

5 Ergebnisse

5.1 Histologisch-morphometrische Untersuchung der saisonalen Veränderungen im Hodenparenchym des Rehbockes

5.1.1 Qualitative Beschreibung des histologischen Bildes

Februar (Abb. 5):

Tubuli seminiferi:

Die Tubulusquerschnitte sind klein und scheinen relativ dicht zu liegen. Es befinden sich in ihnen ausschließlich A-Spermatogonien sowie Sertolizellen, die sehr eng gepackt liegen. Die Sertolizellkerne befinden sich luminal über den Spermatogonien.

Interstitium:

Das Interstitium ist mit fibroblastenförmigen Zellen gefüllt, unter denen nach lichtmikroskopischen Kriterien keine Leydigzellen zu identifizieren sind. Aufgrund der Zelldichte sind selbst bei hoher Vergrößerung auch andere Strukturen, wie z.B. Blut- und Lymphgefäße nur eingeschränkt beurteilbar.

April (Abb. 6):

Tubuli seminiferi:

Die Tubulusquerschnitte sind im Vergleich zu den Proben aus dem Februar größer. Neben A-Spermatogonien sind nun auch intermediäre und B-Spermatogonien im Keimepithel vertreten. Die ersten germinativen Zellen treten in die Meiose ein, so dass neben Spermatogonien auch Spermatozyten im Tubulus sichtbar werden. Sertolizellkerne sind teils basal zwischen den Spermatogonien, teils luminal auf Höhe der Spermatozyten anzutreffen.

Interstitium:

Das Gewebe erscheint leicht aufgelockert. Die Zellen weichen auseinander und nehmen an Umfang zu. Anhand ihres Zellkerns und des neben dem Kern gelegenen Lipidtropfens können einige Zellen als Leydigzellen angesprochen werden, die genaue Identifizierung bleibt aber unsicher. Aufgrund der verringerten Zelldichte können auch immunkompetente Zellen und Blutgefäße im Interstitium identifiziert werden.

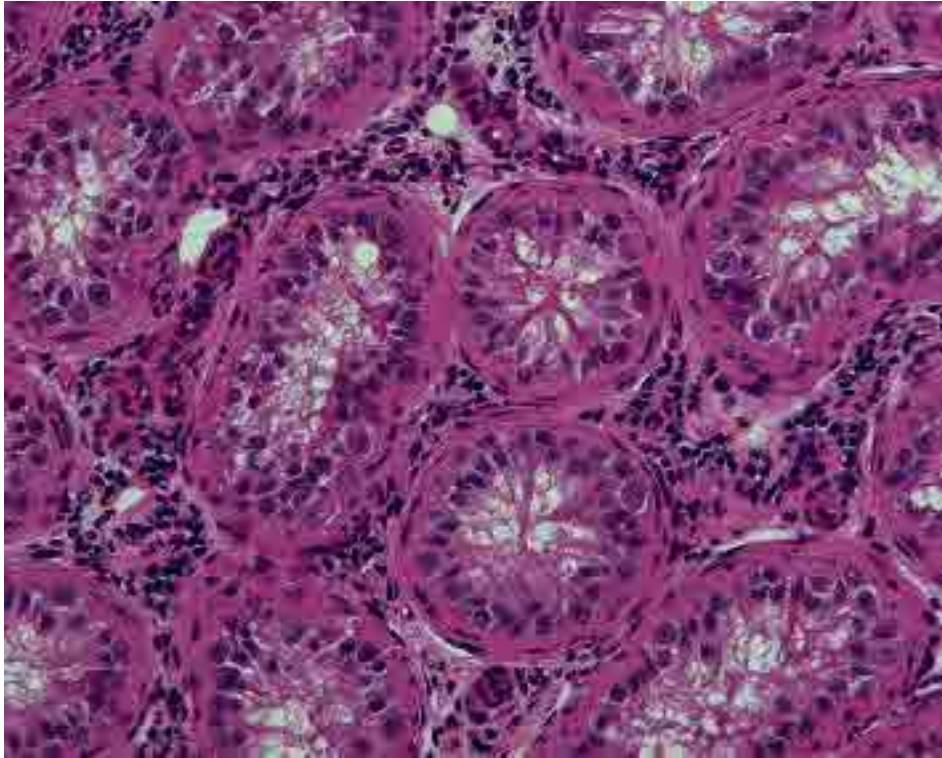


Abb. 5: Bild des Hodenparenchyms eines Rehbockes im Februar
HE-Färbung, 200x

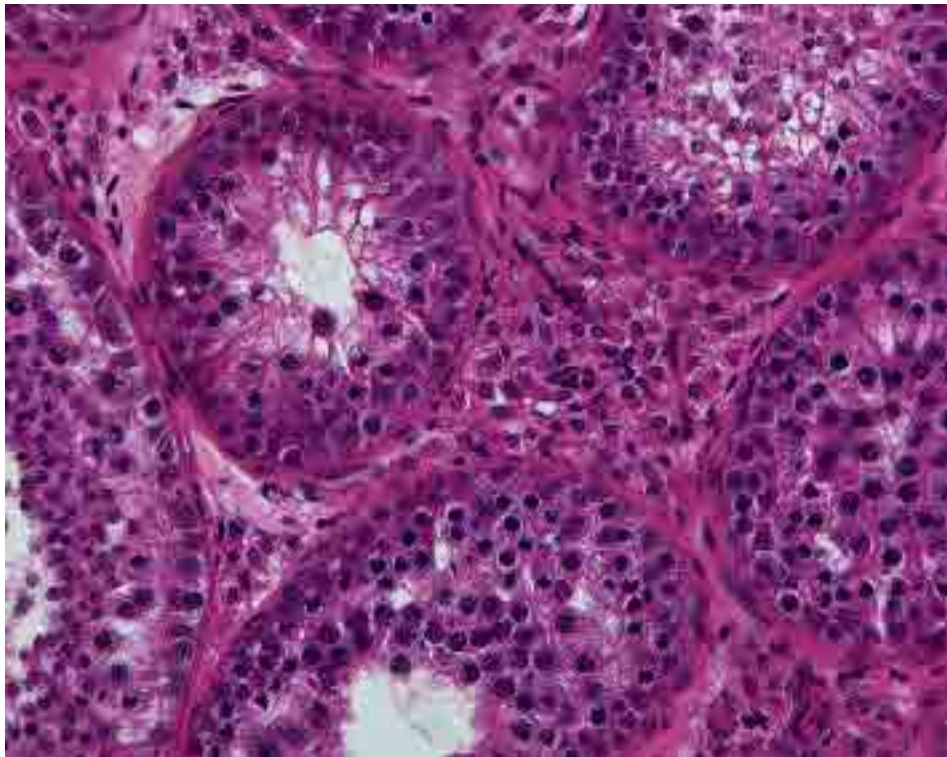


Abb. 6: Bild des Hodenparenchyms eines Rehbockes im April
HE-Färbung, 200x

Juni (Abb. 7):

Tubuli seminiferi:

Im Juni sind alle Tubulusabschnitte vollständig in die Spermatogenese eingetreten. Es sind alle Entwicklungsstufen der germinativen Zellen anzutreffen. Der Spermatogenesezyklus lässt sich in diesem Monat in acht klar unterscheidbare Stadien einteilen, die in allen Abschnitten des Hodens zu beobachten sind. Luminal liegen A-, B-, und intermediäre Spermatogonien, im mittleren Bereich des Keimepithels finden sich Spermatozyten und luminal runde Spermatisden. Elongierte Spermatisden befinden sich stadienabhängig im mittleren oder luminalen Bereich des Epithels.

Interstitium:

Das Gewebe ist locker und relativ flüssigkeitsreich. Leydigzellen liegen einzeln verteilt zwischen anderen Bindegewebszellen. Eine „Clusterbildung“ der Leydigzellen oder eine Gruppierung um die Gefäße ist nicht zu beobachten.

August (Abb. 8):

Tubuli seminiferi:

Im August lässt die mitotische Aktivität der Keimzellen bereits nach. In den meisten Tubulusabschnitten sind noch alle Entwicklungsstufen der germinativen Zellen anzutreffen, wiederkehrende Spermatogenesestadien lassen sich aber schon nicht mehr nachweisen.

Interstitium:

Die Zelldichte nimmt wieder zu. Es sind in HE- und PAS gefärbten Schnitten nur noch vereinzelt Leydigzellen sicher zu identifizieren. Das interstitielle Gewebe wirkt insgesamt weniger locker und flüssigkeitsreich. Auch das Auffinden und Abgrenzen von Blut- und Lymphgefäßen fällt aufgrund der höheren Zelldichte schwer.

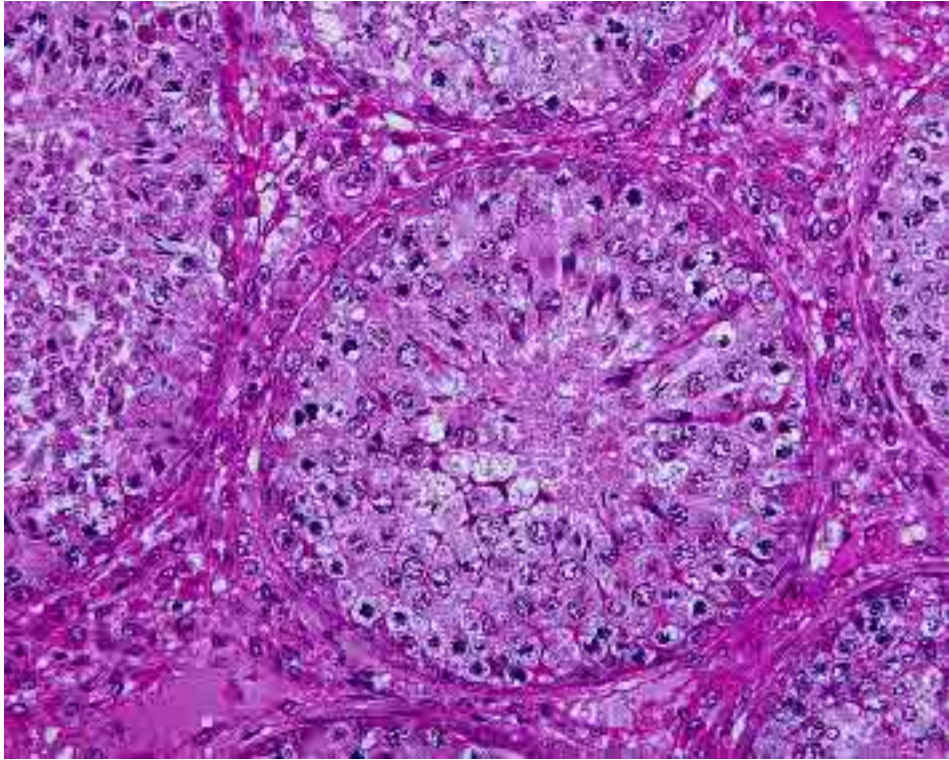


Abb. 7: Bild des Hodenparenchyms eines Rehbockes im Juni
HE-Färbung, 200x

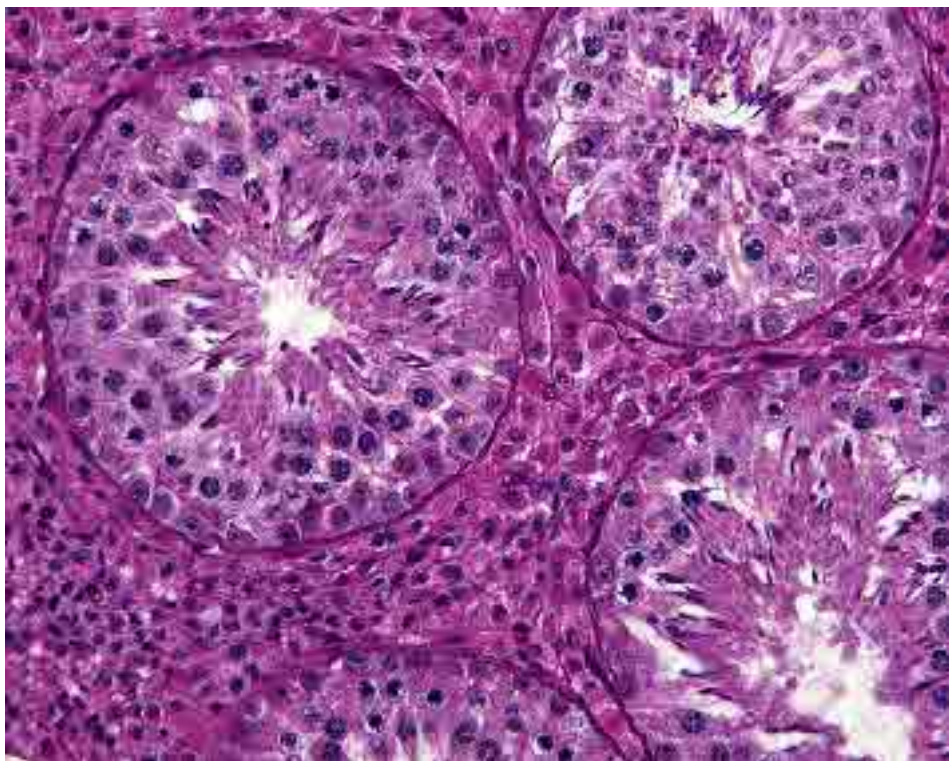


Abb. 8: Bild des Hodenparenchyms eines Rehbockes im August
HE-Färbung, 200x

Oktober (Abb. 9):

Tubuli seminiferi:

Das histologische Bild der Tubuli seminiferi der Rehböcke aus dem Monat Oktober ist sehr inhomogen. Einige Tubulusabschnitte bestehen bereits nur noch aus Spermatogonien und Sertolizellen, andere weisen noch Meiosestadien germinativer Zellen auf. Diese Unterschiede in der Rückbildung des Keimepithels sind schon im Hodenparenchyms innerhalb eines Hodens zu beobachten. Zwischen den Individuen schwankt aber der Grad der Rückbildung insgesamt sehr stark.

Interstitium:

Die Zelldichte im Interstitium nimmt weiter zu. Es sind in den HE- und PAS gefärbten Gewebeschnitten keine Leydigzellen identifizierbar.

Dezember (Abb. 10):

Tubuli seminiferi:

Die Tubuli seminiferi bestehen bei allen Tieren und in allen Abschnitten eines Hodens ausschließlich aus Sertolizellen und Spermatogonien.

Interstitium:

Das Interstitium ist extrem zell dicht. Leydigzellen sind nicht identifizierbar.

