

Experimentelle Untersuchung zur Obstruktion der
ableitenden Samenwege beim Kaninchen: Einfluß
der Obstruktion auf Ejakulatparameter,
Hodenmorphologie und Expression verschiedener
Kernproteine in den Keimzellen

Inauguraldissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Milen Slavov
aus Varna, Bulgarien

Gießen, 2007

Experimentelle Untersuchung zur Obstruktion der
ableitenden Samenwege beim Kaninchen: Einfluß
der Obstruktion auf Ejakulatparameter,
Hodenmorphologie und Expression verschiedener
Kernproteine in den Keimzellen

Inauguraldissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Milen Slavov
aus Varna, Bulgarien

Gießen, 2007

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und
Kinderurologie
Des Universitätsklinikums Gießen
Direktor der Klinik für Urologie und Kinderurologie:
Prof. Dr. med. W. Weidner

Prüfungskommission:

Vorsitzender:

Prof. Dr. Beck

Gutachter:

Prof. Dr. med. W. Weidner

Gutachter:

Prof. Dr. med. A. Meinhardt

Mitglied der Prüfungskommission:

Prof. Dr. med. Gallhofer

Tag der Disputation:

07.12.2007

INHALT

1. Einleitung (S. 11)
- 1.1 Azoospermie (S. 11)
- 1.2 Obstruktive Azoospermie (S. 12)
 - 1.2.1 Ursachen für die obstruktive Azoospermie: Vasektomie (S. 13)
 - 1.2.2 Ursachen für die obstruktiven Azoospermie: nicht – Vasektomie bedingte Ursachen (S.15)
 - 1.2.2.1 Epididymaler Verschuß (S.15)
 - 1.2.2.2 Vas deferens Verschuß (S. 15)
 - 1.2.2.3 Hoher (zentraler) Verschuß (S. 16)
 - 1.2.3 Die obstruktive Azoospermie als pathogenetischer Faktor der Infertilität (S. 17)
 - 1.2.4 Fertilisierungsmaßnahmen (S. 19)
 - 1.2.4.1 Mikrochirurgische Refertilisierung (S. 19)
 - 1.2.4.2 Intraoperative Spermatozoenentnahme und ICSI (S. 20)
 - 1.2.5 Die Chromatinkondensierung als ein Faktor für die Fertilisierungsfähigkeit der Spermatozoen (S. 22)
 - 1.2.6 Organisation und Kondensierung des DNA-Materials während der Spermatogenese. Das Modell von Ward (S. 23)
 - 1.2.6.1 Bestimmung der Chromatinkondensierung in testikulär und epididymal entnommenen Spermatozoen und im Keimepithel (S. 26)

- 1.2.6.1.1 Bestimmung der Chromatinkondensierung in testikulären und epididymalen Spermatozoen (S. 26)
- 1.2.6.1.2 Bestimmung der Expression der Kernproteine (S. 29)
- 1.2.7 Wahl des Kaninchenmodells als Modell für eine Obstruktion der ableitenden Samenwege (S. 31)
- 1.2.8 Ablauf der Kaninchenspermatogenese (S. 33)
- 2. Fragestellung (S. 38)
- 3. Methoden (S. 40)
 - 3.1 Versuchsstruktur (allgemeine Übersicht) (S. 40)
 - 3.2 Versuchstiergruppen (S. 42)
 - 3.3 Kaninchenspermiogramme (S. 44)
 - 3.4 Operationsmethoden (S. 47)
 - 3.5 Bestimmung der Spermatozoendichte in den einzelnen Nebenhodenkompartimenten (S. 51)
 - 3.6 Bestimmung der Spermatozoenmotilität in den einzelnen Nebenhodenkompartimenten (S. 52)
 - 3.7 Bestimmung der Chromatinkondensierung im Nebenhoden und Hoden (S. 53)
 - 3.8 Bestimmung der Expression der Kernproteine (S. 55)
 - 3.9 Statistische Analyse (S. 63)
 - 3.10 Methodischer Anhang (S. 64)
- 4. Ergebnisse (S. 68)
 - 4.1 Spermiogrammwerte (S. 68)
 - 4.2 Gewicht der Nebenhodenkompartimenten (S. 70)

- 4.3 Spermatozoendichte in den einzelnen Nebenhodenkompartimenten (S. 71)
- 4.4 Spermatozoenmotilität in den einzelnen Nebenhodenkompartimenten (S. 73)
- 4.5 Chromatinkondensierung von Spermatozoen aus Homogenisaten von Nebenhoden und Hoden (S. 75)
- 4.6 Histologische Untersuchungen (S. 79)
 - 4.6.1 Hodenmorphologie und Spermatogenesekinetik der Kontrollgruppe und Vasektomiegruppe II (einseitig nicht vasektomiert) (S. 79)
 - 4.6.2 Expression der mRNA für die Kernproteine in den nicht obstruierten Hoden (S. 86)
 - 4.6.3 Hodenmorphologie und Spermatogenesekinetik in den obstruierten Hoden (S. 90)
 - 4.6.4 Expression der mRNA für die Kernproteine in den obstruierten Hoden (S. 95)
- 5. Diskussion (S. 102)
 - 5.1 Das „Giessener“ Kaninchen Verschlußazoospermiemodell (S. 102)
 - 5.2 Spermatozoendichte und Globalmotilität der entnommenen Spermatozoen in Abhängigkeit der Nebenhodenlokalisationen (S. 103)
 - 5.3 Chromatinkondensierung (S. 104)
 - 5.4 Histologische Befunde in den nicht obstruierten und obstruierten Hoden (S. 107)

- 5.5 Expression der mRNA für Transitionsprotein 1, Protamin 1 und Protamin 2 in den nicht obstruierten und obstruierten Hoden (S. 110)
6. Zusammenfassung (S. 113)
7. Schlußfolgerung (S. 116)
8. Zusammenfassung (engl.) (S. 117)
9. Literaturverzeichnis (S. 119)
10. Erklärung (S. 137)

ABBILDUNGEN

Abb. 1 Der Austausch der Kernproteine in den runden und in den elongierten Spermatischen während der Spermiogenese. (S. 25)

Abb.2 Vorversuch- und Versuchsgruppen. (S. 43)

Abb. 3 Gewinnung von Ejakulat beim Kaninchen. (S. 45)

Abb. 4 Teilung des Nebenhodens und Hodens in verschiedene Kompartimente. (S. 50)

Abb. 5 Anilinblaufärbung (Beispiel). (S. 54)

Abb. 6 Signal für mRNA im Zytoplasma der runden Spermatischen während Spermatogenesestadium I. (S. 61, 62)

Abb. 7 Ejakulatvolumen in ml für die drei Versuchsgruppen. (S. 68)

Abb. 8 Spermatozoendichte in Mio/ml im Ejakulat für die drei Versuchsgruppen. (S. 69)

Abb. 9 Globalmotilität (CASA) der Spermatozoen im Ejakulat für die drei Versuchsgruppen. (S. 69)

Abb. 10 Gewicht in g der einzelnen Nebenhodenkompartimenten für die drei Versuchsgruppen. (S. 70, 71)

Abb. 11 Spermatozoendichte in mio/ml für die einzelnen Nebenhodenkompartimenten. (S. 72)

Abb. 12 Die Globalmotilität in % in den einzelnen Nebenhodenkompartimenten für die drei Versuchsgruppen. (S. 74)

Abb. 13 Ergebnisse der Chromatinkondensierung: Prozentuale Verteilung der Spermatozoen der Klasse A. (S. 75)

Abb. 14 Chromatinkondensierung: Vergleich zwischen Kontrollgruppe und den beidseitig vasktomierten Tieren. (S. 76)

Abb. 15 Chromatinkondensierung: Verteilung der Spermatozoen mit komplett kondensierten DNA – Material in den allen 4 Lokalisationen. Vergleich zwischen den beiden Seiten der unilateral vasktomierte Gruppe. (S. 78)

Abb. 16 Stadium I. (S. 82)

Abb. 17 Stadium II. (S. 82)

Abb. 18 Stadium III. (S. 83)

Abb. 19 Stadium IV. (S. 83)

Abb. 20 Stadium V. (S. 84)

Abb. 21 Stadium VI. (S. 84)

Abb. 22 Stadium VII. (S. 85)

Abb. 23 Stadium VIII. (S. 85)

Abb. 24 Expression der mRNA für TP 1 (a), PRM 1 (b) und PRM 2 (c) im Zytoplasma der elongierenden Spermatiden während Stadium II der Kaninchenspermatogenese. (S. 86, 87)

Abb. 25 Spermatogenese-arrest auf der Stufe der Spermatogonien a) und der runden und elongierten Spermatiden. (S. 90, 91)

Abb. 26 Lymphozytäre Infiltration im Interstitium. (S. 92)

Abb. 27 Spermatozoenköpfe im Lumen der Tubuli. (S. 92)

Abb. 28 Fragmente vom Chromatin (Pfeil) in einem vasktomierten Hoden. (S. 93)

Abb. 29 Expression von mRNA für TP1 bei vasktomierten Hoden in den runden und elongierten Spermatischen. (S. 96)

Abb.30 Expression von mRNA für PRM 2 bei vasktomierten Hoden in den runden und elongierten Spermatischen. (S. 99)

Abb. 31 Multinukleäre Spermatozyten in einem vasktomierten Hoden. (S. 101)

TABELLEN:

Tabelle 1: Verteilung der Häufigkeit der Lokalisation einer Obstruktion der ableitenden Samenwege. (S. 13)

Tabelle 2: Ergebnisse refertilisierender Operationen nach Durchgängigkeits- und Schwangerschaftsraten. (S. 20)

Tabelle 3: Mittelwerte des Kaninchenspermiogramms im Giessener Modell nach Hecht. (S. 46)

Tabelle 4: Chromatinkondensierung: Darstellung der Chromatinkondensierung im Vergleich zwischen Hodenentnahmestelle und den unterschiedlichen Nebenhodenkompartimenten für Kontrollen, beidseitig vasktomierten und einseitig vasktomierten Tiere. (S. 77)

Tabelle 5: Der Prozentanteil für jedes Stadium bei allen Gruppen 312 Tubuli/21 Hoden. (S. 81)

Tabelle 6: Verteilung der Expression von TP 1-mRNA, PRM 1-mRNA und PRM 2-mRNA in den 8 Stadien der Kaninchenspermatogenese. (S. 88)

Tabelle 7: Prozentuelle Verteilung der einzelnen Stadien der Spermatogenese bei der beidseitig vasktomierten Gruppe. (S. 94)

Tabelle 8: Expression von den Kernproteine für jeden einzelnen Hoden. (S. 97)

1 EINLEITUNG

1.1 Azoospermie

Grundsätzlich unterscheidet die WHO [79] zwei Typen der Azoospermie in Abhängigkeit vom pathophysiologischen Mechanismus – obstruktive und nicht obstruktive Form. Bei einer obstruktiven Azoospermie liegt ein Verschluss der ableitenden Samenwege vor.

Die testikuläre Azoospermie betrifft das Spermatogenesekompartiment [93]. Folgende Ursachen für die primäre Azoospermie werden von der EAU als typisch aufgeführt [93]:

- congenitale Azoospermie,
- Maldescensus testis,
- Klinefelter – Syndrom,
- komplette oder fokale Keimzellaplasie (congenital oder erworben: z. B. Maldescensus testis, Radiation, Zytostatika u. a.),
- postentzündliche Zustände (Orchitis),
- Systemerkrankungen (z. B. Leberzirrhose, Nierenversagen),
- Varikozele,
- erworbene Azoospermie (Trauma, Hodentorsion, Tumor, chirurgische Eingriffe),
- Spermatogeneseareerst,
- exogene Faktoren (Medikamenten, Intoxikationen, Hitze u.a),

- Hodentumor,
- chirurgische Eingriffe mit nachfolgender Durchblutungsstörung,
- idiopathische Azoospermie.

1.2 Obstruktive Azoospermie

Bei etwa 5% der infertilen Männer liegt ein Verschuß der Samenwege vor [10]. Bei bis zu 50% aller sterilen Paare sind männliche Faktoren die Ursache oder Co – Faktoren. Nach WHO [79] ist die Azoospermie definiert durch die Abwesenheit von Spermatozoen im Ejakulat. Bei einer Azoospermie als Ursache der männlichen Infertilität ist, wie oben bereits aufgeführt, grundsätzlich zwischen einer Spermatogenesestörung (testikulärer Schaden) und einem Verschuß bzw. Fehlen der ableitenden Samenwege im Bereich von Epididymis, Ductus deferens oder Ductus ejaculatorii zu unterscheiden. Dieser Verschuß kann congenital oder erworben sein. Die Häufigkeit der verschiedenen Lokalisationen einer Obstruktion ist in Tabelle 1 zusammengefasst, dabei wurden Patienten nach Vasektomie nicht berücksichtigt [10].

