

Aus dem Institut für Tierhaltung und Tierzucht
Universität Hohenheim
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie
Prof. Dr. Dr. habil. R. Claus

**Steuerungsmechanismen der Spermatogenese beim Eber:
Auswirkungen einer GnRH-Immunsierung und anschließender
Estradiolinfusion**

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Agrarwissenschaften

vorgelegt
der Fakultät Agrarwissenschaften

von
Anna Wagner
aus Tübingen

Hohenheim 2005

Die vorliegende Arbeit wurde am 14.07.2005 von der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften“ angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juli 2005

Prodekan: Prof. Dr. K. Stahr

Berichterstatter, 1. Prüfer: Prof. Dr. Dr. R. Claus

Mitberichterstatter, 2. Prüfer: Prof. Dr. M. Bergmann

3. Prüfer: Prof. Dr. R. Mosenthin

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1	EINLEITUNG 1
2	LITERATUR 3
2.1	Männlicher Genitaltrakt – Prinzipieller Hodenaufbau 3
2.2	Das Interstitium des Hodenparenchyms und dessen Funktion 4
2.3	Tubuli des Hodenparenchyms und deren Funktion 6
2.3.1	Sertolizellen 7
2.3.2	Keimzellen und Spermatogenese 9
2.3.3	Keimepithel- und Spermatogenesezyklus 13
2.4	Regulation der Spermienausbeute 19
2.5	Hormonale Koordination und Steuerung der Hodenfunktion 21
2.5.1	Gonadotropine und übergeordnete Steuerungsmechanismen 21
2.5.2	Follikel Stimulierendes Hormon (FSH) 24
2.5.3	Luteinisierendes Hormon (LH) 26
2.5.4	Gonadenhormone 26
2.5.4.1	Androgene 28
2.5.4.2	Estrogene 29
2.5.5	Glucocorticoide 32
2.6	Modelle zur Untersuchung der hormonalen Regulation der Spermatogenese 35
2.6.1	Hypophysektomie 35
2.6.2	Ethane Dimethane Sulfonate Behandlung 35
2.6.3	Agonisten und Antagonisten des Gonadotropin-Releasing Hormons 36
2.6.4	Enzyminhibitoren 37
2.6.5	Knock-out Experimente 37
2.6.6	Immunisierung 38
3	FRAGESTELLUNG 41

	Seite
4	MATERIAL UND METHODEN..... 42
4.1	Tierversuche 42
4.1.1	Übersicht..... 42
4.1.2	Herkunft, Haltung, Fütterung der Tiere 44
4.1.3	Verlegung von Venenverweilkathetern..... 45
4.1.4	GnRH-Immunisierung..... 46
4.1.5	Infusionstechnik..... 47
4.1.6	Einschläfern und Gewebeprobenahme..... 49
4.2	Hormonanalytische Verfahren..... 51
4.2.1	Radioimmunologische Bestimmungen..... 51
4.2.1.1	Proteohormone 51
4.2.1.2	Steroidhormone..... 58
4.3	Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Cortison..... 68
4.4	Radioenzymassay zur Bestimmung der Aktivität der 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase..... 71
4.5	Histologische Bestimmungen 73
4.6	Immuncytochemische und Cytochemische Bestimmungen..... 76
4.7	Real Time PCR..... 80
4.8	Statistische Auswertung..... 81
5	ERGEBNISSE..... 83
5.1	Auswirkungen der GnRH-Immunisierung und anschließender Estradiol-Infusion auf den Verlauf von LH und FSH..... 83
5.1.1	Luteinisierendes Hormon..... 83
5.1.2	Follikel Stimulierendes Hormon 84
5.2	Auswirkungen einer Immunisierung gegen Gonadotropin-Releasing Hormon und anschließender Estradiol-Infusion auf die Gonadensteroid-,Glucocorticoide und die Aktivität der 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase..... 88
5.2.1	Testosteron..... 88
5.2.2	17 β Estradiol..... 89

	Seite
5.2.3	Glucocorticoide 91
5.2.4	11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 92
5.3	Konsequenzen der Immunisierung gegen Gonadotropin Releasing Hormon und anschließender Estradiolinfusion auf Hodenebene 95
5.3.1	Hodengewicht und Hodenvolumen 95
5.3.2	Auswirkungen der Immunisierung gegen Gonadotropin Releasing Hormon und anschließender Estradiol-Infusion auf morphologische Parameter des Hodens 96
5.3.2.1	Relative Anteile von Tubuli und Interstitium 96
5.3.2.2	Parameter der Tubuli 97
5.3.2.3	Parameter des Interstitiums 99
5.3.2.4	Stadien des Keimepithelzyklus 100
5.3.2.5	Keimzellzahlen 102
5.3.3	Beeinflussung cytochemischer und immuncytochemischer Parameter des Hoden durch Immunisierung gegen Gonadotropin Releasing Hormon und anschließende Estradiolinfusion 105
5.3.3.1	GnRH-Immunisierung 105
5.3.3.2	Estradiolinfusion 107
6	DISKUSSION 112
6.1	Steuerungsmechanismen der Hodenregression beim Eber nach einer GnRH-Immunisierung 112
6.1.1	Hormonstatus 112
6.1.2	Veränderungen auf Hodenebene 114
6.2	Bedeutung der Estrogene für die Spermatogenese 117
6.2.1	Hormonstatus 117
6.2.2	Veränderungen auf Hodenebene 118
6.3	Feed back Effekte auf FSH 119
7	ZUSAMMENFASSUNG 121

	Seite
8	SUMMARY 123
9	LITERATURVERZEICHNIS 125

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 2.1 Aufbau des Hodens.....	3
Abbildung 2.2 Tubulusquerschnitt.....	6
Abbildung 2.3 Dreidimensionale Struktur einer Sertolizelle mit ihren Zellorganellen und Keimzellen	7
Abbildung 2.4 Schema zur Stammzellerneuerung während der Spermatogenese.....	10
Abbildung 2.5 Veränderungen während der Spermiogenese von den runden zu den elongierten Spermatiden.....	12
Abbildung 2.6 Stadien des Keimepithelzyklus beim Eber.....	15
Abbildung 2.7 Aminosäuresequenz des GnRH.....	21
Abbildung 2.8 Übergeordnete Regulation der Spermatogenese.....	23
Abbildung 2.9 Übersicht über die Steroidsynthese in den Leydigzellen des Ebers mit den beteiligten Enzymsystemen und LH-abhängigen Schritten.....	27
Abbildung 2.10 Strukturformel des Ehtan dimethan sulfonat	35
Abbildung 4.1 Ablauf des Hauptversuchs.....	47
Abbildung 4.2 Infusionstechnik beim Schwein.....	48
Abbildung 4.3 Aufarbeitung der Hodengewebeproben für die Bestimmung von 17β Estradiol.....	66
Abbildung 5.1 LH-Profile (pg/ml) des Eber Zentis, des immunisierten Ebers Zunder und des $17\beta E_2$ – infundierten Ebers Zottel im Alter von 25 Wochen.....	84
Abbildung 5.2 FSH-Profile des Kastraten Dumbo mit und ohne Estradiolinfusion sowie des immunisierten Ebers Eddy im Alter von 25 Wochen.....	86
Abbildung 5.3 FSH-Profile a: der Eber Ernie (25 Wochen) und Bonzo (18 Wochen), b: der immunisierten Eber Eddy (25 Wochen) und Bär (18 Wochen), c: der Kastraten Dumbo (25 Wochen) und Ralf (18 Wochen) sowie d: der $17\beta E_2$ -infundierten Kastraten Dieter (25 Wochen) und Ronny (18 Wochen).....	87

	Seite
Abbildung 5.4 Testosteronkonzentrationen der Eber (n=5), immunisierten Eber (n=5) und $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Eber (n=6) innerhalb des 50-tägigen Versuchszeitraumes.....	88
Abbildung 5.5 Testosteron-Konzentrationen (ng/ml) des Ebers Elba während des Versuchszeitraumes.....	89
Abbildung 5.6 Estradiol-Konzentrationen über den Versuchszeitraum in intakten Ebern, immunisierten Ebern und $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Ebern.....	90
Abbildung 5.7 Ergebnisse der RT-PCR für 11β -HSD1 und 11β -HSD2 in porcinem Hodengewebe.....	94
Abbildung 5.8 Darstellung des Immunisierungseffektes.....	95
Abbildung 5.9 Prozentuale Verteilung der drei Phasen des Keimepithelzyklus für Eber (n=5), immunisierte Eber (n=5) und $17\beta E_2$ -infundierte, immunisierte Eber (n=5).....	102
Abbildung 5.10 Tubuli eines Ebers, immunisierten und $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Ebers während Stadium VIII des Keimepithelzyklus.....	104
Abbildung 5.11 Beispiel der Mitose-(Ki-67) Färbung in den Tubuli eines immunisierten Ebers.....	106
Abbildung 5.12 GCR-positive Zellen in den Tubuli eines immunisierten Ebers.....	107
Abbildung 5.13 Apoptotische (TUNEL-positive) Zellen in den Tubuli eines immunisierten Ebers.....	107
Abbildung 5.14 Lokalisierung des $ER\alpha$ im Hodengewebe eines $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Ebers.....	108
Abbildung 5.15 Verteilung des $ER\alpha$ und der Mitose über die Stadien des Keimepithelzyklus von Ebern (n=5) (a), immunisierten Ebern (n=5) (b) und $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Ebern (n=6)(c).....	110

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 2.1	Speziesvergleich des Leydigzellanteils am Gesamthodengewebe 5
Tabelle 2.2	Dauer des Keimepithelzyklus verschiedener Spezies im Vergleich zum Eber 14
Tabelle 2.3	Charakteristika der einzelnen Stadien des Keimepithelzyklus beim Eber 16
Tabelle 2.4	Dauer der Stadien des Keimepithelzyklus vergleichend zwischen verschiedenen Schweinerassen 17
Tabelle 2.5	Gesamtdauer der Spermatogenese 18
Tabelle 2.6	LH- und FSH-Konzentrationen nach einer GnRH-Immunisierung 22
Tabelle 2.7	Abhängigkeit der Spermatogenese verschiedener Spezies von FSH, Testosteron oder beiden Hormonen 25
Tabelle 2.8	Aromatase-Expression im Hoden verschiedener Spezies 31
Tabelle 2.9	Rolle der Estrogene für die Spermatogenese verschiedener Spezies 32
Tabelle 2.10	Charakteristika der Isoformen 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 1 und 2 33
Tabelle 4.1	Verteilung der Gruppen aus den zwei Durchgängen mit zugehörigen Körpergewichten (Gewichte zu Beginn der 25. bis Ende der 32. Lebenswoche) 42
Tabelle 4.2	Estradiolinfusion an Kastraten: Verteilung der Gewichte über den Versuchszeitraum (24.-26. Lebenswoche) 43
Tabelle 4.3	Zusammensetzung der Futterration 45
Tabelle 4.4	Übersicht über die angewandten hormonanalytischen Methoden 51
Tabelle 4.5	Charakterisierung der Qualität der Markierungsprodukte 52
Tabelle 4.6	Kreuzreaktivitäten des LH Antiserums 53
Tabelle 4.7	Absolute Bindung, NSB und untere Nachweisgrenze der pLH-Tests 54
Tabelle 4.8	Interassay-Varianzen für die LH-Messungen der 2-Tagestests (n= 7) mit kalter Wiederfindung (WAF) 55

	Seite	
Tabelle 4.9	Interassay-Varianzen für die LH-Messungen der 3-Tagestests (n= 7) mit kalter Wiederfindung (WAF).....	55
Tabelle 4.10	Kreuzreaktivitäten des pFSH Antiserums.....	56
Tabelle 4.11	Bindungskapazität zur Ermittlung der Testverdünnung des Antiserums gegen pFSH.....	56
Tabelle 4.12	Interassay-Varianzen für die pFSH-Messungen (n= 28) mit kalter Wiederfindung (WAF).....	57
Tabelle 4.13	Verwendete Plasmavolumina der gemessenen Steroidhormone.....	58
Tabelle 4.14	Testparameter der Steroidhormone 17 β Estradiol, Testosteron, Cortisol.....	60
Tabelle 4.15	Kreuzreaktivitäten der hormonspezifischen Antiseren.....	61
Tabelle 4.16	Qualitätsparameter der 17 β Estradiol Messungen.....	62
Tabelle 4.17	Interassayvarianzen und kalte Wiederfindung der 17 β Estradiol Messungen in Blutplasma und Tubulusflüssigkeit.....	63
Tabelle 4.18	Qualitätsparameter der Testosteronmessungen.....	64
Tabelle 4.19	Interassayvarianz und kalte Wiederfindung der Kontrollen bei der Testosteronmessung.....	64
Tabelle 4.20	Qualitätsparameter für die Cortisolbestimmung.....	65
Tabelle 4.21	Aufnahmевolumina an MeOH sowie für den RIA verwendete Aliquots für Eber, immunisierte und 17 β E ₂ -infundierte immunisierte Eber.....	67
Tabelle 4.22	Qualitätsparameter der 17 β Estradiolmessungen in Hodengewebe.....	67
Tabelle 4.23	Interassayvarianz und kalte Wiederfindung der Kontrollen im Rahmen der 17 β Estradiolmessung in Hodengewebe.....	68
Tabelle 4.24	Extinktionen der Tracertitration zur Bestimmung der optimalen Kombination von Cortison-Antikörper und Cortison-HRP.....	69
Tabelle 4.25	Testparameter für Cortison.....	70
Tabelle 4.26	Kalte Wiederfindung der Kontrollen beim Cortison-EIA.....	70
Tabelle 4.27	Inkubationsbedingungen zur Bestimmung der 11 β -HSD Aktivität.....	71

	Seite
Tabelle 4.28	Entwässerung der Bouin- und Formaldehyd-fixierten Hodengewebssproben und Einbettung in Paraffin.....74
Tabelle 4.29	Morphologische Kriterien zur Charakterisierung des Hodengewebes.....75
Tabelle 4.30	Immuncytochemische und cytochemische Parameter zur Charakterisierung der Spermatogenese der 3 Versuchsgruppen.....76
Tabelle 5.1	LH-Konzentrationen (pg/ml) aus den 12-Stunden Windows der intakten Eber, der immunisierten Eber und der 17 β E ₂ -infundierten, immunisierten Eber im Alter von 25, 26, 27, 28 und 31 Wochen.....83
Tabelle 5.2	FSH-Konzentrationen der jeweiligen 12-Stunden windows von Ebern, immunisierten Ebern, 17 β E ₂ - infundierten immunisierten Ebern im Alter von 25-31 Wochen.....85
Tabelle 5.3	Estradiolkonzentrationen in Tubulusflüssigkeit (ng/ml) und Hodengewebe (ng/g) von Ebern, immunisierten und 17 β E ₂ -infundierten, immunisierten Ebern.....91
Tabelle 5.4	Cortisol-und Cortisonkonzentrationen der Eber, der immunisierten Eber und der 17 β E ₂ -infundierten immunisierten Eber.....92
Tabelle 5.5	Oxidative und Reduktive 11 β -HSD-Aktivität im Hodengewebe intakter, immunisierter und 17 β E ₂ -infundierter immunisierter Eber.....93
Tabelle 5.6	Hodengewichte (g) und Hodenvolumina (ml) der intakten, immunisierten und 17 β E ₂ -infundierten, immunisierten Eber.....96
Tabelle 5.7	Prozentuale Flächenanteile des Interstitiums und der Tubuli im Hodengewebe intakter, immunisierter und 17 β E ₂ -infundierter immunisierter Eber.....97
Tabelle 5.8	Parameter der Tubuli des Hodens für Eber, immunisierte Eber und 17 β E ₂ -infundierte, immunisierte Eber.....98

	Seite	
Tabelle 5.9	Morphologische Parameter des Interstitiums des Hodens für Eber, immunisierte Eber und $17\beta E_2$ -infundierte immunisierte Eber.....	99
Tabelle 5.10	Prozentualer Anteil der Zellstadien des Keimepithelzyklus bei Ebern, immunisierten Ebern und $17\beta E_2$ -infundierten immunisierten Ebern	101
Tabelle 5.11	Häufigkeit der einzelnen Keimzellen (Zellen/Tubulus) bei Ebern immunisierten Ebern und $17\beta E_2$ -infundierten immunisierten Ebern.....	103
Tabelle 5.12	Positive Zellen je Tubulus für Mitose, GCR und Apoptose bei Ebern und immunisierten Ebern.....	105
Tabelle 5.13	Zugehörigkeit der GCR- und TUNEL-positiven Zellen zu den Keimzelltypen von Ebern und immunisierten Ebern.....	106
Tabelle 5.14	Mitose, GCR, Apoptose und $ER\alpha$ bei Ebern, immunisierten Ebern und $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Ebern.....	109

Abkürzungen

AB-Komplex	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
BL	Blank
CMO	Carboxymethyloxim
cpm	counts per minute
DAB	Diaminobenzidin
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribose nucleic acid
dUTP	deoxy-uridin-triphosphat
E ₂	17βEstradiol
EIA	Enzymimmunoassay
EKG	Elektrokardiogramm
ER _α	Estrogen Rezeptor alpha
G6P	Glucose-6-Phosphat
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GA	Gesamtaktivität
GCR	Glucocorticoidrezeptor
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
11β-HSD	11β-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase
³ H	Tritium
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Horseradish-(Meerrettich-)peroxidase
HS	Hemisuccinat
IV	Interstitiumsvolumen
¹²⁵ J	Jod ¹²⁵
LZ	Leydigzellzahl
MJME	Megajoule metabolizable energy
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotin-Adenin-Dinucleotid
NADP ⁺	Nicotin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NADPH	Nicotin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat Wasserstoff
NRS	Normal Rabbit Serum

NSB	Nicht Spezifische Bindung
PBS	Phosphate-buffered-saline
PEG	Polyethylenglycol
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rounds per minute
RSA	Rinderserumalbumin
RT-PCR	Real Time-Polymerase Chain Reaction
TBM-Ether	Tertiärer Buthyl-Methyl-Ether
TBq	Terabequerel
TMB	Tetramethylbenzidin
TT	Terminale Transferase
TUNEL	Terminal Transferase mediated dUTP nick end labeling
WAF	Wiederauffindung (Extraktionsausbeute)
XP	Rohprotein

1 EINLEITUNG

Der Eber weist im Vergleich zu anderen Spezies einige Besonderheiten in seiner Hodenfunktion auf. So bilden die Leydigzellen, die einen wesentlich größeren Anteil am Hodenparenchym einnehmen als bei anderen Spezies, neben den Androgenen große Mengen an Estrogenen. Da der Eber weder ein Androgen Bindendes Protein (ABP) noch ein vergleichbares Protein zum Transport der Estrogene aufweist (Ritzen et al. 1975, Jegou & Le Gac-Jegou 1978), ist unbekannt, wie Androgene und Estrogene in den Tubulusbereich gelangen, zumal eine Aromatisierung von Androgenen im Tubulusbereich beim Eber nicht stattfindet (Raeside & Renaud 1983). Damit in Zusammenhang steht auch die Frage nach der Bedeutung des Follikel Stimulierenden Hormons (FSH) für die Aufrechterhaltung der Spermatogenese beim maturen Eber, da eine wesentliche Funktion von FSH in anderen Spezies die Produktion des ABP ist. Inwieweit FSH gegebenenfalls für die Aromatisierung von Estrogenen in den Leydigzellen zuständig ist, ist für den Eber noch nicht untersucht. Befunde über hohe Glucocorticoidkonzentrationen im Tubulusmilieu des Ebers deuten zudem auf eine Funktion dieser katabolen Steroidhormone bei der Spermatogenese hin, die bisher allerdings noch unbekannt ist (Distelhorst 2002).

Eine Reihe von Untersuchungen existieren in anderen Spezies, primär Nagern zur Rolle des glucocorticoidinaktivierenden Enzyms 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (11 β -HSD) im Hoden. Ihm wird eine bedeutende Rolle in der Regulation der Steroidbiosynthese und damit des Ausmaßes der Testosteronproduktion zugesprochen (Leckie et al. 1998). Inwieweit beim Eber die Glucocorticoide das Spermatogenesegeschehen beeinflussen, welche Zellen von der Glucocorticoidwirkung betroffen sind und was für eine Rolle die 11 β -HSD dabei spielen könnte, ist nicht untersucht. In Zusammenhang damit steht auch die Frage nach dem Mechanismus der antikatabolen Wirkung der Androgene, die in anderen Geweben zumindest teilweise durch eine Hemmung der Glucocorticoidwirkung erklärt werden kann (Yazawa et al. 2002).

Die hohen Estrogenkonzentrationen des Ebers haben Bedeutung für die Ausbildung des Sexualverhaltens, indem sie die Libido von Ebern fördern (Booth 1988, Parrott & Booth 1984). Daneben beschleunigen die testikulären Estrogene im weiblichen Genitaltrakt durch ihre kontraktionsfördernden Eigenschaften den Spermientransport

und beeinflussen den Ovulationszeitpunkt bei der Sau. (Claus et al. 1987, Claus et al. 1990). Im Rahmen eines früheren Projektes wurde bereits versucht mittels eines Aromataseinhibitors die Rolle der Estrogene für die Spermatogenese zu klären. Der für die Humanmedizin entwickelte Aromataseinhibitor erwies sich jedoch beim Schwein als unwirksam (Steinhauer 1983), so dass die Bedeutung der Estrogene für die Spermatogenese des Ebers noch nicht geklärt ist.

Da mittlerweile durch GnRH-Immunsierung (immunologische Kastration) die Möglichkeit besteht, die gesamte Hodenfunktion auf ein Minimum zu reduzieren, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Rolle der Estrogene für die Spermatogenese näher zu charakterisieren.

Infolge einer aktiven Immunsierung gegen GnRH entfällt dessen stimulierende Wirkung auf den Hypophysenvorderlappen. So unterbleibt die LH-Freisetzung aus der Hypophyse und in Folge auch die unter LH-Einfluss stehende Sekretion der Gonadensteroiden aus den Leydigzellen. Dies ermöglicht, die Konsequenzen der Abwesenheit von Gonadensteroiden auf Hodenebene zu untersuchen und durch Infusion von Androgenen oder Estrogenen deren selektive Wirkung zu erfassen.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Männlicher Genitaltrakt: Prinzipieller Hodenaufbau

Der männliche Genitaltrakt besteht aus den Hoden als keimbereitenden Organen, den Nebenhoden sowie den Samenleitern als keimleitenden Organen, den akzessorischen Geschlechtsdrüsen, deren Sekrete die charakteristische Zusammensetzung der Ejakulate bestimmen, sowie dem zur Begattung dienenden Penis.

Der Aufbau des Hodens ist für die verschiedenen Säugetierspezies ähnlich (Wrobel 1990, Johnson et al. 1999, Sinowatz 2001). Abbildung 2.1 gibt einen schematischen Überblick.

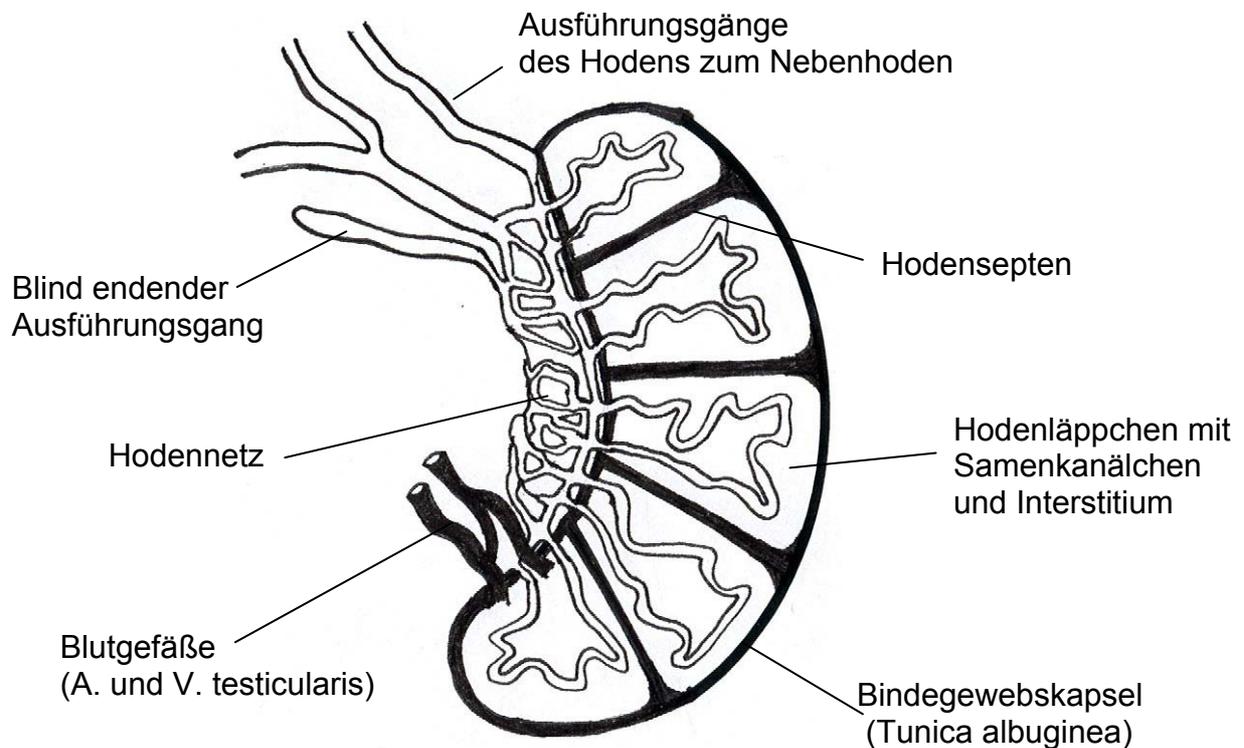


Abbildung 2.1 Aufbau des Hodens (verändert nach Netter 1987)

Generell umschließt die paarig angelegten Hoden eine dicke, muskulöse bindegewebsartige Organkapsel (Tunica albuginea), welche mit einem Teil des Bauchfells, das ebenfalls den Hoden überzieht, verwachsen ist (dieser Teil wird während des embryonalen Hodenabstiegs mit in das Skrotum überführt).

Ausgehend von dieser Organkapsel, strahlen Bindegewebssepten in das Hodenparenchym und bilden das Mediastinum des Hodens. Durch diese Septenbildung wird der Hoden in mehrere Läppchen, die Lobuli testes, unterteilt (Abbildung 2.1). Über diese Läppchen gelangen die über die Tunica albuginea in den Hoden eintretenden Blutgefäße (Arteria (A) und Vena (V) testicularis) sowie Nervenfasern in das Hodenparenchym. Im Mediastinum enden die Samenkanälchen des Hodens und bilden das Hodennetz (Rete testis), aus dem die Ausführungsgänge Richtung Nebenhoden entspringen, welche die reifen Spermatozoen in den Nebenhoden transportieren. Als Reste der embryonalen Urnierenkanälchen sind teilweise blind endende Gänge im Mediastinum vorzufinden (Netter 1987).

Das Hodenparenchym selbst enthält die zwei wesentlichen funktionellen Kompartimente des Hodens, die Samenkanälchen (Tubuli) und das Interstitium. Die Samenkanälchen verlaufen stark geschlängelt in Richtung Mediastinum. Kurz vor Erreichen desselben werden sie zu geraden Ausführungsgängen (Tubuli recti) und verzweigen sich, durch Anastomosen verbunden, in das Hodennetz.

2.2 Das Interstitium des Hodenparenchyms und dessen Funktion

Im Interstitium des Hodenparenchyms enden die Blutgefäße sowie Nervenbahnen und Lymphgefäße des Hodens.

Die Blutversorgung des Hodens erfolgt über die A. testicularis. Sie verzweigt sich über beide Hoden, verläuft in der Tunica albuginea und den zum Mediastinum verlaufenden Bindegewebssepten und gelangt so in das Interstitium des Hodenparenchyms. Hier verzweigt sie sich bis auf Kapillargröße und kehrt, die Tubuli umwindend, wieder zur Tunica albuginea zurück. Der venöse Blutabfluss erfolgt über die V. testicularis, welche aus von den Tubuli kommenden Kapillaren in der Tunica albuginea zusammenfließt.

Durch den Plexus pampiniformis wird ein Temperaturgefälle des Blutes in Richtung Hoden, das zur Aufrechterhaltung einer intakten Spermatogenese essentiell ist, sichergestellt. Dieses „Counter Current“ System besteht aus den Arterien und den Venen, die sich umeinander winden, so dass vom Hoden kommendes „kaltes“ venöses Blut für die Abkühlung des vom Körper kommenden arteriellen „warmen“ Blutes sorgt.

Die den Hoden versorgenden Nervenbahnen verlaufen parallel zu den Blutgefäßen und sind überwiegend sympathischen Ursprungs. Die Nervenfasern enden wie die

Blutgefäße auch zwischen den Tubuli im Interstitium des Hodenparenchyms. Ebenfalls aus dem Interstitium des Hodenparenchyms kommend, verlaufen lymphatische Gefäße über die Bindegewebssepten des Hodenparenchyms zu der Tunica albuginea und leiten die Lymphe bis in die zu den nahe der Aorta liegenden Lymphknoten (Steinberger & Steinberger 1972, Johnson et al. 1999).

Die wichtigsten Zellen des Interstitiums sind die Leydigzellen, welche die endokrine Funktion des Hodens übernehmen und somit für die Steroidbiosynthese verantwortlich sind. Ihr Anteil am Gesamthodengewebe variiert speziesspezifisch wie in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tabelle 2.1 Speziesvergleich des Leydigzellanteils am Gesamthodengewebe

Spezies	% Leydigzellen am gesamten Hodengewebe	Literatur
Bulle	5	Lennox & Logue 1979
Schafbock	2,7 – 5,7	Lunstra & Schanbacher 1988 Hötzel et al. 1998
Ratte	2,7	Mori & Christensen 1980
Mensch	3,1	Mori et al. 1982
Hengst	7,7	Johnson & Thompson 1986
Eber	25	Groth & Claus 1977 Claus et al. 1983 Awoniyi et al. 1988a

Mit 25% nehmen die Leydigzellen des Ebers einen sehr großen Anteil am Hodengewebe ein. Innerhalb des Interstitiums ist nahezu die gesamte Fläche mit Leydigzellen besetzt, während Blut- und Lymphgefäße nur spärlich zu finden sind. Demgegenüber liegen Leydigzellen bei anderen Spezies zu einem wesentlich geringeren Prozentsatz vor und sind, weniger dicht gepackt, zwischen die Blut- und Lymphgefäße des Interstitiums eingebettet.

Speziesübergreifend weisen die Leydigzellen eine polygonale Form auf. Ihr Cytoplasma ist aufgrund der Aktivitäten der Steroidsynthese reich an Lipidtröpfchen als Cholesterolspeicher. Im reichlich vorhandenen endoplasmatischen Reticulum (ER) und den Mitochondrien sind die für die Steroidbiosynthese notwendigen Enzyme lokalisiert. Durch die enge Verbindung zu den Blutgefäßen sorgen die Leydigzellen für die Abgabe der synthetisierten Steroide in das periphere Blutplasma. Die Leydigzellen sind über das gesamte Interstitium verteilt, vermutlich um die Versorgung der Samenkanälchen mit den für die Spermatogenese wichtigen Steroidhormonen sicherzustellen.

2.3 Tubuli des Hodenparenchyms und deren Funktion

Die Spermatogenese findet in den Samenkanälchen oder Tubuli des Hodens statt. Hier liegen zum einen die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Keimzellen, zum anderen die für die Keimzellen als Stütz- und Nährzellen dienenden Sertolizellen. Begrenzt ist ein Tubulus von den peritubulären Zellen, die als kontraktionsfähige Muskelzellen auf den Keimzelltransport und die Abgabe der fertigen Spermatozoen Einfluss nehmen können. Ein Tubulus läßt sich in Keimepithel und Lumen unterteilen. Abbildung 2.2 zeigt einen Tubulus im Querschnitt.

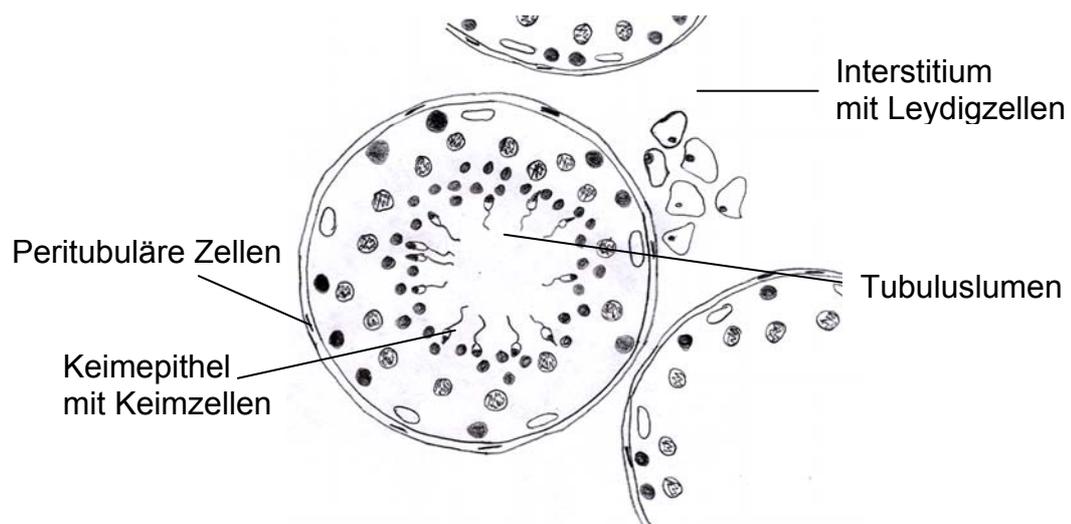


Abbildung 2.2 Tubulusquerschnitt

2.3.1 Sertolizellen

Die Sertolizellen sind die größten Zellen in den Tubuli (Sertoli 1865). Sie erstrecken sich vom basalen Rand bis hin zum Tubuluslumen. Abbildung 2.3 zeigt die Struktur einer Sertolizelle mit ihren Zellorganellen.

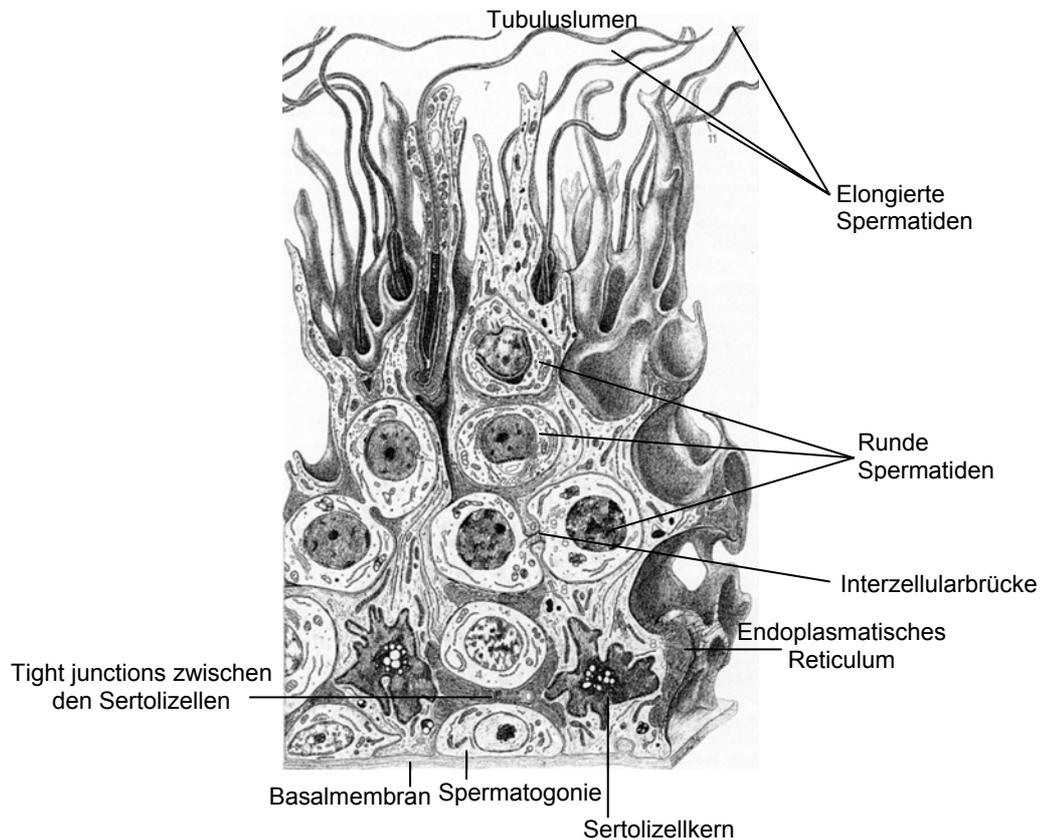


Abbildung 2.3 Dreidimensionale Struktur einer Sertolizelle mit ihren Zellorganellen und Keimzellen (Rüsse & Sinowatz 1998)

Die verbreiterte Zellbasis am Rand der Tubuli enthält den Kern der Sertolizelle. Durch eine Vielzahl an Falten, Einstülpungen und Fortsätzen umschließen die Sertolizellen (Abbildung 2.3) die Keimzellen und stellen so einen engen, keine Zwischenräume lassenden Kontakt zu diesen her. Eine ähnlich enge Zellverbindung ist vergleichbar im Zentralnervensystem (ZNS) zwischen Nerven und Gliazellen zu finden (Aumüller 1978). Ebenso vergleichbar mit den im ZNS enthaltenen Gliazellen ist die Funktion der Sertolizellen. Beide Zelltypen übernehmen die Ernährung der in sie eingebetteten Keim- bzw. Nervenzellen, sorgen für Stabilität, sind essentiell für die Ausbildung der Blut-Hoden- bzw. der Blut-Hirn-Schranke und haben phagozytotische Fähigkeiten (Steinberger & Steinberger 1972, Heckert & Griswold

1993). Für die Ernährung der Keimzellen wandelt die Sertolizelle Blutglucose in Lactat um, die primäre Energiequelle der Keimzellen. Aktin- und Myosinfilamente innerhalb der Sertolizelle gewährleisten den Halt der Keimzellen. Der enge Kontakt zwischen Keimzellen und Sertolizellen wird über gap junctions zusätzlich verstärkt, die Sertolizellen selbst sind über Hemidesmosomen mit der Basalmembran verankert. Die bekanntesten Verbindungen zwischen Sertoli- und Keimzellen sind ektoplasmatische Spezialisierungen und tubulobulbäre Komplexe, über die Sertolizellen vorrangig mit den Spermatiden verbunden sind.

Ektoplasmatische Spezialisierungen dienen der festen Verbindung von Sertolizellen mit elongierten Spermatiden. Sie bestehen aus endoplasmatischem Reticulum, das sich mantelartig über den Kopf der Spermatiden legt. Ektoplasmatische Spezialisierungen treten zum ersten Mal in frühen elongierten Spermatiden auf. Tubulobulbäre Komplexe lösen die ektoplasmatischen Spezialisierungen ab und sind charakteristisch für elongierte Spermatiden kurz vor der Spermiation. Durch die Ausbildung der tubulobulbären Komplexe verankern sich die elongierten Spermatiden in der Sertolizelle und verhindern eine zu frühe Abgabe in das Tubuluslumen. Zusätzlich wird durch die tubulobulbären Komplexe die Aufnahme von überschüssigem Cytoplasma und von Zellmembranbestandteilen der sich differenzierenden Spermatiden (den sogenannten Residualkörperchen) durch die Sertolizelle vereinfacht (Kojima 1990). Demnach werden die von den Sertolizellen ausgehenden ektoplasmatischen Spezialisierungen kurz vor der Spermiation abgebaut und durch von den Spermatiden ausgehende tubulobulbäre Komplexe ersetzt (Mruk & Cheng 2004). Durch tight junctions zwischen den Sertolizellen entsteht die Blut-Hoden-Schranke, eine Diffusionsbarriere, die jeden Tubulus in ein basales und ein adluminales Kompartiment aufteilt (Aumüller 1978). Während sich die Spermatogonien im basalen, an die zentrale Blutversorgung angeschlossenen Kompartiment befinden, liegen Spermatozyten und Spermatiden im spezifischen Milieu des adluminalen Bereichs, in den extratubuläre Substanzen ausschließlich über die Vermittlung durch die Sertolizellen eintreten können. Damit unterliegen die im adluminalen Bereich befindlichen Keimzellen einerseits einem speziellen, vom extratubulären Bereich abweichenden hormonellen und humoralen Milieu, können aber andererseits durch die Sertolizellen weiterhin mit essentiellen Nährstoffen versorgt werden.

Die Fähigkeit der Sertolizellen zur Phagozytose mit Hilfe von Lysosomen ist sowohl im basalen als auch im adluminalen Tubuluskompartiment gewährleistet.

Die Zahl der Sertolizellen innerhalb eines Tubulus wird während der Pubertät festgelegt und ist anschließend konstant. Adulte Sertolizellen zeigen keine mitotische Aktivität. Die Sertolizellzahl ist zwischen Individuen sehr variabel. Allein im Vergleich der Schweinerassen Whitecross, Meishan und West African zeigen sich deutliche Unterschiede in der Sertolizellzahl. So weisen Whitecross Eber durchschnittlich $15 \times 10^9 \pm 1,3$ Sertolizellen je Tier auf, während West African Eber im Durchschnitt $5 \times 10^9 \pm 0,3$ und Meishan Eber nur $4 \times 10^9 \pm 0,6$ Sertolizellen je Tier haben (Okwun et al. 1996).

2.3.2 Keimzellen und Spermatogenese

Stammzellen der Spermatogenese sind die basal im Tubulus liegenden, aufgrund morphologischer Parameter unterscheidbaren A- und B-Spermatogonien (Allen 1918). Diese zwischen den Sertolizellen liegenden Keimzellen entwickeln sich in einem hoch synchronisierten Spermatogeneseprozess vom basalen Rand der Tubuli zum Tubuluslumen hin. Sie entwickeln sich zu den Spermatozoen, welche in das Lumen abgegeben und über das Hodennetz und die Ausführungsgänge zur weiteren Reifung in den Nebenhoden transportiert werden.

Die Spermatogenese läuft bei allen Spezies recht ähnlich ab. Aus den A-Spermatogonien entstehen durch mitotische Teilungen die B-Spermatogonien und anschließend die primären Spermatozyten. Über die verschiedenen Phasen der meiotischen Prophase entstehen nach der 1. Reifeteilung übergangsweise die sekundären Spermatozyten und nach der 2. Reifeteilung die haploiden runden Spermatiden. Letztere teilen sich nicht weiter, sondern unterliegen Differenzierungsvorgängen, die zu den elongierten Spermatiden führen.

Da die Spermatogenese einen kontinuierlichen lebenslang ablaufenden Prozess darstellt, kommt es periodisch zur Erneuerung der Stammzellen der Spermatogenese, der A-Spermatogonien, so dass immer ein „Stammzellpool“ in den Tubuli zur Verfügung steht.

Aus einer Gruppe A-Spermatogonien entstehen mitotisch je Spermatogonie zwei neue A-Spermatogonien. Während eine davon sich weiter teilt und als B-Spermatogonie in den Spermatogeneseprozess eintritt, bleibt die andere als Reservestammzelle zurück und dient dem Erhalt des Stammzellpools. Im folgenden

Zyklus teilt sich eine Gruppe dieser zurückgebliebenen Reservestammzellen erneut und lässt wiederum eine A-Spermatogonie als Reservestammzelle zurück. Dieser Prozess wiederholt sich zyklisch, so dass immer neue A-Spermatogonien zur Verfügung stehen (Clermont 1972, de Rooji 2001). Charakteristisch für alle Spermatogonien ist deren mitotische Aktivität.

Abbildung 2.4 verdeutlicht diesen Zusammenhang der Stammzellerneuerung während der Spermatogenese.

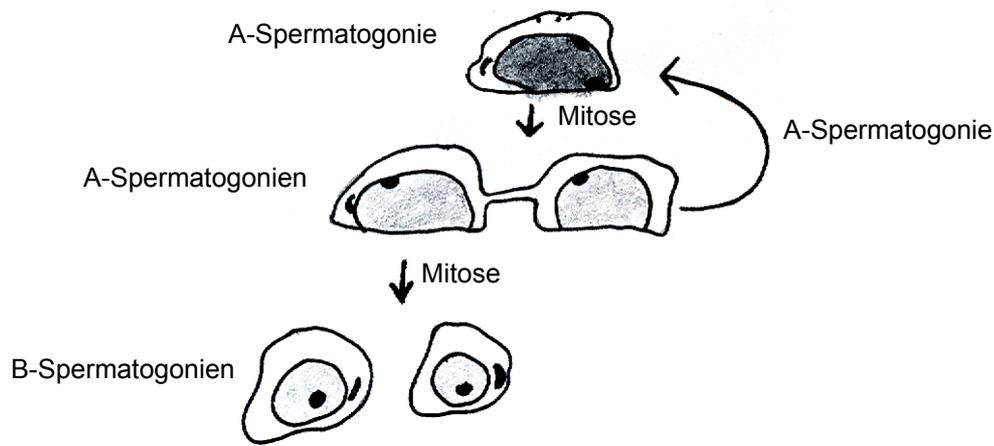


Abbildung 2.4 Schema zur Stammzellerneuerung während der Spermatogenese

Während A-Spermatogonien sich als annähernd ovale, flache Zellen mit einem sichtbaren Cytoplasmaanteil zeigen, sind B-Spermatogonien eher runde Zellen mit relativ wenig Cytoplasma (Dym & Fawcett 1971). Die Vermehrung der Spermatogonien, Spermatozytogenese genannt, endet mit der Entstehung der präleptotänen Spermatozyten. Dies sind ebenfalls runde Zellen, die aber im Gegensatz zu den Spermatogonien keine Verbindung mehr zu der Basalmembran der Tubuli haben (Pinart et al. 2000). Während die Spermatozyten der frühen Prophase (präleptotän, leptotän) nur schwer von B-Spermatogonien zu unterscheiden sind, weisen zygotäne Spermatozyten, eine fädige Kernstruktur auf und liegen mittig innerhalb des Keimepithels. Pachytäne Spermatozyten sind runde große Zellen mit einem ausgedehnten Zellkern. Ihr Zytoplasma ist lichtmikroskopisch nicht mehr zu erkennen. Sie wachsen zum Diakinesestadium hin noch an und sind aufgrund ihrer Größe und der „gepunkteten Musterung“ leicht von anderen Keimzellen unterscheidbar. Sekundäre Spermatozyten sind als vorübergehende

Zwischenstadien nur selten im Tubulus zu sehen. Da die erste Reifeteilung bereits stattgefunden hat, sind sie kleiner als die primären Spermatozyten, weisen aber ebenfalls eine runde Zellform auf.