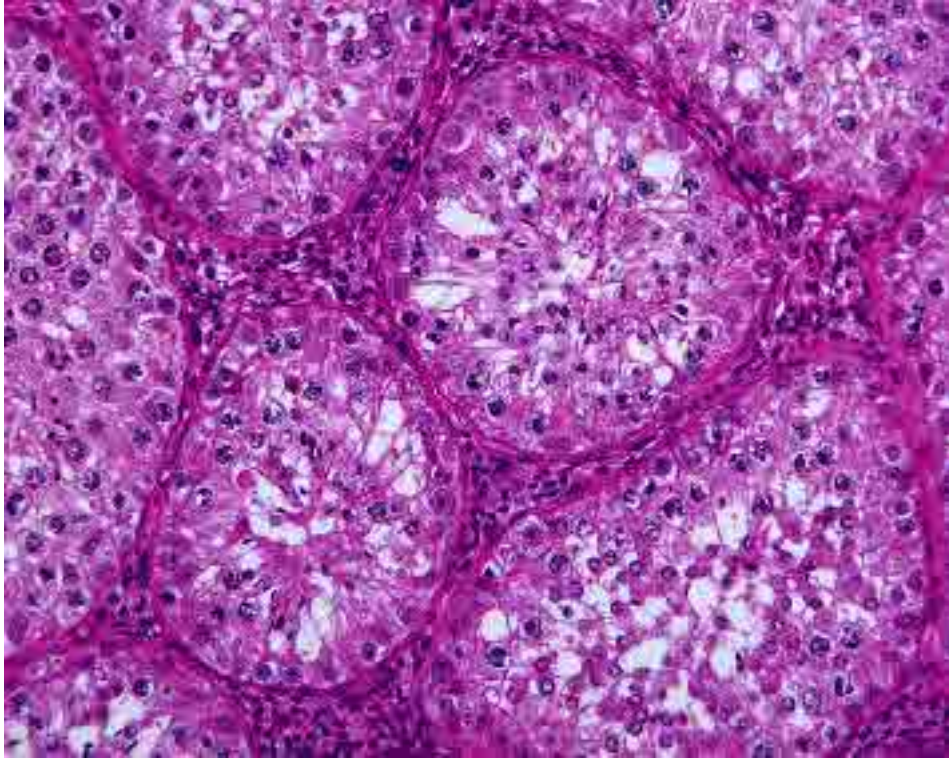


Abb. 9: Bild des Hodenparenchyms eines Rehbockes im Oktober
HE-Färbung, 200x

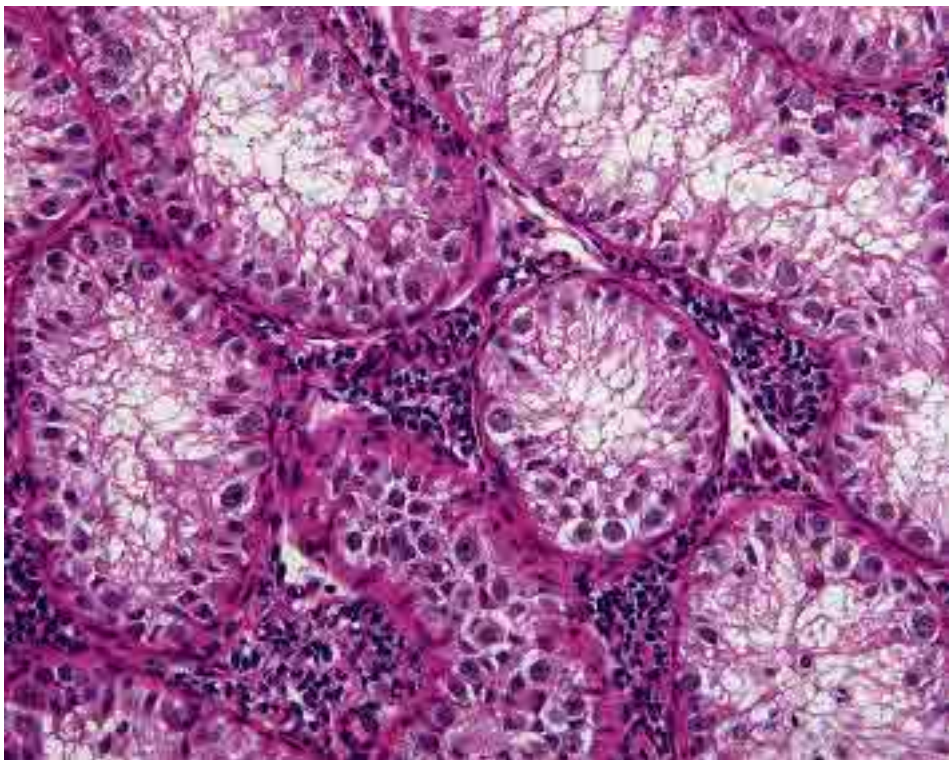


Abb. 10: Bild des Hodenparenchyms eines Rehbockes im Dezember
HE-Färbung, 200x

5.1.2 Quantitative Erfassung der saisonalen Veränderungen

5.1.2.1 Gewebezusammensetzung

Die prozentualen Anteile des tubulären sowie des interstitiellen Kompartimentes am Hodenparenchym zeigen eine deutliche saisonale Abhängigkeit. Machen zur Ruhephase beide Kompartimente annähernd 50% des Gesamtgewebes aus, so erhöht sich der Anteil des tubulären Kompartimentes zur Brunft hin deutlich und macht im August annähernd 80% des Gesamtgewebes aus (Abb. 11).

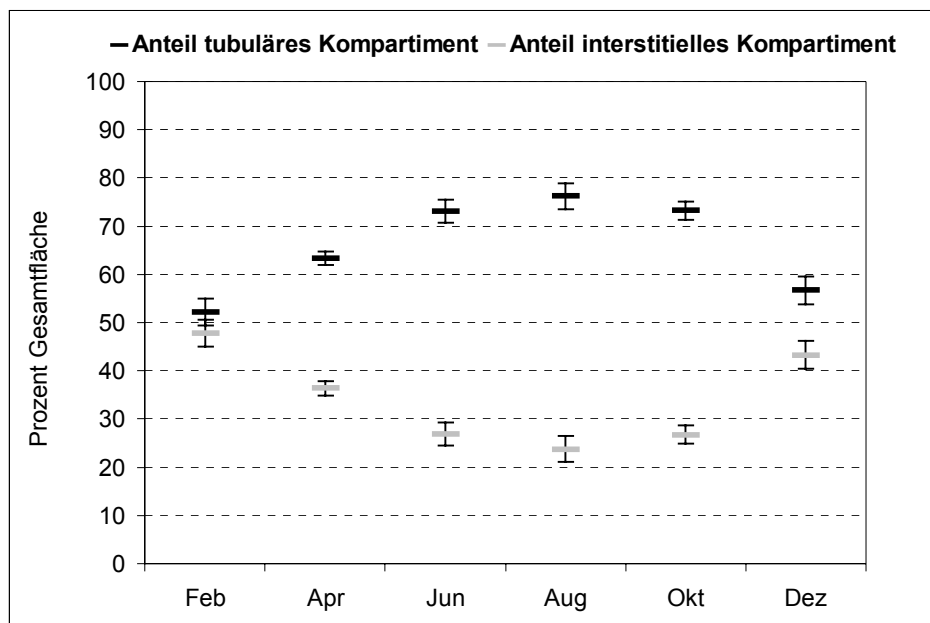


Abb. 11: Anteil des tubulären und interstitiellen Kompartimentes an der insgesamt vermessenen Fläche des Hodenparenchyms

5.1.2.2 Tubulusdurchmesser

Der saisonale Auf- und Abbau des Keimepithels sowie die Veränderung des Lumens (siehe Abb. 5 - 10) resultiert in einer Veränderung des mittleren Tubulusdurchmessers mit einem Maximum während der Brunft und einer Abnahme zur Ruhephase der Tubuli seminiferi (Abb. 12).

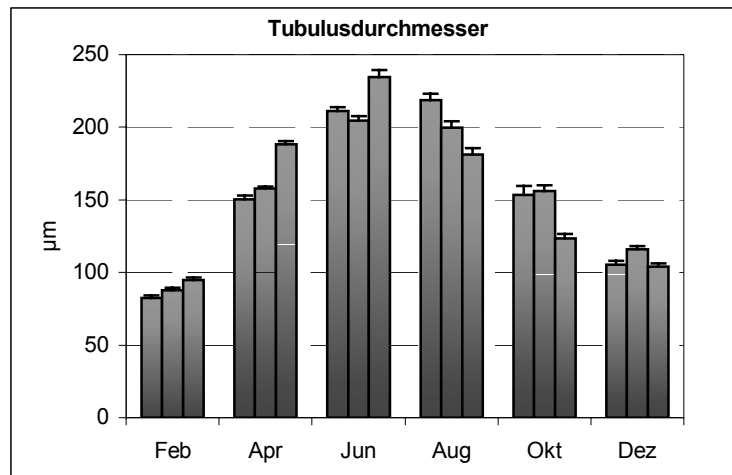


Abbildung 12: Durchmesser der Tubuli seminiferi im Jahresverlauf. Dargestellt sind die Ergebnisse aller 18 Tiere.

5.1.2.3 Veränderungen der zellulären Zusammensetzung der Tubuli seminiferi

Die bereits qualitativ beschriebenen Veränderungen in der Zellkomposition der Tubuli seminiferi wurden auf zweifache Art quantifiziert: als Gesamtzahl der einzelnen germinativen und somatischen Zelltypen pro Tubulusquerschnitt und für eine normierte Tubulusfläche von 1 mm^2 . Für die Sertolizellen sind außerdem die theoretischen Werte dargestellt, die für eine über das Jahr konstant bleibende Zellzahl allein aus den veränderten morphometrischen Verhältnissen des Hodenparenchyms durch Berechnung geschätzt wurden (siehe Punkt 4.9.3.1, Material und Methoden).

5.1.2.3.1 Sertolizellen

Sertolizellen als die Stütz- und Versorgungszellen des Keimepithels sind erwartungsgemäß zu jeder Zeit des Jahres im Tubulus auffindbar. Ihre Anzahl pro Tubulusquerschnitt schwankt im Jahresverlauf nur leicht. Bedingt durch die enorme Größenzunahme der Tubuli seminiferi, nimmt die Zahl der Sertolizellen pro Flächeneinheit jedoch zur Brunft hin stark ab. Der Vergleich der gemessenen mit den theoretischen Werten, die sich allein aus der Veränderung der Tubulusflächen ableiten, zeigt, dass die Gesamtzahl der Sertolizellen im Jahresverlauf konstant bleibt (Abb. 13).

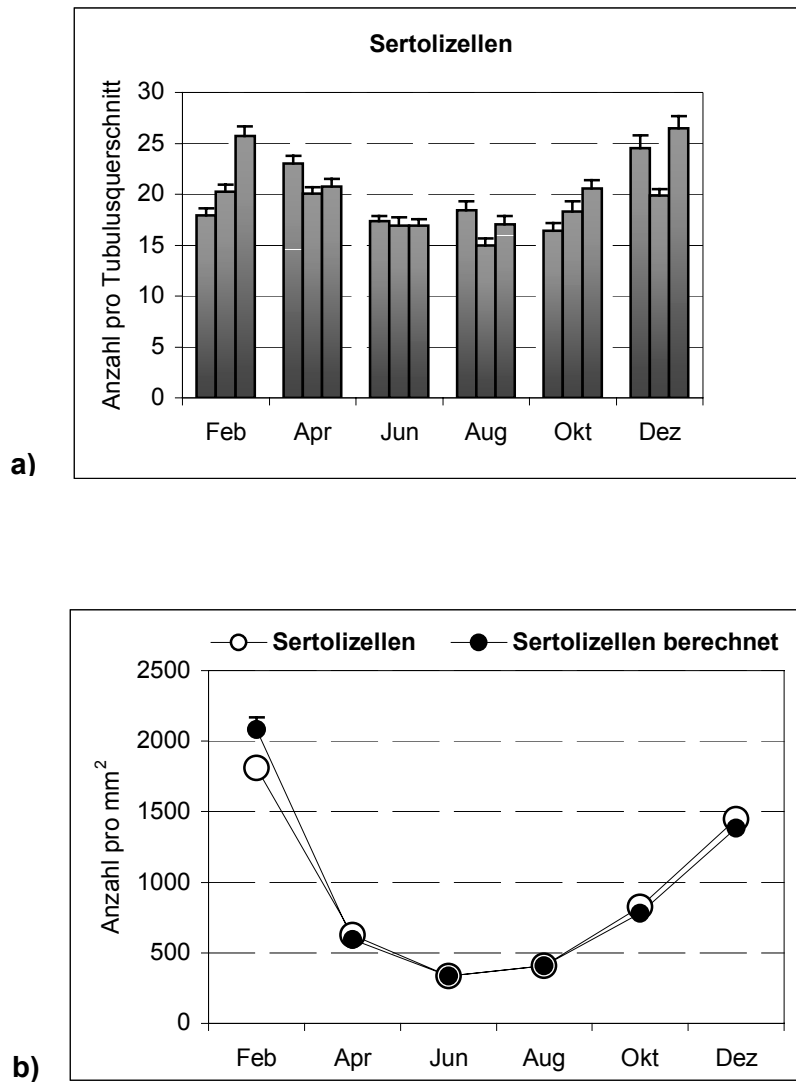


Abbildung 13:

Anzahl der Sertolizellen im Jahresverlauf:

a) Pro Tubulusquerschnitt. Dargestellt sind die Ergebnisse aller 18 Tiere.

b) Vergleich der Anzahl der Sertolizellen pro mm² Tubulusfläche mit der berechneten Zellanzahl pro mm² Tubulusfläche, die sich bei konstanter Sertolizellpopulation allein aus den saisonalen geometrischen Veränderungen innerhalb des Hodenparenchyms ergibt. Der SEM wird bei einigen berechneten Sertolizellanzahlen vom Symbol verdeckt.

5.1.2.3.2 Spermatogonien

Als „Stammzellen“ der Spermatogenese sind auch sie zu jeder Zeit des Jahres in den Tubuli seminiferi vorhanden. Die Anzahl der Spermatogonien pro Tubulusquerschnitt nimmt allerdings schon vor der Brunft deutlich zu. Sie erreicht ihre höchsten Werte vor der Brunft im April / Juni und fällt bereits in der späten Brunftphase (August) wieder auf ihr „Grundniveau“ zurück. Pro definierter Flächeneinheit ist die Zahl der Spermatogonien, infolge verringerter Gesamtzahl und großer Tubulusdurchmesser, zur Brunft am geringsten.

