu et al., 2010).

Bei den Untersuchungen dieser Dissertation weisen alle Keimzellen – bis auf elongierte Spermatiden – einzelne Sertoli-, aber auch Leydig-Zellen positive Reaktionen für den Antikörper gegen 8-OHG auf. Visuell scheinen jedoch die Spermatogonien und vor allem die Spermatozyten eine höhere Anzahl 8-OHG-stark-positiver-Reaktionen im Zellkern aber auch im Zytoplasma zu besitzen. Dies deckt sich mit anderen Studien, in welchen auch für Spermatogonien, vor allem jedoch für Spermatozyten positive oxidative Stressreaktionen mit Hilfe von immunhistochemischen Reaktionen beschrieben wurden. Dies soll in Zusammenhang mit Apoptose stehen (Ishikawa et al., 2007; Yoon, 2013).

In der vorliegenden Studie zeigen auch die veränderten großen Spermatogonien und Spermatozyten immer wieder Anzeichen von oxidativem Stress. Subjektiv gesehen scheint auch hier die Anzahl an 8-OHG-positiven Spermatozyten – wenn diese vorkommen – höher im Vergleich zu den restlichen Zellen zu sein.

Bei den vakzinierten Tieren dieser Untersuchung scheint es mehr oxidative Stressreaktionen als bei den intakten Ebern zu geben. Da bei einem Großteil der vakzinierten Tiere jedoch auch starke Keimzellverluste vorkommen und es auch Tubuli mit nur sehr wenigen Keimzellen im Vergleich zu den intakten Ebern gibt, ist die Häufigkeit der oxidativen Stressreaktionen nur subjektiv zu beurteilen.

Neben der Vermutung, dass die Vakzination mit Improvac® auf Grund der runden/ovalen Struktur des Sertoli-Zellkerns und der großen Spermatogonien eine Fehldifferenzierung oder eine De-Differenzierung im Hodenepithel verursachen könnte, scheint auch oxidativer Stress mit einer möglichen Apoptose eine Auswirkung der Vakzination auf das Hodenepithel zu sein. Apoptotische Zellen äußern sich durch eine Schrumpfung des Zellkerns sowie durch eine Kondensation des Chromatins und des Zytoplasmas (Kerr et al., 1972; Majno und Joris, 1995). Da die spontane Apoptose auch bei einer physiologisch ablaufenden Spermatogenese sowohl Spermatogonien, Spermatozyten als auch Spermatischen betrifft, wäre der Zelltod nach GnRH-Vakzination wahrscheinlich (Blanco-Rodríguez und Martínez-García, 1996; Print und Loveland, 2000). In dieser Studie liefert die immunhistochemische Untersuchung mit 8-OHG Hinweise dafür, dass die GnRH-Vakzination zumindest Stress auf Zellebene des Hodenparenchyms verursacht.

In Studien mit Ratten und Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass eine GnRH-Suppression oder eine Unterdrückung von LH sowie FSH eine erhöhte Apoptose im Hoden zur Folge hat (Marathe et al., 1995; Shetty et al., 1996; Hikim et al., 1998; Pareek et al., 2007). Ebenso konnten Wagner et al. (2006) erhöhte Reaktionen mit dem Antikörper gegen TUNEL, welcher zum Nachweis von Apoptose verwendet wird, im Hoden von mit Improvac® vakzinierten Schweinen nachweisen. Für eine genaue Bestimmung der Apoptoserate im Hodenepithel nach Vakzination mit Improvac® sollten in weiteren Studien immunhistochemische Untersuchungen mit dem Antikörper gegen TUNEL erfolgen.

Eine weitere Fragestellung dieser Untersuchung war, welche Auswirkungen die Vakzination mit Improvac® auf die Tight- und Gap-junction-Komponenten der Blut-Hoden-Schranke sowie die Hormonrezeptoren haben. Dies wird im Folgenden anhand der immunhistochemischen Untersuchungen diskutiert.

Claudin-3, ein Tight-junction-Protein zwischen benachbarten Sertoli-Zellen, spielt eine Rolle bei der Regulierung von jungen Spermatozyten, welche die Blut-Hoden-Schranke passieren (Chihara et al., 2013).

Die aktuelle Studie liefert Hinweise darauf, dass das Claudin-3-Protein auch beim Eber eine essentielle Funktion bei der Entwicklung einer Blut-Hoden-Schranke besitzt.

Während Chihara et al. (2013) einen stadienspezifischen positiven Nachweis für Claudin-3 auf der Ebene der Blut-Hoden-Schranke, in präleptotänen-, leptotänen Spermatozyten sowie in Sertoli-Zellen bei Mäusen hatten, weisen die intakten Eber in dieser Studie einen positiven Nachweis für Claudin-3 in Leydig-Zellen, allen Keimzelltypen und Sertoli-Zellen auf. Eine stadienspezifische Korrelation zwischen dem Reaktionsmuster von Claudin-3 bei intakten Ebern lässt sich ebenso vermuten. So kann Claudin-3 dorsal von Spermatogonien und jungen Spermatozyten in einer horizontalen „band“- oder auch „gürtelartigen“ Formation nachgewiesen werden.

Das steht zum Teil im Widerspruch zu Studien an Mäusen (Meng et al., 2005; Komljenovic et al., 2009). In den Studien der Autoren wird das Claudin-3-Protein nur in frühen Stadien des Zellzyklus luminal von Spermatogonien und jungen Spermatozyten nachgewiesen. Später lässt es sich nur apikal oder gar nicht mehr anreichern (Meng et al., 2005; Komljenovic et al., 2009).

Dies ist insofern übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Dissertation, als dass sich Claudin-3 häufig sehr stark in reiferen Spermatozyten und Spermatischen anreichert, jedoch nicht immer in einer horizontalen Linie, die Spermatogonien und jungen Spermatozyten umgebend. Oft sind auch die jungen Spermatozyten Claudin-3-negativ, während ältere Spermatozyten-Stadien und runde Spermatischen vor allem im adluminalen Kompartiment positiv sind.

Das lässt vermuten, dass das Claudin-3-Protein auch beim Schwein ein wichtiger Faktor für die Keimzellwanderung vom basalen zum adluminalen Kompartiment ist und es unter Umständen auch beim Schwein ein intermediäres Kompartiment gibt, wie es von Komljenovic et al. (2009) beschrieben wird.

Ein weiteres Merkmal hierfür ist, dass vakzinierter Eber oft nur irregulär verzweigte Claudin-3-positive Reaktionen zeigen, die vom Sertoli-Zellkern in Richtung Lumen reichen. Claudin-3-positive „band“- oder „gürtelartige“ Reaktionen dorsal von Spermatogonien lassen sich bei den vakzinierten Tieren nur geringfügig an lokalen Stellen oder meist gar nicht nachweisen. Dies liefert Hinweise auf eine dysfunktionale Blut-Hoden-Schranke nach Vakzination mit Improvac®.

Ursache hierfür könnte vor allem ein Fehlen von notwendigen Androgenen für die Claudin-3-Aktivität sein (McCabe et al., 2012). Auf der anderen Seite ist Claudin-3 bei vakzinierten Tieren im Bereich lateral der Sertoli-Zellkerne sowie hin und wieder fokal als „bandartige“ Struktur dorsal von Spermatogonien nachweisbar – selbst wenn keine Testosteronaktivität vorhanden ist. Da sich die Blut-Hoden-Schranke erst mit Einsetzen der Meiose oder bei Vorhandensein der Spermatozyten bildet (Morales et al., 2007; Li et al., 2018), könnte eine fehlende Meiose oder niedrige Spermatozyten-Zahlen ein zusätzlicher Grund für eine nicht funktionsfähige Blut-Hoden-Schranke sein. Da es bisher keine bekannten Studien gibt, die belegen, dass das Claudin-3-Protein bei mit Improvac® vakzinierten Tieren nachzuweisen ist, gibt es noch keine Daten zum Vergleich dieser Ergebnisse. Diese müssen erst in weiteren Untersuchungen erbracht werden.

Ein weiteres Protein, das in dieser Studie untersucht wurde, ist das Occludin. Es ist im Hoden Bestandteil der Tight-junction-Komplexe und bildet in Epithelien und Endothelien eine dichte Barriere (Furuse et al., 1994; Furuse et al., 1998). Auch wenn die Funktion des Occludins noch nicht vollkommen geklärt ist, so soll dieses im Hoden eine Rolle für die Funktion einer intakten Blut-Hoden-Schranke insbesondere mit Hinblick auf die Permeabilität und Integrität spielen (McCarthy et al., 1996; Saitou et al., 2000; Chung und Cheng, 2001).

Das Occludin-Protein kann in dieser Studie bei intakten Ebern der Gruppe 1 im Zytoplasma von Sertoli-Zellen, vor allem in Spermatogonien (Nukleus und Zytoplasma) sowie vereinzelt in Spermatozyten und im akrosomalen Vesikel von Spermatischen sowie im Spermatischenkopf gefunden werden. Da es auch eine positive

Reaktion im Sertoli-Zellzytoplasma sowie einen stark-positiven Nachweis in den Spermatogonien und Spermatozyten vakzinierter Tiere besitzt, liefert dies Hinweise dafür, dass das Occludin-Protein trotz GnRH-Suppression vorhanden ist.

Ob die Funktion des Occludins als Tight-junction-Protein der Blut-Hoden-Schranke jedoch eingeschränkt oder gar gestört ist, kann nicht nachgewiesen werden. Bei den vakzinierten Tieren ist im Vergleich zu den intakten Ebern ein stärkerer Nachweis für Occludin in den großen Spermatozyten (Nukleus und Zytoplasma) und den großen Spermatogonien auffällig.

Da die Vakzination einen milden bis starken Keimzellverlust verursacht, sind die Spermatozyten häufig die differenziertesten Zellen. Unter Umständen könnte dies an der fehlenden Testosteroneinwirkung auf die Sertoli- und Keimzellen liegen, welche notwendig ist, um ein Keimepithel mit elongierten Spermatischen zu erhalten.

Das Occludin-Protein soll eine androgenabhängige Komponente besitzen, welche für eine intakte Blut-Hoden-Schranke notwendig ist (Chung und Cheng, 2001; Tu'uhevaha et al., 2007). So konnte mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesen werden, dass Occludin, neben Claudin-11, bei einem Fehlen des Androgen-Rezeptors down reguliert wird (Wang, R.-S. et al., 2006). Zusätzlich ist für das Occludin-Protein eine testosteronabhängige Anlagerung an die Zelloberfläche von Sertoli-Zellen beschrieben sowie bei Abwesenheit eine Verlagerung des Occludin-Proteins in das Zytosol (Yan et al., 2008).

In anderen Studien kann Occludin immunhistochemisch und mit Hilfe der RT-PCR nur in Sertoli-Zellen nachgewiesen werden (Wong et al., 2004; Zhang et al., 2018). Eine „gürtelartige“ Anlagerung des Occludins auf Höhe der Blut-Hoden-Schranke, wie sie von Wong et al. (2004) beschrieben wurde, konnte in dieser Dissertation weder im Keimepithel intakter noch vakzinierten Eber erkannt werden.

Eine strangartige Anlagerung des Occludin-Proteins zwischen Sertoli-Zellen wird von Zhang et al. (2018) bei Schweinen beschrieben.

Dies kann auch bei einem Tier aus Gruppe 5b nachvollzogen werden. Hier sind zwischen angrenzenden Sertoli-Zellen starke Occludin-Reaktionen vorhanden, welche „straßenartig“ vom Sertoli-Zellkern zu elongierenden Spermatischen reichen.

Es sollte jedoch auch erwähnt werden, dass in den immunhistochemischen Untersuchungen von Hejmej et al. (2012) keine aussagekräftigen Ergebnisse bezüglich der Untersuchungen des Occludin-Proteins im Schweinehoden erzielt werden konnten.

Auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung ist anzunehmen, dass Occludin im Schweinehoden sowohl bei den vakzinierten als auch bei den intakten Ebern vorhanden ist. Auch hier könnte Occludin auf Grund des Expressionsmusters in den Keimzellen eine androgenabhängige Komponente in Bezug auf die Funktion der Blut-Hoden-Schranke einnehmen. Aber auch für die intakte Spermatogenese.

Da Occludin deutlich- bis stark-positiv im Zytoplasma und im Nukleus von Spermatogonien und auch in Spermatischen zu finden ist, könnte für das Occludin des Schweines eine testosteronabhängige Funktion bei der Proliferation und Reifung der Keimzellen angenommen werden.

Ob das Occludin-Protein beim Schwein wichtig für den Erhalt einer intakten Spermatogenese oder das Aufrechterhalten der Blut-Hoden-Schranke ist, kann an dieser Stelle nicht gesagt werden. Denn das Occludin-Protein kann beim Menschen und beim Meerschwein nicht im Hoden nachgewiesen werden, ein Occludin-Knockout im Mausmodell bewirkt jedoch einen Arrest der Spermatogenese (Moroi et al., 1998; Saitou et al., 2000).

Connexin-43, ein Gap-junction-Protein, wird bei Hunden in Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen, Spermatogonien und Spermatozyten exprimiert und gilt als Differenzierungsfaktor für Sertoli-Zellen, da es mit dem Beginn der Spermatogenese und mit dem Auftreten einer funktionellen Blut-Hoden-Schranke erscheint (Rüttinger, 2008). Es ist ein wichtiges Protein für die Regulation einer funktionierenden Spermatogenese (Batias et al., 1999; Brehm et al., 2007; Kidder und Cyr, 2016).

In dieser Studie kann das Gap-junction-Protein Connexin-43 bei intakten Ebern in angrenzenden Leydig-Zellen, dort an der Kernmembran und im Zytoplasma, nachgewiesen werden. Ebenso zeigt der Antikörper gegen Connexin-43 eine positive Reaktion im Sertoli-Zellzytoplasma. Dorsal, teilweise auch lateral der Spermatogonien und jungen Spermatozyten, wird das Connexin-43-Protein horizontal „band“- oder auch „gürtelartig“ nachgewiesen.

Ähnliche Befunde wurden in anderen Studien erhoben, die im Folgenden aufgeführt werden (Pelletier, 1995; Steger, Klaus et al., 1999; Kopera et al., 2010). In den Hoden von adulten Männern kann das Connexin-43-Protein durch Immunhistochemie- und Western-Blot-Analysen in angrenzenden Sertoli-Zellen sowie apikal von Spermatogonien und basal von primären Spermatozyten nachgewiesen werden. Ebenso ist es fokal oder auch linear an der Zellmembran benachbarter Leydig-Zellen zu finden (Steger, Klaus et al., 1999). Beim Nerz lässt sich das Connexin-43 immunhistochemisch ebenfalls an angrenzenden Leydig-Zellen finden.

Stadienabhängig kann dort Claudin-3 sowohl basal als auch luminal von Spermatogonien und jungen Spermatozyten in einer bandartigen Struktur nachgewiesen werden (Pelletier, 1995). Risley et al. (1992) beschreibt zusätzlich eine Immunreaktion des Connexin-43-Proteins im Zytoplasma von Spermatogonien und Spermatozyten.

Kopera et al. (2010) untersuchten das Keimepithel von präpubertären Ebern. Dort konnte das Connexin-43 Protein an der Zellmembran angrenzender Leydig-Zellen, allerdings nur fokal zwischen angrenzenden Sertoli- und auch Keimzellen, nachgewiesen werden. Eine Reaktion auf Höhe der Blut-Hoden-Schranke dorsal von Spermatogonien konnte nicht nachgewiesen werden (Kopera et al., 2010). Die unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf den Nachweis des Connexin-43-Proteins auf Höhe der Blut-Hoden-Schranke in der Studie von Kopera et al. (2010) und luminal von Spermatogonien sowie jungen Spermatozyten in dieser Dissertation könnten auf das unterschiedliche Alter der Schweine zurückzuführen sein. In den vorliegenden Untersuchungen wurden die intakten Eber in einem Alter geschlachtet, in dem bereits die Pubertät eingetreten und damit das Ausbilden einer Blut-Hoden-Schranke stattgefunden haben sollte (França et al., 2000; McCabe et al., 2012).

Dagegen untersuchten Kopera et al. (2010) die Hoden präpubertärer Tiere. Eine Blut-Hoden-Schranke bildet sich jedoch erst mit Eintritt in die Pubertät und dem Vorhandensein von Spermatozyten (McCabe et al., 2012; Li et al., 2018).

Ebenso soll das Connexin-43-Protein erst mit Beginn der Spermatogenese eine Funktion ausüben, hier vor allem bei der Migration der Spermatozyten vom basalen in das adluminal Kompartiment, so dass eine positive Connexin-43-Reaktion

dorsal der Spermatogonien unwahrscheinlich sein könnte (Pelletier, 1995).

Auch in den Hoden präpubertärer Hunde zeigt Connexin-43 eine positive Reaktion in angrenzenden Leydig-Zellen, jedoch gar nicht oder nur wenig in den Tubuli seminiferi contorti (Rüttinger, 2008).

Die vakzinierten Tiere aus der vorliegenden Untersuchung besitzen im Gegensatz zu den intakten Ebern stark verzweigte positive Zytoplasmareaktionen. Sie reichen vom baso-lateralen Aspekt des Sertoli-Zellkerns unregelmäßig in Richtung Lumen.

Diese morphologische Veränderung kann auch bei Ebern gesehen werden, welche mit Flutamid, einem anti-androgenen Mittel, behandelt wurden (Kopera et al., 2010). Die Autoren beschreiben, dass Tiere, denen Flutamid verabreicht wurde, eine deutliche lineare Connexin-43-Reaktion zwischen angrenzenden Sertoli-Zellen, aber auch zwischen Sertoli- und Keimzellen aufweisen (Kopera et al., 2010).

Wenn man die histologischen Abbildungen von Kopera et al. (2010) und den vakzinierten Tieren der vorliegenden Dissertation vergleicht, so sehen die immunhistochemischen Reaktionen mit dem Antikörper gegen Connexin-43, bezogen auf die Tubuli und die interstitielle Bereich, sehr ähnlich aus. In den eigenen Untersuchungen haben die intakten Eber der Gruppe 1 außerdem eine Connexin-43-positive Immunreaktion zwischen benachbarten Leydig-Zellen. Bei vakzinierten Ebern sind diese vermindert. Dort besitzt die Zellmembran keine linearen Nachweise an der Leydig-Zellmembran, sondern häufig schwächere Nachweise oder nur fokale Reaktionen.

Eine Applikation eines GnRH-Implantats (Gonazon®) führt bei Hunden in der Studie von Röhrs (2013) zu einer Anreicherung von Connexin-43 im adluminalen Tubulus-Kompartiment. Die Autoren vermuten hierbei eine GnRH-abhängige Funktionsstörung der Blut-Hoden-Schranke (Röhrs, 2013).

Nach der Evaluation der histologischen Schnitte, mit dem Ergebnis veränderter Nachweise des Connexin-43 Proteins an den Leydig-Zellen vakzinierter Eber, der Gruppen 2 bis 5a sowie unregelmäßige Zytoplasmareaktionen, welche von den Sertoli-Zellen irregulär in Richtung Lumen weisen, kann vermutet werden, dass eine Vakzination mit Improvac® eine Funktionsstörung an der Blut-Hoden-Schranke verursacht. Ebenso könnten die Befunde auf eine Störung zwischen den

Connexin-43-Gap-junctions und damit auf die Zellkommunikation zwischen Leydig-Zellen, aber auch zwischen den Sertoli- und Keimzellen hinweisen.

In der Studie von Cavicchia et al. (1996) konnte mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass bei Vorhandensein von Keimzellen bis hin zu Spermatozyten Inter-Sertoli-Zellverbindungen und eine Blut-Hoden-Schranke bestehen, auch wenn die Keimzellen Anzeichen von Degeneration besitzen.

Die Autoren zeigen jedoch auch, dass das Reifestadium der Sertoli-Zellen einen wichtigen Einfluss auf die Blut-Hoden-Schranke hat, da die Permeabilität der Blut-Hoden-Schranke bei mangelnder Differenzierung der Sertoli-Zellen gestört ist. Dies ist auch an der Anordnung der Tight-junction-Proteine zu erkennen, welche anstatt einer zur Basalmembran parallelen Ausrichtung eine perpendikuläre Ausrichtung zeigen (Cavicchia et al., 1996). Wichtig ist hierbei jedoch, dass auch bei den Keimzellen ein Arrest der Meiose-Aktivität erkennbar ist und unklar ist, ob die eingeschränkte Funktion der Blut-Hoden-Schranke auf die reduzierte Keimzell- oder Sertoli-Zell-Differenzierung zurückzuführen ist (Cavicchia et al., 1996). Diese Beobachtung passt zu den Ergebnissen der aktuellen Untersuchungen.

Bei den vakzinierten Tieren der Gruppen 2 bis 5a kann sowohl das Claudin-3- als auch das Connexin-43-Protein trotz eines Verlusts von Keimzellen nachgewiesen werden. Jedoch zeigen diese oft eine irreguläre Anordnung rund um Sertoli-Zellkerne in Richtung Lumen. Auch die Sertoli-Zellen weisen, wie bereits oben erwähnt, morphologische und somit vermutlich auch funktionelle Veränderungen auf.

In der Studie von Brehm et al. (2007) konnte ein spezifischer Knockout des Connexin-43-Proteins an Sertoli-Zellen von Mäusen einen Arrest der Spermatogenese auf Höhe der Spermatogonien hervorrufen. Zusätzlich wird eine Proliferation von immaturren Sertoli-Zellen beschrieben. Sie stellen die Vermutung an, dass Connexin-43 in Sertoli-Zellen essentiell für die Initiation der Spermatogenese ist, ebenso soll es essentiell für die Mitose-Aktivität der Keimzellen und für die Proliferation und Reifung von Sertoli-Zellen sein (Brehm et al., 2007).

Um weitere Aufschlüsse bezüglich der hormonellen Regulation bei intakten Ebern und den vakzinierten Tieren zu erhalten, wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper die Rezeptoren für FSH, Estrogen α und β , Androgen sowie das Hormon Testosteron immunhistochemisch in den Hoden der Eber untersucht.

Testosteron wird in den Leydig-Zellen des Hodens synthetisiert und bindet an den Androgen-Rezeptor, der in Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen und peritubulären Zellen zu finden ist (Vornberger et al., 1994). Einige Autoren diskutieren, dass der Androgen-Rezeptor auch in männlichen Keimzellen, insbesondere in Gonozyten und Spermatogonien der Tubuli zu finden ist (Zhou et al., 1996; Merlet et al., 2007).

Andere Autoren beschreiben, dass der Androgen-Rezeptor auch in den weiter differenzierten Keimzellstadien wie den elongierten Spermatiden zu finden ist (Wright und Frankel, 1980; Vornberger et al., 1994).