Die nach der zweiten Reifeteilung entstandenen haploiden runden Spermatiden sind noch kleiner als die sekundären Spermatozyten und zeigen sich als dunkle runde Zellen mit kleinem Zellkern. Sie treten in die Differenzierungsphase der Spermatogenese, die Spermiogenese ein und entwickeln sich über 4 Phasen (Golgi-, Kappen-, Akrosom-, und Reifungsphase) zu den elongierten Spermatiden, die als Spermatozoen in das Tubuluslumen abgegeben werden.

Während der 4 Phasen der Spermiogenese werden die Zellorganellen der runden Spermatiden in die Organellen der fertigen Spermien umgewandelt. Der Hauptteil des Zytoplasmas wird von der Zelle abgeschnürt und bildet die Residualkörperchen. Diese werden bei der Spermienfreisetzung ins Tubuluslumen von den Sertolizellen phagozytiert. Die DNA wird im Spermienkopf kondensiert, aus dem Golgiapparat entsteht das Akrosom, welches die für die Befruchtung notwendigen proteolytischen Enzyme enthält. Das spätere Mittelstück der Spermien, das als Energielieferant dient, geht aus den Mitochondrien hervor. Der Spermien Schwanz enthält v.a. kontraktile Elemente, die aus den Zentriolen des Spindelapparates gebildet worden sind (Clermont 1972).

Die Abläufe während der Spermiogenese und die an den Keimzellen stattfindenden Veränderungen sind schematisch in Abbildung 2.5 dargestellt.

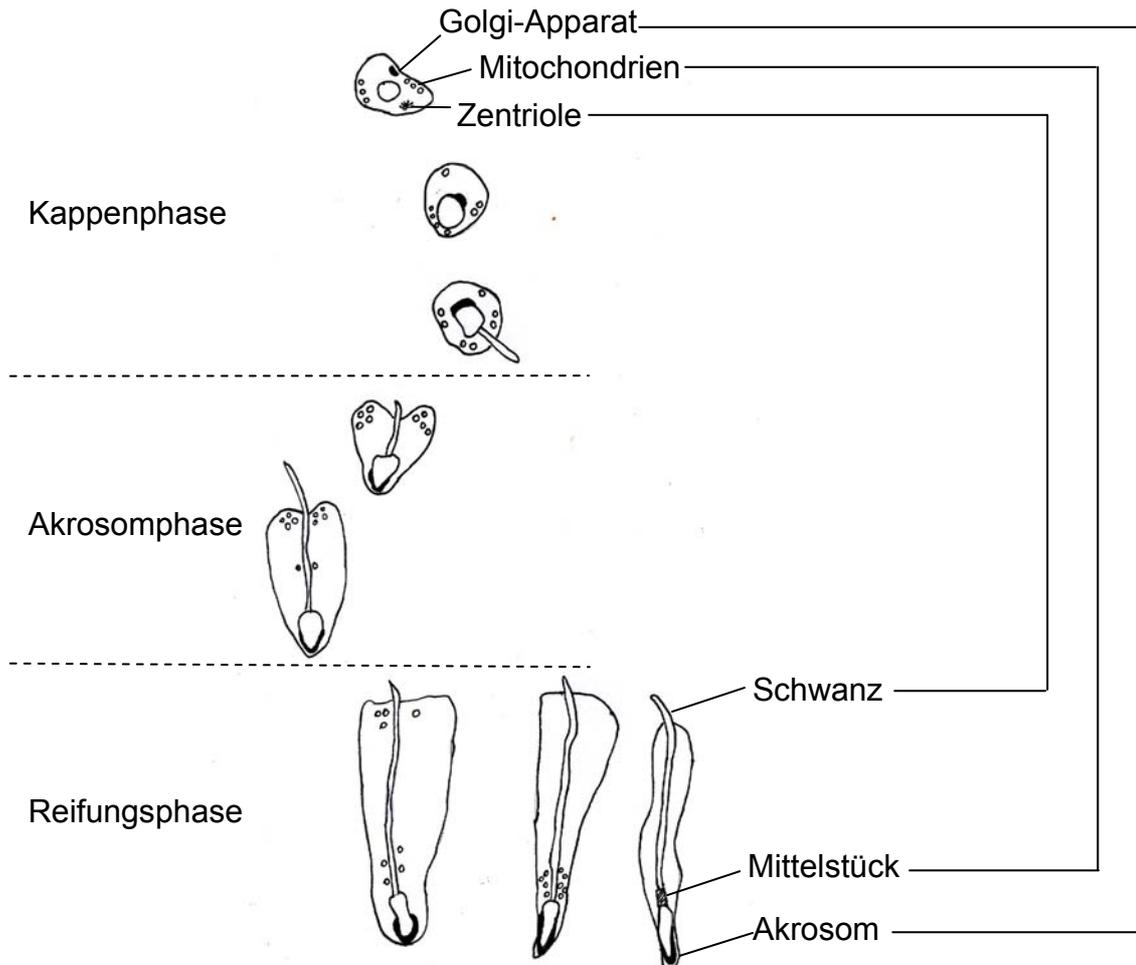


Abbildung 2.5 Veränderungen während der Spermiogenese

Die Spermatogenese endet mit der Freisetzung der elongierten Spermatiden in das Tubuluslumen, der Spermiation. Zu Beginn der Spermiation werden alle Verbindungen zwischen den Sertolizellen und den Spermatiden gelöst (Russell & Malone 1980). Die tubulobulbären Komplexe sowie auch die Residualkörperchen der Spermatiden werden von der Sertolizelle phagozytiert und durch deren Lysosomen verdaut (Vogl et al. 1983). Auf den abgeschnürten Residualkörperchen befinden sich Membranrezeptoren, welche für die Bindung der Keim- an die Sertolizellen verantwortlich waren und nun durch die Sertolizellen verdaut werden, so dass die Freisetzung der Spermatozoen gewährleistet ist (Millette 1979).

Ein winziger Anteil an Zytoplasma, der Mitochondrien und Membranpartikel enthält, der zytoplasmatische Tropfen, verbleibt allerdings während der Spermiation an den Spermatozoen. Er wird erst im Verlauf der Nebenhodenpassage von den heranreifenden Spermien abgestreift. Mögliche Funktionen des zytoplasmatischen Tropfens könnten die Beeinflussung der Spermienaktivität (Van Rensburg et al.

1966) oder der Reifungsprozesse (Mann 1975) sein. Möglicherweise ist der zytoplasmatische Tropfen aber auch nur ein funktionsloser Überrest der Residualkörperchen, der charakteristisch für noch nicht voll befruchtungsfähige Spermien ist, sich im Reifungsprozess abschnürt und verloren geht (Zamboni et al. 1971, Phillips 1975a,b).

2.3.3 Keimepithel- und Spermatogenesezyklus

Während ihrer Entwicklung sind die gleichen Entwicklungsstadien der Keimzellen untereinander über einen bestimmten Längenabschnitt des Tubulus miteinander verbunden und bilden Keimzellgruppen, so dass deren synchrone Entwicklung als „Keimzellgeneration“ gewährleistet ist (Steinberger & Steinberger 1972). Zusätzlich sind auch die verschiedenen Entwicklungsstadien der Keimzellen miteinander verbunden, d.h. die A-Spermatogonien mit den B-Spermatogonien, die B-Spermatogonien mit den Spermatozyten usw. (Clermont 1972, Roosen-Runge 1977). Dadurch entstehen über einen bestimmten Abschnitt des Tubulus charakteristische aufeinander folgende Keimzellverbindungen oder Keimzellstadien, in denen im histologischen Tubulusquerschnitt immer das gleiche „Zellbild“ zu sehen ist. Die Abfolge dieser Stadien, d.h. der Zeitraum vom Auftreten eines Stadiums bis zu dessen erneutem Wiederauftreten wird als „Keimepithelzyklus“ bezeichnet (Leblond & Clermont 1952).

Die Dauer dieses Zeitraumes ist zwischen den Spezies sehr unterschiedlich. Tabelle 2.2 zeigt die Dauer des Keimepithelzyklus verschiedener Spezies im Vergleich zum Eber.

Tabelle 2.2 Dauer des Keimepithelzyklus verschiedener Spezies im Vergleich zum Eber

	Dauer (Tage)	Literatur
Eber	8,6	Swierstra 1968
Hengst	12	Swierstra et al. 1974
Schafbock	10	Ortavant 1954
Bulle	13	Hochereau et al. 1964
Mensch	16	Heller & Clermont, 1963
Ratte	13	Clermont & Harvey 1965

Die Stadien des Keimepithelzyklus werden zufällig anhand bestimmter Kriterien eingeteilt. Daher kann es, da eigentlich ein kontinuierlicher Prozess dargestellt wird, durchaus zu Überschneidungen zwischen den einzelnen Stadien kommen.

Für den Eber wurden 8 Stadien definiert (Swierstra 1968, Garcia-Gil et al. 2002), andere Autoren teilten den Keimepithelzyklus des Ebers in 14 Stadien ein, um bestimmte Keimzellen exakter untersuchen zu können (Frankenhuis et al. 1982). Der besseren Übersichtlichkeit wegen werden die Stadien auch in die drei Abschnitte prämeiotische Phase (I, II, III), meiotische Phase (IV, V) und postmeiotische Phase (VI, VII, VIII) zusammengefasst (Garcia-Gil et al. 2002).

Abbildung 2.6 zeigt die Stadien des Keimepithelzyklus beim Eber wie sie nach Swierstra 1968 definiert wurden.

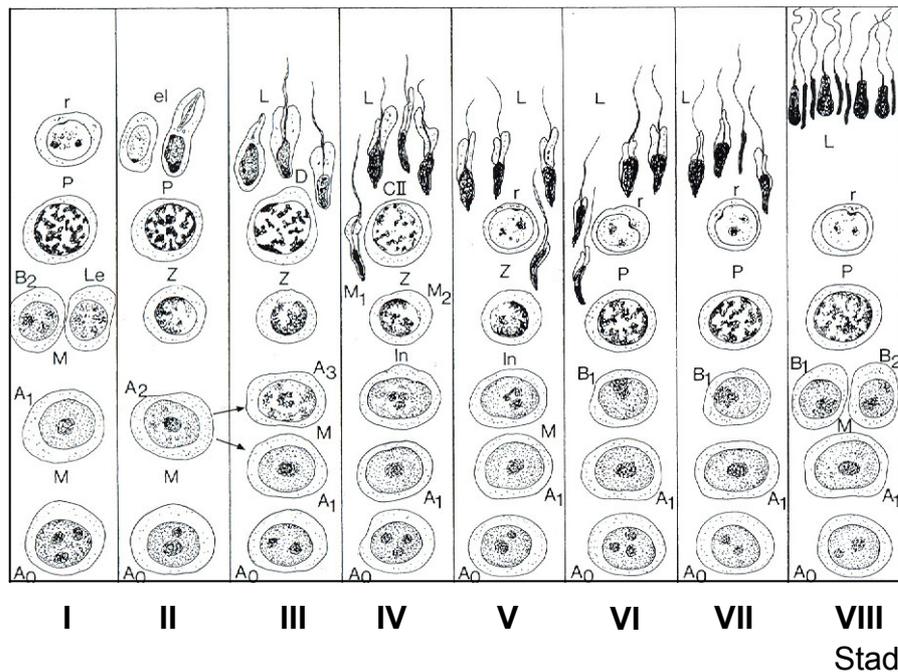


Abbildung 2.6 Stadien des Keimepithelzyklus beim Eber (nach Swierstra 1968)

Als Beginn des Keimepithelzyklus beim Schwein wurde Stadium I definiert, in dem die Spermatozoen gerade das Tubuluslumen verlassen haben und im basalen Tubulusbereich die neuen Stammzellmitosen beginnen. In Tabelle 2.3 sind die Charakteristika der einzelnen Stadien verdeutlicht.

Tabelle 2.3 Charakteristika der einzelnen Stadien des Keimepithelzyklus beim Eber (nach Swierstra 1968, Garcia-Gil et al. 2002)

Anzutreffende Entwicklungsstufen	
I	Elongierte Spermatiden abwesend; A-,B-Spermatogonien mitotisch aktiv; primäre Spermatozyten (präleptotän, leptotän, pachytän); runde Spermatiden
II	Elongierende runde Spermatiden; A-,B-Spermatogonien; primäre Spermatozyten (leptotän, pachytän)
III	Primäre Spermatozyten (diplotän, diakinese); elongierende Spermatiden; A-,B-Spermatogonien
IV	Beginn 1. Bis Ende 2. Reifeteilung; Mitosestadien der primären Spermatozyten; sekundäre Spermatozyten, ggf. runde Spermatiden; elongierte Spermatiden; Spermatogonien
V	A-Spermatogonien; primäre Spermatozyten (pachytän); runde, elongierte Spermatiden, zweitäre tief in der Keimepithelschicht
VI	Elongierte Spermatiden näher am Tubuluslumen; Runde Spermatiden; A-,B-Spermatogonien
VII	Beginn Mitose B-Spermatogonien, elongierte Spermatiden wandern weiter Richtung Tubuluslumen, runde Spermatozyten
VIII	Elongierte Spermatiden am Tubuluslumen aufgereiht; runde Spermatiden mit Akrosom; A-,B-Spermatogonien; Spermatozyten (pachytän)

Jedes dieser Keimepithelstadien hat eine bestimmte zeitliche Dauer im Rahmen des Keimepithelzyklus wie Tabelle 2.4 vergleichend nach Swierstra (1968), Okwun et al. (1996) und Garcia-Gil et al. (2002) zeigt.

Tabelle 2.4 Dauer der Stadien des Keimepithelzyklus beim Eber für Yorkshire und Lacombe Eber (Swierstra 1968), für Eber der deutschen Landrasse (Garcia-Gil et al. 2002) und für Whitecross sowie Meishan Eber (Okwun et al. 1996)

Stadium	Yorkshire/Lacombe	Deutsche Landrasse	Whitecross/Meishan
	(Tage)	(Tage)	(Tage)
I	0,9	1,2	1,2
II	1,2	1,0	1,0
III	0,3	0,6	0,6
IV	1,0	0,4	1,0
V	0,8	0,9	0,7
VI	1,7	0,8	1,5
VII	1,6	2,5	1,4
VIII	1,0	1,1	1,3

Die relative Dauer der einzelnen Stadien für die untersuchten Rassen, aber auch zwischen verschiedenen Spezies ist recht ähnlich. Abweichungen sind in erster Linie methodisch bedingt und insbesondere durch eine unterschiedliche Einteilung der Stadien zu erklären. Generell nehmen die prämeiotischen Stadien ca. 32% ein, die meiotischen Stadien etwa 16% und die postmeiotischen Stadien ungefähr 51% (Garcia-Gil et al. 2002). Die Häufigkeit mit der die einzelnen Stadien in den Tubuli auftreten, ist direkt korreliert mit der Lebensdauer der in diesen Stadien dominierenden Keimzellen. So sind die meiotischen Stadien, die eher selten in den Tubuli anzutreffen sind, charakterisiert durch die relativ kurzlebigen sekundären Spermatozyten. In den postmeiotischen Stadien hingegen findet die gesamte Spermio-genese mit anschließender Spermiation statt, so dass diese Stadien häufiger vertreten sind (Garcia Gil et al. 2002).

Betrachtet man einen Tubulus in seiner Länge, so sind die Stadien des Keimepithelzyklus über seine Länge verteilt. D.h. Stadium I nimmt eine bestimmte Länge ein, dann folgt Stadium II mit einer bestimmten Länge usw. Diese Aneinanderreihung der einzelnen Stadien wurde als „Welle des Keimepithels“ bezeichnet (Ebner 1871, Regaud 1901). Der Längenabschnitt, über den ein Stadium den Tubulus besetzt, ist sowohl zwischen den Stadien als auch zwischen den Tubuli

sehr unterschiedlich (Perey et al. 1961). Garcia-Gil et al. (2002) bestimmten den Längenabschnitt eines Tubulus über den ein Stadium auftritt bei Ebern der Deutschen Landrasse. So werden innerhalb eines gegebenen Abschnittes 1790 μm eines Tubulus von den prämeiotischen Stadien besetzt, 7871 μm von den meiotischen und 2097 μm von den postmeiotischen. Damit ist also die Zeitdauer eines Keimepithelstadiums nicht proportional zu dem von ihm besetzten Tubulusabschnitt.

Während nun der Keimepithelzyklus aus nach histologischen Kriterien abgegrenzten Stadien resultiert, bezeichnet der Spermatogenesezyklus die Dauer der Entwicklung einer A-Spermatogonie bis hin zur differenzierten elongierten Spermatoide. Dazu sind generell vier Keimepithelzyklen notwendig. Dieser Zeitraum kann allerdings nur näherungsweise bestimmt werden, da der Beginn der ersten mitotischen Stammzellteilung schwer zu definieren ist und auch der Endpunkt, d.h. die Abgabe der Spermatozoen in das Tubuluslumen nicht exakt bestimmt werden kann. Größenordnungen für die Dauer eines Spermatogenesezyklus bei verschiedenen Spezies sind in Tabelle 2.5 dargestellt.

Tabelle 2.5 Gesamtdauer der Spermatogenese

	Dauer (Tage)	Literatur
Eber	34	Swierstra 1968
Hengst	48	Swierstra et al. 1974
Schafbock	49	Ortavant 1954
Bulle	54	Clermont 1972
Mensch	64	Heller & Clermont 1963
Ratte	52	Clermont & Harvey 1965

2.4 Regulation der Spermienausbeute

Spermienkonzentrationen in Ejakulaten bewegen sich bei verschiedenen Spezies, so beispielsweise Eber, Hengst, Bulle, Schafbock und Mensch im Bereich mehrerer Milliarden Spermien je Ejakulat (Nieschlag 1998, Johnson et al. 2000, Weitze 2001), beeinflusst von Absamhäufigkeit und Einflüssen des Individuums.

Diese Spermienzahlen stellen allerdings trotz der beachtlichen Mengen nur etwa 25% der tatsächlich möglichen Spermienausbeute dar, 75% der Keimzellen gehen unter physiologischen Bedingungen verloren (Huckins 1978, Allan et al. 1987, Kerr 1992). Dabei existieren auffällige Speziesunterschiede. So ist die Effizienz der Spermatogenese, also die tatsächliche Spermienproduktion pro Tag im Vergleich zur theoretisch möglichen Ausbeute beim Menschen wesentlich geringer als bei anderen Spezies. Hintergrund ist die wesentlich längere Spermatogenesedauer des Menschen (Tabelle 2.5) sowie zusätzlich die längere Dauer des Keimepithelzyklus (Tabelle 2.2). Auch die geringere Spermiedichte in den Tubuli des Menschen im Vergleich zu anderen Spezies kann als Grund für die geringere Effizienz der Spermatogenese angesehen werden (Johnson 1986). Betrachtet man daneben zusätzlich die Anzahl an Keimzellen, die von einer Sertolizelle versorgt werden, so zeigt sich dass bei Hengst und Eber wesentlich mehr Keimzellen von einer Sertolizelle versorgt werden können als bei Bulle und Mensch mit der niedrigeren täglichen Spermienproduktion (Johnson et al. 1980, 1994, Okwun et al. 1996).

Als zentraler Mechanismus der Keimzellverluste während der Spermatogenese gilt die Apoptose bzw. die Keimzelldegeneration (Regaud 1901, Roosen-Runge 1955, Clermont 1972). So unterliegen in erster Linie Spermatogonien und primäre Spermatozyten apoptotischen Veränderungen (Brinkworth et al. 1995, Heninger et al. 2002), wodurch das Ausmaß der Spermienproduktion schon in einem sehr frühen Entwicklungsstadium der Keimzellen reduziert wird (Huckins 1978, Kerr 1992).

Der Beginn der ersten Spermatogonien-Teilungen im pubertären Tier ist durch eine bedeutend höhere Apoptoserate im Vergleich zu jener des adulten Keimepithels charakterisiert (Rodriguez et al. 1997, Staub et al. 2002). Ursache dafür ist vermutlich die Anpassung der Keimzellen an die zu diesem Zeitpunkt schon fixe Sertolizellpopulation (Orth et al. 1988, Heiskanen et al. 1996, Print & Loveland 2000 Review, Jahnukainen et al. 2004).

Auch für adulte Tiere kann vermutet werden, dass die Apoptose dazu dient, die Keimzellzahlen kontinuierlich an die vorgegebene Sertolizellzahl und ihr

Aufnahmevermögen anzupassen. Zusätzlich werden defekte Spermien ausgesondert, so dass die Apoptose auch der Qualitätssicherung dient (Braun 1998). Die Erkennung defekter Keimzellen erfolgt über den Fas-Rezeptor (Francavilla et al. 2002). Die apoptotischen Zellen werden von den Sertolizellen phagozytiert (Grandjean et al. 1997). Die Sertolizelle erkennt die apoptotischen Zellen aufgrund eines auf diesen enthaltenen Oberflächenmarkers, dem sogenannten Phosphatidylserin, welches während des Apoptoseprozesses aus dem Inneren der Zelle an deren Oberfläche tritt und dort präsentiert wird (Nakanishi & Shiratsuchi 2004).

Keimzellverluste im Hoden mittels Apoptose sind zudem Mechanismus im Zusammenhang mit der Keimepithelinvolution bei saisonalen Tieren, in der Phase sexueller Inaktivität (Desjardins & Lopez 1983, Young & Nelson 2001). So steigt die Apoptoserate von Spermatogonien und pachytänen Spermatozyten im Hoden während dessen Rückbildung, kehrt dann allerdings im zurückgebildeten Hoden wieder auf ein Basalniveau zurück (Young & Nelson 2001). Sertoli- und Leydigzellen im Hoden unterliegen demgegenüber keinen apoptotischen Veränderungen. Saisonal bedingt ändert sich nur die Größe der Leydigzellen, ihre Zahl hingegen bleibt erhalten.

Betrachtet man die Verteilung der Apoptose im Verlauf des gesamten Spermatogeneseprozesses und zieht hierfür die Stadien des Keimepithelzyklus heran, zeigt sich eine Abhängigkeit von den Spermatogenesestadien. So finden sich in den Tubuli von Ratten apoptotische Zellen von Beginn der mitotischen Teilungen an (Stadium VII) bis zum Ende der Reifeteilungen (Stadium I) (Billig et al. 1995, Brinkworth et al. 1995). Beim Hengst ist die stadienspezifische Verteilung der Apoptose ebenfalls gut untersucht. So zeigt sich ein Maximum der Apoptoseaktivität in Stadium IV und V während der Reifeteilungen. Die Stadien höchster mitotischer Aktivität I und II dagegen zeigen nur eine sehr niedrige Apoptoserate (Heninger et al. 2002, 2004). Dies steht in Widerspruch zu den Ergebnissen an Ratten, die sowohl während der mitotischen als auch während den meiotischen Stadien eine hohe Apoptoserate in den Tubuli aufwiesen.

Da die apoptotischen Keimzellen in einem sehr frühen Stadium der Apoptose von den Sertolizellen phagozytiert werden, ist in histologischen Schnitten nur eine begrenzte Anzahl apoptotischer Zellen zu finden (Russell & Clermont 1977, Chemes 1986, Kerr 1992).

Aus anderen Geweben, so beispielsweise Uterus, Darm, Fettgewebe und Milchdrüse, ist die Apoptose als ein der Mitose gegensteuernder Mechanismus bekannt, der durch die Aufrechterhaltung einer ausbalancierten Homöostase im Gewebe dessen Funktionalität aufrechterhält (Verhagen 1998, Medh & Thompson 2000).

Während der Spermatogenese beim Menschen wird im Hoden ebenfalls ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Mitose und Apoptose eingestellt (Martincic et al. 2001).

2.5 Hormonale Koordination und Steuerung der Hodenfunktion

2.5.1 Gonadotropine und übergeordnete Steuerungsmechanismen

Die Produktion fertiler Spermien unterliegt im maturaen Eber dem fein aufeinander abgestimmten Zusammenwirken endokriner Parameter und sich entwickelnder Keimzellen im Hoden. Zentrale Steuerungsaufgaben übernehmen dabei die Gonadotropine des Hypophysenvorderlappens **FSH** (Follikel stimulierendes Hormon) und **LH** (Luteinisierendes Hormon).

Beide Gonadotropine sind Glycoproteine (Molekulargewicht 29-30 kDa), die aus einer identischen, allerdings speziesspezifischen α -Untereinheit und einer speziesspezifischen β -Untereinheit aufgebaut sind (Esch et al. 1986, Neumann et al. 1991, König 1993). Die hormonelle Wirkung der Gonadotropine wird allerdings erst durch die Kombination der beiden Untereinheiten gewährleistet.

Das Gonadotropin-Releasing-Hormon (**GnRH**) des Hypothalamus stimuliert die LH- und speziesspezifisch auch die FSH- Freisetzung durch die Hypophyse.

GnRH besteht bei allen Säugern aus 10 Aminosäuren (1.18 kDa) (Abbildung 2.7)

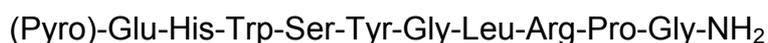


Abbildung 2.7 Aminosäuresequenz des GnRH

Es wird im Hypothalamus gebildet und vermittelt neuronale Einflüsse aus dem ZNS an das endokrine System. Über Portalgefäße gelangt GnRH in die Hypophyse.

Während die LH-Bildung und -Sekretion ausschließlich von GnRH veranlasst wird (Culier & Negro-Vilar 1986), ist die Bedeutung von GnRH für die Regulation der FSH-

Bildung und -Sekretion für die einzelnen Spezies unterschiedlich. Tabelle 2.6 gibt einen Überblick über Befunde zur Reaktion von FSH und LH auf eine GnRH-Immunsierung bei verschiedenen Spezies in Abhängigkeit vom Geschlecht.

Tabelle 2.6 LH- und FSH nach einer GnRH-Immunsierung

Spezies	Geschlecht	LH	FSH	Literatur
Schwein	♂	Hemmung	unverändert	Awoniyi et al. 1988b
	♂	Hemmung	Hemmung	Caraty & Bonneau 1986
	♀	Hemmung	Hemmung (verzögert)	Esbenshade & Britt 1985
Pferd	♂	Hemmung	unverändert	Rabb et al. 1990
	♀	Hemmung	Hemmung (50%)	Garza et al. 1986
Schaf	♂	Hemmung	Hemmung	Brown et al. 1994
Rind	♂	Hemmung	Hemmung	Finnerty et al. 1998
Nager	♂	Hemmung	Hemmung	McLachlan et al. 1995

Die divergierenden Ergebnisse lassen auf eine GnRH-unabhängige zusätzliche Regulation der FSH-Bildung und -Freisetzung, in erster Linie bei den Spezies Eber und Hengst schließen, bei denen die FSH-Konzentrationen nach einer GnRH-Immunsierung unverändert hoch blieben.

Bei Nagern, Bullen und Schafböcken hingegen scheint GnRH allein für die FSH-Freisetzung zuständig zu sein. Eine Zwischenstellung nehmen Sauen und Stuten ein, da sich das verzögerte Absinken der FSH-Konzentrationen sowohl durch die im Vergleich zu LH wesentlich längere Halbwertszeit des FSH als auch durch ein Zusammenspiel mit weiteren GnRH-unabhängigen Faktoren erklären lässt (Esbenshade et al. 1986, Garza et al. 1986).

Die in Tabelle 2.6 erkennbaren Unterschiede sind vorrangig auf eine zusätzliche FSH-Steuerung über Activine, Inhibine und Follistatin (Kumar & Low 1993, Brown & McNeilly 1999, Bernard & Wodruff 2001) zurückzuführen. Während Inhibin primär in den Gonaden gebildet wird und somit ausschließlich endokrin auf die FSH-Freisetzung wirkt, können Activin und Follistatin sowohl parakrin als auch autokrin auf die FSH-Sekretion Einfluss nehmen. So wird Activin direkt im Hypophysenvorderlappen (HVL) exprimiert und beeinflusst die FSH-Synthese und

-Freisetzung. Ebenso soll Acitivin aber auch über Stimulation des GnRH-Rezeptors oder direkt die GnRH-Freisetzung im Hypothalamus anregen und so die LH und FSH-Freisetzung beeinflussen. Follistatin und Inhibin wirken dem entgegen, indem sie die Aktivinbindung an dessen Rezeptor unterbinden und so dessen Wirkung neutralisieren (Gregory & Kaiser 2004). Ebenfalls diskutiert wird eine zweiphasige Regulation des FSH: Basalwerte werden über GnRH sichergestellt, jede Erhöhung der FSH-Sekretion sowie dessen Pulsatilität bedarf allerdings des separaten Einflusses anderer Faktoren (Culier & Negro-Vilar 1986).

Schließlich wurde auch die Existenz eines separaten Releasing-Hormons, das allein die FSH-Freisetzung steuert vermutet (Igarashi et al. 1964, Yu et al. 1997, 2000)

Abbildung 2.8 gibt einen Überblick über die Regulation der Spermatogenese.

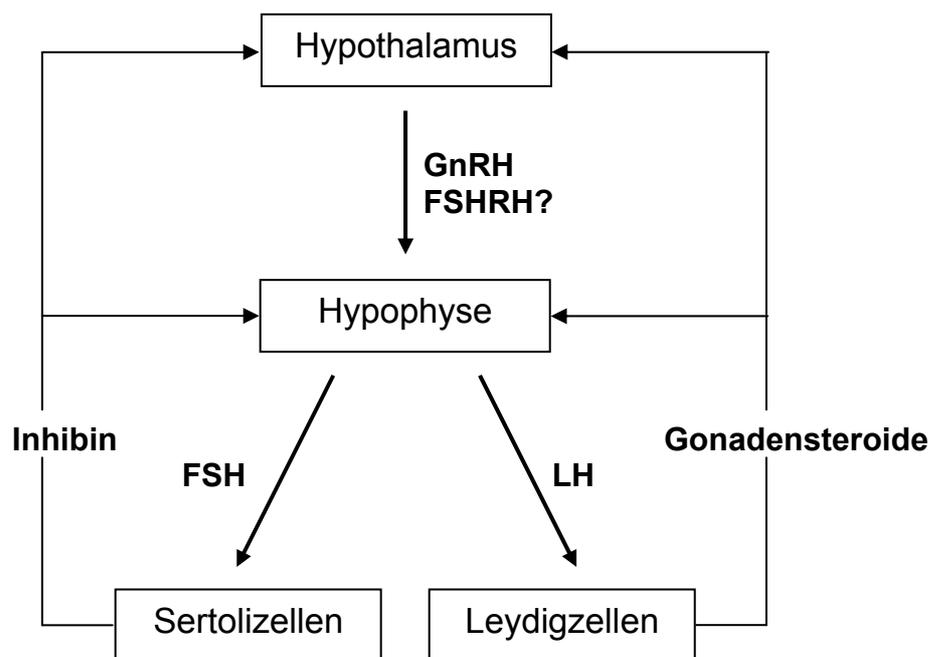


Abbildung 2.8 Übergeordnete Regulation der Spermatogenese. GnRH = Gonadotropin-Releasing-Hormon, FSHRH = FSH-Releasing Hormon, LH = Luteinisierendes Hormon, FSH = Follikel Stimulierendes Hormon

2.5.2 Follikel Stimulierendes Hormon (FSH)

FSH wirkt über Rezeptoren auf die Sertolizellen und nimmt so Einfluss auf die verschiedenen Entwicklungsstadien der Keimzellen (Lauria et al. 1979, Bergmann 1987, McLachlan et al. 1996). Beim präpuberalen Tier ist FSH essentiell für die Induktion der ersten Spermatogonienteilungen und damit die Initiierung der Spermatogenese. Zudem wird durch FSH die beim maturen Tier fixe Sertolizellzahl während der puberalen Phase festgelegt (Means et al. 1976, Monet-Kuntz & Fontaine 1989, Weinbauer et al. 1991, Orth 1984, Marshall et al. 1995, McLachlan et al. 1995, Meachem et al. 2001). In der Maturität sorgt FSH dann über die Sertolizellen für die Wiederaufnahme der Spermatogonienteilungen bei der Wiederaufnahme saisonaler Reproduktionsfunktionen (Bergmann 1987) und ist über die Strukturproteine Actin und Vinculin für die Bindung der Keimzellen an die Sertolizellen zuständig (z.B. Muffly et al. 1994, Simoni et al. 1999). Zudem beeinflusst es speziesspezifisch die Expression des Androgenrezeptors sowie des Androgen bindenden Proteins in den Sertolizellen und beeinflusst damit die Vermittlung der Androgenwirkung im Tubulusbereich (Courot 1980, Verhoeven & Cailleau 1988).

Im weiblichen Tier ist FSH auch für die Stimulation der Aromataseaktivität zuständig (Reichert 1999). Männliche Spezies weisen jedoch im Allgemeinen wesentlich niedrigere Estrogenkonzentrationen auf, die über LH gesteuert werden. Bei Eber und Hengst allerdings lassen sich hohe Estrogenkonzentrationen in Blutplasma und Hoden nachweisen (Claus et al. 1983, Claus 1990), so dass bei diesen Spezies durchaus eine Bedeutung von FSH für die Aromataseaktivität und damit eine von Androgenen unabhängige Regulation der Estrogenkonzentrationen vermutet werden kann. Trotz der bekannten FSH-Einflüsse auf die mature Spermatogenese ist nicht geklärt, inwieweit FSH für die Aufrechterhaltung der Spermatogenese essentiell ist bzw. inwieweit sie allein durch Testosteron aufrechterhalten werden kann. Tabelle 2.7 gibt einen Überblick über Untersuchungsergebnisse an verschiedenen Spezies zur Notwendigkeit des FSH für die Aufrechterhaltung der Spermatogenese.

Tabelle 2.7 Abhängigkeit der Spermatogenese verschiedener Spezies von FSH, Testosteron oder beiden Hormonen

Spezies	Spermatogenese Aufrechterhaltung	Literatur
Ratte	Testosteron	Raj & Dym 1976 Awoniyi et al. 1989
Ratte	Testosteron, FSH	Muffly et al. 1994 McLachlan et al. 2002
Primat, Mensch	Testosteron, FSH	Wickings et al. 1980 Wickings & Nieschlag 1980 Raj et al. 1982
Primat, Mensch	Testosteron	Matsumoto et al. 1984 Marshall et al. 1986
Schafbock	Testosteron, FSH	Kilgour et al. 1993

Die z.T. widersprüchlichen Aussagen (s. Tabelle 2.7) sind teilweise darauf zurückzuführen, dass meistens die Spermienausbeute unberücksichtigt blieb (Sharpe 1989), d.h. nur qualitative Aspekte der Spermatogenese berücksichtigt wurden. Die Qualität der Spermatogenese allerdings ist bei allen untersuchten Spezies allein durch Testosteron aufrechtzuerhalten. Erst die Spermienausbeute, d.h. die Menge an produzierten Spermien, wird durch FSH festgelegt und ohne FSH kommt es zu einem drastischen Absinken der Spermienzahlen (Steinberger 1971, Sharpe 1989). Studien an Nagern, die keinen Einfluss des FSH auf das quantitative Ausmaß der Spermatogenese nachwiesen, beziehen sich ausschließlich auf Tiere, bei denen FSH unterdrückt wurde, so dass Effekte basaler FSH-Konzentrationen nicht auszuschließen sind (Sharpe et al. 1988).

Somit scheint die synergistische Wirkung von FSH und Testosteron notwendig zu sein, um im murenen Organismus eine qualitativ und quantitativ optimale Spermatogenese zu gewährleisten (Sharpe 1989, Sun et al. 1990, McLachlan et al. 1996). Ohne FSH, mit Testosteron allein treten weniger Spermatogonien in die Spermatogenese ein, so dass es zu geringeren Spermienzahlen kommt. Ohne Testosteron, nur mit FSH bleibt die Keimzellentwicklung auf der Stufe der runden

Spermatiden stehen (McLachlan et al. 2002). Für die Spermiogenese ist Testosteron essentiell (Sun et al. 1990).

Beim Eber ist die Bedeutung des FSH für die Aufrechterhaltung der Spermatogenese wenig untersucht. So wurden zwar in einigen Studien Vergleiche zwischen verschiedenen Rassen mit hohen oder niedrigen FSH-Konzentrationen und deren Auswirkungen auf Hodengewicht, -volumen und Spermienzahl je Ejakulat durchgeführt. Daraus lassen sich paradoxerweise niedrigere Hodengewichte und auch Spermienzahlen je Ejakulat bei Tieren mit hohen FSH-Konzentrationen feststellen. Über denkbare Kausalzusammenhänge zwischen Spermatogenese und FSH beim Eber wurde nicht berichtet (Schinckel et al. 1984, Borg et al. 1993, Lunstra et al. 1997, Wise et al. 2000).

2.5.3 Luteinisierendes Hormon (LH)

LH wirkt beim Eber ausschließlich auf die Leydigzellen im Interstitium und bestimmt hier, vermittelt über membranständige Rezeptoren, das Ausmaß der Steroidproduktion (Dufau 1995). Durch Förderung bestimmter Enzymsysteme in den Leydigzellen, beeinflusst LH die Bereitstellung der Vorstufen der Steroidbiosynthese, Cholesterin und Pregnenolon. Die LH-abhängigen Schritte im Rahmen der Steroidbiosynthese sind in Abbildung 2.9 mit Pfeilen gekennzeichnet. LH kann also an jedem Punkt der Steroidbiosynthese Einfluss auf Enzymaktivitäten nehmen, und so die Menge des jeweils produzierten Steroids regulieren. Zusätzlich sorgt LH für die Cholesterinbereitstellung aus den Lipidtröpfchen, indem es die Spaltung der Cholesterinester herbeiführt. Die Aromataseexpression, also die Estrogenbildung wird im männlichen Tier generell auch über LH gesteuert (Genissel et al. 2001). Inwieweit dies auch für Spezies mit sehr hoher Estrogenbildung im Hoden wie beispielsweise Eber und Hengst zutrifft, ist nicht bewiesen.

2.5.4 Gonadenhormone

Direkten Einfluss auf die Spermatogenese nehmen die Gonadensteroidhormone, die unter LH-Einfluss in den Leydigzellen des Hodens gebildet werden. Die gebildeten Gonadensteroidhormone beeinflussen über feedback Mechanismen den HVL und den Hypothalamus, so dass sie in direktem Kontakt mit den steuernden Zentren LH/FSH und GnRH stehen (siehe auch Abbildung 2.9). Ein Teil der Gonadenhormone wird auch in der Nebennierenrinde gebildet, dabei handelt es sich allerdings um Spuren,

die keine große Bedeutung für die peripheren Blutplasmakonzentrationen haben (Gower 1972).

Die Synthese der Gonadensteroiden in den Leydigzellen verläuft beim Eber vorrangig über den $\Delta 5$ -Weg (Wichmann et al. 1984, Brooks & Pearson 1986).

Abbildung 2.9 gibt eine Übersicht über die Synthese der Gonadensteroiden im Hoden des Ebers.

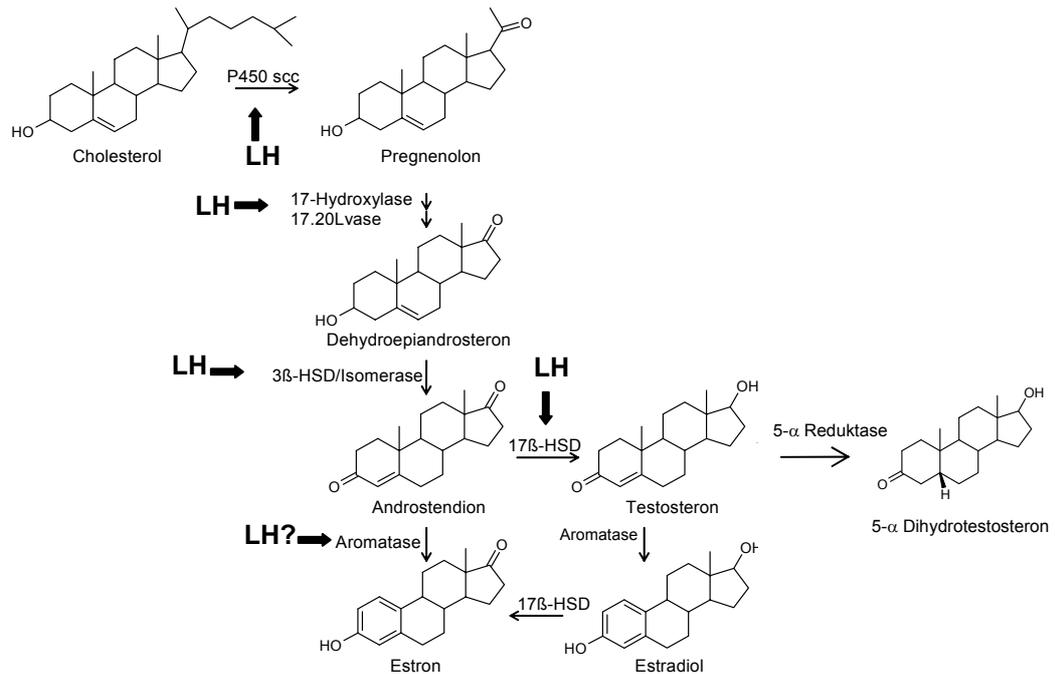


Abbildung 2.9 Übersicht über die Steroidsynthese in den Leydigzellen des Ebers mit den beteiligten Enzymsystemen und LH-abhängigen Schritten

Cholesterol, das Ausgangssteroid der Steroidbiosynthese liegt entweder in den Leydigzellen in Form seiner Speicherform, des Cholesterolesters vor oder wird neu aus Acetyl-Coenzym A synthetisiert. Über Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron (DHEA) wird Androstendion gebildet.

Durch Hydrogenierung der Ketogruppe des 17. C-Atoms entsteht Testosteron, welches zu Estradiol aromatisiert wird. Das im Vergleich zu Estradiol inaktivere, aber beim Eber in etwa doppelt so hohen Konzentrationen im Blutplasma auftretende Estron wird direkt durch Aromatisierung aus Androstendion gebildet. Aus Testosteron entsteht durch 5-alpha-Reduktion das 5 α -Dihydrotestosteron, welches als das biologisch aktive Androgen gilt, allerdings auch in wesentlich geringeren Konzentrationen im Blutplasma vorliegt (Longcope & Fineberg 1985).

2.5.4.1 Androgene

Die wichtigsten **Androgene** des Ebers sind neben Testosteron (ca. 2 ng/ml Blutplasma) und Dihydrotestosteron (0.75 ng/ml Blutplasma) auch Androstendion (14-23 ng/ml) und Dehydroepiandrosteronsulphat (>100 ng/ml) (Lindner 1961, Tan & Raeside 1980, Claus et al. 1983, Schwarzenberger et al. 1993). Aufgrund ihrer geringen androgenen Wirksamkeit haben Androstendion und Dehydroepiandrosteronsulphat allerdings nur mengenmäßig eine Bedeutung. Auch das Geruchssteroid Androstenon ist beim Eber in ähnlichen Konzentrationen wie Testosteron vorhanden (Claus 1970) und sorgt für den eberspezifischen, urinartigen Geruch der Tiere.

Die Konzentrationen der einzelnen Androgene variieren in Abhängigkeit von Alter, Tageszeit und Photoperiode. So setzt bei Ebern im Alter von ca. 4 Wochen ein erheblicher, allerdings vorübergehender Anstieg der Gonadensteroidkonzentrationen ein, der im Alter von etwa 17 Wochen erneut auftritt und den Eintritt in die Pubertät zur Folge hat. Die Testosteronkonzentrationen zeigen kurz nach der Pubertät Maximalwerte und sinken dann wieder leicht ab (Booth 1975, Schwarzenberger et al. 1993).

Wie unter 2.5.2 beschrieben kann Testosteron allein eine einmal initiierte Spermatogenese zumindest qualitativ aufrechterhalten (Steinberger 1971, Bartlett et al. 1989, Sharpe 1989, McLachlan et al. 2002).

Testosteron nimmt über Rezeptoren in den Sertolizellen indirekt Einfluss auf die verschiedenen Keimzellen und unterstützt hiermit Induktion und Aufrechterhaltung der Spermatogenese (Lyon et al. 1975). So beeinflusst es im adulten Tier die meiotischen Teilungen, und ist essentiell für die Umwandlung der runden zu den elongierten Spermatischen (Sun et al. 1990, O'Donnell et al. 1991, McLachlan et al. 1994b). Essentielle Aufgabe des Testosterons ist die Steuerung der Spermienausbeute. Generell ist Testosteron als „Überlebensfaktor“ bekannt, d.h. als ein Signal, dass die Apoptose hemmt bzw. verzögert. Die Abwesenheit von Testosteron führt zu einem drastischen Anstieg der Apoptoserate in den Tubuli des Hodens (Billig et al. 1995, Tapanainen et al. 1993). So nehmen beispielsweise die Testosteronkonzentrationen in den Tubuli saisonaler Tiere zum Ende der Saison deutlich ab, was einen drastischen Anstieg der Apoptoserate von Spermato gonien und Spermatozyten zur Folge hat. Der Mechanismus, über den Testosteron die Apoptose der Keimzellen induziert, unterliegt einem Netzwerk verschiedener

apoptoseregulierender Faktoren, z.B. den Apoptoseinhibitoren der bcl_2 -Familie bzw. den Apoptoseinduktoren bax oder bcl_{xl} sowie den Glucocorticoiden. Alle diese Faktoren sind in Kombination für die Aufrechterhaltung der homöostatischen Steuerung der einzelnen Keimzellpopulationen verantwortlich (Print & Loveland 2000).

Die Testosteronkonzentrationen innerhalb der Tubulusflüssigkeit übertreffen Blutplasmakonzentrationen um ein Vielfaches. So sind Testosteronkonzentrationen in der Tubulusflüssigkeit des Ebers um das 40-fache höher als die zugehörigen Blutplasmakonzentrationen. Diese hohen intratestikulären Testosteronkonzentrationen sind notwendig, um die Abläufe der Spermatogenese aufrechtzuerhalten (Singh et al. 1995). Die Anreicherung des Testosterons in den Tubuli erfolgt über das durch FSH-Stimulation in den Sertolizellen gebildete ABP, das vermehrt Androgene in den Tubulusbereich vermitteln kann. Aufgrund der v.a. bei Nagern sehr geringen Leydigzellzahl sowie der niedrigen Testosteronproduktion je Leydigzelle, ist dieser Mechanismus bei diesen Spezies essentiell. Eber und Hengst besitzen kein ABP (Jegou & Le Gac Jegou 1978), so dass andere Mechanismen der Androgenanreicherung in den Tubuli existieren müssen.