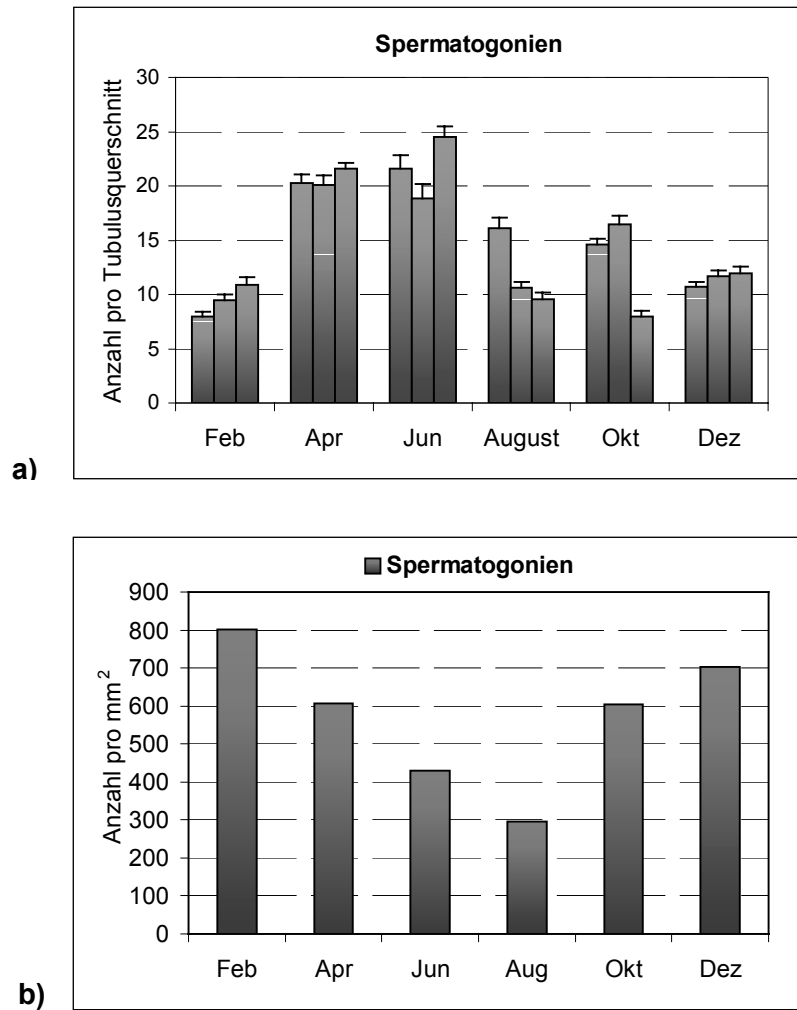


Abbildung 14:

Anzahl der Spermatogonien im Jahresverlauf:
 a) Pro Tubulusquerschnitt. Dargestellt sind die Ergebnisse aller 18 Tiere.
 b) Pro mm² Tubulusfläche

5.1.2.3.3 Spermatozyten

Im März scheinen die ersten Spermatogonien in die Meiose einzutreten, so dass im April schon in vielen Tubulusanschnitten Spermatozyten anzutreffen sind. Ihre Anzahl erreicht das Maximum kurz vor der Brunft, während sie schon in der späten Brunftperiode wieder stark zurückgeht.

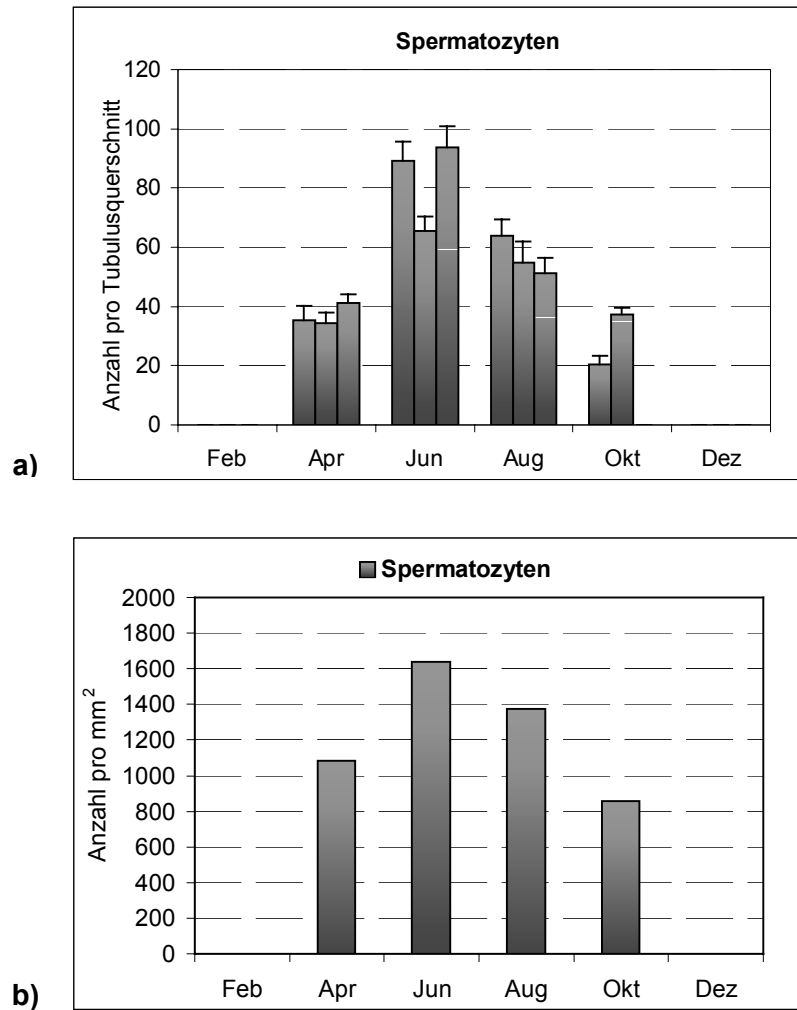


Abbildung 15:

Anzahl der Spermatozyten im Jahresverlauf:

a) Pro Tubulusquerschnitt. Dargestellt sind die Ergebnisse aller 18 Tiere.

b) Pro mm² Tubulusfläche.

5.1.2.3.4 Spermatisden

Sie stellen das Endprodukt der Spermatogenese dar und werden dementsprechend nur in einem engen Zeitfenster zur Brunft maximal produziert. Doch bereits im Oktober ist die Spermatisdenzahl pro Tubulusquerschnitt wieder um das ca. 8fache reduziert.

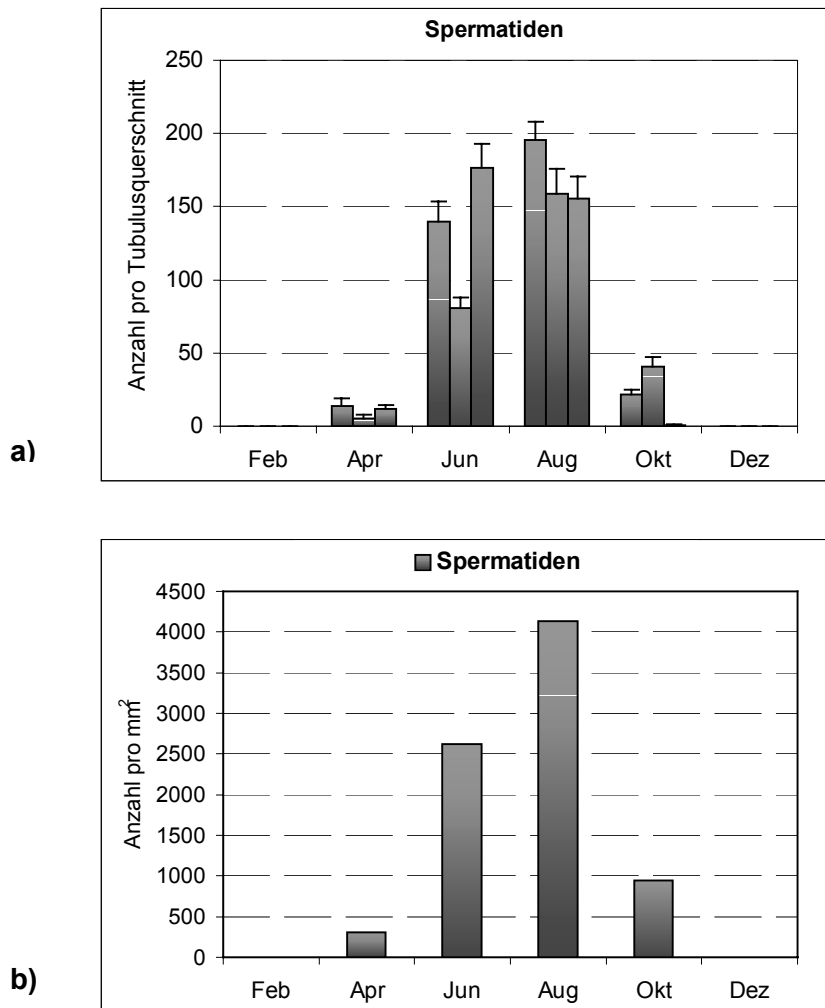


Abbildung 16: Anzahl der Spermatisden im Jahresverlauf:
a) Pro Tubulusquerschnitt. Dargestellt sind die Ergebnisse aller 18 Tiere.
b) Pro mm² Tubulusfläche

5.1.3 Systematisierung der Spermatogenese des Rehbockes

Der Spermatogenesezyklus des Rehbockes kann nur im Juni in Stadien eingeteilt werden, da nur in diesem Monat der Probennahme Spermatisden maximal proliferieren (siehe Abb.14 und 15). Es ist daher schon im August nicht mehr möglich, in allen Hodenabschnitten gleichmäßig wiederkehrende Zellassoziationen im Tubulusquerschnitt zu dokumentieren. Die Einteilungskriterien mit den dazugehörigen Zellassoziationen zeigt Tabelle 3.

Stadium	Einteilungskriterien	Zellassoziati on	
		Basal gelegen:	Luminal gelegen:
I	Zwei Spermatidengenerationen Elongierte Spermatiden liegen basal bis medial. Neue Generation runder Spermatiden	A-Spermatogonien	Primäre Spermatozyten im Pachytän
II	Zwei Spermatidengenerationen Elongierte Spermatiden im mittleren Bereich des Epithels Das akrosomale Vesikel wird sichtbar	A- und Intermediäre Spermato gonien	Primäre Spermatozyten im Pachytän
III	Zwei Spermatidengenerationen Das akrosomale Vesikel senkt sich auf den Kern und flacht diesen leicht ab. Das akrosomale Granulum flacht ebenfalls ab und legt sich über die Kernmembran. Elongierte Spermatiden im mittleren bis luminalen Bereich des Epithels	A-, Intermediäre und B-Spermato gonien	Primäre Spermatozyten im Pachytän
IV	Zwei Spermatidengenerationen Das Akrosom bedeckt den luminalen Pol des Spermatidenkerns. Elongierte Spermatiden säumen das Lumen des Tubulus. Die Spermiati on steht kurz bevor oder hat bereits begonnen.	A- und B-Spermato gonien	Primäre Spermatozyten im Pachytän
V	Eine Spermatidengeneration Runde Spermatiden wenden den mit dem Akrosom bedeckten Pol nach basal.	A-Spermatogonien Spermatozyten im Leptotän	Primäre Spermatozyten im Pachytän
VI	Eine Spermatidengeneration Spermatiden beginnen zu elongieren	A-Spermatogonien Spermatozyten im Leptotän	Primäre Spermatozyten im Pachytän
VII	Eine Spermatidengeneration Elongation der Spermatiden scheint weitgehend abgeschlossen.	A-Spermatogonien Spermatozyten im Leptotän	Primäre Spermatozyten im Zygotän und Pachytän
VIII	Ein bis zwei Spermatidengenerationen Meiotische Teilungen der Spermatozyten	A-Spermatogonien	sekundäre Spermatozyten/ runde Spermatiden Spermatozyten im Pachytän

Tabelle 3: Einteilungskriterien und Zellassoziati onen der Spermatogenesestadien des Rehbockes

Abbildung 17 zeigt eine schematische Darstellung der Spermatogenesestadien des Rehbockes.

Die Abbildungen 18 und 19 veranschaulichen diese Stadien anhand von Semidünnschnitt-Präparaten.

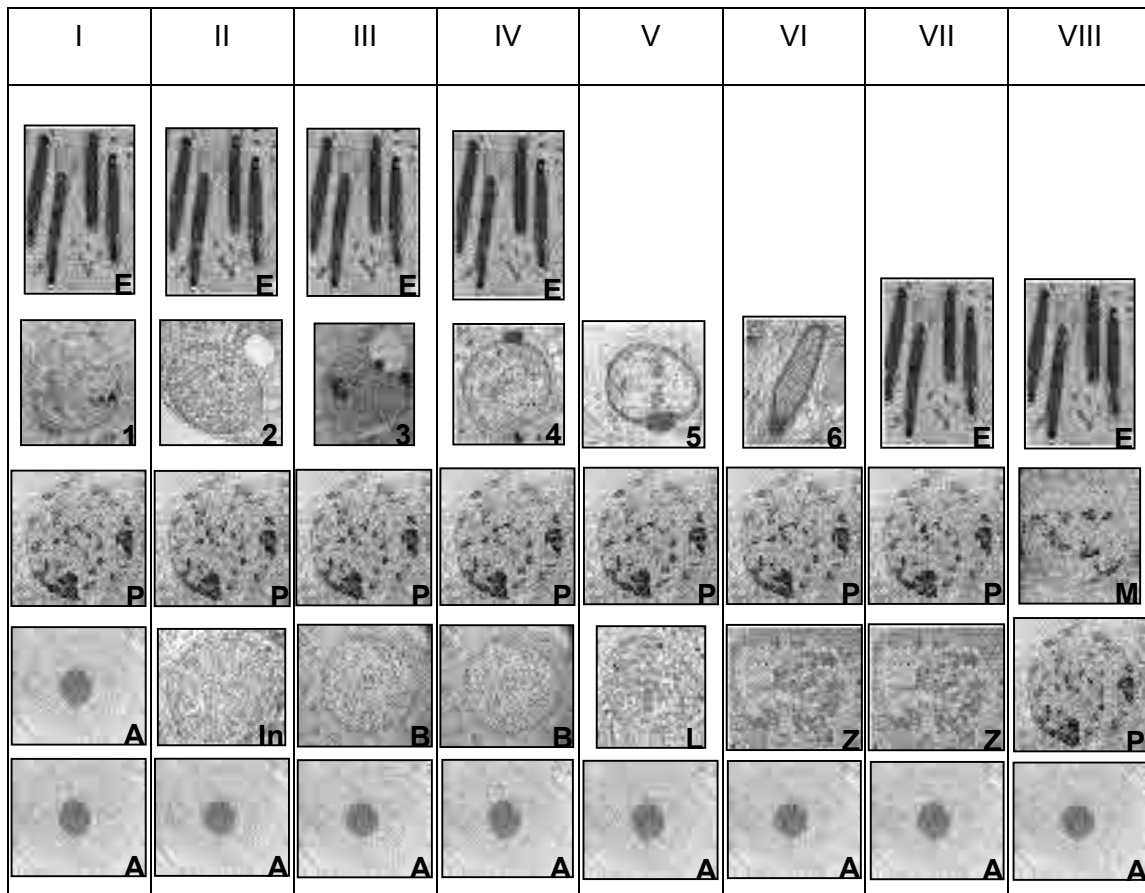


Abb. 17: Schematische Darstellung der Spermatogenesestadien des Rehbockes im Monat Juni. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Kernbilder, 4000x

- A, In, B = A-, Intermediär-, B-Spermatogonien
- L, Z, P = Spermatozyten im Leptotän, Zygotän, Pachytän
- 1- 6 = Spermatiden rund
- E = Spermatiden elongiert