In dieser Untersuchung kann Testosteron bei den intakten Ebern im Zytoplasma der Leydig-Zellen und fokal im Zytoplasma der Sertoli-Zellen mit einem homogenen Reaktionsnachweis, aber auch in Form von positiven kleinen Granula nachgewiesen werden. Spermatogonien und einzelne Spermatozyten zeigen vereinzelt ein Testosteron-positives Reaktionsmuster im Zytoplasma. Vakzinierte Tiere zeigen ähnliche Nachweise für den Antikörper gegen Testosteron wie intakte Eber.

Im Vergleich dazu kann der Androgen-Rezeptor, an den Testosteron bindet, bei den vakzinierten Tieren dieser Untersuchung ebenfalls in Sertoli- und Leydig-Zellen als auch in einzelnen Spermatogonien und Spermatozyten gefunden werden. Die runden Spermatiden sind meist negativ bis schwach-positiv für den Androgen-Rezeptor.

Im Gegensatz zu intakten Ebern besitzen vakzinierte Tiere ein stärkeres Reaktionsmuster für den Antikörper gegen den Androgen-Rezeptor in Sertoli- und Keimzellen.

Der Androgen-Rezeptor und Testosteron zeigen zum größten Teil in den gleichen Zelllinien positive Reaktionen. Diese Befunde lassen die Vermutung zu, dass der Androgen-Rezeptor und somit die Wirkung von Testosteron auch in den Keimzellen von Ebern eine wichtige Rolle spielen könnte.

In der Studie von Zhu et al. (2000) zeigen Ratten, die mit einem LHRH, Luteinisierendes Hormon Releasing Hormon-Antagonisten behandelt wurden, einen Rückgang der Testosteron- und LH-Synthese, zudem nimmt die Androgen-Rezeptor-Expression in Sertoli-, Leydig- und Myoidzellen ab. Mit der Applikation von Androgen steigt die Androgen-Rezeptor-Expression in Sertoli-Zellen wieder an.

Bei Tieren der Gruppe 5b dieser Arbeit war der Nachweis für den Antikörper gegen den Androgen-Rezeptor im Vergleich zu intakten Ebern stärker und deckt sich mit den Ergebnissen der Studie von Zhu et al. (2000). Geimpfte Tiere der vorliegenden Untersuchung zeigen stärkere Nachweise des Androgen-Rezeptors in Sertoli- und Keimzellen als die intakten Eber.

Eine erhöhte Androgen-Expression bei mit Improvac® vakzinierten Ebern wird auch von Srisuwatanasagul et al. (2018) beschrieben, hier jedoch vor allem in den Sertoli-Zellen. In einer weiteren Studie von Wicks et al. (2013) konnte der Androgen-Rezeptor bei Schweinen, die mit Improvac® behandelt wurden, nur in Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen, jedoch nicht in Keimzellen nachgewiesen werden. Sie vermuten, dass der Androgen-Rezeptor auch bei sehr niedrigen Testosteronwerten anwesend ist und somit bei einem Anstieg der Testosteronwerte eine schnelle Regeneration des Keimepithels möglich ist (Wicks et al., 2013).

Auch in hypogonadalen Hoden von Hunden konnte der AR nur in den Sertoli- nicht jedoch in den Keimzellen gefunden werden (Prapaiwan et al., 2017).

Eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Expression des Androgen-Rezeptors bei den vakzinierten Tieren der vorliegenden Arbeit könnte die fehlende oder verminderte Einwirkung des Testosterons auf den Androgen Rezeptor sein.

Der positive Nachweis von Testosteron in den Sertoli-Zellen vakzinierter Tiere ist in Form von kleinen bis großen „blasenähnlichen“ Strukturen zu erkennen. Dies ist bei den intakten Ebern nicht der Fall. Eine Ursache dafür könnte sein, dass Testosteron nicht an den elongierenden Spermatiden wirken kann. Diese fehlen bei den Kastraten meistens.

Möglicherweise akkumulieren die Testosteron-Granula somit im Sertoli-Zellzytoplasma als Lipidtröpfchen oder werden durch Lysosomen phagozytiert (Chemes, 1986; Wang, H. et al., 2006), was in Form der

Testosteron-positiven „blasenähnlichen“ Strukturen zu sehen ist. Dies geschieht möglicherweise auf Grund der fehlenden GnRH-Aktivität, so dass Testosteron in zu geringen Mengen vorhanden ist oder weil es durch die Vakzination auch zu einem Verlust der Keimzellen, wie den runden und elongierten Spermatozoen kommt (O' Donnell et al., 1996).

Vergleicht man die intakten Eber mit den vakzinierten Ebern dieser Dissertation, kann ein direkter und auch zum größten Teil ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der Testosteronwerte und der morphologischen Kriterien des Hodens dargestellt werden. Bis auf zwei Tiere der Gruppe 2 (4,19 ng/ml und 0,14 ng/ml) sowie ein Tier aus Gruppe 4 (0,48 ng/ml) haben alle vakzinierten Tiere der Gruppe 2 bis 4, 0 ng/ml Testosteron im Blutplasma. Rottner (2012) beschreibt in ihrer Dissertation einen Grenzwert von $> 0,5$ ng/ml Testosteron im Blutplasma für die Wiederaufnahme der Hodenfunktion.

Der intakte Eber der vorliegenden Untersuchung, mit den niedrigsten Testosteronwerten besitzt 4,03 ng/ml Testosteron im Blutplasma. Mit 4,19 ng/ml Testosteron im Blutplasma übersteigt das eine Tier aus Gruppe 2 damit sogar den Wert des vorher genannten intakten Ebers. Verwendet man den Grenzwert von Rottner (2012), so wurde bei den vakzinierten Tieren der Gruppe 2 bis 4 mit Werten über 0 ng/ml, jedoch unter 0,5 ng/ml noch keine Testosteronaktivität aufgenommen. Bei dem Tier mit 4,19 ng/ml Testosteron im Blutplasma ist davon auszugehen, dass es eine Spermatogenese ähnlich der intakten Eber besitzt.

Dies bestätigt sich auch anhand der histologischen Ergebnisse. In dieser Arbeit wurde ein Grenzwert von 3 ng/ml Testosteron im Blutplasma festgelegt. Vakzinierte Tiere der Gruppen 2 bis 5a, die diesen Wert unterschreiten, zeigen im Vergleich zu den intakten Ebern in der Regel signifikant kleinere Tubuli seminiferi contorti ($p = 0,047$), niedrigere Mitoseraten in den Tubuli seminiferi contorti ($p = 0,021$), eine erhöhte Sertoli-Zellzahl ($p = 0,032$) sowie große Spermatozoen ($p = 0,004$) und Leydig-Zellen mit pyknotischen Zellkernen.

Tiere, welche Testosteronwerte über 3 ng/ml besitzen, zeigen meist große Tubuli seminiferi contorti, erhöhte Mitoseraten, mehr Keimepithel, kleine Spermatozoen, niedrigere Sertoli-Zellzahlen und polygonale Leydig-Zellkerne. Anhand der Ergebnisse kann vermutet werden, dass Testosteronwerte von 3 ng/ml ausreichend sind, um eine intakte Spermatogenese mit Keimzellproliferation bis hin

zu elongierten Spermatiden und morphologisch physiologisch erscheinenden Sertoli-Zellen sowie Spermatogonien zu erhalten.

Dies wurde auch von anderen Autoren bestätigt, in deren Studien 25% der ursprünglichen Testosteronwerte bei Ratten sowie 50% bei Affen nach einer Hypophysektomie ausreichten, um eine Spermatogenese zu initiieren oder auch aufrecht zu halten (Marshall et al., 1986; Huang et al., 2012).

Die vakzinierten Tiere der Gruppe 5a besitzen wie auch die vakzinierten Eber der Gruppe 2 bis 4 kleine Tubuli seminiferi contorti mit einem milden bis starken Keimzellverlust, verringerte Mitoseraten und kleine runde/ovale Sertoli-Zellkerne mit dazwischenliegenden großen runden Spermatogonien. Auch die Leydig-Zellen können pyknotische Zellkerne mit keinem erkennbaren oder wenig Zytoplasma besitzen. Die vakzinierten Tiere der Gruppe 5b besitzen große Tubuli seminiferi contorti mit hohen Mitoseraten sowie einem stark ausgeprägtem Keimepithel und viele Gruppen an Leydig-Zellen mit polygonalem Zellkern und viel Zytoplasma. Interessant ist, dass zwei vakzinierte Tiere der Gruppe 5 zum Teil gar keinen Nachweis des Antikörpers gegen Testosteron in den Tubuli oder nur zu einem sehr geringen Teil in den Leydig-Zellen besitzen. Da bei diesen Tieren der Zeitraum zwischen Schlachtung und V_2 21 Wochen betrug, ist es möglich, dass die Testosteronreserven im Keimepithel und den Leydig-Zellen aufgebraucht wurden und Testosteron deshalb nicht im Hoden nachweisbar ist.

Dies widerspricht zum Teil den Blutplasmauntersuchungen. In den Blutplasma-Testosteronwerten besitzt das Tier aus Gruppe 5a mit ähnlicher Hodenmorphologie wie die vakzinierten Tiere aus Gruppe 2 bis 4, 1,91 ng/ml Testosteron. Das andere Tier der Gruppe 5b zeigt Testosteronwerte von 18,19 ng/ml. Ein weiteres Tier aus Gruppe 5, welches jedoch nicht mit dem Antikörper gegen Testosteron untersucht wurde, besitzt sogar 20,26 ng/ml Testosteron im Blutplasma. Damit haben die letztgenannten vakzinierten Tiere zum Teil deutlich höhere Testosteronwerte im Vergleich zu den intakten Ebern. Die intakten Eber dieser Untersuchung weisen einen Medianwert von 7,92 ng/ml Testosteron im Blutplasma mit maximalen Werten von 9,15 ng/ml auf.

Bonneau et al. (1987) beschreiben sinkende Testosteronkonzentrationen für Eber im Alter von 100 Tagen mit durchschnittlich 8,8 ng/ml auf durchschnittliche 4,5 ng/ml in einem Alter von 150 Tagen. Claus et al. (1983) liefern in ihrer Studie

Testosteronwerte von durchschnittlich 2,15 ng/ml bis maximal 11,50 ng/ml im Blutplasma von ca. 18 Monate alten männlichen Schweinen. Sie postulieren jedoch, dass die Höhe der Testosteronwerte nicht nur vom Alter, sondern auch von äußeren Faktoren abhängig ist.

Verwendet man den Testosteron-Grenzwert von 0,5 ng/ml aus der Studie von Rottner (2012), ist davon auszugehen, dass das Tier dieser Studie mit 1,91 ng/ml Testosteron im Blutplasma eine beginnende Testosteronaktivität mit einer Wiederaufnahme der Spermatogenese besitzt, auch wenn dies noch nicht im Keimepithel erkennbar ist. In der Studie von Rottner (2012) nehmen mit Improvac® vakzinierte Tiere die Testosteronsynthese zwischen 10 und 25 Wochen nach der Zweitvakzination (V_2) auf. Die Eber überschritten zum Teil die zu Beginn der Zweitvakzination gemessenen Testosteronwerte mit 15 ng/ml 181 Tage nach V_2 (Rottner, 2012). In Kombination der teilweise sehr hohen Testosteronwerte mit den Hodengewichten postulierten Rottner und Claus (2009) den so genannten Rebound-Effekt.

Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Tiere der Gruppe 5b in der vorliegenden Studie. Sie weisen Hoden mit größeren Tubuli seminiferi contorti ($p = 0,049$), mehr geordnete Keimzellreihen ($p = 0,010$) und höhere Testosteronkonzentrationen als intakte Eber auf.

Die durchschnittliche Anzahl der Sertoli-Zellen entspricht in etwa denen der intakten Eber. Im Vergleich zu den intakten Ebern sind bei Tieren der Gruppe 5b zu 61,8 % wieder vermehrt kleine runde/ovale Spermatogonien sowie zu 77,6% Leydig-Zellen mit polygonalem Zellkern und zu 7,1% viel Zytoplasma erkennbar.

Ein Zusammenhang zwischen der Wirkung von Testosteron und FSH, wie er von O' Donnell et al. (1996) sowie Singh und Handelsman (1996) beschrieben wird, kann anhand der Ergebnisse dieser Studie ebenfalls vermutet werden. Laut den oben genannten Autoren führt ein Fehlen von Testosteron zu einem Arrest der Spermatogenese auf Höhe der runden Spermatiden (Kumar, 2007). Auch eine alleinige Gabe von FSH bewirkt eine Sertoli- und Keimzell-Proliferation sowie Reifung bis hin zu runden Spermatiden (Haywood et al., 2003). Erst die Zugabe von Testosteron führt zu einer Ausbildung von elongierten Spermatiden (Singh und Handelsman, 1996).

In dieser Studie kann dieses Phänomen sehr gut anhand der untersuchten Antikörper gesehen werden. Eine positive Immunreaktion für den Antikörper gegen den FSH-Rezeptor ist in Sertoli-Zellen und allen Keimzellen außer den elongierten Spermatisden zu finden. Testosteron kann in den Leydig-Zellen, in den Sertoli-Zellen und vor allem in Spermato gonien und Spermatozyten gefunden werden. Jedoch sind hier vor allem die Testosteron-positiven Granula auffällig. Diese reichen bei den intakten Ebern vom Sertoli-Zellkern bis hin zu den elongierten Spermatisden und sind in das Sertoli-Zellzytoplasma eingebettet. Das lässt vermuten, dass Testosteron eine wichtige Rolle für elongierende Spermatisden besitzt.

Baccetti et al. (1998) wiesen die mRNA des FSH-Rezeptors mit Hilfe von in-situ-Hybridisierung im Zytoplasma von Sertoli-, aber auch Keimzellen nach. Dies deutet auf eine wichtige Rolle von FSH auch in den Keimzellen hin.

Auch bei Tieren in dieser Arbeit ist der FSH-Rezeptor mit Hilfe von immunhistochemischen Untersuchungen in allen Keimzellen mit Ausnahme von elongierten Spermatisden zu finden. Besonders deutlich jedoch in Spermato gonien und Spermatozyten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass FSH nicht nur eine Wirkung auf die Sertoli-Zellen in Bezug auf die Proliferation und Reifung hat, sondern auch auf die Keimzellen.

Im Speziellen mit einer Wirkung auf die Proliferation und Reifung der Spermato gonien und Spermatozyten, aber auch auf die restlichen Keimzellen bis hin zu runden Spermatisden. Ebenso weist der fehlende Nachweis des FSH-Rezeptors in elongierten Spermatisden darauf hin, dass FSH nicht an elongierten Spermatisden wirkt.

Da der Antikörper gegen Testosteron hingegen auch im Zytoplasma von Sertoli-Zellen lokalisiert ist, an welchem elongierende Spermatisden haften, kann vermutet werden, dass vor allem das Testosteron eine Wirkung auf elongierende Spermatisden hat, während die Wirkung des FSHs auf elongierende Spermatisden eher untergeordnet zu sein scheint (O' Donnell et al., 1996; Singh und Handelsman, 1996). Dies wird durch die Studie von O' Donnell et al. (1996) unterstützt, die bei fehlender Testosteronwirkung ein Lösen der runden Spermatisden aus dem Zytoplasma von Sertoli-Zellen beschreiben.

Da die ektoplasmatischen Spezialisierungen keine Beeinträchtigung bei Fehlen von Testosteron zeigen, vermuten sie hierbei eine testosteronabhängige Störung zwischen der Verbindung von Sertoli-Zellen und Spermatisden durch Adhäsionsmoleküle (O' Donnell et al., 2000). So soll die Wirkung des FSH auf die Keimzellen vor allem in einer Proliferation und Reifung der Spermatogonien und der Keimzellen bis hin zu runden Spermatisden sein (McLachlan et al., 1995; Meachem et al., 1996). Da jedoch die alleinige Gabe von Testosteron verminderte Keimzellzahlen hervorruft (Huang et al., 1987), ist ein synergistischer Effekt von FSH und Testosteron essentiell (O' Shaughnessy, 2014).

Die vakzinierten Tiere zeigen ein stärkeres FSH-R-Immunreaktionsmuster als die intakten Eber sowie vereinzelt einen erhöhten Nachweis des FSH-Rezeptors in den Nuklei von Sertoli-Zellen. Hierfür könnte die vermutete GnRH-unabhängige FSH-Regulation und dem damit aktiven FSH-Rezeptor verantwortlich sein (Awoniyi et al., 1988a; Blok et al., 1989; Padmanabhan und McNeilly, 2001; Wagner und Claus, 2004). Eine weitere Vermutung wäre, dass die Impfung mit Improvac® auf Grund der GnRH-Inaktivität zu einer regulatorischen Erhöhung des FSH-Rezeptors führt.

Dies konnte in der Studie von Maguire et al. (1997) gezeigt werden, in welcher die m-RNA-Expression des FSH-Rezeptors in Folge einer Hypophysektomie an Ratten zunahm. Die GnRH-unabhängige FSH-Sekretion könnte unter Umständen eine Erklärung für die erhöhten und auch morphologisch veränderten Sertoli-Zellzahlen sein. FSH besitzt präpubertär bekannterweise proliferierende Eigenschaften auf die Sertoli-Zellen (Orth et al., 1984; Meachem et al., 1996; Sharpe et al., 2003; Walker, 2003).

Unter anderem soll Testosteron wiederum die Proliferation und Reifung der Sertoli-Zellen bewirken (Buzzard et al., 2003).

Weitere wichtige Faktoren für den Ablauf der Spermatogenese sind die Estrogene. Diese haben eine Funktion bei der Sertoli-Zellreifung (At-Taras et al., 2006; Berger et al., 2013), für die Fertilität (Walker und Korach, 2004), aber auch bei der Resorption von Tubulus-Flüssigkeit in den Ductuli efferentes (Oliveira et al., 2001; Cho et al., 2003), für die Sekretionsfähigkeit der akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Joshi und Raeside, 1973), sowie den Spermientransport zur Eizelle (Claus, 1990).

Hierfür wurden in dieser Studie die Estrogen-Rezeptoren α und β immunhistochemisch untersucht. Der Estrogen-Rezeptor α kann bei intakten Ebern im Zytoplasma von Leydig-Zellen nachgewiesen werden. Einzelne Spermato gonien und Spermatozyten zeigen eine Estrogen-Rezeptor- α -positive-Immunreaktion im Zytoplasma, teilweise auch im Nukleus. Spermatoziden besitzen meist eine auffallend positive Estrogen-Rezeptor- α -Immunreaktion entweder nur im akrosomalen Vesikel oder im Spermatozidenkopf von elongierten Spermatoziden. Die Sertoli-Zellen sind meist negativ oder nur schwach-positiv für den Antikörper gegen Estrogen-Rezeptor α .

Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass das Vorhandensein des Estrogen-Rezeptors α beim Schwein insbesondere der Kommunikation zwischen Leydig-Zellen und der Keimzellbildung bis zur Ausbildung von elongierten Spermatoziden dient. Ein synergistischer Effekt mit Testosteron kann zudem vermutet werden. Der synergistischer Effekt von Testosteron und Estrogenen bei Schweinen wurde bereits von Joshi und Raeside (1973) in Bezug auf die Sekretionsfähigkeit der akzessorischen Geschlechtsdrüsen sowie die Libido beschrieben.

Die Ergebnisse zahlreicher Studien postulieren jedoch, dass Estrogen α vor allem eine Funktion bei der Regulation der Proliferation sowie der Sertoli-Zell-Reifung haben könnte (At-Taras et al., 2006; Berger et al., 2013).

Geimpfte Tiere zeigen Schwankungen von negativen bis deutlich-positiven Reaktionen in Keim- und Sertoli-Zellkernen. Das Zytoplasma von Sertoli-Zellen vakzinierter Tiere ist immer positiv. Im Vergleich zu intakten Ebern sind vor allem die Spermato gonien und Spermatozyten der geimpften Tiere häufig positiv für den Antikörper gegen den Estrogen-Rezeptor α .

Auch die Leydig-Zellen zeigen meistens einen positiven Nachweis für den Estrogen-Rezeptor α .

In Studien von Mutembei (2006) weisen immature und mature intakte Eber ein ähnliches Reaktionsmuster mit einer stark-positiven Reaktion für den Antikörper gegen Estrogen-Rezeptor α in Spermato gonien und Spermatozyten auf, während Sertoli-Zellen und andere Keimzellen wie runde Spermatoziden schwächer positiv sind. Leydig-Zellen sind ebenfalls positiv für den Antikörper gegen Estrogen-Rezeptor α .

Im Gegensatz dazu konnte Lekhkota (2007) den Estrogen-Rezeptor α nur in Spermato gonien und Spermatozyten, nicht aber in Spermatischen und Leydig-Zellen von intakten und auch geimpften Tieren finden. Wagner (2005) konnte den Estrogen-Rezeptor α bei immunologisch vakzinierten Ebern ihrer Untersuchung nur in Spermato gonien nachweisen. Dies widerspricht den Ergebnissen der vorliegenden Studie, in welcher der Estrogen-Rezeptor α in allen Keimzellen nachgewiesen werden kann.

Es gibt inzwischen einige Studien, die dem Estrogen α eine essentielle Funktion für eine intakte Spermato genese zusprechen (Robertson et al., 2001; Walker und Korach, 2004). So zeigen Mäuse mit einem Aromatase-Knockout – und somit einer fehlenden Estrogenproduktion – im matura ren Alter einen Arrest der Spermato genese auf Höhe der runden Spermatischen (Robertson et al., 2001).

Auch die Tiere mit einem Estrogen-Rezeptor- α -Knockout zeigen eine gestörte Spermato genese mit Infertilität (Walker und Korach, 2004). Dies steht auch im Zusammenhang mit den Untersuchungen von Clarke und Pearl (2014).

Sie vermuten, dass auf Grund eines Abfalls der Estrogen-Aktivität bei älteren männlichen Ratten die Spermato produktion mit zunehmendem Alter sinkt. Die Autoren konnten durch immunhistochemische Untersuchungen im Rattenmodell zeigen, dass im Alter bei niedriger Estrogen-Aktivität die Anzahl der Estrogen-Rezeptoren im Hoden abnimmt und damit auch die Spermienzahlen weniger werden, während bei Estrogen-Zugabe die Estrogen- α -Rezeptoren zunehmen und die Spermato qualität verbessert werden kann. Die Testosteronwerte waren nicht beeinträchtigt (Clarke und Pearl, 2014). Somit nehmen sie an, dass Estrogene eine essentielle Rolle für das Aufrechterhalten der Spermato genese haben.