2.5.4.2 Estrogene

In den Leydigzellen einiger Spezies, insbesondere des Ebers und des Hengstes werden auch bedeutende Estrogenmengen synthetisiert (Claus & Hoffmann 1980, Raeside & Renaud 1983), die in peripherem Blutplasma, Tubulusflüssigkeit und Ejakulat nachgewiesen werden können (Velle 1958, Raeside 1969, Setchell & Cox 1982, Claus et al. 1992). So weisen Eber im peripheren Blutplasma Estrogenkonzentrationen von bis zu 280 pg/ml auf (Claus & Hoffmann 1980). Sie übertreffen damit die Blutkonzentrationen östrischer Sauen (Claus et al. 1983, 1987). Das aktive Estrogen ist das 17β Estradiol, welches beim murenen Eber etwa 180 pg/ml im peripheren Blutplasma ausmacht (Weiler et al. 1998). Vergleichend zu den Androgenen sind auch hier die intratestikulären Konzentrationen wesentlich höher (Claus et al. 1985), so dass ein murerer Eber um bis zu 100-mal höhere Estradiolkonzentrationen im Tubulusbereich aufweist als im peripheren Plasma (Claus et al. 1985).

Über das Ejakulat gelangen die Estrogene in den weiblichen Genitaltrakt, in dem sie durch Steigerung der Uteruskontraktionen den Spermientransport erleichtern und

ovulationsfördernd wirken (Claus 1990). Libido und Sexualverhalten des Ebers werden synergistisch über Estrogene und Androgene gesteuert (Joshi & Raeside 1973, Parrott & Booth 1984, Booth 1988). Eine Rolle der Estrogene bei der Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen ist ebenfalls beschrieben (Burrows 1949). Allerdings wirken Estrogene hier ebenfalls synergistisch mit Testosteron, um eine optimale Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen zu gewährleisten (Joshi & Raeside 1973).

Eine Bedeutung der Estrogene für die Spermatogenese ist, zumindest beim Eber noch nicht untersucht.

In einer aktuellen immuncytologischen Studie an immaturren und matura Eberhoden wurde der Estrogenrezeptor alpha ($ER\alpha$) in Spermatogonien, Spermatozyten und Leydigzellen lokalisiert, Estrogenrezeptor beta ($ER\beta$) in Spermatogonien und Spermatozyten matura Eber (Rago et al. 2004).

Bei anderen Spezies sind die Ergebnisse hinsichtlich der exakten Lokalisation von Estrogenrezeptoren im Hoden widersprüchlich. So sind $ER\alpha$ und $ER\beta$ bei Nagern teilweise in Spermatozyten und Spermatischen oder auch in allen Keimzellen berichtet, während sie in anderen Studien z.T. auch gar nicht im Keimzellbereich, sondern nur in den Leydig- oder den Sertolizellen nachgewiesen wurden (O'Donnell et al. 2001). Untersuchungen über die Verteilung von Estrogenrezeptoren im Hodengewebe des Menschen beispielsweise lokalisierten den $ER\alpha$ in Leydigzellen und den $ER\beta$ in Leydig- und Sertolizellen (Pelletier & El Alfy 2000). Andere Untersuchungen wiesen bei Mensch und Ziege überhaupt keine $ER\alpha$ -Rezeptoren im Hoden nach, $ER\beta$ dagegen in allen testikulären Zellen außer den elongierten Spermatischen (Hess 2003). Eine Ursache der Unterschiede ist sicherlich die Verwendung unterschiedlicher Nachweistechiken. Allerdings gibt es auch innerhalb der immuncytochemischen Nachweismethoden Abweichungen, so dass letztendlich keine Aussage getroffen werden kann welcher Estrogenrezeptor vorrangig Bedeutung im Hoden hat. Bei Nagern wird allerdings dem $ER\alpha$ eine eher untergeordnete Rolle für die Reproduktionsfunktion zugesprochen (Pelletier & El Alfy 2000).

Im Gegensatz zu den Estrogenrezeptoren liegen hinsichtlich der Aromataseexpression im Hoden einheitliche Ergebnisse hinsichtlich der Lokalisierung vor (Tabelle 2.8).

Tabelle 2.8 Aromataseexpression im Hoden verschiedener Spezies

Spezies	Aromataseexpression	Literatur
Eber	Leydigzellen	Conley et al. 1996
		Carreau et al. 2001
		Frączek et al. 2001
Hengst	Leydigzellen	Sipahutar et al. 2003
	Sertolizellen	Hess & Roser 2004
Mensch	Leydigzellen	Brodie & Inkster 1993
Nager	Leydigzellen, Sertolizellen, Spermatozyten, runde, elongierte Spermatiden	O'Donnell et al. 2001

Während die Aromataseexpression bei Nagern und z.T. auch beim Hengst in den Tubuli stattfindet, ist sie bei Eber und Mensch auf die Leydigzellen beschränkt. Nur im Rahmen pathologischer Veränderungen kann sie beim Menschen auch in den Sertolizellen stattfinden (Brodie & Inkster 1993).

Beim Nager scheint die Aromataseexpression nicht nur Zelltyp-, sondern auch altersabhängig zu sein. So wurde die Aromatase in präpubertären Ratten ausschließlich in den Sertolizellen exprimiert, während im adulten Zustand die Leydigzelle die primäre Aromatasequelle darstellt (Payne et al. 1987, Hess 2003).

Effekte der Estrogene auf die Spermatogenese und die Spermienreifung wurden bisher primär an Nagern untersucht, die im Vergleich zum Eber sehr niedrige Estrogenkonzentrationen in Blutplasma und Samenflüssigkeit aufweisen (Free & Jaffe 1979). Tabelle 2.9 gibt eine Übersicht über bisherige Untersuchungen zur Bedeutung der Estrogene für die Spermatogenese verschiedener Spezies.

Tabelle 2.9 Rolle der Estrogene für die Spermatogenese verschiedener Spezies

Spezies	Estrogeneffekte	Literatur
Ratte	Bindung runder Spermatozoen an Sertolizellen	Ebling et al. 2000
	Spermatozoenreifung, Akrosomentwicklung	Robertson et al. 1999
	Differenzierung der Leydig- und Sertolizellen bis zur Pubertät	Payne et al. 1987
Maus	Beeinflussung der Sertolizell- und Keimzellentwicklung über peritubuläre Zellen	Nielsen et al. 2000
Aal	Stammzellerneuerung von A-Spermatogonien	Miura et al. 1999

2.5.5 Glucocorticoide

Die Glucocorticoide werden in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde gebildet. Ihre Synthese beginnt analog zu jener der Androgene und Estrogene mit Acetyl-Coenzym A bzw. Cholesterol als Ausgangssubstrat. Über den Δ 4-Weg entstehen über Pregnenolon und Progesteron die Glucocorticoide. Das aktive Glucocorticoid beim Schwein und auch bei den meisten anderen Spezies ist das Cortisol. Es entsteht nach Umwandlung des Progesterons in 11-Deoxycortisol durch Hydroylierung an C-11. Das aktive Glucocorticoid der Nager ist das Corticosteron, in der Synthese Vorläufer des Mineralocorticoids Aldosteron.

Innerhalb eines Organs wird das Ausmaß der Glucocorticoidwirkung über die Expression des Glucocorticoidrezeptors gesteuert. Der überwiegende Teil des porcinen Glucocorticoidrezeptors (GCR) wurde sequenziert (Gutscher et al. 2001). Da Cortisolkonzentrationen im Blutplasma überall gleich sind, werden durch den GCR individuelle Reaktionen einzelner Gewebe ermöglicht, so dass die GCR-Konzentrationen eng mit den Turnover-Raten der jeweiligen Gewebe zusammenhängen (Claus et al. 1996). Die Expression des Glucocorticoidrezeptors selbst wird teilweise hormonal gesteuert. So reduzieren beispielsweise Androgene die GCR-Expression, indem Heterodimere zwischen Androgen- und Glucocorticoidrezeptor gebildet werden, so dass die Wirkung des Rezeptors an der DNA gehemmt wird (Chen et al. 1997).

Neben der Regulation über den GCR unterliegen die Glucocorticoide einem weiteren Steuerungssystem durch 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenasen.

Zwei Isoenzyme der 11 β -HSD, die 11 β -HSD 1 und die 11 β -HSD 2 existieren im Organismus. Tabelle 2.10 zeigt die Charakteristika dieser beiden Isoformen.

Tabelle 2.10 Charakteristika der Isoformen 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 1 (11 β -HSD1) und 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 2 (11 β -HSD2)

	11β-HSD 1	11β-HSD 2
Enzymaktivität	Bidirektionale Oxidoreduktase	Unidirektionale Oxidase
Cofaktor	NADP ⁺ , NADPH	NAD ⁺
Funktion	Cortisol \longleftrightarrow Cortison	Cortisol \longrightarrow Cortison
Literatur	z.B. Diederich et al. 2000 Jamieson et al. 2000	z.B. Brown et al. 1993

Je nach Anwesenheit eines bestimmten Cofaktors wird Cortisol in die inaktive Form Cortison überführt, oder das inaktive Cortison zu Cortisol aktiviert. So dominiert in der Leber die reduktive Aktivität der 11 β -HSD1 (Seckl & Walker 2001), während die 11 β -HSD2-Aktivität, deren primäre Rolle der Schutz von Geweben vor einem Überschuss an Glucocorticoiden ist (Seckl 1997), z.B. in Aldosteron-sensitiven Geweben wie der Niere und auch dem Darm überwiegt (Edwards et al. 1988, Funder et al. 1988, Claus et al. 2001).

Die Steuerung der 11 β -HSD-Aktivität ist primär während des Trächtigkeitsverlaufs untersucht. Hier sind Progesteron und Estrogene für Veränderungen der uterinen 11 β -HSD2-Aktivität verantwortlich (Burton et al. 1998). In plazentärem Gewebe greifen die Estrogene regulierend in die 11 β -HSD-Aktivität ein (Darnel et al. 1999).

Die Glucocorticoide werden im Organismus generell als katabole Stoffwechselhormone angesehen (Sharpe et al. 1986). Sie weisen, vermittelt über spezifische Rezeptoren, vielfältige Wirkungen auf. So initiieren sie die Zelldifferenzierung (Raab et al. 1998), sorgen aber zugleich für die Apoptose der Zellen (Claus & Weiler 1994, Thompson 1994, Geley et al. 1997, Riccardi et al. 1999). Daneben haben sie eine ausgeprägte Wirkung auf das Immunsystem,

wodurch sich auch ihre antiphlogistische Wirkung erklärt (Thun & Schwartz-Porsche 1994).

Sowohl Glucocorticoidrezeptor als auch 11 β -HSD1 wurde bei Nagern primär in den Leydigzellen nachgewiesen (Ge et al. 1997a,b, Leckie et al. 1998, Weber et al. 2000). Daraus abgeleitet wurde eine Rolle im Rahmen der Testosteronsynthese. Glucocorticoide hemmen vermutlich die Testosteronsynthese und in Folge davon sinkt die Spermienausbeute (Evain et al. 1976, Ge et al. 1997b). Über das System der 11 β -HSD1 könne diese Hemmung nun durch Inaktivierung des Cortisols reduziert werden (Monder et al. 1994, Ge et al. 1997b). Auch der präpubertäre Androgenanstieg soll beim Nager vermutlich nur durch einen Anstieg der testikulären 11 β -HSD1-Aktivität und damit der Inaktivierung von Cortisol ermöglicht werden (Neumann et al. 1993, Michael et al. 2003).

Neben den Leydigzellen wurden Glucocorticoidrezeptoren allerdings auch in Keimzellen und teilweise in Sertolizellen nachgewiesen (Schultz et al. 1993, Konrad et al. 1998). Eine Untersuchung an Ratten wies dabei 60% mehr GCR-positive Zellen in den Tubuli nach als im Interstitium (Biagini et al. 1995). Hier besteht ein direkter Zusammenhang mit der Keimzellapoptose im Hoden. So wird durch Verabreichung des synthetischen Glucocorticoids Dexamethason die Anzahl apoptotischer Keimzellen im Hoden von Ratten gesteigert, wohingegen eine Mifepriston-Applikation (GCR-Antagonist) zu einer dramatischen Reduktion der Keimzellapoptose führt (Yazawa et al. 2000).

Eine solche Glucocorticoid-induzierte Apoptose von Keimzellen im Hoden (Billig et al. 1995, Heninger et al. 2002) könnte also einen normalen regulatorischen Feinsteuerungsmechanismus darstellen, über den die Spermienzahlen im Ejakulat an den aktuell notwendigen physiologischen Bedarf angepasst werden können. Dadurch wird zum einen eine Überladung von Sertolizellen (Huckins 1978, Johnson et al. 2000) verhindert, zum anderen sinkt das Risiko von Polyspermie und damit von Mehrfachbefruchtungen, die beim Schwein je nach Besamungsart immerhin in einer Größenordnung von 5-50% der befruchteten Eizellen liegen (Li et al. 2003).

2.6 Modelle zur Untersuchung der hormonalen Regulation der Spermatogenese

Um die Bedeutung endokriner Parameter für die Spermatogenese einzeln oder in Kombination zu erfassen, existieren verschiedene in vivo Methoden, die im Folgenden vorgestellt werden sollen.

2.6.1 Hypophysektomie

Die Hypophysektomie ist die älteste, klassische Methode zur Untersuchung der Spermatogenese (Smith 1930), mit der die Abhängigkeit der Hodenfunktion von den Gonadotropinen erstmals nachgewiesen wurde. Als Folge des Gonadotropinmangels, unterbleibt die Synthese der Gonadenhormone im Hoden, so dass ein Gonadenhormon- und Gonadotropin-freies System geschaffen wird.

Wesentlicher Nachteil der Hypophysektomie ist, dass neben den für die Gonaden verantwortlichen Hormonen auch andere Hormonsysteme entfernt werden, die Bedeutung für die Spermatogenese haben könnten, z.B. das TSH (Thyroid-Stimulierendes Hormon), Prolactin oder GH (McLachlan et al. 1994a). Zudem führt die Hypophysektomie nicht zu einem vollständigen Abbruch der Spermatogenese, da die Leydigzellen des hypophysektomierten Tieres immer noch geringe Mengen an Gonadenhormonen freisetzen, die eine geringe Keimzellentwicklung zulassen (Franca et al. 1998).

Außerdem gilt die Hypophysektomie im Rahmen heutiger Tierschutzüberlegungen als gravierender Eingriff, so dass andere Vorgehensweisen im Vordergrund stehen.

2.6.2 Ethan Dimethan Sulfonat (EDS) Behandlung

Ethan dimethan sulfonat (EDS) übt selektiv auf Leydigzellen eine cytotoxische Wirkung aus und zerstört diese (Kerr et al. 1992, Henriksen et al. 1995). Abbildung 2.10 zeigt die Struktur dieses Moleküls

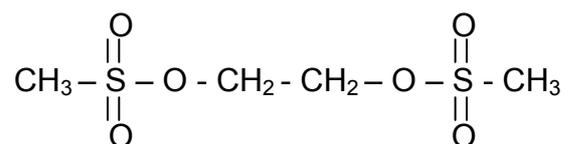


Abbildung 2.10 Strukturformel des Ethan dimethan sulfonat

Bereits durch eine einmalige Behandlung von Ratten mit EDS werden die intratestikulären Testosteronkonzentrationen nach 3 Tagen durch Zerstörung der

Leydigzellen auf nicht mehr nachweisbare Konzentrationen gesenkt (Henriksen et al. 1995). Bei in vitro Versuchen wirkte EDS direkt apoptoseinduzierend auf die Leydigzellen (Flinterman et al. 1994). So können Effekte eines Gonadenhormonmangels auf die Spermatogenese selektiv untersucht werden. Problematisch ist, dass die durch die EDS-Behandlung nicht mehr vorhandenen feedback Effekte der Gonadenhormone auf die Hypophyse und den Hypothalamus auch Veränderungen von GnRH und damit der Gonadotropine LH und FSH zur Folge haben. So steigen die LH-Konzentrationen im Blutplasma von Ratten nach EDS-Behandlung an (Ariyaratne et al. 2003).

2.6.3 Agonisten und Antagonisten des Gonadotropin-Releasing-Hormons

GnRH-Agonisten weisen durch ihre Bindung an den GnRH Rezeptor in der Hypophyse eine GnRH-ähnliche Wirkung auf, so dass die Hypophysen-Gonadenachse stimuliert wird. Bei dauerhafter Anwendung kommt es jedoch zur Desensibilisierung der GnRH-Rezeptoren und damit einem Wirkungsverlust (Doecke 1994). Angewendet wird dieses Prinzip bei der Behandlung von Pubertas praecox bei Jugendlichen, sowie bei der Behandlung von Prostatakarzinomen (Conn & Crowley 1994).

Die Anwendung von GnRH-Antagonisten, d.h. speziellen Molekülen, welche sich an den hypophysären GnRH-Rezeptor setzen und so die GnRH-Wirkung verhindern, unterdrücken effizient und reversibel die Hodenfunktion (Swerdloff et al. 1983, Sinha-Hikim et al. 1995). Infolgedessen können exogen Hormone einzeln oder in Kombination substituiert werden. Da sie die Spermatogenese unterdrücken, wurden GnRH-Antagonisten auch als Kontrazeptiva im Humanbereich diskutiert (Weinbauer & Nieschlag 1993). Die Effekte einer GnRH-Antagonist Behandlung sind vergleichbar mit jenen einer Hypophysektomie (Sinha-Hikim & Swerdloff 1995). Nachteilig an diesem Modell ist v.a. der relativ hohe Arbeitsaufwand, da der Antagonist täglich injiziert werden muss, um einen Effekt zu erzielen. Aufgrunddessen ist er, zusätzlich auch wegen der relativ hohen Kosten, speziell für Langzeitexperimente eher ungeeignet (McLachlan et al. 1994a).

2.6.4 Enzyminhibitoren

Enzyminhibitoren sind eine Möglichkeit, um selektiv die Synthese bestimmter Steroide zu unterdrücken. Zum Einsatz kommen v.a. Aromataseinhibitoren, anhand derer die Estrogensynthese in intakten Tieren selektiv unterdrückt und damit die Rolle der Estrogene für die Spermatogenese untersucht werden kann (Cardone et al. 2002). Aromataseinhibitoren werden auch therapeutisch eingesetzt, um einer durch eine zu hohe Estrogenproduktion bedingten Infertilität entgegenzuwirken (Kawakami et al. 2004). Allerdings ändern sich durch die inhibierte Estrogenproduktion auch die Konzentrationen von FSH und LH (Juniewicz et al. 1988, Bhatnagar et al. 1992, Turner et al. 2000). Dadurch können Auswirkungen des Aromataseinhibitors auf die Spermatogenese nicht unbedingt allein auf die Abwesenheit der Estrogene zurückgeführt werden. So kommt es nach Applikation eines Aromataseinhibitors bei Hengst, Mensch, Primat, Hund und Ratte zu einem Anstieg der Testosteronkonzentrationen von bis zu 50% (Bhatnagar et al. 1992, Trunet et al. 1993, Hayes et al. 1999, Stein et al. 2002).

Ein weiteres Problem besteht darin, dass die Aromataseinhibitoren innerhalb des Hodens nicht alle Zellen erreichen, so dass z.B. bei der Ratte zwar die Aromatase der Leydigzellen, nicht aber die in den Keimzellen enthaltene Aromatase blockiert wird (Janulis et al. 1998). Zudem könnte der Testosteronanstieg ebenso einen Anstieg der Aromataseexpression bewirken, wodurch nicht alles durch den Inhibitor blockiert werden kann (Roselli & Resko 1997). Beim Eber wurde bereits versucht, mittels eines Aromataseinhibitors die Bedeutung der Estrogene für die Spermatogenese zu untersuchen (Steinhauer 1983). Der aus dem Humanbereich stammende Inhibitor wurde jedoch aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu dem Estrogenvorläufer Androstendion selbst in Estrogene umgewandelt.

2.6.5 Knock-out Experimente

Das Ausschalten bestimmter Gene zur Untersuchung der hormonellen Regulation der Spermatogenese wird hauptsächlich bei Nagern angewendet.

So existieren Mäuse, denen das Gen für die Aromatase fehlt (Aromatase-knock out, ARKO) oder jenes für die Produktion der Estrogenrezeptoren (Estrogen Rezeptor knock out, ERKO) (Fisher et al. 1998, Robertson et al. 1999). Ebenfalls dazu gehören transgene Mäuse, die durch Zerstörung eines Teils des GnRH-Gens nicht mehr in der Lage sind GnRH zu produzieren, so dass in Folge weder Gonadotropine

noch Gonadenhormone gebildet werden, sogenannte hpg (hypogonadal) Mäuse (Singh et al. 1995, Ebling et al. 2000). Neben den Vorteilen, dass anhand solcher Modelle selektive Funktionen von Hormonen erfasst werden können, steht die Frage, inwieweit es sich hier noch um ein physiologisches Modell handelt und damit inwieweit die erzielten Ergebnisse auf physiologische Situationen übertragbar sind. Zudem sind knock out Experimente natürlich nur anwendbar, wenn Genort und -sequenz des auszuschaltenden Gens bekannt sind.

2.6.6 Immunisierung

Immunisierungen bzw. Veränderungen der Reproduktionsfunktion durch Immunisierungen wurden erstmals in den 30er Jahren durchgeführt (Scaramuzzi et al. 1993). In fortführenden Studien wurde spezifisch gegen bestimmte Hormone immunisiert, um ihre Bedeutung für Stoffwechsel und Reproduktion näher zu charakterisieren. Interesse bestand ebenso darin, die Immunisierung kommerziell zur Reproduktionskontrolle bei landwirtschaftlichen Nutztieren einzusetzen, so z.B. um Sexualverhalten und/oder Agressivität zu vermindern sowie den spezifischen Geschlechtsgeruch von Ebern oder Ziegenböcken zu reduzieren.

Anwendungsbereiche in der Humanmedizin sind zudem die Behandlung hormonabhängiger Krankheiten wie z.B. Prostatakarzinome oder Endometritis durch Immunisierungen.

Bei allen Immunisierungen, unabhängig gegen was immunisiert wird, kann die Immunisierung stets aktiv oder passiv vorgenommen werden. Vorteile der **passiven Immunisierung** sind v.a. die schnelle Immunantwort, so dass Hormone zu einem definierten Zeitpunkt effizient unterdrückt werden können. Dem steht allerdings nachteilig gegenüber, dass enorme Mengen an Antikörper verwendet werden müssen, um schnell ausreichende Antikörpertiter zu erzielen. Monoklonale Antikörper stehen zwar in ausreichenden Mengen zur Verfügung, da sie jedoch nur jeweils eine einzige antigene Determinante erkennen, ist ihre Wirkung weitaus geringer als jene von polyklonalen Antikörpern (Hage-van Noort et al. 1992).

Die **aktive Immunisierung**, deren Wirkungseintritt zwar verzögert ist, hat den Vorteil, dass langanhaltende Antikörpertiter aufrechterhalten werden können.

Anwendung zur Untersuchung der hormonalen Regulation der Spermatogenese findet v.a. die Immunisierung gegen GnRH.

Versuche einer aktiven Immunisierung gegen Testosteron sowie gegen Estrogene, FSH und LH wurden ebenfalls unternommen. Die **Immunisierung gegen Testosteron** steigert allerdings durch fehlende feed back Effekte die Gonadotropin- und in Folge auch die Testosteronproduktion selbst (Wickings & Nieschlag 1978, Thompson et al. 1985, D'Occhio et al. 1987).

Auch **Immunisierungen gegen Estrogene** führten nicht zu der gewünschten Unterdrückung der Spermatogenese und stellten somit keine Alternative dar, um die hormonale Regulation der Spermato-genese zu untersuchen (Reeves et al. 1989).

Die aktive **Immunisierung gegen FSH** wurde speziell an Affen näher untersucht im Hinblick auf eine Anwendung beim Menschen als kontrazeptive Maßnahme (Wickings & Nieschlag 1980, Srinath et al. 1983). Allerdings zirkuliert FSH in relativ hohen Mengen im Blut, so dass sehr hohe Antikörpertiter notwendig wären, um dieses Gonadotropin zu neutralisieren. Befriedigende Ergebnisse wurden nicht erzielt.

Immunisierungen gegen LH wurden ebenfalls durchgeführt, führten allerdings zu sehr divergierenden Ergebnissen, die gegebenenfalls auf Unterschiede in den Antikörpertitern zurückzuführen sind.

Bewährt hat sich indes die **Immunisierung gegen GnRH**, mittels der, allerdings speziessabhängig die gesamte Gonadotropin- und Gonadenhormonsekretion unterdrückt werden kann (Scaramuzzi et al. 1993).

Da GnRH eine speziesspezifische Struktur und sehr geringe Molekülgröße aufweist ($\leq 5\text{kDa}$), wird es vom Organismus nicht als Antigen erkannt. Um einen antigen wirksamen Impfstoff zu erzeugen wird GnRH deshalb an ein größeres Trägerprotein (Carrier) gebunden. Die Bindung dieses Carriers erfolgt über einen Abstandshalter (Spacer), durch den dem Organismus die antigene Determinante, das GnRH, präsentiert wird (Talwar 1985). Generell sind zwei kommerziell erwerbliche Vakzinen auf dem Markt, wobei nur eine (Improvac[®], CSL Animal Health, Victoria, Australien) zur immunologischen Kastration von Ebern zugelassen ist.

Durch das GnRH-Antigen wird im Organismus die Bildung spezifischer anti-GnRH-Antikörper veranlasst, welche auch endogene GnRH-Moleküle binden. Dadurch wird die GnRH-Wirkung in der Hypophyse verhindert, so dass die Sekretion von LH und, speziesspezifisch auch FSH unterbleibt. In Folge ist die Bildung der Gonadensteroiden in den Leydigzellen inhibiert. Die GnRH-Immunisierung wird sowohl als Therapiemethode als auch zu Forschungszwecken eingesetzt. Bei

landwirtschaftlichen Nutztieren dient die GnRH-Immunisierung beispielsweise der Unterdrückung des geschlechtsspezifischen Verhaltens sowie des unangenehmen Geschlechtsgeruchs bei Ebern und Ziegenböcken (Metz et al. 2002, Thompson 2000).

Brust- oder Prostatakarzinome sowie Endometriosen können in der Humanmedizin durch die GnRH-Immunisierung behandelt werden. Die Immunisierung verhindert die Bildung der tumorfördernden Hormone und hemmt zusätzlich direkt oder indirekt dadurch die Teilungsrate der Tumorzellen. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Pubertas praecox von Jugendlichen, bei denen die GnRH-Immunisierung zur Inhibierung der Fortpflanzungsregulation ebenfalls zum Einsatz kommt (Talwar 1997).

Generell bedarf es bei der GnRH-Immunisierung mindestens einer Boosterimpfung, um ausreichend hohe Antikörpertiter zu erreichen und eine effektive Inhibierung der Gonadotropine und Gonadensteroiden hervorzurufen (Thompson 2000).

3. FRAGESTELLUNG

Beim Eber bestehen erhebliche Besonderheiten für die Regulation der Hodenfunktion. So besitzen Eber mit 30% einen sehr hohen Anteil an Interstitialgewebe am Hodenvolumen, was in Zusammenhang mit einer sehr hohen testikulären Estrogenbildung steht. Eine Rolle der Estrogene für Sexualverhalten und Libido, sowie die Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen sind nachgewiesen. Die Wirkungen der im Ejakulat angereicherten Estrogene im Genitaltrakt der Sau sind ebenfalls bekannt. Ob die testikulären Estrogene auch Bedeutung für die Spermatogenese des Ebers haben, ist bisher nicht untersucht.

Ebenso ist die Bedeutung des FSH für die Spermatogenese bei maturen Ebern nicht bekannt, zumal Eber kein Androgen bindendes Protein bilden.

Zu diesem Fragekomplex soll die Arbeit einen Beitrag leisten. Sie gliedert sich in 4 Teilfragestellungen.

Im Rahmen der **Fragestellung 1** sollten die Auswirkungen einer GnRH-Immunsierung von Ebern auf Gonadotropine und testikuläre Steroidhormone erfasst werden. Diese Versuche ergaben allerdings, dass das Gonadotropin FSH durch die GnRH-Immunsierung unbeeinflusst ist. Daraus ergab sich die **Fragestellung 2**, in welcher Teilaspekte der Steuerung der FSH-Regulation durch Vergleich pubertärer und maturaer Eber sowie Kastraten bearbeitet werden sollten.

Fragestellung 3 sollte dann die Konsequenzen der LH-Inhibierung und damit einer gehemmten Steroidsynthese für die Spermatogenese beim Eber näher charakterisieren.

Fragestellung 4 sollte erklären, inwieweit Estrogene eine Bedeutung für die Spermatogenese beim Eber haben, indem GnRH-immunisierte Eber exogen mit 17β Estradiol infundiert werden sollten.

Es handelt sich bei der Arbeit um ein von der DFG gefördertes Gemeinschaftsprojekt zwischen dem Institut für Tierhaltung und Tierzüchtung, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie der Universität Hohenheim (Prof. Dr. R. Claus) und dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Universität Giessen (Prof. Dr. M. Bergmann). Die in Giessen bearbeitete Dissertation baut auf molekularbiologischen Methoden, unterstützt durch Laser assisted cell picking auf, so dass die Ergebnisse der beiden Arbeiten nicht überlappen.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Tierversuche

4.1.1 Übersicht

Die Tierversuche bauen auf genehmigten Tierversuchsanträgen beim Regierungspräsidium in Stuttgart auf.

Die 4 Fragestellungen wurden im Rahmen eines Haupt- und eines Ergänzungsversuches bearbeitet.

Die Gruppenverteilung der Einzeltiere für den Hauptversuch sowie die zugehörigen Verläufe der Körpergewichte über die sieben Wochen Versuchsdauer sind in Tabelle 4.1 verdeutlicht.

Tabelle 4.1 Verteilung der Gruppen aus den zwei Durchgängen mit zugehörigen Körpergewichten (Gewichte zu Beginn der 25. bis Ende der 32. Lebenswoche)

	Durchgang			
	1 (Juli - September)		2 (Januar - März)	
	Tier	Körpergewicht (kg)	Tier	Körpergewicht (kg)
Intakte Eber	Zentis	105-137	Ernie Elba Edwin Ernesto	127-164 111-147 110-140 104-140
Immunisierte Eber	Zausel Zunder Zorro	98-124 95-126 95-126	Eddy Esra	100-128 117-142
17 β E ₂ -infundierte, immunisierte Eber	Zimt Zwerg Zottel	91-124 95-129 107-135	Egon Enzo Etsel	118-151 117-146 109-135

Für den Hauptversuch kamen insgesamt 16 Tiere im Alter von 25-32 Wochen (Gewichtsbereich 91-164 kg, siehe Tabelle 4.1) zum Einsatz. Diese waren in die 3 Gruppen „Intakte Eber“ (n=5), „Immunisierte Eber“ (n=5) (Immunisierung gegen GnRH siehe 4.1.4) und „17 β E₂-infundierte, immunisierte Eber“ (n=5) (Details zur Infusion siehe 4.1.5) unterteilt. Aus Kapazitätsgründen gliederte sich der Hauptversuch in zwei Durchgänge. Beide Durchgänge dauerten insgesamt 7 Wochen. Dieser Zeitraum beinhaltet die Dauer für die Spermatogenese von etwa 34 Tagen sowie die Dauer für die Nebenhodenpassage von etwa 14 Tagen (Swierstra 1968), so dass Effekte der GnRH-Immunisierung bzw. der Estradiolinfusion auf die Spermatogenese erstmals nach diesem Zeitraum erwartet werden konnten.

Zur Bearbeitung der **Fragestellung 1** wurde die Gruppe „Intakte Eber“ mit der Gruppe „Immunisierte Eber“ verglichen.

Die **Fragestellung 3** wurde an der Gruppe „17 β E₂-infundierte, immunisierte Eber“ bearbeitet, wobei die Gruppen „Intakte Eber“ sowie „Immunisierte Eber“ zum Vergleich herangezogen wurden.

Für den Ergänzungsversuch wurden 5 Kastraten im Alter von 24-26 Wochen (Gewichtsbereich 95-120kg) eingesetzt.

Tabelle 4.2 zeigt den Gewichtsverlauf der Kastraten während der zwei Wochen Versuchsdauer. In der zweiten Versuchsdauer wurden alle Tiere mit 17 β Estradiol infundiert.

Tabelle 4.2 Estradiolinfusion an Kastraten: Verteilung der Gewichte über den Versuchszeitraum (24.-26. Lebenswoche)

Tier	Körpergewicht (kg)
Daniel	99-120
Dux	101-115
Dieter	102-110
Buffy	97-114
Dirk	95-112

Zusätzlich standen Blutplasmaproben aus früheren Versuchen „GnRH-Immunisierung“ und „Gonadotropininfusion“ von C. Metz (Metz 2003) zur

Verfügung. Dabei handelte es sich um pubertäre Eber, GnRH-immunisierte Eber sowie Kastraten und 17 β Estradiol-infundierte Kastraten im Alter von 18 Wochen.

Zur Bearbeitung der **Fragestellung 2** wurden die maturen Tiere des Hauptversuchs sowie des Ergänzungsversuchs mit den pubertären Tieren aus den Versuchen von C. Metz verglichen.

4.1.2 Herkunft, Haltung und Fütterung der Tiere

Bei den Tieren des Hauptversuchs handelt es sich um Eber der Deutschen Landrasse, die von der Versuchsstation Unterer Lindenhof bezogen und im Alter von 22 Wochen in den Versuchsställen der Universität Hohenheim aufgestellt wurden.

Die Kastraten des Ergänzungsversuches wurden im Alter von 22 Wochen aus der Zucht von Herrn K. Benz (72511 Bingen, Deutschland) bezogen und in Hohenheim aufgestellt. Die Tiere von denen die bereitgestellten Proben aus früheren Versuchen stammten, waren Eber und Kastraten der Rasse Deutsche Landrasse x Piétrain und stammten von der Versuchsstation Unterer Lindenhof der Universität Hohenheim.

Alle Tiere wurden im Versuchsstall in Hohenheim in mit Stroh eingestreuten Einzelbuchten aufgestellt, die gegenseitigen Sichtkontakt erlaubten.

Die **Fütterung** aller Tiere erfolgte bedarfsgerecht mit 30 MJ ME und 40 g Rohprotein pro Tag. Für diese Bedarfswerte wurde eine Ration gestaltet, die auf der Versuchsstation Unterer Lindenhof gemischt wurde. Die Zusammensetzung der Ration ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

Tabelle 4.3 Zusammensetzung der Futtermation

Inhaltsstoff	MJ ME/kg	XP g / kg	% in der
	Frischsubstanz	Frischsubstanz	Ration
Gerste	12,6	11,0	37,0
Hafer	11,2	10,8	15,0
Weizen	13,8	12,1	8,0
Erbsen	13,6	22,8	7,0
Sojaschrot	14,4	49,1	3,0
Weizenkleie	8,3	14,1	6,2
Mineralstoffe			2,5
Sojaöl	37,3		1,0
Futterkalk			0,2
Grünmehl	5,97	16,6	20

Die Futterzuteilung erfolgte zweimal täglich um 8:00 Uhr und um 15:00 Uhr. Alle Tiere bekamen je Mahlzeit 1,5 kg Futter, d.h. 3 kg pro Tag.

4.1.3 Verlegung von Venenverweilkathetern und Blutprobennahme

Alle Tiere bekamen jeweils zwei **Venenverweilkatheter** über die Vena cephalica in die Vena jugularis verlegt (Metz 2003). Einer diente während des Versuchs der kontaminationsfreien Blutprobennahme, der andere der Infusion. Die Methodik zur Verlegung der Verweilkatheter ist ein am Institut etabliertes Verfahren (Claus et al. 1990, Kraetzel & Weiler 1998).

Der Katheter ist folgendermaßen aufgebaut: Ein 160 cm langer Siliconschlauch ist in der Mitte mit einer Dacronscheibe versehen (Durchmesser: 3 cm). Diese Dacronscheibe wird während der Operation in das Nackenfettgewebe des Tieres an der Austrittsstelle des Katheters verlegt, einerseits um den Katheter zu fixieren, andererseits, um absteigende Infektionen zu verhindern. Details der Verlegung sind in der Dissertation von Zeifang (2000) beschrieben.

Die Blutprobennahme (10 ml in heparinisierte Röhrchen) begann eine Woche nach der OP mit der Entnahme täglicher Blutproben morgens um 8:00 Uhr, in denen der Verlauf der Gonadensteroiden Estradiol und Testosteron von der 25. bis zur 32. Lebenswoche gemessen wurde. Das Plasma wurde durch Zentrifugation (15 min,

3000 U/min gewonnen und auf 2 Probenröhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden bis zur späteren Analytik bei -20°C tiefgefroren.

Bei den Intensivprobenahmen (windows) wurden über 12 Stunden alle 20 Minuten 5 ml Blut entnommen und ebenso wie die täglichen Proben weiterverarbeitet. Nach jeder Blutentnahme wurde der Katheter im Falle der täglichen Blutprobenahmen mit 20 ml, bei den windows mit 10 ml heparinierter Kochsalzlösung (0.9% NaCl) gespült. Der Heparin Gehalt betrug dabei 2 g/L für die Spüllösung der täglichen Blutproben und 0.4 g/L für die Spüllösung der windows. Bei den windows wurde die Spülflüssigkeit aufgrund der großen Mengen pro Tag zusätzlich über einen Bakterienfilter verabreicht, der alle 4 Stunden gewechselt wurde. Täglich jeweils um 15:00 Uhr wurden die Katheter zusätzlich mit 0.9% NaCl gespült, um Blutkoagulationen zu vermeiden. Der Dreiwegehahn wurde mit einer Lösung aus 70% Alkohol + 3% H_2O_2 desinfiziert und nach jedem Window ausgewechselt.

Innerhalb des Hauptversuchs wurden an 5 Tagen windows durchgeführt, innerhalb des Ergänzungsversuchs an 2 Tagen.

4.1.4 GnRH-Immunisierung

Die **aktive Immunisierung gegen GnRH** im Rahmen des Hauptversuches erfolgte in Anlehnung an frühere Versuche von Metz (2003) mit einem kommerziellen Impfstoff (Improvac®, Boar taint vaccine, CSL Animal Health, Victoria, Australien). Der Impfstoff enthält 200 μg eines GnRH-Protein-Konjugates je mL, 0,1 mg Thimerosal je mL zur Konservierung sowie zusätzlich ein synthetisches Adjuvans auf Dextranbasis. Entsprechend der Empfehlung des Herstellers wurde er in einer Dosis von 2 mL subkutan am Ohrgrund injiziert.

Abbildung 4.1 gibt einen Überblick über den zeitlichen Ablauf der Immunisierungen, im Rahmen des gesamten Zeitablaufs des Versuches.

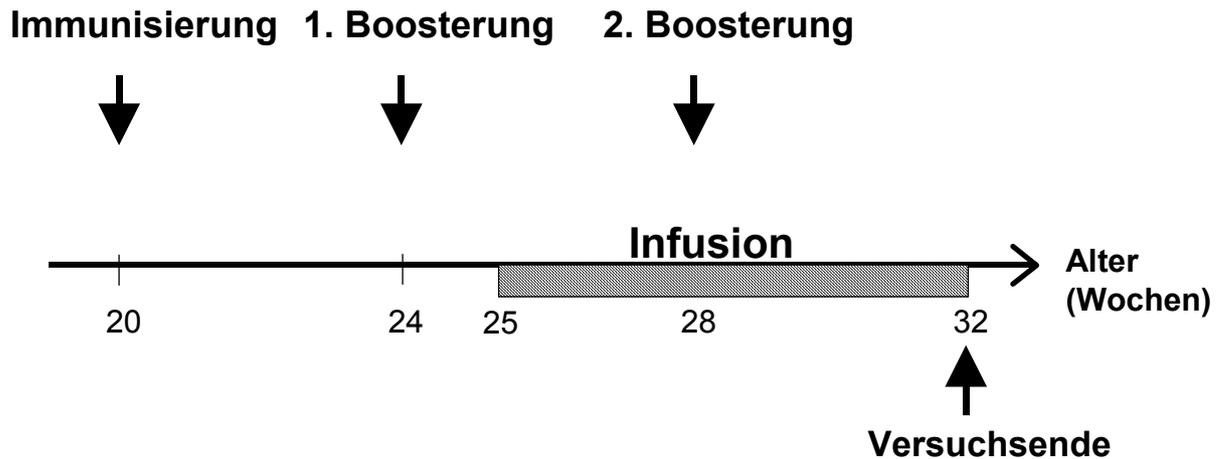


Abbildung 4.1 Ablauf des Hauptversuchs

Die Erstimmunisierung im Rahmen des Hauptversuchs erfolgte bei den Gruppen „Immunisierte Eber“ und „17 β E₂-infundierte, immunisierte Eber“ im Alter von 20 Wochen (79, 64 \pm 1,81 kg), zu einem Zeitpunkt, zu dem alle Keimzellstadien im Hoden bereits als etabliert gelten konnten. Eine Boosterimpfung 4 Wochen später (24 Wochen; 94,82 \pm 2,78 kg) reduzierte die Konzentrationen der Gonadensteroiden auf Minimalwerte. Um diese minimalen Konzentrationen über den gesamten Versuchszeitraum aufrechtzuerhalten, fand eine 2. Boosterimpfung im Alter von 28 Wochen (117,36 \pm 3,34 kg), in der Mitte des Versuchszeitraumes statt.

Zwei Tage vor der 1. Boosterimpfung, bekamen die Tiere die Venenverweilkatheter verlegt. Nach einer einwöchigen Erholungsphase, begannen die zur Bearbeitung der Fragestellung 3 notwendigen Infusionen (Details siehe 4.1.5).

Im Alter von 32 Wochen wurden alle Tiere des Hauptversuchs eingeschläfert. Die GnRH-immunisierten Eber aus den von C. Metz bereitgestellten Proben, wurden ebenfalls 3 x, im Alter von 10, 16 und 23 Wochen immunisiert.

4.1.5 Infusionstechnik

Die **Infusionen** laufen als Dauertropfinfusionen. Die Infusionstechnik ist am Institut etabliert (Abbildung 4.2). Generell sind die Tiere mit zwei Venenverweilkathetern versehen. Ein Katheter dient ausschließlich der Infusion, der andere der kontaminationsfreien Blutentnahme.

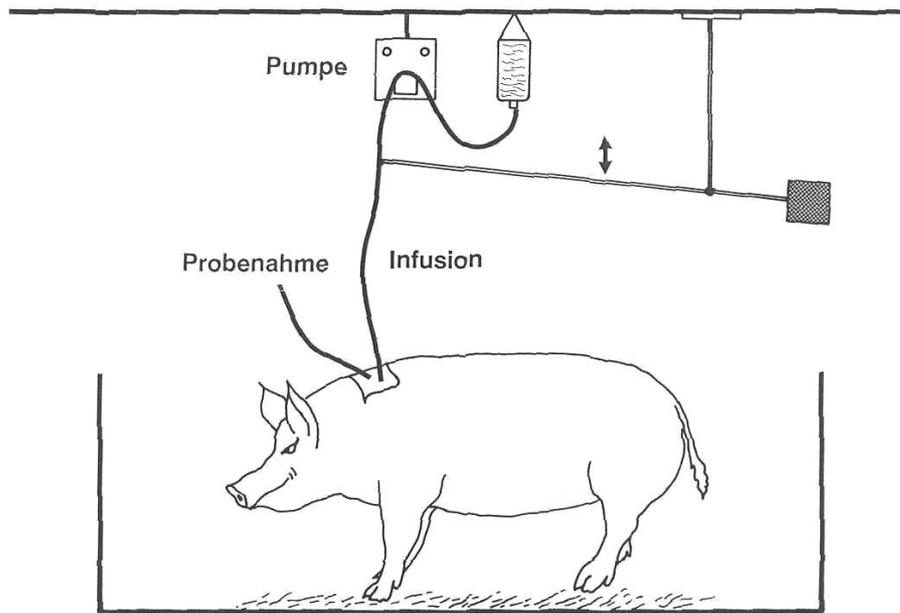


Abbildung 4.2 Infusionstechnik beim Schwein (Vorlesungsunterlagen FG Tierhaltung & Leistungsphysiologie)

Für die Infusion wurden Infusionspumpen (Typ Niki V4, Fa. CME Ltd., Caesarea Medical Electronic, Israel) eingesetzt. Sie waren ca. 1,50 m über dem Boden angebracht. Über ein Infusionsbesteck, das an einem der Venenverweilkatheter befestigt war, wurde die Infusionsflüssigkeit in das Tier geleitet. Das Infusionsbesteck wurde wöchentlich gewechselt. Um den Katheter vor Zugbelastungen zu schützen, wurde die im Nacken des Schweines angebrachte Tasche mit einer Schnur versehen, die parallel zum Katheter verlief und an einem beweglichen Stab angebracht war. Dieser Stab gleicht Bewegungen des Schweines aus und hält den Katheter nach oben, so dass er vor dem Abbeißen durch das Tier geschützt ist.

Die Überwachung der infundierten Tiere erfolgte kontinuierlich Tag und Nacht, um eventuell auftretenden Lufteintritt in den Katheter oder mögliche andere Probleme der Infusion sofort erkennen und beheben zu können.

Die infundierte Menge der Lösung belief sich auf 100 mL je Stunde und Tier und somit 2,4 l Infusionsflüssigkeit je Tag und Tier.

Die Gruppen „Intakte Eber“ und „Immunisierte Eber“ des Hauptversuchs bekamen über die gesamten 7 Wochen Versuchsdauer physiologische Kochsalzlösung infundiert, um Effekte der Infusionsflüssigkeit zu erfassen. Die $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Eber bekamen zunächst eine Woche lang ebenfalls physiologische

Kochsalzlösung infundiert. Dieser wurden dann über 7 Tage 1,3 mg 17 β Estradiol je Tier und Tag zugesetzt, was zu einer Estradiolkonzentration von etwa 1000 pg/ml im peripheren Blutplasma führte. Dazu wurden 500 μ l (0,54 mg Estradiol) einer ethanolischen Stammlösung (1,08 mg/ml EtOH) an 17 β Estradiol (Sigma E8875) in 1 L 0,9 % NaCl gelöst. Damit sollte der beim Eber charakteristische präpuberale Hormonanstieg simuliert werden (Schwarzenberger et al. 1993). Es folgte eine 5-wöchige Infusion mit 0,49 mg 17 β Estradiol je Tier und Tag, was zu Blutplasmakonzentrationen vergleichbar mit jenen von intakten Ebern führte. Dazu wurden 250 μ l (0,2 mg Estradiol) der ethanolischen Stammlösung (0,81 mg/ml EtOH) in 1 L 0,9% NaCl gelöst.