	Häufigkeit (%)	Ursache
Leerer Nebenhoden	31	Spermatogenesestörung
Verschuß des Nebenhodens: 1.Caput 2.Corpus/Cauda	29 19	Young-Syndrom Postinfektiös
Verschuß der Vasa deferentia	11	Postinfektiös, Postoperativ
Fehlender Ductus deferens: 1.Bilateral 2.Unilateral	18 5	Kongenital Kongenital
Verschuß der Ductus ejakulatorii	4	Kongenital Postinfektiös Traumatisch

Tabelle 1: Verteilung der Häufigkeit der Lokalisation einer Obstruktion der ableitenden Samenwege (Hendry et al., 1990, [10])

1.2.1 Ursachen für die obstruktive Azoospermie: Vasektomie

Verschiedene Kontrazeptionsmethoden stehen in der heutigen Familienplanung zur Verfügung. Die Benutzung von Kondomen ist bis heute die am meist verbreitete Methode. In den letzten Jahrzehnten aber nimmt der Anteil der Vasektomie als unkomplizierte chirurgische Sterilisationsmethode beim Mann immer zu. Manche Autoren [1] berichten 1984 von weltweit 33 Mio. Paaren, die dieser Methode vertrauen. Nach Untersuchungen von Engelmann et al. [2] werden in Deutschland jährlich etwa 422 Sterilitätsvasektomien pro 1 Mio. Einwohner vorgenommen.

Obwohl die Vasektomie einen endgültigen Eingriff darstellen soll, ergeben sich immer wieder Situationen eines Kinderwunsches früher oder später nach der Vasektomie. Die häufigsten Ursachen dafür sind der Kinderwunsch in einer neuen Partnerschaft und Veränderungen in der Lebensplanung. Seltener ist der Kinderverlust eine Ursache für den erneuten Kinderwunsch [13].

Die Vasektomie wird von vielen Autoren [3-5] als die sicherste Maßnahme zur Antikonzeption bezeichnet. Die Erfolgsquote bei korrekter Operationstechnik beträgt etwa 99,9%. Bevor nach der Operation auf andere Methoden der Schwangerschaftsverhütung verzichtet werden darf, sind unbedingt zwei negative Spermioogramme abzuwarten [6].

Die Verbreitung der Vasektomie ist weltweit unterschiedlich. Führend dabei sind die Länder der dritten Welt. Hier sind ca. 40 Mio. Männer vasktomiert, vorwiegend in Indien und China. Es folgen die USA mit ca. 6 Mio. und Europa mit ca. 3 Mio. vasktomierten Männern [7]. Nach einer Untersuchung von Forste et al. aus dem Jahre 1995 sind in den USA 12% der verheirateten Männer im Alter von 20-39 vasktomiert [8]. Nach einer Untersuchung 1990 wurden in Deutschland jährlich etwa 50.000 durchgeführte Vasektomien festgestellt [9].

Vor der Durchführung ist eine sorgfältige Indikationsstellung nötig. Es muß umfassend über die Komplikationsmöglichkeiten, Konsequenzen und auch Alternativen aufgeklärt werden.

1.2.2 Ursachen für die obstruktive Azoospermie: nicht – Vasektomie bedingte Ursachen

1.2.2.1 Epididymaler Verschuß

Bei den Ursachen epididymaler Verschlüsse muss man zwischen congenitalen und erworbenen Pathologien unterscheiden. Zu den congenitalen Ursachen zählt vor allem die uni- oder bilaterale Aplasie des Vas deferens (CBAVD). Sie tritt bei ca 1,4% der infertilen männlichen Bevölkerung auf, dabei überwiegt die bilaterale Form [80]. In 48% - 80% finden sich eine oder mehrere Mutationen im CFTR – Gen [80, 81]. Die CAVBD ist mit der zystischen Fibrose vergesellschaftet [82].

Hiervon abzugrenzen ist das Young – Syndrom, bei dem neben der obstruktiven Azoospermie eine chronische, jedoch nicht progrediente sinubronchiale Symptomatik vorliegt. Die Ätiologie ist unklar.

Bei den erworbenen epididymalen Verschlüssen kommen Infektionen der Samenwege, Rupturen der Tubuli nach Vasektomie oder Atresien als häufigste Ursache in Betracht [83].

1.2.2.2 Vas deferens Verschuß

Die häufigste Ursache einer Verschußazoospermie im Bereich des Ductus deferens ist die Vasektomie. Weitere Ursachen eines Verschlusses der Vasa deferentia können

iatrogene Verletzungen sein. Hier ist an den Verschuß der Samenleiter bei Leistenoperationen, Operationen im kleinen Becken oder Hydrozeleresektionen zu denken [84, 85]. Dabei scheinen Hernienoperationen im Kindersalter ein besonderes Risiko darzustellen [69]. Entzündungen der Samenwege als Ursache einer Verschußazoospermie sind heute am ehesten durch gramnegative Bakterien, Chlamydien und Mykoplasmen verursacht. Sie sind aber nur selten Ursache einer Verschußazoospermie [10].

1.2.2.3 Hoher (zentraler) Verschuß

Ein zentraler Verschuß ist selten. Er findet sich bis zu 5 % aller Patienten mit einer Verschußazoospermie [10]. Die Ursachen können kongenital oder erworben sein [88, 10]. Kongenital sind verschiedene zystische Veränderungen (Utrikuluszysten, Ductus ejakulatoris Zysten, einfache Prostatazysten), diese stellen den überwiegenden Anteil der angeborenen Ursachen dar, es finden sich aber auch Atresien oder Stenosen [10]. Erworbene postinflammatorische Ursachen für einen hohen Verschuß können Prostatitis, Prostataabszesse, Vesikulitis und Urethritis posterior sein [86]. Vernarbungen der Ausführungsgänge nach transurethraler Resektion sind seltene Ursachen [86].

1.2.3 Die obstruktive Azoospermie als pathogenetischer Faktor der Infertilität

Die Spermatogenese bleibt nach der Obstruktion nicht unbeeinflusst. Der Verschuß als ein pathophysiologischer Mechanismus hat eine entsprechende Wirkung auf die normale anatomische Struktur. Die Prozesse, die im Organ ablaufen, werden auch beeinflusst. Ein Beispiel für den negativen Einfluß der Obstruktion auf die Fertilitätsfähigkeit der Spermatozoen sind die Fertilisierungsergebnisse nach einer Refertilisierung. Belker [11] findet einen Zusammenhang zwischen der Dauer der Vasektomie und den Schwangerschaftsraten. Ist dieser Zeitraum unter 3 Jahre, so liegt die Schwangerschaftsrate bei 76% und nimmt auf bis zu 30% ab, wenn die Zeit zwischen Vasektomie und Vasovasostomie mehr als 15 Jahre dauert. Diese Bedeutung des Zeitintervalls zwischen Vasektomie und Vasovasostomie für den Erfolg einer Refertilisierungsmaßnahme konnte von anderen Autoren [12, 13] bestätigt werden.

Die Veränderungen im vasktomierten Hoden-Nebenhoden-Komplex sind nicht nur mit den schlechteren Schwangerschaftsraten nach der Refertilisierung assoziiert. Auch bei anatomischen Untersuchungen wurden Veränderungen in der Hodenstruktur festgestellt. Eine Beobachtung von Nistal [14] bei über 48 Patienten mit obstruktiver Azoospermie zeigt Veränderungen wie Reduktion der Anzahl aller Keimzellen, Bildung von Spermagranulomen

und Hyalinisationen. Nicht nur der Hoden ist an diesem Prozeß beteiligt. Läsionen treten sowohl in den Hodentubuli als auch in den Abführungskanälchen, entlang der Nebenhodenkanälchen und im distalen Ductus deferens auf.

Von besonderer Bedeutung ist die Beschädigung der Blut-Hoden-Schranke infolge der Obstruktion. Bei 50% aller vasektomierten Männer sind zirkulierende Spermatozoen – Antikörper gefunden worden. Die Bildung dieser Antikörper scheint ein wichtiger Faktor für die gestörte Fertilität nach operativ erfolgreicher Refertilisierung zu sein [88].

Aber auch andere Faktoren beeinflussen die Erfolgsraten der Refertilisierung, besonders wenn es sich nur um eine mikrochirurgische Maßnahme handelt:

- Der Zeitintervall zwischen Vasektomie und Vasovasostomie, bzw. Vasotubulostomie [11].
- Die Länge des testikulären Endes des Ductus deferens. Eine Ductuslänge ab 2,7 cm steigern die Erfolgsraten signifikant [89].
- Ein weiterer druckregulierender Faktor besteht in der Ausbildung von Granulomen [15, 32].
- Die Erfahrung des Operateurs stellt bei der Vasovasostomie ebenfalls einen entscheidenden Faktor dar [11].
- Auch das Alter des Patienten scheint einen Einfluß auf das Ergebnis der mikrochirurgischen Refertilisierung zu haben [90].

- Der intraoperative Nachweis von Spermatozoen ist ein Indikator für die zu erwartende Schwangerschaftsrate [11]. So ist die Zahl der Schwangerschaften bei intraoperativem Nachweis von Spermatozoen im Ductusapirat deutlich höher als bei fehlendem Nachweis.

1.2.4 Fertilisierungsmaßnahmen

Etwa 6% aller vasktomierten Männer lassen sich nach einer gewisser Zeit refertilisieren [15].

Grundsätzlich stellt nach einer Vasktomie die mikrochirurgische Refertilisierung die Therapie der Wahl dar [91]. Wenn die Wiederherstellung der Durchgängigkeit der ableitenden Samenwege nicht möglich ist, wird heute eine chirurgische Spermatozoenentnahme für ICSI empfohlen [93].

1.2.4.1 Mikrochirurgische Refertilisierung

Die erste Refertilisierungsmaßnahme ist die mikrochirurgische Wiederherstellung der Durchgängigkeit des Reproduktionstraktes. Dies wird durch eine Vasovasostomie oder Vasotubulostomie möglich. Dabei wird das proximale Ende des Samenleiters am hodennahe Ende bzw. am epididymalen Kanälchen anastomosiert. In der Literatur sind unterschiedliche Erfolgsraten nach Vasovasostomie, bzw. Vasotubulostomie beschrieben (Tab. 2):

	VV	TV
Durchgängigkeit	91% ± 5%	66,1% ± 18,3%
Schwangerschaft	57% ± 12%	37,1% ± 14,6%

Tab. 2 Ergebnisse refertilisierender Operationen gerechnet nach Durchgängigkeits- und Schwangerschaftsraten (Analyse der Ergebnisse aus der Weltliteratur) (nach Schroeder-Printzen [97])

Die andere Möglichkeit für eine assistierte Reproduktion eröffnet das ICSI – Verfahren, seit 1992 ein routinemäßiges Methode der Reproduktionsmedizin [96].

Silber [16] hat Vasoepididymostomien an verschiedene Lokalisationen des Nebenhodens durchgeführt. Es wurde festgestellt, daß Spermien aus verschiedenen Regionen unterschiedliche Motilitätsquoten zeigten, was zu unterschiedlichen Schwangerschaftsraten führte. Eine spätere Studie von Haidl [17] bestätigt die unterschiedlichen Motilitätswerte im Laufe der Nebenhodenpassage.

1.2.4.2 Intraoperative Spermatozoenentnahme und ICSI

Die teilweise schlechteren Ejakulatparameter bzw. Schwangerschaftsraten stellen die Frage für den Einsatz einer weiteren assistierten Befruchtung. Heute stehen zwei Methoden für eine assistierte Refertilisierung zur Verfügung – IVF und ICSI. In manchen Fällen, z. B. bei der kongenitalen beidseitigen Aplasie des Ductus deferens oder nach langjähriger Vasektomie kann man epididymale

Spermatozoen intraoperativ aspirieren und für eine IVF einsetzen. Die Ergebnisse sind aber enttäuschend [95].

Spermatozoen aus verschiedenen Lokalisationen des Reproduktionstraktes werden bei den Refertilisierungsmaßnahmen verwendet – aus dem distalen Ductus deferens (Vasovasostomie), aus dem Nebenhoden (Vasoepididymostomie, MESA) und testikuläre (TESE). Viele Autoren berichten über unterschiedliche Erfolgsquoten bei Spermatozoen aus den verschiedenen Lokalisationen der ableitenden Samenwege.

Unterschiedliche Schwangerschaftsraten zeigen sich bei der MESA/TESE – ICSI [73]. Es wurden höhere Fehlgeburtsrate [104, 105] und niedrigere Fertilisierungsraten [105] beim Einsatz von testikulären Spermatozoen für ICSI beobachtet. Grundsätzlich empfehlen die meisten Autoren [93, 97, 104, 105] den Einsatz testikulärer Spermatozoen für ICSI bei Patienten mit obstruktiver Azoospermie erst dann, wenn die Qualität des MESA – Aspirats schlecht ist. Obwohl einige Zentren ähnliche Ergebnisse für TESE/ICSI und MESA/ICSI beschreiben [99], wird die TESE/ICSI von einigen Autoren als primäre Behandlung bei Patienten mit testikulärer Azoospermie angesehen [100, 104].

1.2.5 Die Chromatinkondensierung als ein Faktor für die Fertilisierungsfähigkeit der Spermatozoen

Bei infertilen Patienten lässt sich ein signifikant höherer Anteil von Spermatozoen mit gestörter Chromatinkondensierung feststellen [22]. Diese und weitere Untersuchungen führen zur Schlussfolgerung, dass die Kondensierung des DNA-Material ein verantwortlicher Faktor für die Fertilisierung ist.