Der Estrogen-Rezeptor α von Keimzellen scheint jedoch keine wichtigen Gene zu regulieren, welche notwendig für eine intakte Spermato genese sind (Mahato et al., 2000). Denn Wildtyp-Mäuse ohne Keimzellen, denen die Keimzellen von Estrogen-Rezeptor- α -Knockout-Mäusen implantiert wurden, zeigen Fertilität. Die Autoren der Studie vermuten hierbei, dass Estrogen α eher einen Einfluss auf die somatischen Zellen hat (Mahato et al., 2000, 2001). Insbesondere soll das Vorhandensein des Estrogen-Rezeptors α an somatischen Zellen des Hodens essentiell für die Entwicklung der Spermatischen und damit für die Fertilität sein (Mahato et al., 2001).

In weiteren Studien wird beschrieben, dass der Estrogen-Rezeptor α vor allem bei der Reabsorption der Samenflüssigkeit in den Ductuli efferentes eine Rolle spielt; Ein Fehlen des Estrogen-Rezeptors α soll die Konzentrierung der Samenflüssigkeit stören und dies in Folge zu Infertilität führen (Oliveira et al., 2001; Cho et al., 2003).

Die Ergebnisse dieser Studie lassen wie bereits oben erwähnt ein Zusammenspiel zwischen den Estrogenen und Testosteron bei der Synthese von elongierten Spermatiden vermuten. Ebenso ist der Estrogen-Rezeptor α bei vakzinierten Tieren in Sertoli-Zellen sowie in Spermatogonien und Spermatozyten und in Leydig-Zellen nachzuweisen. Runde Spermatiden und elongierte Spermatiden sind jedoch meistens nicht vorhanden. Da vakzinierte Tiere der Gruppen 2 bis 4 mit wenigen Ausnahmen Testosteronwerte von 0 ng/ml besitzen, kann auch hier vermutet werden, dass das Vorhandensein von Testosteron notwendig ist, um elongierte Spermatiden hervorzubringen. Erst bei Vorhandensein von höheren Testosteronwerten können elongierende Spermatiden in höherer Menge erkannt werden.

Der Estrogen-Rezeptor β kann in dieser Untersuchung immer in Leydig-Zellen, Spermatogonien, Spermatozyten und runden Spermatiden nachgewiesen werden. Zum Teil sogar in elongierten Spermatiden. Die Leydig-Zellen besitzen meist eine starke Estrogen-Rezeptor- β -positive-Reaktion im Zytoplasma. Die Reaktionen im Zellkern variieren von negativ bis stark-positiv. Im Vergleich zu vakzinierten Tieren weisen intakte Eber ein stärkeres Reaktionsmuster im Zellkern von Keimzellen auf. Die Zellkerne der Sertoli-Zellen haben unterschiedliche Reaktionsmuster, die von negativ bis deutlich-positiv reichen.

Das Sertoli-Zellzytoplasma ist häufig schwach-positiv für den Estrogen-Rezeptor β . Diese Befunde sind ähnlich wie die von Mutembei (2006). Sie konnten den Estrogen-Rezeptor β in allen Keimzellen mit Ausnahme der elongierten Spermatiden sowie in Sertoli- und Leydig-Zellen von Schweinen immunhistochemisch darstellen.

Lekhkota (2007) hingegen konnte das Vorkommen des Estrogen-Rezeptors β mit Hilfe von in-situ-Hybridisierung nur im Zytoplasma der Sertoli-Zellen von intakten und geimpften Ebern nachweisen. Leydig-Zellen und Keimzellen waren negativ für den Estrogen-Rezeptor β (Lekhkota, 2007).

Die vakzinierten Tiere dieser Studie besitzen häufig keine oder nur schwache Reaktionen in den Keimzellkernen, aber auch in Leydig-Zellen. Die veränderten großen Spermatogonien und Spermatozyten besitzen meist eine schwach- bis deutlich-positive Reaktion für den Antikörper gegen Estrogen-Rezeptor β . Das Zytoplasma der Sertoli-Zellen von vakzinierten Tieren reagiert meistens Estrogen-Rezeptor- β -positiv, die Sertoli-Zellkerne zeigen Reaktionen von negativ bis deutlich-positiv. Ein Grund für die nicht übereinstimmenden Ergebnisse der zahlreichen Studien könnte die Verwendung unterschiedlicher Antikörper sein (Selva et al., 2004).

Es wird beschrieben, dass ein Estrogen-Rezeptor- β -Knockout fertile Mäuse hervorbringt, weshalb bei Vorhandensein des Estrogen-Rezeptors β eher eine Wirkung auf die Apoptose von Keimzellen angenommen wird (Selva et al., 2004; Walker und Korach, 2004). Dies wird in der Studie von Delbes et al. (2004) unterstützt, in welcher ein Estrogen-Rezeptor- β -Knockout bei neonatalen Mäusen eine erhöhte Anzahl an Gonozyten mit verminderten Apoptoseraten bei gleichen Sertoli- und Leydig-Zellzahlen im Vergleich zu Kontrolltieren zeigte. Da dies bei einer Inaktivierung des Estrogen-Rezeptors α nicht der Fall ist, gehen sie davon aus, dass der Estrogen-Rezeptor β einen regulierenden Einfluss auf die Keimzellen durch Apoptose besitzt (Delbes et al., 2004).

Der Estrogen-Rezeptor α soll hingegen einen hemmenden Einfluss auf die Steroidogenese in fetalen und neonatalen Leydig-Zellen haben, wie anhand eines Estrogen-Rezeptor- α -Knockouts gezeigt werden konnte (Delbes et al., 2006).

Auf Grund der Ergebnisse dieser Studie kann nachgewiesen werden, dass der Estrogen-Rezeptor β auch bei vakzinierten Ebern vorhanden ist. Im Vergleich zu den intakten Ebern, sind bei Tieren der Gruppe 5b die starken Estrogen-Rezeptor- β -Reaktionen nicht nur in den Sertoli-Zellen, sondern auch in Keim- und Leydig-Zellen zu finden.

Da die immunhistochemischen Reaktionen der Keimzellnuklei und Leydig-Zellen bei den vakzinierten Tieren zum Teil schwächer als bei den intakten Ebern und den Tieren der Gruppe 5b ist, weist dies auf eine direkte Funktion des Estrogen-Rezeptors β auf die Keimzellen und Leydig-Zellen hin. Unter Umständen könnte das Estrogen β in Kombination mit Testosteron essentiell für eine Wirkung auf die Leydig-Zellen und Keimzellen und damit auf die Spermatogenese sein.

Dass der Estrogen-Rezeptor β auch eine regulierende Funktion auf die Apoptose im Hoden der Eber hat (Delbes et al., 2004), kann hier nicht bestätigt werden. Da jedoch die Keimzellzahlen vermindert sind und erhöhte Stressreaktionen an den Keimzellen und dort vor allem an den Spermatozyten erkennbar ist, kann eine regulierende Funktion des Estrogen-Rezeptors β auf die Keimzellen in Form von Apoptose nicht ausgeschlossen werden. Da Speziesunterschiede zwischen den einzelnen Studien bestehen, ist es unter Umständen auch nicht so einfach, Rückschlüsse auf die Funktion des Estrogen-Rezeptors β zwischen dem Mausmodell und den Ebern zu ziehen.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass eine Vakzination mit Improvac® eine testosteronabhängige und zum Teil starke Auswirkung auf das Keimepithel mit einer temporär begrenzten Kastration hat.

So können bei vakzinierten Tieren der Gruppen 2 bis 5a mit Testosteronwerten unter 3 ng/ml zum Teil signifikant kleinere Tubuli seminiferi contorti mit reduzierten Mitoseraten, einem milden bis starken Verlust von Keimzellen sowie runde/ovale Sertoli-Zellkerne, die in ihrer Anzahl erhöht sind, große Spermato gonien sowie Leydig-Zellen mit pyknotischen Zellkernen und wenig Zytoplasma gefunden werden. Ob dies wiederholbare Ergebnisse sind, müsste in weiteren Studien erörtert werden.

Die Tight- und Gap-junction-Komponenten im Keimepithel sowie die Rezeptoren, die für die Spermatogenese wichtig sind, zeigen ebenfalls eine Beeinträchtigung nach einer Vakzination mit Improvac®.

Die Tight-junction-Proteine Claudin-3 und Connexin-43 zeigen bei den vakzinierten Tieren eine irreguläre Anordnung positiver Sertoli-Zytoplasmareaktionen vom Nukleus in Richtung Lumen. Ebenso fehlen häufig die positiven Claudin-3 und Connexin-43-Reaktionen luminal von Spermato gonien und jungen Spermatozyten, wodurch eine testosteronabhängige Störung der Blut-Hoden-Schranke vermutet wird.

Ebenso kann gezeigt werden, dass bei den vakzinierten Tieren der Gruppen 2 bis 5a der FSH-Rezeptor, der Androgen-Rezeptor, Testosteron und die Estrogen-Rezeptoren α und β auch bei vakzinierten Tieren nachweisbar sind und sich zum Teil von den Reaktionen der intakten Eber unterscheiden.

Der FSH- und auch der Androgen-Rezeptor ist bei den vakzinierten Tieren teilweise stärker nachweisbar. Da sich der FSH-Rezeptor neben den Sertoli-Zellen in allen Keimzellen, besonders jedoch in Spermatogonien und Spermatozyten anreichert, aber nicht in elongierten Spermatisden, kann eine Wirkung auf die Proliferation und die Reifung der Sertoli- und Keimzellen vermutet werden.

Auch kann eine testosteronabhängige Ausbildung der elongierten Spermatisden vermutet werden. Denn bei den intakten Ebern kann Testosteron im Zytoplasma von Sertoli-Zellen, vom Nukleus bis zum Lumen, wo elongierte Spermatisden an den Sertoli-Zellen anhaften, nachgewiesen werden.

Aber auch in Spermatogonien, Spermatozyten und Leydig-Zellen ist Testosteron nachweisbar. Nach der Vakzination mit Improvac® kann Testosteron im Zytoplasma von Sertoli-Zellen nur in Form von „blasenähnlichen“ Strukturen nachgewiesen werden. Aber auch in den Leydig-Zellen ist Testosteron verringert nachweisbar, ebenso wie in Spermatogonien und Spermatozyten.

Der Androgen-Rezeptor lässt sich zum größten Teil in den gleichen Zellen wie Testosteron nachweisen. Hier auch in den Keimzellen.

Auf Grund der positiven Reaktionen für den Estrogen-Rezeptor- β in den Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen, zum Teil in den Spermatogonien, Spermatozyten, aber auch in den akrosomalen Vesikeln von runden sowie im Kopf von elongierten Spermatisden, kann für den Estrogen-Rezeptor α eine unterstützende Funktion für die Ausbildung von elongierten Spermatisden zusammen mit Testosteron vermutet werden.

Der Estrogen-Rezeptor β lässt sich bei den intakten Ebern und dem eberähnlichen Tier aus Gruppe 5b neben den Sertoli-Zellen in Keimzellen und vermehrt in den Leydig-Zellen nachweisen.

Im Gegensatz dazu zeigen die vakzinierten Tiere meist schwächere Reaktionen in den Leydig- und Keimzellen. Sertoli-Zellen sind auch positiv für den Antikörper gegen den Estrogen-Rezeptor β . Deshalb kann für den Estrogen-Rezeptor β eine

testosteronabhängige Funktion auf die Keimzellen und Leydig-Zellen und somit auch auf die Spermatogenese vermutet werden.

Abschließend wird noch einmal auf mögliche Schwachpunkte dieser Dissertation sowie auf mögliche Forschungsschwerpunkte für die Zukunft eingegangen.

Da die Gruppen dieser Studie sich alle in den Intervallen zwischen V_1 und V_2 sowie bei den Intervallen zwischen V_2 und der Schlachtung unterscheiden, ist es schwierig, die Gruppen miteinander zu vergleichen. Besonders um die immunhistochemischen Untersuchungen zu unterstützen oder auch vergleichen zu können, wäre es sinnvoll andere Intervalle zu verwenden.

Eine mögliche Aufteilung wäre, für die einzelnen Gruppen zumindest das gleiche Intervall zwischen V_1 und V_2 , jedoch mit unterschiedlichen Intervallen zwischen V_2 und der Schlachtung zu verwenden. Die andere Alternative wäre eine Gruppeneinteilung mit unterschiedlichen Intervallen zwischen V_1 und V_2 , jedoch mit gleichem Intervall zwischen V_2 und der Schlachtung.

Wenn man die gleichen Antikörper wie in dieser Dissertation untersuchen würde, so ergäbe sich ein noch detaillierteres Bild über die Auswirkungen einer Vakzination mit Improvac® auf das Hodenepithel. Insbesondere in Bezug auf die Morphologie der Sertoli- und Leydig-Zellen. Aber auch in Bezug auf die Komponenten der Blut-Hoden-Schranke sowie die Hormonrezeptoren.

Ebenso wäre eine Untersuchung von prä- oder gar neonatalen Ferkeln interessant, um die Hoden dieser und die Hoden vakzinierter Tiere zu vergleichen. Dies wäre insofern von Interesse, als es Hinweise darauf gibt, dass Tiere, welche mit Improvac® vakziniert werden, anders als die intakten Eber morphologisch veränderte Sertoli-Zellen und Spermatogonien besitzen, die denen von immaturren Tieren ähnlich sind.

In diesem Zusammenhang wäre eine Untersuchung mit weiteren Differenzierungsmarkern für Spermatogonien und Sertoli-Zellen interessant. Dies wäre insofern von Interesse, um herauszufinden, ob eine Vakzination mit Improvac® zu einer Fehl-, oder De-Differenzierung des Hodenepithels mit immaturren Sertoli-Zellen sowie Spermatogonien führt.

Mögliche Untersuchungen für die Sertoli-Zellen wären immunhistochemische Untersuchungen mit dem AMH oder dem M2A-Antigen, welche sich nur in immaturren Sertoli-Zellen anreichern (Baumal et al., 1989; Steger, Klaus et al., 1999). Für den Nachweis undifferenzierter Spermato gonien würden sich außerdem der Antikörper gegen CDH1, RARG und Stra 8 anbieten (Tokuda et al., 2007; Gely-Pernot et al., 2012; Niedenberger et al., 2015).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer immunologischen Kastration auf die Hoden von Ebern, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem GnRH-Analogon Improvac® vakziniert wurden, untersucht. Eine Impfung mit Improvac® verursachte eine zum Teil starke Veränderung des Keimepithels mit einer temporär begrenzten Kastration. Dies zeigte sich an einer testosteronabhängigen Veränderung der Tubulusgröße, der Anzahl der Mitosen sowie anhand morphologischer Veränderungen von Spermatogonien, Sertoli-Zellen und auch der Leydig-Zellen. So zeigten die vakzinierten Tiere der Gruppen 2 bis 5a mit Werten unter 3 ng/ml Testosteron im Blutplasma kleinere Tubuli seminiferi contorti mit reduzierten Mitoseraten, einem milden bis starken Verlust von Keimzellen sowie runde/ovale Sertoli-Zellkerne, welche in der Anzahl erhöht waren, große Spermatogonien sowie Leydig-Zellen mit pyknotischen Zellkernen und wenig Zytoplasma. Tiere mit Testosteronwerten über 3 ng/ml im Blutplasma wiesen hingegen größere Tubuli seminiferi contorti, hohe Mitose-Aktivität der Keimzellen, viele Reihen an Keimzellen, birnenförmige Sertoli-Zellkerne, kleine Spermatogonien sowie Leydig-Zellen mit polygonalem Zellkern und lichtmikroskopisch erkennbares Zytoplasma auf.

Zusätzlich hatte eine Impfung mit Improvac® unterschiedliche Auswirkungen auf die Tight-und Gap-junction-Komponenten im Hodenepithel sowie auf Rezeptoren, die für die Spermatogenese wichtig sind. Vor allem bei den Tight-junction-Proteinen Claudin-3 und Connexin-43 bewirkte eine Vakzination mit Improvac® eine irreguläre Anordnung positiver Sertoli-Zytoplasmareaktionen vom Nukleus in Richtung Lumen. Dies – sowie ein Fehlen der positiven Claudin-3 und Connexin-43-Reaktionen luminal von Spermatogonien und jungen Spermatozyten – war hinweisend für eine Störung in der Funktion der Blut-Hoden-Schranke.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass bei den vakzinierten Tieren der Gruppen 2 bis 5a der FSH-Rezeptor, der Androgen-Rezeptor, Testosteron und die Estrogen-Rezeptoren auch bei vakzinierten Tieren nachweisbar waren.

Auf Grund der milden bis starken Keimzellverluste und der verringerten Mitoseraten, welche mit dem Antikörper gegen das Ki67-Protein nachgewiesen

werden konnten, ergab sich bei den vakzinierten Tieren jedoch ein anderes immunhistochemisches Bild – bezogen auf die Hormonrezeptoren – als bei den intakten Ebern.

Der FSH- und auch der Androgen-Rezeptor war bei den vakzinierten Tieren zum Teil stärker nachweisbar. Ebenso konnte bei den intakten Ebern gezeigt werden, dass der Antikörper gegen den FSH-Rezeptor positiv in Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen und in allen Keimzellen bis auf elongierte Spermatiden reagiert. Aus diesem Grund wurde für den FSH-Rezeptor eine Wirkung auf die Proliferation und die Reifung der Sertoli- und Keimzellen vermutet.

Dies sollte in Kombination mit den positiven Reaktionen von Testosteron betrachtet werden. Testosteron reagierte in den Leydig-Zellen, in Spermatogonien und Spermatozyten sowie im Zytoplasma von Sertoli-Zellen positiv. Hierbei war vor allem interessant, dass sich Testosteron im Sertoli-Zellzytoplasma vom Nukleus der Sertoli-Zellen bis hin zu elongierten Spermatiden nachweisen ließ. Auch in dieser Studie konnte somit eine testosteronabhängige Ausbildung der elongierten Spermatiden vermutet werden.

Bei den vakzinierten Tieren war der Antikörper gegen Testosteron in Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen und auch den Spermatogonien und Spermatiden nachweisbar. Jedoch waren vor allem die Nachweise in den Leydig-Zellen geringer und auch im Zytoplasma der Sertoli-Zellen konnte Testosteron verringert sowie in Form von „blasenähnlichen“ Strukturen gefunden werden. Der Androgen-Rezeptor ließ sich zum größten Teil in den gleichen Zellen wie Testosteron nachweisen.

Auf Grund der Anreicherung des Antikörpers gegen den Estrogen-Rezeptor α in den Leydig-Zellen, den Spermatogonien, Spermatozyten, aber auch in runden und elongierten Spermatiden intakter Eber, konnte eine unterstützende Funktion des Estrogen-Rezeptors α für die Spermatogenese, insbesondere für die Ausbildung von elongierten Spermatiden zusammen mit Testosteron vermutet werden.

Da der Estrogen Rezeptor β sich bei den intakten Ebern und dem eberähnlichen Tier aus Gruppe 5b neben den Sertoli-Zellen vor allem in Keimzellen und vermehrt in den Leydig-Zellen anreicherte konnte für den Estrogen-Rezeptor β , in Kombination mit der Wirkung von Testosteron, eine Funktion auf die Keimzellen und Leydig-Zellen und somit auch auf die Spermatogenese vermutet werden.

Weil die Vakzination mit Improvac® geringe oder keine nachweisbaren Testosteronwerte im Blutplasma als Folge hatte, ist davon auszugehen, dass ein Fehlen von Testosteron eine Störung des Ablaufs der Spermatogenese sowie morphologische Veränderungen in den Tubuli seminiferi contorti verursacht.

VII. SUMMARY

In this study the effects of an immunological castration on the testes of boars vaccinated at different times with the GnRH-analogue Improvac® were investigated. Vaccination with Improvac® caused a temporary limited castration with a partly strong change in the seminiferous epithelium. This was shown by a testosterone-dependent change in tubule size, the number of mitoses, as well as by morphological changes of spermatogonia, Sertoli-cells and also Leydig-cells. Thus, vaccinated animals of groups 2 to 5a with levels below 3 ng/ml testosterone in blood plasma showed smaller tubules with reduced mitotic rates, mild- to severe loss of germ cells as well as round/oval Sertoli-cell nuclei which were increased in number, large spermatogonia as well as Leydig-cells with pyknotic nuclei and little cytoplasm. In contrast animals with testosterone levels above 3 ng/ml in blood-plasma had larger tubules, high mitotic activity of germ cells, many rows of germ cells, pear-shaped Sertoli-cell nuclei, small spermatogonia as well as Leydig-cells with polygonal nuclei and cytoplasm detectable by light microscopy.

In addition, vaccination with Improvac® had different effects on tight- and gap-junction components in the testicular epithelium as well as on the receptors important for spermatogenesis. Especially for the tight-junction proteins claudin-3 and connexin-43, vaccination with Improvac® caused an irregular arrangement of positive Sertoli-cytoplasmic reactions reaching from the nucleus towards the lumen. This as well as an absence of positive claudin 3 and connexin 43 reactions luminal to spermatogonia and young spermatocytes was indicative of a disturbance in blood-testis barrier function.

It was shown that FSH-receptor, androgen-receptor, testosterone and estrogen-receptors were also detectable in vaccinated animals of groups 2 to 5a.

However, due to the mild to severe germ cell losses and the reduced mitotic rates, which could be detected with the antibody against the Ki67 protein, the immunohistochemical picture in the vaccinated animals - related to the hormone receptors - was different from that in the intact boars.

The FSH- and also the androgen-receptor were partly more detectable in vaccinated animals.

In intact boars it could be shown that the antibody against the FSH-receptor reacted positively in Leydig-cells, Sertoli-cells and in all germ cells except elongated spermatids. For this reason, the FSH-receptor was thought to have an effect on proliferation and maturation of Sertoli- and germ cells.

This should be considered in combination with the positive responses of testosterone. Testosterone reacted positively in Leydig-cells, in spermatogonia and spermatocytes, and in the cytoplasm of Sertoli-cells. Of particular interest here was that testosterone could be detected in Sertoli-cell cytoplasm reaching from the nucleus of Sertoli-cells to elongated spermatids. Thus, testosterone-dependent formation of elongated spermatids could also be suspected in this study. In vaccinated boars, the antibody against testosterone was detectable in Leydig-cells, Sertoli-cells and also in spermatogonia and spermatids. However, especially the detections in the Leydig-cells were lower and also in the cytoplasm of the Sertoli-cells testosterone was found to be reduced, as well as in the form of "bubble-like" structures. The androgen-receptor could be detected for the most part in the same cells as testosterone.

Based on the detection of the antibody against the estrogen-receptor α in Leydig-cells, spermatogonia, spermatocytes, but also in round and elongated spermatids of intact boars, a supportive function of the estrogen-receptor α for spermatogenesis, especially for the formation of elongated spermatids together with testosterone, could be assumed. Since the estrogen receptor β was detectable in intact boars and the boar-like animal from group 5b, besides in Sertoli-cells, mainly in germ cells and increasingly in Leydig-cells - a function on the germ cells and Leydig-cells - could be suspected for the estrogen-receptor β . Thus, it was assumed that the estrogen receptor β , in combination with testosterone activity, has a function on spermatogenesis.