Die Kastraten des Ergänzungsversuchs sowie auch die Kastraten aus den bereitgestellten Proben von C. Metz, bekamen ebenfalls über Dauertropfinfusionen zunächst in einer einwöchigen Kontrollphase ausschließlich physiologische Kochsalzlösung infundiert, dann in der folgenden einwöchigen Behandlungsphase 0,49 mg 17 β Estradiol je Tier und Tag, so dass im peripheren Blutplasma Konzentrationen erreicht wurden, wie sie für intakte Eber als physiologisch angesehen werden können.

4.1.6 Einschläfern und Gewebeprobenahme

Am Ende der Versuche wurden alle Tiere mittels intravenöser Applikation von 10-20 mL Eutha 77 (Pentobarbital-Natrium 128,3 mg/mL; ESSEX Pharma München) über den Venenverweilkatheter exzitationsfrei eingeschläfert.

Im Falle eines Katheterausfalles erfolgte die Applikation über die Ohrvene nach Sedation mit Tilest[®] 500 (1mg/kg Körpergewicht intramuskulär; Pharmacia & Upjohn, Erlangen).

Unmittelbar nach dem Einschläfern wurden beide Hoden mit Nebenhoden entnommen. Das Gewicht der beiden Organe wurde bestimmt und das Volumen nach dem Prinzip der Wasserverdrängung ermittelt. Für die Auswertung wurde der linke Hoden quer zur Längsachse halbiert. Aus der einen Hälfte wurde die Tubulusflüssigkeit gewonnen. Dazu wurde der Hoden vorsichtig zusammengepresst und die Flüssigkeit mittels einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle abgesaugt. In der Tubulusflüssigkeit sollte das Steroidmilieu im Tubulusbereich erfasst werden. Die Flüssigkeit wurde bis zur analytischen Auswertung bei – 20°C gelagert.

Aus der anderen Hodenhälfte wurden Gewebestückchen herausgeschnitten. Dabei wurden Gewebstücke aus dem inneren Hodenbereich (Rete testis), aus dem mittleren und aus dem äußeren Hodenbereich gewonnen. Die Gewebestückchen wurden für spätere morphologische und immunocytochemische Untersuchungen entweder in 4 % Formalin oder in Bouin-Lösung fixiert. Die Fixierdauer belief sich auf 48 h sowohl bei der Formalin als auch bei der Bouin-Fixierung. Damit konnte eine ausreichende Hemmung der die Gewebestrukturen zerstörenden Endopeptidasen als gesichert angesehen werden. Für analytische Zwecke wurde weiteres Hodengewebe zunächst in Stickstoff schockgefroren, anschließend in kleine Stücke zerteilt und bei -80°C bis zu weiteren analytischen Untersuchungen gelagert.

Aus den Gewebeproben des Nebenhodens wurde die Flüssigkeit des Nebenhodenkopfes in kleine Reagenzgläser für spätere Spermien-dichtebestimmungen geleitet. Die Auswertung dieser Proben erfolgte im Rahmen der Diplomarbeit von Katrin Danowski. Die Reagenzgläser lagerten bis zur weiteren analytischen Auswertung bei -20°C .

4.2 Hormonanalytische Verfahren

In Tabelle 4.4 sind die für die analytische Auswertung der Proben angewandten immunologischen Meßverfahren dargestellt.

Tabelle 4.4 Übersicht über die angewandten hormonanalytischen Methoden

Parameter	Charakterisierung von	Substrat	Messmethode
LH	Immunisierungseffekt	Blutplasma Window	RIA
FSH	Immunisierungseffekt Feed back Mechanismen		
Testosteron	Immunisierungseffekt Einflüsse der $17\beta E_2$ - Infusion	Blutplasma Täglich Tubulusflüssigkeit	
Estradiol	Immunisierungseffekt Infusionsverlauf		
Cortisol	Katabole Veränderungen durch die Immunisierung		
Cortison	Inaktivierung von Cortisol		EIA
11 β -Hydroxysteroid- dehydrogenase	Inaktivierung/Aktivierung der Glucocorticoide	Hodengewebe	Radioenzym- Assay

Nachfolgend sind die Verfahren näher charakterisiert.

4.2.1 Radioimmunologische Bestimmungen

4.2.1.1 Proteohormone

Sowohl LH als auch FSH wurden in allen window-Proben des Hauptversuchs gemessen. In den windows des Ergänzungsversuchs sowie den bereitgestellten Proben von C. Metz wurden ausschließlich die FSH –Konzentrationen bestimmt.

Beide Proteohormone wurden in einem radioimmunologischen Direkttest mittels Doppelantikörpermethode bestimmt. Als Tracer wurde ^{125}J -markiertes pLH (AFP 11043B) bzw. pFSH (AFP 10640B) verwendet. Antiseren und Standards beider Proteohormone wurden von Dr. Parlow (NIDDK, Torrance, CA, USA) zur Verfügung

gestellt (pLH Standard AFP 11043B, pLH antiserum AFP 15103194; pFSH AFP 10640B, pFSH antiserum AFP 2062096).

Die radioaktive Markierung der beiden Proteohormone war nahezu identisch und wurde in Anlehnung an die bereits früher beschriebene Methode (Claus et al. 1990, Over 1992) durchgeführt.

Markierung

Bei der Markierung von Proteohormonen wird ein ^{125}J -Kation an der phenolischen Seitenkette der im Hormon vorhandenen Aminosäure Tyrosin eingeführt. Als Oxidationsmittel diente 1,3,4,6-tetrachloro-3 α , 6 α -diphenyl Glycouril (Jodogen) (Salacinsky et al. 1981, Claus et al. 1990), so dass die Struktur der Proteohormone weitestgehend geschont bleibt.

Die Qualität des markierten Hormons wurde mittels des TrichloressigsäureAnionenaustauscher-Talkum-Tests (Tower et al. 1980) überprüft. Dazu werden jeweils 10 μl Radioaktivität mit Anionenaustauscher, Talkum und Trichloressigsäure versetzt und anschließend zentrifugiert. Die Charakteristika sind in Tabelle 4.5 dargestellt.

Tabelle 4.5 Charakterisierung der Qualität der Markierungsprodukte

	Charakteristikum	Zeichen für gute Qualität der Markierung
Anionenaustauscher	Bindet freies Jod, d.h. im Pellet findet sich freies Jod, im Überstand an das Hormon gebundenes Jod	Niedrige Aktivität im Pellet
Talkum	Fällt große Proteine aus, d.h. im Pellet findet sich das an das Hormon gebundene Jod, im Überstand denaturierte Bruchstücke	Hohe Aktivität im Pellet
Trichloressigsäure	Fällt sowohl Bruchstücke als auch gebundenes Hormon aus	Hohe Aktivität im Pellet

Luteinisierendes Hormon (LH)

Das radioimmunologische Messverfahren für pLH erfolgte in Anlehnung an die schon beschriebene Methodik (Claus et al. 1990, Over 1992).

Das aus dem Kaninchen stammende Antiserum zeigt Kreuzreaktivitäten mit anderen Hypophysenhormonen wie in Tabelle 4.6 beschrieben.

Tabelle 4.6 Kreuzreaktivitäten des pLH Antiserums (Produktinformation Dr. Parlow, NIDDK)

Hormon (Kennzeichnung)	Kreuzreaktivität (%)
pLH (AFP 11043B)	100
pGH (AFP 10864B)	0,25
pPRL (AFP 9764 B)	0,066
pTSH (AFP 7957A)	0,033
pFSH (AFP 3197A)	0,002

Testablauf

Die Proben der „Intakten Eber“ wurden mit einem 2-Tagestest gemessen, die der „Immunisierten Eber“ und der „17 β E₂-infundierten, immunisierten Eber“ aufgrund der niedrigeren Konzentrationen mit einem 3-Tagestest.

Je nach den erwarteten LH-Konzentrationen wurden aus einer Stammlösung (200 ng pLH/100 μ l 3% RSA-Puffer) zwei verschiedene Eichkurven angesetzt:

Eichkurve 1: (zur Messung von LH-Konzentrationen wie sie bei intakten Ebern vorkommen) 0.0045-2.5 ng pLH / 100 μ l 3%RSA (0.045-25 ng/mL)

Eichkurve 2: (zur Messung geringer LH-Konzentrationen wie sie bei immunisierten Ebern vorkommen) 0.00225 – 1.25 ng pLH / 100 μ l 3%RSA (0.025-12.5 ng/mL).

Das Antiserum wurde mit einer Endverdünnung von 1:666 666 eingesetzt und zu allen Teströhrchen außer der Nicht-Spezifischen-Bindung hinzupipettiert.

Zur Messung des pLH in den Kontrollebern wurde anschließend radioaktiver Tracer zu allen Teströhrchen zugegeben und der Test 24 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Messung des pLH in den immunisierten sowie 17 β E₂-infundierten, immunisierten Ebern, wurden unbekannte Probe bzw. Eichpunkt und Antiserum zunächst über 24 Stunden bei Raumtemperatur vorinkubiert bevor der radioaktive Tracer in gleicher Verdünnung und mit gleichem Aliquot wie bei den intakten Ebern zugegeben wurde.

Nach 24-bzw. 48-stündiger Inkubation wurden zum Plasmaausgleich 100µl Basalplasma (Plasma eines gegen GnRH-immunisierten Ebers) zu der Eichkurve bzw. 100 µl RSA zu den Proben pipettiert. Anschließend wurde der Test wie von Over (1992) beschrieben mit 2. Antikörper, Normal Rabbit Serum (NRS) und Polyethylenglycol (PEG) fertiggestellt.

Testabsicherung

Die absolute Bindung, der NSB sowie die untere Nachweisgrenze der 2- und 3-Tagestests für pLH sind in Tabelle 4.7 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4.7 Absolute Bindung, NSB und untere Nachweisgrenze der pLH-Tests

	2-Tagestests	3-Tagestests
Absolute Bindung (%)	31,8	30,8
NSB (%)	3,04	2,9
Untere Nachweisgrenze (pg/mL)	45	25

Als Kontrollen zur Absicherung der Genauigkeit sowie der Wiederholbarkeit der Tests, wurden zu einem Plasmapool mit bekannt niedrigen Konzentration an pLH (immunisierte Eber, Basalplasma) Zusätze dotiert (K1-K3: Zusatz von 0,25; 0,5; 1 ng pLH/mL Plasma). Die Kontrollen wurden in allen Tests mitgeführt. Zusätzlich wurden in jedem Test als biologische Kontrollen Blutplasma einer Sau, eines Kastraten und eines Ebers mitgemessen. Daraus ergaben sich Interassayvarianzen wie sie in Tabelle 4.8 und Tabelle 4.9 für die 2- und die 3-Tagestests dargestellt sind.

Tabelle 4.8 Interassay-Varianzen für die LH-Messungen der 2-Tagestests (n= 7) mit kalter Wiederfindung (WAF)

	MW \pm S.D. (ng/mL)	CV (%)	Kalte WAF (%)
Basalplasma	0,17 \pm 0,02	17,2	-
Zusatz 0.25 ng/mL	0,3 \pm 0,02	5,7	120
Zusatz 0.5 ng/mL	0,44 \pm 0,03	6,1	88
Zusatz 1 ng/mL	1,08 \pm 0,07	6,44	108
Sauenplasma	0,38 \pm 0,06	16,04	-
Eberplasma	0,13 \pm 0,02	16,01	-
Kastratenplasma	0,42 \pm 0,05	12,1	-

Tabelle 4.9 Interassay-Varianzen für die LH-Messungen der 3-Tagestests (n= 7) mit kalter Wiederfindung (WAF)

	MW \pm S.D. (ng/mL)	CV (%)	Kalte WAF (%)
Basalplasma	0,06 \pm 0,01	21,5	-
Zusatz 0.25 ng/mL	0,16 \pm 0,02	12,16	64
Zusatz 0.5 ng/mL	0,31 \pm 0,007	2,4	62
Zusatz 1 ng/mL	0,78 \pm 0,14	18,16	78
Sauenplasma	0,14 \pm 0,02	12,46	-
Eberplasma	0,07 \pm 0,01	13,4	-
Kastratenplasma	0,38 \pm 0,02	7,26	-

Um Schwankungen innerhalb der Tests zu erfassen, wurden, unterschieden in 2- und 3-Tagestests, Intraassayvarianzen ermittelt. Diese ergaben in den 2-Tagestests für Konzentrationen von 0,1 \pm 0,003 ng/mL eine Varianz von 9,3 % (n=10), für Konzentrationen von 0,4 \pm 0,008 ng/mL eine Varianz von 6,7 %. In den 3-Tagestests lag die Intraassayvarianz bei Konzentrationen von 0,009 \pm 0,001 ng/mL bei 3,1 %. Für Konzentrationen von 0,4 \pm 0,008 ng/mL ergab sich für die 3-Tagestests eine Intraassayvarianz von 6,1%.

Follikel Stimulierendes Hormon (FSH)

Für die Bestimmung von pFSH im Blutplasma wurden von Dr. Parlow (NIDDK, Torrance, CA, USA) pFSH (AFP-10640B) als Standard für die Eichkurve sowie anti-pFSH (AFP-2062096) als Antiserum zur Verfügung gestellt. Der Testablauf erfolgte in Anlehnung an die Methode für LH (Claus et al. 1990, Over 1992). Die in Tabelle 4.10 aufgeführten Kreuzreaktivitäten mit anderen Hormonen verdeutlichen die hohe Spezifität dieses Antiserums.

Tabelle 4.10 Kreuzreaktivitäten des pFSH Antiserums (Produktinformation Dr. Parlow, NIDDK)

Hormon (Kennzeichnung)	Kreuzreaktivität (%)
pFSH (AFP 11043B)	100
pTSH (AFP 7957A)	6,4
pGH (AFP 10864B)	0,04
pPRL (AFP 9764 B)	0,016
pLH (AFP 3197A)	0,0013

Testablauf

Aus einer Stammlösung (200 ng pFSH / 100µl 3% RSA) wurde eine Eichkurve im Bereich zwischen 0,0097 – 5 ng pFSH / 100 µl 3% RSA (0,097-50 ng / mL) angesetzt.

Das Antiserum kam nach Durchführung einer Bindungskapazität (Tabelle 4.11) mit einer Verdünnung von 1: 200 000 zum Einsatz, so dass die angestrebte Bindung von etwa 30% erreicht wurde.

Tabelle 4.11 Bindungskapazität zur Ermittlung der Testverdünnung des Antiserums gegen pFSH

Verdünnung	% Bindung
1 : 50000	72
1 : 100000	54
1 : 150000	39,7
1 : 200000	34
1: 300000	25,5

Das Antiserum wurde zu Eichpunkten und Proben pipettiert. Zu allen Teströhrchen wurden ca. 15000 cpm des radioaktiven Tracers zugeben. Alle Röhrchen wurden 24 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach diesen 24 h Inkubationszeit wurde der Test genauso wie für LH beschrieben fertig gestellt.

Testabsicherung

Die absolute Bindung der FSH-Tests lag im Durchschnitt bei 25,4% bei einem NSB von 2,8 %.

Die untere Nachweisgrenze der pFSH-Tests lag bei 97 pg pFSH/mL Plasma.

Als Kontrollen zur Absicherung der Genauigkeit sowie der Wiederholbarkeit der Tests, wurden zu einem Plasmapool (GnRH-immunisierte Eber) Zusätze dotiert (K1-K3: Zusatz von 1,25; 2,5; 5 ng pFSH/mL Blutplasma). Die Kontrollen wurden in allen Tests mitgeführt. Zusätzlich wurden in jedem Test als biologische Kontrollen eine Sau (Lila), ein Eber (Big) sowie ein Kastrat und ein Estradiol-infundierter Kastrat mitgemessen.

Hieraus ergaben sich Interassayvarianzen wie sie in Tabelle 4.12 dargestellt sind.

Tabelle 4.12 Interassay-Varianzen für die pFSH-Messungen (n= 28) mit kalter Wiederfindung (WAF)

	MW \pm S.D. (ng/mL)	CV (%)	Kalte WAF (%)
Basalplasma	0,39 \pm 0,09	25,3	-
Zusatz 1.25 ng/mL	1,46 \pm 0,2	15,7	116,8
Zusatz 2.5 ng/mL	2,42 \pm 0,3	14,02	96,8
Zusatz 5 ng/mL	4,16 \pm 0,9	23,9	83,2
Sauenplasma	0,89 \pm 0,1	12,4	-
Eberplasma	0,49 \pm 0,1	23,01	-
Kastratenplasma	2,01 \pm 0,2	12,68	-
Kastrat + Estradiol	1,2 \pm 0,2	19,23	-

Schwankungen innerhalb der Tests wurden anhand der Intraassayvarianzen erfasst. Diese ergab für eine Konzentration von 0,67 \pm 0,08 ng/mL eine Varianz von 11,8 %.

4.2.1.2 Steroidhormone

Die radioimmunologische Bestimmung von 17β Estradiol, Estron, Testosteron und Cortisol erfolgte in den täglich um 8:00 gezogenen Blutproben des Hauptversuchs sowie in der am Ende des Versuches gewonnenen Tubulusflüssigkeit.

Als Tracer dienten mit Tritium (^3H) markierte, kommerziell erhältliche Hormone. Um die Hormone im Blutplasma anzureichern und störende Plasmabestandteile zu entfernen, wurde allen vier Radioimmuntests eine Extraktion vorgeschaltet. Als Extraktionsmittel kam destillierter tertiärer Butyl-Methyl-Ether (TBM) (Merck) zum Einsatz. Dieses apolare Extraktionsmittel nimmt während einer 30-minütigen Schütteldauer auf einem Horizontalschüttler die lipophilen Hormone auf. Nach Einfrieren des Plasmas, kann das hormonhaltige Extraktionsmittel dann in Reagenzgläser abgekippt und im Vakuumzentrifugalverdampfer (Thermo Electron GmbH, Dreieich, Deutschland) niedertrocknet werden. Das im Reagenzglas verbliebene Hormon wurde in 100 μl Phosphatpuffer aufgenommen und so wieder in die wässrige Phase überführt.

Die jeweils extrahierten Plasma- bzw. Tubulusflüssigkeitsvolumina für die einzelnen Hormone sind in Tabelle 4.13 aufgeführt.

Tabelle 4.13 Verwendete Probenvolumina zur Extraktion der gemessenen Steroidhormone

		17βEstradiol	Testosteron	Cortisol
		(μl)	(μl)	(μl)
Blutplasma	Eber	250	10	10
	Immunisiert Infundiert	250	100	
Tubulusflüssigkeit	Eber	10	5	
	Immunisiert Infundiert	100	10	

Die Verluste an Hormon während der Extraktion wurden durch die Bestimmung der Wiederfindung ermittelt. Dazu wird der Probe vor der Extraktion eine definierte Menge ^3H -Steroid zugesetzt und die verbliebene Menge nach der Extraktion in einem Aliquot bestimmt. Um Verunreinigungen des Extraktionsmittels oder der zur

Extraktion verwendeten Utensilien auszuschließen, wurde ein „Leerwert“ (nur das jeweilig niedergetrocknete Extraktionsmittel) mitgeführt.

Es folgte der eigentliche Radioimmuntest mit der Inkubation der jeweils hormonspezifischen Antiseren und des hormonspezifischen Tracers mit dem extrahierten Blutplasma bzw. der Tubulusflüssigkeit für 20 Minuten im 37°C warmen Wasserbad. Neben den unbekanntem Blutplasma- bzw. Tubulusflüssigkeitsproben wurde eine nicht extrahierte, in RSA-Puffer angesetzte Eichkurve (außer bei 17 β Estradiol: hier wird eine in Plasma angesetzte Eichkurve verwendet, die extrahiert wurde) sowie Kontrollen zur Qualitätsabsicherung, eine Gesamtaktivität (GA, 100 μ l Tracer), ein NSB (nicht spezifische Bindung, enthält keinen Antikörper) sowie ein Blank-Wert (enthält weder Antikörper noch Tracer) mitgeführt. Nach den 20 Minuten Inkubationszeit hat sich ein Gleichgewicht zwischen unmarkiertem (kaltem) und markiertem (heißem) Hormon an den Antikörperbindungsstellen eingestellt. Durch einstündiges Abstoppen der Reaktion im Eisbad (0°C) wird dieses Gleichgewicht stabilisiert, indem die Dissoziation des kalten und heißen Hormons vom Antikörper durch die niedrige Temperatur reduziert wird.

Die Bound-Free-Trennung der nicht gebundenen kalten und heißen Hormone vom Antikörper erfolgt mit Hilfe einer Kohlesuspension und anschließender Zentrifugation (3000 U/min, 20 min). Das freie Hormon bindet adsorptiv an die Kohle, so dass der nach dem Zentrifugieren verbleibende Überstand ausschließlich gebundenes Hormon enthält. Dieser Überstand wird in mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Lumasafe Plus, Fa. Lumac LSC B.V., NL) gefüllte Gefäße überführt und die Radioaktivität in counts per minute (cpm) im Flüssigkeitsszintillationszähler (Beckmann Instruments, Inc., Fullerton, USA) bestimmt (Zählzeit 2 min).

Die Testkriterien für die einzelnen Steroidhormone sind in Tabelle 4.14 zusammengefasst.

Tabelle 4.14a Testparameter der Steroidhormone: 17-Estradiol

17-Estradiol		
Eichkurve	Messbereich (pg/ml)	10-1000 pg/ml
Antikörper	Antigen	E2-6-CMO-RSA ¹
	Verdünnung	1:56000
Radioaktivität		
	Spezif. Aktivität (TBq/mmol) ¹²⁵ J-Hormon/Testansatz	3,66 9,2 pg

¹ = Estradiol-6-Carboxymethyloxim-Rinderserumalbumin

Tabelle 4.14b Testparameter der Steroidhormone: Testosteron und Cortisol

		Testosteron	Cortisol
Eichkurve	Messbereich (pg/ml)	50-10000 pg/ml	100-10000 pg/ml
Antikörper	Antigen	T-3-CMO-RSA ²	Cortisol-21-HS-RSA ³
	Verdünnung	1:70000	1:30000
Radioaktivität			
	Spezif. Aktivität (TBq/mmol) ¹²⁵ J-Hormon/Testansatz	3,55 16,43 pg	2,33 30,75 pg

² = Testosteron-3-Carboxymethyloxim-Rinderserumalbumin

³ = Cortisol-21-Hemisuccinat-Rinderserumalbumin

Die Kreuzreaktivitäten der Antiseren sind in Tabelle 4.15 verdeutlicht.

Tabelle 4.15 Kreuzreaktivitäten der hormonspezifischen Antiseren

	Kreuzreaktivität (%)
T-3-CMO-RSA	5 α -DHT (30)
	Dehydroepitestosteron (0,46)
	Androstenon (0,06)
	17 β Estradiol (0,05)
E2-6-CMO-RSA	17 α -Estradiol (0,4)
	Estron (0,43)
Cortisol-11-HS-RSA	Cortison (18,26)
	Corticosteron (11,8)
	Deoxycorticosteron (9,0)
	Progesteron (4,5)

Die Qualität der Testsysteme wurde anhand von Kontrollen mit bestimmten Hormonzusätzen sichergestellt. Zum Ansetzen dieser Kontrollen wird sogenanntes „gestripptes“ Plasma verwendet. Dabei handelt es sich um Kastratenplasma aus dem mittels Kohle die noch enthaltenen Steroidhormone entfernt wurden. Diesem Plasma werden verschiedene Mengen an kaltem Hormon zugesetzt, die so erhaltenen Kontrollen in jedem Test mitgemessen und so die Interassayvarianz ermittelt. Die kalte Wiederfindung ergibt sich, indem die gemessene Konzentration unter Abzug des Basalwertes in Bezug zu der zudotierten Konzentration gesetzt wurde. Für alle Hormone wurden zusätzlich Intraassayvarianzen anhand einer in einem Test mehrfach gemessenen Probe bestimmt.

17 β Estradiol

Die Bestimmung von 17 β Estradiol in den täglichen Blutplasmaproben sowie in der Tubulusflüssigkeit erfolgte nach der Methode von Claus et al. (1983). Um die niedrigen Estradiol-Konzentrationen der immunisierten Eber messen zu können, wurde der Tracer in sehr geringen Mengen zugegeben (GA: ca. 2800 cpm/100 μ l), um die Empfindlichkeit des Testsystems zu verbessern.

Zusätzlich wurde statt einer in Phosphatpuffer angesetzten Eichkurve eine in Plasma angesetzte Eichkurve verwendet.

Die Plasmaeichkurve bestand aus Kastratenplasma, welchem die jeweiligen Konzentrationen der Eichkurve zudotiert waren.

Die in dem Messverfahren mitgeführten Kontrollen wurden den zu erwartenden Konzentrationen in den biologischen Proben angepasst. So wurden zur Messung der immunisierten Tiere Kontrollen im Bereich von 20-100 pg/ml mitgeführt, zur Bestimmung der Estradiol-Konzentrationen von Ebern und infundierten Tieren kamen Kontrollen im Bereich von 100-1000 pg/ml zum Einsatz.

Qualitätskriterien

Absolute Bindung, NSB, Leerwert, Extraktionsausbeute, untere Nachweisgrenze und Intraassay-Varianz der Estradiol-Messungen in Blutplasma und Tubulusflüssigkeit sind in Tabelle 4.16 aufgeführt.

Tabelle 4.16 Qualitätsparameter der 17β Estradiol-Messungen in Blutplasma und Tubulusflüssigkeit

Absolute Bindung, GA ~2800 cpm (%)	36
NSB(%)	3
Untere Nachweisgrenze (pg/ml)	12
Leerwert der Extraktion (%)	-
Extraktionsausbeute (%)	94
Intraassay % ($47 \pm 0,25$ pg/ml)	16.8
Intraassay % ($82 \pm 0,38$ pg/ml)	14.6

Die Interassay-Varianzen sind in Tabelle 4.17 dargestellt.

Tabelle 4.17 Interassay-Varianzen und kalte Wiederfindung der 17 β Estradiol-Messungen in Blutplasma und Tubulusflüssigkeit

	MW \pm S.D. (pg/ml)	CV (%)	Kalte WAF (%)
Basalplasma (n=25)	8,04 \pm 3,9	49,3	-
Zusatz von 20 pg/ml (n=9)	29,7 \pm 2,0	7,6	148,5
Zusatz von 50 pg/ml (n=9)	61,2 \pm 3,4	5,6	122,4
Zusatz von 100 pg/ml (n=25)	131,0 \pm 5,4	4,2	131,0
Zusatz von 200 pg/ml (n=16)	235,3 \pm 7,0	3,0	117,6
Zusatz von 500 pg/ml (n=16)	560,2 \pm 10,8	2,0	112,4
Zusatz von 1000 pg/ml (n=16)	1129,4 \pm 25,4	2,1	112,9

Testosteron

Die Testosteronkonzentrationen wurden in den Blutplasmaproben (3 Proben je Versuchswoche je Tier) von allen Tieren sowie zusätzlich in der Tubulusflüssigkeit der Eber und immunisierten Tiere gemessen. Der Test erfolgte in Anlehnung an Bubenik et al. (1982).

Die dotierten Kontrollen für die Testosteronmessung lagen zwischen 0,1 und 5 ng/ml, wobei die 5 ng/ml-Kontrolle nur bei der Messung der Eber mitgeführt wurden. Aufgrund unterschiedlicher Plasmakonzentrationsbereiche, wurden bei Ebern 10 μ l Blutplasma, bei immunisierten und Estradiol-infundierten Ebern 100 μ l extrahiert. Für die Messung der hohen Testosteronkonzentrationen in der Tubulusflüssigkeit von Ebern, wurden nur 5 μ l Tubulusflüssigkeit extrahiert, während bei immunisierten und Estradiol-infundierten Ebern 100 μ l extrahiert wurden.

Qualitätskriterien

Die absolute Bindung, NSB, Untere Nachweisgrenze, Leerwert, Extraktionsausbeute und Intraassayvarianz für die Testosteronmessungen sind in Tabelle 4.18 dargestellt.

Tabelle 4.18 Qualitätsparameter der Testosteronmessungen

Absolute Bindung, GA ~7800 cpm (%)	45
NSB(%)	3
Untere Nachweisgrenze (pg/ml)	50
Leerwert der Extraktion (%)	keiner
Extraktionsausbeute, 10, 100µl (%)	87
Intraassay % (2,1 ± 0,02 ng/ml)	8,2
Intraassay % (0,2 ± 0,01 pg/ml)	11,8

Die Interassayvarianzen und die kalte Wiederfindung sind in Tabelle 4.19 dargestellt.

Tabelle 4.19 Interassayvarianz und kalte Wiederfindung der Kontrollen bei der Testosteronmessung

	MW ± S.D. (ng/ml)	CV (%)	Kalte WAF (%)
Basalplasma (n=10)	0,02 ± 0,01	58,3	-
Zusatz von 0.1 ng/ml (n=10)	0,14 ± 0,01	5,6	140,0
Zusatz von 0.5 ng/ml (n=10)	0,47 ± 0,01	2,9	94,0
Zusatz von 5 ng/ml (n=6)	5,03 ± 0,2	3,9	100,6

Cortisol

Cortisol wurde radioimmunologisch in den Blutplasmaproben der letzten zwei Tage vor Versuchsende sowie in den Proben der Tubulusflüssigkeit bei allen Tieren gemessen. Die Methode erfolgte nach Janning (1993) und Claus & Weiler (1996).

Die dotierten Kontrollen für die Cortisolbestimmung lagen zwischen 10 und 75 ng/ml. Bei der Herstellung der Kontrollen wurde zum Strippen des Plasmas zusätzlich Eisessig zugesetzt, um die Trennung des Cortisols von seinem Bindungsprotein Transcortin herbeizuführen.

Qualitätskriterien

Die Qualitätskriterien für die Cortisolbestimmung sind in Tabelle 4.20 verdeutlicht.

Tabelle 4.20 Qualitätsparameter für die Cortisolbestimmung

Absolute Bindung, GA~7500cpm (%)	35
NSB(%)	2,4
Untere Nachweisgrenze (pg/ml)	100
Leerwert der Extraktion (%)	keiner
Extraktionsausbeute (%)	87
Intraassay % (32,9 ng/ml)	5,03

Die Interassayvarianzen lagen zwischen 10,31 und 11,92% zwischen den dotierten Kontrollen. Die kalte Wiederfindung belief sich damit auf 99,9-101,7%.

17 β Estradiol in Hodengewebe

Um das Anfluten des infundierten Estradiols im Hoden zu erfassen, wurden die Estradiolkonzentrationen außer in Blutplasma und Tubulusflüssigkeit zusätzlich im Hodengewebe radioimmunologisch bestimmt. Die Bestimmung erfolgte in Anlehnung an Claus et al. (1989) in Hodengewebe der Eber, immunisierten und 17 β E₂-infundierten, immunisierten Eber.

Dazu wurden je Tier in allen drei Gruppen 0,4 g Hodengewebe aufgearbeitet. Die Aufarbeitung umfasst die in Abbildung 4.3 dargestellten Schritte.

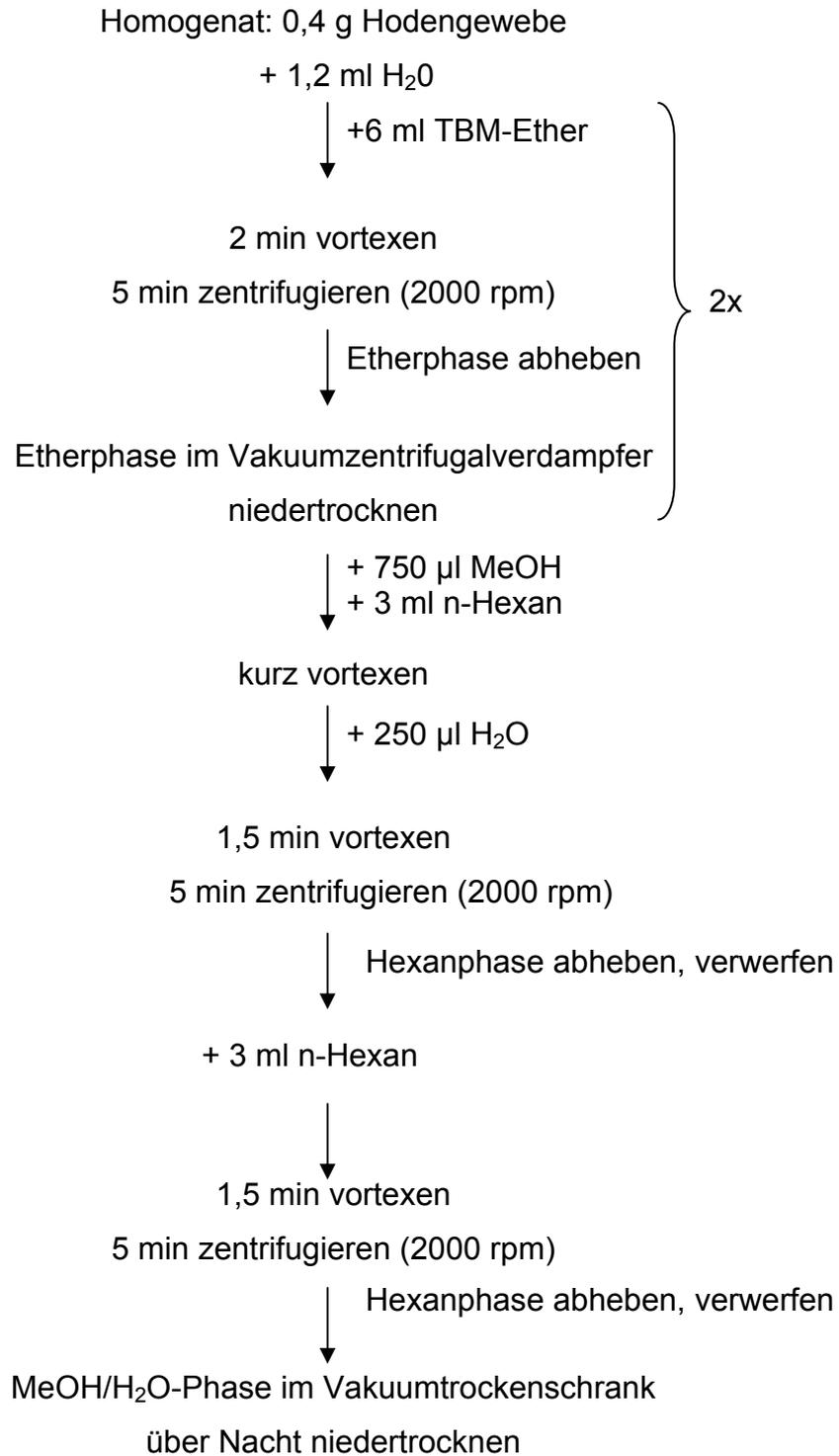


Abbildung 4.3 Aufarbeitung der Hodengewebsproben für die Bestimmung von 17 β Estradiol

Über 2-malige Extraktion mit TBM-Ether wurde das Estradiol aus dem Gewebe in die Etherphase überführt. Über die Verteilung in MeOH/Wasser und Hexan wurde das Fett aus der niedergetrockneten Etherphase entfernt, das Estradiol verblieb in der MeOH/H₂O Phase, die niedergetrocknet wurde.

Der Rückstand wurde am folgenden Tag je nach erwarteten Estradiolkonzentrationen in verschiedenen Mengen Methanol aufgenommen, um im folgenden RIA den empfindlichen Bereich der Eichkurve zu nutzen.

Tabelle 4.21 gibt die Aufnahmevolumina für die drei Gruppen an.

Tabelle 4.21 Aufnahmevolumina an MeOH sowie für den RIA verwendete Aliquots für Eber, immunisierte und 17 β E₂-infundierte, immunisierte Eber.

	Eber	Immunisierte Eber	17 β E ₂ -infundierte, immunisierte Eber
MeOH (ml)	5	1	5
Aliquot (μ l)	50	100	1000

Analog zu den Plasma- und Tubulusflüssigkeitsproben wurde mit den Hodengewebeproben im Folgenden der Radioimmuntest durchgeführt.

Qualitätskriterien

GA, NSB, untere Nachweisgrenze, Leerwert, Extraktionsausbeute und Intraassay für die 17 β Estradiolmessung im Hodengewebe sind in Tabelle 4.22 dargestellt.

Tabelle 4.22 Qualitätsparameter für die 17 β Estradiolmessungen in Hodengewebe

Absolute Bindung, GA ~7300 cpm (%)	30
NSB(%)	3
Untere Nachweisgrenze (pg/ml)	250
Leerwert der Extraktion (%)	keiner
Extraktionsausbeute	87
Intraassay immunisierter Eber (%)	23

Zur Qualitätskontrolle wurden weiterhin in jedem Test dotierte und physiologische Kontrollen mitgeführt. Nachfolgend sind deren Interassayvarianzen und kalte Wiederfindung aufgeführt (Tabelle 4.23).

Tabelle 4.23 Interassayvarianz und kalte Wiederfindung der Kontrollen im Rahmen der 17 β Estradiolmessung in Hodengewebe

	MW \pm S.D. (ng/ml)	CV (%)	Kalte WAF (%)
Immunisierter Eber (n=3)	1,11 \pm 0,07	10,6	-
Zusatz von 1 ng/ml (n=3)	3,04 \pm 0,14	7,9	193,0
Eber Ramses (n= 3)	5,87 \pm 1,19	35	-

4.3 Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Cortison

Da für Cortison kein kommerziell erhältlicher ^3H -Tracer zur Verfügung steht, wurde ein Enzymimmunotest zur Messung von Cortison im Blutplasma eingesetzt. Es wurden die täglichen Proben der letzten zwei Tage von allen Tieren des Hauptversuchs gemessen.

Als Tracer diente mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppeltes Cortison (Cortison-11-Hemisuccinat-HRP).

Die Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit 21-Hemisuccinat-Cortison-RSA erzeugt.

Ebenso wie bei den radioimmunologisch bestimmten Steroidhormonen, ist dem Enzymimmunoassay eine Extraktion vorgeschaltet, um das Hormon anzureichern und störende Plasmabestandteile zu entfernen. Die Extraktion verlief wie in Kapitel 2.3.2. beschrieben. Das niedergetrocknete Cortison wurde allerdings nicht in 100 μl Phosphatpuffer aufgenommen, sondern in 300 μl PBS-Puffer. Die Extraktionsausbeute (WAF) wurde radioimmunologisch bestimmt. Das extrahierte Plasmavolumen für den Cortison-EIA wurde so eingestellt, dass die Proben in einer Größenordnung von 0,04 ng/100 μl im Testansatz lagen. Dies war notwendig, um in den sensitiven Bereich der Eichkurve zu gelangen und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

Um eine optimale Extinktion im Bereich von etwa 1 zu bekommen, wurde mit Antiserum und Enzymkonjugat eine Tracertitration durchgeführt. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.24 verdeutlicht.

Tabelle 4.24 Extinktionen der Tracertitration zur Bestimmung der optimalen Kombination von Cortison-Antikörper und Cortison-HRP

Antikörper-Verdünnung	Enzymkonjugatverdünnung (ng/well)		
	0,25	0,5	1,0
1:1000	1,24	>1,3	> 1,3
1:2000	1,12		
1:4000	<u>0,93</u>		
1:8000	<0,9	0,96	
1:16000		< 0,9	1,15

Als Testkombination erwiesen sich 0,25 ng/well Cortison-HRP und ein 1:4000 verdünnter Cortison-Antikörper als optimal und wurden als Testverdünnungen eingesetzt.

Mikrotiterplatten wurden über 24 h bei 4°C mit Antikörper (anti Cortison-21Hemisuccinat-RSA) in PBS-Puffer beschichtet. Vier Kavitäten (wells) (Leerwert, Nicht-Spezifische Bindung) wurden freigelassen. Nach 24 h wurde die Antikörperlösung abgekippt und die Platten gewaschen. Jeweils 100µl der Eichpunkte, der dotierten Kontrollen sowie der extrahierten Proben wurden auf die Platte pipettiert und zusammen mit dem Tracer (20µl) über 75 min bei 37°C inkubiert. Ein Leerwert und eine Nicht-Spezifische Bindung wurden in jedem Test mitgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Platten abgekippt und gewaschen (Bound-Free-Trennung). Die Substratlösung (150µl H₂O₂-TMB-Gemisch) wurde aufgetragen und über 40 min im Dunkeln inkubiert. Mit 50µl 2M H₂SO₄ wurde die Reaktion abgestoppt und die Platten bei 450 nm (Referenzfilter: 690 nm) im Mikrotiterplatten-Reader (BIO-TEK Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) photometrisch gemessen. Die Testkriterien für den Cortison-EIA sind in Tabelle 4.25 dargestellt.

Tabelle 4.25 Testparameter für Cortison

Cortison		
Eichkurve	Messbereich (pg/ml)	50-10000
Antikörper*	Antigen	Cortison-21-HS-RSA
	Verdünnung	1:4000
	Kreuzreaktivitäten (%)	Cortisol (1,9)
		Corticosteron (0,2)
Deoxycorticosteron (7,9)		
Enzymkonjugat		
	Cortison-HRP/Testansatz	250 pg

* = Cortison-21-Hemisuccinat-Rinderserumalbumin

Qualitätskriterien

Das Ansetzen der dotierten Kontrollen erfolgte wie für Cortisol beschrieben. Die dotierten Zusätze lagen zwischen 1 und 7,5 ng/ml. Ein Extraktionsleerwert wurde in keinem der Tests festgestellt. Die Extraktionsausbeute lag im Durchschnitt bei 85%. Die untere Nachweisgrenze belief sich auf 50 pg/ml. Die Intraassayvarianz lag für Proben im Bereich $7,5 \pm 0,1$ ng/ml bei 10,9%.

Da alle Proben in einem Test gemessen wurden, gab es keine Interassayvarianz. Die kalte Wiederfindung der Kontrollen ist in Tabelle 4.26 dargestellt.

Tabelle 4.26 Kalte Wiederfindung der Kontrollen beim Cortison-EIA

	ng/ml	Kalte WAF (%)
Basalplasma	0,046	-
Zusatz von 5 ng/ml	5,08	101,6
Zusatz von 7.5 ng/ml	9	120,0

Zur Absicherung der im EIA gemessenen Cortisonkonzentrationen wurde ein Vergleich mit dem Cortison-RIA vorgenommen, indem dieselben Proben mit beiden Systemen gemessen und eine Korrelation errechnet wurde. Die Korrelation zwischen EIA und RIA lag bei 89%.

4.4 Radioenzymassay zur Bestimmung der 11 β -HSD-Aktivität

Die oxidative und reduktive 11 β -HSD-Aktivität wurde in Anlehnung an Claus et al. (2001), verändert nach Mazzochi et al. (1998) und Steward & Mason (1995) radioenzymatisch bestimmt. Das Prinzip beruht auf folgenden Schritten:

- Homogenisierung und Zentrifugation (800 g, 20min bei 4°C) von 0,5 g bei –80 °C gelagertem Hodengewebe.
- Aliquotierung des Gewebeüberstandes für Proteinbestimmung (Bradford 1976) oder Enzymaktivitätsmessung.

Zur Enzymaktivitätsbestimmung wurde der Überstand in Tris-Puffer inkubiert. Tabelle 4.27 zeigt eine Übersicht über die Inkubationsbedingungen zur Bestimmung der oxidativen und reduktiven 11 β -HSD-Aktivität.

Tabelle 4.27 Inkubationsbedingungen zur Bestimmung der 11 β -HSD-Aktivität.

	Cofaktor	Radioaktivität	Hormon
Oxidative Aktivität	NAD ⁺	³ H-Cortisol (1,222 pmol)	Cortisol (0,135 nmol)
Reduktive Aktivität	NADP ⁺	³ H-Cortison (1,222 pmol)	Cortison (0,135 nmol)

Die Inkubation erfolgte über 30 min bei 37°C und wurde bei 95°C im Wasserbad abgestoppt (2min; Enzym wird denaturiert).

Da radioaktives Cortison nicht kommerziell erhältlich ist, wurde es aus tritiiertem Cortisol (spezifische Aktivität: 82 Ci/mmol) in Anlehnung an Claus et al. (2001) selbst hergestellt. Diese Herstellung beruht auf der enzymatischen oxidativen Umsetzung des Cortisols in der Niere zu inaktivem Cortison durch die 11 β HSD2. Nach Homogenisierung und Zentrifugation von Nierengewebe, wurden 4,29 μ Ci ³H-Cortisol in 10 μ l des verbleibenden Überstands für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion bei 95°C (2min), wurden 2 ml Dichlormethan zugegeben,

diese nach 20 min Schütteln abpipettiert und niedergetrocknet. Der Rückstand wurde in 200 µl Dichlormethan aufgenommen und der gesamte Ansatz auf eine Kieselgelplatte (Silica gel 60 F₂₅₄; Merck 89081, Ulm, Deutschland) transferiert. Nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung im System Chloroform:Aceton (70:30), wurde das radioaktive Cortison mittels eines TLC-linear-Analyzers (Tracemaster 20, Berthold, Wildbad, Deutschland) lokalisiert, der relevante Bereich der Platte in ein Reagenzglas abgekratzt und wiederum mit 2 ml Dichlormethan versetzt. Der Ansatz wurde bei 3000 rpm für 20 min zentrifugiert. Die Dichlormethanphase wurde in ein Reagenzglas abpipettiert. Das verbleibende Kieselgel wurde dreimal mit 1,5 ml MeOH gespült, und das MeOH jeweils zur Dichlormethanphase hinzugefügt. Die Dichlormethan/Methanolphase wurde niedergetrocknet und mit 500 µl NADPH-Puffer versetzt.

50 µl (ca. 75000 cpm) wurden für eine Enzymbestimmung eingesetzt.

Aufgrund der bekannten Instabilität des NADPH in Gewebe-Homogenaten, wurde bei der Bestimmung der reduktiven Aktivität ein NADPH-regenerierendes System eingesetzt (Agarwal et al. 1990, Diederich et al. 1997). Hierzu wurden dem Inkubationsansatz 0,01 mol / L Glucose-6-Phosphat-Mononatrium-Salz (G6P) und 10 Einheiten Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO) zugesetzt, um die Regeneration des NADPH zu ermöglichen.

Der Inkubationsansatz wurde nach dem Abstoppen mit 2 ml Dichlormethan versetzt und 20 min geschüttelt. Anschließend wurde der Überstand in ein Reagenzglas überführt und niedergetrocknet. Nach erneuter Zugabe von 200µl Dichlormethan erfolgte der Auftrag auf eine Kieselgelplatte (Silica gel 60 F₂₅₄; Merck 89081, Ulm, Deutschland) zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung von Cortisol und Cortison in dem System Chloroform:Aceton (70:30).