Während der Spermatogenese kommt es zu Veränderungen in der DNA – Form bei den Keimzellen. Nach der meiotischen Teilung beginnt der Prozeß einer Verdichtung des gesamten DNA-Materials. Diese Form der Aufwicklung des DNA - Materials begünstigt den Transport der Spermatozoen bis zur Eizelle. Dieser Prozeß ist umkehrbar und nach dem Eindringen des Spermatozoons in der Eizelle beginnt das DNA-Material wieder zu dekondensieren. Niedrigere Erfolgsquoten für IVF mit Spermatozoen mit abnormal kondensierten DNA-Material wurden bereits von Filatov et al. [20] und auch Haidl [21] festgestellt.

Sakkas et al. [19] hat ICSI mit Spermatozoen mit gestörter Chromatinkondensierung durchgeführt. Nach der ICSI wurde eine schlechtere Dekondensierung für diese Spermatozoen und damit schlechtere Erfolgsraten beobachtet [19].

Auch andere Autoren haben schlechtere Erfolgsquoten bei ICSI mit Spermatozoen mit gestörter oder unvollständiger Chromatinkondensierung beobachtet. Levran [18] berichtet über sehr niedrige Schwangerschaftsraten bei ICSI,

durchgeführt mit runden Spermatiden (ROSI) aus dem Hoden nach TESE. Dieser Versuch wurde bei Patienten mit Spermatogenesearearrest vorgenommen.

Bei der ICSI sind Faktoren wie Motilität und akrosomale Reaktion der Spermatozoen nicht von Bedeutung. Bei dieser Methode der Reproduktionsmedizin wird das einzelne Spermatozoon einfach in die Eizelle injiziert. Die niedrigeren Erfolgsquoten bei der Injektion von runden Spermatiden (ROSI) führen zur Schlußfolgerung, daß vermutlich die Form und die Kondensierung des DNA-Materials verantwortlich für den Fertilisationserfolg sind [18, 19].

1.2.6 Organisation und Kondensierung des DNA-Materials während der Spermatogenese. Das Modell von Ward.

Die Reproduktionsorgane sind einzigartig im menschlichen Organismus. Von besonderer Bedeutung sind die meiotische Teilung der Samenzellen und die Kondensierung des DNA-Materials in den Keimzellen. Die Kondensierung dient als „Abwehrmechanismus“ gegen die ungünstigen Verhältnisse im Keimepithel – Eizelle Passage.

Das aktuellste Modell für die Form und die Kondensierung der DNA ist von W. Steven Ward [23, 24] entwickelt und von Fuentes-Mascorro ergänzt [25]. Nach diesem Modell ist der Austausch der Kernproteine entscheidend (Abb. 1).

Die Grundlage des Verständnisses besteht in dem komplizierten Austausch der Kernproteine während der

Spermatogenese. In den Kernen der somatischen Zellen ist das DNA – Material mit Lysin – reichen Proteinen, den Histonen, verbunden. Dabei liegt das DNA – Material in Form von s. g. „Loop Domains“ (Ward [23, 24]) vor. In den runden Spermatiden, beginnt der Austausch während der Spermio-genese gegen die beiden Transitionsproteine. Die genaue Struktur des DNA – Moleküls in diesem Zustand, wenn sie mit den beiden Transitionsproteine verbunden ist, ist noch unklar. Später, in den elongierten Spermatiden werden die Transitionsproteine durch die Arginin – reichen Proteine, die Protamine ersetzt. Die Protamine verändern die Struktur des DNA – Moleküls, so dass nach der Umstrukturierung ein viel kleineres Volumen gesichert ist. Ward bezeichnet die kleinste Struktur im Protamin – DNA – Komplex als „Doughnut Loop“. Diese Einheiten sind spiralförmig aufgewickelt, was zu einem verkleinerten Volumen führt.

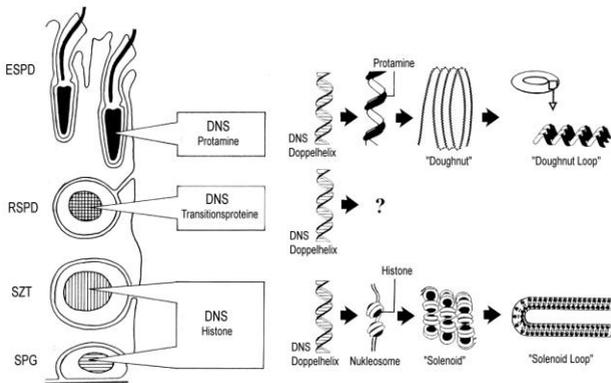


Abb. 1. Der Austausch der Kernproteine in den runden und in den elongierten Spermatisden während der Spermio-genese. Die DNA – Struktur in Verbindung mit den Transitionsproteine ist noch unklar. (modifiziert nach Ward, 1991 [24]). Eine doppelte Aufwicklung der DNA – Molekül um ein Histonen – Oktamer in den somatischen Zellen wird als Nukleosom bezeichnet. Weiter wickeln sich die Nukleosomen spiralförmich auf („Solenoid“). Die mit Protaminen gebundene DNA – Doppelhelix bildet kreisförmige Strukturen („Doughnut“, „Doughnut Loop“), die ein wesentlich verkleinertes Volumen des DNA – Materials ermöglichen. Die dreidimensionale DNA – Transitionsprotein Struktur bleibt noch unklar. ESPD – elongierte Spermatisden; RSPD – runde Spermatisden; SZT – Spermatozyten; SPG - Spermatisden

1.2.6.1 Bestimmung der Chromatinkondensierung in testikulär und epididymal entnommenen Spermatozoen und im Keimepithel

Zahlreiche Methoden sind für die Bestimmung verschiedener Defekte des kondensierten DNA – Materials entwickelt und etabliert. Einige untersuchen das DNA – Material in den reifen Spermatozoen (1.2.6.1.1), andere Verfahren sind für den Prozeß der Chromatinkondensierung in den frühen Keimzellen im Keimepithel geeignet (1.2.6.1.2).

1.2.6.1.1 Bestimmung der Chromatinkondensierung in den testikulären und epididymalen Spermatozoen

Für Bestimmung von Defekten des kondensierten DNA – Materials bei den Spermatozoen sind folgende Methoden entwickelt worden:

1. Fluoreszenzmikroskopie. Hier werden die Spermatozoen mit Acridine-Orange-Färbung angefärbt. Die Acridine-Orange-Färbung verbindet sich mit den Protaminen [11] und diejenige Spermatozoen, die mehr Protamine enthalten fluoreszieren stärker. Diese Methode wurde von Sakkas [11] entwickelt.
2. Flowzytometrie. Das ist die objektivste Methode für die Bestimmung der Chromatinkondensierung [20].
3. Die in Giessen propagierte Anilinblaufärbung [49, 53].

Die Anilinblaufärbung ist eine einfache und billige Methode für die Bestimmung der Chromatinkondensierung, die in vielen Kliniken routinemäßig eingesetzt wird. Die Methode wurde von Terquem and Dadoune [49] entwickelt, nachdem McKay [50] festgestellt hatte, daß abnormal kondensiertes Chromatin sich intensiver mit Anilinblau anfärbt. Das Anilinblau verbindet sich mit den Histonen [51, 52], die die Form und die Kondensierung des DNA-Materials in den somatischen Zellen bestimmen.

Nach einem Vorschlag von Henkel et al. [53], die wir als Arbeitsklassifikation benutzt haben, werden die Spermatozoen in 4 Gruppen eingeteilt. Hier unterscheidet man folgende Gruppen:

1. Ungefärbte Spermatozoenköpfe. Das sind diejenigen Spermien, die am wenigsten Histone enthalten. Der Austausch der Kernproteine ist komplett beendet, dies ist die Gruppe der reifsten Spermatozoen (Klasse A).
2. Schwach gefärbte Spermatozoenköpfe. Im Vergleich zu der ersten Gruppe sind die Spermatozoen hier bis zu hellblau angefärbt. Zu dieser Gruppe gehören Spermatozoen, die dieselbe Stärke der Färbung besitzen, aber äquatorial geteilt sind, d. h. etwa die Hälfte des Kopfes ungefärbt bleibt (Klasse B).
3. Mittelgefärbte Spermatozoenköpfe. Etwas dunkler als die Spermatozoenköpfe aus der vorigen Gruppe. Ein kleiner Teil des Spermatozoenkopfes kann schwächer gefärbt sein (Klasse C)

4. Stark gefärbte Spermatozoenköpfe. Tiefblaue Färbung des gesamten Kopfes. Das sind die Spermien, die die größte Menge von Histonen enthalten. Das sind die unreifsten Spermatozoen hinsichtlich der Chromatinkondensierung (Klasse D) (s. Beispiel, Abb. 5).

1.2.6.1.2 . Bestimmung der Expression der Kernproteine

Für die Ziele der vorliegenden Arbeit wurde eine quantitative Auswertung der Kernproteine (Transitionsprotein 1 und Protamine 1 und 2) mittels In situ Hybridisierung verwendet.

Im Allgemeinen ist die In situ Hybridisierung eine Lokalisierung von DNA- oder RNA-Sequenzen in Geweben, Zellen oder intrazellulären Strukturen. Das Hybridisierungssignal wird nicht auf einer festen Trägermembran, wie z. B. bei Southern- oder Northern- Blot- Hybridisierung, sondern direkt im biologischen Präparat (in-situ) sichtbar, was als ein Vorteil geschätzt wird. In unserem Fall benutzen wir die In situ Hybridisierung für Nachweis der mRNA für Transitionsprotein 1 (TP 1-mRNA) und Protamine 1 und 2 (PRM 1-mRNA, PRM 2-mRNA) im Zytoplasma der runden Spermatozoen.

Der Erfolg der In situ Hybridisierung ist abhängig von vielen Faktoren, aber entscheidend ist die Synthese der c-RNA-Sonde. Die Sonde ist eine synthetisierte mRNA für das entsprechende Kernprotein. In jeder Nukleinsäure-Kette unterscheidet man zwei Untereinheiten (gegenseitige Nucleotidsequenzen). Die doppelte Nukleinsäure -Kette bezeichnet man als Hybride. Es gibt einige Arten von Hybriden – RNA:RNA, DNA:DNA, und DNA:RNA. Bei der Sonde nennt man die beiden Untereinheiten „sense“ und „anti-sense“ in Abhängigkeit davon, welche Untereinheit sich mit der mRNA im Zytoplasma („sense“) verbindet. Ziel des Versuches ist die synthetische cRNA Sequenz mit der gesuchten mRNA im

Zytoplasma zu verbinden. Auf diese Weise wird ein Hybrid zwischen der synthetisierten und gesuchten RNA hergestellt und später mit der Hilfe eines markierten Antikörpers visualisiert.

Bei der In situ Hybridisierung handelt es sich um einen indirekten Nachweis von Kernproteinen. Die dynamischen Prozesse des Kernproteinaustausch, finden in den runden Spermatozyten statt [23, 24]. Eine abnehmende Expression von PRM 1-mRNA und PRM 2-mRNA bei infertilen Patienten wurde bereits von Steger [72] nachgewiesen. Steger [48, 54] konnte mittels In situ Hybridisierung die Expression des Transitionproteins 1 und der Protamine 1 und 2 bei der humanen Spermatogenese ausschließlich in den runden Spermatozyten darstellen. Hier wurde eine Stadium-spezifische Expression beobachtet. Das Transitionprotein 1 exprimiert im Zytoplasma der runden Spermatozyten im Stadium II, III und in dem frühen Stadium IV der humanen Spermatogenese. Ähnlich ist die Situation bei den beiden Protaminen – sie exprimieren vorwiegend im Stadium II-IV der Spermatogenese. Die elongierten Spermatozyten sind komplett negativ. Diese Untersuchungen führten zur Schlußfolgerung, daß die Expression der mRNA für die Kernproteine mittels In situ Hybridisierung in den runden Spermatozyten nachweisbar ist.

1.2.7 Wahl des Kaninchenmodells als Modell für eine Obstruktion der ableitenden Samenwege.

Bei tierexperimentellen Untersuchungen zur Vasektomie stellen Ratte und Kaninchen die am häufigsten verwendeten Versuchstiere dar [29, 30, 32]. Ähnlich den bereits für den Menschen beschriebenen testikulären Veränderungen kommt es bei Ratten ebenfalls zu degenerativen Veränderungen im testikulären Gewebe, auch wenn die Veränderungen nicht einheitlich beschrieben werden. So fand Neaves 1978 bei vasektomierten Lewis-Ratten degenerative Veränderungen der Tubuli, eine Verminderung der Spermatozoenkonzentration und der germinativen Zellen in bis zu 79% [33]. In derselben Arbeit beschrieb Neaves Anzeichen für eine Aufhebung der Blut-Hoden-Schranke mit Übertritt von Keimzellen in die Blutbahn und reaktiver Infiltration des Hodengewebes mit Immunzellen. Flickinger [34] fand bei 25% der vasektomierten Lewis-Ratten eine deutliche Verminderung der germinativen Zellen bis hin zum Sertoli-cell-only-Syndrom und fokale Nekrosen bereits einen Monat nach der Vasektomie. In früheren Studien konnte Flickinger nachweisen, daß sich diese degenerativen Veränderungen mit zunehmendem Intervall zur Vasektomie verstärken [35].