Because the vaccination with Improvac® resulted in low or no detectable testosterone levels in the blood plasma, it can be assumed that an absence of testosterone causes a disturbance of the spermatogenesis as well as morphological changes in the seminiferous tubules contorti.

VIII. VERZEICHNISSE

1.1. Literaturverzeichnis

Abel, M., Baban, D., Lee, S., Charlton, H., O' Shaughnessy, P. Effects of FSH on testicular mRNA transcript levels in the hypogonadal mouse. *J Mol Endocrinol* 2009; 42: 291.

Acharya, P., Beckel, J., Ruiz, W.G., Wang, E., Rojas, R., Birder, L., Apodaca, G. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4,-8, and-12 in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: 305-318.

Albert, S., Ehmecke, J., Wistuba, J., Eildermann, K., Behr, R., Schlatt, S., Gromoll, J. Germ cell dynamics in the testis of the postnatal common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Reproduction* 2010; 140: 733.

Allen, E. Studies on cell division in the albino rat (*Mus norvegicus albinus*). III. Spermatogenesis: The origin of the first spermatocytes and the organization of the chromosomes, including the accessory. *J Morphol* 1918; 31: 133-185.

Almeida, F.F., Leal, M.C., França, L.R. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biol Reprod* 2006; 75: 792-799.

Almunia, J., Nakamura, K., Murakami, M., Takashima, S., Takasu, M. Characterization of domestic pig spermatogenesis using spermatogonial stem cell markers in the early months of life. *Theriogenology* 2018; 107: 154-161.

Amlani, S., Vogl, A.W. Changes in the distribution of microtubules and intermediate filaments in mammalian Sertoli cells during spermatogenesis. *Anat Rec* 1988; 220: 143-160.

Antich, M., Fabian, E., Sarquella, J., Bassas, L. Effect of testicular damage induced by cryptorchidism on insulin-like growth factor I receptors in rat Sertoli cells. *J Reprod Fertil* 1995; 104: 267-275.

Arambepola, N., Bunick, D., Cooke, P. Thyroid hormone effects on androgen receptor messenger RNA expression in rat Sertoli and peritubular cells. *J Endocrinol* 1998; 156: 43-50.

Arambepola, N.K., Bunick, D., Cooke, P.S. Thyroid hormone and follicle-stimulating hormone regulate Mullerian-inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in cultured neonatal rat Sertoli cells. *Endocrinology* 1998; 139: 4489-4495.

At-Taras, E.E., Berger, T., McCarthy, M.J., Conley, A.J., Nitta-Oda, B.J., Roser, J.F. Reducing estrogen synthesis in developing boars increases testis size and total sperm production. *J Androl* 2006; 27: 552-559.

Aumüller, G., Steinbrück, M., Krause, W., Wagner, H.-J. Distribution of vimentin-type intermediate filaments in Sertoli cells of the human testis, normal and pathologic. *Anat Embryol (Berl)* 1988; 178: 129-136.

Aumüller, G., Schulze, C., Viebahn, C. Intermediate filaments in Sertoli cells. *Microsc Res Tech* 1992; 20: 50-72.

Avelar, G.F., Oliveira, C.F., Soares, J.M., Silva, I.J., Dobrinski, I., Hess, R.A., França, L.R. Postnatal somatic cell proliferation and seminiferous tubule maturation in pigs: a non-random event. *Theriogenology* 2010; 74: 11-23.

Awoniyi, C.A., Chandrashekar, V., Arthur, R.D., Schanbacher, B.D., Amador, A.G., Falvo, R.E. Pituitary and Leydig cell function in boars actively immunized against gonadotrophin-releasing hormone. *J Reprod Fertil* 1988a; 84: 295-302.

Awoniyi, C.A., Chandrashekar, V., Arthur, R.D., Schanbacher, B.D., Falvo, R.E. Changes in testicular morphology in boars actively immunized against gonadotropin hormone-releasing hormone. *J Androl* 1988b; 9: 160-171.

B.M.E.L. Pressemitteilung Nr. 259/2020 vom 21. Dez 2020: Vorreiter in Europa: Betäubungslose Ferkelkastration ab 1. Januar 2021 verboten. 2020: <https://www.bmel.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/DE/2020/259-ferkelkastration-tierschutz.html>. 23.03.2021.

Baba, Y., Matsuo, H., Schally, A.V. Structure of the porcine LH-and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 44: 459-463.

Baccetti, B., Collodel, G., Costantino-Ceccarini, E., Eshkol, A., Gambera, L., Moretti, E., Strazza, M., Piomboni, P. Localization of human follicle-stimulating hormone in the testis. *FASEB J* 1998; 12: 1045-1054.

Barakat, B., Itman, C., Mendis, S., Loveland, K. Activins and inhibins in mammalian testis development: new models, new insights. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 359: 66-77.

Batias, C., Defamie, N., Lablack, A., Thepot, D., Fenichl, P., Segretain, D., Pointis, G. Modified expression of testicular gap-junction connexin 43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis. *Cell Tissue Res* 1999; 298: 113-121.

Batias, C., Siffroi, J.-P., Fénichel, P., Pointis, G., Segretain, D. Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 793-805.

Baumal, R., Bailey, D., Giwercman, A., Skakkebaek, N., Stratis, M., Marks, A. A novel maturation marker for human Sertoli cells. *Int J Androl* 1989; 12: 354-359.

Bazzoni, G., MartíNez-Estrada, O.M., Orsenigo, F., Cordenonsi, M., Citi, S., Dejana, E. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem* 2000; 275: 20520-20526.

Bee, G., Chevillon, P., Bonneau, M. Entire male pig production in Europe. *Anim Prod Sci* 2015; 55: 1347-1359.

Berger, T., Conley, A.J., Van Klompenberg, M., Roser, J.F., Hovey, R.C. Increased testicular Sertoli cell population induced by an estrogen receptor antagonist. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 366: 53-58.

Bergmann, M. Physiology of spermatogenesis. In: *Andrology for the Clinician*: Springer 2006: 272-281.

Bernal-Mañas, C.M., Morales, E., Pastor, L.M., Pinart, E., Bonet, S., De La Rosa, P., Briz, M.D., Zuasti, A., Ferrer, C., Canteras, M. Proliferation and apoptosis of spermatogonia in postpuberal boar (*Sus domesticus*) testes with spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchidism. *Acta Histochem* 2005; 107: 365-372.

Bertschinger, H., Jago, M., Nöthling, J., Human, A. Repeated use of the GnRH analogue deslorelin to down-regulate reproduction in male cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Theriogenology* 2006; 66: 1762-1767.

Bertschinger, H. Controlling wildlife reproduction: reversible suppression of reproductive function or sex-related behaviour in wildlife species. *Diss. med. vet.* 2010. Utrecht Universität.

Bertschinger, H.J., Trigg, T.E., Jöchle, W., Human, A. Induction of contraception in some African wild carnivores by downregulation of LH and FSH secretion using the GnRH analogue deslorelin. *Reprod Suppl* 2002; 60: 41-52.

Blanco-Rodríguez, J., Martínez-García, C. Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif* 1996; 29: 13-31.

Blok, L.J., Mackenbach, P., Trapman, J., Themmen, A.P., Brinkmann, A.O., Grootegoed, J.A. Follicle-stimulating hormone regulates androgen receptor mRNA in Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 1989; 63: 267-271.

Boekelheide, K., Neely, M.D., Sioussat, T.M. The Sertoli cell cytoskeleton: a target for toxicant-induced germ cell loss. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989; 101: 373-389.

Bonneau, M., Carrié-Lemoine, J., Prunier, A., Garnier, D., Terqui, M. Age-related changes in plasma LH and testosterone concentration profiles and fat 5 α -androstene content in the young boar. *Anim Reprod Sci* 1987; 15: 241-258.

Bonneau, M., Enright, W. Immunocastration in cattle and pigs. *Livest Prod Sci* 1995; 42: 193-200.

Botha, A., Schulman, M., Bertschinger, H., Guthrie, A., Annandale, C., Hughes, S. The use of a GnRH vaccine to suppress mare ovarian activity in a large group of mares under field conditions. *Wildl Res* 2008; 35: 548-554.

Boyd, B.G., McCallum, S.W., Lewis, R.W., Terris, M.K. Assessment of patient concern and adequacy of informed consent regarding infertility resulting from prostate cancer treatment. *Urology* 2006; 68: 840-844.

Brehm, R., Zeiler, M., Rüttinger, C., Herde, K., Kibschull, M., Winterhager, E., Willecke, K., Guillou, F., Lécureuil, C., Steger, K. A Sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. *Am J Pathol* 2007; 171: 19-31.

Bremner, W.J., Millar, M.R., Sharpe, R.M., Saunders, P. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 1994; 135: 1227-1234.

Brewster, V., Nevel, A. Immunocastration with Improvac® reduces aggressive and sexual behaviours in male pigs. *Appl Anim Behav Sci* 2013; 145: 32-36.

Brown, P., McNeilly, A.S. Transcriptional regulation of pituitary gonadotrophin subunit genes. *Rev Reprod* 1999; 4: 117-124.

Brunius, C., Zamaratskaia, G., Andersson, K., Chen, G., Norrby, M., Madej, A., Lundstrom, K. Early immunocastration of male pigs with Improvac® - effect on boar taint, hormones and reproductive organs. *Vaccine* 2011; 29: 9514-9520.

Bruno, S., Darzynkiewicz, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif* 1992; 25: 31-40.

Bukhari, U., George, A., Shafique, Y., Bukhari, A. Prostatic carcinoma: Frequency, pattern and evaluation of gleason grading in prostate biopsies. *Pak J Med Res* 2020; 59: 55-59.

Bun-Ichi, T. Steroidogenesis and cell structure: Biochemical pursuit of sites of steroid biosynthesis. *J Steroid Biochem* 1973; 4: 89-107.

Burger, D., Janett, F., Vidament, M., Stump, R., Fortier, D., Imboden, I., Thun, R. (2006) Immunization against GnRH in adult stallions: Effects on semen characteristics, behaviour and shedding of equine arteritis virus. 9. International Symposium on Equine Reproduction, 2006

Busch, W., Holzmann, A. (2001) Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Schattauer Verlag. 1-277

Bustos-Obregon, E., Fléchon, J.-E. Comparative scanning electron microscope study of boar, bull and ram spermatozoa. *Cell Tissue Res* 1975; 161: 329-341.

Buzzard, J.J., Wreford, N.G., Morrison, J.R. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat Sertoli cells. *Endocrinology* 2003; 144: 3722-3731.

Caires, K., Schmidt, J., Oliver, A., De Avila, J., McLean, D. Endocrine regulation of the establishment of spermatogenesis in pigs. *Reprod Domest Anim* 2008; 43: 280-287.

Carette, D., Weider, K., Gilleron, J., Giese, S., Dompierre, J., Bergmann, M., Brehm, R., Denizot, J.-P., Segretain, D., Pointis, G. Major involvement of connexin 43 in seminiferous epithelial junction dynamics and male fertility. *Dev Biol* 2010; 346: 54-67.

Carreau, S., Bourguiba, S., Lambard, S., Galeraud-Denis, I., Genissel, C., Bilinska, B., Benahmed, M., Levallet, J. Aromatase expression in male germ cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 79: 203-208.

Carreau, S., Silandre, D., Bourguiba, S., Hamden, K., Said, L., Lambard, S., Galeraud-Denis, I., Delalande, C. Estrogens and male reproduction: a new concept. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 761-768.

Castrillon, D.H., Quade, B.J., Wang, T., Quigley, C., Crum, C.P. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 9585-9590.

Cavicchia, J.C., Sacerdote, F.L., Ortiz, L. The human blood-testis barrier in impaired spermatogenesis. *Ultrastruct Pathol* 1996; 20: 211-218.

Chaboissier, M.-C., Kobayashi, A., Vidal, V.I., Lützkendorf, S., Van De Kant, H.J., Wegner, M., De Rooij, D.G., Behringer, R.R., Schedl, A. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 2004; 131: 1891-1901.

Chalmers, A.D., Whitley, P. Continuous endocytic recycling of tight junction proteins: how and why? *Essays Biochem* 2012; 53: 41-54.

Chaudhary, J., Sadler-Riggleman, I., Ague, J.M., Skinner, M.K. The helix-loop-helix inhibitor of differentiation (ID) proteins induce post-mitotic terminally differentiated Sertoli cells to re-enter the cell cycle and proliferate. *Biol Reprod* 2005; 72: 1205-1217.

Chemes, H. The phagocytic function of Sertoli cells: A morphological, biochemical, and endocrinological study of lysosomes and acid phosphatase localization in the rat testis. *Endocrinology* 1986; 119: 1673-1681.

Chen, M., Wang, J., Liu, N., Cui, W., Dong, W., Xing, B., Pan, C. Pig SOX9: Expression profiles of Sertoli cell (SCs) and a functional 18 bp indel affecting testis weight. *Theriogenology* 2019; 138: 94-101.

Cheng, C.Y., Mruk, D.D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 2002; 82: 825-874.

Cheng, C.Y., Mruk, D.D. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev* 2012; 64: 16-64.

Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S., Loeb, L.A. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G→T and A→C substitutions. *J Biol Chem* 1992; 267: 166-172.

Chihara, M., Ikebuchi, R., Otsuka, S., Ichii, O., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Saga, Y., Kon, Y. Mice stage-specific claudin 3 expression regulates progression of meiosis in early stage spermatocytes. *Biol Reprod* 2013; 89: 3, 1-12.

Cho, H.W., Nie, R., Carnes, K., Zhou, Q., Sharief, N.A., Hess, R.A. The antiestrogen ICI 182,780 induces early effects on the adult male mouse reproductive tract and long-term decreased fertility without testicular atrophy. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 57.

Chung, N.P., Cheng, C.Y. Is cadmium chloride-induced inter-Sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable in vitro model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? *Endocrinology* 2001; 142: 1878-1888.

Clarke, M., Pearl, C.A. Alterations in the estrogen environment of the testis contribute to declining sperm production in aging rats. *Syst Biol Reprod Med* 2014; 60: 89-97.

Claus, R., Hoffmann, B. Oestrogens, compared to other steroids of testicular origin, in bloodplasma of boars. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1980; 94: 404-411.

Claus, R., Schopper, D., Wagner, H.-G. Seasonal effect on steroids in blood plasma and seminal plasma of boars. *J Steroid Biochem* 1983; 19: 725-729.

Claus, R., Schopper, D., Hoang-Vu, C. Contribution of individual compartments of the genital tract to oestrogen and testosterone concentrations in ejaculates of the boar. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1985; 109: 281-288.

Claus, R. Physiological role of seminal components in the reproductive tract of the female pig. *J Reprod Fertil Suppl* 1990; 40: 117-131.

Clermont, Y., Leblond, C. Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the "periodic acid-Schiff" technique. *Am J Anat* 1955; 96: 229-253.

Clermont, Y., Harvey, S.C. (1967) Effects of hormones on spermatogenesis in the rat. *Ciba Found Symp.* 173-196

Clermont, Y. Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Am J Anat* 1969; 126: 57-71.

Clermont, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972; 52: 198-236.

Cook, B., Hunter, R., Kelly, A.S. Steroid-binding proteins in follicular fluid and peripheral plasma from pigs, cows and sheep. *Reproduction* 1977; 51: 65-71.

Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K., Linder, P. The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 2006; 367: 17-37.

Costa, D.S., Faria, F.J., Fernandes, C.A., Silva, J.C., Auharek, S.A. Testis morphometry and kinetics of spermatogenesis in the feral pig (*Sus scrofa*). *Anim Reprod Sci* 2013; 142: 63-70.

Cyr, D.G., Hermo, L., Egenberger, N., Mertineit, C., Trasler, J.M., Laird, D.W. Cellular immunolocalization of Occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis. *Endocrinology* 1999; 140: 3815-3825.

D'Agostino, A., Monaco, L., Stefanini, M., Geremia, R. Study of the interaction between germ cells and Sertoli cells in vitro. *Exp Cell Res* 1984; 150: 430-435.

Dagar, M., Singh, J.P., Dagar, G., Tyagi, R.K., Bagchi, G. Phosphorylation of HSP90 by protein kinase A is essential for the nuclear translocation of androgen receptor. *J Biol Chem* 2019; 294: 8699-8710.

De Franca, L.R., Hess, R.A., Cooke, P.S., Russell, L.D. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anat Rec* 1995; 242: 57-69.

De Gendt, K., Swinnen, J.V., Saunders, P.T., Schoonjans, L., Dewerchin, M., Devos, A., Tan, K., Atanassova, N., Claessens, F., Lécureuil, C. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 1327-1332.

De Kretser, D.M., Loveland, K.L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., Wreford, N. Spermatogenesis. *Hum Reprod* 1998; 13: 1-8.

De Kretser, D.M., Loveland, K.L., Meehan, T., O' Bryan, M.K., Phillips, D.J., Wreford, N.G. Inhibins, activins and follistatin: actions on the testis. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 180: 87-92.

De Miguel, M.P., Bethencourt, F.R., Arenas, M., Fraile, B., Paniagua, R. Intermediate filaments in the Sertoli cells of the ageing human testis. *Virchows Arch* 1997; 431: 131-138.

De Nys, H.M., Bertschinger, H.J., Turkstra, J., Colenbrander, B., Palme, R., Human, A. Vaccination against GnRH may suppress aggressive behaviour and musth in African elephant (*Loxodonta africana*) bulls: a pilot study. *J S Afr Vet Assoc* 2010; 81: 08-15.

De Rooij, D.G., Grootegoed, J.A. Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 694-701.

De Rooij, D.G., Okabe, M., Nishimune, Y. Arrest of spermatogonial differentiation in *jsd/jsd*, *S117H/S117H*, and cryptorchid mice. *Biol Reprod* 1999; 61: 842-847.

De Rooij, D.G., Russel, L.D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 2000; 21: 776-798.

De Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F., Berta, P. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6653-6665.

Decrouy, X., Gasc, J.M., Pointis, G., Segretain, D. Functional characterization of Cx43 based gap junctions during spermatogenesis. *J Cell Physiol* 2004; 200: 146-154.

Delbes, G.R., Levacher, C., Pairault, C., Racine, C.L., Duquenne, C., Krust, A.E., Habert, R. Estrogen Receptor β -Mediated Inhibition of Male Germ Cell Line Development in Mice by Endogenous Estrogens during Perinatal Life. *Endocrinology* 2004; 145: 3395-3403.

Delbes, G.R., Levacher, C., Habert, R. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction* 2006; 132: 527-538.

Desaulniers, A.T., Cederberg, R.A., Mills, G.A., Ford, J.J., Lents, C.A., White, B.R. LH-independent testosterone secretion is mediated by the interaction between GnRH2 and its receptor within porcine testes. *Biol Reprod* 2015; 93

Devkota, B., Sasaki, M., Takahashi, K.-I., Matsuzaki, S., Matsui, M., Haneda, S., Takahashi, M., Osawa, T., Miyake, Y.-I. Postnatal developmental changes in immunohistochemical localization of α -smooth muscle actin (SMA) and vimentin in bovine testes. *J Reprod Dev* 2006; 52: 43-49.

Dizdaroglu, M., Jaruga, P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res* 2012; 46: 382-419.

Domke, L.M., Rickelt, S., Dörflinger, Y., Kuhn, C., Winter-Simanowski, S., Zimbelmann, R., Rosin-Arbesfeld, R., Heid, H., Franke, W.W. The cell-cell junctions of mammalian testes: I. The adhering junctions of the seminiferous epithelium represent special differentiation structures. *Cell Tissue Res* 2014; 357: 645-665.

Driancourt, M.A., Briggs, J.R. Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) agonist implants for male dog fertility suppression: A review of mode of action, efficacy, safety, and uses. *Front Vet Sci* 2020; 7

Dunshea, F., Colantoni, C., Howard, K., McCauley, I., Jackson, P., Long, K., Lopaticki, S., Nugent, E., Simons, J., Walker, J. Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac®) eliminates boar taint and increases growth performance. *J Anim Sci* 2001; 79: 2524-2535.

Durlej, M., Kopera, I., Knapczyk-Stwora, K., Hejmej, A., Duda, M., Koziorowski, M., Slomczynska, M., Bilinska, B. Connexin 43 gene expression in male and female gonads of porcine offspring following in utero exposure to an anti-androgen, flutamide. *Acta Histochem* 2011; 113: 6-12.

Dym, M., Fawcett, D.W. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 1970; 3: 308-326.

Dym, M., Fawcett, D.W. Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol Reprod* 1971; 4: 195-215.

Eik-Nes, K.B. Patterns of steroidogenesis in the vertebrate gonads. *Gen Comp Endocrinol* 1969; 2: 87-100

Einarsson, S., Andersson, K., Wallgren, M., Lundstrom, K., Rodriguez-Martinez, H. Short- and long-term effects of immunization against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac, on sexual maturity, reproductive organs and sperm morphology in male pigs. *Theriogenology* 2009; 71: 302-310.

Einarsson, S., Brunius, C., Wallgren, M., Lundström, K., Andersson, K., Zamaratskaia, G., Rodriguez-Martinez, H. Effects of early vaccination with Improvac® on the development and function of reproductive organs of male pigs. *Anim Reprod Sci* 2011; 127: 50-55.

Engelhardt, W.V. (2015) *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag, Stuttgart. 574-592

Ewing, L.L., Zirkin, B.R., Chubb, C. Assessment of testicular testosterone production and Leydig cell structure. *Environ Health Perspect* 1981; 38: 19-27.

Fanning, A.S., Jameson, B.J., Jesaitis, L.A., Anderson, J.M. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998; 273: 29745-29753.

Fanning, A.S., Ma, T.Y., Anderson, J.M. Isolation and functional characterization of the actin-binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB J* 2002; 16: 1-23.

Fawcett, D.W. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 1975; 44: 394-436.

Fisher, J.S., Macpherson, S., Marchetti, N., Sharpe, R.M. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod* 2003; 18: 1383-1394.

Floyd, R.A., Watson, J.J., Harris, J., West, M., Wong, P.K. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoylphorbolacetate. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 137: 841-846.

Forster, R., Ancian, P., Fredholm, M., Simianer, H., Whitelaw, B. The minipig as a platform for new technologies in toxicology. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010; 62: 227-235.

Fortier, G., Vidament, M., De Craene, F., Ferry, B., Daels, P. The effect of GnRH antagonist on testosterone secretion, spermatogenesis and viral excretion in EVA-virus excreting stallions. *Theriogenology* 2002; 58: 425-427.

Fraczek, B., Kotula-Balak, M., Wojtusiak, A., Pierscinski, A., Bilinska, B. Cytochrome P450 aromatase in the testis of immature and mature pigs. *Reprod Biol* 2001; 1: 51-59.

França, L., Cardoso, F. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar. *Tissue Cell* 1998; 30: 573-582.