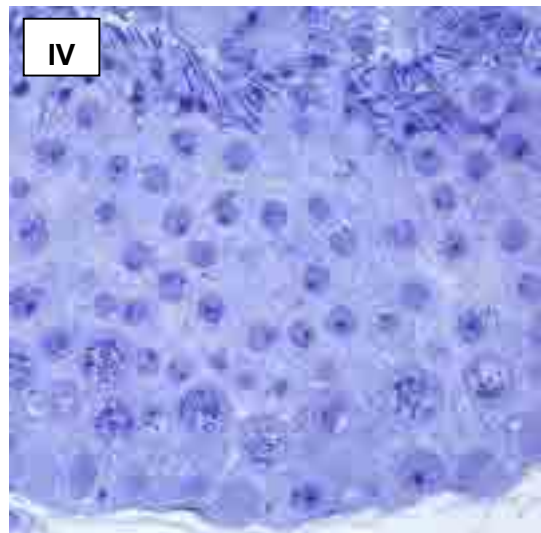
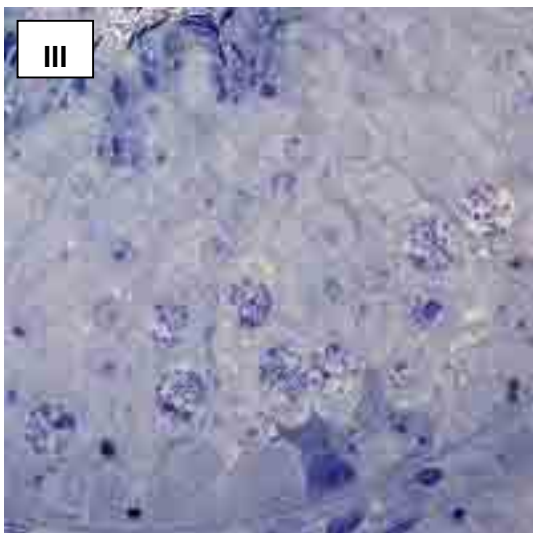
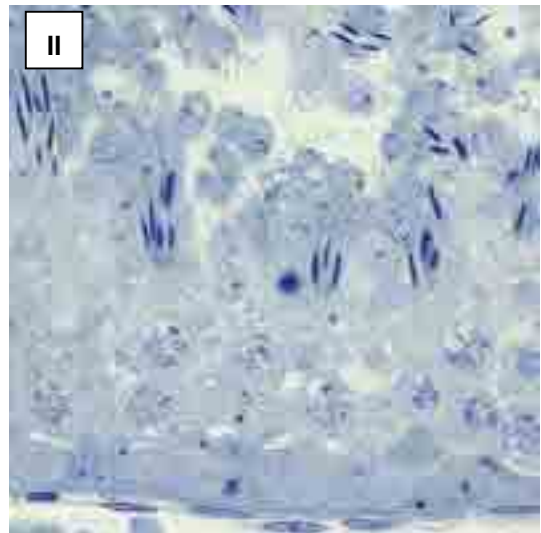
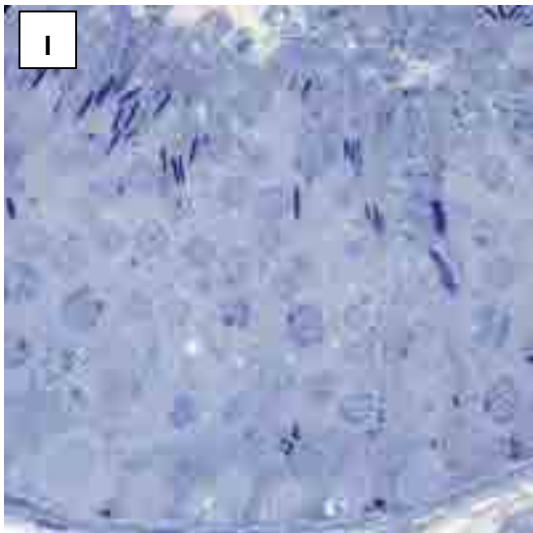


Abb. 18: Stadien I - IV der Spermatogenese des Rehbockes
Semidünnschnittpräparate, 1000x

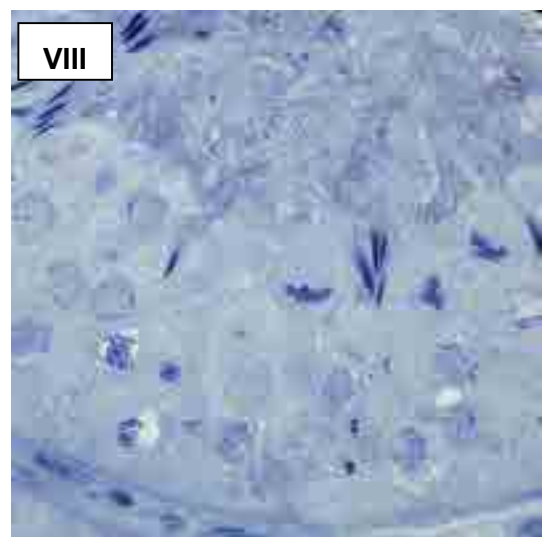
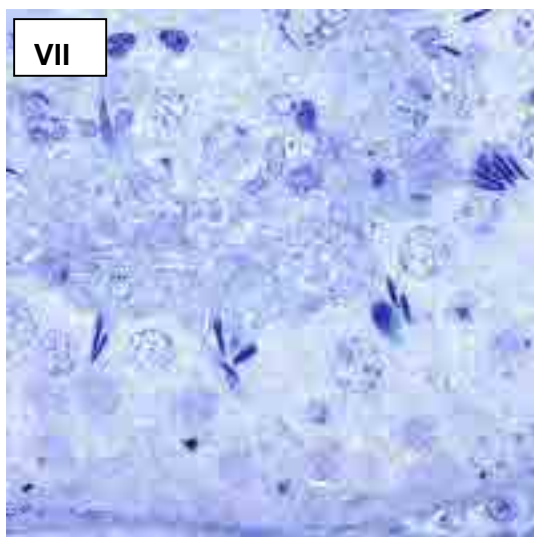
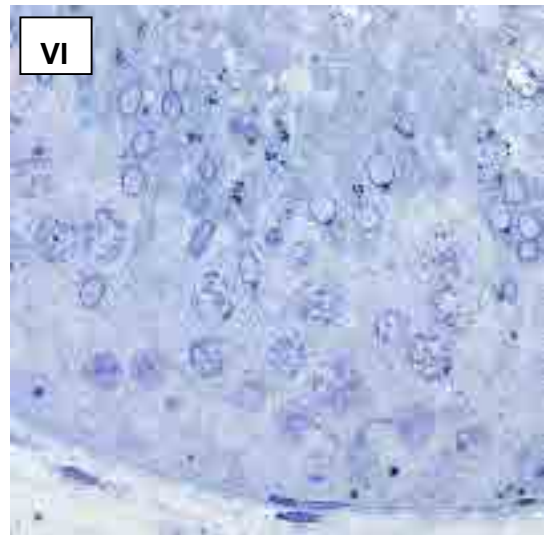
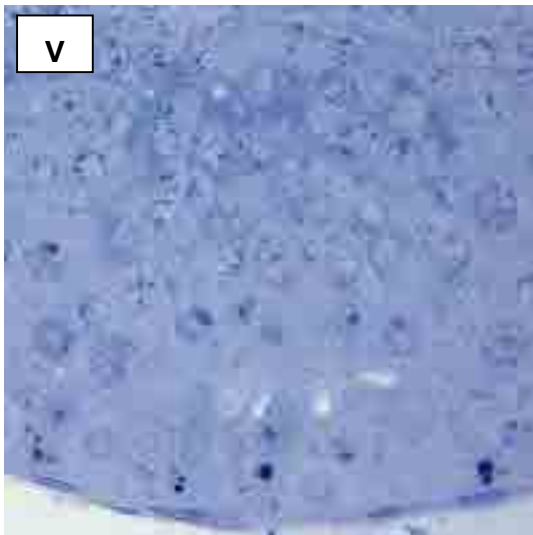


Abb. 19: Stadien V - VIII der Spermatogenese des Rehbockes
Semidünnschnittpräparate, 1000x

5.1.4 Veränderungen der zellulären Zusammensetzung des Interstitiums

Wie in der qualitativen Beschreibung der histologischen Bilder bereits erwähnt, war es anhand der HE- und PAS-Färbungen nicht zu allen Monaten möglich, die für unsere Untersuchung relevanten interstitiellen Zelltypen wie Leydigzellen und Blutgefäßendothelien sicher von Bindegewebszellen zu unterscheiden. Dies machte eine immunhistochemische Markierung dieser Zelltypen notwendig. Leydigzellen wurden mittels einer anti-„relaxin-like factor“, Endothelien mittels einer anti-„Von-Willebrand-Faktor“ Immunhistochemie markiert.

5.1.4.1 Interstitielle Gesamtzellzahl und Leydig'sche Zwischenzellen

Die interstitielle Gesamtzellzahl pro 1 mm² nimmt zur Brunft hin stark ab. Der Vergleich der gemessenen mit den theoretischen Werten, die sich allein aus den geometrischen Veränderungen innerhalb des Hodenparenchyms ableiten, ergibt eine gute Übereinstimmung (Abb. 20).

Der „relaxin-like factor“ (RLF) gilt im Hodenparenchym als Leydigzell-spezifisch. Die Abbildungen 22 und 23 zeigen die Lokalisation des RLF zu den verschiedenen Monaten der Probennahme. Es fällt auf, dass im Dezember keinerlei RLF(+) Zellen im Interstitium auffindbar sind. Allerdings weisen einige fibroblastenartige Zellen, die den peritubulären Zellen direkt aufliegen, eine Färbung im Bereich der Kernmembran auf. Diese Färbung ist aber nicht immer eindeutig und wurde deshalb in die Quantifizierung nicht aufgenommen. Im Februar sind vereinzelt deutlich RLF(+) Zellen zu identifizieren. Die Färbung der peritubulär gelegenen Zellen nimmt deutlich zu. Da aber auch hier die Färbung dieser Zellen nicht immer eindeutig war, wurden auch sie nicht in die Zählung einbezogen. Im April steigt der Anteil der RLF(+) Zellen im interstitiellen Gewebe bis auf 45% an (Abb. 21), während die Gesamtzahl der interstitiellen Zellen pro Flächeneinheit zurückgeht. Auch im Juni bleibt der Anteil der RLF (+) Zellen weiterhin sehr hoch, um zum August deutlich abzufallen. Im histologischen Bild zeigt sich eine inhomogene Verteilung der markierten Zellen. Man findet im gleichen Gewebeschnitt interstitielle Räume, deren Färbung sich kaum von den im Juni beobachtbaren unterscheidet, wie auch Räume, in denen nur noch vereinzelt oder gar keine Anfärbungen sichtbar sind. Die Gesamtzellzahl pro Fläche steigt bereits wieder leicht an. In der Phase der Hodeninvolution im Oktober sind nur noch sehr vereinzelt RLF(+) Zellen nachweisbar, während die Gesamtzellzahl stark zunimmt. Sie erreicht im Dezember wieder ihr Maximum.

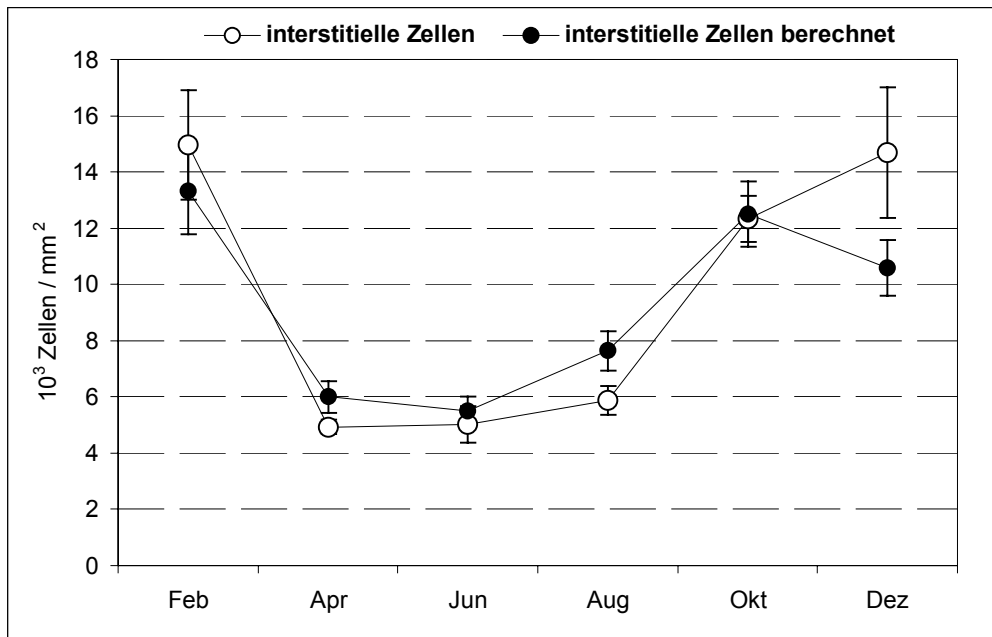


Abb. 20: Vergleich der Anzahl der interstitiellen Zellen pro mm² Interstitiumsfläche mit der berechneten Zellanzahl pro mm², die sich für eine konstante interstitielle Zellpopulation allein aus den saisonalen geometrischen Veränderungen des Hodenparenchyms ableitet.

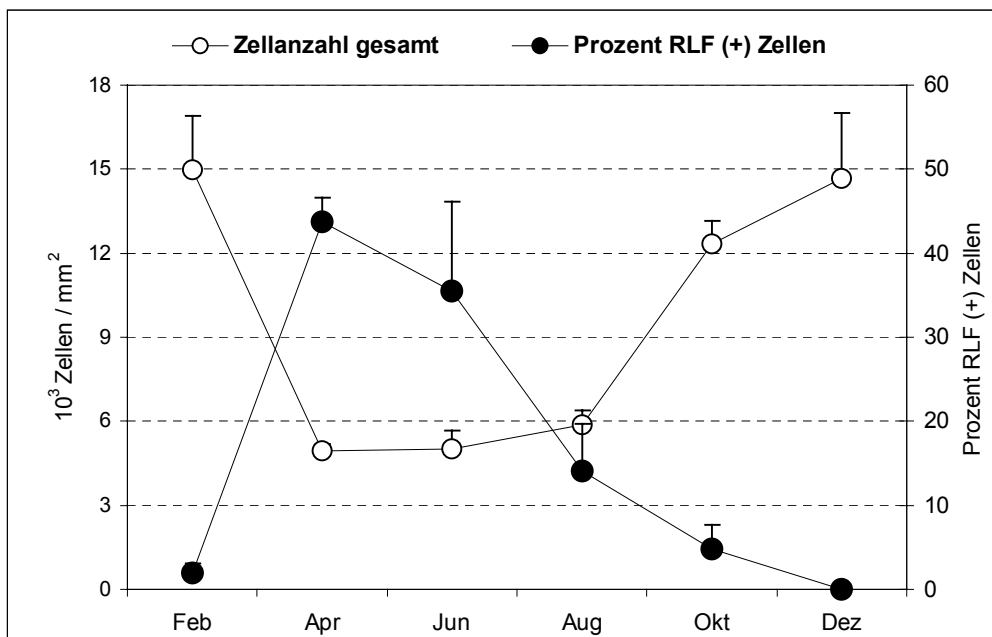


Abb. 21: Anzahl der interstitiellen Zellen pro mm² Interstitiumsfläche im Jahresverlauf. Zellanzahl gesamt und prozentuale Anteile der RLF(+) Zellen an der Anzahl interstitieller Zellen.