Bezüglich der Veränderungen des Nebenhodens ist vor allem der Nebenhodenschwanz betroffen [36, 37]. Es finden sich Tubuli, die kollabiert sind und in deren unmittelbarer Nähe

Spermatozoen im Interstitium nachzuweisen sind [37]. In einer neueren Untersuchung fand Flickinger [38] bei vasektomierten Ratten multiple mikroskopische Veränderungen im Sinne chronischer Entzündung und Infiltrationen des Nebenhodeninterstitiums mit Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten. Diese Tiere wiesen alle einen erhöhten Titer an Spermatozoenantikörpern auf [38].

Zusammenfassend bleibt für die Ratte eine sehr frühe Verletzung der Tubulusintegrität am Nebenhoden durch Ruptur festzuhalten [29]. Die Blut-Hoden-Schranke ist sehr früh verletzt.

Im Gegensatz dazu sind Kaninchen besser für eine experimentelle Vasektomie geeignet. Flickinger stellte 1975 fest [30], daß es nach Vasektomie beim Kaninchen zwar zu einer außerordentlichen Distension des Nebenhodens kommt, Verletzungen oder Veränderungen des Epithels jedoch nie vor Ablauf von 6 Monaten auftraten. Eine weitere Arbeit von Flickinger [31] führte zu dem Erkenntnis, daß auch der Hoden und mit ihm die Spermiogenese mindestens 6 Monate unbeeinflusst bleiben. Moore und Bredford [39] untersuchten 1978 das Schicksal der produzierten Spermatozoen nach Vasektomie bei männlichen Kaninchen. Sie opferten vasektomierte Tiere zu festgelegten Zeitpunkten nach Vasektomie und quantifizierten den Inhalt von Nebenhoden und Ductusstumpf. Sie fanden bei deutlicher Dilatation mit Speicherung der Spermienproduktion vor Ablauf von 6 Monaten keine Epitheldegenerationen oder Integritätsverletzungen.

Für die Ziele vorliegender Arbeit zeigte sich das Kaninchen als das optimalste Versuchstier. Eine vollkommen obstruktive Situation ist nur solange gegeben, wie es noch nicht zu einer Ruptur des Epithels im Reproduktionstrakt mit Extravasation gekommen ist. Dies ist beim Kaninchen im Gegensatz zur Ratte für mindestens 6 Monate der Fall [30, 40, 39].

1.2.8 Ablauf der Kaninchenspermatogenese

Zu Besonderheiten der Kaninchenspermatogenese konnten wenig Literaturquellen gefunden werden. Autoren wie Bedford [29], Flickinger [30, 31] und Jones [44] haben schon früher Kaninchenmodelle etabliert, aber ausführlich ist die Spermatogenese beim Kaninchen von Swierstra und Foote [42] untersucht.

Das Kaninchen ist eine Spezies mit sehr aktiver Spermatogenese. Die normalen Werte des Kaninchenejakulats wurde von Paufler [41] bestimmt. Eine Dichte von über 100 Mio/ml spricht über eine sehr aktiv ausgeprägte Spermatozoenbildung. Die Zytologie und die Kinetik der Spermatogenese beim Kaninchen ist ausführlich von Swierstra [42] beschrieben worden. Der Spermatogenesezyklus beim Kaninchen ist in 8 Stadien unterteilt. Hier sind die einzelnen Stadien nach Swierstra [42] beschrieben:

Stadium 1: Spermatozyten Typ A und Sertolizellen sind entlang der Basalmembran vorhanden. Typ A

Spermatogonien haben ein „staubförmiges“ Chromatin. Man unterscheidet zwei Generationen von Spermatocyten, „alte“ und „junge“. Die „jungen“ primären Spermatocyten sind in der Präleptotän-Phase und in der Nähe der Basalmembran lokalisiert; die „alten“ primären Spermatocyten befinden sich im Pachytän und sind zwischen der Basalmembran und dem Lumen des Tubulus verstreut. Die Kerne der „jungen“ primären Spermatocyten sind rund und normal ist das Chromatin schwach gefärbt. Bald beginnt das Chromatin dieser leptotänen Kerne sich stärker anzufärben. Die Spermatiden besitzen runde Kerne, die Kernmembran ist deutlich abzugrenzen.

Stadium 2: Das typische Bild für dieses Stadium ist die Elongation der runden Spermatiden. Am Beginn des Stadiums 2 sind die Kerne oval, am Ende schon komplett elongiert; zwei Generationen von primären Spermatocyten sind vorhanden: Bei den beiden Generationen sind die Kernzellmembranen nicht zu unterscheiden. Der Zustand des Chromatins ist ähnlich wie bei Stadium I.

Stadium 3: Die Sertolizellen und Spermatogonien vom Typ A sind immer noch im Kontakt mit der Basalmembran. Hier sind auch zwei Generationen von Spermatocyten vorhanden. Der Chromatin der „jungen“ primären Spermatocyten ist noch „klein“ und befindet sich im Zygotän. Die „alten“ primären Spermatocyten sind in der Pachytän-Phase. Die Spermatidenkerne sind elongiert.

Stadium 4: Die Spermatogonien A teilen sich mitotisch und es entstehen so intermediäre Spermatogonien. Sie stehen im Kontakt mit der Basalmembran. Die intermediäre Spermatogonien haben ovale Kerne, wobei die Längsachse parallel zur Basalmembran liegt. Das Chromatin dieser Zellen sieht granuliert aus. In der früheren Phase des Stadiums 4 findet man zwei Generationen primärer Spermatocyten. Die Kerne der „jungen“ Generation, lokalisiert in der Nähe der Basalmembran sind in der Pachytän-Phase und das Chromatin färbt sich intensiv an. Die Kerne der Spermatozoen aus der „älteren“ Generation sind sehr groß; sie befinden sich in der Diplotän-Phase. Am Beginn des Stadiums 4 teilen sich diese primäre Spermatocyten meiotisch und es entstehen so sekundäre Spermatocyten. Diese haben sphärische Kerne. Das Chromatin sieht kornförmig aus, wobei sich die einzelnen kornförmige Teile durch dünne Filamente verbinden. Der Durchmesser dieser Kerne ist kleiner als der Durchmesser der Kerne der primären Spermatocyten, aber größer als der Durchmesser der nachfolgenden Spermatozoen. Die sekundären Spermatocyten kommen nur kurzfristig vor. Sie sind nur im Stadium 4 nachzuweisen. Kurz nach ihrer Bildung findet die zweite Reifeteilung statt und aus den sekundären Spermatocyten entstehen runde Spermatozoen. Sie haben runde Kerne und eine deutlich sichtbare Kernmembran. Die Spermatozoen aus dem Stadium 3 sind schon elongiert - in diesem Stadium gibt es zwei Generationen Spermatozoen.

Stadium 5: Die Spermatogonien Typ A teilen sich und bilden intermediäre Spermatogonien. Später teilen sich die intermediären Spermatogonien und bilden noch eine Generation solcher Zellen. Im Vergleich mit den Stadien 1, 2, 3 und 4 gibt es hier nur eine Generation von primären Spermatocyten. Das ist auch während des Stadiums 6, 7 und der Hälfte des Stadiums 8 der Fall. Das Chromatin dieser Zellen dehnt sich aus und entfernt sich von der Basalmembran. Die runde Spermatiden haben sphärische Kerne und deutlich sichtbares Chromatin.

Stadium 6: Die Sertolizellen, die intermediäre und Typ A Spermatogonien sind dicht an der Basalmembran lokalisiert. Am Ende dieses Stadiums teilen sich die intermediäre Spermatogonien mitotisch und formieren sich zu Spermatogonien Typ B. Die Kerne der Spermatogonien Typ B sind sphärisch; das Chromatin liegt in Form von stark gefärbten Granula vor. Die Kerne der primären Spermatocyten vergrößern sich während der langen Pachytän-Phase. Die runde Spermatiden sind im Kontakt mit den Sertolizellen.

Stadium 7: Die Sertolizellen und die Spermatogonien sind auch hier dicht an der Basalmembran lokalisiert. Der Typ A Spermatogonien kommt abhängig davon vor wie weit fortgeschritten dieses Stadium ist. Intermediäre Spermatogonien können im Stadium 7 früher beobachtet werden. Bald teilen sich diese Zellen und differenzieren sich

zu Spermatogonien Typ B. Die elongierte Spermatiden bewegen sich in Richtung Lumen.

Stadium 8: Die Sertolizellen und die Spermatogonien Typ A sind ständig im Kontakt mit der Basalmembran, während die Spermatogonien Typ B nur am Anfang dieses Stadiums erscheinen und sich danach mitotisch teilen und die primären Spermatocyten formieren. Diese sind in der präleptotänen Phase. Sie besitzen runde Kerne, ähnlich wie bei den Spermatogonien Typ B, aber etwas kleiner und weniger intensiv angefärbt. Die pachytänen-Kerne der primären Spermatocyten sind relativ groß; das Chromatin ist netzförmig geformt. Die Kerne der runden Spermatiden sind sphärisch. Die Spermatozoen sind adluminal angeordnet, manche liegen sogar frei im Lumen.

2. FRAGESTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit soll die obstruktive Azoospermie als ein Faktor für eventuelle Störungen der Chromatinkondensierung bei reifen Spermatozoen und frühe Zellen der Spermatogenese untersucht werden. Als Versuchstier haben wir Kaninchen der Rasse „New-Zealand-White“ verwendet. Mittels eines experimentellen Tiermodells [103]. sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. Einfluß der obstruktiven Azoospermie auf die Motilität der Spermatozoen im epididymalen Kopf (caput epididymis), Mittelstück (corpus epididymis) und Schwanz (cauda epididymis).
2. Einfluß der obstruktiven Azoospermie auf den Grad der Chromatinkondensierung bei epididymalen und testikulären Spermatozoen.
3. Einfluß des epididymalen Transits auf den Grad der Chromatinkondensierung in den Spermatozoen. Dabei wurden Spermatozoen aus dem Hoden, Nebenhodenkopf, -mittelstück und -schwanz verglichen.
4. Einfluß der obstruktiven Azoospermie auf die allgemeine Hodenmorphologie. Führendes Zeichen dabei sind die qualitativen und quantitativen Veränderungen der Spermatogenese.
5. Einfluß der obstruktiven Azoospermie auf das Expressionsmuster von Transitionsprotein 1 (TP 1-

mRNA), Protamin 1 (PRM 1-mRNA) und Protamin 2 (PRM 2-mRNA) in runden und elongierten Spermatiden des testikulären Keimepithels.

3.METHODEN

3.1 Versuchsstruktur (allgemeine Übersicht)

Die im Rahmen des Projekte vorgenommenen Tierversuche waren genehmigungspflichtig nach dem Tierschutzgesetz. Der Regierungspräsidium Gießen genehmigte nach entsprechendem Antrag das Versuchsvorhaben mit Schreiben vom 30. Nov. 1999. Gefördert wurde das gesamte Projekt vom DFG – GK #533 – „Zell-Zell Interaktion im Reproduktionsgeschehen“ Gießen – Marburg.

Alle Kaninchen wurden im Tierstall des Instituts für medizinische Mikrobiologie der JLU – Gießen gehalten. Ein Transport der Tiere oder von Tierprodukten während des Versuches war nicht notwendig.

Die Organentnahme wurde im OP-Saal des Tierstalls durchgeführt, die Vasektomien wurden im OP-Saal für Kleintiere der Chirurgischen Veterinärklinik an der JLU – Gießen durchgeführt. Die Laboruntersuchungen des Ejakulats, die Anilinblaufärbung und die mikrochirurgische Bearbeitung der einzelnen Kompartimente des Hoden-Nebenhoden-Komplex wurden im andrologischen Labor der Urologischen Universitätsklinik Gießen durchgeführt.

Histologisch wurden alle Biopsien in dem Institut für Veterinäranatomieabteilung an der JLU – Gießen bearbeitet. Dort wurde die In situ Hybridisierung und die histopathologischen Untersuchungen durchgeführt.

Zuerst musste die aktive Spermiogenese des Tieres nachgewiesen werden. Das wurde durch eine Gewinnung von Ejakulat mittels einer künstlichen Vagina möglich (Abb. 3). Es wurde die Spermatozoendichte und –motilität im Ejakulat bestimmt (s. Kap. 3.3.3).

Nach der Einleitung der Kurznarkose wurden die Hoden, Nebenhoden und der distale Samenleiter entnommen. Die Hoden wurden von den Nebenhoden getrennt. Dann erfolgte die Teilung jedes einzelnen Nebenhodens in drei Teile (Kompartimente) – Caput epididymis, Corpus epididymis und Cauda epididymis. Es folgte eine sofortige Homogenisierung jedes Teiles und die Bestimmung der Spermatozoendichte und –motilität sowie eine Anfertigung von Ausstrichen für die Anilinblaufärbung. Der Hoden wurde in zwei Teile geteilt – der eine Teil wurde auf dieselbe Weise homogenisiert, die andere Hälfte diente der Histologie.

Die Chromatinkondensierung wurde mittels Anilinblaufärbung bestimmt (s. Kap. 3.3.4).

Die Expression der Kernproteine wurde durch einen lichtmikroskopischen Nachweis der mRNA für das entsprechende Kernprotein (Transitionsprotein 1, Protamin 1 und 2) dargestellt.