Die Radioaktivität wurde nach anschließendem Auskratzen der jeweiligen Bereiche auf den Kieselgelplatten in Szintillationsflüssigkeit überführt und die Aktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

Die Berechnung der Enzymaktivität aus der gemessenen Radioaktivität erfolgte anhand des Molekulargewichtes des Hormons, der spezifischen Aktivität von ³H-Cortisol bzw. ³H-Cortison sowie der Menge des kalten Hormons im Ansatz unter Berücksichtigung des jeweiligen Proteingehaltes der Proben. Daraus ergibt sich als Einheit der oxidativen bzw. reduktiven 11β-HSD-Aktivität: pmol/min/mg Protein, d.h.

die Menge an Cortisol bzw. Cortison die in einer Minute pro einem mg Protein zu Cortison bzw. Cortisol umgesetzt wird.

Qualitätskriterien

Die dargestellten Testbedingungen sind so gewählt, dass sie sich im linearen Bereich zwischen Proteinkonzentration und Enzymaktivität befinden.

Durch Erhitzung (100°C, 5 min) denaturiertes Nierengewebe (bekannt für hohe oxidative Enzymaktivität) wurde bei der Bestimmung der oxidativen Aktivität als Negativkontrolle mitgeführt. Zusätzlich wurde unbehandeltes Nierengewebe als Positivkontrolle eingesetzt. Sowohl durch Erhitzung inaktiviertes als auch intaktes Lebergewebe (bekannt für hohe reduktive Enzymaktivität) dienten als Negativ- und Positivkontrolle bei der Bestimmung der reduktiven 11 β -HSD-Aktivität.

Die Interassayvarianz in den Nierenhomogenaten betrug 9,9% (n=10), die Intraassayvariation 9,4% (n=5).

4.5 Histologische Bestimmungen

Die nach dem Einschläfern entnommenen Hodengewebeproben wurden histologisch zunächst auf verschiedene morphologische Charakteristika hin untersucht. Dazu wurden die in Formaldehyd bzw. Bouin fixierten Proben zunächst in Anlehnung an Romeis (1989) in Paraffin eingebettet. In einem vorangehenden Schritt mussten die Proben dabei zunächst entwässert werden. Tabelle 4.28 zeigt die einzelnen Schritte der Entwässerung und der anschließenden Einbettung in flüssiges Paraffin.

Tabelle 4.28 Entwässerung der Bouin- und Formaldehyd - fixierten Hodengewebeproben und Einbettung in Paraffin

Medium	Dauer	
70% Ethanol	24h	
96% Ethanol	12h	
100% Ethanol	2-3h	} Dazwischen Wechsel
100% Ethanol	2-3h	
100% Ethanol	2-3h	
Xylol	1h	
Paraffin	8h	} Dazwischen Wechsel
Paraffin	1h	
Paraffin	1h	

Die in dem flüssigen Paraffin liegenden Gewebeproben wurden 24 h bei 4°C ausgekühlt. Anschließend wurden am Schlittenmikrotom (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Deutschland) 4 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Objektträger aufgezogen.

Zur Darstellung der Hodenkompartimente wurden die Bouin-fixierten Gewebeschnitte mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung) nach Romeis (1989) angefärbt, so dass Zellkerne dunkel (Hämatoxylin), cytoplasmatische Bestandteile dagegen hellrot (Eosin) angefärbt waren. Die Anfärbung erfolgte nach vorheriger Entparaffinierung in Chloroform und die Hydrogenierung mittels der absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70% Ethanol, aqua bidest, jeweils 5 min). Zuerst wurden die Gewebeschnitte in einer Hämatoxylinlösung (Merck, Darmstadt) blau angefärbt, bevor sie in einer 0.2%igen Eosinlösung (Merck, Darmstadt) (+Essigsäure) die rote Anfärbung erhielten. Anschließend wurden die so angefärbten Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe und in Xylol entwässert, um dann mit Depex (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) eingedeckt und getrocknet zu werden.

Die so präparierten Schnitte wurden zur Auswertung morphologischer Gewebeparameter herangezogen (Tabelle 4.29). Ein Teil dieser Parameter wurde mikroskopisch (Leitz DM RBE; Leica Mikrosysteme GmbH, Bensheim, Deutschland) bei verschiedenen Vergrößerungen erfasst, der jeweilige Gewebeausschnitt über eine Kamera (Color Vision Camera Modul 3 CCD, Sony, Japan) auf einen Rechner

übertragen, ausgedruckt (HP DeskJet 695C) und planimetrisch (OTT-Planimeter, A.OTT, Kempten, Bayern) ausgewertet. Die verbleibenden Parameter konnten rechnerisch aus den planimetrisch bestimmten Kriterien ermittelt werden.

Tabelle 4.29 Morphologische Kriterien zur Charakterisierung des Hodengewebes (LZ = Leydigzell-)

Parameter	Vergrößerung	Berechnung
Hodendichte		Hodengewicht / Hodenvolumen
%tualer Anteil Interstitium	50	Planimetrierte Tubulusfläche/ Gesamtfläche
%tualer Anteil Tubuli		100% - % Tubuli
Interstitiumvolumen (IV) (cm ³)		Hodenvolumen * % Interstitium
Nicht-LZ-Interstitium (µm ³)		Interstitiumsvolumen – LZvolumen/Hoden
Parameter der Tubuli		
Tubulusradius (µm)	200	
Lumenradius (µm)		
Keimepithelhöhe (µm)		Tubulusradius- Lumenradius
% Keimepithel je Tubulus		Keimepithelfläche/Tubulusfläche * 100
Tubulusgewicht (g)		Hodengewicht * % Tubuli
Keimepithelgewicht (g)		% Keimepithel je Tubulus * Tubulusgewicht
Tubuluslänge (km)		Tubulusvolumen / mittlere Tubulufläche
Parameter des Interstitiums		
Leydigzell(LZ)		
- kernvolumen (µm ³)	400	
- plasmavolumen(µm ³)		Lzvolumen – Lzkernvolumen
- volumen/Hoden(µm ³)		IV*((LZzahl*LZfläche*Schnittdicke)/0.004m ³) *100
- kerngewicht (g)		Hodendichte * Lzkernvolumen je Hoden
- plasmagewicht (g)		Hodendichte * Lzplasmavolumen je Hoden
LZzahl je Hoden		Lzvolumen/Hoden / mittleres Volumen einer LZ

Zur Bestimmung der relativen Anteile der Tubuli und des Interstitiums sowie deren Radien und Flächen wurden 5 in etwa gleich große Flächen planimetrisch ausgewertet.

Die mittlere Leydigzellfläche wurde anhand von 10 zufällig ausgewählten Leydigzellen und deren Kernen planimetrisch ermittelt. Dabei wurde die Leydigzelle als Kugel angesehen und aus der Fläche das jeweilige Volumen errechnet. Die Leydigzellzahl je Tier wurde aus der Leydigzellzahl je mm² errechnet, welche planimetrisch bestimmt wurde. Neben den morphometrischen Hodenmessungen

wurde die Spermatogenese anhand der verschiedenen Stadien des Keimepithelzyklus charakterisiert. Hierzu wurden bei 400-facher Vergrößerung die jeweiligen Keimepithelstadien bestimmt und die prozentuale Häufigkeit ihres Vorkommens ermittelt.

Die Einteilung der Keimepithelstadien erfolgte nach Swierstra (1968), wobei Stadium VI und VII zusammengelegt wurden, da sie bei 400-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop nur schwer zu unterscheiden sind. Nach Garcia-Gil et al. (2002) wurden die Stadien der besseren Übersichtlichkeit wegen in prämeiotische Stadien (I, II, III), meiotische Stadien (IV, V) und postmeiotische Stadien (VI/VII, VIII) unterteilt.

Je Tier wurden 100 Tubuli auf die Keimepithelstadien hin untersucht.

Neben den Keimepithelstadien wurden auch die Keimzellen selbst näher betrachtet. Dazu wurden bei 1000-facher Vergrößerung für jedes Keimepithelstadium fünf Tubuli auf A-, B-Spermatogonien, primäre Spermatozyten, sekundäre Spermatozyten, runde und elongierte Spermatischen hin untersucht. D.h. es wurden insgesamt 35 Tubuli ausgewertet. Die ausgezählte Zahl der jeweiligen Keimzellen wurde auf einen Tubulus umgerechnet, so dass die Zellen alle je Tubulus dargestellt sind.

4.6 Immuncytochemische und cytochemische Bestimmungen

In Tabelle 4.30 sind die immuncytochemisch und cytochemisch erfassten Parameter dargestellt.

Tabelle 4.30 Immuncytochemische und cytochemische Parameter zur Charakterisierung der Spermatogenese der 3 Versuchsgruppen

Parameter
Mitose (Ki-67)
Apoptose (TUNEL)
Glucocorticoidrezeptor (GCR)
Estrogenrezeptor α (ER α)

Bei allen Parametern wurden zur Absicherung bei jeder Färbung Positiv- und Negativkontrollen angefertigt, um den Status der jeweiligen Färbung überprüfen zu können. Die Negativkontrollen bestanden aus Hodengewebschnitten, bei denen der

1. Antikörper weggelassen wurde. Als Positivkontrolle diente Darmgewebe. Bei ER α bestand die Positivkontrolle aus porcinem Ovargewebe.

Mitose-Färbung

Die Anfärbung der mitotisch aktiven Zellen erfolgte immunocytochemisch mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper gegen Ki-67 (MIB-1) (Maus-anti-Ki-67, Monoklonaler Antikörper, Histoprime[®], Linaris Biologische Produkte GmbH, D-97877 Wertheim-Bettingen).

Ki-67 ist ein alkalisches Protein und essentiell für die Aufrechterhaltung eines Zellzyklus. Es wird während der S-, G₂-, M- und späten G₁-Phasen des Zellzyklus exprimiert (Gerdes et al. 1984). Direkt nach der mitotischen Teilung werden die geringsten Ki-67-Konzentrationen nachgewiesen, die immunocytochemisch nicht sichtbar sind (Du Manoir et al. 1991). Dennoch erfasst die Ki-67-Färbung eine sehr lange Zeitspanne während der Mitose, da dieses Protein nahezu über die gesamte Mitosedauer exprimiert wird.

Die Anfärbung der mitotischen Zellen mittels Ki-67 erfolgte in Anlehnung an Mentschel et al. (2001). In den entparaffinierten und mikrowellenbehandelten Gewebeschnitten wurde zunächst die endogene Peroxidase mit einem 2.4%igen MeOH-H₂O₂-Gemisch blockiert. Nach dem Absättigen der für den Antikörper unspezifischen Bindungsstellen mit Ziegeserum (1:10), wurde der Primärantikörper gegen Ki-67 aufgetragen (60 min, 37°C). Ein zweiter, biotinylierter Antikörper (Ziege gegen Maus-IgG; Fa. DAKO, Hamburg) und der Avidin-Biotin-Peroxidase (AB)-Komplex (Fa. DAKO, Hamburg) verstärkten das Signal durch den Farbstoff Diaminobenzidin (DAB; Fluka), der als Substrat für die Peroxidase fungiert. Die Ki-67-positiven Zellen erscheinen braun angefärbt. Alle Gewebeschnitte wurden anschließend mit Hämatoxylin (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt.

Zur Absicherung der Spezifität wurde bei jeder Färbung eine Positiv- und eine Negativkontrolle angefertigt. Als Positivkontrolle wurde Darmgewebe verwendet. Als Negativkontrolle Hodengewebe, das mit PBS-Puffer statt mit 1. Antikörper inkubiert wurde.

Bei der Auswertung der mitotischen Zellen wurden ausschließlich die Spermatogonien berücksichtigt, während die ebenfalls positiv angefärbten meiotischen Spermatozyten unbeachtet blieben (laut Firmeninformation färbt der Antikörper ebenfalls die Reifeteilungen der Meiose positiv an). Zur Quantifizierung

wurden pro Tier jeweils 100 Tubuli ausgezählt, die Anzahl Ki-67-positiver Zellen bestimmt und auf einen Tubulus bezogen. Zusätzlich wurden die Ki-67-positiven Zellen für jedes Keimepithelstadium ausgezählt (5 Tubuli je Stadium), und so die Verteilung der Ki-67-positiven Zellen im Verlauf des Keimepithelzyklus ermittelt.

TUNEL-Färbung

Mit der TUNEL-(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (dUTP) nick-end labelling)- Färbung nach Gavrieli et al (1992) werden DNA-Strangbrüche im histologischen Schnitt nachgewiesen.

Bei der Methode werden mit Hilfe des Enzyms Terminale Transferase (TT) mit Biotin gekoppelte dUTP-Nucleotide an die 3'-OH-Enden von DNA-Einzel- oder Doppelstrangbrüchen gebunden. Der so markierte Strangbruch wird mittels des AB-Peroxidase-Komplexes und anschließender Farbumsetzung des Substrates DAB mit Hilfe der Peroxidase sichtbar gemacht. Mittels der TUNEL-Färbung werden nur Zellen angefärbt, deren DNA schon vollständig gebrochen ist, frühere Stadien der Zelle auf ihrem Weg zur Apoptose werden nicht erfasst, so dass mit der TUNEL-Färbung nur ein sehr kleines Zeitfenster des Apoptoseverlaufs erfasst wird. Demzufolge kann ein Vergleich nur innerhalb dieser Färbung erfolgen, eine Bilanzierung mit der Mitose, bei der ein sehr großes Zeitfenster dargestellt wird ist hingegen nicht möglich.

Nach Demaskierung der entparaffinierten Gewebeschnitte durch Proteinase K und damit der „Freilegung“ der Strangbrüche, wurde die Aktivität der endogenen Peroxidase gehemmt. Anschließend wurden die Schnitte 60 min mit einem Gemisch aus terminaler Transferase und Biotin-16-UTP inkubiert. Zur Beendigung dieser Reaktion, wurden die Schnitte gewaschen, anschließend unspezifische Bindungsstellen mit bovinem Serumalbumin (BSA) blockiert und der AB-Peroxidase-Komplex aufgetragen.

Die Qualitätsabsicherung der TUNEL-Färbung erfolgte wiederum durch Positiv- und Negativ-Kontrollen. Die Positiv-Kontrolle war mit DNase behandeltes Hodengewebe, die Negativkontrolle war Hodengewebe, das keiner Inkubation mit terminaler Transferase unterlag.

Die Auswertung der Apoptose-positiven Zellen erfolgte, indem 100 Tubuli pro Tier, unterschieden in A-, B-Spermatogonien und Spermatozyten ausgezählt und die erhaltene Zellzahl auf einen Tubulus umgerechnet wurde.

Färbung des Glucocorticoid-Rezeptors

Der Glucocorticoidrezeptor (GCR) wurde immunocytochemisch mit einem polyklonalen anti-Kaninchen Antikörper gegen den porcinen GCR (Gutscher et al. 2001) lokalisiert. Der GCR-Antikörper richtet sich gegen 135 Aminosäuren des N-terminalen Endes des Rezeptors. Die Absicherung der Spezifität des Antiserums erfolgte mittels Western Blot (Gutscher et al. 2001). Der Ablauf der Färbung erfolgte wie bei der Ki-67-Färbung. Zur Gegenfärbung wurde ebenfalls Hämatoxylin verwendet. Die Qualitätsabsicherung erfolgte auch hier wieder mit einer Positiv- (Darmgewebe) und einer Negativkontrolle (Hodengewebe ohne 1. Antikörper), die bei jeder Färbung durchgeführt wurden.

Zur Auswertung des GCR wurden 100 Tubuli pro Tier, unterschieden in A- und B-Spermatogonien auf GCR-positive Zellen ausgezählt und auf einen Tubulus umgerechnet.

Färbung des Estrogenrezeptors alpha (ER α)

Die Lokalisation des ER α in allen drei Behandlungsgruppen erfolgte ebenfalls immunocytochemisch. Als Antiserum wurde ein kommerziell erhältlicher polyklonaler anti-Kaninchen Primärantikörper (1:150) verwendet. Dieser richtet sich gegen ein 67 kDa-Epitop des C-terminalen Endes des humanen ER α (AB 17, LabVision corporation, 4779 Westinghouse Drive Fremont CA, 94539 USA). Eine Kreuzreaktivität des Antiserums mit porcinem Gewebe wurde vom Hersteller nachgewiesen. Der prinzipielle Ablauf der Färbung erfolgte in Anlehnung an die Färbung des GCR und des Ki-67, die Gegenfärbung erfolgte wiederum mit Hämatoxylin. Die Qualitätsabsicherung erfolgte mit Ovargewebe als Positiv- und 1. Antikörper-freien Hodengewebsschnitten als Negativkontrolle.

Die Expression des ER α in Zelltypen der Spermatogenese war streng an das Stadium des Keimepithelzyklus gebunden. Daher wurde die Auswertung in Zusammenhang mit den Stadien des Keimepithelzyklus vorgenommen. Pro Stadium wurden je Tier fünf Tubuli auf ER α -positive Zellen untersucht und auf einen Tubulus umgerechnet.

Die Expression und Lokalisierung des ER α in porcinem Hodengewebe, erfolgte zusätzlich zu Immuncytochemie mit RT-PCR, in situ Hybridisierung und UV-laser-assisted cell picking. Die Proben wurden in Gießen von Oksana Lekhota im Rahmen ihrer Dissertation untersucht.

4.7 RT-PCR

Zusätzlich zu der Bestimmung der 11 β -HSD-Aktivität wurde die Anwesenheit der 11 β -HSD-Isoformen in porcinem Hodengewebe mittels RT-PCR nachgewiesen. Die Durchführung dieser Bestimmungen wurde freundlicherweise von T. Lambert und J. Bzyl vorgenommen.

Die Sequenzen der beiden Isoformen 11 β -HSD 1 und 11 β -HSD 2 waren über die Gen-Datenbank erhältlich (Zugangsnummern: AF 414124 und AF 374414).

Die Gesamt-RNS von etwa 40 mg Hodengewebe wurde extrahiert (E.Z.N.A RNA kit; PeqLab, Erlangen, Deutschland), 1 μ g dieser RNA mit DNase verdaut (DNase amplification grade, Invitrogen, Carlsbad, CA) und revers transkribiert (Superscript II; Invitrogen, Carlsbad, CA und einen Oligo-dT Primer). Nach dem RNase-Verdau wurden 2 μ l (10%) der einsträngigen cDNS als Vorlage für die PCR-Reaktion benutzt. Folgende isoformspezifischen Primer kamen zum Einsatz:

11 β -HSD-1s 5'-TTCAGACCAGAGATGCTTCG3', 11 β -HSD-1 as 5'-GGAGCAACAAGTGGATTCG-3'; 11 β -HSD-2s 5'-TTGCTGTTCCCCTCGTCTG-3', 11 β -HSD-2as 5'-TGGATGACGCTGACCTTGAC-3'.

Die PCR wurde mit einem Gesamtvolumen von 50 μ l mit 1.5 mM MgCl₂, 0.6 μ M jedes Primers, 0.2 mM dNTPs und 2 U Taq DNS Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) durchgeführt. Folgende Parameter wurden verwendet: 1. Denaturierung (3 min, 94°C); 2. 35 Zyklen (1 min, 94°C, 30 sec, 60 °C; 1 min, 72 °C); 3. Verlängerung (6 min; 72 °C). 10 μ l jedes PCR Ansatzes wurden in einem 1% Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die PCR-Produkte wurden ausgeschnitten und aufgereinigt (MinElute Gel Extraction Kit; Quiagen, Hilden, Deutschland). Die PCR-Produkte wurden direkt sequenziert (ABI Prism BigCye terminator cycle sequencing kit) und die Sequenz auf einem ABI Prism 310 Gen-Analyzer (PerkinElmer, foster City, CA) analysiert.

4.8 Statistische Auswertung

Alle Daten des Hauptversuchs stellen die Gruppenmittelwerte \pm SEM der fünf „Intakten Eber, der 5 „immunisierten Eber“ und der 6 „17 β E₂ infundierten, immunisierten Eber“ dar. Die Daten des Ergänzungsversuches beziehen sich auf 5 Kastraten. Die breitgestellten Proben von C. Metz bestehen ebenfalls aus jeweils 5 Ebern, 5 immunisierten Ebern und 5 Kastraten.

Bei den Ergebnissen der Testosteronmessungen, stehen hinter jedem Tier 22 Blutproben, bei den Estradiolmessungen sind es 50. Die Cortisolmessungen im Blutplasma sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 2 Plasmaproben je Tier. Bei den Steroidmessungen in der Tubulusflüssigkeit ist jedes Tier durch eine Probe charakterisiert.

Die Ergebnisse der Proteohormonmessungen (LH, FSH) sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 37 Proben je window und Tier.

Die Enzymaktivität der 11 β -HSD stellt den Mittelwert von jeweils 2 Hodengewebeproben pro Tier dar.

Die Ergebnisse der histologischen Auswertungen sind die Gruppenmittelwerte \pm SEM von 35 Tubuli je Tier (Keimzellzahlen) bzw. der jeweils ausgezählten Tubuluszahl oder Hodengewebeflachen (morphometrische Parameter), die immunocytochemischen und cytochemischen Daten repräsentieren die Gruppenmittel \pm SEM von je 100 ausgezählten Tubuli je Tier.

Alle Daten wurden mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung überprüft.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte, da die Daten unbalanciert waren, d.h. sowohl die Tierzahl der Gruppen als auch die Anzahl der Proben individuell variierte, mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS (Version 11, SPSS, Chicago, IL, USA).

Folgendes Modell wurde zur Auswertung verwendet:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

Y_{ijk} =	Mittelwert des kten Tieres in der iten Gruppe innerhalb des jten Durchgangs.
μ =	Genereller Effekt
α_i =	Haupteffekt der iten Gruppe
β_j =	Haupteffekt des jten Durchganges
$(\alpha\beta)_{ij}$ =	Gruppe x Durchgang Wechselwirkung
e_{ijk} =	Residualfehler

D.h. es wurden die Faktoren "Tier innerhalb der Gruppe und des Durchganges", "Gruppe", "Durchgang" sowie die Wechselwirkungen zwischen Gruppe und Durchgang berücksichtigt und die errechneten Randmittelwerte auf signifikante Unterschiede geprüft.

Der Tiereffekt wurde in diesem Modell als zufällig betrachtet.

Berechnungen von Korrelationen zwischen den täglichen Hormonkonzentrationen, den histologischen Parametern einzelner Tiere sowie bei der Absicherung des Cortison-Immunotests mittels RIA wurden mit Hilfe des Programmes Excel 97 durchgeführt.

Zum Vergleich der LH- und FSH-Konzentrationen zwischen den einzelnen windows eines Tieres wurde die Prozedur "General linear model" (GLM), multivariate Analyse mit Messwiederholungen durchgeführt. Um FSH-Konzentrationen zwischen verschiedenen, auch dem Versuch nicht angehörigen Tieren zu vergleichen, wurde, ebenfalls mittels des Programmes SPSS, eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt, da hier andere Effekte als die Behandlung und der zufällige Tiereffekt nicht in Betracht gezogen wurden.

Folgende Wahrscheinlichkeiten sind die Grundlage der angegebenen Signifikanzen:

$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.
$p \leq 0,05$	signifikant	*
$p \leq 0,01$	hoch signifikant	**
$p \leq 0,001$	höchst signifikant	***

5 ERGEBNISSE

5.1 Auswirkungen der GnRH-Immunisierung und anschließender Estradiol-Infusion auf den Verlauf von LH und FSH

5.1.1 Luteinisierendes Hormon (LH)

Die Konzentrationen des Gonadotropins LH wurden in den window-Proben der intakten Eber, der immunisierten Eber und der Estradiol ($17\beta E_2$)-infundierten, immunisierten Eber des Hauptversuchs gemessen.

Die mittleren LH-Konzentrationen über den gesamten Versuchszeitraum lagen bei den immunisierten Ebern etwa 77% niedriger als jene der Eber ($p \leq 0,001$).

Die $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Tiere zeigten LH-Konzentrationen wie jene der immunisierten Eber. Dabei waren die $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Eber ebenfalls signifikant von den Ebern unterschieden ($p \leq 0,001$).

Zwischen den windows der Einzeltiere zu den verschiedenen Zeitpunkten (25,26,27,28,31 Wochen) gab es keine signifikanten Unterschiede.

Die Mittelwerte der LH-Konzentrationen der verschiedenen Gruppen über die jeweiligen 12-Stunden windows sind in Tabelle 5.1 dargestellt.

Tabelle 5.1 LH-Konzentrationen (pg/ml) aus den 12-Stunden Windows der intakten Eber (n=5), der immunisierten Eber (n=5) und der $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Eber (n=6) im Alter von 25, 26, 27, 28 und 31 Wochen (Mittelwerte \pm SEM)

Alter (Wochen)	Eber	Immunisierte Eber	$17\beta E_2$ -infundierte, immunisierte Eber
25	130 \pm 30 ^a	30 \pm 8 ^b	30 \pm 8 ^b
26	130 \pm 30 ^a	30 \pm 10 ^b	40 \pm 10 ^b
27	120 \pm 20 ^a	20 \pm 10 ^b	20 \pm 7 ^b
28	130 \pm 20 ^a	30 \pm 10 ^b	20 \pm 10 ^b
31	130 \pm 20 ^a	30 \pm 10 ^b	30 \pm 10 ^b

Unterschiedliche Buchstaben ^{ab} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede ($p \leq 0,001$) zwischen den Gruppen hin.

In Abbildung 5.1 sind die unterschiedlichen Verläufe der LH-Konzentrationen des ersten 12-Stunden Windows zwischen den Gruppen anhand von repräsentativen Einzeltieren beispielhaft dargestellt.

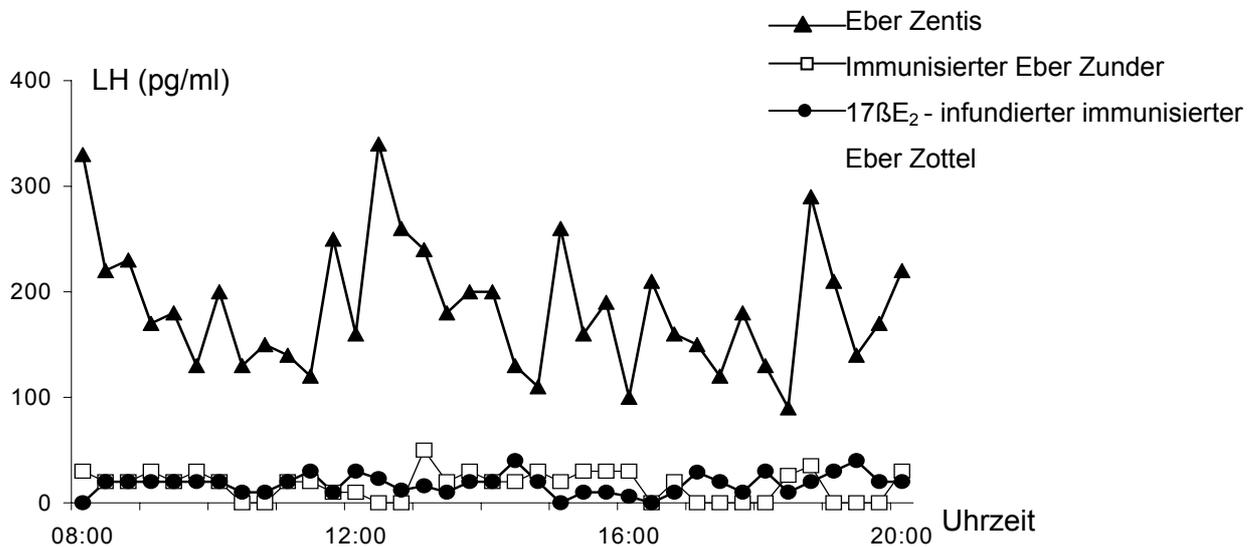


Abbildung 5.1 LH-Profile (pg/ml) des Eber Zentis, des immunisierten Ebers Zunder und des 17βE₂-infundierten, immunisierten Ebers Zottel im Alter von 25 Wochen

Während beim Eber die pulsatile LH-Freisetzung über den 12 Stunden Zeitraum gut zu erkennen ist, sind die LH-Konzentrationen bei immunisierten und 17βE₂-infundierten, immunisierten Ebern auf ein so niedriges Niveau abgesunken, dass keine Pulse mehr auszumachen sind.

5.1.2 Follikel Stimulierendes Hormon (FSH)

FSH wurde in den Windowproben aller Tiere des Haupt- und Ergänzungsversuchs sowie in den von C. Metz bereitgestellten Proben der präpuberalen Eber, immunisierten Eber und Kastraten gemessen.

Tabelle 5.2 zeigt die FSH-Konzentrationen des Hauptversuchs.

Tabelle 5.2 FSH-Konzentrationen (ng/ml) der 12-Stunden windows von Ebern (n=5), immunisierten Ebern (n=5) und 17 β E₂-infundierten, immunisierten Ebern (n=6) im Alter von 25-31 Wochen (Mittelwerte \pm SEM)

Alter (Wochen)	Eber	Immunisierte Eber	17 β E ₂ -infundierte, immunisierte Eber
25	0,39 ^a \pm 0,06	0,43 ^a \pm 0,05	0,35 ^a \pm 0,05
26	0,36 ^a \pm 0,05	0,38 ^a \pm 0,03	0,34 ^a \pm 0,05
27	0,34 ^a \pm 0,07	0,31 ^a \pm 0,04	0,36 ^a \pm 0,05
28	0,37 ^a \pm 0,08	0,37 ^a \pm 0,05	0,39 ^a \pm 0,08
31	0,43 ^a \pm 0,07	0,35 ^a \pm 0,04	0,38 ^a \pm 0,07

Verschiedene Buchstaben ^{abc} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen

Die FSH-Konzentrationen der maturen Kastraten des Ergänzungsversuchs lagen bei 1,3 \pm 0,23 ng/ml und wurden durch die Estradiolinfusion signifikant auf 0,82 \pm 0,12 ng/ml gesenkt.

Die präpuberalen Eber und immunisierten Eber von C. Metz zeigten FSH-Konzentrationen von 0,69 \pm 0,05 bzw. 0,70 \pm 0,05 ng/ml Blutplasma. Die präpuberalen Kastraten lagen deutlich höher bei 2,32 \pm 0,21 ng/ml bzw. 1,34 \pm 0,14 ng/ml für die Estradiol-infundierten Kastraten.

Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede der FSH-Konzentrationen zwischen Ebern und immunisierten Ebern, unabhängig davon, ob es sich um 18 oder 25-31 Wochen alte Tiere handelte. Ebenso wenig gab es Unterschiede zwischen den windows eines Einzeltieres zu den verschiedenen Zeitpunkten der windows. Eine Estradiol-Infusion hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die FSH-Konzentrationen der immunisierten Eber.

Ein Unterschied war allerdings zwischen den Altersgruppen zu erkennen mit etwa doppelt so hohen FSH-Konzentration in den 18 Wochen alten Tieren im Vergleich zu den 25-31 Wochen alten Tieren ($p \leq 0,01$).

Kastraten wiesen im Durchschnitt 3-mal höhere FSH-Konzentrationen auf als Eber, immunisierte Eber und 17 β E₂-infundierte, immunisierte Eber ($p \leq 0,001$). Dabei zeigten wiederum die 18 Wochen alten Kastraten etwa doppelt so hohe FSH-Konzentrationen im Vergleich zu den 25-31 Wochen alten Tieren ($p \leq 0,001$). Eine

Estradiol-Infusion an Kastraten senkte die FSH-Konzentrationen signifikant um etwa 35% in beiden Altersgruppen ($p \leq 0,001$).

Innerhalb der Altersgruppe von 25 – 31 Wochen sind weder bei den Ebern noch bei den immunisierten Ebern signifikante Unterschiede in den Konzentrationen von FSH zu erkennen.

Abbildung 5.2 zeigt die Niveauunterschiede der FSH-Konzentrationen im Alter von 25 Wochen zwischen einem Kastraten, einem $17\beta E_2$ -infundierten Kastraten sowie beispielhaft einem immunisierten Tier (da Eber, immunisierte und $17\beta E_2$ -infundierte, immunisierte Eber keine signifikanten Unterschiede aufweisen).

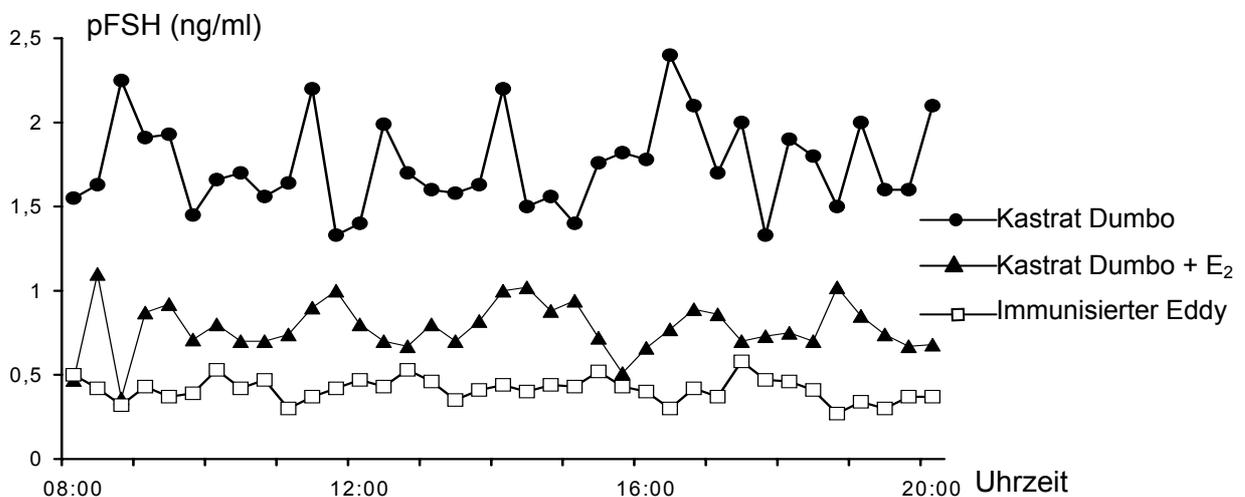


Abbildung 5.2 FSH-Profile des Kastraten Dumbo mit und ohne Estradiolinfusion sowie des immunisierten Ebers Eddy im Alter von 25 Wochen.

Das FSH-Niveau der Kastraten liegt aufgrund des fehlenden negativen feed-backs der Gonadensteroiden wesentlich höher als bei Ebern, immunisierten oder $17\beta E_2$ -infundierten immunisierten Ebern. Durch Estradiol-Applikation wurde FSH auf die Hälfte der Ausgangswerte reduziert, lag aber immer noch signifikant über den Konzentrationen intakter und immunisierter Eber.

In Abbildung 5.3 a-d ist der Einfluss der Altersunterschiede auf die FSH-Konzentrationen beispielhaft an Einzeltieren (a:Eber, b:immunisierte Eber, c:Kastraten, d: $17\beta E_2$ -infundierte Kastraten) jeweils im Alter von 18 und 25 Wochen dargestellt.

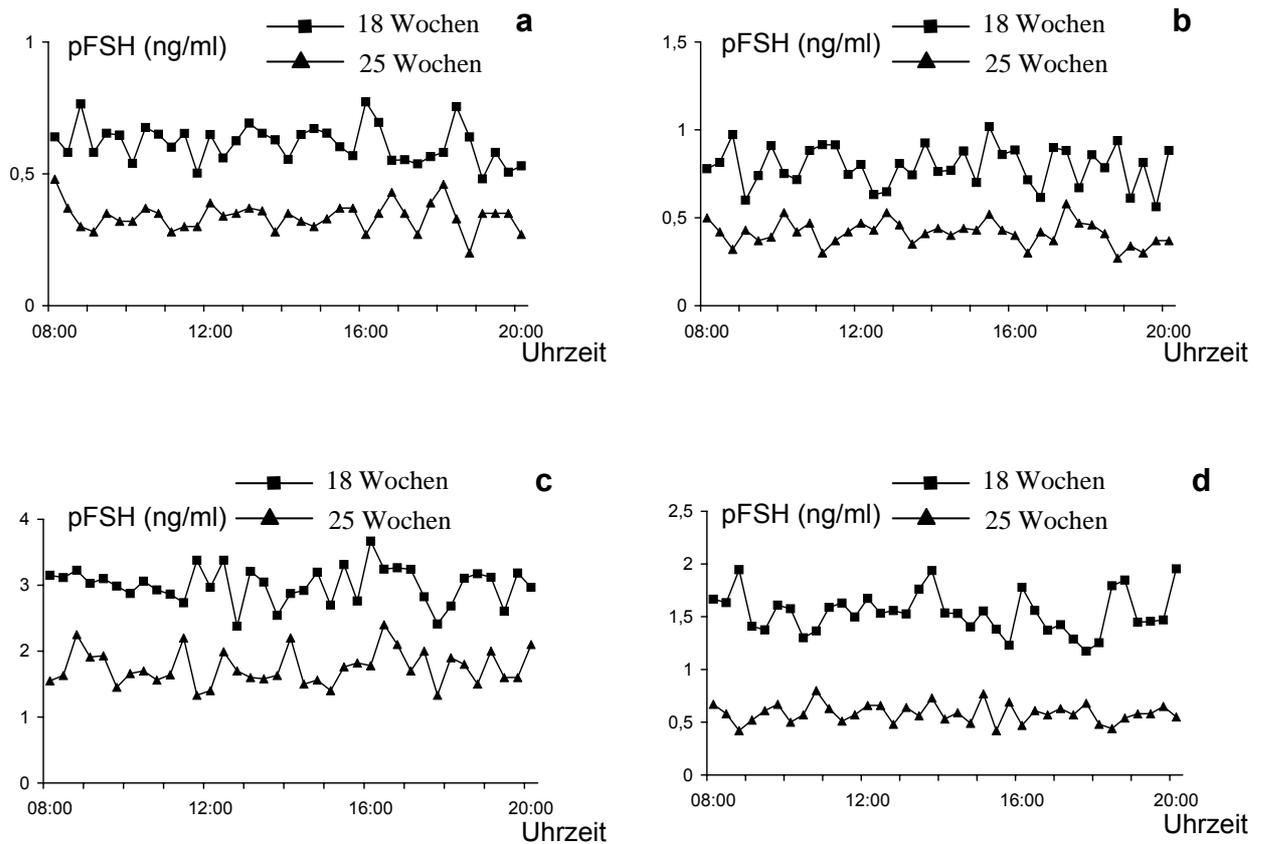


Abbildung 5.3 a-d FSH-Profile a: der Eber Ernie (25 Wochen) und Bonzo (18 Wochen), b: der immunisierten Eber Eddy (25 Wochen) und Bär (18 Wochen), c: der Kastraten Dumbo (25 Wochen) und Ralf (18 Wochen) sowie d: der 17 β E₂-infundierten Kastraten Dieter (25 Wochen) und Ronny (18 Wochen).

Bei allen 4 Tiergruppen ist eindeutig ein Einfluss des Alters auf die FSH-Konzentrationen im peripheren Blutplasma festzustellen. Die 18 Wochen alten Tiere wiesen, unabhängig ob Eber, immunisierter Eber, Kastrat oder Estradiol substituierter Kastrat immer etwa doppelt so hohe FSH-Konzentrationen auf wie die 25 Wochen alten Tiere.

5.2 Auswirkungen einer GnRH-Immunsierung und anschließender $17\beta E_2$ - Infusion auf die Gonadensteroidoide, Glucocorticoide und die Aktivität der 11β -HSD

5.2.1 Testosteron

Die Testosteron-Konzentrationen wurden jeweils dreimal wöchentlich in den täglichen Blutproben der Eber, der immunisierten Eber und der $17\beta E_2$ -infundierten immunisierten Eber gemessen.

Abbildung 5.4 zeigt den Verlauf der Testosteronkonzentrationen über den Versuchszeitraum (25.-31. Lebenswoche) in den verschiedenen Behandlungsgruppen.

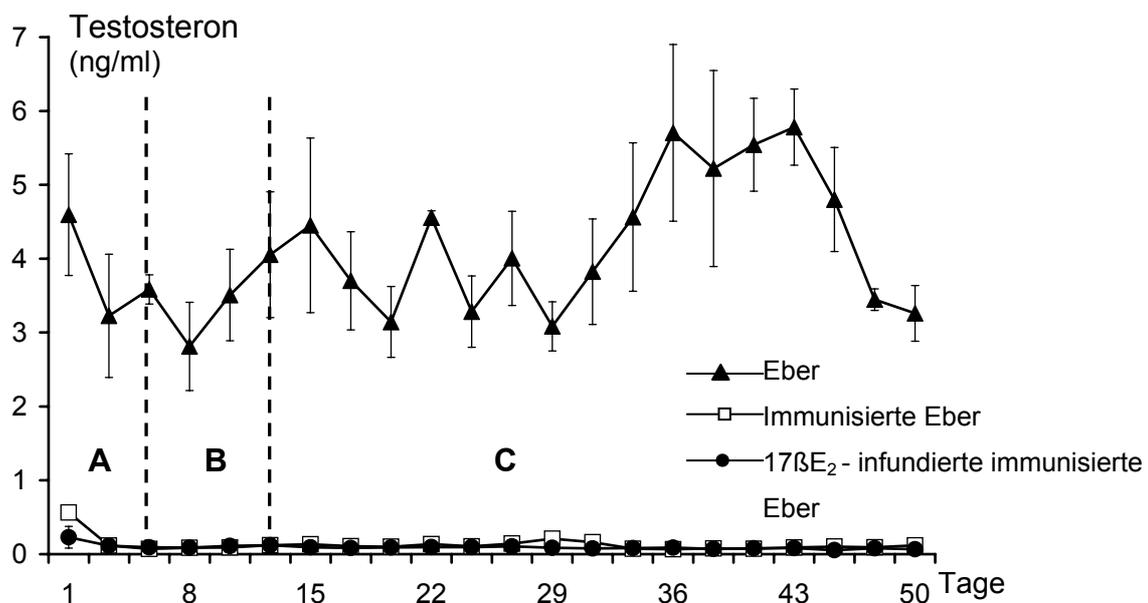


Abbildung 5.4 Testosteronkonzentrationen der Eber (n=5), immunisierten Eber (n=5) und $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Eber (n=6) innerhalb des 50-tägigen Versuchszeitraumes (Mittelwerte \pm SEM). Senkrechte Linien trennen die drei Behandlungszeiträume A-C (A= eine Woche 0,9% NaCl, B= eine Woche 0,81 μ g Estradiol / L 0,9% NaCl, C= 5 Wochen 0,2 μ g Estradiol / L 0,9% NaCl)

Die Testosteronkonzentrationen der intakten Eber lagen im Mittel bei $3,06 \pm 0,83$ ng/ml. Durch die Immunisierung fielen diese mittleren Konzentrationen auf $0,03 \pm 0,006$ ng/ml, also um 99% ab.

Die anschließende Estradiolinfusion änderte die auf diesem niedrigen Niveau liegenden Testosteronkonzentrationen nicht ($0,13 \pm 0,06$ ng/ml). Bei den Ebern wiesen die Testosteronkonzentrationen individuelle Schwankungen auf, die im Bereich zwischen 1,3 und 10,6 ng/ml lagen, auch wurden signifikante Effekte des Einzeltieres bei den Testosteronkonzentrationen nachgewiesen ($p \leq 0,05$).

Abbildung 5.5 zeigt beispielhaft ein Einzelprofil des Ebers Elba innerhalb der 50 Tage Versuchsdauer. Das Profil zeigt die normalen Fluktuationen um einen Mittelwert von $4,27 \pm 0,38$ ng/ml, wie sie auch bei den anderen Tieren auftreten.

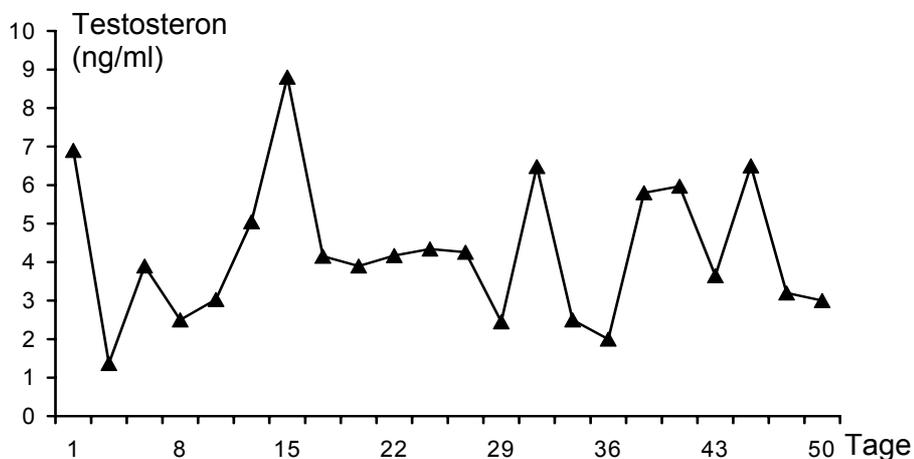


Abbildung 5.5 Testosteron-Konzentrationen (ng/ml) des Ebers Elba während des Versuchszeitraumes.

5.2.2 17β Estradiol

Die Estradiol-Konzentrationen wurden täglich in den Blutproben der Eber, immunisierten Eber und der $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Eber bestimmt. Abbildung 5.6 zeigt den Verlauf der 17β Estradiol-Konzentrationen über den Versuchszeitraum für alle Gruppen.

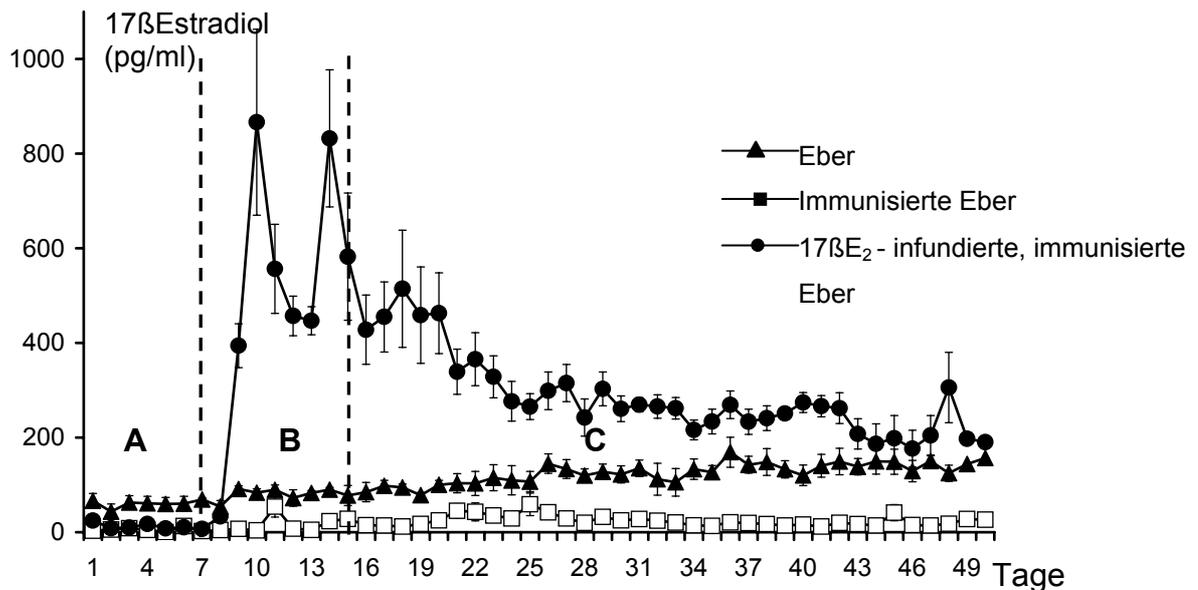


Abbildung 5.6 Estradiol-Konzentrationen über den Versuchszeitraum in intakten Ebern ($n=5$), immunisierten Ebern ($n=5$) und $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Ebern ($n=6$). Senkrechte Linien trennen die drei Behandlungszeiträume A-C (A= eine Woche 0,9% NaCl, B= eine Woche 0,81 μg Estradiol / L 0,9% NaCl, C= 5 Wochen 0,2 μg Estradiol / L 0,9% NaCl). (Mittelwerte \pm SEM)

Die mittleren Estradiolkonzentrationen der intakten Eber lagen bei $106,6 \pm 0,33$ pg/ml. Die Estradiolkonzentrationen dieser Gruppe zeigten einen altersabhängigen Anstieg vom ersten zum letzten Versuchstag. Die mittleren Konzentrationen der einzelnen Eber schwankten zwischen 54 und 284 pg/ml.