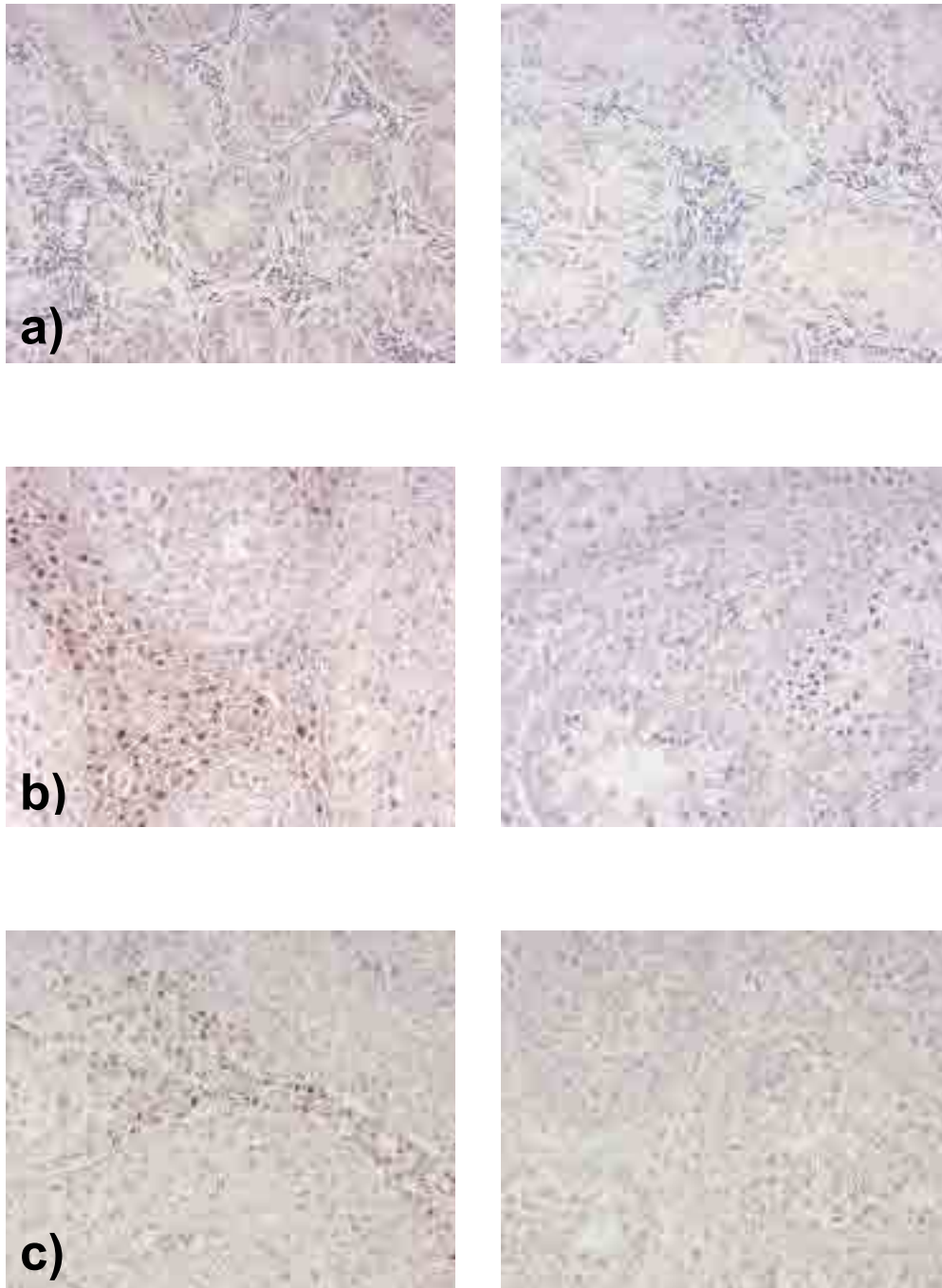


Abb. 22: Lokalisation des „relaxin-like Factor“ im Testisparenchym des Rehbockes
a) Februar b) April c) Juni
(rechts Negativkontrollen mit Kaninchen-Normalserum)
Nachweis mittels indirekter Immunhistochemie, Detektion mit DAB (braunes Präzipitat)
Vergrößerung: 200x

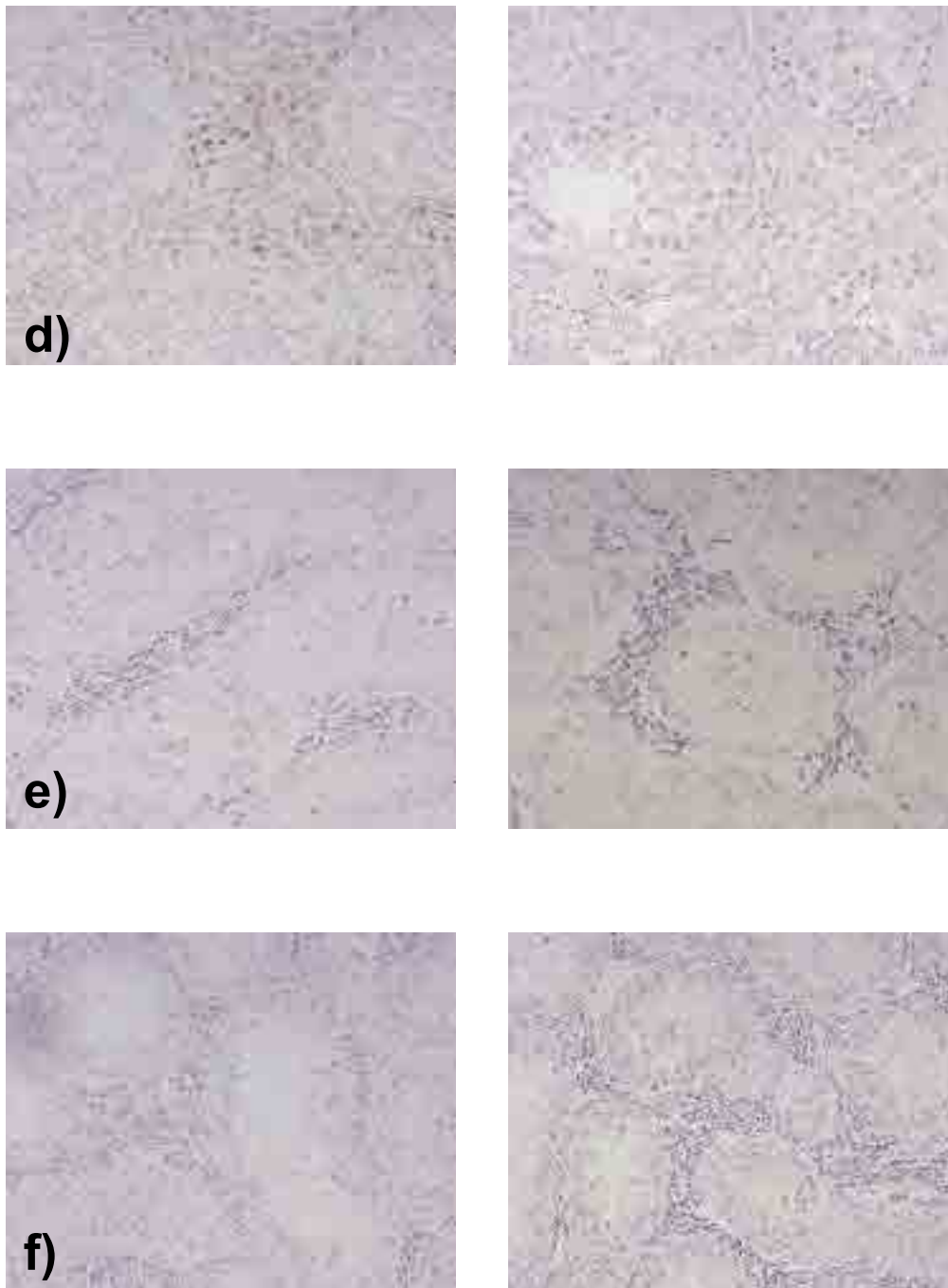


Abb. 23: Lokalisation des „relaxin-like Factor“ im Testisparenchym des Rehbockes
d) August e) Oktober f) Dezember
(rechts Negativkontrollen mit Kaninchen-Normalserum)
Nachweis mittels indirekter Immunhistochemie; Detektion mit DAB (braunes Präzipitat)
Vergrößerung: 200x

5.1.4.2 Blutgefäße

Ein Beispiel für die immunhistochemische Detektion des „Von-Willebrand-Faktor“ zeigt Abb. 24. Der prozentuale Anteil der Blutgefäßfläche an der Interstitiumsfläche schwankt im Jahresverlauf zwischen 3 und 7%. Eine Abhängigkeit von der Saison ist nicht zu beobachten (Abb. 25).

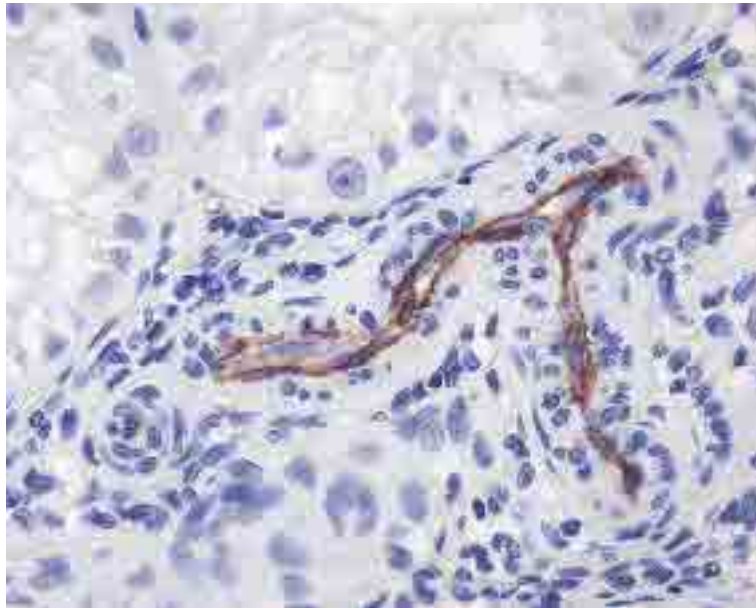


Abbildung 24: Beispiel für die Lokalisation des „Von-Willebrand-Faktor“ im Hodengewebe des Rehbockes. Nachweis mittels indirekter Immunhistochemie Detektion mit DAB (braunes Präzipitat); Vergrößerung: 400x

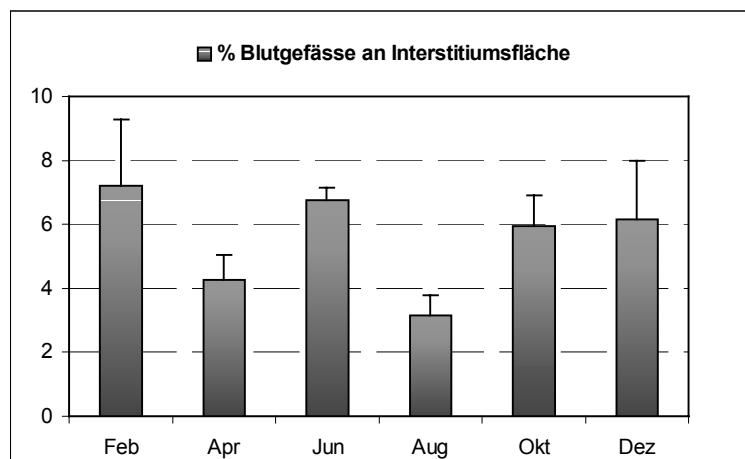


Abbildung 25: Prozentualer Anteil der Blutgefäße an der Interstitiumsfläche

Die Anzahl der Kapillaren pro mm^2 Interstitiumsfläche liegt zwischen 300 und 550. Der Vergleich mit den theoretisch ermittelten Werten, geschätzt für eine über den Jahresverlauf hinweg konstante Anzahl an Kapillaranschnitten in der Gesamthodenfläche, zeigt (mit Ausnahme des Monats Juni) eine gute Übereinstimmung (Abb. 26).

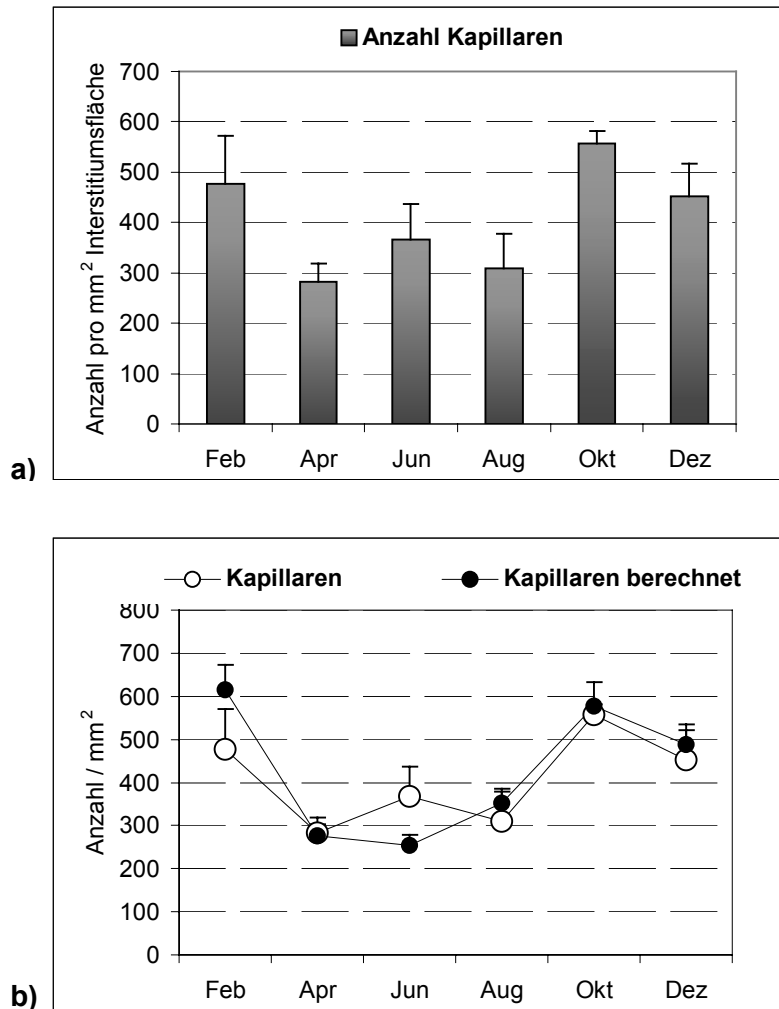


Abbildung 26:

Anzahl der Kapillaren im Jahresverlauf

a) pro mm^2 Interstitiumsfläche

b) Vergleich der Anzahl der Kapillaranschnitte pro mm^2 Interstitiumsfläche mit der berechneten Anzahl Kapillaranschnitte, die sich für eine konstante Anzahl pro Testisquerschnitt allein aus den sich saisonal verändernden geometrischen Verhältnissen des Hodenparenchyms ergibt.

5.2 Immunhistochemischer Nachweis saisonal exprimierter Wachstumsfaktoren

5.2.1 Western Blot und Immunodetektion zur Antikörper-Charakterisierung

5.2.1.1 Polyklonaler Kaninchen anti-Human-TGF β 1 Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies)

Nach Immunodetektion mit dem Kaninchen anti-Human-TGF β 1 Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnologies zeigten sich 3 Banden. Sie repräsentieren das Präkursorprotein, das prozessierte Protein sowie das Monomer des prozessierten Proteins (Abb. 27).