3.2 Versuchstiergruppen

Bei den verwendeten männlichen Kaninchen handelte es sich ausnahmslos um „New – Zealand – White“ Rammler. Zusätzlich stand eine kastrierte Häsin für die Absamung zur Verfügung. Zum Zeitpunkt der Absamung hatten die Tiere ein Alter von 6 Monaten.

Alle Tiere wurden in Flatdeck – Käfigen gehalten. Gefüttert wurde mit kommerziellem Fertigfutter sowie regelmäßigen Heuzugaben. Wasser stand über Nippeltränken ad libitum zur Verfügung. Die Stalltemperaturen betragen 16-20 °C. Die Beleuchtung der Ställe wurde in einem 12-Stunden-Programm realisiert.

Insgesamt wurden 4 Gruppen gebildet: eine Vorversuchsgruppe und drei Versuchsgruppen (Abb. 2):

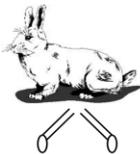
1. Vorversuchsgruppe von Kaninchen (4 Tiere), die zum Vorversuch dienten, d. h. bei diesen Tiere wurden die o. g. Methoden etabliert.

30 Rammlern wurden für die Bildung der drei Versuchsgruppen gebraucht. Alle Tiere konnten ohne Komplikationen hinsichtlich der Narkose vasektomiert werden. In jeder Gruppe war jeweils ein Tier azoosperm. Nach der Vasektomie starben in den beiden Vasektomiegruppen jeweils zwei Tiere an Mittelohrentzündung. Von den insgesamt 30 Kaninchen verblieben 23.

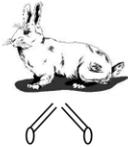
2. Kontrollgruppe (9 Tiere). Das waren nicht vasektomierte Rammler, die gemeinsam mit den anderen Tiere gehalten

wurden. Die Organentnahme erfolgte zeitgleich mit den anderen Rammmler.

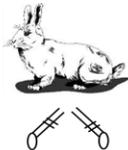
3. Beidseitige Vasektomiegruppe (7 Tiere): Kaninchen, die beidseitig vasektomiert wurden.
4. Einseitige Vasektomiegruppe (7 Tiere): Diese Tiere wurden nur rechts vasektomiert.



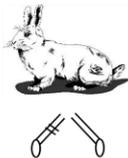
Vorversuchsgruppe, n=4



Kontrolle, n=9
(Gruppe I)



Beidseitig vasektomiert, n=7
(Gruppe II)



Einseitig (rechts) vasektomiert, n=7
(Gruppe III)

Abb.2 Vorversuch- und Versuchsgruppen

3.3 Kaninchenspermiogramme

Die Gewinnung der Ejakulate aus allen drei Gruppen erfolgte mittels Absamung der Rammler in einer künstlichen Vagina [43] nach Pauffler [41] (Abb. 3). Durch regelmäßiges Anbieten wurden die Rammler zunächst an die künstliche Vagina gewöhnt. Alle Versuchstiere nahmen dieses Phantom an.

Die künstliche Vagina mußte zunächst auf eine Temperatur von etwa 45° C aufgewärmt werden (Brutschrank). Für die Ejakulatentnahme haben wir folgende Technik verwendet: es wurde eine sterilisierte Häsin auf den Unterarm gelegt, so daß die Vagina der Häsin am distalen Teil des Armes des Operateurs lag (Abb. 3). In der Hand wurde dem aufspringenden Rammler die künstliche Vagina mit der Öffnung entgegengehalten. Die trainierten Rammler ejakulierten dann problemlos in das Auffangglas [41]

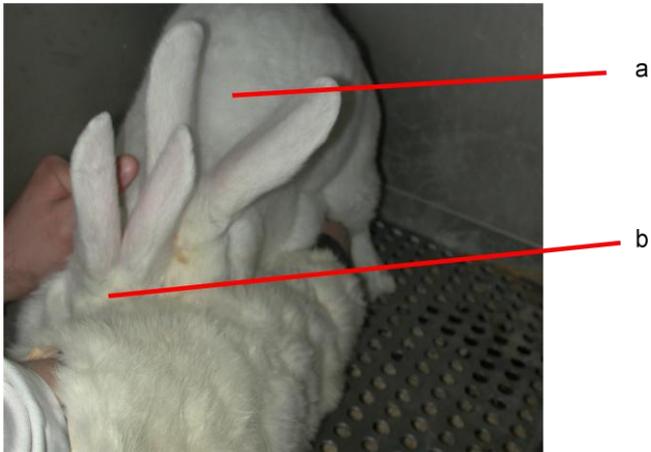


Abb. 3 Gewinnung von Ejakulat beim Kaninchen. a – der Rammler; b – kastrierte Häsin. Die künstliche Vagina befindet sich zwischen den beiden Tieren in der rechten Hand des Untersuchers.

Die gewonnenen Ejakulate wurden sofort 1:10 mit Medium (LEPUS[®]) verdünnt. Das Volumen (ml) wurde vor der Verdünnung nativ bestimmt. Die Dichte in Mio/ml wurde durch Zählung in der Neubauer-Kammer bestimmt [92]. Hierzu erfolgte eine Immobilisation der Spermatozoen mit 10%-iger Kochsalzlösung.

Die Spermatozoenmotilität (% motile Spermatozoen) wurde mit Hilfe der Computer-Assistierten-Spermatozoen-Analyse (CASA) (MIKA Motion-Analyzer[®]) bestimmt. Mittels dieser Methode berichtet Hecht über eine 53% Globalmotilität der Kaninchenspermatozoen bei Raumtemperatur [103]. Diese videogestützte Computeranalyse erfolgte bei Verdünnung 1:10 bis 1:20 mit dem LEPUS[®] - Medium. Die Messung folgte in 8

randomisiert ausgewählte Felder, die Werte der Globalmotilität wurden automatisch vom Programm gerechnet.

Zum Nachweis der Azoospermie nach durchgeführter beidseitiger Vasektomie wurde die Dichtebestimmung im Zentrifugat durchgeführt (10 min. bei 2000 U/min). Die Normwerte des Kaninchenspermiogramm wurden bereits für das Giessener Modell von Hecht [103] bestimmt, wobei er die Globalmotilität nativ untersuchte. Mittelwerte sind in Tab. 3 angegeben:

Volumen (ml)	Dichte (Mio/ml)	Motile Spermatozoen (%)
1,31	472	45

Tabelle 3 Mittelwerte des Kaninchenspermiogramms im Giessener Modell nach Hecht [103]

3.4 Operationsmethoden

Kurzzeitnarkose zur Vasektomie

Für die Durchführung der Vasektomie war eine Kurzzeitnarkose notwendig. Sie erfolgte durch einmalige Gabe von Ketamin (Ketanest®) und Xylazin (Rompun®) in einer Mischspritze [103]. Ketamin ist ein wasserlösliches, schnell resorbierbares Kurzzeitnarkotikum mit starker analgetischen Potenz. Xylazin ist ein nur in der Veterinärmedizin angewandter Alpha-2 Agonist mit analgetischer, sedativer und relaxierender Wirkung. Die Ketamin/Rompun- Narkose mittels intramuskulärer Injektion beim Kaninchen ist das Standardverfahren für derartige kurze chirurgische Eingriffe [47].

Direkt praeoperativ wurden die Kaninchen gewogen. Die Dosierung der Medikamente betrug zur i. m. – Gabe 35mg/kg KG Ketamin und 5 mg/kg KG Xylazin [47]. Das Tier wurde dann zur Injektion in eine Holzbox gesetzt, die Fluchtbewegungen ausschloß, speziell das gefürchtete Auskeilen der Hinterläufe mit der Konsequenz von Wirbelsäulefrakturen [45]. Gespritzt wurde in zwei Portionen paravertebral in den musculus longissimus dorsi [46]. Die Narkose trat nach etwa zehn bis fünfzehn Minuten ein und dauerte jeweils mindestens 60 Minuten an.

Die Kurzzeitnarkose zeigte sich bei manchen Tiere nicht ausreichend und sie mußten nachgespritzt werden. Das führte bei keinem Tier zur Komplikationen.

Vasektomie

Die Vasektomie wurden in dem Op-Saal der chirurgischen Abteilung für Kleintiere, Klinik für Veterinärchirurgie an der JLU- Gießen durchgeführt.

Nach Eintritt der Narkose wurden die Tiere in der Leistengegend großzügig rasiert und dann auf dem Rücken gelagert, das Operationsgebiet wurde mit Braunol® desinfiziert. Die Technik erfolgte nach Hecht [103]:

OP – Protokoll: „Schräger Hautschnitt von etwa zwei Zentimetern Länge rechts, bzw. beidseitig der Medianlinie in direkter Verlängerung des Skrotums. Präparieren des Samenstranges, der leicht flüssigkeitsgefüllt ist. Nach Eröffnung des Samenstranges Identifizieren des kräftigen Samenleiters mit anhaftenden Begleitgefäßen. Sorgfältige Präparation des Ductus zum Erhalt der nutritiven Gefäße auf einer Länge von maximal zwei Zentimetern. Abklemmen mit zwei Moskitoklemmchen im Abstand von circa 1.5 cm und Resektion. Dann Ligatur mit Vicryl® 2-0. Anschließend schichtweiser Verschuß unter anatomischer Rekonstruktion auch mit Vicryl® derselbe Stärke. Hautnaht und Sprühpflasterverband. Das Anlegen einer Halskrause war nicht notwendig.“

Organentnahme und Opferung

Die Organentnahmen wurden im OP-Saal des Tierstalls des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der JLU- Gießen durchgeführt.

Nach der Organentnahme wurden die einzelnen Nebenhodenkompartimente vor der Bearbeitung gewogen.

Die Narkose erfolgte mit der üblichen Dosierung von Rompun[®] und Ketanest[®]. Das OP-Gebiet wurde ebenfalls rasiert. Hautschnitt von 2-3 Zentimetern Länge entlang der Medianlinie. Nach der Präparation des Samenstranges links bzw. rechts wurde der Hoden und der Nebenhoden luxiert. Der gesamte Hoden-Nebenhoden-Komplex wurde von dem umgebenden Fett- und Bindegewebe abpräpariert. Darstellung aller Teile des Nebenhodens. Danach sorgfältige Durchtrennung des Hodens von dem Nebenhoden. Dann wurden der Samenleiter 2 – 3 cm proximal vom Nebenhodenschwanz und den nutritiven Gefäße durchgetrennt.

Die so entnommene Organe wurden sofort auf folgende Weise bearbeitet:

Der Nebenhoden wurde in seine drei Teile, Caput epididymis (Kopf), Corpus epididymis (Mittelstück) und Cauda epididymis (Schwanz) geteilt (Abb. 4). Die einzelnen Nebenhodenteile wurden sofort in LEPUS[®] - Medium bei 37° C fixiert. Der Hoden wurde zuerst in zwei Teile geteilt. Der eine Teil wurde in LEPUS[®] - Medium fixiert. Dieser Teil diente zur Homogenisierung und Gewinnung von testikulären

Spermatozoen. Der andere Teil wurde nochmals für die Biopsien für die Hämatoxylin-Eosin Färbung und die In situ Hybridisierung geteilt (Abb. 4). Die Hodenteile für die Histologie wurden in Bouin'scher Lösung fixiert [48]. 12-24 Stunden später wurden die Präparate mit 70%-iger Ethanol mehrmals gespült.

Dieselbe Manipulation wurde auch gegenseitig durchgeführt. Die Wunde wurde verschlossen und das Tier wurde mittels einer Überdosierung (200 mg pro kg KG) von Na-Pentobarbital euthanasiert. Das Na-Pentobarbital wurde i. v. in die Ohrvene injiziert

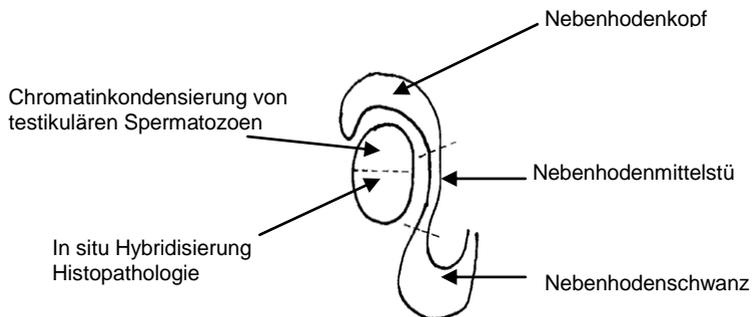


Abb. 4 Teilung des Nebenhodens und Hodens in verschiedene Kompartimente. Der Nebenhoden wurde vom Hoden abgetrennt und in Kopf (caput epididymis), Mittelstück (corpus epididymis) und Schwanz (cauda epididymis) geteilt.

3.5 Bestimmung der Spermatozoendichte in den einzelnen Nebenhodenkompartimenten

Zuerst wurde der entsprechende Nebenhodenteil mikrochirurgisch präpariert. Mit der Hilfe einer Lupenbrille, Mikroschere und Mikropinzette wurden alle restlichen Fett- und Bindegewebsanteile entfernt. Als nächster Schritt wurde der entsprechende Nebenhodenteil gewogen.