In Folge der Immunisierung lagen die Estradiolkonzentrationen im Durchschnitt bei $12,3 \pm 3,0$ pg/ml (Unterschiede zwischen den Einzeltieren: ≤ 12 bis 35,8 pg/ml). Die Estradiolinfusion erhöhte die Estradiolkonzentrationen der immunisierten Tiere nach der einwöchigen Kontrollphase signifikant auf $512,43 \pm 49,1$ pg/ml ($p \leq 0,001$). Mit Beginn der niedrigeren Dosierung sanken die Estradiolkonzentrationen im Blutplasma über eine Woche nur langsam, vermutlich aufgrund der Estradiolfreisetzung aus dem Gewebe und stabilisierten sich auf Durchschnittswerte von $234 \pm 38,7$ pg/ml in den letzten zwei Wochen vor dem Einschlafen. Damit lagen die Estradiolkonzentrationen der infundierten Tiere etwa doppelt so hoch wie jene der intakten Eber.

Die Mittelwerte der Estradiolkonzentrationen in der Tubulusflüssigkeit sowie dem Hodengewebe sind in Tabelle 5.3 dargestellt.

Tabelle 5.3 Estradiolkonzentrationen in Tubulusflüssigkeit (ng/ml) und Hodengewebe (ng/g) von Ebern (n=5), immunisierten (n=5) und $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Ebern (n=6) (Mittelwerte \pm SEM)

	Eber	Immunisierte Eber	$17\beta E_2$ -infundierte, immunisierte Eber
Tubulusflüssigkeit	42,78 \pm 1,68 ^a	0,84 \pm 0,14 ^b	0,64 \pm 0,01 ^b
Hodengewebe	79,43 \pm 13,7 ^a	0,33 \pm 0,1 ^b	0,61 \pm 0,1 ^c

Unterschiedliche Buchstaben ^{abc} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Tubulusflüssigkeit, Hodengewebe Eber-Immunisiert: $p \leq 0,001$

Hodengewebe Immunisiert- $17\beta E_2$ -infundiert, immunisiert: $p \leq 0,05$

Die Estradiolkonzentrationen in der Tubulusflüssigkeit waren nach der GnRH-Immunsierung im Vergleich zu den Ebern deutlich reduziert. Durch die Estradiolinfusion kam es zu keinem Anstieg der Konzentrationen in der Tubulusflüssigkeit. Im Gegensatz zu den Estradiolkonzentrationen im Blutplasma blieben die Estradiolkonzentrationen in der Tubulusflüssigkeit auf dem niedrigen Niveau der immunisierten Eber. Betrachtet man die Konzentrationen des 17β Estradiols im Hodengewebe, so sanken die Konzentrationen durch die Immunsierung um 99%. Diese niedrigen Konzentrationen wurden durch die Estradiolinfusion verdoppelt, so dass im Hodengewebe Estradiolkonzentrationen in einer Größenordnung wie auch im Blutplasma erzielt wurden. Allerdings lagen die Estradiolkonzentrationen der $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Eber immer noch unter den Konzentrationen der intakten Kontrolleber.

5.2.3 Glucocorticoide

Cortisol und Cortison wurde in den Blutplasmaproben der letzten zwei Tage vor dem Einschlafen bzw. des letzten Tages vor dem Einschlafen sowie in den Proben der Tubulusflüssigkeit gemessen. In Tabelle 5.4 sind die Cortisol- und Cortisonkonzentrationen in Blutplasma und Tubulusflüssigkeit der Eber, der immunisierten Eber sowie der $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Eber dargestellt.

Tabelle 5.4 Cortisol- und Cortisonkonzentrationen (ng/ml) der Eber (n=5), der immunisierten Eber (n=5) und der 17 β E₂-infundierten, immunisierten Eber (n=6) (Mittelwerte \pm SEM)

	Eber	Immunisierte Eber	17 β E ₂ -infundierte, immunisierte Eber
Cortisol *			
Blutplasma	16,3 \pm 1,7	11,8 \pm 3,2	16,7 \pm 2,2
Tubulusflüssigkeit	14,7 \pm 1,5	10,9 \pm 1,7	12,2 \pm 1,3
Cortison *			
Blutplasma	5,21 \pm 0,5	4,7 \pm 0,7	6,33 \pm 0,74
Tubulusflüssigkeit	4,5 \pm 0,9	6,7 \pm 1,2	4,98 \pm 1,12

* = p \geq 0,05

Weder die Cortisol- noch die Cortisonkonzentrationen waren durch die Immunisierung und die Estradiolinfusion signifikant beeinflusst. Erkennbare Unterschiede der Gruppenmittelwerte zwischen den Gruppen sowie zwischen Blutplasma und Tubulusflüssigkeit sind auf tierindividuelle Einflüsse zurückzuführen, da beide Glucocorticoide tierspezifisch sehr unterschiedliche Konzentrationen aufwiesen. So schwankten die Cortisolkonzentrationen sowohl in Tubulusflüssigkeit als auch im Blutplasma tierindividuell zwischen 10 und 21 ng/ml, die Cortisonkonzentrationen zwischen 2 und 7 ng/ml. Die Konzentrationen lagen allerdings bei allen Tieren in dem für Hausschweine physiologischen Rahmen.

5.2.4 11 β -Hydroxsteroid-Dehydrogenase (11 β HSD)

Die Aktivität des Enzyms 11 β -HSD2 wurde in den nach dem Einschlafen entnommenen Hodengewebeproben bestimmt.

Tabelle 5.5 zeigt die Ergebnisse der Messungen der oxidativen und reduktiven 11 β -HSD-Aktivität für intakte Eber, immunisierte Eber und 17 β E₂-infundierte, immunisierte Eber.

Tabelle 5.5 Oxidative (11 β -HSD2) und Reduktive (11 β HSD1) 11 β -HSD-Aktivität im Hodengewebe intakter (n=5), immunisierter (n=5) und 17 β E₂-infundierter, immunisierter (n=6) Eber (Mittelwerte \pm SEM)

	Eber	Immunisierte Eber	17 β E ₂ -infundierte, immunisierte Eber
11β-HSD2 (pmol Cortison /min/mg Protein)	10,19 \pm 2,28 ^a	0,08 \pm 0,03 ^b	0,47 \pm 0,14 ^c
11β-HSD1 (pmol Cortisol /min/mg Protein)	1	0,07	0,05

Unterschiedliche Buchstaben ^{abc} zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p \leq 0,01$).

Durch die Immunisierung sank die 11 β -HSD2 Aktivität um etwa 99%. Durch die Estradiol-Infusion stieg die 11 β -HSD2 wieder nahezu 6-fach an. Die Aktivität der 11 β -HSD1 lag bei den Ebern schon generell sehr viel niedriger als die 11 β -HSD2-Aktivität. In dem als Positivkontrolle für die 11 β -HSD1-Aktivität dienenden Lebergewebe wurde das gesamte Cortison umgesetzt. Durch die Immunisierung sank die Aktivität der 11 β -HSD1 im Hoden um 93%. Nach der Estradiolinfusion blieb sie im Gegensatz zur 11 β -HSD2 unverändert auf dem niedrigen Niveau der immunisierten Eber.

Zur Absicherung der Enzymaktivitätsmessungen der 11 β -HSD-Aktivität im Hoden, wurde mittels RT-PCR die mRNA beider 11 β -HSD Isoformen im Hoden nachgewiesen.

Diese RT-PCR im Hodengewebe (Abbildung 5.7) ergab Banden der erwarteten Größe sowohl für die 11 β -HSD 1 als auch für die 11 β -HSD 2 spezifischen Primer. Somit werden die mRNA sowohl der 11 β -HSD1 als auch der 11 β -HSD2 im Hoden exprimiert.

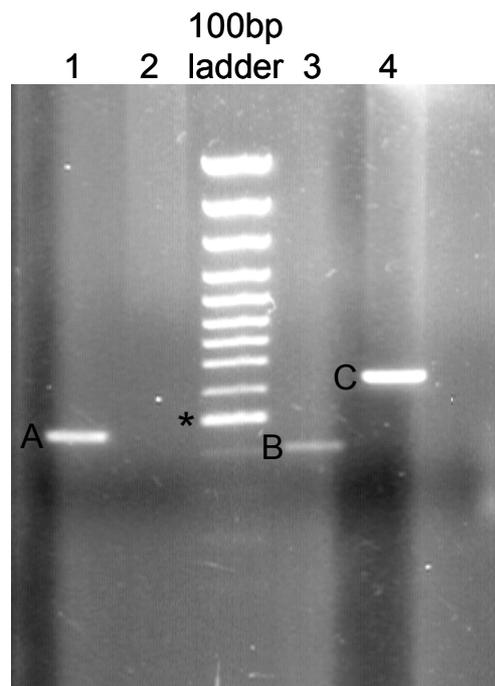


Abbildung 5.7 Ergebnisse der RT-PCR für 11 β -HSD 1 und 11 β -HSD 2 in porcinem Hodengewebe.

- 1) mit 11 β -HSD 1 spezifischen Primern und Hoden cDNA als Vorlage. Bande A zeigt die erwartete Größe von 467 bp.
- 2) Mit genomischer DNA als Vorlage und 11 β -HSD 1 spezifischen Primern. Es gibt keine Bande
- 3) Mit 11 β -HSD 2 spezifischen Primern ergab sich eine Bande B der erwarteten Größe von 405 bp.
- 4) Genomische DNA mit 11 β -HSD 2 spezifischen Primern ergibt eine Bande C über 600 bp.

Ein Stern markiert den 400 bp Abschnitt der 100 bp-Leiter

5.3 Konsequenzen der GnRH-Immunsierung und anschließender 17β Estradiolinfusion auf die Hodenmorphologie und die Spermatogenese

5.3.1 Hodengewicht und Hodenvolumen

Der Effekt der GnRH-Immunsierung war nach der 1. Boosterung schon äußerlich eindeutig zu erkennen. In Abbildung 5.8 ist ein intakter Eber neben einem immunisierten Tier dargestellt.



Abbildung 5.8 Darstellung des Immunisierungseffektes: rechts immunisierter Eber, links intakter Eber

Die Hodenrückbildung durch die Immunisierung ist deutlich zu erkennen. In Tabelle 5.6 sind die mittleren Hodengewichte und Hodenvolumina der Hoden von Ebern, immunisierten Ebern und $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Tieren dargestellt.

Tabelle 5.6 Hodengewichte (g) und Hodenvolumina (ml) der intakten (n=5), immunisierten (n=5) und $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten (n=6) Eber. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM sowie die Schwankungsbereiche

	Eber	Immunisierte Eber	$17\beta E_2$ -infundierte, immunisierte Eber
Hodengewicht (g)	336 ± 14^a (312-395)	115 ± 10^b (83 \pm 155)	145 ± 17^b (91-215)
Hodenvolumen (ml)	328 ± 17^a (297-400)	109 ± 11^b (77-150)	138 ± 15^b (91-197)

Unterschiedliche Fußnoten ^{ab} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede ($p \leq 0.001$).

Da die Hodendichte (Hodengewicht/Hodenvolumen) nahezu 1 beträgt, sind diese beiden Parameter annähernd identisch.

Sowohl Hodengewichte als auch Hodenvolumina wurden durch die Immunisierung um etwa 66% reduziert ($p \leq 0,001$). Die Estradiol-Infusion beeinflusste weder Hodengewichte noch Hodenvolumina im Vergleich zu den immunisierten Ebern signifikant, obwohl Einzeltiere durchaus höhere Hodengewichte bzw. Hodenvolumina aufwiesen.

Außer Gruppenunterschieden war bei den Hodengewichten bzw. -volumina auch ein Einfluss des Durchgangs wahrnehmbar, mit um etwa 33% höheren Hodengewichten bzw. -volumina bei den Ebern, immunisierten und $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Ebern des 2. Durchgangs.

5.3.2 Auswirkungen der GnRH-Immunisierung und anschließender Estradiol-Infusion auf morphologische Parameter des Hodens

5.3.2.1 Relative Anteile von Tubuli und Interstitium

Das Hodengewebe immunisierter Eber war mikroskopisch eindeutig von dem der intakten Tiere zu unterscheiden. So waren die Tubuli der immunisierten Tiere deutlich kleiner, von weniger Keimzellen ausgefüllt und das Interstitium war löchrig und von vielen bindegewebsartigen Septen durchzogen.

Der prozentuale Anteil dieser beiden Hauptkompartimente des Hodens blieb jedoch annähernd gleich. In Tabelle 5.7 ist die prozentuale Verteilung der Tubuli und des gesamten Interstitiums (Leydigzellen + Bindegewebe) für die Eber, die immunisierten Eber und die $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Eber dargestellt.

Tabelle 5.7 Prozentuale Flächenanteile des Interstitiums und der Tubuli am Hoden intakter (n=5), immunisierter (n=5) und $17\beta E_2$ -infundierter immunisierter (n=6) Eber (Mittelwerte \pm SEM)

	Eber	Immunisierte Eber	$17\beta E_2$ -infundierte, immunisierte Eber
Interstitium (%)	28,7 \pm 1,51	20,8 \pm 2,93	23,3 \pm 1,54
Tubuli (%)	71,3 \pm 1,51	79,2 \pm 2,93	76,7 \pm 1,54

Die reduzierten Hodengewichte bzw. -volumina nach der Immunisierung konnten somit nicht auf Veränderungen des prozentualen Anteils der Tubuli oder des Interstitiums zurückgeführt werden.

5.3.2.2 Parameter der Tubuli

Die Tubuli der 3 Gruppen wurden morphologisch näher charakterisiert hinsichtlich der Tubulusradien, der Radien der Tubuluslumina sowie der Tubulusfläche bzw. der Fläche der jeweiligen Tubuluslumina. Außerdem wurden Keimepithelhöhe und -fläche sowie der Anteil (%) des Keimepithels an der gesamten Tubulusfläche ermittelt.

Zusätzlich sollten Tubulusgewicht, Keimepithelgewicht, Tubulusvolumen sowie die Gesamtlänge der Tubuli Aufschluß über den morphologischen Status des Hodengewebes der 3 Gruppen geben.

Tabelle 5.8 zeigt die Gruppenmittelwerte dieser Parameter für Eber, immunisierte Eber und $17\beta E_2$ -infundierte, immunisierte Eber.

Tabelle 5.8 Parameter der Tubuli des Hodens für Eber (n=5), immunisierte Eber (n=5) und 17 β E₂-infundierte, immunisierte Eber (n=6) (Mittelwerte \pm SEM)

	Eber	Immunisierte Eber	17 β E ₂ -infundierte immunisierte Eber
Tubulusradius (μ m)	167,7 \pm 8,4 ^a	89,9 \pm 2,6 ^b	87,6 \pm 2,0 ^b
Lumenradius (μ m)	52,4 \pm 4,3 ^a	38,3 \pm 3,2 ^a	43,6 \pm 1,4 ^a
Tubulusgewicht (g)	244,6 \pm 11,6 ^a	89,0 \pm 8,2 ^b	126,0 \pm 15,0 ^b
Tubuluslänge (km)	3,65 \pm 0,4 ^a	2,83 \pm 0,5 ^a	5,04 \pm 0,6 ^a
Keimepithelhöhe (μ m)	94,3 \pm 4,2 ^a	51,54 \pm 1,2 ^b	44,25 \pm 2,0 ^c
%Keimepithel je Tubulus	81,3 \pm 4,3 ^a	81,5 \pm 3,4 ^a	75,0 \pm 1,6 ^a
Keimepithelgewicht (g)	197,5 \pm 10,2 ^a	67,72 \pm 5,0 ^b	93,1 \pm 9,5 ^b

Verschiedene Buchstaben ^{abc} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen

Tubulusradius, Tubulusgewicht, Keimepithelgewicht: $p \leq 0,001$

Keimepithelhöhe: $p \leq 0,001$ (Eber vs. 17 β E₂-infundierte Eber); $p \leq 0,01$ (Eber vs. immunisierte Eber); $p \leq 0,05$ (immunisierte Eber vs. 17 β E₂-infundierte Eber).

Durch die Immunisierung waren die Radien der Tubuli deutlich reduziert. So wiesen die immunisierten Eber nur noch etwa die Hälfte des Tubulusdurchmessers der intakten Eber auf. Demgegenüber sind die Radien der Tubuluslumina unverändert im Vergleich zwischen Eber und immunisiertem Tier. Auch die rechnerisch ermittelte Gesamtlänge der Tubuli ändert sich nicht. Deshalb muss die Reduktion der Tubulusradien primär durch eine Veränderung des Keimepithels bedingt sein.

Bei näherer Betrachtung des Keimepithels fällt allerdings auf, dass der Anteil, den das Keimepithel am Tubulus einnimmt, unverändert blieb im Vergleich zwischen Ebern und immunisierten Ebern. Die Keimepithelhöhe und das Keimepithelgewicht dagegen sind durch die Immunisierung deutlich um 45% bzw. 67% reduziert.

Die 17 β E₂-infundierten, immunisierten Eber unterscheiden sich nur schwach von den immunisierten Tieren. Ausschließlich die Keimepithelhöhe ist im Vergleich zu den immunisierten Ebern noch einmal um etwa 14% gesunken. Dies vermittelt den Eindruck, dass die Spermatogenese durch die Estradiol-Infusion zu einem noch stärkeren Ausmaß inhibiert wäre, als durch die GnRH-Immunisierung. Tatsächlich

aber ergibt sich der zusätzliche Verlust an Keimepithelhöhe durch eine Verschiebung der Stadien des Keimepithelzyklus (s. 5.3.2.4).

5.3.2.3 Parameter des Interstitiums

Zur Charakterisierung des Interstitiums der drei Gruppen wurden Volumina und Gewichte des Leydigzellkernes und des Leydigzellplasmas sowie das Volumen aller Leydigzellen je Hoden bestimmt. Die Leydigzellzahl je Tier sollte zusätzlich Aufschluß über mögliche Leydigzellverluste durch die Immunisierung geben. Durch Erfassung des „Nicht-Leydigzell-Interstitiums“ wurde eine mögliche Zunahme an Bindegewebe nach der Immunisierung erfasst.

Tabelle 5.9 gibt einen Überblick über die erfassten Parameter des Interstitiums für Eber, immunisierte Eber und 17 β E₂-infundierte, immunisierte Eber.

Tabelle 5.9 Morphologische Parameter des Interstitiums des Hodens für Eber (n=5), immunisierte Eber (n=5) und 17 β E₂-infundierte, immunisierte Eber (n=6) (Mittelwerte \pm SEM)

	Eber	Immunisierte Eber	17 β E ₂ -infundierte immunisierte Eber
Interstitiumvolumen (cm ³)	94077 \pm 6992 ^a	23682 \pm 4801 ^b	32516 \pm 4328 ^c
Nicht-Leydigzell-Interstitium (μ m ³)	43903 \pm 12694 ^a	18137 \pm 5213 ^b	23509 \pm 36700 ^b
Leydigzell-			
volumen/Hoden (μ m ³)	40578 \pm 4782 ^a	5545 \pm 783 ^b	9007 \pm 1218 ^b
Leydigzellkern-			
volumen(μ m ³)	157 \pm 6 ^a	56 \pm 6 ^b	41 \pm 3 ^b
gewicht (g)	41 \pm 3 ^a	8 \pm 2 ^b	6 \pm 1 ^b
Leydigzellplasma-			
volumen(μ m ³)	2079 \pm 349 ^a	203 \pm 25 ^b	138 \pm 19 ^b
gewicht (g)	9 \pm 1 ^a	3 \pm 0.5 ^b	2 \pm 0.3 ^b
Leydigzellzahl je Hoden ($\times 10^{10}$)	5 \pm 1 ^a	6 \pm 2 ^a	6 \pm 1 ^a

Verschiedene Buchstaben ^{abc} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede ($p \leq 0,001$) zwischen den Gruppen.

Da gewebefreie Flächen hier nicht berücksichtigt wurden, war der Anteil des Nicht-Leydigzell-Interstitiums, sowie auch das gesamte Interstitiumvolumen nach der Immunisierung signifikant reduziert. Allerdings wiesen die immunisierten und die 17 β E₂-infundierten Eber wesentlich mehr Löcher (gewebefreie Fläche) in ihrem

Interstitium auf als die Eber. Zurückzuführen ist die Abnahme des Interstitiumvolumens auf signifikante Veränderungen der Leydigzellparameter. So sank das Leydigzellvolumen je Hoden bedingt durch die Immunisierung um 76-88%. Die Leydigzellen der immunisierten Eber bestanden fast ausschließlich aus dem Leydigzellkern. Das Leydigzellplasma, welches die für die Steroidbiosynthese notwendigen Enzyme enthält, war nahezu verschwunden. So enthielten Leydigzellen aus der Gruppe der immunisierten Eber nur noch etwa 10% des Leydigzellplasmas verglichen mit einer Leydigzelle aus der Gruppe der intakten Eber. Auch der Leydigzellkern war nach der Immunisierung aufgrund der nicht mehr stattfindenden Steroidbiosynthese um etwa die Hälfte reduziert. Während also die Leydigzellen hinsichtlich Volumina und Gewichten in Anpassung an den inaktiven Zustand deutlich reduziert waren, blieb die Leydigzellzahl je Hoden nach der Immunisierung nahezu konstant. Lediglich tierindividuelle Schwankungen verursachten geringe Unterschiede zwischen den Gruppenmittelwerten. Die $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Tiere unterschieden sich in ihren Leydigzellparametern nicht oder nur geringfügig von den immunisierten Ebern.

5.3.2.4 Stadien des Keimepithelzyklus

Die Verteilung der Stadien des Keimepithelzyklus wurde vergleichend bei Ebern, immunisierten Ebern und $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Ebern bestimmt. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Stadien in Tabelle 5.10 nach Garcia-Gil et al. (2002) in prämeiotische (I, II, III) meiotische (IV, V/VI) und postmeiotische (VII, VIII) Stadien eingeteilt dargestellt.

Tabelle 5.10 Prozentualer Anteil der Zellstadien des Keimepithelzyklus bei Ebern (n=5), immunisierten Ebern (n=5) und 17 β E₂-infundierten, immunisierten Ebern (n=6) (Mittelwerte \pm SEM von 100 ausgewerteten Tubuli je Tier)

	Eber	Immunisierte Eber	17 β E ₂ -infundierte, immunisierte Eber
Prämeiotische Stadien (I, II, III)	25,8 \pm 1,4 ^a	41,7 \pm 3,2 ^b	45,5 \pm 4,0 ^b
Meiotische Stadien (IV, V/VI)	20,0 \pm 1,5 ^a	16,0 \pm 2,1 ^a	7,3 \pm 0,7 ^b
Postmeiotische Stadien (VII, VIII)	54,1 \pm 2,3 ^a	42,6 \pm 3,2 ^a	47,2 \pm 4,2 ^a

Unterschiedliche Buchstaben ^{abc} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede (Prämeiotische Stadien: $p \leq 0,01$; meiotische Stadien: $p \leq 0,001$) zwischen den Gruppen hin.

Generell nahmen die postmeiotischen Stadien den größten Anteil am Keimepithelzyklus des Ebers ein, da sie aufgrund der Spermatidendifferenzierung die längste Zeitdauer in Anspruch nehmen. Die nur in einem sehr engen Zeitfenster stattfindenden Vorgänge der meiotischen Phase hingegen hatten einen sehr geringen Anteil an den Stadien des Keimepithelzyklus.

Durch die Immunisierung kam es zu einem signifikanten Anstieg der prämeiotischen Stadien (charakterisiert durch mitotische Teilungen der Spermatogonien, Freisetzung der elongierten Spermatiden ins Lumen sowie Differenzierungsvorgänge der runden Spermatiden), während sowohl meiotische als auch postmeiotische Stadien keine signifikanten Unterschiede zeigten. Die Infusion von Estradiol ließ die gehäuft auftretenden Stadien der prämeiotischen Phase bei den immunisierten Tieren leicht, allerdings nicht signifikant ansteigen. Die meiotische Phase, d.h. die Phase, in der die 1. und die 2. Reifeteilung stattfinden, war nach der Estradiol-Infusion signifikant reduziert. In der postmeiotischen Phase, d.h. der Phase, die primär durch die Differenzierung der Spermatiden gekennzeichnet ist, unterschieden sich die drei Gruppen nicht. Hierdurch erklärt sich auch die durch die Estradiolinfusion unter 5.3.2.2 beschriebene zusätzliche Abnahme der Keimepithelhöhe. Die bei den 17 β E₂-infundierten, immunisierten Ebern gehäuft auftretenden prämeiotischen Stadien

weisen nämlich im Vergleich zu den meiotischen eine wesentlich geringere Keimepithelhöhe auf.

In Abbildung 5.9 ist die Verteilung der Stadien innerhalb der drei Phasen für Eber, immunisierte Eber und $17\beta E_2$ -infundierte, immunisierte Tiere verdeutlicht.

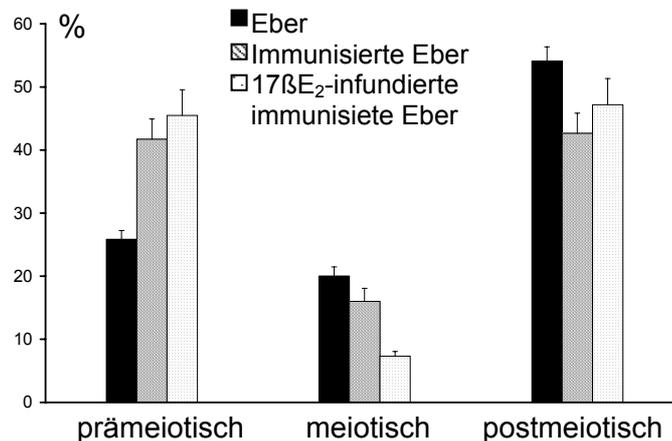


Abbildung 5.9 Prozentuale Verteilung der drei Phasen des Keimepithelzyklus für Eber (n=5), immunisierte Eber (n=5) und $17\beta E_2$ -infundierte, immunisierte Eber (n=6) (Mittelwerte \pm SEM von insgesamt 700 ausgezählten Tubuli)

5.3.2.5 Keimzellzahlen

Die Anzahl der A- und B-Spermatogonien, der primären Spermatozyten, der runden sowie der elongierten Spermatiden wurde in den Tubuli von Ebern, immunisierten Ebern und $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Ebern bestimmt.

Tabelle 5.11 zeigt die Häufigkeit der einzelnen Keimzellen innerhalb der Tubuli für die drei Gruppen.

Tabelle 5.11 Häufigkeit der einzelnen Keimzellen (Zellen/Tubulus) bei Ebern (n=5), immunisierten Ebern (n=5) und 17 β E₂-infundierten, immunisierten Ebern (n=5) (Gruppenmittelwerte \pm SEM von 40 Tubuli je Tier)

	Eber	Immunisierte Eber	17 β E ₂ -infundierte, immunisierte Eber
A-Spermatogonien [‡]	8,2 \pm 0,4 ^a	7,8 \pm 0,4 ^a	4,4 \pm 0,3 ^b
B-Spermatogonien [‡]	42,1 \pm 3,8 ^a	16,1 \pm 1,7 ^b	26,2 \pm 1,9 ^c
Primäre Spermatozyten [†]	54,9 \pm 3,9 ^a	21,2 \pm 1,6 ^b	36,0 \pm 3,6 ^c
Runde Spermatisden [‡]	130,6 \pm 8,8 ^a	48,9 \pm 6,1 ^b	107,4 \pm 11,9 ^c
Elongierte Spermatisden [†]	77,8 \pm 2,9 ^a	33,2 \pm 1,1 ^b	67,1 \pm 5,0 ^c

Verschiedene Buchstaben ^{abc} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen

[‡] = p \leq 0,001

[†] = p \leq 0,01

Mit Ausnahme der A-Spermatogonien sind durch den Mangel an Gonadensteroiden nach der GnRH-Immunsisierung alle Keimzellen signifikant um 58-62% reduziert. Durch die Estradiol-Infusion stieg die Anzahl der Keimzellen wieder. Keimzellzahlen wie sie beim Eber vorkommen wurden nicht erreicht, so dass die Zahlen für die 17 β E₂-infundierten, immunisierten Eber zwischen den Ebern und den immunisierten Ebern lagen. Somit kam es zu einer Zunahme an Keimzellen durch die Estradiolinfusion um 41-54%. Die A-Spermatogonien allerdings blieben durch die Immunsisierung unbeeinflusst und wiesen dann bei den 17 β E₂-infundierten, immunisierten Tieren sogar nur die Hälfte der A-Spermatogonien von Eber und immunisiertem Eber auf.

Abbildung 5.10 zeigt beispielhaft den Tubulus eines Ebers, eines immunisierten und eines 17 β E₂-infundierten, immunisierten Ebers während Stadium VIII des Keimepithelzyklus (1000-fache Vergrößerung).

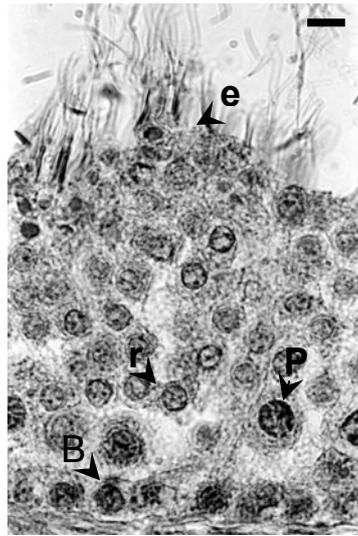


Abbildung 5.10a Tubulus eines intakten Ebers während Stadium VIII des Keimepithelzyklus (Balken = 4 μm). B = B-Spermatogonien, P = Primäre Spermatozyten, r = runde Spermatiden, e = elongierte Spermatiden

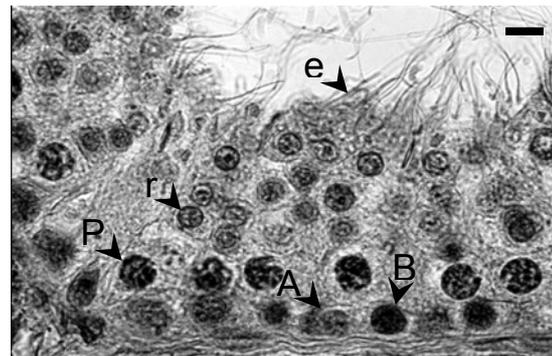
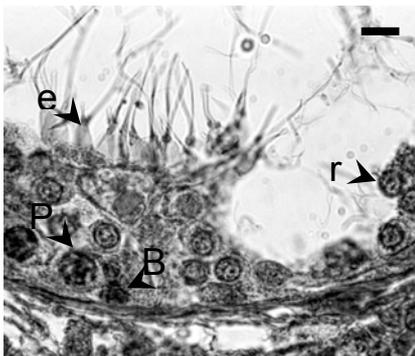


Abbildung 5.10b Tubulus eines immunisierten Ebers (links) und eines $17\beta\text{E}_2$ -infundierten, immunisierten Ebers (rechts) während Stadium VIII des Keimepithelzyklus (Balken = 4 μm). A = A-Spermatogonien, B = B-Spermatogonien, P = Primäre Spermatozyten, r = runde Spermatiden, e = elongierte Spermatiden, S = Sertolizellkern

5.3.3 Beeinflussung cytologischer und immuncytochemischer Parameter des Hodens durch GnRH-Immunsierung und anschließende Estradiolinfusion

Mit Hilfe der cytologischen und immuncytochemischen Parameter sollten Rückschlüsse auf Regelprozesse im Organismus ermöglicht werden, die in enger Abhängigkeit zueinander stehen. Daher sollen diese Phänomene hier zusammenhängend besprochen werden. Im ersten Teil werden Effekte der durch GnRH-Immunsierung bedingten Hodenregression auf das Glucocorticoid vermittelte Mitose-Apoptose-Gleichgewicht im Hoden dargestellt. Im zweiten Teil werden vergleichend Auswirkungen einer Estradiolinfusion an GnRH-immunisierte Eber charakterisiert.

5.3.3.1 GnRH-Immunsierung

Mitose, GCR und Apoptose wurden für Eber und immunisierte Eber an jeweils 100 Tubuli bestimmt. In Tabelle 5.12 sind die absoluten Zahlen positiver Zellen je Tubulus für Mitose, GCR und Apoptose dargestellt.

Tabelle 5.12 Positive Zellen je Tubulus für Mitose, GCR und Apoptose bei Ebern (n=5) und immunisierten Ebern (n=5) (Mittelwerte \pm SEM von 100 Tubuli je Tier)

	Eber	Immunisierte Eber
Mitose	13,7 \pm 1,1 ^a	7,4 \pm 0,7 ^b
GCR	0,67 \pm 0,2 ^a	2,48 \pm 0,54 ^b
Apoptose	0,29 \pm 0,02 ^a	0,59 \pm 0,03 ^b

Verschiedene Buchstaben ^{ab} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Mitose, GCR: $p \leq 0,05$; Apoptose: $p \leq 0,001$.

Die Mitoserate war durch die Immunsierung um etwa die Hälfte reduziert. Demgegenüber waren die GCR-positiven Zellen nahezu vervierfacht. Zusätzlich kam es zu einer Verdopplung der apoptotischen Zellen bei den immunisierten Ebern.

Tabelle 5.13 zeigt zusätzlich die Verteilung der GCR- und TUNEL-positiven Zellen auf die verschiedenen Keimzelltypen.

Tabelle 5.13 Zugehörigkeit GCR- und TUNEL-positiver Zellen zu den Keimzelltypen von Ebern (n=5) und immunisierten Ebern (n=5) (Mittelwerte \pm SEM von 100 Tubuli je Eber)

	Zelltyp	Eber	Immunisierte Eber
GCR	A-Spermatogonien	0,31 \pm 0,13 ^a	0,65 \pm 0,18 ^a
	B-Spermatogonien	0,69 \pm 0,17 ^a	1,86 \pm 0,39 ^b
Apoptose	A-Spermatogonien	0,04 \pm 0,01 ^a	0,03 \pm 0,01 ^a
	B-Spermatogonien	0,14 \pm 0,03 ^a	0,21 \pm 0,04 ^b
	Primäre Spermatozyten	0,17 \pm 0,02 ^a	0,31 \pm 0,03 ^b

Verschiedene Buchstaben ^{ab} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. GCR, Apoptose: $p \leq 0,05$.

Sowohl bei Ebern als auch bei immunisierten Ebern konnte der GCR ausschließlich in A- und B-Spermatogonien nachgewiesen werden, nicht jedoch in Spermatozyten und Spermatischen. Apoptotische Zellen waren ebenfalls die A- und B-Spermatogonien, aber zusätzlich die primären Spermatozyten. Auch bei einigen runden und elongierten Spermatischen waren apoptotische Zellen zu finden. Die Zahl war allerdings so gering, dass sie nicht quantitativ ausgewertet werden konnte. In Abbildung 5.11, 5.12 und 5.13 sind beispielhaft an einem immunisierten Eber Mitose-, GCR- und TUNEL-positive Keimzellen dargestellt.

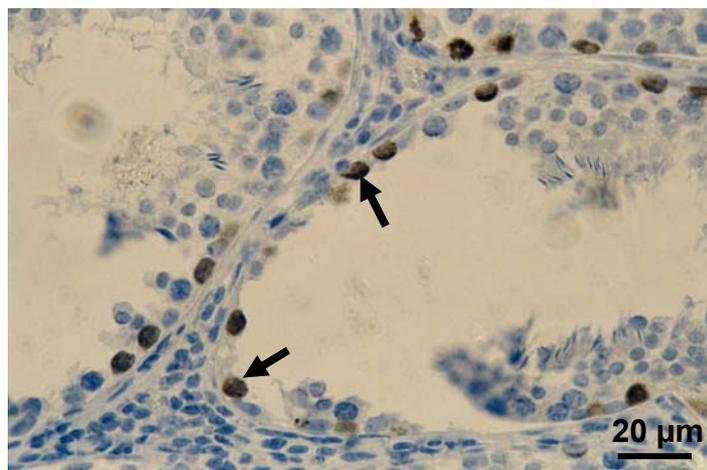


Abbildung 5.11 Repräsentatives Bild einer Ki-67 Färbung in den Tubuli eines immunisierten Ebers. Pfeile markieren die positiven Zellen. (Balken = 20 μ m)

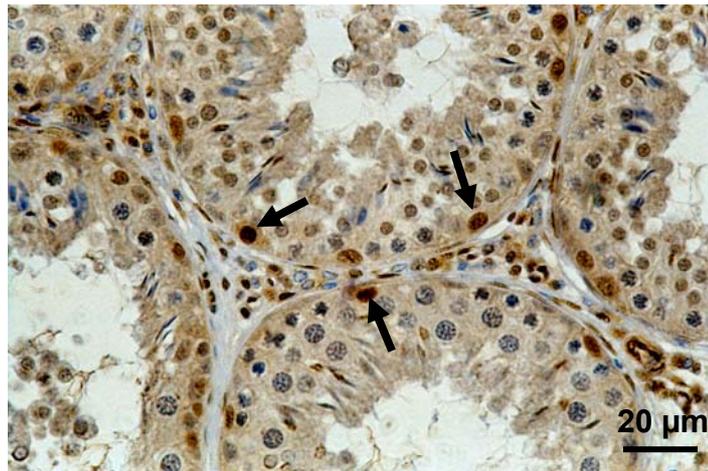


Abbildung 5.12 Repräsentatives Bild einer GCR Färbung in den Tubuli eines immunisierten Ebers. Pfeile markieren GCR-positive Zellen im Spermatogonienbereich. (Balken = 20 µm).

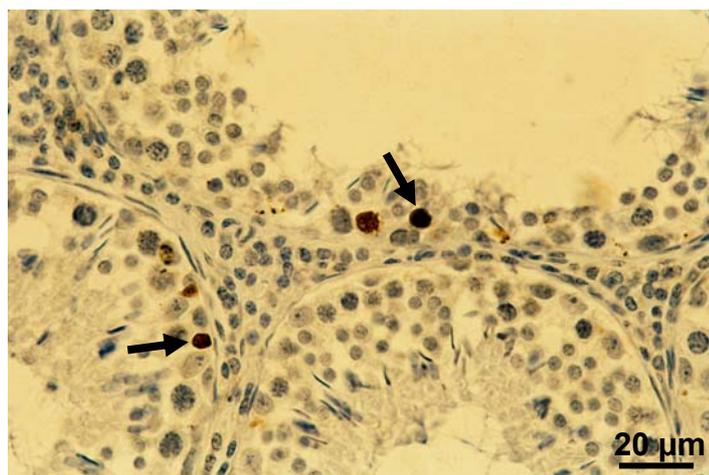


Abbildung 5.13 Repräsentatives Bild der TUNEL Färbung in den Tubuli eines immunisierten Ebers. Pfeile markieren positiv gefärbte Zellen. (Balken = 20 µm).

5.3.3.2 Estradiolinfusion

Um Aussagen über eine Wirkung der Estrogene treffen zu können, wurde zunächst die Verteilung des Estrogenrezeptors α im Hodengewebe $17\beta E_2$ -infundierter immunisierter Eber immunocytochemisch bestimmt und vergleichend zu Ebern und immunisierten Ebern quantifiziert.

Die Expression des $ER\alpha$ in den Tubuli beschränkte sich ausschließlich auf die Spermatogonien wie in Abbildung 5.14 an einem $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Eber beispielhaft dargestellt ist.

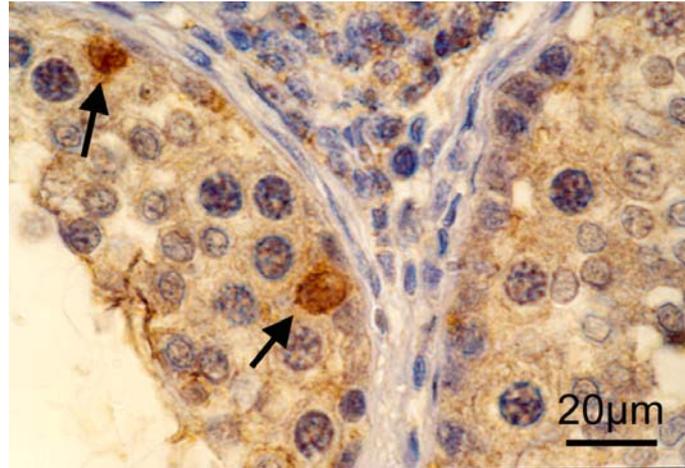


Abbildung 5.14 Lokalisierung des ER α im Hodengewebe eines 17 β E₂-infundierten, immunisierten Ebers. Pfeile deuten auf ER α -positive Zellen (Balken =20 μ m)

Die ER α -Expression im Spermatogonienbereich wurde in Gießen durch in situ-Hybridisierung sowie mittels laser assisted cell picking bestätigt. Der ER β hingegen wird laut der Ergebnisse von O. Lekhota aus Gießen ausschließlich in den Sertolizellen und nicht im Keimzellbereich exprimiert (Lekhota et al. eingereicht). Zusätzlich ergab sich eine streng den Stadien des Keimepithelzyklus folgende Verteilung der Estrogenrezeptoren. So konzentrierte sich der Großteil der ER α -Expression bei Ebern, immunisierten und auch bei 17 β E₂-infundierten, immunisierten Ebern auf Stadium I des Keimepithelzyklus, so dass nur dieses Stadium für die Quantifizierung ER α -positiver Zellen herangezogen wurde. In diesem Stadium finden während der Spermatogenese die mitotischen Teilungen statt. Die Lokalisation von GCR in den Keimzellen der 17 β E₂-infundierten Eber beschränkte sich ausschließlich auf die Spermatogonien und war damit identisch zu Ebern und immunisierten Ebern. Auch apoptotische Keimzellen wurden wie bei Ebern und immunisierten Ebern in Spermatogonien und Spermatozyten nachgewiesen. Tabelle 5.14 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Auswertung von Mitose, GCR, Apoptose und ER α für die 17 β E₂-infundierten, immunisierten Eber. Vergleichend sind die Ergebnisse der Eber und immunisierten Eber für Mitose, GCR und Apoptose aus Tabelle 5.12 hier erneut aufgegriffen.

Tabelle 5.14 Mitose, GCR, Apoptose und ER α bei Ebern (n=5), immunisierten (n=5) und 17 β E₂-infundierten, immunisierten Ebern (n=6) (Mittelwerte \pm SEM von 100 Tubuli je Tier).

	Eber	Immunisierte Eber	17 β E ₂ -infundierte, immunisierte Eber
Mitose	13,7 \pm 1,10 ^a	7,4 \pm 0,72 ^b	9,0 \pm 0,88 ^c
GCR	0,67 \pm 0,20 ^a	2,48 \pm 0,54 ^b	1,46 \pm 0,17 ^c
Apoptose	0,29 \pm 0,02 ^a	0,59 \pm 0,03 ^b	0,61 \pm 0,03 ^b
ERα	1,04 \pm 0,16 ^a	0,64 \pm 0,09 ^a	1,47 \pm 0,31 ^b

Unterschiedliche Buchstaben ^{abc} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Mitose, GCR, ER α : $p \leq 0,05$; Apoptose: $p \leq 0,001$.

Durch die Estradiolinfusion steigt die durch die Immunisierung reduzierte Mitoserate wieder deutlich an. Die 17 β E₂-infundierten, immunisierten Eber wiesen zwar immer noch 34% weniger Mitose auf als die intakten Eber, lagen allerdings signifikant über der geringen Mitoserate der immunisierten Tiere. Demgegenüber veränderte sich allerdings die Apoptoserate durch die Estradiolinfusion nicht. Die GCR-positiven Zellen lagen wiederum zwischen Ebern und immunisierten Ebern.

ER α -positive Zellen waren bei den 17 β E₂-infundierten, immunisierten Ebern deutlich mehr zu finden als bei den anderen beiden Gruppen. Zwischen Ebern und immunisierten Ebern waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen, obwohl die Zahl ER α -positiver Zellen tendenziell abnahm. Aufgrund der relativ großen tierindividuellen Schwankungen kann dies aber durchaus an der geringeren Tierzahl liegen.

Die Lokalisation des ER α in den Spermato gonien, den mitotisch aktiven Keimzellen im Hoden, und der Anstieg der Mitoserate im Hoden GnRH-immunisierter Eber nach der Estradiolinfusion (s. Tabelle 5.14) ist offensichtlich für die Mitose von Bedeutung. Also wurden Mitose und ER α -Expression in Zusammenhang gebracht und in Bezug

zu den Stadien des Keimepithelzyklus ausgewertet wie in Abbildung 5.15 dargestellt ist.