5.2.1.2 Polyklonaler Kaninchen anti-Human-TGF β 3 Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies)

Der polyklonale Kaninchen anti-human-TGF β 3 Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnologies markiert eine sehr deutliche Bande bei ca. 40 kD, was dem Molekulargewicht des Präkursorproteins von TGF β 3 entspricht. Die etwas schwächere Bande bei ca. 25 kD repräsentiert das prozessierte Protein (Abb. 28).

5.2.1.3 Polyklonaler Maus anti-Human-VEGF Antikörper (RDI)

Der polyklonale Maus anti-Human-VEGF Antikörper der Firma RDI markiert eine Bande bei ca. 19 kD. Dies entspricht dem Molekulargewicht des prozessierten Proteins (Abb. 29).

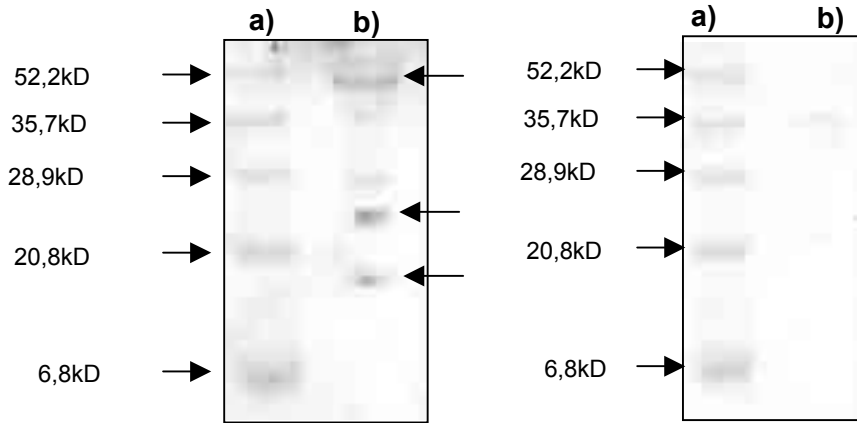


Abb. 27: Immunodetektion von TGFβ1 nach Western Blot aus einem Proteinlysate des Testisgewebes vom Reh. Rechts Negativkontrolle mit Kaninchen-IgG anstelle des primären Antikörpers.
a) Marker (broad range prestained, BioRad) b) Proteinlysate Reh

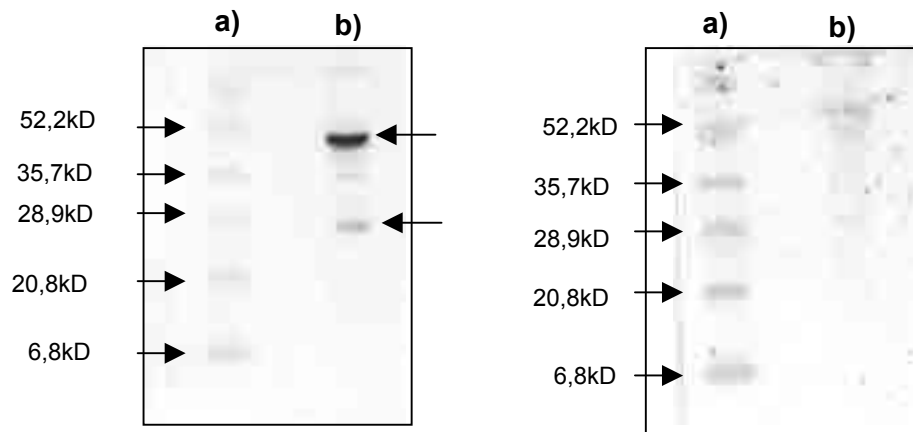


Abb. 28: Immunodetektion von TGFβ3 nach Western Blot aus einem Proteinlysate des Testisgewebes vom Reh. Rechts Negativkontrolle mit Kaninchen-IgG anstelle des primären Antikörpers.
a) Marker (broad range prestained, BioRad) b) Proteinlysate Reh

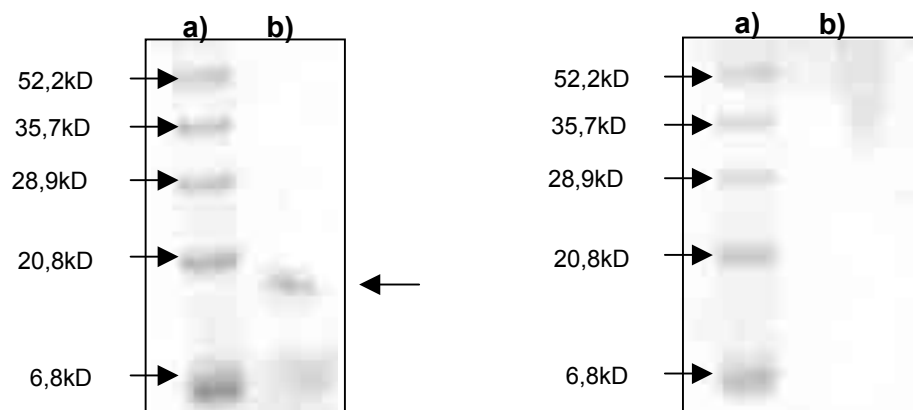


Abb. 29: Immunodetektion von VEGF nach Western Blot aus einem Proteinlysate des Testisgewebes vom Reh. Rechts Negativkontrolle mit Maus-IgG anstelle des primären Antikörpers.
a)Marker (broad range prestained, BioRad) b) Proteinlysate Reh

5.2.1.4 Polyklonaler Kaninchen anti-Bovin-aFGF Antikörper (RDI)

Abbildung 30 zeigt die Immunodetektion des aFGF im Testislysat des Rehs und des Rindes. Beim Reh ergab sich mit der normalen DTT Konzentration im Probenpuffer eine Bande zwischen 30 und 35 kD. Versetzt man die Probe erneut mit der gleichen Menge DTT erscheint wie beim Rind eine Bande etwas oberhalb von 20 kD. Dies entspricht nicht dem erwarteten Molekulargewicht des aFGF (15 – 17 kD). Nach Auskunft der Firma Santa Cruz Biotechnologies läuft aber dieser Faktor aus bisher unbekannten Gründen stets etwas oberhalb seines eigentlichen Molekulargewichtsbereiches.

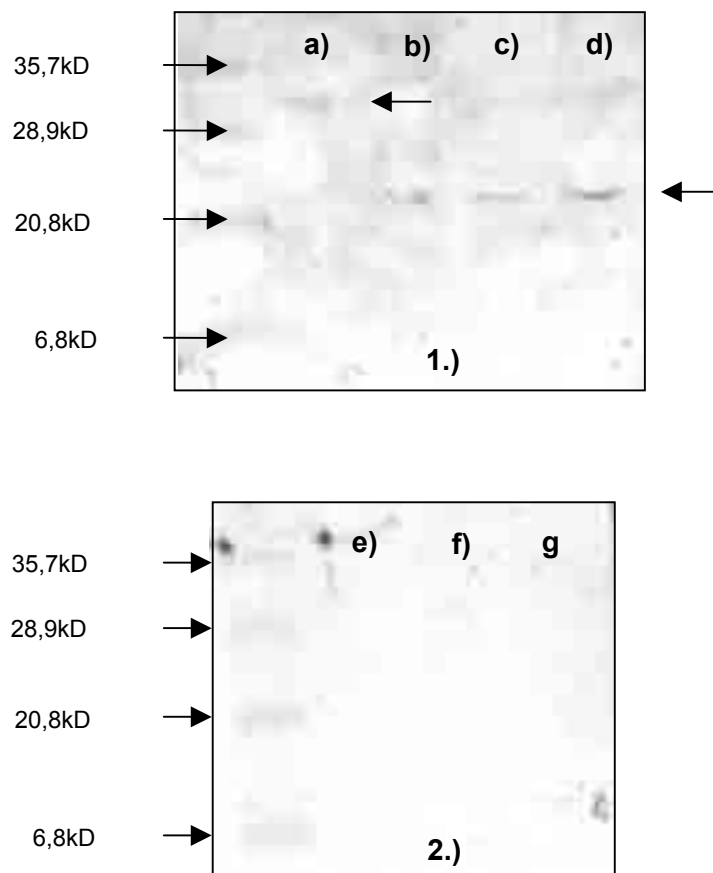


Abbildung 30:

- 1.) Immundetektion von aFGF nach Western Blot
 - Proteinlysat des Testisgewebes vom Reh
 - a) In Probenpuffer mit einfacher DTT Konzentration
 - b) In Probenpuffer mit doppelter DTT Konzentration
 - Proteinlysat des Testisgewebes vom Rind
 - c) In Probenpuffer mit einfacher DTT Konzentration
 - d) In Probenpuffer mit doppelter DTT Konzentration
- 2.) Negativkontrolle mit Kaninchen-IgG anstelle des primären Antikörpers
 - Proteinlysat des Testisgewebes vom Reh
 - e) In Probenpuffer mit einfacher DTT Konzentration
 - f) In Probenpuffer mit doppelter DTT Konzentration
 - Proteinlysat des Testisgewebes vom Rind
 - g) In Probenpuffer mit einfacher DTT Konzentration

5.2.2 Immunhistochemische Detektion des TGF β 1 im Hodengewebe des Rehbockes

Interstitielles Kompartiment:

TGF β 1 konnte zu keiner Zeit des Jahres in interstitiellen Zellen nachgewiesen werden.

Tubuläres Kompartiment:

Die Detektion des TGF β 1 konnte keiner bestimmten Zellart zugeordnet werden. Es waren immer einzelne Zellen betroffen, die starke Degenerationserscheinungen zeigten. Es handelte sich um Kernpyknosen, Kerndilatationen oder Zellfragmentierungen. Nach morphologischen Kriterien befinden sich diese Zellen in verschiedenen Stadien der Apoptose (Abb. 31 und 32).

5.2.3 Immunhistochemische Detektion des TGF β 3

Interstitielles Kompartiment:

Das TGF β 3 Protein konnte zu keiner Zeit des Jahres in interstitiellen Zellen nachgewiesen werden.

Tubuläres Kompartiment:

TGF β 3 befindet sich im Tubulus vor allem in primären und sekundären Spermatozyten kurz vor und während der meiotischen Teilungen, sowie in runden Spermatiden. Des Weiteren färben auch Sertolizellen positiv für den TGF β 3. Diese Anfärbungen sind nur von April bis August zu beobachten (Abb. 33 und 34).

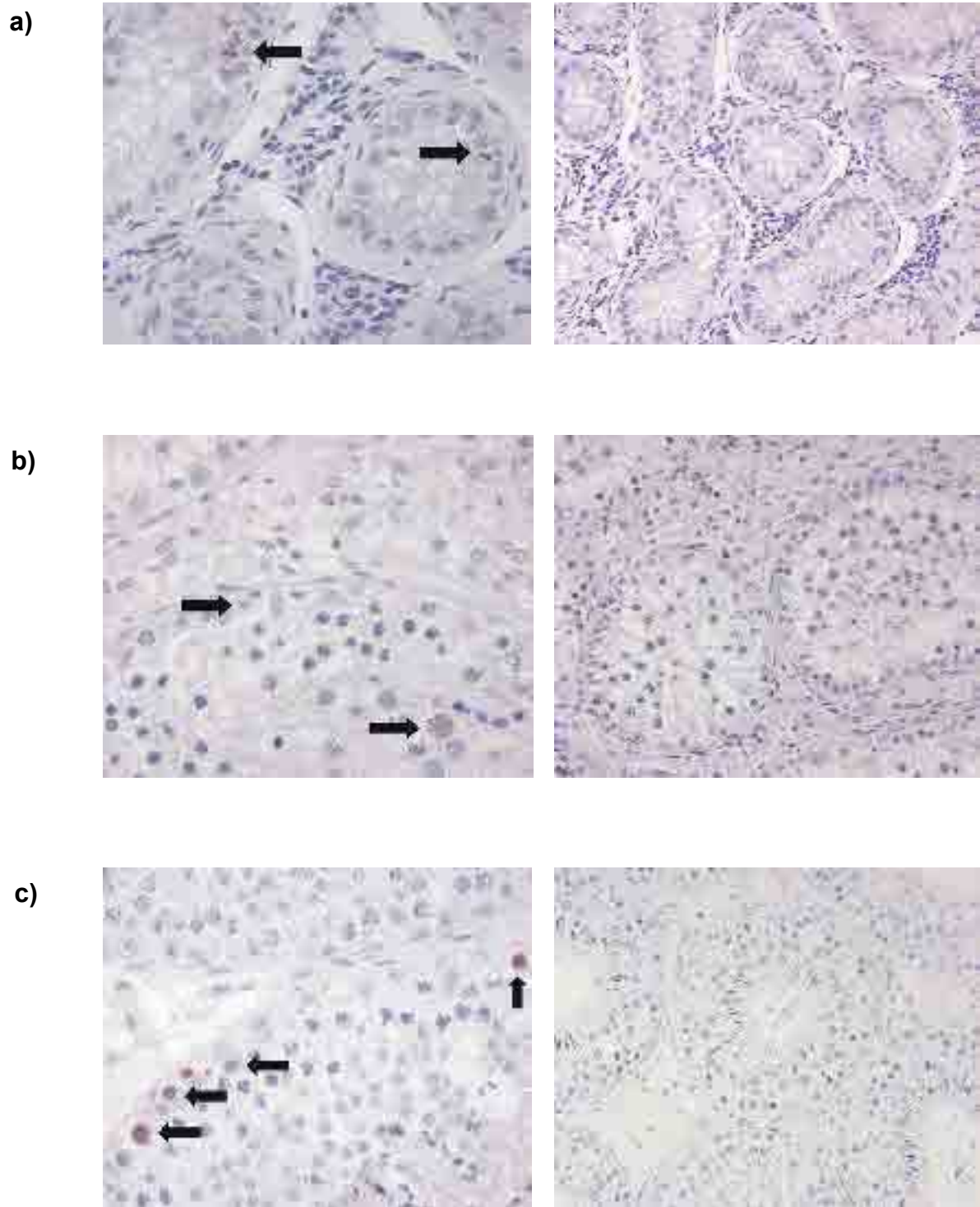


Abb. 31: Lokalisation des TGF β 1 im Testisparenchym des Rehbockes
 a) Februar, b) April, c) Juni (rechts Negativkontrollen mit Kaninchen-IgG)
 Nachweis mittels indirekter Immunhistochemie, Detektion mit DAB (braunes Präzipitat)
 Vergrößerung: 400x (Kontrollen 200x)