França, L.R., Silva Jr, V.A., Chiarini-Garcia, H., Garcia, S.K., Debeljuk, L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol Reprod* 2000; 63: 1629-1636.

Frankenhuis, M., Kramer, M., De Rooij, D. Spermatogenesis in the boar. *Vet Q* 1982; 4: 57-61.

Fröjdman, K., Harley, V.R., Pelliniemi, L.J. Sox9 protein in rat Sertoli cells is age and stage dependent. *Histochem Cell Biol* 2000; 113: 31-36.

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., Tsukita, S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993; 123: 1777-1788.

Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., Tsukita, S. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* 1994; 127: 1617-1626.

Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., Tsukita, S. Claudin-1 and-2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998; 141: 1539-1550.

Garcia-Gil, N., Pinart, E., Sancho, S., Badia, E., Bassols, J., Kadar, E., Briz, M., Bonet, S. The cycle of the seminiferous epithelium in Landrace boars. *Anim Reprod Sci* 2002; 73: 211-225.

Gelmann, E.P. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3001-3015.

Gely-Pernot, A., Raverdeau, M., Célébi, C., Dennefeld, C., Feret, B., Klopfenstein, M., Yoshida, S., Ghyselinck, N.B., Mark, M. spermatogonia differentiation requires retinoic acid receptor γ . *Endocrinology* 2012; 153: 438-449.

Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.-H., Schwab, U., Stein, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-1715.

Gerland, P., Raftery, A.E., Ševčíková, H., Li, N., Gu, D., Spoorenberg, T., Alkema, L., Fosdick, B.K., Chunn, J., Lalic, N. World population stabilization unlikely this century. *Science* 2014; 346: 234-237.

Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., Laudet, V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 685-704.

Ghosh, S., Bartke, A., Grasso, P., Reichert Jr, L., Russell, L.D. Structural manifestations of the rat Sertoli cell to hypophysectomy: a correlative morphometric and endocrine study. *Endocrinology* 1992; 131: 485-497.

Goel, S., Reddy, N., Mandal, S., Fujihara, M., Kim, S.-M., Imai, H. Spermatogonia-specific proteins expressed in prepubertal buffalo (*Bubalus bubalis*) testis and their utilization for isolation and in vitro cultivation of spermatogonia. *Theriogenology* 2010; 74: 1221-1232.

Gómez, J., Netto, A.S., Antonelo, D., Silva, J., Sene, G., Silva, H., Dias, N., Leme, P., Silva, S. Effects of immunocastration on the performance and meat quality traits of feedlot-finished *Bos indicus* (Nellore) cattle. *Anim Prod Sci* 2019; 59: 183-190.

Gray, M.E., Thain, D.S., Cameron, E.Z., Miller, L.A. Multi-year fertility reduction in free-roaming feral horses with single-injection immunocontraceptive formulations. *Wildl Res* 2010; 37: 475-481.

Griffin, P., Aribarg, A., Gui-Yuan, Z., Jian, C., Guo-Zhu, L., Anderson, R., Swerdloff, R., Wu, F., Baker, H., Xing-Hai, W. Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Int J Gynaecol Obstet* 1996; 55: 83-83.

Griswold, M.D. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod* 1995; 52: 211-216.

Griswold, M.D. (1998) The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 411-416

Gumbiner, B., Lowenkopf, T., Apatira, D. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 3460-3464.

Günther, S., Fietz, D., Weider, K., Bergmann, M., Brehm, R. Effects of a murine germ cell-specific knockout of Connexin 43 on Connexin expression in testis and fertility. *Transgenic Res* 2013; 22: 631-641.

Gye, M.C. Expression of occludin in canine testis and epididymis. *Reprod Domest Anim* 2004; 39: 43-47.

Hammes, A., Andreassen, T.K., Spoelgen, R., Raila, J., Hubner, N., Schulz, H., Metzger, J., Schweigert, F.J., Lupp, P.B., Nykjaer, A. Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell* 2005; 122: 751-762.

Hammes, S.R., Levin, E.R. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* 2007; 28: 726-741.

Han, X., Gu, L., Xia, C., Feng, J., Cao, X., Du, X., Zeng, X., Song, T. Effect of immunization against GnRH on hypothalamic and testicular function in rams. *Theriogenology* 2015; 83: 642-649.

Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E.S., Hibbard, J., Stevenson, B.R. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* 1998; 141: 199-208.

Hay, M., Vulin, A., Génin, S., Sales, P., Prunier, A. Assessment of pain induced by castration in piglets: behavioral and physiological responses over the subsequent 5 days. *Appl Anim Behav Sci* 2003; 82: 201-218.

Haywood, M., Spaliviero, J., Jimenez, M., King, N.J.C., Handelsman, D.J., Allan, C.M. Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone. *Endocrinology* 2003; 144: 509-517.

Heiskala, M., Peterson, P.A., Yang, Y. The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic* 2001; 2: 92-98.

Hejmej, A., Kopera, I., Kotula-Balak, M., Gizejewski, Z., Bilińska, B. Age-dependent pattern of connexin43 expression in testes of European bison (*Bison bonasus*, L.). *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 2009; 311: 667-675

Hejmej, A., Kopera, I., Kotula-Balak, M., Lydka, M., Lenartowicz, M., Bilinska, B. Are expression and localization of tight and adherens junction proteins in testes of adult boar affected by foetal and neonatal exposure to flutamide? *Int J Androl* 2012; 35: 340-352.

Hermo, L., Pelletier, R.M., Cyr, D.G., Smith, C.E. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 3: developmental changes in spermatid flagellum and cytoplasmic droplet and interaction of sperm with the zona pellucida and egg plasma membrane. *Microsc Res Tech* 2010; 73: 320-363.

Hess, R., França, L.R. Structure of the Sertoli cell. In: *Sertoli cell biology*. Skinner, Griswold, eds.: Elsevier 2005: 19-40.

Hickford, D.E., Frankenberg, S., Pask, A.J., Shaw, G., Renfree, M.B. DDX4 (VASA) is conserved in germ cell development in marsupials and monotremes. *Biol Reprod* 2011; 85: 733-743.

Hikim, A.P.S., Rajavashisth, T.B., Hikim, I.S., Lue, Y., Bonavera, J.J., Leung, A., Wang, C., Swerdloff, R.S. Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *J Urol* 1998; 159: 1771-1772.

Hilbe, M., Jaros, P., Ehrensperger, F., Zlinszky, K., Janett, F., Hassig, M., Thun, R. Histomorphological and immunohistochemical findings in testes, bulbourethral glands and brain of immunologically castrated male piglets. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2006; 148: 599-608.

Hirase, T., Staddon, J.M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S., Rubin, L.L. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* 1997; 110: 1603-1613.

Hoffmann, B., Rostalski, A., Mutembei, H., Goericke-Pesch, S. Testicular steroid hormone secretion in the boar and expression of testicular and epididymal steroid sulphatase and estrogen sulphotransferase activity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010; 274-280.

Hoh, J., Sosinsky, G., Revel, J., Hansma, P. Structure of the extracellular surface of the gap junction by atomic force microscopy. *Biophys J* 1993; 65: 149-163.

Holdcraft, R.W., Braun, R.E. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development* 2004; 131: 459-467.

Hollenbach, J., Jung, K., Noelke, J., Gasse, H., Pfarrer, C., Koy, M., Brehm, R. Loss of connexin43 in murine Sertoli cells and its effect on blood-testis barrier formation and dynamics. *PLoS One* 2018; 13: e0198100.

Huang, C., Lee, T., Shih, Y., Yu, B. Effects of dietary supplementation of Chinese medicinal herbs on polymorphonuclear neutrophil immune activity and small intestinal morphology in weanling pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2012; 96: 285-294.

Huang, H.F.S., Marshall, G.R., Rosenberg, R., Nieschlag, E. Restoration of spermatogenesis by high levels of testosterone in hypophysectomized rats after long-term regression. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1987; 116: 433.

Huhtaniemi, I. Studies on steroidogenesis and its regulation in human fetal adrenal and testis. *J Steroid Biochem* 1977; 8: 491-497.

Huhtaniemi, I. A short evolutionary history of FSH-stimulated spermatogenesis. *Hormones* 2015; 14: 468-478.

Ishikawa, T., Fujioka, H., Ishimura, T., Takenaka, A., Fujisawa, M. Increased testicular 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients with varicocele. *BJU Int* 2007; 100: 863-866.

Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., Tsukita, S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 1999a; 147: 1351-1363.

Itoh, M., Morita, K., Tsukita, S. Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and α catenin. *J Biol Chem* 1999b; 274: 5981-5986.

Iwase, Y., Fukata, H., Mori, C. Estrogenic compounds inhibit gap junctional intercellular communication in mouse Leydig TM3 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 212: 237-246.

Izadyar, F., Spierenberg, G., Creemers, L., Ouden, K.D., De Rooij, D. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction* 2002; 124: 85-94.

Jegou, B., Le Gac-Jegou, F. Androgen-binding protein in the seminal plasma of some mammalian species. *J Endocrinol* 1978; 77: 267-268.

Jin, J.-Y., Zhou, L., Wang, Y., Li, Z., Zhao, J.-G., Zhang, Q.-Y., Gui, J.-F. Antibacterial and antiviral roles of a fish β -defensin expressed both in pituitary and testis. *PLoS One* 2010; 5: e12883.

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

Johnson, L., Carter, G., Varner, D., Taylor, T., Blanchard, T., Rembert, M. The relationship of daily sperm production with number of Sertoli cells and testicular size in adult horses: role of primitive spermatogonia. *J Reprod Fertil* 1994; 100: 315-321.

Johnson, L., Suggs, L.C., Norton, Y.M., Welsh Jr, T.H., Wilker, C.E. Effect of hypophysectomy, sex of host, and/or number of transplanted testes on Sertoli cell number and testicular size of syngeneic testicular grafts in Fischer rats. *Biol Reprod* 1996; 54: 960-969.

Johnson, L., Thompson Jr, D.L., Varner, D.D. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Anim Reprod Sci* 2008; 105: 23-51.

Jordan, K., Chodock, R., Hand, A.R., Laird, D.W. The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *J Cell Sci* 2001; 114: 763-773.

Joshi, H., Raeside, J. Synergistic effects of testosterone and oestrogens on accessory sex glands and sexual behaviour of the boar. *J Reprod Fertil* 1973; 33: 411-423.

Kadokawa, H. Discovery of new receptors regulating LH and FSH secretion by bovine gonadotrophs to explore a new paradigm for mechanisms regulating reproduction. *J Reprod Dev* 2020; 66(4): 291-297.

Kahiri, C.N., Khalil, M.W., Tekpetey, F., Kidder, G.M. Leydig cell function in mice lacking connexin43. *Reproduction* 2006; 132: 607-616.

Kangawa, A., Otake, M., Enya, S., Yoshida, T., Kangawa, Y., Shibata, M. Spermatogenesis in the micromini pig. *Toxicol Pathol* 2016; 44: 974-986.

Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J. Isoprenoid-Lipide: Steroide und Carotinoide. *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler* 1994; 3

Kashiwagi, B., Shibata, Y., Ono, Y., Suzuki, R., Honma, S., Suzuki, K. Changes in testosterone and dihydrotestosterone levels in male rat accessory sex organs, serum, and seminal fluid after castration: establishment of a new highly sensitive simultaneous androgen measurement method. *J Androl* 2005; 26: 586-591.

Kauffold, J., Rohrmann, H., Boehm, J., Wehrend, A. Effects of long-term treatment with the GnRH agonist deslorelin (Suprelorin®) on sexual function in boars. *Theriogenology* 2010; 74: 733-740.

Kenngott, R.A.-M. Licht-und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur prä- und postnatalen Entwicklung des Eileiters beim Rind. Diss. med. vet. 2006. Ludwig-Maximilians-Universität-München.

Kenngott, R.A.-M., Sauer, U., Vermehren, M., Sinowatz, F. Expression of intermediate filaments and germ cell markers in the developing bovine ovary: an immunohistochemical and laser-assisted microdissection study. *Cells Tissues Organs* 2014; 200: 153-170.

Kent, J., Wheatley, S.C., Andrews, J.E., Sinclair, A.H., Koopman, P. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 1996; 122: 2813-2822.

Kerr, J. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J Reprod Fertil* 1992; 95: 825-830.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.

Kidder, G.M., Cyr, D.G. Roles of connexins in testis development and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2016; 50: 22-30.

Kim, J., Jung, H., Yoon, M. VASA (DDX4) is a putative marker for spermatogonia, spermatocytes and round spermatids in stallions. *Reprod Domest Anim* 2015; 50: 1032-1038.

Kimura, N., Mizokami, A., Oonuma, T., Sasano, H., Nagura, H. Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 671-678.

Klobucar, I., Kosec, M., Cebulj-Kadunc, N., Majdic, G. Postnatal hypothyroidism does not affect prepubertal testis development in boars. *Reprod Domest Anim* 2003; 38: 193-198.

Knol, B. Stress and the endocrine hypothalamus-pituitary-testis system: A review. *Vet Q* 1991; 13: 104-114.

Komatsu, T., Yamamoto, Y., Atoji, Y., Tsubota, T., Suzuki, Y. Immunohistochemical demonstration of cytoskeletal proteins in the testis of the Japanese black bear, *Ursus thibetanus japonicus*. *Anat Histol Embryol* 1998; 27: 209-213.

Komljenovic, D., Sandhoff, R., Teigler, A., Heid, H., Just, W.W., Gorgas, K. Disruption of blood-testis barrier dynamics in ether-lipid-deficient mice. *Cell Tissue Res* 2009; 337: 281-299.

Koopman, P. Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 839-856.

Kopera, I., Durlej, M., Hejmej, A., Knapczyk-Stwora, K., Duda, M., Slomczynska, M., Koziorowski, M., Bilinska, B. Effects of pre-and post-natal exposure to flutamide on connexin 43 expression in testes and ovaries of prepubertal pigs. *Eur J Histochem* 2010; 54

Krishnamurthy, H., Suresh Babu, P., Morales, C.R., Sairam, M.R. Delay in sexual maturity of the follicle-stimulating hormone receptor knockout male mouse. *Biol Reprod* 2001; 65: 522-531.

Kubale, V., Batorek, N., Škrlep, M., Prunier, A., Bonneau, M., Fazarinc, G., Čandek-Potokar, M. Steroid hormones, boar taint compounds, and reproductive organs in pigs according to the delay between immunocastration and slaughter. *Theriogenology* 2013; 79: 69-80.

Kumar, N.M., Gilula, N.B. The gap junction communication channel. *Cell* 1996; 84: 381-388.

Kumar, T.R., Wang, Y., Lu, N., Matzuk, M.M. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* 1997; 15: 201-204.

Kumar, T.R. Functional analysis of LH β knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 269: 81-84.

Kurohmaru, M., Kanai, Y. A cytological and cytoskeletal comparison of Sertoli cells without germ cell and those with germ cells using the W/WV mutant mouse. *Tissue Cell* 1992; 24: 895-903.

Kuzmuk, K.N., Schook, L.B. Pigs as a model for biomedical sciences. In: *The genetics of the pig*: CABI 2011: 426-444.

Langendijk, P., Soede, N., Kemp, B. Uterine activity, sperm transport, and the role of boar stimuli around insemination in sows. *Theriogenology* 2005; 63: 500-513.

Langenstroth, D., Kossack, N., Westernströer, B., Wistuba, J., Behr, R., Gromoll, J., Schlatt, S. Separation of somatic and germ cells is required to establish primate spermatogonial cultures. *Hum Reprod* 2014; 29: 2018-2031.

Lee, K.H., Park, J.H., Bunick, D., Lubahn, D.B., Bahr, J.M. Morphological comparison of the testis and efferent ductules between wild-type and estrogen receptor α knockout mice during postnatal development. *J Anat* 2009; 214: 916-925.

Lee, R., Lee, W.-Y., Park, H.-J., Ha, W.-T., Woo, J.-S., Chung, H.-J., Lee, J.-H., Hong, K., Song, H. Stage-specific expression of DDX4 and C-kit at different developmental stages of the porcine testis. *Anim Reprod Sci* 2017;

Legacki, E., Conley, A.J., Nitta-Oda, B.J., Berger, T. Porcine Sertoli cell proliferation after androgen receptor inactivation. *Biol Reprod* 2015; 92: 93, 91-97.

Lei, Z., Mishra, S., Ponnuru, P., Li, X., Yang, Z., Rao, C.V. Testicular phenotype in luteinizing hormone receptor knockout animals and the effect of testosterone replacement therapy. *Biol Reprod* 2004; 71: 1605-1613.

Lekhkota, O., Brehm, R., Claus, R., Wagner, A., Bohle, R., Bergmann, M. Cellular localization of estrogen receptor-alpha ($ER\alpha$) and-beta ($ER\beta$) mRNA in the boar testis. *Histochem Cell Biol* 2006; 125: 259-264.

Lekhkota, O. Die Expression von Steroid- und Gonadotropinrezeptor mRNA im Hoden vom Schwein unter besonderer Berücksichtigung der Östrogenrezeptoren ($ER-\alpha$, $ER-\beta$). Diss. med. vet. 2007. Justus-Liebig-Universität Gießen.

Li, M., Macdonald, G., Ford, J. Breed differences in expression of inhibin/activin subunits in porcine anterior pituitary glands. *Endocrinology* 1997; 138: 712-718.

Li, M.W., Mruk, D.D., Lee, W.M., Cheng, C.Y. Connexin 43 and plakophilin-2 as a protein complex that regulates blood–testis barrier dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 10213-10218.

Li, X.Y., Zhang, Y., Wang, X.X., Jin, C., Wang, Y.Q., Sun, T.C., Li, J., Tang, J.X., Batool, A., Deng, S.L., Chen, S.R., Cheng, C.Y., Liu, Y.X. Regulation of blood-testis barrier assembly in vivo by germ cells. *FASEB J* 2018; 32: 1653-1664.

Liebich, H.-G. (2010) Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis, 5. edn. Schattauer Verlag. 295-308

Lunstra, D., Ford, J., Christenson, R., Allrich, R. Changes in Leydig cell ultrastructure and function during pubertal development in the boar. *Biol Reprod* 1986; 34: 145-158.

Ma, Y., Zhou, Y., Zhu, Y.-C., Wang, S.-Q., Ping, P., Chen, X.-F. Lipophagy contributes to testosterone biosynthesis in male rat Leydig cells. *Endocrinology* 2018; 159: 1119-1129.

Maguire, S.M., Tribley, W.A., Griswold, M.D. Follicle-Stimulating Hormone (FSH) regulates the expression of FSH receptor messenger ribonucleic acid in cultured Sertoli cells and in hypophysectomized rat testis. *Biol Reprod* 1997; 56: 1106-1111.

Mahato, D., Goulding, E.H., Korach, K.S., Eddy, E.M. Spermatogenic cells do not require estrogen receptor- α for development or function. *Endocrinology* 2000; 141: 1273-1276.

Mahato, D., Goulding, E.H., Korach, K.S., Eddy, E.M. Estrogen receptor- α is required by the supporting somatic cells for spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 178: 57-63.

Majno, G., Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3.

Marathe, C.K., Shetty, J., Dighe, R.R. Selective immunoneutralization of luteinizing hormone results in the apoptotic cell death of pachytene spermatocytes and spermatids in the rat testis. *Endocrine* 1995; 3: 705-709.

Markov, A.G., Aschenbach, J.R., Amasheh, S. Claudin clusters as determinants of epithelial barrier function. *IUBMB life* 2015; 67: 29-35.

Marshall, G.R., Jockenhövel, F., Lüdecke, D., Nieschlag, E. Maintenance of complete but quantitatively reduced spermatogenesis in hypophysectomized monkeys by testosterone alone. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1986; 113: 424.

Martín-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998; 142: 117-127.

Martinova, Y., Kantcheva, L., Tzvetkov, D. Testicular ultrastructure in infertile men. *Arch Androl* 1989; 22: 103-122.

Matsuda, M., Kubo, A., Furuse, M., Tsukita, S. A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *J Cell Sci* 2004; 117: 1247-1257.

Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R.G., Arimura, A., Schally, A. Structure of the porcine LH-and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 43: 1334-1339.

Maymon, B.B.-S., Yogev, L., Paz, G., Kleiman, S.E., Schreiber, L., Botchan, A., Hauser, R., Yavetz, H. Sertoli cell maturation in men with azoospermia of different etiologies. *Fertil Steril* 2002; 77: 904-909.

McCabe, M.J., Tarulli, G.A., Meachem, S.J., Robertson, D.M., Smooker, P.M., Stanton, P.G. Gonadotropins Regulate Rat Testicular Tight Junctions in Vivo. *Endocrinology* 2010; 151: 2911-2922.

McCabe, M.J., Allan, C.M., Foo, C.F., Nicholls, P.K., McTavish, K.J., Stanton, P.G. Androgen initiates Sertoli cell tight junction formation in the hypogonadal (hpg) mouse. *Biol Reprod* 2012; 87: 38, 31-38.

McCarthy, K.M., Skare, I.B., Stankewich, M.C., Furuse, M., Tsukita, S., Rogers, R.A., Lynch, R.D., Schneeberger, E.E. Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 1996; 109: 2287-2298.

McLachlan, R.I., Wreford, N.G., De Kretser, D.M., Robertson, D.M. The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized adult rat. *Endocrinology* 1995; 136: 4035-4043.

Meachem, S.J., McLachlan, R.I., De Kretser, D.M., Robertson, D.M., Wreford, N.G. Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. *Biol Reprod* 1996; 54: 36-44.

Meachem, S.J., Stanton, P.G., Schlatt, S. Follicle-stimulating hormone regulates both Sertoli cell and spermatogonial populations in the adult photoinhibited Djungarian hamster testis. *Biol Reprod* 2005; 72: 1187-1193.

Meehan, T., Schlatt, S., O' Bryan, M.K., De Kretser, D.M., Loveland, K.L. Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH. *Dev Biol* 2000; 220: 225-237.

Mendis-Handagama, S.M. Luteinizing hormone on Leydig cell structure and function. *Histol Histopathol* 1997; 12: 869-882.

Meng, J., Holdcraft, R.W., Shima, J.E., Griswold, M.D., Braun, R.E. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 16696-16700.

Merlet, J., Racine, C., Moreau, E., Moreno, S.G., Habert, R. Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 3615-3620.

Miller, L.A., Johns, B.E., Killian, G.J. Immunocontraception of white-tailed deer with GnRH vaccine. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44: 266-274.

Miller, W.L., Auchus, R.J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 2011; 32: 81-151.

Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett* 2011; 585: 606-612.

Mital, P., Hinton, B.T., Dufour, J.M. The blood-testis and blood-epididymis-barriers are more than just their tight junctions. *Biol Reprod* 2011; 84: 851-858.

Mitic, L., Anderson, J. Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 121-142.