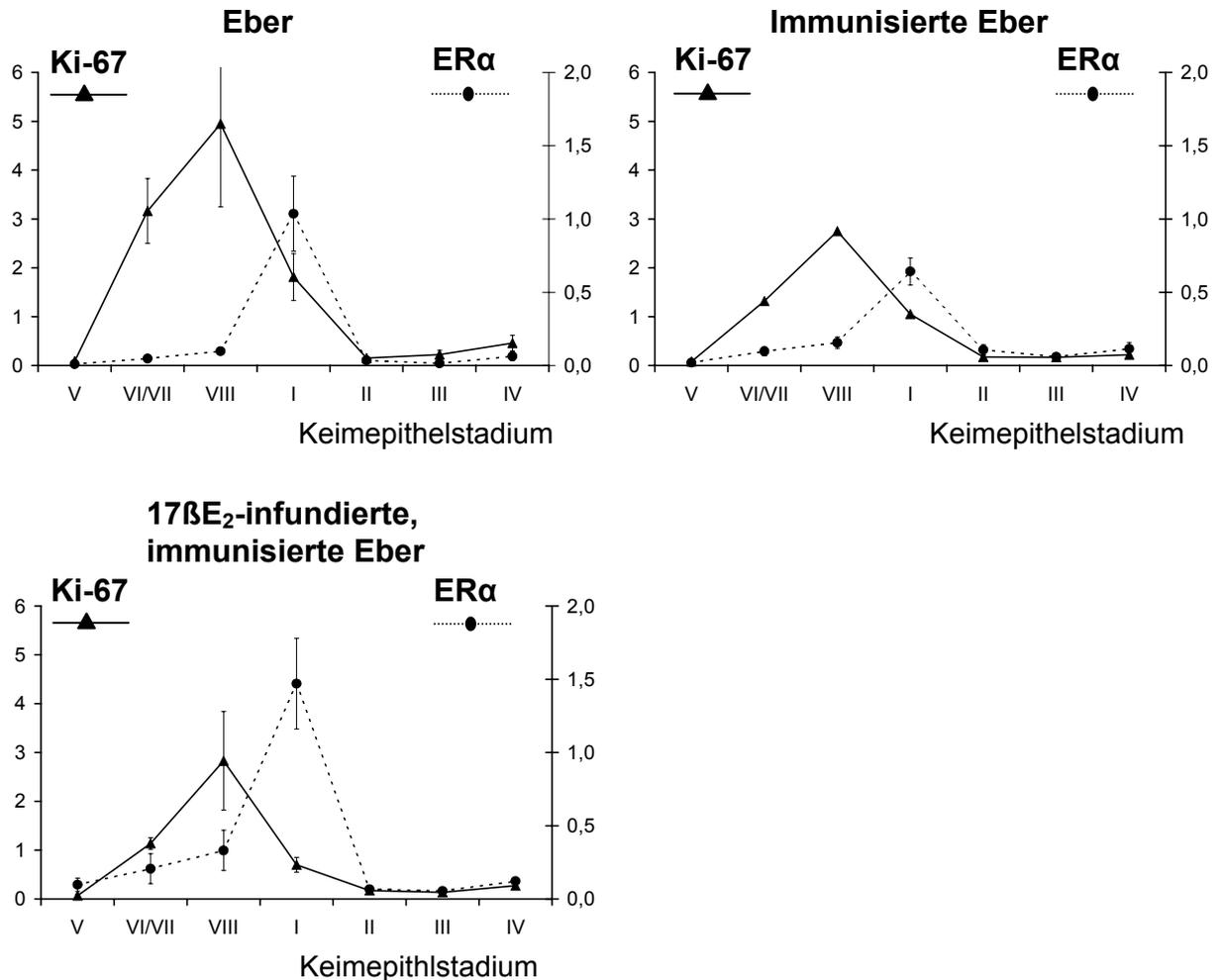


Abbildung 5.15 Verteilung des ERα und der Mitose über die Stadien des Keimepithelzyklus von Ebern (n=5) (a), immunisierten Ebern (n=5) (b) und 17βE₂-infundierten, immunisierten Ebern (n=6) (c) (Mittelwerte ± SEM)

Auffällig bei allen drei Gruppen sind maximale Zellzahlen der Ki-67 positiven Zellen in Stadium VIII des Keimepithelzyklus, gefolgt von einem Maximum der ERα-Expression in Stadium I. Die Verläufe beider Parameter über den Keimepithelzyklus weisen eine Korrelation von 0.98 auf. Der frühere Anstieg der Ki-67-positiven Zellen ist durch den Zellzyklus erklärbar. So wird der Ki-67 von allen mitotischen Zellen außer in der G₀-Phase exprimiert. Die G₁-Phase ist die längste Phase während des Mitoseablaufs, die tatsächliche Teilung der Zellen findet allerdings in der wesentlich kürzeren G₂-Phase statt. Dies führt zu der Phasenverschiebung der maximalen Ki-

67-Expression auf Stadium VIII, wobei allerdings die mitotische Teilung erst in Stadium I stattfindet.

6 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst Mechanismen dargestellt werden, über die eine durch aktive Immunisierung gegen GnRH induzierte Hodenregression gesteuert wird. Darauf aufbauend sollte durch Estradiolinfusion an GnRH-immunisierte Eber die Bedeutung der Estrogene für die Spermatogeneseregulation beim Eber näher charakterisiert werden. In einer zusätzlichen Fragestellung sollten feed back Effekte der Estrogene auf die FSH-Konzentrationen maturer und pubertärer Eber charakterisiert werden.

Zur Klärung der ersten beiden Fragestellungen wurden 5 intakte Eber mit 5 immunisierten und 6 Estradiol-infundierten, immunisierten Ebern verglichen. Die Immunisierung fand im Alter von 20 Wochen statt, so dass alle Zellen im Hoden der Eber bereits ihre volle Funktion aufgenommen hatten. Um Klarheit über feed back Effekte auf FSH zu bekommen, wurden die FSH-Konzentrationen maturer und pubertärer Kastraten mit denen Estradiol infundierter Kastraten verglichen.

6.1 Steuerungsmechanismen der Hodenregression beim Eber nach einer GnRH-Immunisierung

6.1.1 Hormonstatus

Die GnRH- Immunisierung führte, vergleichbar zu diversen anderen Studien (Caraty & Bonneau 1986, Falvo et al. 1986, Grizzle et al. 1987, Awoniyi et al. 1988b, Metz et al. 2002, Zeng et al. 2002) zu einer deutlichen Reduktion der **LH**-Konzentrationen im peripheren Blutplasma. Die niedrigen LH-Konzentrationen blieben über den gesamten Versuchszeitraum aufrechterhalten. Auch bei anderen Spezies (Ratte, Bulle, Schafbock) ist die praktisch vollständige Unterdrückung der LH-Konzentrationen durch die GnRH-Immunisierung beschrieben (Ratte: McLachlan et al. 1994a, 1995, Bulle: Finnerty et al. 1998, Schafbock: Brown et al. 1994).

Aufgrund der fehlenden LH-Sekretion in der Hypophyse unterblieb auch die **Gonadensteroidproduktion** in den Leydigzellen. Androgen- und Estrogenkonzentrationen lagen nahe der Nachweisgrenze. Gleichsinnig verhalten sich die Konzentrationen des Steroids Androstenon in Blutplasma und Fettgewebe. Androstenon ist das Pheromon des Ebers mit einem stechenden, urinartigen Geruch

und stellt den Anlass dar, warum die GnRH-Immunisierung als Kastrationsverfahren etabliert wurde (Metz 2003).

Die Effekte der GnRH-Immunisierung auf die Konzentrationen von Testosteron sind in der Literatur vielfach beschrieben. Speziesübergreifend sinken die Testosteronkonzentrationen auf Minimalwerte (Bulle: Finnerty et al. 1998, Ratte: McLachlan et al. 1994a, 1995, Eber: Falvo et al. 1986, Grizzle et al. 1987, Awoniyi et al. 1988b).

Die Estradiolkonzentrationen waren nach der Immunisierung um 88,5 % reduziert. Eber und immunisierte Eber wiesen damit in etwa gleiche Relationen der Estradiolkonzentrationen im peripheren Blutplasma auf wie bei Metz & Claus (2003) beschrieben. Als Folge der inhibierten Steroidsynthese in den Leydigzellen ist dieser Abfall der Estradiolkonzentrationen in Zusammenhang mit den erniedrigten Testosteronwerten allerdings auch zu erwarten.

Die **FSH**-Konzentrationen waren durch die GnRH-Immunisierung nicht beeinflusst: Eber und immunisierte Eber wiesen, von tierindividuellen Schwankungen abgesehen gleich hohe FSH-Konzentrationen im peripheren Blutplasma auf.

Ähnlich konnten auch Awoniyi et al. (1988b) bei Ebern und Rabb et al. (1990) bei Ponywallachen keine Beeinflussung der FSH-Konzentrationen im peripheren Blutplasma nach einer GnRH-Immunisierung feststellen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einer anderen Studie beim Schwein, in der eine deutliche Reduktion der FSH-Konzentrationen im Blutplasma nachgewiesen wurde (Caraty & Bonneau 1986). Auch bei Bulle, Schafbock und Ratte, sind die FSH-Konzentrationen nach einer GnRH-Immunisierung deutlich reduziert (Brown et al. 1994, McLachlan et al. 1994a, 1995, Finnerty et al. 1998).

Speziesunterschiede, aber auch die Tatsache, dass Tiere nur in bestimmten Alters- oder Gewichtsklassen mit einem FSH-Abfall auf die GnRH-Immunisierung reagieren, könnten eine mögliche Ursache sein.

Diese unterschiedlich ausgeprägte Reaktion von FSH, nicht aber von LH ist auf die grundsätzlich bekannte GnRH-unabhängige Regulation des FSH zurückzuführen. Vermutet wird ein eigener FSH-Releasing-Faktor (Awoniyi et al. 1988b, Padmanabhan & McNeilly 2001). Daneben werden auch Steuerungsmechanismen über das Aktivin-Inhibin-System diskutiert, welche zusätzlich bzw. alternativ zu GnRH in die FSH-Regulation eingreifen könnten (Brown & McNeilly 1999, Bernard &

Woodruff 2001). Auch käme eine unterschiedliche Ansprechbarkeit von LH und FSH auf feed back Effekte der Steroide auf Hypophysenebene in Frage.

6.1.2 Veränderungen auf Hodenebene

Hodenmorphologie

Die histometrischen Befunde im Hoden der intakten Eber im Rahmen dieser Arbeit stimmten im Wesentlichen mit den Ergebnissen von den an 37 Wochen alten Tieren durchgeführten Untersuchungen von Groth & Claus (1977) überein.

Die Immunisierung gegen GnRH unterdrückte effektiv die Hodenfunktion, einhergehend mit reduzierten Hodengewichten, -volumina und einer Abnahme der Keimzellen im Tubulusbereich.

Die Abnahme der Hodengewichte um etwa 70% lag in etwa bei den von Awoniyi et al. (1988a) ermittelten Werten.

Die Fläche der Leydigzellen innerhalb des Hodens sank durch die Immunisierung und die damit verbundene Stagnation der Steroidbiosynthese um etwa 75%, primär bedingt durch eine Abnahme des Leydigzellzytoplasmas. Da die Steroidbiosynthese primär in Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum abläuft (Ewing et al. 1979), erklären sich trotz Aufrechterhaltung der Leydigzellkerne die reduzierten Steroidwerte.

Die Anzahl der Leydigzellen pro Hoden änderte sich nach unseren Ergebnissen durch die GnRH-Immunisierung nicht. Durch dieses Phänomen, das speziell auch bei saisonalen Tieren auftritt (Leidl et al. 1970, Delgadillo et al. 1995), wird eine rasche Wiederaufnahme der Sexualfunktionen gewährleistet, sobald der Stimulus für die Testosteronsynthese wieder auftritt.

Sowohl Tubulusdurchmesser als auch Keimepithelhöhe waren bei den immunisierten Ebern deutlich reduziert. Die Abnahme der Keimepithelhöhe war Folge der deutlich geringeren Keimzellzahlen in den Tubuli der immunisierten Eber, wobei allerdings noch alle Keimzelltypen im Tubulusbereich anzutreffen waren. Demgegenüber führte eine GnRH-Immunisierung bei Ratten zu einer vollständigen Rückbildung der Tubuli, so dass ausschließlich Spermatogonien und Sertolizellen übrig blieben (Fraser et al. 1974). Hier ist allerdings zu berücksichtigen, dass die FSH-Konzentrationen bei Ratten durch eine GnRH-Immunisierung im Gegensatz zum Eber auch vollständig unterdrückt waren (McLachlan et al. 1994).

Vergleicht man die erstmals mit 20 Wochen immunisierten Eber mit Ebern, die präpubertär im Alter von 10 Wochen zum ersten Mal immunisiert wurden (Metz 2003), so zeigen sich deutliche Unterschiede im Ausmaß des Immunisierungseffektes. So waren in den Tubuli der jüngeren Tiere selten Keimzellen anzutreffen, die weiter entwickelt waren als Spermatogonien, während in den Hoden der älteren immunisierten Eber durchaus alle Keimzelltypen, wenn auch in geringerer Zahl, anwesend waren.

Feinsteuerung der Spermatogenese

Die **Mitose** stellt ein zentrales Phänomen bei der Spermatogenese dar, über das festgelegt wird, wie viele Keimzellen in den Spermatogeneseprozess eintreten. Als essentielles gegensteuerndes Prinzip ist die **Apoptose** von Keimzellen im Hoden seit langem bekannt und spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Spermienausbeute. Erstmals wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch eine essentielle Bedeutung der Glucocorticoide als Regulatoren der Apoptose während der Spermatogenese nachgewiesen. Alle Keimzellstadien im Tubulusbereich können von der Apoptose betroffen sein (Russell & Clermont 1977, Henriksen et al. 1995, Yazawa et al. 2000, Young & Nelson 2001, Heninger et al. 2002).

Schon aus sehr frühen Arbeiten (Regaud 1901) ist bekannt, dass nicht alle mitotisch in den Spermatogeneseprozess eintretenden Spermatogonien auch zu fertigen Spermien differenziert werden, sondern dass es im Spermatogeneseprozess unter physiologischen Bedingungen zu einer Aussonderung von Keimzellen kommt, so dass letztendlich nur etwa 25% der Spermatogonien die Entwicklung zu Spermien auch wirklich beenden. Die Apoptose gilt hier als zentrales Phänomen (Allan et al. 1987, Kerr 1992, Huckins 1978). Die Keimzelldegeneration betrifft, übereinstimmend in dieser Arbeit sowie der Literatur, vor allem Spermatogonien und Spermatozyten (Brinkworth et al. 1995, Heninger et al. 2002), so dass das Ausmaß der Spermienproduktion schon in einem frühen Entwicklungsstadium der Keimzellen reguliert werden kann. Als mögliche Ursachen für die Keimzellverluste während der Spermatogenese werden die Aussonderung defekter Keimzellen sowie die Anpassung der Keimzellzahl an die im maturen Hoden fixe Sertolizellzahl diskutiert (Huckins 1978, Johnson et al. 2000).

Durch die GnRH-Immunisierung ist die Zahl apoptotischer Zellen in den Tubuli nahezu verdoppelt, die Mitoserate hingegen ist reduziert. Beide Phänomene,

ausgelöst durch Mangel an Gonadensteroiden, sind bereits in anderen Arbeiten an Nagern (Billig et al. 1995) und Mensch (Woolveridge et al. 1998) beschrieben.

Neben der Verdopplung der Apoptoserate war aber auch die Anzahl der **Glucocorticoidrezeptor (GCR) - positiven Zellen** im Spermatogonienbereich um nahezu das Vierfache erhöht. Somit spielt der GCR eine wichtige Rolle bei den im Hoden ablaufenden Regelprozessen.

Eine Glucocorticoid-induzierte Apoptose wurde auch von Yazawa et al. (2000) beschrieben. Hier wurde durch exogene Dexamethasongaben an Ratten die Apoptose im Keimepithel deutlich erhöht. Auch andere Untersuchungen wiesen eine Glucocorticoid-induzierte Apoptose nach (Distelhorst 2002), ihre physiologische Bedeutung wurde allerdings nicht erläutert. In unseren Untersuchungen sind die Cortisolkonzentrationen zwischen Ebern und immunisierten Ebern allerdings nicht unterschieden, so dass die Wirkung des Cortisols, nämlich die Induktion der Apoptose im Keimepithel, vorrangig durch Veränderungen der Rezeptorkonzentration auf den Keimzellen zustande kommt.

Schon während eines sehr frühen Zeitpunktes der Spermatogenese, zu dem noch nicht viel „investiert“ wurde, nämlich bei Spermatogonien und Spermatozyten wird dadurch die Entscheidung für die spätere Spermienausbeute getroffen. Über eine solche Feinregulation kann somit eine schnelle Anpassung der Spermienzahlen im Ejakulat an den aktuell notwendigen Bedarf erfolgen und das Risiko von Mehrfachbefruchtungen durch zu hohe Spermienzahlen minimiert werden.

In diesem Zusammenhang ist das die Cortisol-Konzentrationen regulierende Enzym **11 β -Hydroxy Steroid Dehydrogenase 2 (11 β -HSD2)** ebenfalls von Bedeutung. In Übereinstimmung mit Untersuchungen am Menschen (Albiston et al. 1994), wurde die mRNA beider Isoformen 11 β -HSD 1 und 2 erstmals im Hoden von Ebern nachgewiesen. Dem gegenüber stehen Untersuchungen primär an Nagerspezies, bei denen ausschließlich die 11 β -HSD 1 im Hoden nachgewiesen wurde (Phillips et al. 1989, Gao et al 1997, Ge et al. 1997a, b, Ge & Hardy 2000).

Nachgewiesen wurde in unseren Untersuchungen, übereinstimmend mit diversen anderen Studien an maturaen Tieren die 11 β -HSD2 Aktivität, während nur Spuren einer reduktiven Aktivität auch unter Zugabe eines NADPH-regenerierenden Systems nachweisbar waren (Baillie et al. 1965, Koerner 1966, Bilaspuri & Guraya 1984, Walker et al. 1992, Neumann et al. 1993, Gao et al. 1997, Leckie et al. 1998).

Die vermutete physiologische Bedeutung der 11 β -HSD2 im Hoden von Ratten und auch vom Menschen, ist die Verhinderung einer durch Glucocorticoide inhibierten Steroidsynthese in den Leydigzellen (Doerr & Pirke 1976, Welsh et al. 1982, Neumann et al. 1993, Monder et al. 1994, Gao et al. 1997, Leckie et al. 1998, Kusakabe et al. 2003).

Beim Eber ist allerdings eine Wirkung im Tubulusbereich wahrscheinlicher, zumal ausschließlich hier GCR nachgewiesen worden sind. Auch ist eine Glucocorticoidwirkung auf die Leydigzellfunktion beim Schwein in vivo nicht nachweisbar (Claus, persönliche Mitteilung). Möglicherweise erfolgt eine Wirkung der 11 β -HSD2 über die Sertolizellen auf den Keimzellbereich. So könnte über dieses System zusätzlich zum Glucocorticoidrezeptor die Verfügbarkeit von Cortisol als Ligand reduziert werden und damit auch das Ausmaß der Apoptose. Durch welche Regulationsmechanismen die Enzymaktivität im Tubulusbereich bestimmt wird, ist allerdings noch nicht bekannt.

6.2 Bedeutung der Estrogene für die Spermatogenese

6.2.1 Hormonstatus

Die Infusion von Estradiol an GnRH-immunisierte Eber zeigte keinerlei Effekte auf LH- oder FSH-Konzentrationen im peripheren Blutplasma im Vergleich zu immunisierten Ebern ohne Estradiol-Infusion.

Auch die Testosteronkonzentrationen waren unverändert niedrig, so dass stimulierende Effekte der exogen substituierten Estrogene auf die Testosteronkonzentrationen ausgeschlossen werden konnten.

Die peripheren Estradiolkonzentrationen im Blutplasma stiegen auf Werte, die leicht über denen der Kontrolleber jedoch immer noch im physiologischen Bereich lagen, (Claus et al. 1983). Die hohen Estradiolkonzentrationen der ersten Woche lagen im peripheren Blutplasma in dem Bereich, welcher für den pubertären Gonadensteroidanstieg bei Ebern nachgewiesen wurde (Schwarzenberger et al. 1993).

Estradiolkonzentrationen der Tubulusflüssigkeit allerdings zeigten keine Unterschiede zu Konzentrationen von immunisierten Ebern ohne Infusion. Geht man von einer Aufrechterhaltung der Blut-Hoden-Schranke nach der Immunisierung aus, so sind diese geringen Konzentrationen durchaus erklärbar. So zeigten

Untersuchungen an Ratten, dass aus dem Blutplasma anflutende Steroide zu einem unterschiedlichen Ausmaß in die Tubulusflüssigkeit gelangen (Cooper & Waites 1975). Während Testosteron und Dehydroepiandrosteron peripher anflutend nahezu vollständig in den Tubulusbereich überführt wurden, gelangten Estrogene nur sehr bedingt in dieses Kompartiment.

Die Estradiolkonzentrationen im Hodengewebe der $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Tiere hingegen lagen signifikant über den Konzentrationen der immunisierten Tiere, so dass das infundierte Estradiol im Gleichgewicht mit im peripheren Blutplasma gemessenen Werten lag.

6.2.2 Veränderungen auf Hodenebene

Während die morphologischen Parameter zur Charakterisierung des Hodens geringe Unterschiede zu den immunisierten Ebern aufwiesen, waren die Keimzellen im Tubulusbereich durch die Estradiolinfusion im Vergleich zu den immunisierten Ebern deutlich erhöht. Die Keimzellzahlen lagen zwischen den Werten der Eber und der immunisierten Eber.

Der ER α war ausschließlich im Spermatogonienbereich während Stadium I des Keimepithelzyklus nachzuweisen, dessen Charakteristikum mitotische Teilungen der Spermatogonien sind (Frankenhuis et al. 1983, Guraya 1987, Garcia-Gil et al. 2002). O. Lekhota konnte im Rahmen ihrer Dissertation mittels RT-PCR und in situ Hybridisierung Estrogenrezeptor α ebenfalls in den Spermatogonien lokalisieren. Somit war eine Wirkung des infundierten Estradiols im Rahmen mitotischer Teilungen der Spermatogonien gewährleistet. Diese mitogenen Effekte der Estrogene im Tubulusbereich sind keineswegs überraschend, da sie aus anderen Geweben und estrogenabhängigen Tumoren durchaus bekannt sind (Altucci et al. 1997, Zhang et al. 1998). Auch für Hengst, Nager und sogar den Aal wurde eine mitosefördernde Wirkung der Estrogene bei der Spermatogenese bereits vermutet (Miura et al. 1999, O'Donnell et al. 2001 Review, Sipahutar et al. 2003).

Zusätzlich untermauert wurde die mitogene Estrogenwirkung im Tubulusbereich durch die Quantifizierung der Ki-67-positiven Zellen im Verlauf des Keimepithelzyklus. Die absolute Zahl Ki-67-positiver Zellen lag bei den Estradiol substituierten Ebern zwischen den Ebern und den immunisierten Ebern, so dass die Mitoserate zwar erhöht ist, allerdings durch die Infusion allein nicht auf das Niveau der Eber angehoben werden konnte.

In Tumorzellen wurde nachgewiesen, dass Estrogene speziell Einfluss auf die G-1-Phase der Mitose nehmen (Leung & Potter 1987a,b, Zhang et al. 1998). Der Eintritt in die mitotische Teilung findet am Ende der G-1-Phase, im Hoden zwischen Stadium VIII und I des Keimepithelzyklus statt, in dem hier auch die maximale ER α -Expression nachgewiesen wurde.

Die durch Estrogene gesteigerte Mitoserate hat aber nicht unbedingt eine Erhöhung der Spermienzahlen im Ejakulat zur Folge, denn die Apoptose im Hoden der Estradiol-infundierten Eber ist unverändert. Offensichtlich erfolgt die Apoptoseregulation unabhängig von den Estrogenen. Zu vermuten ist primär eine Bedeutung der antikatabol wirkenden Androgene.

Auch die Expressionshöhe des GCR lag bei den infundierten Tieren zwischen Ebern und immunisierten Ebern. Das gleiche gilt für die oxidative 11 β -HSD-Aktivität. Möglicherweise ist die Cortisolverfügbarkeit durch diese Erhöhung der 11 β -HSD 2 Aktivität reduziert, wodurch sich die Abnahme der Rezeptorexpression erklären ließe. Eine Beeinflussung der 11 β -HSD-Aktivität durch Estrogene ist generell auch für Plazenta und Niere untersucht, wobei selektive Estradiolwirkungen nicht beschrieben sind (Baggia et al. 1990, Smith & Funder 1991, Gomez-Sanchez et al. 2003).

6.3 Feed back Effekte auf FSH

Grundsätzlich sind feed back Effekte von Immunisierung und Estradiolinfusion auf die FSH-Konzentrationen wie sie im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden, nicht vom Alterszustand des jeweiligen Tieres abhängig, zumindest nicht zwischen Pubertät und Maturität. Pubertäre und mature Tiere verhielten sich nahezu identisch. Durch die GnRH-Immunisierung blieben die FSH-Konzentrationen ebenso unbeeinflusst wie durch die Estradiolinfusion an GnRH-immunisierte Eber. Einzig die Estradiolinfusion an Kastraten führte zu einer Verminderung des FSH im peripheren Blutplasma. Das heißt, negativer feedback scheint beim Eber eine eher untergeordnete Erklärung für die nach Immunisierung erhöht bleibenden FSH-Konzentrationen im peripheren Blutplasma zu sein. Es ist eher daran zu denken, dass die FSH-Regulation über das Inhibin/Activin-System erfolgt. Dabei dürfte eher das Activin eine Bedeutung für die FSH-Freisetzung beim Eber einzunehmen. Grundsätzlich ist eine solche Wirkung des in der Hypophyse gebildeten Activin für die FSH-Regulation nachgewiesen (Gregory & Kaiser 2004), die Übertragung auf

das Schwein allerdings bedarf zusätzlicher experimenteller Vorgehensweisen. Ausgeprägt allerdings sind altersbedingte Unterschiede der FSH-Konzentrationen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Grundsätzlich ist die Regulation der Spermatogenese bei landwirtschaftlichen Nutztieren, nicht zuletzt wegen der Bedeutung für das Verfahren der künstlichen Besamung, gut untersucht. Beim Eber ergeben sich allerdings Besonderheiten. So ist zwar bekannt, dass die hohen Mengen testikulärer Estrogene Bedeutung für verschiedene Reproduktionsfunktionen des männlichen Tieres und aufgrund hoher Konzentrationen im Ejakulat auch für das Fortpflanzungsgeschehen der Sau haben. Nicht geklärt ist allerdings eine mögliche Bedeutung der Estrogene für die Spermatogenese beim Eber. Ebenso ist unbekannt, inwieweit die aus der Nebenniere stammenden Glucocorticoide, die ebenfalls in den Samenkanälchen nachweisbar sind, Spermatogenese regulierende Funktionen haben.

Um diese Fragestellungen zu klären, wurden Eber aktiv gegen GnRH immunisiert. GnRH steht an der Spitze der hodenregulierenden endokrinen Kaskade und reguliert insbesondere die Gonadotropin-Freisetzung aus der Hypophyse.

Die Auswertung der Hormonverlaufskurven im Blutplasma ergab überraschenderweise, dass das Gonadotropin FSH durch die Immunisierung völlig unbeeinflusst blieb, während das Gonadotropin LH und damit die Steroidhormonbildung (Estrogene und Androgene) auf minimale Konzentrationen reduziert waren. Damit ergab sich die Möglichkeit, die selektive Bedeutung der Estrogene (unter Beibehaltung von FSH), näher zu untersuchen.

Hierzu kamen 3 Gruppen zum Einsatz: intakte Eber (n=5), immunisierte Eber (n=5) und 17β Estradiol-infundierte, immunisierte Eber (n=6). Alle Tiere wurden mit jeweils zwei Venenverweilkathetern versehen. Einer davon diente der Infusion, der andere der kontaminationsfreien Blutentnahme. Alle Tiere wurden über einen Versuchszeitraum von 7 Wochen mit physiologischer Kochsalzlösung infundiert. Dieser war bei den 17β Estradiol-infundierten, immunisierten Ebern eine bestimmte Menge 17β Estradiol zugesetzt. Über den gesamten Versuchszeitraum wurden Blutproben gewonnen. Am Ende des Versuchs wurden die Tiere eingeschläfert.

Die gesicherten Blutproben wurden mit etablierten radioimmunologischen Meßverfahren (LH, FSH, Testosteron, Estradiol) ausgewertet. An den für die histologische Auswertung gesicherten Gewebeproben wurden morphologische Kriterien (u.a. Tubulusdurchmesser, Keimepithelhöhe, Leydigzellzahl) bestimmt. Zudem wurden weitere immunocytochemische Parameter erfasst, die Aufschluß über funktionelle Abläufe gaben (Mitose, Apoptose, GCR).

Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Der Vergleich der Kontrolleber mit den immunisierten Ebern ergab eine etwa 60%ige Reduktion der Keimzellzahl in den Tubuli. Diese Veränderungen im Tubulusbereich lassen sich folgendermaßen erklären: Der Glucocorticoidrezeptor wurde von den Spermatogonien exprimiert, offenbar gefolgt vom Eintritt der Apoptose, die in Spermatogonien und primären Spermatozyten nachgewiesen wurde, also phasenverschoben zur Expression des Glucocorticoidrezeptors. Aufgrund dieser Befunde konnte erstmals aufgezeigt werden, dass die Glucocorticoide eine erhebliche Bedeutung für die quantitative Regulation der Spermatogenese haben dürften, indem sie gegensteuernd zur Mitose die Zahl der gebildeten Keimzellen apoptotisch reduzieren.

Der Vergleich mit der zusätzlich untersuchten Gruppe mit Estradiol-Infusion, ergab zunächst, dass die Infusion im peripheren Blutplasma zur Wiederherstellung physiologischer Estradiolkonzentrationen von etwa 230 pg/ml führte, während die Androgenkonzentrationen erwartungsgemäß sehr niedrig lagen. Damit konnte spezifisch die Rolle der Estrogene für die Spermatogenese geklärt werden. So zeigten die Daten, dass die Expression des Estrogenrezeptors α in den Spermatogonien erfolgt und zwar spezifisch in jenen Keimepithelstadien, in denen auch die mitotische Aktivität während der Spermatogenese stattfindet. Dies stimmt mit den quantitativen Befunden zur Spermatogenese überein: Die Keimzellzahlen der $17\beta E_2$ -infundierten, immunisierten Eber waren im Vergleich zu den immunisierten Ebern wieder um 41-54 % erhöht. Immerhin zeigten aber die histologischen Daten, dass eine hohe Apoptoserate nach wie vor aufrechterhalten wird und damit in Zusammenhang auch nicht die normale Zahl reifer Spermien gebildet wird. Damit konnte insgesamt erstmals geklärt werden, dass sowohl Glucocorticoide als auch Estrogene beim Schwein eine essentielle Rolle für die Spermatogenese haben. Sie wirken sich insbesondere auf das Mitose-Apoptose-Gleichgewicht in den Tubuli aus und nehmen so Einfluss auf die Spermienausbeute.

8 SUMMARY

Anna Wagner

Effects of active immunization against gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and estradiol infusion on spermatogenesis in the boar

Whereas the regulation of spermatogenesis is well known in various species, specific differences, however, exist for the boar, which require species-specific investigation. High concentrations of estrogens are synthesized in the boar testis. It is known, that they play a synergistic role for male behaviour and function of accessory sex glands. Additionally, estrogens in the ejaculate reach the female genital tract and contribute to sperm transport and ovulation in the sow. A possible involvement of estrogens in spermatogenesis, however, was not investigated so far. Similarly, high concentrations of glucocorticoids occur in the tubuli of mature boars. Their regulatory function in spermatogenesis so far is unknown.

For clarification, boars were actively immunized against GnRH. GnRH stimulates gonadotropin-release from the pituitary. The evaluation of hormone concentrations in blood plasma after GnRH immunization showed unexpectedly, that the gonadotropin FSH is not influenced, whereas LH- and in consequence steroid- (androgen and estrogen) concentrations were abolished. This offers the possibility to characterize the selective function of estrogens in the presence of FSH.

Three groups were evaluated: intact boars (n=5), immunized boars (n=5), 17 β -estradiol infused, immunized boars (n=6). All animals were fitted with indwelling cephalic vein catheters on both sides. One of them was reserved for infusion, the other one for uncontaminated blood sampling. All animals were infused with physiological saline over 7 weeks. For the 17 β Estradiol infused, immunized boars, a defined concentration of estradiol was added to the solution. Blood samples were collected over the whole 7-week period for LH, FSH, testosterone and estradiol. Blood samples were later analysed by established radioimmunological procedures. At the end of the 7-week period, all animals were killed. Tissue samples were fixed for histological examination. Morphological criteria included e.g. tubular diameter, seminiferous epithelial height and number of Leydig cells. Immunocytochemical evaluation was performed for mitosis (Ki-67), apoptosis (TUNEL) and the glucocorticoid receptor.

The number of germ cell in the tubuli was reduced by 60% in immunized boars compared to the intact controls. These changes were explained by a more pronounced expression of the glucocorticoid receptor in spermatogonia, followed by the appearance of apoptosis in spermatogonia and primary spermatocytes. In consequence these findings demonstrate for the first time an involvement of glucocorticoids in the quantitative regulation of spermatogenesis. They counteract tubular mitosis by reducing the number of germ cells by apoptosis.

In the 17 β estradiol infused group of immunized boars, the infusion led to the restoration of physiological estradiol concentrations (230 pg/ml) in peripheral blood plasma. As expected, androgen concentrations were minimal, so that the specific role of estrogens for spermatogenesis could be clarified.

Data from the histological evaluation showed, that the expression of the estrogen receptor alpha occurred in spermatogonia, selectively in the mitotic active stage of the seminiferous epithelial cycle leading to a 41-50% rise of germ cell numbers compared to immunized boars. The apoptotic rate in the tubuli of the estradiol infused boars however was not changed compared to immunized boars, so that physiological sperm numbers as they are characteristic for intact boars, were not reached.

This study shows for the first time that both glucocorticoids and estrogens play an essential role for spermatogenesis in the boar.

They are involved in the regulation of sperm yield by influencing the mitosis-apoptosis equilibrium in the tubuli of boars.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Agarwal AK, Tusie-Luna MT, Monder C & White PC** 1990 Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase using recombinant vaccinia virus. *Molecular Endocrinology* **4** 1827-1832.
- Albiston AL, Obeyesekere VR, Smith RE & Krozowski ZS** 1994 Cloning and tissue distribution of the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Molecular and Cellular Endocrinology* **105** R11-R17.
- Allan DJ, Harmon BV & Kerr JFR** 1987 Cell death in spermatogenesis. In: Perspectives on mammalian cell death. Ed: Potten CS. *London Oxford University Press* 229-258.
- Allen E** 1918 Studies on cell division in the albino rat. *Journal of Morphology* **31** 133-185.
- Altucci L, Addeo R, Cicatiello L, Germano D, Pacilio C, Battista T, Cancemi M, Petrizzi VB, Bresciani F & Weisz A** 1997 Estrogen induces early and timed activation of cyclin-dependent kinase 4, 5, and 6 and increases cyclin messenger ribonucleic acid expression in rat uterus. *Endocrinology* **138** 978-984.
- Ariyaratne S, Kim I, Mills N, Mason I & Mendis-Handagama C** 2003 Effects of ethane dimethane sulfonate on the functional structure of the adult rat testis. *Archives of Andrology* **49** 313-326.
- Aumüller G** 1978 Morphologie des Säugerhodens: Leydig-Zellen, Blut-Hoden-Schranke und Rete testis. In: Physiologie und Pathophysiologie der Hodenfunktion: Arbeitstagung Canstein. Eds. Senge T *Thieme Verlag Stuttgart* 20-40.
- Awoniyi CA, Chandrashekar V, Arthur RD, Schanbacher BD & Falvo RE** 1988a Changes in testicular morphology in boars actively immunized against gonadotropin releasing hormone. *Journal of Andrology* **9** 160-171.
- Awoniyi CA, Chandrashekar V, Arthur RD, Schanbacher BD, Amador AG & Falvo RE** 1988b Pituitary and Leydig cell function in boars actively immunized against gonadotrophin-releasing hormone. *Journal of Reproduction and Fertility* **84** 295-302.

- Awoniyi CA, Santulli R, Chandrashekar V, Schanbacher BD & Zirkin BR** 1989 Quantitative restoration of advanced spermatogenic cells in adult male rats made azoospermic by active immunization against luteinizing hormone or gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* **125** 1303-1309.
- Baggia S, Albrecht ED & Pepe GJ** 1990 Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the baboon placenta by estrogen. *Endocrinology* **126** 2742-2748.
- Baillie AH, Ferguson MM, Calman KC & McHart D** 1965 Histochemical demonstration of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Endocrinology* **33** 119-125.
- Bartlett JMS, Weinbauer GF & Nieschlag E** 1989 Differential effects of FSH and testosterone on the maintenance of spermatogenesis in the adult hypophysectomized rat. *Journal of Endocrinology* **121** 49-58.
- Bergmann M** 1987 Photoperiod and testicular function in *Phodopus sungorus*. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology* **105** 1-76.
- Bernard DJ & Woodruff TK** 2001 Inhibin binding protein in rats: alternative transcripts and regulation in the pituitary across the estrous cycle. *Molecular Endocrinology* **15** 654-667.
- Bhatnagar AS, Muler P, Schenkel L, Trunet PF, Beh I & Schieweck K** 1992 Inhibition of estrogen biosynthesis and its consequences on gonadotrophin secretion in the male. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **41** 437-443.
- Biagini G, Pich EM, Frasoldati A, Agnati LF & Marrama P** 1995 Changes in glucocorticoid receptor immunoreactivity after adrenalectomy and corticosterone treatment in the rat testis. *Journal of Endocrinological Investigation* **18** 384-390.
- Bilaspuri GS & Guraya SS** 1984 Histochemical studies on steroid dehydrogenases in the testis of the goat (*Capra hircus*). *Journal of Endocrinology* **101** 359-363.
- Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M & Hsueh AJW** 1995 Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* **136** 5-12.

- Booth WD** 1975 Changes with age in the occurrence of C19 steroids in the testis and submaxillary gland of the boar. *Journal of Reproduction and Fertility* **42** 459-472.
- Booth WD** 1988 Hormones, pheromones and sexual behaviour in the boar. *Pig News and Information* **9** 251-255.
- Borg KE, Lunstra DD & Christenson RK** 1993 Semen characteristics, testicular size, and reproductive hormone concentrations in mature duroc, meishan, fengjing, and minzhu boars. *Biology of Reproduction* **49** 515-521.
- Bradford MM** 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72** 248-254.
- Braun RE** 1998 Every sperm is sacred - or is it? *Nature Genetics* **18** 202-204.
- Brinkworth MH, Weinbauer GF, Schlatt S & Nieschlag E** 1995 Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility* **105** 25-33.
- Brodie A & Inkster S** 1993 Aromatase in the human testis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **44** 549-555.
- Brooks RI & Pearson AM** 1986 Steroid hormone pathways in the pig, with special emphasis on boar odor: a review. *Journal of Animal Science* **62** 632-645.
- Brown P & Mc Neilly AS** 1999 Transcriptional regulation of pituitary gonadotrophin subunit genes Review. *Reviews of Reproduction* **4** 117-124.
- Brown RW, Chapman KE, Edwards CRW & Seckl JR** 1993 Human placental 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase: Evidence for and partial purification of a distinct NAD-dependent isoform. *Endocrinology* **132** 2614-2621.
- Brown BW, Mattner PE, Carroll PA, Paull DR, Hoskinson RM & Rigby RDG** 1994 Immunization of sheep against GnRH early in life: effects on reproductive function and hormones in rams. *Journal of Reproduction and Fertility* **101** 15-21.
- Bubenik GA, Morris JM, Schams D & Claus R** 1982 Photoperiodicity and circannual levels of LH, FSH and testosterone in normal and castrated male, white-tailed deer. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **60** 788-793.

- Burrows H** 1949 *Biological Actions of Sex Hormones*. 2nd edition *Cambridge University Press* 351-359.
- Burton PJ, Krozowski ZS & Waddell BJ** 1998 Immunolocalization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in rat uterus: variation across the estrous cycle and regulation by estrogen and progesterone. *Endocrinology* **139** 376-382.
- Caraty A & Bonneau M** 1986 Immunisation active du porc male contre la gonadoliberine: effets sur la secretion d'hormones gonadotropes et sur la teneur en 5 α -androst-16-ene-3-one du tissu adipeux. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences/III* **303** 673-676.
- Cardone A, Comitato R, Bellini L & Angelini F** 2002 Effects of the aromatase inhibitor fadrozole on plasma sex steroid secretion, spermatogenesis and epididymis morphology in the lizard, *Podarcis sicula*. *Molecular Reproduction and Development* **63** 63-70.
- Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C, Bilinska B, Benahmed M & Levallet J** 2001 Aromatase expression in male germ cells. *Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **79** 203-208.
- Chemes H** 1986 The phagocytic function of Sertoli cells: a morphological, biochemical, and endocrinological study of lysosomes and acid phosphatase localization in the rat testis. *Endocrinology* **119** 1673-1681.
- Chen S, Wang J, Yu G, Liu W & Pearce D** 1997 Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry* **272** 14087-14092.
- Claus R** 1970 Bestimmung von Testosteron und 5 α -Adrost-16-en-3-on, einem Ebergeruchstoff bei Schweinen. Diss. Sc. Agr. TU München-Weihenstephan.
- Claus R & Hoffmann B** 1980 Oestrogens compared to other steroids of testicular origin in bloodplasma of boars. *Acta Endocrinologica* **94** 404-411.
- Claus R & Weiler U** 1994 Endocrine regulation of growth and metabolism in the pig: a review. *Livestock Production Science* **37** 245-260.

- Claus R & Weiler U** 1996 Relationships between IGF-I, cortisol, and osteocalcin in periphera plasma of growing pigs. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* **104** 344-349.
- Claus R** 1990 Physiological role of seminal components in the reproductive tract of the female pig. *Journal of Reproduction and Fertility* **40 (Suppl)** 117-131.
- Claus R, Bingel A, Hofäcker S & Weiler U** 1990 Twety-four hour profiles of growth hormone (GH) concentrations in mature female and entire male domestic pigs in comparison to mature wild boars (*sus scrofa* L.). *Livestock Production Science* **25** 247-255.
- Claus R, Dimmick MA, Gimenez T & Hudson LW** 1992 Estrogens and prostaglandin F₂ α in the semen and blood plasma of stallions. *Theriogenology* **38** 687-693.
- Claus R, Hoang-Vu C, Ellendorff F, Meyer HD, Schopper D & Weiler U** 1987 Seminal oestrogens in the boar: origin and functions in the sow. *Journal of Steroid Biochemistry* **27** 331-335.
- Claus R, Münch U, Nagel S & Schopper D** 1989 Concentration of 17 β -oestradiol, oestrone and testosterone in tissues of slaughterweight boars compared to barrows and gilts. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **40** 123-126.
- Claus R, Raab S & Lacorn M** 2001 Activities of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 in different regions of the intestinal tract of pigs. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* **109** 374-377.
- Claus R, Raab S & Dehnhard M** 1996 Glucocorticoid receptor in the pig intestinal tract and muscle tissue. *Journal of Veterinar Medicine A* **43** 553-560.
- Claus R, Schopper D & Hoang-Vu C** 1985 Contribution of individual compartements of the genital tract to oestrogen and testosterone concentrations in ejaculates of the boar. *Acta Endocrinologica* **109** 281-288.
- Claus R, Schopper D & Wagner HG** 1983 Seasonal effects on steroids in blood plasma and seminal plasma of boars. *Journal of Steroid Biochemistry* **19** 725-729.
- Clermont Y & Harvey SC** 1965 Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rats. *Endocrinology* **76** 80-89.

- Clermont Y** 1972 Kinetics of Spermatogenesis in Mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews* **52** 198-235.
- Conley AJ, Corbin CJ, Hinshelwood MM, Liu Z, Simpson ER, Ford JJ & Harada N** 1996 Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis. *Biology of Reproduction* **54** 497-505.
- Conn PM & Crowley WF** 1994 Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annual Review of Medicine* **45** 391-405.
- Cooper TG & Waites GMH** 1975 Steroid entry into rete testis fluid and the blood-testis-barrier. *Journal of Endocrinology* **65** 195-205.
- Courot M** 1980 ABP: la protéine testiculaire de liaison des androgènes. *Reproduction, Nutrition and Development* **20** 587-591.
- Culier MD & Negro-Vilar A** 1986 Evidence that pulsatile Follicle-stimulating hormone secretion is independent of endogenous luteinizing hormone releasing hormone. *Endocrinology* **118** 609-612.
- D'Occhio MJ, Gifford DR, Hoskinson RM, Weatherly T, Flavel PF, Mattner PE & Setchell BP** 1987 Reproductive hormone secretion and testicular growth in bull calves actively immunized against testosterone and oestradiol-17 beta. *Journal of Reproduction and Fertility* **79** 315-324.
- Darnel AD, Archer TK & Yang K** 1999 Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by steroid hormones and epidermal growth factor in the Ishikawa human endometrial cell line. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **70** 203-210.
- De Rooij DG** 2001 Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* **121** 347-354.
- Delgadillo JA, Hochereau-de Reviers MT, Daveau A & Chemineau P** 1995 Effect of short periodic cycles on male genital tract and testicular parameters in male goats. *Reproduction, Nutrition, Development* **35** 548-558.
- Desjardins C & Lopez MJ** 1983 Environmental cues evoke differential responses in pituitary-testicular function in deer mice. *Endocrinology* **112** 1398-1406.

- Diederich S, Grossmann C, Hanke B, Quinkler M, Herrmann M, Bähr V & Oelkers W** 2000 In the search for specific inhibitors of human 11 β -hydroxysteroid-dehydrogenase (11 β -HSDs): chenodeoxycholic acid selectivity inhibits 11 β -HSD-I. *European Journal of Endocrinology* **142** 200-207.
- Diederich S, Hanke B, Oelkers W & Baehr V** 1997 Metabolism of deamethasone in the human kidney: nicotinamide adenine dinucleotide-dependent 11 β -reduction. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82** 1598-1602.
- Distelhorst CW** 2002 Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **9** 6-19.
- Doecke F** 1994 Keimdrüsen. In: Veterinärmedizinische Endokrinologie (ed. Döcke F). Gustav Fischer Verlag Stuttgart. 399-508.
- Doerr P & Pirke KM** 1976 Cortisol-induced suppression of plasma testosterone in normal adult males. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **43** 622-629.
- Du Manoir S, Guillaud P, Carius E, Seigneurin D & Brugal G** 1991 Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry* **12** 455-463.
- Dufau ML** 1995 The luteinizing hormone receptor. In: The Leydig Cell eds: Payne AH, Hardy MP & Russell LD. Cache River Press Wien 333-350.
- Dym M & Fawcett DW** 1971 Further observations on the number of spermatogonia, spermatocytes and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testes. *Biology of Reproduction* **4** 195-215.
- Ebling FJP, Brooks AN, Cronin AS, Ford H & Kerr JB** 2000 Estrogenic induction of spermatogenesis in hypogonadal mouse *Endocrinology* **141** 2861-2869.
- Ebner von V** 1871 Untersuchungen über den Bau der Samenkanälchen und die Entwicklung der Spermatozoiden bei den Säugetieren und beim Menschen. Leipzig.
- Edwards CR, Steward PM, Burt D, Brett L, Mc Intyre MA, Sutanto WS, de Kloet ER & Monder C** 1988 Localisation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase- tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *The Lancet* **2** 986-989.