Jeder Nebenhodenteil wurde immer in einer gleichen Menge Medium (3 ml) homogenisiert. Dies war notwendig, um die Werte der Spermatozoendichte vergleichen zu können. Das Kompartiment wurde in einer Schale mit einer Schere an mehreren Stellen angeschnitten, so dass die Gewebeflüssigkeit aus den Nebenhodenkanälchen austrat. Danach wurde das ganze Organteil zerquetscht. Dann wurde die Spermatozoendichte bestimmt, wobei das Homogenisat mit 10%-iger Kochsalzlösung verdünnt wurde, um die Spermatozoen zu immobilisieren. Es wurde eine Neubauerkammer (Typ „improved“) verwendet. Die Spermatozoen in den 25 Quadraten des mittleren Rasters der Kammer wurden gezählt und auf folgende Weise die Dichte gerechnet: $\text{Spermatozoendichte} = \text{Zellzahl} \times \text{Zählkammerfaktor} \times \text{Verdünnungsfaktor}$. Die Zellzahl wurde in Doppelbestimmung gemittelt [92].

3.6 Bestimmung der Spermatozoenmotilität in den einzelnen Nebenhodenkompartimenten

Um die Motilitätswerte zwischen den einzelnen Nebenhodenkompartimenten vergleichbar zu machen, wurden die Nebenhodenteile immer in gleicher Reihenfolge bearbeitet. Aus dem Homogenisat (s. o.) wurde die Motilität mittels CASA bestimmt. Die Hodenhomogenisate wurden mit LEPUS® – Medium verdünnt (1:10 oder 1:20), wobei einige ml 1%-iges Humanalbumin hinzugefügt wurden, um eine Spermatozoenadhäsion zu vermeiden. Es wurden 8 randomisiert ausgewählte Felder beurteilt.

3.7 Bestimmung der Chromatinkondensierung im Nebenhoden und Hoden

Erstellen der Farblösung:

Für unseren Versuch haben wir Anilinblau (Pulver) der Firma Riedel-de Haen[®] benutzt. Die chemische Formel von Anilin blau lautet $C_{32}H_{25}N_3Na_2O_9S_3$.

Zuerst wurde das erforderliche Phosphatpuffer angefertigt:

-Phosphatpuffer 0,2 mol/l: pH-Wert 7,3

2,8392 g Na_2HPO_4 in 100ml a. dest

2,7218 g KH_2PO_4 in 100ml a. dest

im richtigen Verhältnis mischen (pH 7,3); bei 4°C ca 2 Wochen haltbar

-Glutaraldehydlösung 3% in Phosphatpuffer 0,2 mol/l

44 ml Puffer + 6 ml Glutaraldehyd 25% (Merck, Art. 820603)

-Anilinblaulösung 5% in 4%-iger Essigsäure, pH 3,5

5 g Anilin blau in 100ml 4%-iger Essigsäure lösen

pH-Wert mit NaOH 1 mol/l einstellen, filtrieren ca 4 Wochen haltbar

Aus den homogenisierten Nebenhodenteilen wurden 10µl Homogenisat entnommen und auf einen Objektträger ausgestrichen. Dieser wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in Glutaraldehyd für 30 min bei pH 7,3 fixiert. Danach wurden die Ausstriche in Aqua dest. dreifach gespült. Es erfolgte die Färbung in der Anilinblaulösung für 5-6 min bei einem pH von 3,5. Nach der Färbung erfolgte ein einmaliges Spülen in Aqua dest. Die so angefertigte Ausstriche wurden bei Raumtemperatur getrocknet. Die Auswertung wurde bei

400-facher Vergrößerung mit Ölemission durchgeführt. Pro Ausstrich wurden 100 Spermatozoen ausgewertet. Bei jedem Spermatozoon wurde die Kopffärbung beurteilt und nach der Klassifikation von Henkel et al. [53] (s. 1.2.6.1.1) unterteilt. Für jeden Ausstrich wurde eine prozentuale Verteilung der 4 Klassen von testikulären und epididymalen Spermatozoen gebildet. Bei Ausstrichen, angefertigt aus Homogenisaten, fand sich auch andere Zellen und Artefakte – Erythrozyten, Lymphozyten, Epithelzellen u. a., diese färben sich auch blau an. Trotzdem konnte die Beurteilung der Spermatozoen problemlos durchgeführt werden (Abb. 5).

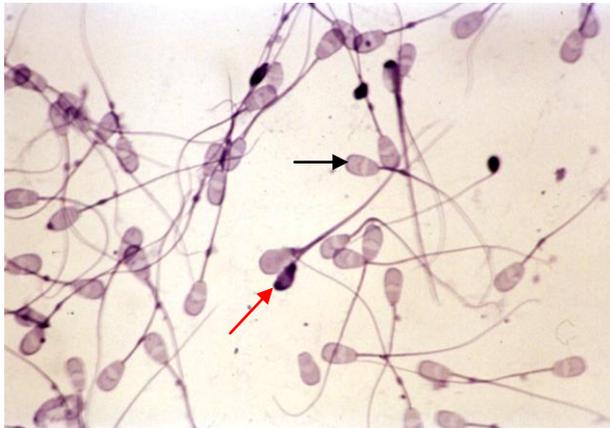


Abb. 5 Anilinblaufärbung (Beispiel). Spermatozoen mit komplett kondensierten DNA – Material sind ungefärbt (schwarzer Pfeil), diejenigen die noch Histone enthalten, sind dunkler angefärbt (roter Pfeil). (PV 100x)

3.8 Bestimmung der Expression der Kernproteine

Die Sonde für unseren Versuch wurde vom Institut für Veterinär Anatomie an der Justus-Liebig-Universität Gießen (Leiter Prof. Dr. M. Bergmann) überlassen. Sie war für mRNA der humanen Kernproteine synthetisiert. Bei den Vorversuch zeigte sich, daß durch diese Sonde eine positive Expression von Kernprotein-mRNA beim Kaninchen erfolgreich durchzuführen war (Abb. 6).

Grundsätzlich wurden folgende Schritte bei der In situ Hybridisierung durchgeführt:

- A. Vorbereitung
- B. Prähybridisierung
- C. Hybridisierung
- D. Posthybridisierung
- E. Immunohistochemie

A. Vorbereitung

-Paraffinschnitte in Trockenschrank (60°C)

-Xylol in Trockenschrank (60°C)

-Heizplatte auf 70°C aufheizen

-Wasserbad auf 70°C aufheizen

-Alkoholreihe: Paraffin-Schnitte in Xylol stellen (trockenschrank: 60°C): 5 min! 2 x 5 min Xylol, 2 x 5 min Abs. Ethanol, 1 x 96 % iges Ethanol, 1 x 5 min 70 % iges Ethanol, 1 x DEPC-Wasser, 1 x 20 min 0,2 N HCl

- 15 min 2 x SSC, 70°C
- 1 x PBSM (Standküvette)
- Inkubation (Feuchte Kammer). Proteinase K, 25-30 min, 37°C
- 5 min 0,2 % ige Glycin-Lösung (Standküvette)
- 15 sec 20 % ige Essigsäure, 4°C(Standküvette)
- 1 x PBSM (Standküvette)
- 10 min 4 % ige Paraformaldehyd-Lösung (Standküvette)
- 1 x PBSM (Standküvette)

B. Prähybridisierung

- 30-60 min 20 % iges Glycerol in DEPC-Wasser

C. Hybridisierung

Substanzen	Sense	Anti-Sense
Sonden-Gemisch:		
DEPC-Wasser	4 µl	4 µl
Salmon sperm DNA (1mg/ml)	4 µl	4 µl
Yeast t-RNA (1mg/ml)	8 µl	8 µl
DIG-cRNA (Sonde)	4 µl (1:100)	4 µl (1:100)
Hybridisierungs-Puffer:		
DEPC- Wasser	56 µl	56 µl
20x SSC (2 x)	40 µl	40 µl
50 % Dextransulfat (10%)	80 µl	80 µl
Denhardt-Reagenz (BFP; 1 x)	4 µl	4 µl
Deionisiertes Formamid (50%)	200 µl	200 µl

- Schnitte kurz in 2 x SSC tauchen; 10-12 min auf Heizplatte (70°C) legen, dann auf Kühlakku abschrecken
 - Sonden-Gemisch 10-12 min in Wasserbad (70°C) stellen, dann in Eiswasser abschrecken
 - Sonden-Gemisch und Hybridisierungs-Puffer zusammenpipettieren und auf den Schnitt geben (ca. 50µl pro Schnitt)
- Inkubation (Feuchte Kammer mit 50 % Formamid in 2 x SSC):
Über Nacht, 37°C. Deckglas!

D. Posthybridisierung

- 4 x 10-15 min 4 x SSC
- Inkubation (Feuchte Kammer): 1,35 ml 4 x SSC+ 150µl 10 x RnaseA/RnaseT Stammlösung; 30 min, 37°C
- 4x 5 min 4 x SSC, 37°C
- 15-20 min 2 x SSC, 60°C
- 15-20 min 0,2 x SSC, 42°C
- 5 min 0,1 x SSC, RT
- 5 min 2 x SSC, RT

E. Immunhistochemie

- 10 min 1 x TNMT, RT
- 1h 3 % BSA in 1 x TNMT, RT
- 10 min 1 x TNMT, RT

- Inkubation (Feuchte Kammer): 666 μ l 1 x TNMT + 333 μ l 3 % BSA in 1 x TNMT + 2 μ l Anti-DIG-Fab-Antikörper (1:500-1:1000); Über Nacht, 4°C
- 2 x 10 min 1 x TNMT
- 5 min 1 x NTB
- 5 min 1x NTB + 1 ml 1 m Levamisol
- Inkubation (Feuchte Kammer: Dunkel!); Entwickeln mit NBT-BCIP-Lösung
- 5 min 1 x NBT + 1 ml 1 M Levamisol
- 5 min Bidest
- Evt.: Gegenfärbung
- Eindecken in DAKO Glycergel

Auswertung im experimentellen Modell

Die so angefertigte Schnitte wurden lichtmikroskopisch beurteilt. Die Bestimmung der Expression wurde bei 200-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach Steger et al. [54]. Es wurde der Prozentanteil der positiven runden Spermatiden in jedem Tubulus festgestellt. Insgesamt wurden 10 Tubuli pro Schnitt ausgezählt. Aus jedem Hoden wurden 3 Schnitte angefertigt – 1 Schnitt für jedes Kernprotein. Außerdem wurde für jeden Hodenanteil eine konventionelle Hämatoxylin – Eosin Färbung angefertigt. Die runde Spermatiden unterschieden sich lichtmikroskopisch mit der HE – Färbung von den anderen Zellen im Tubulus – Spermatozyten, Spermato gonien, Sertoli Zellen und elongierte Spermatiden durch ihren runden Kerne und dichteres

Chromatin. Bei der In situ Hybridisierung war das Cytoplasma der positiven runden Spermatozyten hell- oder dunkelbraun angefärbt (Abb. 6 a, b, c). Die Anfärbung der positiven runden Spermatozyten war von vielen Faktoren wie dem Grad der Gegenfärbung oder dem Typ des Kernproteins abhängig. So exprimierte z. B. beim Kaninchen PRM 2-mRNA stärker als PRM 1-mRNA. Das Cytoplasma der negativen runden Spermatozyten war um den Kern hell.

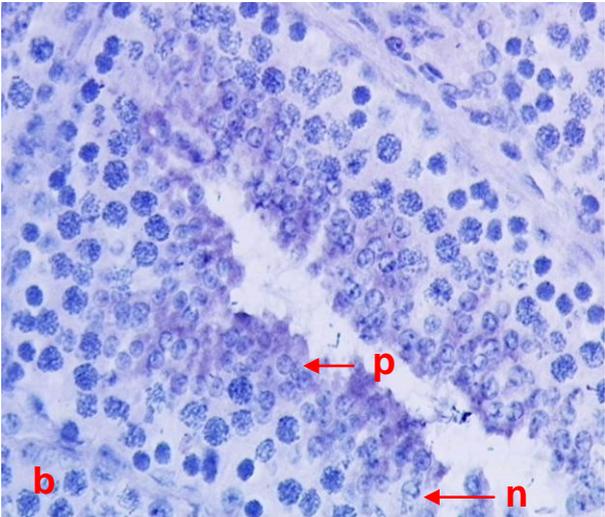
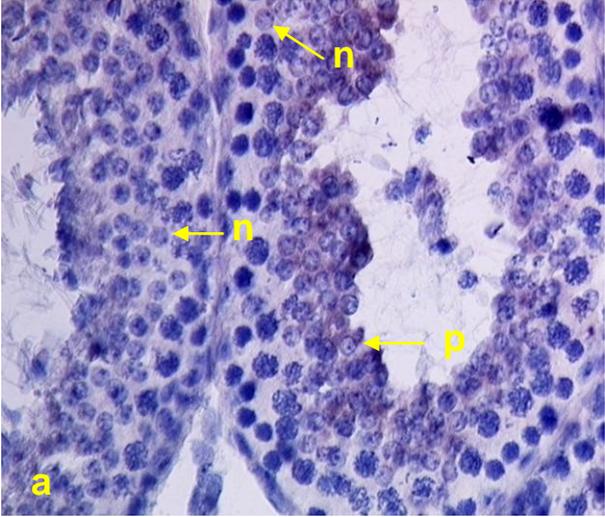
Die Expression des Transitionsprotein 1 war etwas früher als die Expression der beiden Protamine nachzuweisen. Sie begann im späteren Stadium VIII und ließ sich bis zum Stadium IV-V beobachten. Nachdem die runden Spermatozyten sich elongierten, blieben adluminal nur die markierten Cytoplasmaresten nachweisbar. Ähnlich verlief die Expression der beiden Protamine, aber sie war etwas später, im Stadium I nachzuweisen.