Mitic, L.L., Van Itallie, C.M., Anderson, J.M. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G250-G254.

Mok, B.W., Yeung, W.S., Luk, J.M. Differential expression of gap-junction gene connexin 31 in seminiferous epithelium of rat testes. *FEBS Lett* 1999; 453: 243-248.

Monleón, E., Noya, A., Garza, M.C., Ripoll, G., Sanz, A. Effects of an anti-gonadotrophin releasing hormone vaccine on the morphology, structure and function of bull testes. *Theriogenology* 2020; 141: 211-218.

Mora, J.D. Classification of several types of maturational arrest of spermatogonia according to Sertoli cell morphology: an approach to aetiology. *Int J Androl* 1998; 21: 317-326.

Morales, A., Mohamed, F., Cavicchia, J.C. Apoptosis and blood–testis barrier during the first spermatogenic wave in the pubertal rat. *Anat Rec* 2007; 290: 206-214.

Moroi, S., Saitou, M., Fujimoto, K., Sakakibara, A., Furuse, M., Yoshida, O., Tsukita, S. Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998; 274: 1708-1717.

Morrow, C.M., Mruk, D., Cheng, C.Y., Hess, R.A. Claudin and occludin expression and function in the seminiferous epithelium. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365: 1679-1696.

Mruk, D.D., Cheng, C.Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev* 2004; 25: 747-806.

Mruk, D.D., Cheng, C.Y. The mammalian blood-testis barrier: its biology and regulation. *Endocr Rev* 2015; 36: 564-591.

Mulisch, M., Welsch, U. (2015) *Romeis-Mikroskopische Technik*. Springer-Verlag. 1-570

Mutembei, H., Pesch, S., Schuler, G., Hoffmann, B. Expression of oestrogen receptors α and β and of aromatase in the testis of immature and mature boars. *Reprod Domest Anim* 2005; 40: 228-236.

Mutembei, H.M.I. Expression of estrogen receptors alpha and beta, aromatase, steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in testes of immature and mature boars. *Diss. med. vet.* 2006. Justus-Liebig-Universität Gießen.

Neaves, W.B. The pattern of gonadotropin-induced change in plasma testosterone, testicular esterified cholesterol and Leydig cell lipid droplets in immature mice. *Biol Reprod* 1978; 19: 864-871.

Needham, T., Lambrechts, H., Hoffman, L. Castration of male livestock and the potential of immunocastration to improve animal welfare. *S Afr J Anim Sci* 2017; 47: 731-742.

Nicander, L., Bane, A. Fine structure of boar spermatozoa. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1962; 57: 390-405.

Nickel, R. (2004) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band II: Eingeweide.* Georg Thieme Verlag. 341-371

Niederberger, B.A., Busada, J.T., Geyer, C.B. Marker expression reveals heterogeneity of spermatogonia in the neonatal mouse testis. *Reproduction* 2015; 149: 329-338.

Nishimura, H., L' Hernault, S.W. Spermatogenesis. *Curr Biol* 2017; 27: 988-994.

Nusrat, A., Brown, G.T., Tom, J., Drake, A., Bui, T.T., Quan, C., Mrsny, R.J. Multiple protein interactions involving proposed extracellular loop domains of the tight junction protein occludin. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 1725-1734.

O' Hara, L., McInnes, K., Simitsidellis, I., Morgan, S., Atanassova, N., Slowikowska-Hilczer, J., Kula, K., Szarras-Czapnik, M., Milne, L., Mitchell, R.T., Smith, L.B. Autocrine androgen action is essential for Leydig cell maturation and function, and protects against late-onset Leydig cell apoptosis in both mice and men. *FASEB J* 2015; 29: 894-910.

O' Shaughnessy, P.J. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 29: 55-65.

O' Donnell, L., McLachlan, R.L., Wreford, N.G., De Kretser, D.M. Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 1996; 55: 895-901.

O' Donnell, L., Stanton, P.G., Bartles, J.R., Robertson, D.M. Sertoli cell ectoplasmic specializations in the seminiferous epithelium of the testosterone-suppressed adult rat. *Biol Reprod* 2000; 63: 99-108.

Oakberg, E.F. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat* 1956; 99: 507-516.

Oatley, M.J., Racicot, K.E., Oatley, J.M. Sertoli cells dictate spermatogonial stem cell niches in the mouse testis. *Biol Reprod* 2011; 84: 639-645.

Oduwole, O.O., Peltoketo, H., Poliandri, A., Vengadabady, L., Chrusciel, M., Doroszko, M., Samanta, L., Owen, L., Keevil, B., Rahman, N.A., Huhtaniemi, I.T. Constitutively active follicle-stimulating hormone receptor enables androgen-independent spermatogenesis. *J Clin Invest* 2018; 128: 1787-1792.

Ohnuma, K., Kaneko, H., Noguchi, J., Kikuchi, K., Ozawa, M., Hasegawa, Y. Production of inhibin A and inhibin B in boars: Changes in testicular and circulating levels of dimeric inhibins and characterization of inhibin forms during testis growth. *Domest Anim Endocrinol* 2007; 33: 410-421.

Ojeda, S., Lomniczi, A., Sandau, U. Glial–gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 732-742.

Olesen, I.A., Sonne, S.B., Hoei-Hansen, C.E., Rajpert-Demeyts, E., Skakkebaek, N.E. Environment, testicular dysgenesis and carcinoma in situ testis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007; 21: 462-478.

Oliveira, C.A., Carnes, K., França, L.R., Hess, R.A. Infertility and testicular atrophy in the antiestrogen-treated adult male rat. *Biol Reprod* 2001; 65: 913-920.

Orth, J.M., Higginbotham, C.A., Salisbury, R.L. Hemicastration causes and testosterone prevents enhanced uptake of [3H] thymidine by Sertoli cells in testes of immature rats. *Biol Reprod* 1984; 30: 263-270.

Orth, J.M., Gunsalus, G.L., Lamperti, A.A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 1988; 122: 787-794.

Oyamada, M., Oyamada, Y., Takamatsu, T. Regulation of connexin expression. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1719: 6-23.

Padmanabhan, V., McNeilly, A.S. Is there an FSH-releasing factor? *Reproduction* 2001; 121: 21-30.

Pakarainen, T., Zhang, F.-P., Mäkelä, S., Poutanen, M., Huhtaniemi, I. Testosterone replacement therapy induces spermatogenesis and partially restores fertility in luteinizing hormone receptor knockout mice. *Endocrinology* 2005; 146: 596-606.

Pardyak, L., Kaminska, A., Brzoskwinia, M., Hejmej, A., Kotula-Balak, M., Jankowski, J., Ciereszko, A., Bilinska, B. Differential expression of cell-cell junction proteins in the testis, epididymis, and ductus deferens of domestic turkeys (*Meleagris gallopavo*) with white and yellow semen. *Poult Sci* 2020; 99: 555-566.

Pareek, T.K., Joshi, A.R., Sanyal, A., Dighe, R.R. Insights into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists. *Apoptosis* 2007; 12: 1085-1100.

Park, E.-S., Tilly, J.L. Use of DEAD-box polypeptide-4 (Ddx4) gene promoter-driven fluorescent reporter mice to identify mitotically active germ cells in post-natal mouse ovaries. *Mol Hum Reprod* 2015; 21: 58-65.

Parreira, G.G., Melo, R.C.N., Russell, L.D. Relationship of Sertoli-Sertoli tight junctions to ectoplasmic specialization in conventional and en face views. *Biol Reprod* 2002; 67: 1232-1241.

Patel, K. Follistatin. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 1087-1093.

Pauly, C., Spring, P., O' Doherty, J., Kragten, S.A., Bee, G. Growth performance, carcass characteristics and meat quality of group-penned surgically castrated, immunocastrated (Improvac®) and entire male pigs and individually penned entire male pigs. *Animal* 2009; 3: 1057-1066.

Pelletier, R.M. The distribution of connexin 43 is associated with the germ cell differentiation and with the modulation of the Sertoli cell junctional barrier in continual (guinea pig) and seasonal breeders' (mink) testes. *J Androl* 1995; 16: 400-409.

Pentikäinen, V., Erkkilä, K., Suomalainen, L., Parvinen, M., Dunkel, L. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2057-2067.

Pierce, J.G., Parsons, T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 1981; 50: 465-495.

Plum, A., Hallas, G., Magin, T., Dombrowski, F., Hagendorff, A., Schumacher, B., Wolpert, C., Kim, J., Lamers, W., Evert, M. Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol* 2000; 10: 1083-1091.

Pointis, G., Segretain, D. Role of connexin-based gap junction channels in testis. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 300-306.

Pokutta, S., Weis, W.I. The cytoplasmic face of cell contact sites. *Curr Opin Struct Biol* 2002; 12: 255-262.

Prapaiwan, N., Manee-In, S., Moonarmart, W., Srisuwatanasagul, S. The expressions in oxytocin and sex steroid receptors in the reproductive tissues of normal and unilateral cryptorchid dogs. *Theriogenology* 2017; 100: 59-65.

Print, C.G., Loveland, K.L. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 2000; 22: 423-430.

Pummi, K., Malminen, M., Aho, H., Karvonen, S.-L., Peltonen, J., Peltonen, S. Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1050-1058.

Raeseide, J., Renaud, R., Marshall, D. Identification of 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol and 3 β -hydroxy-5 α -androstan-17-one sulfates as quantitatively significant secretory products of porcine leydig cells and their presence in testicular venous blood. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 42: 113-120.

Rago, V., Maggiolini, M., Vivacqua, A., Palma, A., Carpino, A. Differential expression of estrogen receptors (ER α /ER β) in testis of mature and immature pigs. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004; 281A: 1234-1239.

Ramesh, R., Pearl, C.A., At-Taras, E., Roser, J.F., Berger, T. Ontogeny of androgen and estrogen receptor expression in porcine testis: effect of reducing testicular estrogen synthesis. *Anim Reprod Sci* 2007; 102: 286-299.

Reddy Dyhana, R., Rajendranath, N., Pramod Kumar, D., Raghavender, K. Microanatomical studies on the testis of domestic pig (*Sus scrofa domestica*). *Int J Sci Environ Tech* 2016; 5: 2226-2231.

Reiter, S. Einfluss einer GnRH Vakzine auf Verhalten, Schlachtkörperqualität, Leistungs-sowie endokrine Parameter bei männlichen Mastschweinen. Diss. med. vet. 2018. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Richburg, J.H., Redenbach, D.M., Boekelheide, K. Seminiferous tubule fluid secretion is a Sertoli cell microtubule-dependent process inhibited by 2, 5-hexanedione exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 128: 302-309.

Risley, M.S., Tan, I.P., Roy, C., Saez, J.C. Cell-, age-and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J Cell Sci* 1992; 103: 81-96.

Robertson, K.M., Simpson, E.R., Lacham-Kaplan, O., Jones, M.E. Characterization of the fertility of male aromatase knockout mice. *J Androl* 2001; 22: 825-830.

Robic, A., Faraut, T., Prunier, A. Pathways and genes involved in steroid hormone metabolism in male pigs: a review and update. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014; 140: 44-55.

Röhrs, L. Untersuchungen der Blut-Hoden-Schranke während der Rekrudescenz der Spermatogenese nach Downregulation mittels eines slow release GnRH-Implantates beim Rüden. Diss. med. vet. 2013. Justus-Liebig-Universität Gießen

Roscoe, W.A., Barr, K.J., Amir Mhawi, A., Pomerantz, D.K., Kidder, G.M. Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 2001; 65: 829-838.

Rottner, S., Claus, R. Return of testicular function after vaccination of boars against GnRH: consequences on testes histology. *Animal* 2009; 3: 1279-1286.

Rottner, S.M. Wiederaufnahme der Hodenfunktion bei Ebern nach Immunisierung gegen das Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) mit dem kommerziellen Antigen Improvac®. Diss. med. vet. 2012. Justus-Liebig-Universität Gießen.

Russell, L., Clermont, Y. Anchoring device between Sertoli cells and late spermatids in rat seminiferous tubules. *Anat Rec* 1976; 185: 259-277.

Russell, L. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am J Anat* 1977; 148: 313-328.

Russell, L.D., Clermont, Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat Rec* 1977; 187: 347-366.

Russell, L.D. Spermatid-Sertoli tubulobulbar complexes as devices for elimination of cytoplasm from the head region of late spermatids of the rat. *Anat Rec* 1979; 194: 233-246.

Rüttinger, C. Untersuchungen zur Expression von Connexin (Cx) 43 und Connexin (Cx) 45 in Sertoli-Zellen und Keimzellen in der normalen Spermatogenese, Sertoli-Zelltumoren und Seminomen des Hundes. Diss. med. vet. 2008. Justus-Liebig-Universität Gießen.

Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.-D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., Tsukita, S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 4131-4142.

Salhanick, A.I., Terner, C. Androgen synthesis in absence of Leydig and Sertoli cells in a germ cell fraction from rat seminiferous tubules. *Biol Reprod* 1979; 21: 293-300.

Salomon, F.-V., Geyer, H., Gille, U. (2008) Anatomie für die Tiermedizin. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 389-393

Sasaki, M., Endo, H., Kimura, J., Rerkamnuaychoke, W., Hayakawa, D., Bhuminand, D., Kitamura, N., Fukuta, K. Immunohistochemical localization of the cytoskeletal proteins in the testes of the lesser mouse deer (*Tragulus javanicus*). Mammal Study 2010; 35: 57-64.

Saunders, P.T., Sharpe, R.M., Williams, K., Macpherson, S., Urquart, H., Irvine, D.S., Millar, M.R. Differential expression of oestrogen receptor α and β proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. Mol Hum Reprod 2001; 7: 227-236.

Schally, A.V., Arimura, A., Kastin, A.J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T., Nair, R., Debeljuk, L., White, W. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. Science 1971; 173: 1036-1038.

Schmidbauer, S.-M. Lichtmikroskopische, ultrastrukturelle und immunhistochemische Untersuchungen am Hoden des Ebers (*Sus scrofa domestica*). Diss. med. vet. 2001. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Schook, L., Beattie, C., Beever, J., Donovan, S., Jamison, R., Zuckermann, F., Niemi, S., Rothschild, M., Rutherford, M., Smith, D. Swine in biomedical research: creating the building blocks of animal models. Anim Biotechnol 2005; 16: 183-190.

Segretain, D., Falk, M.M. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. Biochim Biophys Acta 2004; 1662: 3-21.

Selva, D.M., Tirado, O.M., Toràn, N., Suárez-Quian, C.A., Reventos, J., Munell, F. Estrogen receptor β expression and apoptosis of spermatocytes of mice overexpressing a rat androgen-binding protein transgene. Biol Reprod 2004; 71: 1461-1468.

Sertoli, E. On the existence of special branched cells in the seminiferous tubule of the human testes. *Morgagni* 1865; 7: 31-39.

Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C., Fisher, J.S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 2003; 125: 769-784.

Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil Steril* 2008; 89: e33-38.

Shetty, J., Marathe, G.K., Dighe, R.R. Specific immunoneutralization of FSH leads to apoptotic cell death of the pachytene spermatocytes and spermatogonial cells in the rat. *Endocrinology* 1996; 137: 2179-2182.

Show, M.D., Anway, M.D., Folmer, J.S., Zirkin, B.R. Reduced intratesticular testosterone concentration alters the polymerization state of the Sertoli cell intermediate filament cytoskeleton by degradation of vimentin. *Endocrinology* 2003; 144: 5530-5536.

Sierens, J.E., Sneddon, S.F., Collins, F., Millar, M.R., Saunders, P.T. Estrogens in testis biology. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1061: 65-76.

Singh, J., Handelsman, D.J. The effects of recombinant FSH on testosterone-induced spermatogenesis in gonadotrophin-deficient (hpg) mice. *J Androl* 1996; 17: 382-393.

Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K.M. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects: Opinion. *Hum Reprod* 2001; 16: 972-978.

Škrlep, M., Batorek, N., Bonneau, M., Prevolnik, M., Kubale, V., Čandek-Potokar, M. Effect of immunocastration in group-housed commercial fattening pigs on reproductive organs, malodorous compounds, carcass and meat quality. *Czech J Anim Sci* 2012; 57: 290-299.

Sladek, Z., Prudikova, M., Knoll, A., Kulich, P., Steinhauserova, I., Borilova, G. Effect of early immunocastration on testicular histology in pigs. *Vet Med (Praha)* 2018; 63

Sluka, P., O' Donnell, L., Bartles, J., Stanton, P.G. FSH regulates the formation of adherens junctions and ectoplasmic specialisations between rat Sertoli cells in vitro and in vivo. *J Endocrinol* 2006; 189: 381-395.

Smith, B.E., Braun, R.E. Germ cell migration across Sertoli cell tight junctions. *Science* 2012; 338: 798-802.

Sobecki, M., Mrouj, K., Colinge, J., Gerbe, F., Jay, P., Krasinska, L., Dulic, V., Fisher, D. Cell-cycle regulation accounts for variability in Ki-67 expression levels. *Cancer Res* 2017; 77: 2722-2734.

Sollerbrant, K., Raschperger, E., Mirza, M., Engström, U., Philipson, L., Ljungdahl, P.O., Pettersson, R.F. The Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) forms a complex with the PDZ domain-containing protein ligand-of-numb protein-X (LNX). *J Biol Chem* 2003; 278: 7439-7444.

Somgird, C., Homkong, P., Sripiboon, S., Brown, J.L., Stout, T.A., Colenbrander, B., Mahasawangkul, S., Thitaram, C. Potential of a gonadotropin-releasing hormone vaccine to suppress musth in captive male Asian elephants (*Elephas maximus*). *Anim Reprod Sci* 2016; 164: 111-120.

Speidel, J.J., Grossman, R.A. Addressing global health, economic, and environmental problems through family planning. *Obstet Gynecol* 2011; 117: 1394-1398.

Srisuwatanasagul, K., Prapaiwan, N., Srisuwatanasagul, S., Kunavongkrit, A., Roongsitthichai, A. Immunohistochemical study of Ki-67 protein, androgen receptor, and estrogen receptor beta in testicular tissues of male pigs immunocastrated with different times of GnRH vaccination. *Anat Histol Embryol* 2018; 47: 475-480.

Srisuwatanasagul, K., Srisuwatanasagul, S., Roongsitthichai, A. Expressions of cytochrome P450 aromatase and anti-Müllerian hormone in testes of fattening pigs by the timing of the first vaccination for immunocastration. *Reprod Domest Anim* 2020;

Stammler, A., Lüftner, B.U., Kliesch, S., Weidner, W., Bergmann, M., Middendorff, R., Konrad, L. Highly conserved testicular localization of claudin-11 in normal and impaired spermatogenesis. *PLoS One* 2016; 11: e0160349.

Steger, K., Wrobel, K.-H. Immunohistochemical demonstration of cytoskeletal proteins in the ovine testis during postnatal development. *Anat Embryol (Berl)* 1994; 189: 521-530.

Steger, K., Schimmel, M., Wrobel, K.-H. Immunocytochemical demonstration of cytoskeletal proteins in seminiferous tubules of adult rams and bulls. *Arch Histol Cytol* 1994; 57: 17-28.

Steger, K., Rey, R., Louis, F., Kliesch, S., Behre, H., Nieschlag, E., Hoepffner, W., Bailey, D., Marks, A., Bergmann, M. Reversion of the differentiated phenotype and maturation block in Sertoli cells in pathological human testis. *Hum Reprod* 1999; 14: 136-143.

Steger, K., Tetens, F., Bergmann, M. Expression of connexin 43 in human testis. *Histochem Cell Biol* 1999; 112: 215-220.

Steinberger, E. Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol Rev* 1971; 51: 1-22.

Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S., Goodenough, D.A. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 1986; 103: 755-766.

Stewart, A.J., Katz, A.A., Millar, R.P., Morgan, K. Retention and silencing of prepro-GnRH-II and Type II GnRH receptor genes in mammals. *Neuroendocrinology* 2009; 90: 416-432.

Stoop, H., Honecker, F., Cools, M., De Krijger, R., Bokemeyer, C., Looijenga, L.H. Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study. *Hum Reprod* 2005; 20: 1466-1476.

Stout, T., Turkstra, J., Meloen, R., Colenbrander, B. (2003) The efficacy of GnRH vaccines in controlling reproductive function in horses. *Managing african elephant populations: act or let die?* 59-61

Suswillo, R., Watson, P. A new light microscopy classification of spermatogenesis in the bull and the boar applicable to tissues processed for electron microscopy. *Anat Histol Embryol* 1990; 19: 326-339.

Suzuki, H., Nishizawa, T., Tani, K., Yamazaki, Y., Tamura, A., Ishitani, R., Dohmae, N., Tsukita, S., Nureki, O., Fujiyoshi, Y. Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science* 2014; 344: 304-307.

Swanlund, D.J., N'diaye, M.R., Loseth, K.J., Pryor, J.L., Crabo, B.G. Diverse testicular responses to exogenous growth hormone and follicle-stimulating hormone in prepubertal boars. *Biol Reprod* 1995; 53: 749-757.

Swierstra, E. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. *Anat Rec* 1968; 161: 171-185.

Tan, I.P., Roy, C., Sáez, J.C., Sáez, C.G., Paul, D.L., Risley, M.S. Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli cell gap junctions. *Biol Reprod* 1996; 54: 1300-1310.

Tarulli, G.A., Meachem, S.J., Schlatt, S., Stanton, P.G. Regulation of testicular tight junctions by gonadotrophins in the adult Djungarian hamster in vivo. *Reproduction* 2008; 135: 867-877.

Tarulli, G.A., Stanton, P.G., Loveland, K.L., Meyts, E.R.-D., McLachlan, R.I., Meachem, S.J. A survey of Sertoli cell differentiation in men after gonadotropin suppression and in testicular cancer. *Spermatogenesis* 2013; 3: e24014.

Thirumalai, A., Ceponis, J., Amory, J.K., Swerdloff, R., Surampudi, V., Liu, P.Y., Bremner, W.J., Harvey, E., Blithe, D.L., Lee, M.S., Hull, L., Wang, C., Page, S.T. Effects of 28 days of oral dimethandrolone undecanoate in healthy men: A prototype male pill. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; 104: 423-432.

Tokuda, M., Kadokawa, Y., Kurahashi, H., Marunouchi, T. CDH1 Is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol Reprod* 2007; 76: 130-141.

Toyama, Y. Actin-like filaments in the Sertoli cell junctional specializations in the swine and mouse testis. *Anat Rec* 1976; 186: 477-491.

Toyama, Y., Maekawa, M., Yuasa, S. Ectoplasmic specializations in the Sertoli cell: new vistas based on genetic defects and testicular toxicology. *Anat Sci Int* 2003; 78: 1-16.

Trigg, T.E., Wright, P.J., Armour, A.F., Williamson, P.E., Junaidi, A., Martin, G.B., Doyle, A.G., Walsh, J. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *J Reprod Fertil Suppl* 2001; 57: 255-261.