- Esbenshade KL, Vogel MJ & Traywick GB** 1986 Clearance rate of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone from peripheral circulation in the pig. *Journal of Animal Science* **62** 1649-1653.
- Esch F, Mason AJ, Cooksey K, Mercado M & Shimasaki S** 1986 Cloning and DNA sequence analysis of the cDNA for the precursor of the β chain of bovine follicle stimulating hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **83** 6618-6621.
- Evain D, Morera AM & Saez JM** 1976 Glucocorticoid receptors in interstitial cells of the rat testis. *Journal of Steroid Biochemistry* **7** 1135-1139.
- Ewing LL, Zirkin BR, Cochran RC, Kromann N, Peters C & Ruiz-Bravo N** 1979 Testosterone secretion by rat, rabbit guinea pig, dog and hamster testis perfused in vivo: correlations with leydig cell mass. *Endocrinology* **112** 1763-1769.
- Falvo RE, Chandrashekar V, Arthur RD, Kuenstler AR, Hasson T, Awoniyi C & Schanbacher BD** 1986 Effect of active immunization against LHRH or LH in boars: reproductive consequences and performance traits. *Journal of Animal Science* **63** 986-994.
- Finnerty M, Enright WJ & Roche JF** 1998 Testosterone, LH and FSH episodic secretory patterns in GnRH-immunized bulls. *Journal of Reproduction and Fertility* **114** 85-94.
- Fisher CR, Graves KH, Parlow AF & Simpson ER** 1998 Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp 19 gene. *Journal of Reproduction and Fertility* **50** 17-21.
- FlintermanJF, Nooter K & Rommerts FFG** 1994 Activation of programmed cell death in rat Leydig cells by EDS. *8th European Workshop on molecular and cellular endocrinology of the testis, De Panne, Belgien* 18 (Abstract).
- Frączek B, Kotula-Balak M, Wojtusiak A, Pierściński A & Bilińska B** 2001 Cytochrome P450 aromatase in the testis of immature and mature pigs. *Reproductive Biology* **1** 51-59.
- Franca LR, Parreira GG, Gates RJ & Russell LD** 1998 Hormonal regulation of spermatogenesis in the rat: quantitation of germ-cell population and effect of elimination of residual testosterone after long-term hypophysectomy. **19** 335-340.

- Francavilla S, D'Abrizio P, Cordeschi G, Pelliccione F, Necozone S, Ulisse S, Properzi G & Francavilla F** 2002 Fas expression correlates with human germ cell degeneration in meiotic and post-meiotic arrest of spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction* **8** 213-220.
- Frankenhuis MT, Kramer MF & de Rooij DG** 1982 Spermatogenesis in the boar. *Veterinary quarterly* **4** 57-61.
- Fraser HM, Gunn A, Jeffcoate SL & Holland DT** 1974 Effect of active immunization to luteinizing hormone releasing hormone on serum and pituitary gonadotropins, testes and accessory sex organs in the male rat. *Journal of Endocrinology* **63** 399-406.
- Free MJ & Jaffe RA** 1979 Collection of rete testis fluid from rats without previous efferent duct ligation. *Biology of Reproduction* **20** 269-278.
- Funder JW, Pearce PT, Smith R & Smith AI** 1988 Mineralocorticoid Action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* **242** 583-585.
- Gao HB, Ge RS, Lakshmi V, Marandici A & Hardy M** 1997 Hormonal Regulation of oxidative and reductive activities of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in rat leydig cells. *Endocrinology* **138** 156-161.
- Garcia-Gil N, Pinart E, Sancho S, Badia E, Bassols J, Kadar E, Briz M & Bonet S** 2002 The cycle of the seminiferous epithelium in Landrace boars. *Animal Reproduction Science* **73** 211-225.
- Garza F Jr, Thompson DL Jr, French DD, Wiest JJ, St George RL, Ashley KB, Jones LS, Mitchell PS & McNeill DR** 1986 Active immunization of intact mares against gonadotropin-releasing hormone: differential effects on secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction* **35** 347-352.
- Gavrieli Y, Shermion Y & Ben-Sasson SA** 1992 Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cellular Biology* **119** 493-501.
- Ge RS & Hardy MP** 2000 Initial predominance of the oxidative activity of type 1 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in primary rat Leydig cell and transfected cell lines. *Journal of Andrology* **21** 303-310.

- Ge RS, Gao HB, Nacharaju VL, Gunsalus GL & Hardy MP** 1997a Identification of a kinetically distinct activity of 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *Endocrinology* **138** 2435-2442.
- Ge RS, Hardy DO, Catterall JF & Hardy MP** 1997b Developmental changes in Glucocorticoid receptor and 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase oxidative and reductive activities in rat Leydig cells. *Endocrinology* **138** 5089-5095.
- Geley S, Fiegl M, Harmann BL & Kofler R** 1997 Genes mediating glucocorticoid effects and mechanisms of their regulation. In: Reviews of Physiology, biochemistry and pharmacology Eds: Blaustein MP, Grunicke H, Habermann E, Pette D, Schultz G & Schweiger M *Springer Verlag Berlin* 1-97.
- Genissel C, Levalet J & Carreau S** 2001 Regulation of cytochrome P450 aromatase gene expression in adult rat Leydig cells: comparison with estradiol production. *Journal of Endocrinology* **168** 95-105.
- Gerdes J, Lemke H, Wacker HH, Schwab J & Stein H** 1984 Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of Immunology* **133** 1710-1715.
- Gomez-Sanchez EP, Ganjam V, Chen YJ, Liu Y, Zhou MY, Toroslu C, Romero DG, Hughson MD, de Rodriguez A & Gomez-Sanchez CE** 2003 Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in the rat kidney by estradiol. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* **285** E272-E279.
- Gower DB** 1972 16-unsaturated C19-steroids: a review of their chemistry, biochemistry and possible physiological role. *Journal of Steroid Biochemistry* **3** 45-103.
- Grandjean V, Sage J, Ranc F, Cuzin F & Rassoulzadegan M** 1997 Stage-specific signals in germ line differentiation: control of Sertoli cell phagocytic activity by spermatogenic cells. *Developmental Biology* **184** 165-174.
- Gregory SJ & Kaiser UB** 2004 Regulation of gonadotropins by inhibin and activin. *Seminars of Reproductive Medicine* **22** 253-267.

- Grizzle TB, Esbenshade KL & Johnson BH** 1987 Active immunization of boars against gonadotropin releasing hormone. I. Effects on reproductive parameters. *Theriogenology* **27** 571-580.
- Groth W & Claus R** 1977 Beziehungen zwischen den Konzentrationen von Testosteroon und dem Ebergeruchstoff 5 α -Androst-16-en-3-on im Blut bzw. Fettgewebe und histometrischen Befunden im Hoden vom Schwein. *Zentralblatt für Veterinärmedizin* **24** 103-121.
- Guraya S** 1987 Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in mammals. *Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo*.
- Gutscher M, Eder S, Müller M & Claus R** 2001 The porcine glucocorticoid receptor: sequencing a 2.1 kb cDNA fragment and raising specific polyclonal antibodies for western blotting, immunoprecipitation and immunohistochemistry. *Animal Science* **73** 267-278.
- Hage-van-Noort M, Puijk WC, Schaaper WMM, Kuperus D, Beekman NJCM, Plasman HH, Lankhof H, Wensing CJG & Meloen RH** 1992 Immunomodulation of reproductive systems *Animal Reproduction Science* **28** 187-193.
- Hayes F, Seminara S, Decruz S, Boepple P & Crowley W** 1999 Absence of testosterone (T) negative feedback on FSH in the male. In *Program and Abstracts, 81st American Endocrine Society, San Diego: The Endocrine Society Press* Abstract OR 02-1.
- Heckert L & Griswold MD** 1993 Expression of the FSH-receptor in the testis. *Recent Progress in Hormone Research* **48** 61-77.
- Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsalo A, Rapola J & Dunkel L** 1996 Apoptotic cell death in the normal and cryptorchid human testis: the effect of human chorionic gonadotropin on testicular cell survival. *Pediatric Research* **40** 351-356.
- Heller CG & Clermont Y** 1963 Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science* **140** 184-186.
- Heninger N, Staub C, Blanchard T, Varner D, Love C, Forrest D & Johnson L** 2002 Apoptosis as a mechanism of germ cell loss in mature stallions. *Theriogenology* **58** 373-376.

- Heninger NL, Staub C, Blanchard TL, Johnson L, Varner DD & Forrest DW** 2004 Germ cell apoptosis in the testes of normal stallions. *Theriogenology* **62** 283-297.
- Henriksen K, Hakovirta H & Parvinen M** 1995 Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: in situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. *Endocrinology* **136** 3285-3291.
- Hess MF & Roser JF** 2004 Immunocytochemical localization of cytochrome p450 aromatase in the testis of prepubertal, pubertal, and postpubertal horses. *Theriogenology* **61** 293-299.
- Hess RA** 2003 Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1** 1-14.
- Hochereau MT, Courot M & Ortavant R** 1964 Labeling of germ cells of rams and bulls by injection of tritiated thymidine into the spermatic artery. *Annales de la Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* **4** 157-161.
- Hötzel MJ, Markey CM, Walkden-Brown SW, Blackberry MA & Martin GB** 1998 Morphometric and endocrine analyses of the effects of nutrition on the testis of mature Merino rams. *Journal of Reproduction and Fertility* **113** 217-230.
- Huckins C** 1978 The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *The Anatomical Record* **190** 905-926.
- Igarashi M & McCann SM** 1964 A hypothalamic follicle stimulating hormone releasing factor. *Endocrinology* **74** 446-452.
- Jahnukainen K, Chrysis D, Hou M, Parvinen M, Eksborg S & Söder O** 2004 Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. *Biology of Reproduction* **70** 290-296.
- Jamieson PM, Walker BR, Chapman KE, Andrew R, Rossiter S, Seckl JR** 2000 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is a predominant 11 beta-reductase in the intact perfused rat liver. *Journal of Endocrinology* **165** 685-692.

- Janning T** 1993 Glucocorticoide als katabole Stoffwechselformone: Methodische Entwicklungen und Messungen beim Schwein. *Dipl. Ing. agr.*, Hohenheim.
- Janulis L, Bahr JM, Hess RA, Janssen S, Osawa Y & Bunick D** 1998 Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. *Journal of Andrology* **17** 651-658.
- Jégou B & Le Gac- Jégou M** 1978 Androgen Binding Protein in the seminal plasma of some mammalian species. *Journal of Endocrinology* **77** 267-268.
- Johnson L** 1986 Spermatogenesis and aging in the human. *Journal of Andrology* **7** 331-354.
- Johnson L & Thompson DL** 1986 Seasonal variation in the total volume of Leydig cells in stallions is explained by variation in cell number rather than cell size. *Biology of Reproduction* **35** 971-979.
- Johnson L, McGowen TA & Keillor GE** 1999 Testis, overview. *Encyclopedia of Reproduction* **4** 769-783.
- Johnson L, Petty CS & Neaves WB** 1980 A comparative study of daily sperm production and testicular composition in human and rats. *Biology of Reproduction* **22** 1233-1243.
- Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE & Scrutchfield WL** 2000 Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Animal Reproduction Science* **60-61** 471-480.
- Johnson L, Wilker CE & Cerelli JS** 1994 Spermatogenesis in the bull. *Technical Conference of Artificial Insemination and Reproduction* **15** 9-27.
- Joshi HS & Raeside JI** 1973 Synergistic effects of testosterone and oestrogens on accessory sex glands and sexual behaviour of the boar. *Journal of Reproduction and Fertility* **33** 411-423.
- Juniewicz PE, Oesterling JE, Walters JR, Steele RE, Niswender GD, Coffey DS & Ewing LL** 1988 Aromatase inhibition in the dog. I. Effect on serum LH, serum testosterone concentrations, testicular secretion and spermatogenesis. *Journal of Urology* **139** 827-831.

- Kawakami E, Hirano T, Hori T & Tsutsui T** 2004 Improvement in spermatogenic function after subcutaneous implantation of a capsule containing an aromatase inhibitor in four oligozoospermic dogs and one azoospermic dog with high plasma estradiol-17 beta concentrations. *Theriogenology* **62** 165-178.
- Kerr JB** 1992 Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *Journal of Reproduction and Fertility* **95** 825-830.
- Kerr JB, Maddock S & Sharpe RM** 1992 Testosterone and FSH have independent, synergistic and stage-dependent effects upon spermatogenesis in the rat testis. *Cell and Tissue Research* **268** 179-189.
- Kilgour RJ, Courot M, Pisselet C, Dubois MP & Sairam MR** 1993 Inhibition of FSH affects spermatogenesis in the mature ram. *Animal Reproduction Science* **32** 213-225.
- Koenig W** 1993 Peptide and proteine hormones: structure, regulation, activity; a reference manual. *VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, New York, Basel, Cambridge*.
- Koerner DR** 1966 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase of lung and testis. *Endocrinology* **79** 935-938.
- Kojima Y** 1990 Ultrastructure of the goat testes: tubulobulbar complexes between spermatids and Sertoli cells. *Japanese Journal of Veterinary Science* **52** 781-786.
- Konrad L, Weber MA, Groos S, Albrecht M & Aumuller G** Paracrine interaction in testicular somatic cells. *Italian Journal of Anatomy and Embryology* **103** 139-152.
- Kraetzel WD & Weiler** 1998 Erfahrungen mit einem implantierbaren Kathetersystem zur frequenten und chronischen Blutentnahme bei Schafen in Gruppenhaltung und bei säugenden Sauen. *Tierärztliche Umschau* **53** 567-574.
- Kumar TR & Low MJ** 1993 Gonadal steroid hormone regulation of human and mouse follicle stimulating hormone beta-subunit gene expression in vivo. *Molecular Endocrinology* **7** 898-906.

- Kusakabe M, Nakamura I & Young G** 2003 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase complementary deoxyribonucleic acid in rainbow trout: cloning, sites of expression and seasonal changes in gonads. *Endocrinology* **144** 2534-2545.
- Lauria A, Bortolussi M, Marini G & Rolandi MT** 1979 Autoradiographic localization of binding sites for follicle stimulating hormone (FSH) in the boar testis. *Basic Applications in Histochemistry* **23** 39-43.
- Leblond CP & Clermont Y** 1952 Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "Periodic acid-Fuchsin-Sulfurous Acid" technique. *American Journal of Anatomy* **90** 167-215.
- Leckie CM, Welberg LAM & Seckl JR** 1998 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase is a predominant reductase in intact rat leydig cells. *Journal of Endocrinology* **159** 233.238.
- Leidl W, Hoffmann B & Karg H** 1970 Endokrine Regulation und jahreszeitlicher Rhythmus der Fortpflanzung beim Ziegenbock. *Zentralblatt für Veterinärmedizin* **17** 623-633.
- Lekhota O, Brehm R, Claus R, Wagner A, Bohle RM & Bergmann M** Cellular localization of estrogen receptor alpha (ER α) and estrogen receptor beta (ER β) in the boar testis. *Histochemistry and Cell Biology* (in press).
- Lennox B & Logue DN** 1979 Tubule length and Leydig cell volume in the normal bull testis. *The Veterinary Record* **104** 431-433.
- Leung BS & Potter AH** 1987 a Mode of estrogen action on cell proliferation in CAMA-1 cells: II. Sensitivity of G1 phase population. *Journal of Cellular Biochemistry* **34** 213-225.
- Leung BS & Potter AH** 1987 b Mode of estrogen action on cell proliferative kinetics in CAMA-1 cells. I. Effect of serum and estrogen. *Cancer Investigation* **5** 187-194.
- Li YH, Ma W, Li M, Hou Y, Jiao LH & Wang WH** 2003 Reduced polyspermic penetration in porcine oocytes inseminated in a new in vitro fertilization (IVF) system: Straw IVF. *Biology of Reproduction* **69** 1580-1585.
- Lindner HR** 1961 Androgens and related compounds in the spermatic vein blood of domestic animals. IV. Testicular androgens in the ram, boar and stallion. *Journal of Endocrinology* **23** 171-178.

- Longcope C & Fineberg SE** 1985 Production and metabolism of dihydrotestosterone in peripheral tissues. *Journal of Steroid Biochemistry* **23** 415-419.
- Lunstra DD & Schanbacher BD** 1988 Testicular function and leydig cell ultrastructure in long-term bilaterally cryptorchid rams. *Biology of Reproduction* **38** 211-220.
- Lunstra DD, Ford JJ, Klindt J & Wise TH** 1997 Physiology of the meishan boar. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* **52** 181-193.
- Lyon MF, Glenister PH & Lamoreux ML** 1975 Normal spermatozoa from androgen-resistant germ cells of chimeric mice and the role of androgen in spermatogenesis. *Nature* **258** 620-622.
- Mann T** 1975 Biochemistry of semen. In: Handbook of physiology. American Physiological society. Washington Section 7 Endocrinology **5** 461-471.
- Marshall GR, Jockenhovel F, Ludecke D & Nieschlag E** 1986 Maintenance of complete but quantitatively reduced spermatogenesis in hypophysectomized monkeys by testosterone alone. *Acta Endocrinologica* **113** 424-431.
- Marshall GR, Zorub DS & Plant TM** 1995 Follicle-stimulating hormone amplifies the population of differentiated spermatogonia in the hypophysectomised testosterone-replaced adult Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* **136** 3504-3511.
- Martinčič DŠ, Klun IV, Zorn B & Vrtovec HM** 2001 Germ cell apoptosis in the human testis. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* **442** (Suppl 1) R159-R160.
- Matsumoto AM, Paulsen CA & Bremner WJ** 1984 Stimulation of sperm production by human luteinizing hormone in gonadotrophin-suppressed normal men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **59** 882-887.
- Mazzocchi G, Rossi GP, Neri G, Malendowicz LK, Albertin G & Nussdorfer GG** 1998 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase expression and activity in the human adrenal cortex. *FASEB Journal* **12** 1533-1539.

- McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K & Robertson DM** 2002 Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Progress in Hormone Research* **57** 149-179.
- McLachlan RI, Wreford NG, de Kretser DM & Robertson DM** 1995 The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized adult rat. *Endocrinology* **136** 4035-4043.
- McLachlan RI, Wreford NG, Tsonis C, de Kretser DM & Robertson DM** 1994a Testosterone effects on spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized rat. *Biology of Reproduction* **50** 271-280.
- McLachlan RI, Wreford NG, Meachem SJ, de Kretser DM & Robertson DM** 1994b Effects of testosterone on spermatogenic cell populations in the adult rat. *Journal of Reproduction and Fertility* **51** 945-955.
- McLachlan, Wreford NG, O'Donnell, de Kretser DM & Robertson DM** 1996 The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *Journal of Endocrinology* **148** 1-9.
- Meachem S, Schönfeldt von V & Schlatt S** 2001 Spermatogonia: stem cells with a great perspective. *Reproduction* **121** 825-834.
- Means AR, Fakunding JL, Huckins C, Tindall DJ & Vitale R** 1976 Follicle-Stimulating hormone, the Sertoli cell, and spermatogenesis. *Recent Progress in Hormone Research* **32** 477-522.
- Medh RD & Thompson EB** 2000 Hormonal regulation of physiological cell turnover and apoptosis. *Cell and Tissue Research* **301** 101-124.
- Mentschel J, Leiser R, Mülling C, Pfarrer C & Claus R** 2001 Butyric acid stimulates rumen mucosa development in the calf mainly by a reduction of apoptosis. *Archives in Animal Nutrition* **55** 85-102.
- Metz C & Claus R** 2003 Active immunization of boars against GnRH does not affect growth hormone but lowers IGF-I in plasma. *Livestock Production Science* **81** 129-137.
- Metz C** 2003 Endokrine Reaktionen von Ebern auf die aktive Immunisierung gegen Gonadotropin-Releasing Hormon. Dissertation Justus-Liebig-Universität Gießen.

- Metz C, Hohl K, Waidelich S, Drochner W & Claus R** 2002 Active immunization of boars against GnRH at an early age: consequences for testicular function, boar taint accumulation and N-retention. *Livestock Production Science* **74** 147-157.
- Michael AE, Thurston LM & Rae MT** 2003 Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. *Reproduction* **126** 425-441.
- Millette CF** 1979 Cell surface antigens during mammalian spermatogenesis. *Current Topics in Developmental Biology* **13 (Pt1)** 1-29.
- Miura T, Miura C, Ohta T, Nader MR, Todo T & Yamauchi K** 1999 Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **264** 230-234.
- Monder C, Miroff Y, Marandici A & Hardy MP** 1994 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase alleviates glucocorticoid-mediated inhibition of steroidogenesis in rat Leydig cells. *Endocrinology* **134** 1199-1204.
- Monet-Kuntz C & Fontaine I** 1989 Age-dependent changes in the in vitro response of a pig Sertoli cell-enriched population to FSH. *Journal of Reproduction and Fertility* **86** 643-651.
- Mori H & Christensen AK** 1980 Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *Journal of Cell Biology* **84** 340-354.
- Mori H, Hiromoto N, Nakahara M & Shiraishi T** 1982 Stereological analysis of Leydig cell ultrastructure in aged humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **55** 634-641.
- Mruk DD & Cheng CY** 2004 Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine Reviews* **25** 747-806.
- Muffly KE, Nazian SJ & Cameron DF** 1994 Effects of Follicle stimulating hormone on the junction-related Sertoli Cell Cytoskeleton and Daily Sperm Production in testosterone-treated hypophysectomized rats. *Biology of Reproduction* **51** 158-166.
- Nakanishi Y & Shiratsuchi A** 2004 Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli Cells: Mechanisms and Consequences. *Biological and Pharmacological Bulletin* **27** 13-16.
- Netter FH** 1987 Farbatlanten der Medizin, Band 3 Genitalorgane Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2. Auflage 24-25.

- Neumann A, Haider SG & Hilscher B** 1993 Temporal coincidence of the appearance of elongated spermatids and of histochemical reaction of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *Andrologia* **25** 263-269.
- Neumann I, Solano AR, Paz C, Mele P, Maciel FC, Lemos JR, Fernandez HN & Podesta EJ** 1991 The action of luteinizing hormone on the testis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **40** 441-451.
- Nielsen M, Björnsdóttir S, Hayer PE & Bysker AG** 2000 Ontogeny of oestrogen receptor α in gonads and sex ducts of fetal and newborn mice. *Journal of Reproduction and Fertility* **118** 195-204.
- Nieschlag E** 1998 Hodenfunktion. In: **Thomas L** Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 5. Auflage *TH Books Verlagsgesellschaft Frankfurt* **44** 1130-1133.
- O'Donnell L, McLachlan RJ, Wreford NG & Robertson DM** 1991 Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. *Endocrinology* **128** 2608-2614.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME & Simpson ER** 2001 Estrogen and Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* **22** 289-318.
- Okwun OE, Igboeli G, Ford JJ, Lunstra Dd & Johnson L** 1996 Number and function of Sertoli cells, number and yield of spermatogonia, and daily sperm production in three breeds of boar. *Journal of Reproduction and Fertility* **107** 137-149.
- Ortavant R** 1954 Contribution à l'étude de la durée du processus spermatogénétique du bélier à l'aide du ^{32}P . *Comptes Rendus de séances de la Société de Biologie et ses filiales* **148** 804-806.
- Orth JM** 1984 The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology* **115** 1248-1255.
- Orth JM, Gunsalus GL & Lamperti AA** 1988 Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* **122** 787-794.
- Over R** 1992 Physiologische Wirkungen und Arbeiten zur Isolierung der Pheromone von Ziegen- und Schafböcken. *Diss. sc. agr.*, Hohenheim.

- Padmanabhan V & McNeilly AS** 2001 Is there an FSH releasing factor? *Reproduction* **121** 21-30.
- Parrott RF & Booth WD** 1984 Behavioural and morphological effects of 5 α -dihydrotestosterone and oestradiol-17 β in the prepubertal castrated boar. *Journal of Reproduction and Fertility* **71** 453-461.
- Payne AH, Perkins LM, Georgiou M & Quinn PG** 1987 Intratesticular site of aromatase activity and possible function of testicular estradiol. *Steroids* **50** 435-448.
- Pelletier G & El Alfy M** 2000 Immunocytochemical localization for ER α and β in the human reproductive organs. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **85** 4835-4840.
- Perey B, Clermont Y & Leblond CP** 1961 The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *American Journal of Anatomy* **108** 47-77.
- Phillips DM** 1975a Cell surface structure of rodent sperm heads. *Journal of Experimental Zoology* **191** 1-8.
- Phillips DM** 1975b Mammalian sperm structure. In: Handbook of physiology American Physiological society, Washington Section 7 Endocrinology **5** 405.
- Phillips DM, Lakshmi V & Monder C** 1989 Corticosteroid 11 β -dehydrogenase in rat testis. *Endocrinology* **125** 209-216.
- Pinart E, Sancho S, Briz MD, Bonet S, Garcia N & Badia E** 2000 Ultrastructural study of boar seminiferous epithelium: changes in cryptorchidism. *Journal of Morphology* **244** 190-202.
- Print CG & Loveland KL** 2000 Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays* **22** 423-430.
- Raab S, Leiser R, Kemmer H & Claus R** 1998 Effects of energy and purines in the diet on the proliferation, differentiation and apoptosis in the small intestine of the pig. *Metabolism* **47** 1105-1111.
- Rabb MH, Thomson DL, Barry BE, Colborn DR, Hehnke KE & Garza F** 1990 Effects of active immunization against GnRH on LH, FSH and Prolactin storage, secretion and response to their secretagogues in pony geldings. *Journal of Animal Science* **68** 3322-3329.
- Raaside JI & Renaud RL** 1983 Estrogen and androgen production by purified leydig cells of mature boars. *Biology of Reproduction* **28** 727-733.

- Raeside JI** 1969 The isolation of estrone sulfate and estradiol-17 β sulfate from stallion testes. *The Canadian Journal of Biochemistry* **47** 811-815.
- Rago V, Maggiolini M, Vivacqua A, Palma A & Carpino A** 2004 Differential Expression of estrogen receptors (ERalpha /ERbeta) in testis of mature and immature pigs. *The Anatomical Record* **281A** 1234-1239.
- Raj HGM & Dym M** 1976 The effects of selective withdrawal of FSH or LH on spermatogenesis in the immature rat. *Biology of Reproduction* **14** 489-494.
- Raj HGM, Murty GSRC, Sairam MR & Talbert LM** 1982 Control of spermatogenesis in primates: effects of active immunization against FSH in the monkey. *International Journal of Andrology Supplement* **5** 27-33.
- Reeves JJ, Chang CF, deAvila DM, Grieger DM, Johnson HE, Roberts AJ** 1989 Vaccines against endogenous hormones: a possible future tool in animal production. *Journal of Dairy Science* **72** 3363-3371.
- Regaud C** 1901 Étude sur la structure des tubes seminifères et sur la spermatogenèse chez les mammifères. *Archives d'Anatomie microscopique et de la Morphologie expérimentale* **4** 231-233.
- Reichert LE** 1999 FSH (Follicle Stimulating Hormone). *Encyclopedia of Reproduction* **2** 418-422.
- Riccardi C, Cifone MG & Migliorati G** 1999 Glucocorticoid hormone induced modulation of gene expression and regulation of T-cell death: role of G1TR and G1LZ, two dexamethasone induced genes. *Cell Death and Differentiation* **6** 1182-1189.
- Ritzen EM, Hagenas L, Hansson V, Weddington SC, French FSH & Nayfeh SN** 1975 Androgen binding and transport in testis and epididymis. *Vitamines and Hormones* **33** 283-295 (Review).
- Robertson KM, O'Donnell L, Jones ME, Meachem SJ, Boon WC, Fischer CR, Graves KH, McLachlan RI & Simpson ER** 1999 Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proceedings of the National Academy of Science* **96** 7986-7991.
- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I & Vassalli P** 1997 An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *The EMBO Journal* **16** 2262-2270.

- Romeis B** (1989) Mikroskopische Technik. P. Böck (Edt.), Urban und Schwarzenberg München Wien Baltimore, 17. Aufl., pp. 697.
- Roosen Runge EC** 1955 Untersuchungen ueber die Degeneration samenbildender Zellen in der normalen Spermatogenese der Ratte. *Zeitschrift für Zellforschung* **40** 221-235.
- Roosen Runge EC** 1977 The process of spermatogenesis in animals. *Cambridge University Press*
- Roselli CE & Resko JA** 1997 Sex differences in androgen-regulated expression of cytochrome P450 aromatase in the rat brain. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **61** 365-374.
- Rüsse I & Sinowatz F** 1998 Gametogenese. In: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Eds: Rüsse I & Sinowatz F. *Blackwell Berlin 2. Auflage* 53-70.
- Russell LD & Clermont Y** 1977 Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *The Anatomical Record* **187** 347-366.
- Russell LD & Malone JP** 1980 A study of Sertoli-spermatid tubulobulbar complexes in selected mammals. *Tissue and Cell* **12** 263-285.
- Salacinsky PR, McLean C, Sykes JE, Clement-Jones VV & Lowry PJ** 1981 Iodination of proteins, glycoproteins and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3alpha,6alpha-diphenyl glycouril (Iodogen). *Analytical Biochemistry* **117** 136-146.
- Scaramuzzi RJ, Campbell BK & Martin GB** 1993 Immunological approaches to fertility regulation in domestic livestock. *Immunological Cell Biology* **71** 489-499.
- Schinckel AP, Johnson RK & Kittok RJ** 1984 Testicular development and endocrine characteristics of boars selected for either high or low testis size. *Journal of Animal Science* **58** 675-685.
- Schultz R, Isola J, Parvinen M, Honkaniemi J, Wikström AC, Gustafsson JA & Pelto-Huikko M** 1993 Localization of the glucocorticoid receptor in testis and accessory sexual organs of male rat. *Molecular and Cellular Endocrinology* **95** 115-120.

- Schwarzenberger F, Toole GS, Christie HL & Raeside JI** 1993 Plasma levels of several androgens and estrogens from birth to puberty in male domestic pigs. *Acta Endocrinologica* **128** 173-177.
- Seckl JR & Walker BR** 2001 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 – a tissue specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* **142** 1371-1376.
- Seckl JR** 1997 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? *Frontiers in Neuroendocrinology* **18** 49-99.
- Sertoli E** 1865 Dell'esistenza di particolari cellule ramificati nei canalicoli seminiferi del testicolo humano. *Morgagni* **7** 31-39.
- Setchell BP & Cox JE** 1982 Secretion of free and conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood. *Journal of Reproduction and Fertility* **32 Suppl** 123-127.
- Sharpe PM, Haynes NB & Buttery PJ** 1986 Glucocorticoid status and growth. In: Control and manipulation of animal growth eds: Buttery PJ, Haynes NB and Lindsay DB. Butterworth, London Boston, Durban, Singapore, Sidney, Toronto, Wellington. 207-222.
- Sharpe RM** 1989 Follicle-stimulating hormone and spermatogenesis in the adult male. *Journal of Endocrinology* **121** 405-407.
- Sharpe RM, Donachie K & Cooper I** 1988 Reevaluation of the intratesticular level of testosterone required for quantitative maintenance of spermatogenesis in the rat. *Journal of Endocrinology* **117** 19-26.
- Simoni M, Weinbauer GF, Gromoll J & Nieschlag E** 1999 Role of FSH in male gonadal function Review. *Annals of Endocrinology* **60** 102-106.
- Singh J, O'Neill C & Handelsman DJ** 1995 Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* **136** 5311-5321.
- Sinha Hikim AP & Swerdloff RS** 1995 Temporal and stage-specific effects of recombinant human follicle-stimulating hormone on the maintenance of spermatogenesis in gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated rat. *Endocrinology* **136** 253-261.

- Sinha Hikim AP, Wang C, Leung A & Swerdloff RS** 1995 Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* **136** 2770-2775.
- Sinowatz F** 2001 Morphologie und Histologie der männlichen Genitalorgane. in: Veterinärmedizinische Andrologie, Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Eds. **Busch W & Holzmann A** Schattauer Verlag Stuttgart 1-22.
- Sipahutar H, Sourdaire P, Moslemi S, Plainfossé B & Séralini GE** 2003 Immunolocalization of aromatase in stallion Leydig cells and seminiferous tubules. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **51** 311-318.
- Smith PE** 1930 Hypophysectomy and a replacement therapy in the rat. *American Journal of Anatomy* **45** 205-215.
- Smith RE & Funder JW** 1991 Renal 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity: effects of age, sex and altered hormonal status. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **38** 265-267.
- Srinrath BR, Wickings EJ, Witting C & Nieschlag E** 1983 Active immunisation with follicle stimulating hormone for fertility control: a 4 ½ -year study in male rhesus monkeys. *Fertility and Sterility* **40** 110-117.
- Staub C, Heninger NL, Donnelly CL, Forrest DW, Blanchard TL, Love CC, Varner DD & Johnson L** 2002 Apoptosis during the initiation of equine spermatogenesis. *Theriogenology* **58** 367-371.
- Stein TA, Ball BA, Conley AJ, Bhatnagar AS & Roser JF** 2002 The effects of an aromatase inhibitor (Letrozole) on hormone and sperm production in the stallion. *Theriogenology* **58** 381-383.
- Steinberger E & Steinberger A** 1972 Testis: basic and clinical aspects. *Reproductive Biology* eds Balin H, Glasser S, Excerpta Medica Amsterdam **4** 144-267.
- Steinberger E** 1971 Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiological Reviews* **51** 1-22.
- Steinhauer K** 1983 Wirkung eines Aromatasehemmers (ATD) auf die Östrogenkonzentration im Blut- und Samenplasma des Ebers. Diplomarbeit, Stuttgart-Hohenheim.

- Stewart PM & Mason JI** 1995 Cortisol to cortisone: glucocorticoid to mineralocorticoid. *Steroids* **60**143-146.
- Sun YT, Wreford NG, Robertson DM & De Kretser DM** 1990 Quantitative Cytological Studies of Spermatogenesis in Intact and Hypophysectomized Rats: Identification of Androgen-Dependent Stages. *Endocrinology* **127** 1215-1223.
- Swerdloff RS, Heber D, Bhasin S & Rajfer J** 1983 Effect of GnRH superactive analogs (alone and combined with androgen) on testicular function in man and experimental animals. *Journal of Steroid Biochemistry* **19** 491-497.
- Swierstra EE** 1968 Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. *The Anatomical Record* **161** 171-186.
- Swierstra EE, Gebauer MR & Pickett BW** 1974 Reproductive Physiology of the stallion I Spermatogenesis and testis composition. *Journal of Reproduction and Fertility* **40** 113-123.
- Talwar GP** 1985 Immunobiology of gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Steroid Biochemistry* **23** 795-800.
- Talwar GP** 1997 Vaccines for control of fertility and hormone-dependent cancers. *Immunology and Cell Biology* **75** 184-189.
- Tan HS & Raeside JI** 1980 Developmental patterns of plasma dehydroepiandrosterone sulphate and testosterone in male pigs. *Animal Reproduction Science* **3** 73-81.
- Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK & Hsueh AJW** 1993 Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Molecular Endocrinology* **7** 643-650.
- Thompson DL** 2000 Immunization against GnRH in male species (comparative aspects). *Animal Reproduction Science* **60-61** 459-469.
- Thompson DL, Southern LL, St. George RL, Jones LS & Garza F** 1985 Active immunization of prepubertal boars against testosterone: testicular and endocrine responses at 14 months of age. *Journal of Animal Science* **61** 1498-1504.

- Thompson EB** 1994 Apoptosis and steroid hormones. *Molecular Endocrinology* **8** 665-673.
- Thun R & Schwartz-Porsche D** 1994 Nebennierenrinde In: Veterinärmedizinische Endokrinologie. Ed: Döcke F *Gustav Fischer Verlag Stuttgart*. 309-356.
- Tower BB, Sigel MB, Poland RE, van der Laan WP & Rubin RT** 1980 The talc-resin-trichloroacetic acid test for screening radioiodinated polypeptide hormones. *Methods of Enzymology* **70(A)** 322-334.
- Trunet PF, Mueller P, Bhatnagar AS, Dickes I Monnet G & White C** 1993 Open dose-finding study of a new potent and selective nonsteroidal aromatase inhibitor CGS 20 29, in healthy male subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **77** 319-323.
- Turner KJ, Morley M, Atanassova N, Swanston ID & Sharpe RM** 2000 Effect of chronic administration of an aromatase inhibitor to adult male rats on pituitary and testicular function and fertility. *Journal of Endocrinology* **164** 225-238.
- Van Rensburg SW, van Rensburg SJ & de Vos WH** 1966 The significance of the cytoplasmic droplet in the disintegration of semen in Guernsey bulls. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* **33** 169-184.
- Velle W** 1958 Further studies on urinary oestrogen excretion by the boar. *Acta Endocrinologica* **29** 395-400.
- Verhagen S** 1998 Microscopical study of cell death via apoptosis. *European Microscopical Analysis* 31-33.
- Verhoeven G & Cailleau J** 1988 Follicle-Stimulating Hormone and androgens increased the concentration of the androgen receptor in Sertoli cells. *Endocrinology* **122** 1541-1550.
- Vogl AW, Lin YC, Dym M & Fawcett DW** 1983 Sertoli cells of the golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*): a model system for the study of shape change. *American Journal of Anatomy* **168** 83-98.
- Walker BR, Campbell JC, Williams BC & Edward CRW** 1992 Tissue-specific distribution of the NAD⁺-dependent isoform of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* **131** 970-977.

- Weber MA, Groos S, Hopfl U, Speilmann M, Aumuller G & Konrad L** 2000 Glucocorticoid receptor distribution in rat testis during postnatal development and effects of dexamethasone on immature peritubular cells in vitro. *Andrologia* **32** 23-30.
- Weiler U, Claus R, Schoebelen-Combes S & Bonneau M** 1998 Influence of age and genotype on endocrine parameters and growth performance: a comparative study in Wild boars, Meishan and Large White boars. *Livestock Production Science* **54** 21-31.
- Weinbauer GF & Nieschlag E** 1993 Gonadotropin-releasing hormone analogue-induced manipulation of testicular function in the monkey. *Human Reproduction* **8 Suppl 2** 45-50.
- Weinbauer GF, Behre HM, Fingscheidt U & Nieschlag E** 1991 Human follicle-stimulating hormone exerts a stimulatory effect on spermatogenesis, testicular size, and serum inhibin levels in the gonadotropin-releasing hormone antagonist treated nonhuman primate (*Macaca fascicularis*). *Endocrinology* **129** 1831-1839.
- Weitze KF** 2001 Spermatologische Untersuchung. In: Busch W & Holzmann A *Veterinärmedizinische Andrologie* **6** 87-118.
- Welsh TH, Bambino TH & Hsueh AJW** 1982 Mechanism of Glucocorticoid-induced suppression of testicular androgen biosynthesis in vitro. *Biology of Reproduction* **27** 1138-1146.
- Wichmann U, Wichmann G & Krause W** 1984 Serum levels of testosterone precursors, testosterone and estradiol in 10 animal species. *Experimental and Clinical Endocrinology* **83** 283-290.
- Wickings EJ & Nieschlag E** 1978 The effects of active immunization with testosterone on pituitary-gonadal feedback in the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Biology of Reproduction* **18** 602-607.
- Wickings EJ & Nieschlag E** 1980 Suppression of spermatogenesis over two years in rhesus monkey actively immunized with follicle-stimulating hormone. *Fertility and Sterility* **34** 269-274.
- Wickings EJ, Usadel KH, Dathe G & Nieschlag E** 1980 The role of follicle stimulating hormone in testicular function of the mature rhesus monkey. *Acta Endocrinologica* **95** 117-128.

- Wise T, Zanella EL, Lunstra DD & Ford JJ** 2000 Relationships of gonadotropins, testosterone, and cortisol in response to GnRH and GnRH antagonist in boars selected for high and low follicle-stimulating hormone levels. *Journal of Animal Science* **78** 1577-1590.
- Woolveridge I, Bryden AAG, Taylor MF, George NJR, Wu F & Morris I** 1998 Apoptosis and expression of apoptotic regulators in the human testis following short- and long-term anti-androgen treatment. *Molecular Human Reproduction* **4** 701-707.
- Wrobel KH** 1990 Männliche Geschlechtsorgane in: Mosimann und Kohler, Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere. Verlag Paul Parey, Berlin. 206-231.
- Yazawa H, Sasagawa I & Nakada T** 2000 Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats. *Human Reproduction* **15** 1917-1920.
- Young KA & Nelson RJ** 2001 Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis. *Reproduction* **122** 677-685.
- Yu WH, Karanth D, Walczewska A, Sower SA & McCann SM** 1997 A hypothalamic follicle-stimulating hormone-releasing decapeptide in the rat. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **94** 9499-9503.
- Yu WH, Karanth S, Sower SA, Parlow AF & McCann SM** 2000 The similarity of FSH-Releasing Factor to lamprey gonadotropin-releasing hormone III (I-GnRH-III). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **224** 87-92.
- Zamboni L, Zemjanis R & Stefani M** 1971 The fine structure of monkey and human spermatozoa. *The Anatomical Record* **169** 129
- Zeifang A** 2000 Einfluss des Splitweaning auf die pulsatile LH-Freisetzung und das Wiederingangkommen des Zyklus nach dem Absetzen bei der Sau. Dissertation Universität München.
- Zeng XY, Turkstra JA, Meloen RH, Liu XY, Chen FQ, Schaaper WM, Oong HB, Guo DZ & van de Wiell DFM** 2002 Active immunization against gonadotropin releasing hormone in Chinese male pigs: effects of dose on antibody titer, hormone levels and sexual development. *Animal Reproduction Science* **70** 223-233.

- Zhang Z, Laping J, Glasser S, Day P & Mulholland J** 1998 Mediators of estradiol-stimulated mitosis in the rat uterine luminal epithelium. *Endocrinology* **139** 961-966.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. R. Claus durch den ich die Möglichkeit hatte, mich in den wissenschaftlichen Bereich der männlichen Reproduktion einzuarbeiten. Die Kombination von praktischer Arbeit mit den Ebern sowie die Anwendung eines breiten Analysenspektrums im Labor schafften ein sehr vielseitiges und interessantes Beschäftigungsfeld. Die zusätzliche Anfertigung von Veröffentlichungen gab darüber hinaus Einblicke und Erfahrungen in das wissenschaftliche Arbeiten.

Bedanken möchte ich mich ebenso bei Prof. Dr. M. Bergmann aus Giessen für die Vermittlung der spermatogenesespezifischen Stadieneinteilungen sowie für ein immer offenes Ohr, in spezifischen die Spermatogenese betreffenden Fragestellungen.

Ein Dankeschön an Frau Priv. Doz. Dr. U. Weiler für die Einweisung in die Messungen der Proteohormone im Isotopenlabor.

Bei den Mitarbeitern im Stall, so C. Fischinger, W. Dunne und M. Mecellem möchte ich mich für die immer tatkräftige Unterstützung bei größeren und kleineren Problemen der Durchführung der Tierversuche sowie die stets kooperative Zusammenarbeit in allen Fragen des Tierversuchs bedanken.

Steffie Mayer bekommt ein Dankeschön für die immer sehr kurzweilige Hilfe bei den windows und die kompetente Unterstützung in Fragen der Enzymimmunoassays.

Mein ganz besonderer Dank gilt Helga Hägele, die in allen die Histologie betreffenden Dingen mir stets eine große Hilfe und fachlich kompetente Unterstützung war sowie Sybille Knöllinger für die Hilfe bei der Durchführung der radioimmunologischen und radioenzymatischen Bestimmungen.

Herzlicher Dank an Nine Fleck, die mit der Auswertung eines ersten Vorversuchs in ihrer Diplomarbeit mir zu Beginn des Projekts tatkräftige Unterstützung auch beim Erlernen der Spermatogenesestadien gab und stets zu fachlichen Diskursen und Denkanlässen bereit war und beisteuerte.

Teile des Projekts wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt, ohne die die Durchführung sicherlich nicht in diesem Ausmaß möglich gewesen wäre, so dass ich an dieser Stelle auch hierfür ein herzliches Dankeschön ausspreche.

Zu guter Letzt ein herzliches Dankeschön meinen Eltern und Mario Hribal, die mir immer unterstützend zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anna-Maria Wagner

Geburtsdatum: 12.05.1977

Geburtsort: Tübingen

Eltern: Dr. med. Helmut Wagner

Dr. med. Eva-Maria Wagner

Schulbildung

1983 – 1987	Grundschule Groß-Lengden
1987 – 1989	Bonifatius – Schule Göttingen (OS)
1989-1996	Theodor-Heuss-Gymnasium Göttingen
1996	Abitur

Akademische Ausbildung

1996 – 2001 Studium der Agrarwissenschaften an der Universität Göttingen und der Universität Hohenheim

Praktika

März 1997 2-wöchiges Landwirtschaftliches Praktikum Schafzuchtbetrieb Ostsee.

Mai 1997

– September 1997 Landwirtschaftliches Praktikum auf der Farm des Benediktinerklosters in Peramiho in Tanzania / Ost-Afrika

August 1998 Landwirtschaftliches Praktikum auf dem Bioland-Betrieb „Winkler Hof“ in

– Oktober 1998 Gaggenau (Schwarzwald)

und Mai 1999

– Juli 1999

Mai 2001 Diplom

2001 – 2005 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Tierhaltung und Tierzucht, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie der Universität Hohenheim

Veröffentlichungen

Wagner A & Claus R 2004 Involvement of glucocorticoids in testicular involution after immunization of boars against GnRH. *Reproduction* **127** 275 - 283.

Lopes SO, Claus R, Lacorn M, Wagner A & Mosenthin R 2004 Effects of dexamethasone application in growing pigs on hormones, N-retention and other metabolic parameters. *Journal of Veterinary Medicine A* **51** 97-105.

- Claus R, Wagner A & Lambert T** 2005 Characterization of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in testicular tissue of control and GnRH-immunized boars as a possible regulator of spermatogenesis. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* **113** 262-267.
- Wagner A, Lock M, Bergmann M, Lekhota O & Claus R** 2005 Effects of estradiol infusion in GnRH immunized boars on spermatogenesis. *Reproduction* under revision.
- Lekhota O, Brehm R, Claus R, Wagner A, Bohle RM & Bergmann M** Cellular localization of estrogen receptor alpha (ER α) and estrogen receptor beta (ER β) in the boar testis. *Histochemistry and Cell Biology* in press.

Erklärung

Die Dissertation wurde von mir selbstständig angefertigt. Es wurden nur die angegebenen Quellen als Hilfsmittel benutzt, wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Stuttgart-Hohenheim, 25.Juli 2005