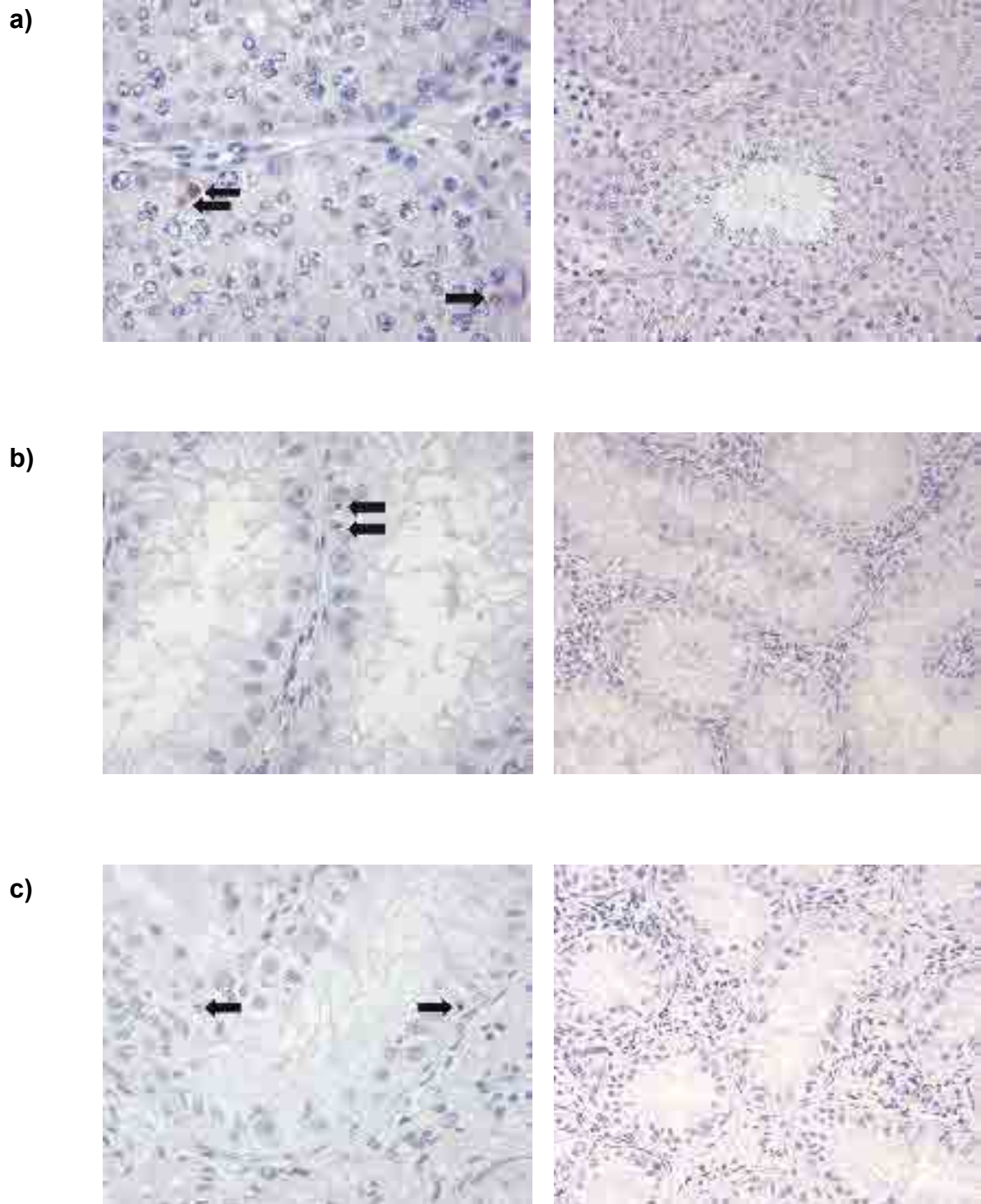


Abb. 32: Lokalisation des TGFβ1 im Testisparenchym des Rehbockes
a) August, b) Oktober, c) Dezember (rechts Negativkontrollen mit Kaninchen-IgG)
Nachweis mittels indirekter Immunhistochemie, Detektion mit DAB (braunes Präzipitat)
Vergrößerung: 400x (Kontrollen 200x)

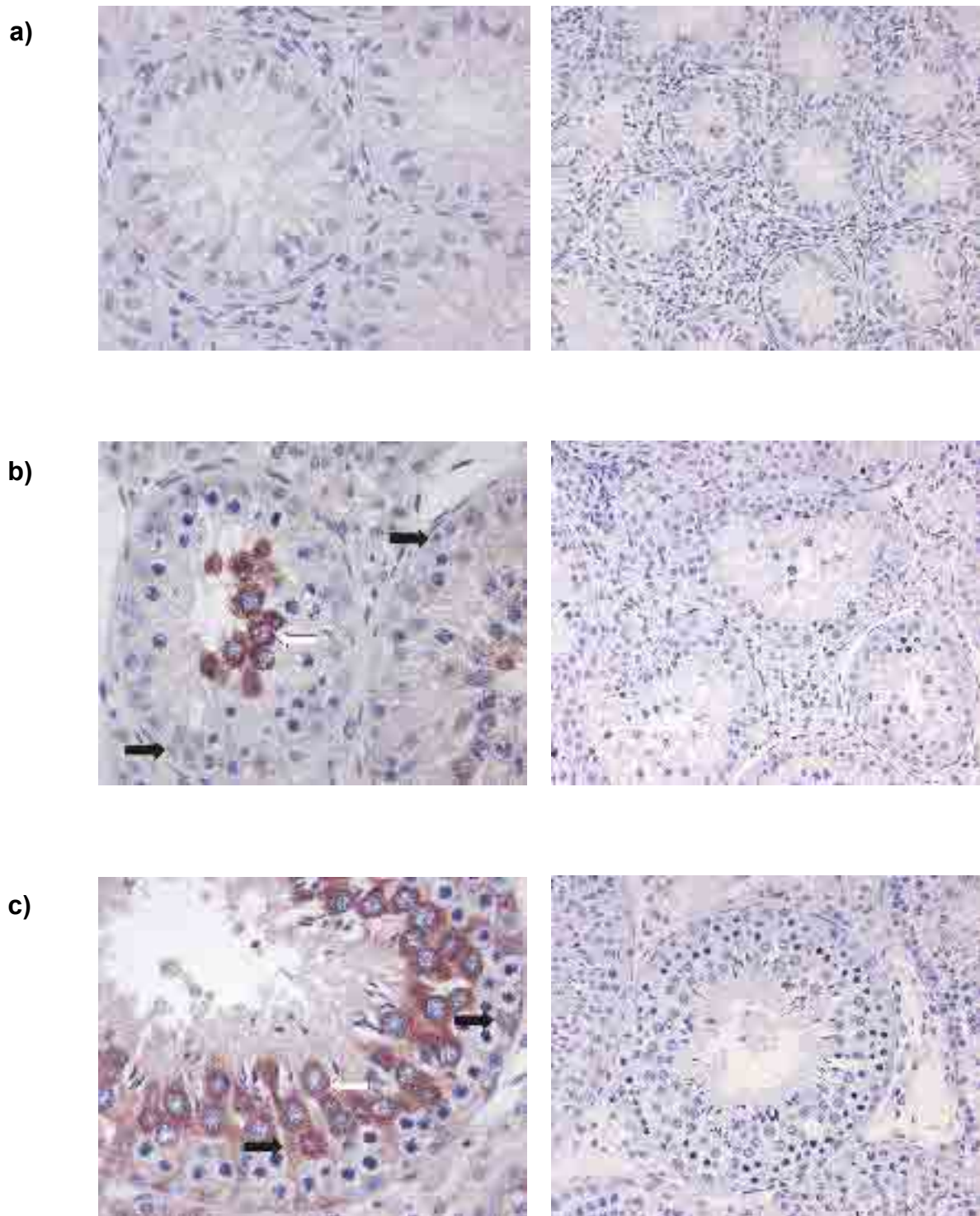




Abb. 33: Lokalisation des TGFβ3 im Testisparenchym des Rehbockes
 a) Februar, b) April, c) Juni (rechts Negativkontrollen mit Kaninchen-IgG)
 Nachweis mittels indirekter Immunhistochemie, Detektion mit DAB (braunes Präzipitat)
 Vergrößerung: 400x (Kontrollen 200x)

 = Sertolizellen
 = Spermatozyten

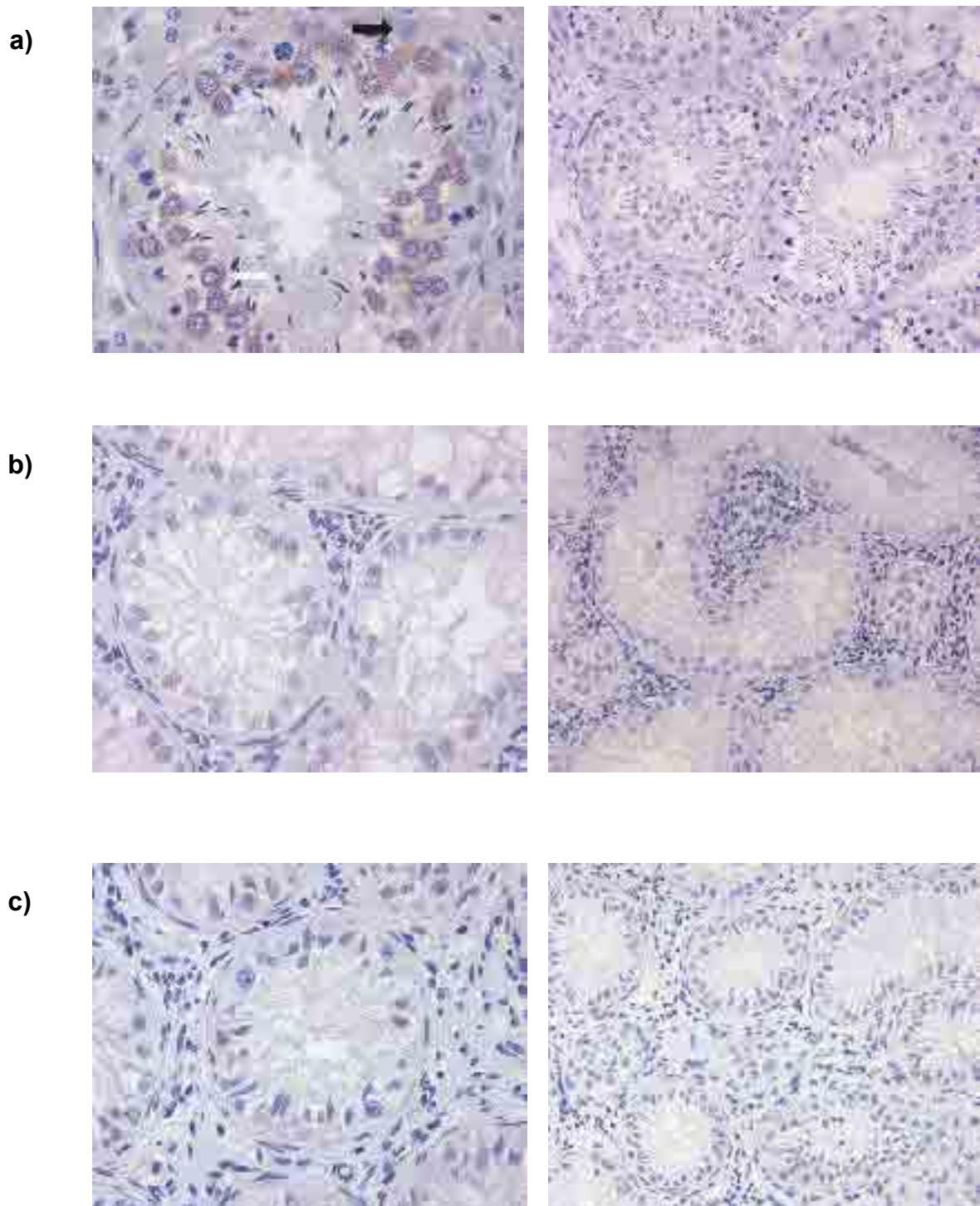




Abb. 34: Lokalisation des TGF β 3 im Testisparenchym des Rehbockes
 a) August, b) Oktober, c) Dezember (rechts Negativkontrollen mit Kaninchen-IgG)
 Nachweis mittels indirekter Immunhistochemie, Detektion mit DAB (braunes Präzipitat)
 Vergrößerung: 400x (Kontrollen 200x)

 = Sertolizellen
 = Spermatozyten

5.2.4 Immunhistochemische Detektion des VEGF

Interstitielles Kompartiment:

VEGF ist zu allen Zeiten der Probennahme zytoplasmatisch in interstitiellen Zellen nachweisbar. Im Oktober, Dezember und Februar sind diese Zellen deutlich kernnah gefärbt. Im April, Juni und August liegt das Protein tropfenförmig neben dem Kern vor. In diesen Monaten sind die VEGF-positiven Zellen wahrscheinlich Leydigzellen, die Identifizierung ist aber nicht immer eindeutig möglich.

Tubuläres Kompartiment:

Über das gesamte Jahr hinweg sind Spermatogonien deutlich VEGF positiv gefärbt. In den Monaten, in denen auch andere spermatogene Zellen im Keimepithel vertreten sind, zeigen auch sie eine zytoplasmatische Anfärbung (Abb. 35 und 36).

5.2.5 Immunhistochemische Detektion des aFGF

Interstitielles Kompartiment:

aFGF ist zu allen Zeiten der Probennahme in interstitiellen Zellen nachweisbar. Im Oktober, Dezember und Februar ist diese Färbung eher diffus und intrazellulär fein verteilt. Im April, Juni und August liegt das Protein tropfenförmig neben dem Kern vor. In diesen Monaten können die aFGF-positiven Zellen als Leydigzellen angesprochen werden, die Identifizierung ist aber nicht immer eindeutig möglich.

Tubuläres Kompartiment:

Tubulär ist aFGF nur in den Monaten Juni und August detektierbar. Elongierende Spermatiden färben zu dieser Zeit sehr deutlich positiv für aFGF. Die Anfärbung ist im Bereich des Akrosoms lokalisiert und kann nur bei Spermatiden in Stadium VI bis III nachgewiesen werden. Elongierte Spermatiden, die sich im Spermiationsstadium (IV) befinden oder bereits abgeschwommen sind, weisen keine Färbung mehr auf. Während der anderen Monate sind in den Tubuli seminiferi keine Spermatiden vorhanden. Andere tubuläre Zellen zeigen keine aFGF positive Anfärbung (Abb. 37 und 38).