Die mRNA war nur am Anfang, im Stadium VIII-I aktiv. Nur dann fand die Translation der mRNA statt und nur dann bildete sich das entsprechende Kernprotein. Später, nachdem die Kernproteine das DNA-Material kondensierten und die runden Spermatozyten sich elongierten, blieben die Cytoplasmareste positiv, d. h. die mRNA Moleküle waren vorhanden, aber eine Translation fand nicht statt. Aus diesen Gründen wurden nur die positiven Tubuli im Stadium VIII-II beurteilt. Außerdem ließen sich zum diesen Zeitpunkt die runden Spermatozyten am besten unterscheiden. Das bräunlich

gefärbte Cytoplasma kontrastierte auf die runden Kerne und auf die umgebende Zellen (Abb. 6).

Sowohl die Kontrollgruppe, als auch die beiden Vasektomiegruppen wurden histologisch mittels konventioneller Hämatoxylin-Eosin Färbung beurteilt.

Hier wurde die prozentuale Verteilung der einzelnen Stadien der Kaninchenspermatogenese pro Schnitt bestimmt. Es wurden 30 Tubuli pro Schnitt ausgezählt und die prozentuale Verteilung jedes Stadiums bestimmt. Die 8 Stadien waren nicht gleichmäßig verteilt, denn einige Stadien kamen nur kurzfristig vor. So konnten z. B. die sekundären Spermatozyten nur kurzfristig in Stadium IV nachgewiesen werden.



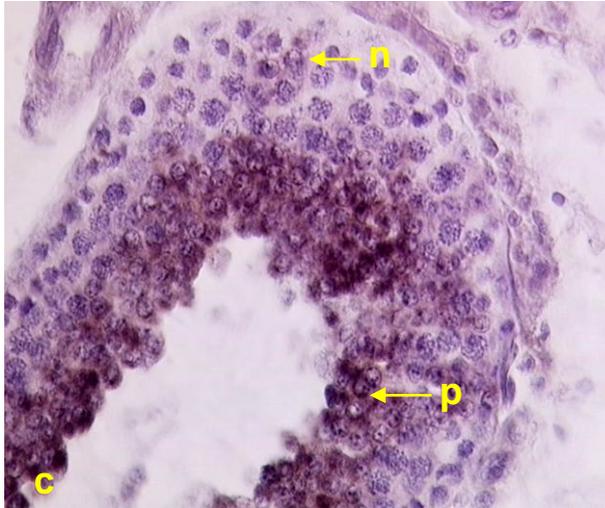


Abb. 6 Signal für mRNA im Zytoplasma der runden Spermatiden während Spermatogenesestadium I für TP 1 (a), PRM 1 (b) und PRM 2 (c); p – positive runde Spermatide (ISH, PV 40X). Die runden Spermatiden sind für TP 1-mRNA während des früheren Stadium VIII noch negativ.

ISH – In situ Hybridisierung; PV – Primäre Vergrößerung.

3.9 Statistische Analyse

Die statistische Bearbeitung wurde in Kooperation mit der Abteilung für Biomathematik des Instituts für Veterinär Physiologie (Leiter: Dr. K. Failing) durchgeführt.

Die statistische Analyse wurde mit der multifaktorielle Varianzanalyse, Dunnett – Test und Student – t – Test ausgewertet. Ergebnisse mit einem $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen [101, 102]. Graphisch wurden die Ergebnisse mit PlotIT[®] 3.2 für Windows dargestellt.

3. 10 Methodischer Anhang

Bestimmung der Ejakulatparameter und Auswertung der Spermatozoendichte und -motilität in den einzelnen Nebenhodenteilen:

- Künstliche Vagina nach Bredderman für Kaninchen
- Verdünnungsmedium „LEPUS fluid semen extender for rabbit“, MEDI CHIMICA, Mailand, Italien
- Pipetten der Fa. EPPENDORF
- Neubauer-Zählkammer der Fa. BRAND
- Lichtmikroskop OLYMPIA BH2
- MIKA motion analyzer zur CASA
(Computer-Assistierte-Spermatozoen-Analyse)
- Lupenbrille
- Mikroschere und –pinzette
- Laborwaage der Fa METTLER AE240
- Zentrifuge der Fa. HETTICH (Rotanta/AP)

Narkose und Operation:

- Ketanest[®] 50 mg/ml
- Rompun 2%, 25 ml
- NaCl 0,9%
- Konventionelle OP-Instrumente diverser Firmen
- Zur Ductusligatur und zur Hautnaht Vycril[®] 2-0
- Pflastersprühverband Johnson & Johnson[®]

Anilinblaufärbung:

- Essigsäure 4%
- 5%-ige Anilinblaulösung (Anilinblaupulver der Fa. RIEDEL-DE HAEN®)
- 3%-ige Glutaraldehydlösung in 0,2 M Phosphatpuffer
- pH-Meter der Fa. VOGEL®
- Objektträger

Histologie und In situ Hybridisierung:

- Feuchte Kammer (TUPPER): 100 ml Formamid + 20 ml 20 x SSC + 80 ml DEPC-Wasser

Labor (RT):

- DEPC-Wasser: 2l Bidest + 2ml DEPC (Diethylpyrocarbonat); Kräftig schütteln; Übernacht in Trockenschrank (37°C)
- Alkoholreihe: 3 x Xylol, 2 x Abs. Ethanol, 1 x 96%-iges Ethanol, DEPC-Wasser, 1 x 0,2 N HCl in DEPC-Wasser.
- 1 M $MgCl_2$ -Lösung : Auf 400 ml DEPC-Wasser: 81,4 g $MgCl_2$.
- 1 x PBSM-Puffer: 400 ml DEPC-Wasser + 1 PBS-Tablette + 1 ml 1 M $MgCl_2$ -Lösung
- 0,5 M EDTA-Lösung: Auf 400 ml DEPC-Wasser: 8 g NaOH-Plätzchen + 74,4 g EDTA. pH 8,0
- Glyzerol
- 0,2%-ige Glyzin-Lösung: 100 PBSM-Puffer + 200 mg Glyzin
- 20 x SSC-Stammlösung: Auf 1 l Bidest: 88,23 g Natriunzitat ($C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$) + 175,29 g NaCl. PH 7,0. Zugabe von 1

ml DEPC. Kräftig schütteln; über Nacht im Trockenschrank (37°C)

-10 x TNMT-Puffer: Auf 1l Bidest: 121,1 g Tris-HCl + 58,4 g NaCl + 4,17 g MgCl₂, pH 7,5. Zugabe von 1 ml DEPC.

-5 x NTB-Puffer: Auf 1 l Bidest: 60,5 g Tris-HCl + 29,2 g NaCl. PH 9,6. Zugabe von 1 ml DEPC. Vor Gebrauch: Zugabe von 25 ml 1 M MgCl₂-Lösung pro 500 ml 1 x NTB-Puffer.

Kühlschrank (4°C):

-20%-ige Essigsäure: 160 ml DEPC-Wasser + 40 ml Eisessig.

-Deioniertes Formamid.

-3% BSA in 1 x TNMT: 200 ml 1 x TNMT-Puffer + 6 g BSA

-Anti. DIG-Fab-Antikörper.

-RNase A.

-RNase T1

-NBT-BCIP-Lösung

Gefrierschrank (-20°C):

-4%-ige Paraformaldehyd – Lösung: 25 g Paraformaldehyd in 500 ml 1 x PBSM-Puffer lösen. Conc. NaOH (4N) zugeben bis Lösung klar wird.

-Proteinase K-Stammlösung: 10mg Proteinase K + 100 µl 0,5 M EDTA –Lösung + 900 µl 1 x PBSM-Puffer.

-Salmon Sperm DNA

-Yeast t – RNA

-50%-iges Dextransulfat: Auf 10 ml DEPC-Wasser 5 g Dextransulfat

-Denhardt-Reagenz (BFP): Auf 10 ml DEPC-Wasser: 200 mg BSA (2%), 200 mg Ficoll 400 (2%), 200 mg Polyvinylpyrrolidon (2%).

-Rnase A/Rnase T1-Stammlösung:

RNase A: 25 mg/1ml, d. h. 12µl (Endkonzentration :300 µg/1 ml 2x SSC)

RNase T1: 10 U/1 ml, d. h. 0,1 µl (Endkonzentration: 10 U/ 1 ml 2xSSC)

-1 M Levamisol: 10 ml NTB-Puffer + 2,4 g Levamisol.

4. ERGEBNISSE

4.1 Spermogrammwerte (Volumen, Spermatozoendichte, Globalmotilität) der Versuchsgruppen

Unabhängig davon, zu welcher Gruppe jedes Tier gehörte, war die normale, ungestörte Spermatogenese eine absolute Voraussetzung für die Bildung der Versuchsgruppen. In jeder Gruppe war jeweils ein Tier azoosperm. Aus diesem Grund wurden diese Kaninchen aus dem Versuch ausgeschlossen. Die geometrischen Mittelwerte für das Ejakulatvolumen, Spermatozoendichte und Globalmotilität (CASA) sind in Abb. 7, 8 und 9 dargestellt. Dabei fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (Varianzanalyse).

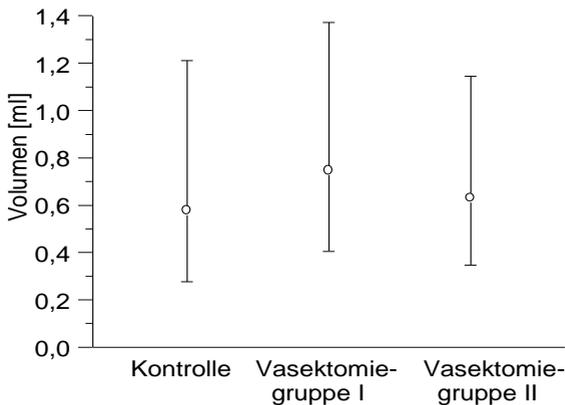


Abb. 7 Ejakulatvolumen in ml für die drei Versuchsgruppen als geometrische Mittelwerte mit 25%- und 75%-igen Perzentile. Kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ($p=0,8$, Varianzanalyse).

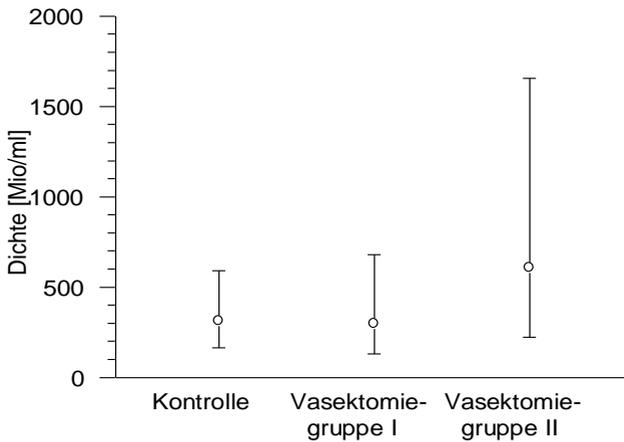


Abb. 8 Spermatozoendichte in Mio/ml im Ejakulat für die drei Versuchsgruppen als geometrische Mittelwerte mit 25%- und 75%-igen Perzentile. Kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ($p=0,1$, Varianzanalyse).

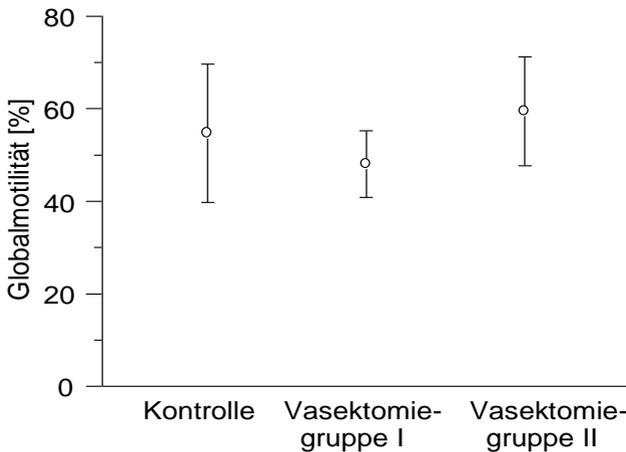
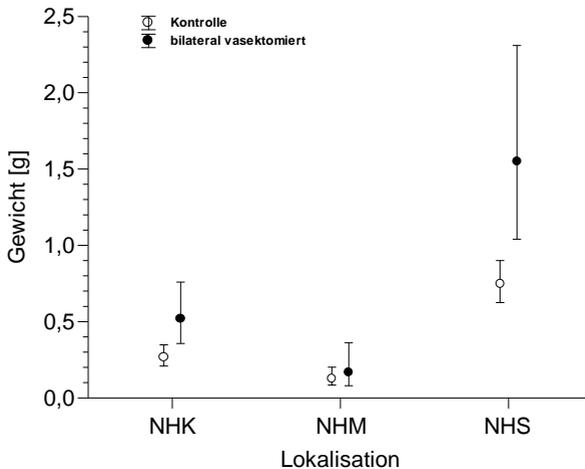


Abb. 9 Globalmotilität (CASA) der Spermatozoen im Ejakulat für die drei Versuchsgruppen als geometrische Mittelwerte mit 25%- und 75%-igen Perzentile. Kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ($p=0,1$, Varianzanalyse).