Tsai, M.-Y., Yeh, S.-D., Wang, R.-S., Yeh, S., Zhang, C., Lin, H.-Y., Tzeng, C.-R., Chang, C. Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 18975-18980.

Tsukita, S., Furuse, M., Itoh, M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 285-293.

Tu'uhevaha, J., Sluka, P., Foo, C.F., Stanton, P.G. Claudin-11 expression and localisation is regulated by androgens in rat Sertoli cells in vitro. *Reproduction* 2007; 133: 1169-1179.

Tuçcu, V., Gedikbaşı, A., Mutlu, B., Güner, E., Uhri, M., Andican, G., Ozbek, E., Taşçi, A. Increased testicular 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and inducible nitric oxide synthetase (iNOS) and nuclear factor κ B (NF- κ B) expressions in experimental rat varicocele. *Arch Ital Urol Androl* 2010; 82: 148-153.

Turner, L., Conway, A.J., Jimenez, M., Liu, P.Y., Forbes, E., McLachlan, R.I., Handelsman, D.J. Contraceptive efficacy of a depot progestin and androgen combination in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4659-4667.

Van Der Molen, H., Van Beurden, W., Blankenstein, M., De Boer, W., Cooke, B., Grootegoed, J., Janszen, F., De Jong, F., Mulder, E., Rommerts, F. (1979) The testis: biochemical actions of trophic hormones and steroids on steroid production and spermatogenesis. *Hormonal Steroids: Proceedings of the Fifth International Congress on Hormonal Steroids*. 13-18

Van Poppel, H., Abrahamsson, P.A. Considerations for the use of gonadotropin-releasing hormone agonists and antagonists in patients with prostate cancer. *Int J Urol* 2020;

Van Straaten, H., Wensing, C. Leydig cell development in the testis of the pig. *Biol Reprod* 1978; 18: 86-93.

Van Vorstenbosch, C.J.a.H.V., Spek, E., Colenbrander, B., Wensing, C.J.G. Sertoli cell development of pig testis in the fetal and neonatal period. *Biol Reprod* 1984; 31: 565-577.

Varanda, W.A., De Carvalho, A. Intercellular communication between mouse Leydig cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1994; 267: 563-569.

Vogl, A.W., Vaid, K.S., Guttman, J.A. The Sertoli cell cytoskeleton. In: *Molecular mechanisms in spermatogenesis*: Springer Verlag 2009: 186-211.

Von Leydig, F. Zur Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane und Anldrüsen der Säugetiere. *Z. Wiss. Zool* 1850; 2: 1-57.

Vornberger, W., Prins, G., Musto, N.A., Suarez-Quian, C.A. Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 1994; 134: 2307-2316.

Wagner, A., Jahreis, G. Nachweis von DNA-Schäden mittels Analyse von oxidierten Nukleosiden und deren Anwendung als Biomarker. *Carcinogenesis* 2000; 21: 361-370.

Wagner, A., Claus, R. Involvement of glucocorticoids in testicular involution after active immunization of boars against GnRH. *Reproduction* 2004; 127: 275-283.

Wagner, A. Steuerungsmechanismen der Spermatogenese beim Eber: Auswirkungen einer GnRH-Immunisierung und anschließender Estradiolinfusion. *Diss. med. vet.* 2005. Universität Hohenheim.

Wagner, A., Messe, N., Bergmann, M., Lekhkota, O., Claus, R. Effects of estradiol infusion in GnRH immunized boars on spermatogenesis. *J Androl* 2006; 27: 880-889.

Walker, V.R., Korach, K.S. Estrogen receptor knockout mice as a model for endocrine research. *ILAR journal* 2004; 45: 455-461.

Walker, W.H. Molecular mechanisms controlling Sertoli cell proliferation and differentiation. *Endocrinology* 2003; 144: 3719-3721.

Wang, H., Wang, H., Xiong, W., Chen, Y., Ma, Q., Ma, J., Ge, Y., Han, D. Evaluation on the phagocytosis of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells in vitro through detecting lipid droplet formation by Oil Red O staining. *Reproduction* 2006; 132: 485-492.

Wang, R.-S., Yeh, S., Chen, L.-M., Lin, H.-Y., Zhang, C., Ni, J., Wu, C.-C., Di Sant'agnese, P.A., Demesy-Bentley, K.L., Tzeng, C.-R., Chang, C. Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes. *Endocrinology* 2006; 147: 5624-5633.

Weiler, U., I Furnols, M.F., Fischer, K., Kemmer, H., Oliver, M., Gispert, M., Dobrowolski, A., Claus, R. Influence of differences in sensitivity of Spanish and German consumers to perceive androstenone on the acceptance of boar meat differing in skatole and androstenone concentrations. *Meat Sci* 2000; 54: 297-304.

Weiss, J., Guendner, M.J., Halvorson, L.M., Jameson, J.L. Transcriptional activation of the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene by activin. *Endocrinology* 1995; 136: 1885-1891.

Welsh, M., Saunders, P.T., Atanassova, N., Sharpe, R.M., Smith, L.B. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J* 2009; 23: 4218-4230.

Weng, Q., Medan, M.S., Watanabe, G., Tsubota, T., Tanioka, Y., Taya, K. Immunolocalization of steroidogenic enzymes P450scc, 3 β HSD, P450c17, and P450arom in Göttingen miniature pig testes. *J Reprod Dev* 2005; 51: 299-304.

Wicks, N., Crouch, S., Pearl, C.A. Effects of Improvac and Bopriva on the testicular function of boars ten weeks after immunization. *Anim Reprod Sci* 2013; 142: 149-159.

Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U., Söhl, G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 2002; 383: 725-737.

Willems, A., Batlouni, S.R., Esnal, A., Swinnen, J.V., Saunders, P.T., Sharpe, R.M., França, L.R., De Gendt, K., Verhoeven, G. Selective ablation of the androgen receptor in mouse Sertoli cells affects sertoli cell maturation, barrier formation and cytoskeletal development. *PLoS One* 2010; 5: e14168.

Wittchen, E.S., Haskins, J., Stevenson, B.R. Protein interactions at the tight junction actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem* 1999; 274: 35179-35185.

Wohlfahrt-Veje, C., Main, K.M., Skakkebaek, N.E. Testicular dysgenesis syndrome: foetal origin of adult reproductive problems. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009; 71: 459-465.

Wong, C.-H., Mruk, D.D., Lui, W.-Y., Cheng, C.Y. Regulation of blood-testis barrier dynamics: an in vivo study. *J Cell Sci* 2004; 117: 783-798.

Wright, W.W., Frankel, A.I. An androgen receptor in the nuclei of late spermatids in testes of male rats. *Endocrinology* 1980; 107: 314-318.

Wrobel, K.-H., Schimmel, M. Morphology of the bovine Sertoli cell during the spermatogenetic cycle. *Cell Tissue Res* 1989; 257: 93-103.

Wrobel, K.-H., Reichold, J., Schimmel, M. Quantitative morphology of the ovine seminiferous epithelium. *Ann Anat* 1995; 177: 19-32.

Wu, S., Lv, L., Li, L., Wang, L., Mao, B., Li, J., Shen, X., Ge, R., Wong, C.K.C., Sun, F., Cheng, C.Y. KIF15 supports spermatogenesis via its effects on Sertoli cell microtubule, actin, vimentin, and septin cytoskeletons. *Endocrinology* 2021; 162

Yan, H.H., Mruk, D.D., Lee, W.M., Yan Cheng, C. Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *FASEB J* 2008; 22: 1945-1959.

Yeager, M., Gilula, N.B. Membrane topology and quaternary structure of cardiac gap junction ion channels. *J Mol Biol* 1992; 223: 929-948.

Yoon, S.P. Apurinic/aprimidinic endonuclease immunoreactivity in germ cells of experimental varicocele-induced rat testes. *Acta Histochem* 2013; 115: 887-892.

You, K., Xu, X., Fu, J., Xu, S., Yue, X., Yu, Z., Xue, X. Hyperoxia disrupts pulmonary epithelial barrier in newborn rats via the deterioration of occludin and ZO-1. *Respir Res* 2012; 13: 1-11.

You, S., Li, W., Lin, T. Expression and regulation of connexin43 in rat Leydig cells. *J Endocrinol* 2000; 166: 447-454.

Yuen, F., Nguyen, B.T., Swerdloff, R.S., Wang, C. Continuing the search for a hormonal male contraceptive. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2020;

Zamaratskaia, G., Rydhmer, L., Andersson, H.K., Chen, G., Lowagie, S., Andersson, K., Lundström, K. Long-term effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac®, on hormonal profile and behaviour of male pigs. *Anim Reprod Sci* 2008; 108: 37-48.

Zamaratskaia, G., Rasmussen, M.K. Immunocastration of male pigs – situation today. *Procedia Food Sci* 2015; 5: 324-327.

Zduńczyk, S., Janowski, T., Raś, A., Barański, W. Concentrations of oestrogens in blood plasma and seminal plasma of boars during the postpuberal period. *Pol J Vet Sci* 2011; 14: 539-544.

Zhang, B., Guo, Y. Supplemental zinc reduced intestinal permeability by enhancing occludin and zonula occludens protein-1 (ZO-1) expression in weaning piglets. *Br J Nutr* 2009; 102: 687-693.

Zhang, F.-P., Poutanen, M., Wilbertz, J., Huhtaniemi, I. Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of Luteinizing Hormone Receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 172-183.

Zhang, F.-P., Pakarainen, T., Zhu, F., Poutanen, M., Huhtaniemi, I. Molecular characterization of postnatal development of testicular steroidogenesis in luteinizing hormone receptor knockout mice. *Endocrinology* 2004; 145: 1453-1463.

Zhang, R., Wen, X., Kong, L., Deng, X., Peng, B., Huang, A., Wan, Y., Yang, Z. A quantitative (stereological) study of the effects of experimental unilateral cryptorchidism and subsequent orchiopexy on spermatogenesis in adult rabbit testis. *Reproduction* 2002; 124: 95-105.

Zhang, Z., Fan, X., Xi, H., Ji, R., Shen, H., Shi, A., He, J. Effect of local scrotal heating on the expression of tight junction-associated molecule Occludin in boar testes. *Reprod Domest Anim* 2018; 53: 458-462.

Zhong, Y., Saitoh, T., Minase, T., Sawada, N., Enomoto, K., Mori, M. Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *J Cell Biol* 1993; 120: 477-483.

Zhou, X., Kudo, A., Kawakami, H., Hirano, H. Immunohistochemical localization of androgen receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development. *Anat Rec* 1996; 245: 509-518.

Zhu, L.-J., Hardy, M.P., Inigo, I.V., Huhtaniemi, I., Bardin, C.W., Moo-Young, A.J. Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Reprod* 2000; 63: 368-376.

Zirkin, B.R., Papadopoulos, V. Leydig cells: formation, function, and regulation†. *Biol Reprod* 2018; 99: 101-111.

Zoetis Deutschland GmbH. Improvac 2021:
<https://www.zoetis.de/products/seiten/improvac/prescribinginfo.aspx>. 20.03.2021.

Zoetis New Zealand Limited. Improvac 2021:
<http://www.improvac.com/nz/prescribing-info.aspx>. 20.03.2021.

1.2. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1:	AUFBAU EINER SPERMATOZOE.....	8
ABBILDUNG 2:	ANORDNUNG DER AKTINFILAMENTE IN SERTOLI-ZELLEN	12
ABBILDUNG 3:	ANORDNUNG DER AKTINFILAMENTE AN ZWEI ANGRENZENDEN SERTOLI-ZELLEN.....	13
ABBILDUNG 4:	ZELLVERBINDUNGEN ZWISCHEN SERTOLI-ZELLEN SOWIE ZWISCHEN SERTOLI- UND KEIMZELLEN.....	17
ABBILDUNG 5:	ÜBERSICHT ÜBER DIE GNRH-AKTIVITÄT UND DESSEN ZIELZELLEN (KNOL, 1991).....	19
ABBILDUNG 6:	AUFBAU DER ZONULA OCCLUDENS.....	33
ABBILDUNG 7:	BILDUNG, WIRKUNGSORT UND ABBAU DER CONNEXINE (SEGRETAIN UND FALK, 2004).	40
ABBILDUNG 8:	ENTNAHMESTELLE DER GEWEBEPROBEN FÜR DIESE STUDIE (EIGENE DARSTELLUNG).....	49
ABBILDUNG 9:	ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI VON INTAKTEN EBERN DER GRUPPE 1. TRICHRON-FÄRBUNG NACH MASSON UND GOLDNER.....	62
ABBILDUNG 10:	ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI VON INTAKTEN EBERN DER GRUPPE 1. TRICHRON-FÄRBUNG NACH MASSON UND GOLDNER.....	63
ABBILDUNG 11:	ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI UND LEYDIG-ZELLEN IM HODEN EINES INTAKTEN EBERS. TRICHRON-FÄRBUNG NACH MASSON UND GOLDNER.	64
ABBILDUNG 12:	ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI UND LEYDIG ZELLEN IM HODEN EINES INTAKTEN EBERS. H.E.-FÄRBUNG.....	65
ABBILDUNG 13:	ÜBERSICHTSAUFNAHME VOM KEIMEPITHEL EINES INTAKTEN EBERS. H.E. FÄRBUNG.	66
ABBILDUNG 14:	ÜBERSICHTSAUFNAHME VAKZINierter TIERE AUS GRUPPE 2. H.E.-FÄRBUNG.....	68

ABBILDUNG 15: ÜBERSICHTSAUFNAHME VON VAKZINIERTEN TIEREN DER GRUPPE 2. TRICHRUM-FÄRBUNG NACH MASSON UND GOLDNER.....	69
ABBILDUNG 16: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES TIERES AUS GRUPPE 2. H.E.-FÄRBUNG.	70
ABBILDUNG 17: ÜBERSICHTSAUFNAHME EINES TIERES DER GRUPPE 3. H.E.- FÄRBUNG.	71
ABBILDUNG 18: ÜBERSICHTSAUFNAHME EINES TIERES DER GRUPPE 3. H.E.-FÄRBUNG.	72
ABBILDUNG 19: VERGRÖßERUNGS-AUFNAHME EINES TIERES AUS GRUPPE 2 MIT EBERÄHNLICHEM AUSSEHEN. TRICHRUM-FÄRBUNG NACH MASSON UND GOLDNER.....	73
ABBILDUNG 20: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES TIERES AUS GRUPPE 4. H.E.-FÄRBUNG.	75
ABBILDUNG 21: ÜBERSICHTSAUFNAHME DES GLEICHEN TIERES DER GRUPPE 4 (ABBILDUNG 20). H.E.-FÄRBUNG.	76
ABBILDUNG 22: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES ANDEREN TIERES AUS GRUPPE 4. H.E.-FÄRBUNG.	77
ABBILDUNG 23: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES TIERES AUS GRUPPE 5. H.E.-FÄRBUNG.	80
ABBILDUNG 24: ÜBERSICHTSAUFNAHMEN DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES TIERES AUS GRUPPE 5. H.E.-FÄRBUNG.	81
ABBILDUNG 25: ÜBERSICHTSAUFNAHME EINES TIERES AUS GRUPPE 5. TRICHRUM-FÄRBUNG NACH MASSON UND GOLDNER.....	82
ABBILDUNG 26: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES INTAKTEN EBERS; SOX-9.	87
ABBILDUNG 27: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES INTAKTEN EBERS; SOX-9.	88
ABBILDUNG 28: ÜBERSICHTSAUFNAHME DES KEIMEPITHEL EINES INTAKTEN EBERS; SOX-9.....	89

ABBILDUNG 29: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORI EINES TIERES AUS GRUPPE 2; SOX-9.	91
ABBILDUNG 30: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORI EINES TIERES AUS GRUPPE 3; SOX-9.	92
ABBILDUNG 31: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES TIERES AUS GRUPPE 4; SOX-9.....	93
ABBILDUNG 32: ÜBERSICHTSAUFNAHMEN DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES TIERES AUS GRUPPE 5A; SOX-9.....	94
ABBILDUNG 33: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES TIERES AUS GRUPPE 5B; SOX-9.	95
ABBILDUNG 34: ÜBERSICHTSAUFNAHME EINES TIERES AUS GRUPPE 5B; SOX-9.	96
ABBILDUNG 35: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES INTAKTEN EBERS; VIMENTIN.	99
ABBILDUNG 36: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES INTAKTEN EBERS AUS GRUPPE 1; VIMENTIN.	100
ABBILDUNG 37: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES VAKZINIERTEN EBERS AUS GRUPPE 2; VIMENTIN.	102
ABBILDUNG 38: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES VAKZINIERTEN EBERS DER GRUPPE 2; VIMENTIN.	103
ABBILDUNG 39: ÜBERSICHTSAUFNAHME DES TUBULUS-QUERSCHNITTS EINES TIERES AUS GRUPPE 3; VIMENTIN.	104
ABBILDUNG 40: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES TIERES DER GRUPPE 4; VIMENTIN.	105
ABBILDUNG 41: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES TIERES AUS GRUPPE 5B; VIMENTIN.	106
ABBILDUNG 42: VERGRÖßERUNGS-AUFNAHME EINES TUBULUS-QUERSCHNITTS EINES TIERES AUS GRUPPE 5B; VIMENTIN.	107
ABBILDUNG 43: ÜBERSICHTSAUFNAHME DES HODENEPITHEL EINES INTAKTEN EBERS DER GRUPPE 1; DDX-4.....	108

ABBILDUNG 44: VERGRÖßERUNGS-AUFNAHME EINES TUBULUS-ANSCHNITTS EINES INTAKTEN EBERS AUS GRUPPE 1; DDX-4.....	109
ABBILDUNG 45: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES VAKZINIERTEN EBERS AUS GRUPPE 3; DDX-4.....	110
ABBILDUNG 46: VERGRÖßERUNG DES HODENEPITHEL EINES TIERES AUS GRUPPE 3; DDX-4.	111
ABBILDUNG 47: ÜBERSICHTSAUFNAHME EINES TUBULUS-QUERSCHNITTS EINES TIERES AUS GRUPPE 4; DDX-4.....	113
ABBILDUNG 48: ÜBERSICHTSAUFNAHME DES KEIMEPITHEL EINES TIERES AUS GRUPPE 4; DDX-4.....	114
ABBILDUNG 49: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES TIERES AUS GRUPPE 5A; DDX-4.	115
ABBILDUNG 50: ÜBERSICHTSAUFNAHME DES KEIMEPITHEL EINES TIERES AUS GRUPPE 5B; DDX-4.	116
ABBILDUNG 51: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES INTAKTEN EBERS; KI67.	120
ABBILDUNG 52: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES INTAKTEN EBERS; KI67.	121
ABBILDUNG 53: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES INTAKTEN EBERS; KI67.	122
ABBILDUNG 54: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES VAKZINIERTEN TIERES AUS GRUPPE 2; KI67.	123
ABBILDUNG 55: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES VAKZINIERTEN TIERES AUS GRUPPE 3; KI67.	124
ABBILDUNG 56: VERGRÖßERUNGS-AUFNAHME VON EINEM TUBULUS ANSCHNITT EINES TIERES AUS GRUPPE 5; KI67.....	125
ABBILDUNG 57: VERGRÖßERUNGS-AUFNAHME VON EINEM TUBULUS ANSCHNITT EINES ANDEREN TIERES AUS GRUPPE 5; KI67.	126

ABBILDUNG 58:	ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES INTAKTEN EBERS; 8-OHG.	128
ABBILDUNG 59:	ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES VAKZINIERTEN TIERES AUS GRUPPE 2; 8-OHG.	130
ABBILDUNG 60:	ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES VAKZINIERTEN TIERES AUS GRUPPE 5; 8-OHG.	131
ABBILDUNG 61:	ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES INTAKTEN EBERS; OCCLUDIN.	133
ABBILDUNG 62:	ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES INTAKTEN EBERS; OCCLUDIN.	134
ABBILDUNG 63:	ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES VAKZINIERTEN TIERES AUS GRUPPE 2; OCCLUDIN.	135
ABBILDUNG 64:	ÜBERSICHTSAUFNAHME DES KEIMEPITHELS EINES TIERES AUS GRUPPE 5B; OCCLUDIN.	136
ABBILDUNG 65:	ÜBERSICHTSAUFNAHME EINES TUBULUS-QUERSCHNITTS VON EINEM INTAKTEN EBER; CLAUDIN-3.	138
ABBILDUNG 66:	ÜBERSICHTSAUFNAHME EINES TUBULUS-QUERSCHNITTS EINES INTAKTEN EBERS; CLAUDIN-3.....	139
ABBILDUNG 67:	ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES VAKZINIERTEN TIERES AUS GRUPPE 2; CLAUDIN-3.....	141
ABBILDUNG 68:	ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES INTAKTEN EBERS AUS GRUPPE 1; CONNEXIN-43.....	143
ABBILDUNG 69:	ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES INTAKTEN EBERS AUS GRUPPE 1; CONNEXIN-43.....	144
ABBILDUNG 70:	ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES VAKZINIERTEN TIERES AUS GRUPPE 2; CONNEXIN-43.....	146

ABBILDUNG 71: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES VAKZINIERTEN TIERES AUS GRUPPE 3; CONNEXIN-43.....	147
ABBILDUNG 72: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES VAKZINIERTEN TIERES AUS GRUPPE 5B; CONNEXIN-43.....	148
ABBILDUNG 73: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES VAKZINIERTEN TIERES AUS GRUPPE 5B; CONNEXIN-43.....	149
ABBILDUNG 74: ÜBERSICHTSAUFNAHME VON EINEM QUERANSCHNITT DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES INTAKTEN EBERS; ESTROGEN-REZEPTOR A.	151
ABBILDUNG 75: VERGRÖßERUNGS-AUFNAHME VON EINEM TUBULUS-QUERSCHNITT EINES INTAKTEN EBERS; ESTROGEN-REZEPTOR A.	152
ABBILDUNG 76: QUERANSCHNITT DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES TIERES DER GRUPPE 3; ESTROGEN-REZEPTOR A.	153
ABBILDUNG 77: TUBULUS-ANSCHNITT EINES TIERES DER GRUPPE 2; ESTROGEN-REZEPTOR A.....	154
ABBILDUNG 78: ÜBERSICHTSAUFNAHME VON EINEM TUBULUS-QUERSCHNITTS EINES INTAKTEN EBERS; ESTROGEN-REZEPTOR B.	155
ABBILDUNG 79: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES TIERES AUS GRUPPE 2; ESTROGEN-REZEPTOR B.	157
ABBILDUNG 80: ÜBERSICHTSAUFNAHME EINES TUBULUS-QUERSCHNITTS VON EINEM TIER AUS GRUPPE 5B; ESTROGEN-REZEPTOR B.	158
ABBILDUNG 81: ÜBERSICHTSAUFNAHME EINES TUBULUS VON EINEM TIER AUS GRUPPE 1; FSH-REZEPTOR.....	160
ABBILDUNG 82: ÜBERSICHTSAUFNAHME EINES TIERES AUS GRUPPE 2; FSH-REZEPTOR.....	161