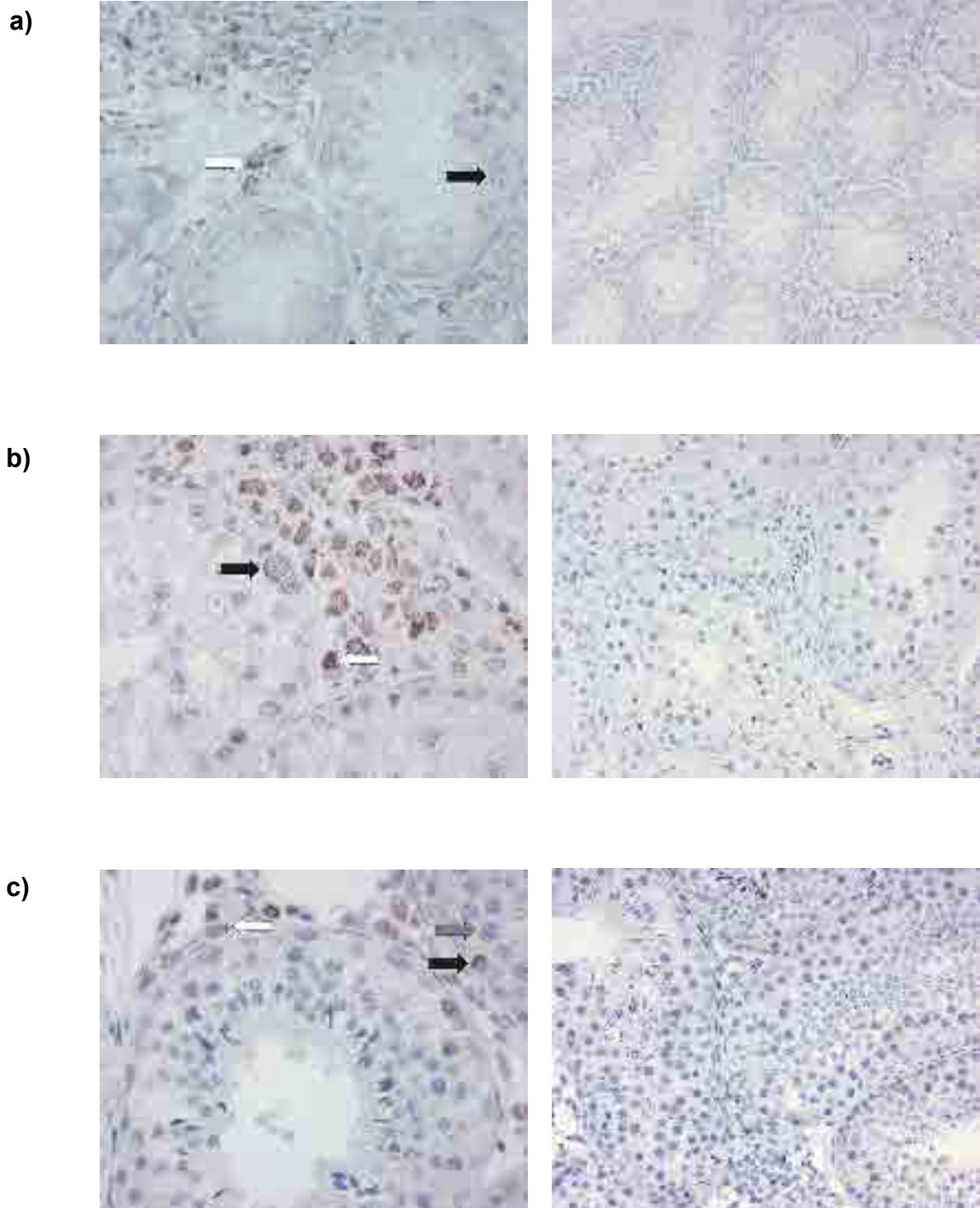





Abb. 35: Lokalisation des VEGF im Testisparenchym des Rehbockes
 a) Februar, b) April, c) Juni (rechts Negativkontrollen mit Maus-IgG)
 Nachweis mittels indirekter Immunhistochemie, Detektion mit DAB (braunes Präzipitat)
 Vergrößerung: 400x (Kontrollen 200x)

-  = Spermatogonien
-  = Spermatozyten
-  = interstitielle Zellen

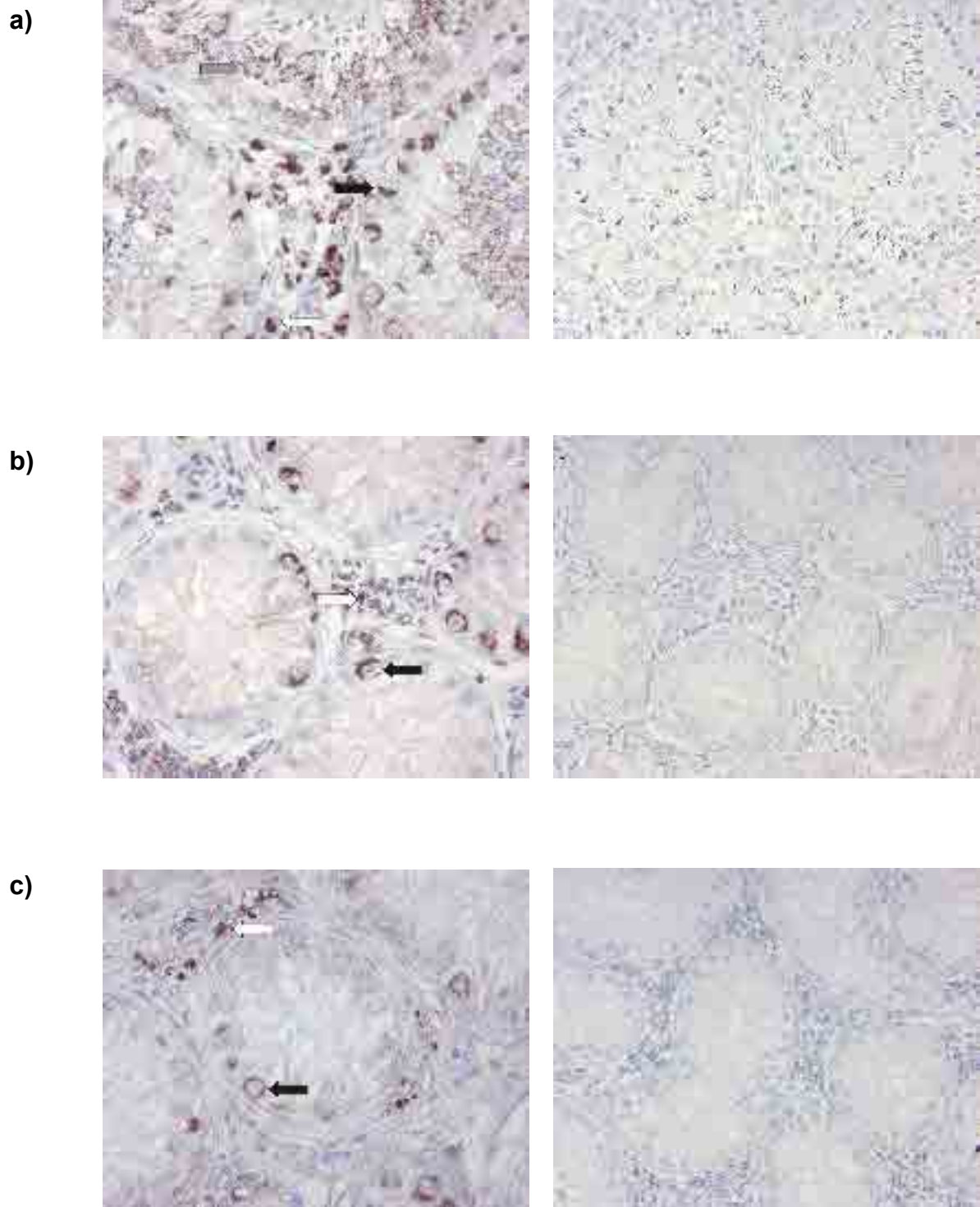





Abb. 36: Lokalisation des VEGF im Testisparenchym des Rehbockes
 a) August, b) Oktober, c) Dezember (rechts Negativkontrollen mit Maus-IgG)
 Nachweis mittels indirekter Immunhistochemie, Detektion mit DAB (braunes Präzipitat)
 Vergrößerung: 400x (Kontrollen 200x)

-  = Spermatogonien
-  = Spermatozyten
-  = interstitielle Zellen

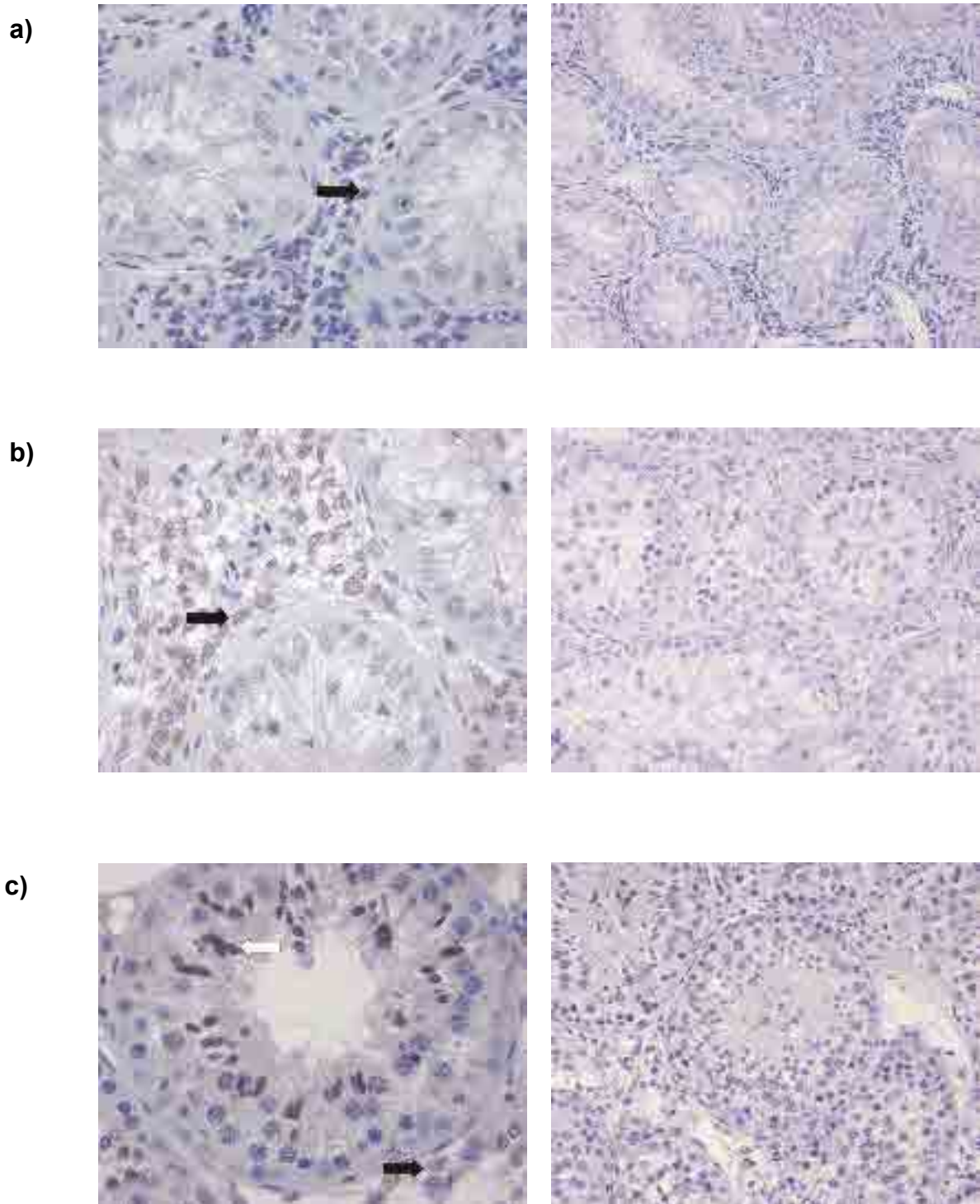




Abb. 37: Lokalisation des aFGF im Testisparenchym des Rehbockes
 a) Februar, b) April, c) Juni (rechts Negativkontrollen mit Kaninchen-IgG)
 Nachweis mittels indirekter Immunhistochemie, Detektion mit DAB (braunes Präzipitat)
 Vergrößerung: 400x (Kontrollen 200x)

 = interstitielle Zellen
 = Spermatiden

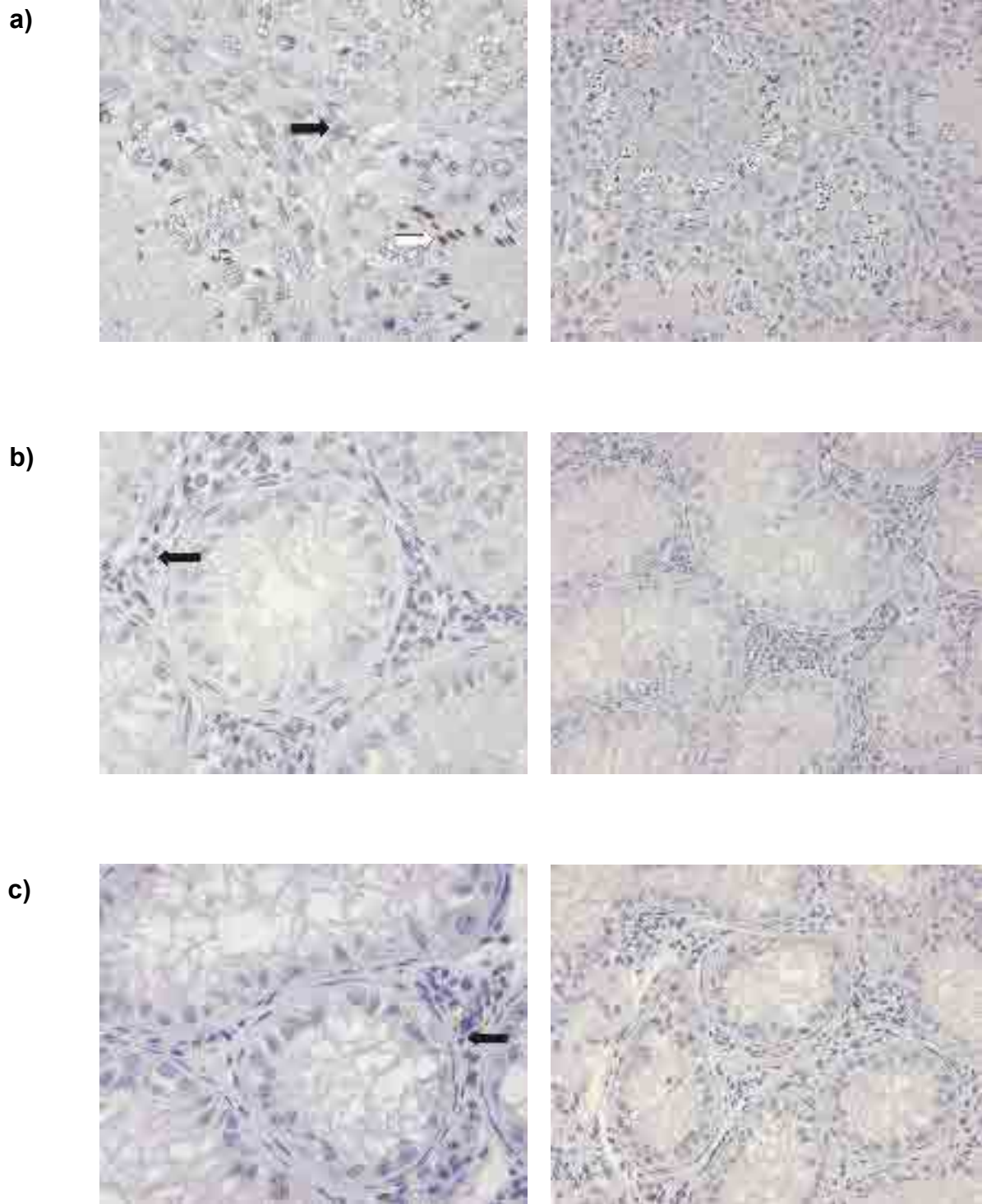




Abb. 38: Lokalisation des aFGF im Testisparenchym des Rehbockes
 a) August, b) Oktober, c) Dezember (rechts Negativkontrollen mit Kaninchen-IgG)
 Nachweis mittels indirekter Immunhistochemie, Detektion mit DAB (braunes Präzipitat)
 Vergrößerung: 400x (Kontrollen 200x)

 = interstitielle Zellen
 = Spermatiden