ABBILDUNG 83: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES TIERES AUS GRUPPE 4; FSH-REZEPTOR.	162
ABBILDUNG 84: ÜBERSICHTSAUFNAHME EINES TUBULUS SEMINIFERUS CONTORTUS EINES TIERES AUS GRUPPE 4; FSH-REZEPTOR.	163
ABBILDUNG 85: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES INTAKTEN EBERS; TESTOSTERON.	165
ABBILDUNG 86: ÜBERSICHTSAUFNAHME VOM INTERSTITIUM EINES INTAKTEN EBERS; TESTOSTERON.	166
ABBILDUNG 87: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES VAKZINIERTEN EBERS DER GRUPPE 2; TESTOSTERON.	167
ABBILDUNG 88: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES VAKZINIERTEN TIERES AUS GRUPPE 4; TESTOSTERON.	168
ABBILDUNG 89: ÜBERSICHTSAUFNAHME VON EINEM TUBULUS-QUERSCHNITT EINES VAKZINIERTEN EBERS DER GRUPPE 5; TESTOSTERON.	169
ABBILDUNG 90: ÜBERSICHTSAUFNAHME EINES TIERES AUS DER GRUPPE 5A; TESTOSTERON.	170
ABBILDUNG 91: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI EINES INTAKTEN EBERS; ANDROGEN-REZEPTOR.	183
ABBILDUNG 92: ÜBERSICHTSAUFNAHME VON EINEM TUBULUS-QUERSCHNITT EINES INTAKTEN EBERS; ANDROGEN-REZEPTOR.	184
ABBILDUNG 93: ÜBERSICHTSAUFNAHME DER TUBULI EINES TIERES AUS GRUPPE 3; ANDROGEN-REZEPTOR.	186
ABBILDUNG 94: ÜBERSICHTSAUFNAHME EINES TUBULUS SEMINIFERUS CONTORTUS EINES TIERES AUS GRUPPE 5B; ANDROGEN-REZEPTOR.	187

1.3. Graphikverzeichnis

GRAPHIK 1:	ANZAHL DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI PRO GESICHTSFELD.....	83
GRAPHIK 2:	FLÄCHE DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI.....	84
GRAPHIK 3:	KEIMEPITHEL DER TUBULI SEMINIFERI CONTORTI.....	85
GRAPHIK 4:	SERTOLI-ZELLEN PRO TUBULUS-QUERANSCHNITT.....	97
GRAPHIK 5:	RELATIVE HÄUFIGKEITEN DER KLEINEN SPERMATOGONIEN.....	117
GRAPHIK 6:	RELATIVE HÄUFIGKEITEN DER MITTELGROBEN SPERMATOGONIEN.....	118
GRAPHIK 7:	RELATIVE HÄUFIGKEITEN DER GROBEN SPERMATOGONIEN.....	119
GRAPHIK 8:	MITOSEN PRO TUBULUS-QUERSCHNITT.....	127
GRAPHIK 9:	GESTAPELTES BALKENDIAGRAMM LEYDIG-ZELLZYTOPLASMA.....	171
GRAPHIK 10:	GESTAPELTES BALKENDIAGRAMM LEYDIG-ZELLNUKLEUS.....	172
GRAPHIK 11:	TESTOSTERONWERTE IN DEN UNTERSCHIEDLICHEN GRUPPEN.....	173
GRAPHIK 12:	ANZAHL DER TUBULI PRO GESICHTSFELD IN ABHÄNGIGKEIT DER TESTOSTERON-KONZENTRATIONEN.....	175
GRAPHIK 13:	GRÖßE DER TUBULUS-QUERSCHNITTSFLÄCHE IN ABHÄNGIGKEIT DER TESTOSTERON-KONZENTRATIONEN.....	176
GRAPHIK 14:	ANZAHL DER SERTOLI-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT DER TESTOSTERON-KONZENTRATIONEN.....	177
GRAPHIK 15:	ANZAHL DER MITOSEN IN ABHÄNGIGKEIT DER TESTOSTERON-KONZENTRATIONEN.....	178
GRAPHIK 16:	VORKOMMEN KLEINER SPERMATOGONIEN IN ABHÄNGIGKEIT DER TESTOSTERON-KONZENTRATION.....	179

GRAPHIK 17:	VORKOMMEN GROßER SPERMATOGONIEN IN ABHÄNGIGKEIT DER TESTOSTERON- KONZENTRATIONEN.....	180
GRAPHIK 18:	VORKOMMEN DES LEYDIG-ZELLZYTOPLASMAS IN ABHÄNGIGKEIT DER TESTOSTERON- KONZENTRATIONEN.....	181
GRAPHIK 19:	KLASSIFIKATION DES LEYDIG-ZELLNUKLEUS IN ABHÄNGIGKEIT DER TESTOSTERON-KONZENTRATION.	182

1.4. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1:	GRUPPENEINTEILUNG UND VAKZINATIONSZEITPUNKTE	48
TABELLE 2:	UNTERSUCHTE ANTIKÖRPER DIESER STUDIE	53
TABELLE 3:	IMMUNHISTOCHEMISCHE AUFBEREITUNG	54
TABELLE 4:	KLASSIFIKATION DER LEYDIG-ZELLEN	58
TABELLE 5:	KLASSIFIKATION DES KEIMEPITHELS	59
TABELLE 6:	KLASSIFIKATION FÜR KLEINE/MITTELGROÙE/GROÙE SPERMATOGONIEN	59
TABELLE 7:	GRUPPE 1: MEDIANWERTE FÜR SERTOLI-ZELLEN, FLÄCHE, MITOSEN UND TUBULI PRO GESICHTSFELD	67
TABELLE 8:	GRUPPE 2: MEDIANWERTE FÜR SERTOLI-ZELLEN, FLÄCHE, MITOSEN UND TUBULI PRO GESICHTSFELD	74
TABELLE 9:	GRUPPE 3: MEDIANWERTE FÜR SERTOLI-ZELLEN, FLÄCHE, MITOSEN UND TUBULI PRO GESICHTSFELD	74
TABELLE 10:	GRUPPE 4, MEDIANWERTE FÜR SERTOLI-ZELLEN, FLÄCHE, MITOSEN UND TUBULI PRO GESICHTSFELD	77
TABELLE 11:	GRUPPE 5A, MEDIANWERTE FÜR SERTOLI-ZELLEN, FLÄCHE, MITOSEN UND TUBULI PRO GESICHTSFELD	82
TABELLE 12:	GRUPPE 5B, MEDIANWERTE FÜR SERTOLI-ZELLEN, FLÄCHE, MITOSEN UND TUBULI PRO GESICHTSFELD	83
TABELLE 13:	TESTOSTERONWERTE DER VERSCHIEDENEN GRUPPEN	174
TABELLE 14:	IMMUNHISTOCHEMISCHE NACHWEISE VERWENDETER ANTIÖRPER BEI INTAKTEN EBERN	188
TABELLE 15:	IMMUNHISTOCHEMISCHE NACHWEISE VERWENDETER ANTIÖRPER BEI VAKZINIERTEN EBERN	189
TABELLE 16:	LEYDIG-ZELLZYTOPLASMA, PROZENTZAHLEN	307
TABELLE 17:	LEYDIG-ZELLNUKLEUS, PROZENTZAHLEN	308
TABELLE 18:	KEIMEPITHEL, PROZENTZAHLEN	309
TABELLE 19:	KLEINE SPERMATOGONIEN, PROZENTZAHLEN	310

TABELLE 20:	MITTELGROBE SPERMATOGONIEN, PROZENTZAHLEN	311
TABELLE 21:	GROÙE SPERMATOGONIEN, PROZENTZAHLEN	312
TABELLE 22:	TESTOSTERONWERTE DER UNTERSUCHTEN TIERE.....	313

IX. ANHANG**1.1. Lösungen für die Fixantien****1.1.1. Bouin-Lösung:**

Gesättigte Pikrinsäure	375 ml
Formalin 35 %	125 ml
Eisessig	25 ml

1.1.2. Formalin-Lösung:

Formalin 35 %, verdünnt im Verhältnis 1:10 mit PBS-Puffer

1.2. Lösungen für die lichtmikroskopischen Färbungen**1.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung:**

Eosin:	
Stammlösung:	Eosin 2 g Lösen in Aqua dest. 198 ml Einige Tropfen Formol zur Haltbarkeit
Verdünnung:	Eosin Stammlösung 60 ml in 600 ml Aqua dest. lösen 8 Tropfen Eisessig hinzugeben

Hämalaun:	
Hämatoxylin	2 g
Natriumjodat	100 g
Kalialaun	100 g
Chlorallhydrat	100 g
Kristalline Zitronensäure	2 g
(Fa. Merck Darmstadt, Deutschland)	

1.2.2. Trichrom-Färbung nach Masson und Goldner**Eisenhämatoxylin nach Weigert:**

Stammlösung A:	Hämatoxylin 1 g in 100 ml Ethanol 96 % lösen für 1 Woche
Stammlösung B:	EisenIIIchlorid ($\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$) 2,48g in 100 ml Aqua dest. lösen, Zugabe von Salzsäure (HCL) 37 %
Zusammensetzung:	Stammlösung A+B im Verhältnis 1:1 mischen

Eisessig 1%:

	Eisessig 10 ml in Aqua dest. 1 L lösen
--	--

Azophloxin-Lösung:

	Azophloxin 0,5 g in Aqua dest. 100 ml lösen, Zugabe von Eisessig 0,2 ml
--	--

Phosphormolybdänsäure-Orange:

	Phosphorwolframsäure 3-5 g in Aqua dest. 100 ml lösen Zugabe von Orange G 2 g
--	--

Lichtgrün:

	Lichtgrün 0,2 g Lösen in Aqua dest. 100 ml Zugabe von Eisessig 0,2 ml Filtrieren
--	--

1.3. Lösungen für die immunhistochemischen Untersuchungen**1.3.1. PBS (Phosphate Buffered Saline)-Puffer, pH 7,4:**

NaCl (Natrium-chlorid)	42,50 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat)	6,35 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (Natriumhydrogenphosphat-monohydrat)	1,95 g
Aqua dest.	5,00 L

1.3.2. Zitrat-Puffer pH, 6,0:

Stammlösung A:	Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇ ·x H ₂ O (Typ 244, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)) 21,01 g Lösen in Aqua dest. 1 L
Stammlösung B:	Natriumcitrat (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·x 2H ₂ O (Typ 6448, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)) 29,41 g in Aqua dest. 1 L lösen
Zusammensetzung:	Stammlösung A 9 ml und Stammlösung B 450 ml ad Aqua dest. 500ml auffüllen

1.3.3. TRIS-Puffer pH 7,4:

NaCl (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)	43,9 g
TRIZMA-Hydrochlorid (Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland)	34,25 g
TRIZMA-Base (Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland))	4,5 g
Aqua dest.	5 L

1.4. Testosteron-Immunhistochemie

Die immunhistochemische Reaktion für den Antikörper gegen Testosteron wurde mit der ABC Methode durchgeführt. Hierfür wurde das Vectastain ABC-HRP-Kit Elite Universal der Fa. Vector aus Burlingame, Kalifornien, USA verwendet.

1. Lagern der Objektträger mit Paraplastschnitten im Wärmeschrank für 12h bei 40°C.
2. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (2x30 Min.)
3. Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe (2x Isopropanol, 1x 96% Ethanol, 1x 70% Ethanol, jeweils Schnitte kurz schwenken bis Aqua dest.)
4. Waschen in TRIS-Puffer 3x5 Min.
5. Vorbehandlung:
Mit Pro Taqs IV Antigen Enhancer pH9 (Fa. Quartett, Berlin, Deutschland) in der Mikrowelle 2x15 Min., bei Raumtemperatur abkühlen lassen 20 Min.
6. Spülen in TRIS-Puffer pH 7,5 2x5 Min.
7. Endogene Peroxidase hemmen mit Hydrogenperoxid (7,5%) und inkubieren in Feuchtkammer bei Raumtemperatur (RT) 10 Min.
8. Fließendes Leitungswasser 10 Min.
9. Spülen in TRIS-Puffer pH 7,5 2x5 Min.
10. Blockieren unspezifischer Bindungen für Antikörper mit ABC-kit Blocking Serum
11. Abgießen des Überstands
12. Auftragen des Primär-Antikörper (AK)
13. Inkubieren in Feuchtkammer 60 Min bei Raumtemperatur.
14. Spülen in TRIS-Puffer pH 7,5 2x5 Min.
15. Sekundär-Antikörper aus ABC-kit auftragen und inkubieren bei Raumtemperatur 30 Min.
16. Spülen in TRIS Puffer pH 7,5 2x5 Min.
17. Reaktionsreaktion auslösen in DAB-Lösung 3.Min (Fa. Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
18. Schwenken in Leitungswasser
19. Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin Gill's Formula (Fa. Vector, Burlingame, Kalifornien, USA)
20. Fließendes Leitungswasser 10 Min.
21. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe (70% Ethanol, 96% Ethanol, 2x Isopropanol),
22. Entfernen des Alkohols in Xylolbädern (1x10 Min., 1x20 Min.)
23. Eindecken der Schnitte mit Aquatex (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
24. Trocknen im Wärmeschrank bei 40 C° für 12 Stunden

1.5. Verzeichnisse für Statistik

Tabelle 16: Leydig-Zellzytoplasma, Prozentzahlen

Leydig-Zellzytoplasma		Kein	Wenig	Mäßig	Viel	Gesamt
1	Anzahl	27	119	98	56	300
	% innerhalb von Gruppe	9,0%	39,7%	32,7%	18,7%	100,0%
2	Anzahl	221	150	28	1	400
	% innerhalb von Gruppe	55,3%	37,5%	7,0%	0,3%	100,0%
3	Anzahl	301	96	3	0	400
	% innerhalb von Gruppe	75,3%	24,0%	0,8%	0,0%	100,0%
4	Anzahl	436	62	2	0	500
	% innerhalb von Gruppe	87,2%	12,4%	0,4%	0,0%	100,0%
5a	Anzahl	104	0	0	0	104
	% innerhalb von Gruppe	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%
5b	Anzahl	69	67	45	14	196
	% innerhalb von Gruppe	35,2%	34,2%	23,0%	7,1%	100,0%
Gesamt		1158	494	176	71	1900
		60,9%	26,0%	9,3%	3,7%	100,0%

Tabelle 17: Leydig-Zellnukleus, Prozentzahlen

Leydig-Zellnukleus	Degenerativ		Physiologisch		Gesamt
	Anzahl	%	Anzahl	%	
1	22	7,3%	278	92,7%	300
	% innerhalb von Gruppe		% innerhalb von Gruppe		100,0%
2	197	49,3%	203	50,7%	400
	% innerhalb von Gruppe		% innerhalb von Gruppe		100,0%
3	238	59,6%	161	40,4%	399
	% innerhalb von Gruppe		% innerhalb von Gruppe		100,0%
4	419	83,8%	81	16,2%	500
	% innerhalb von Gruppe		% innerhalb von Gruppe		100,0%
5a	93	89,4%	11	10,6%	104
	% innerhalb von Gruppe		% innerhalb von Gruppe		100,0%
5b	44	22,4%	152	77,6%	196
	% innerhalb von Gruppe		% innerhalb von Gruppe		100,0%
Gesamt	1013	53,3%	886	46,7%	1899
	% innerhalb von Gruppe		% innerhalb von Gruppe		100,0%

Tabelle 18: Keimepithel, Prozentzahlen

Keimepithel*		0	1	2	3	4	5	Gesamt
1	Anzahl	0	1	12	77	181	29	300
	% innerhalb von Gruppe	0,0%	0,3%	4,0%	25,7%	60,3%	9,7%	100,0%
2	Anzahl	0	184	16	14	80	6	300
	% innerhalb von Gruppe	0,0%	61,3%	5,3%	4,7%	26,7%	2,0%	100,0%
3	Anzahl	1	233	94	59	13	0	400
	% innerhalb von Gruppe	0,3%	58,3%	23,5%	14,8%	3,3%	0,0%	100,0%
4	Anzahl	3	166	75	114	42	0	400
	% innerhalb von Gruppe	0,8%	41,5%	18,8%	28,5%	10,5%	0,0%	100,0%
5a	Anzahl	0	200	0	0	1	0	201
	% innerhalb von Gruppe	0,0%	99,5%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%	100,0%
5b	Anzahl	0	0	0	9	100	90	199
	% innerhalb von Gruppe	0,0%	0,0%	0,0%	4,5%	50,3%	45,2%	100,0%
Gesamt		4	784	197	273	417	125	1800
		0,2%	43,6%	10,9%	15,2%	23,2%	6,9%	100,0%

* Die Klassifikation des Keimepithels ist der Tabelle 5 im Material und Methodenteil zu entnehmen.

Tabelle 19: Kleine Spermato gonien, Prozentzahlen

Kleine Spermato gonien	keine Spermato gonien		wenig, < 5 Spermato gonien	mäßig, 5-14 Spermato gonien	viel, >15 Spermato gonien	Gesamt
	Anzahl	% innerhalb von Gruppe				
1	1	0,3%	22	86	191	300
2	165	55,2%	68	36	30	299
3	218	54,5%	107	66	9	400
4	108	27,0%	209	71	12	400
5a	115	57,2%	83	3	0	201
5b	0	0,0%	6	70	123	199
Gesamt	607	33,7%	495	332	365	1799
			27,5%	18,5%	20,3%	100,0%

Tabelle 20: Mittelgroße Spermato gonien, Prozentzahlen

Mittelgroße Spermato gonien	keine Spermato gonien		wenig, < 5 Spermato gonien	mäßig, 5-14 Spermato gonien	viel, >15 Spermato gonien	Gesamt
	Anzahl	% innerhalb von Gruppe				
1	129	43,0%	155	14	2	300
			51,7%	4,7%	0,7%	100,0%
2	105	35,0%	89	82	24	300
			29,7%	27,3%	8,0%	100,0%
3	94	23,5%	163	98	45	400
			40,8%	24,5%	11,3%	100,0%
4	18	4,5%	201	148	33	400
			50,2%	37,0%	8,3%	100,0%
5a	17	8,5%	119	61	4	201
			59,2%	30,3%	2,0%	100,0%
5b	36	18,1%	127	34	2	199
			63,8%	17,1%	1,0%	100,0%
Gesamt	399	22,2%	854	437	110	1800
			47,4%	24,3%	6,1%	100,0%

Tabelle 21: Große Spermato gonien, Prozentzahlen

Große Spermato gonien	keine Spermato gonien		wenig, < 5 Spermato gonien	mäßig, 5-14 Spermato gonien	viel, >15 Spermato gonien	Gesamt
	Anzahl	%				
1	293	97,7%	6	1	0	300
			2,0%	0,3%	0,0%	100,00%
2	109	36,3%	176	14	1	300
			58,7%	4,7%	0,3%	100,00%
3	97	24,3%	270	33	0	400
			67,5%	8,3%	0,0%	100,00%
4	135	33,8%	232	32	1	400
			58,0%	8,0%	0,3%	100,00%
5a	4	2,0%	92	97	8	201
			45,8%	48,3%	4,0%	100,00%
5b	192	96,5%	7	0	0	199
			3,5%	0,0%	0,0%	100,00%
Gesamt	830	46,1%	783	177	10	1800
			43,5%	9,8%	0,6%	100,00%

Tabelle 22: Testosteronwerte der untersuchten Tiere

Testosteron- Werte	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
Tier 1	9,15 ng/ml	0 ng/ml	0 ng/ml	0 ng/ml	20,16 ng/ml
Tier 2	7,92 ng/ml	0,14 ng/ml	0 ng/ml	0,48 ng/ml	0,43 ng/ml
Tier 3	4,03 ng/ml	4,19 ng/ml	0 ng/ml	0 ng/ml	20,26 ng/ml
Tier 4	7,56 ng/ml	0 ng/ml	0 ng/ml	0 ng/ml	06,96 ng/ml
Tier 5	N/A*	0 ng/ml	0 ng/ml	0 ng/ml	15,95 ng/ml
Tier 6	N/A			0 ng/ml	01,91 ng/ml
Tier 7					18,19 ng/ml

*N/A = Not available/ nicht Vorhanden

X. DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle bei den zahlreichen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter PD. Dr. Rebecca Kenngott für die Überlassung des Themas. Sie hat mich stets freundlich und fachkundig bei der Anfertigung dieser Arbeit beraten, ermutigt und unterstützt.

Bei Herrn Dr. Reese möchte ich mich für die Mithilfe bei der statistischen Auswertung meiner Daten bedanken.

Ein großer Dank gilt den Technischen Assistenten des Lehrstuhls. Frau M. Settles, A. Servatius, G. Rußmeier und W. Scholz die mich sehr gut in die Labortätigkeiten eingearbeitet haben. Auch hatten sie immer ein offenes Ohr und haben mich immer unterstützt sowie bei Problemen aller Art geholfen.

Der Klinik für Schweine, der LMU München möchte ich für die Kooperation mit dem Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie danken. Mein Dank gilt insbesondere Frau Dr. Zöls und Herrn Dr. Reiter für das Überlassen der Proben der Schweinehoden. Aber auch für die Erlaubnis, die Testosteronwerte in dieser Arbeit zu verwenden, welche bereits Teil der Studie von Herrn Dr. Reiter waren.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. F. Habermann danken, der mir stets freundliche und fachkundige Ratschläge in Bezug auf meine Arbeit und die Unterstützung bei technischen Problemen gab.

Ich möchte mich weiterhin bei den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie bedanken. Insbesondere bei den aktuellen, aber auch bei den ehemaligen Kollegen, die mir stets ihre Hilfe angeboten haben.

Hier möchte ich mich insbesondere bei Herrn Dr. O. Eitschberger und Frau D. Riebow für ihre stetige Bereitschaft und Hilfe bei Problemen aller Art bedanken.

Auch möchte ich mich bei Frau Dr. B. Schick für die stets freundliche, hilfsbereite und fachliche Beratung aller Art bedanken.

Insbesondere gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Maierl für die Überlassung der Stelle am Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie.

Herzlich möchte ich mich bei Franz Braunschläger und Dominik Ridinger für das Korrekturlesen sowie die stetige Unterstützung bei Problemen aller Art bedanken.

Ein besonderer Dank geht an all meine Freunde, die mich in dieser Zeit unterstützt und ermutigt haben.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die zu jeder Zeit für mich da war, mich stets uneingeschränkt auf meinem Lebensweg begleitet und unterstützt hat. Ohne sie wäre ich nie so weit gekommen.

Vielen Dank!