4.2 Gewicht der Nebenhodenkompartimente

Abb. 10 stellt die Gewichte der Nebenhodenkompartimente für die differenten Nebenhodenlokalisierungen der drei Versuchsgruppen graphisch dar. Dabei bestand eine signifikante Zunahme der Gewichte in den Nebenhodenschwänzen ($p < 0,001$, Dreifaktorielle Varianzanalyse), darüberhinaus führte die Vasektomie nur am Nebenhodenschwanz zu einem signifikanten ($p < 0,001$) Gewichtsanstieg zwischen obstruierten und nicht obstruierten Nebenhoden des gleichen Tieres (Abb. 10).



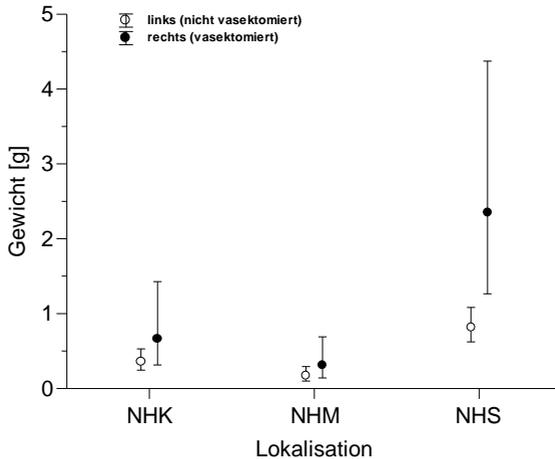


Abb. 10 Gewicht in g der einzelnen Nebenhodenkompartimenten für die drei Versuchsgruppen. NHK – Nebenhodenkopf; NHM – Nebenhodenmitte; NHS – Nebenhodenschwanz (die Gewichte sind als geometrische Mittelwerte mit 25%- und 75%-ige Perzentile dargestellt).

4.3 Spermatozoendichte in den einzelnen Nebenhodenkompartimenten

In allen Gruppen, d. h. sowohl bei den vasktomierten, als auch bei den nicht vasktomierten Nebenhoden war die Spermatozoendichte im Nebenhodenschwanz im Vergleich zu den anderen Teilen des Nebenhodens signifikant höher ($p < 0,001$, Dreifaktorielle Varianzanalyse). Der Unterschied zwischen den vasktomierten und nicht vasktomierten Nebenhodenkompartimenten des gleichen Tieres war nicht signifikant (Abb. 11).

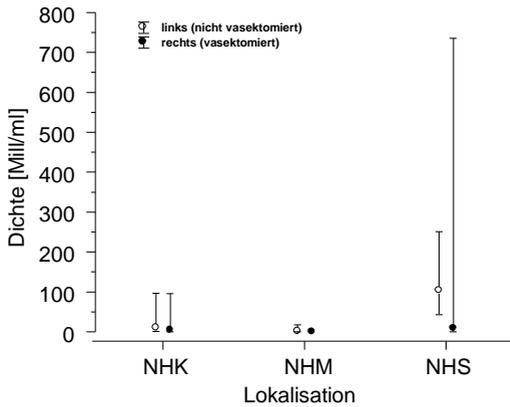
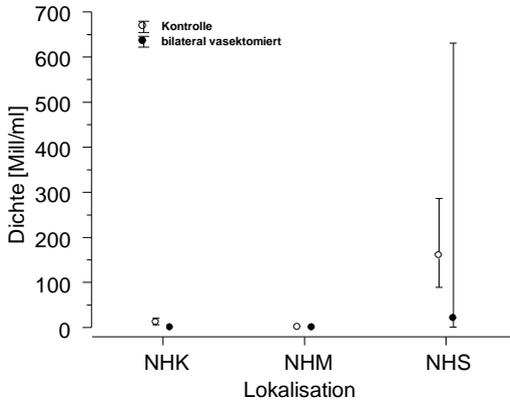


Abb.11 Spermatozoendichte in Mill/ml für die einzelnen Nebenhodenkompartimenten für die drei Versuchsgruppen. NHK – Nebenhodenkopf; NHM – Nebenhodenmitte; NHS – Nebenhodenschwanz. (die geometrische Mittelwerte für die Spermatozoendichte wurden mit 25%- und 75%-igen Perzentilen dargestellt).

4.4 Spermatozoenmotilität in den einzelnen Nebenhodenkompartimenten

Bei fast allen vasktomierten Nebenhoden waren die Spermatozoen nicht motil. Nur bei einem einzigen Tier fanden sich motile Spermien. Bei der Globalmotilität in der Kontrollgruppe war ein Einfluß der Lokalisation zu beobachten – im Nebenhodenschwanz wurde ein signifikant höherer Anteil der motilen Spermatozoen im Vergleich mit dem Nebenhodenkopf beobachtet ($p < 0,001$, Multifaktorielle Varianzanalyse, Abb. 12 oben). Bei den beidseitig vasktomierten Kaninchen wurden in nur einem Nebenhoden motile Spermatozoen gefunden (Abb. 12, oben). In allen anderen Nebenhodeneinheiten waren die Spermatozoen nicht motil. Eine ähnliche Situation wurde in der Gruppe der einseitig vasktomierten Tieren festgestellt. In der nicht vasktomierten Seite (links) wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Nebenhodenschwanz und –kopf festgestellt ($p < 0,001$, Multifaktorielle Varianzanalyse, Abb. 12 unten). In den vasktomierten Nebenhoden wurden keine motile Spermatozoen gefunden (Abb. 12, unten).

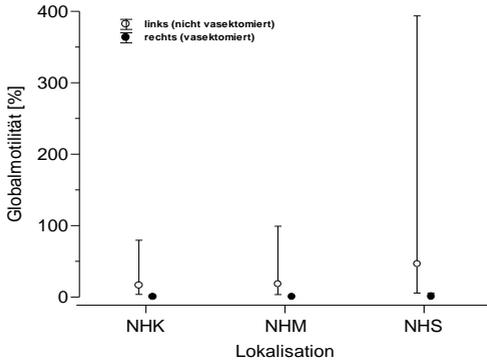
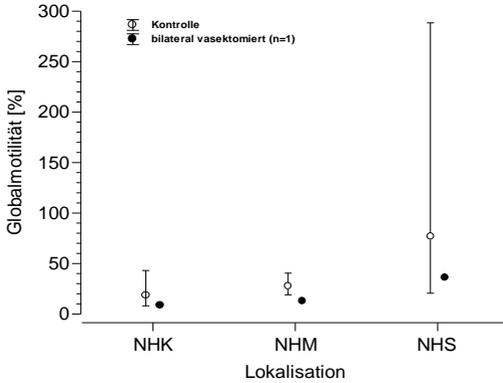


Abb. 12 Die Globalmotilität in % in den einzelnen Nebenhodenkompartimenten für die drei Versuchsgruppen. NHK – Nebenhodenkopf; NHM – Nebenhodenmitte; NHS – Nebenhodenschwanz. Der Unterschied in der Globalmotilität bei der Kontrollgruppe zwischen den Nebenhodenkopf und –schwanz ist signifikant ($p < 0,001$, Multifaktorielle Varianzanalyse). In der zweiten Versuchsgruppe (beidseitig vaskotomiert) gab es nur ein einziges Nebenhodenkompartiment mit motilen Spermatozoen. Ähnliche Situation bei der einseitig vaskotomierten Gruppe – keine Motilität auf der vaskotomierten Seite und signifikanter Anstieg ($p < 0,001$, Multifaktorielle Varianzanalyse) der Motilität bei der vaskotomierten Seite im Nebenhodenschwanz. (Die geometrische Mittelwerte für die Chromatinkondensierung wurden mit 25%- und 75%-igen Perzentilen dargestellt.)

4.5 Chromatinkondensierung von Spermatozoen aus Homogenisaten von Nebenhoden und Hoden.

Die Ergebnisse für die Chromatinkondensierung wurden nach der Klassifikation von Henkel [53] für die Klasse A (mit komplett kondensiertem DNA – Material) dargestellt. In Abb. 13 ist der prozentuale Anteil der Spermatozoen der Klasse A für alle Versuchsgruppen und Lokalisationen als Übersicht dargestellt. Tendenziell zeigte sich ein zunehmender Prozentanteil von Spermatozoen mit komplett kondensiertem DNA – Material (Klasse A) vom Hoden zum Nebenhodenschwanz.

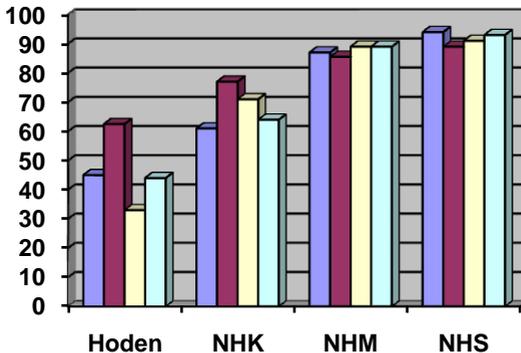


Abb. 13 Ergebnisse der Chromatinkondensierung: Prozentuale Verteilung der Spermatozoen der Klasse A in allen Kompartimenten für die Kontrollen, Vasektomiegruppe I (beidseitig vasektomiert) und Versuchsgruppe II (links – nicht vasektomiert, rechts – vasektomiert).

- Kontrollgruppe (beidseitig nicht obstruiert)
- Vasektomiegruppe I (beidseitig obstruiert)
- Vasektomiegruppe II, (linke Seite, nicht obstruiert)
- Vasektomiegruppe II, (rechte Seite, obstruiert)

In Abb. 14 wurde der Einfluß der Lokalisation der Spermatozoenentnahme für die Chromatinkondensierung zwischen den Kontrollen und den beidseitig vasktomierten Kaninchen (Versuchsgruppe I) dargestellt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied für die testikuläre Lokalisation ($p=0,03$) und für den Nebenhodenkopf ($p=0,08$, Student – t – Test), dagegen kein Unterschied im Mittelstück ($p=0,54$), während im Nebenhodenschwanz für die Kontrollen die Chromatinkondensierung signifikant ($p<0,001$) erhöht war.

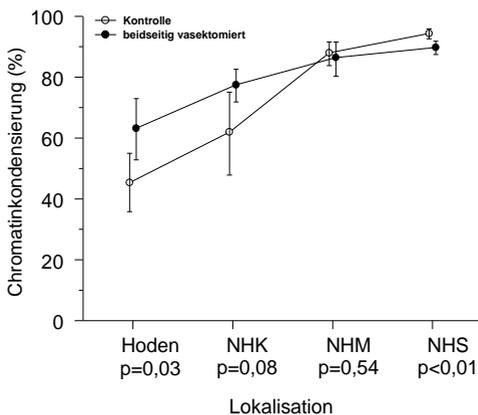


Abb. 14 Chromatinkondensierung: Vergleich zwischen Kontrollgruppe und den beidseitig vasktomierten Tieren. NHK – Nebenhodenkopf; NHM – Nebenhodenmitte; NHS – Nebenhodenschwanz. (Die Chromatinkondensierung wurde als geometrischen Mittelwerte mit 25%- und 75%-igen Perzentilen dargestellt.)

Für Kontrollen und beidseitig vasktomierte Tiere ließ sich in allen Fällen im Nebenhoden gegenüber dem Hoden eine signifikant höhere Chromatinkondensierung nachzuweisen (Tabelle 4), der gleiche Befund fand sich auch beim intraindividuellem Vergleich der links nicht und rechts vasktomierten Tiere (Tabelle 4).

Lokalisation	Kontrollgruppe	Gruppe I (beidseitig obstruiert)	Gruppe II (links, nicht obstruiert)	Gruppe II (rechts, obstruiert)
Hoden vs. Nebenhoden- kopf	p< 0,01	p= 0,05	p<0,01	p<0,01
Hoden vs. Nebenhoden- mittelstück	p< 0,01	p< 0,01	p<0,01	p<0,01
Hoden vs. Nebenhoden- schwanz	p< 0,01	p< 0,01	p<0,01	p<0,01

Tabelle 4. Chromatinkondensierung: Darstellung der p-Werte im Vergleich der Entnahmestelle für die unterschiedlichen Nebenhodenkompartimente für Kontrollen, beidseitig vasktomierte und einseitig vasktomierte Tiere (Dunnett – Test).

Der Vergleich zwischen der linken (nicht obstruierten) und rechten (obstruierten) Seite der einseitig vasktomierten Gruppe wird in Abb. 15 für die unterschiedlichen Lokalisationen graphisch gezeigt. Auch hier kann für beide Seiten ein signifikanter Anstieg der Spermatozoen aus der Klasse A im Laufe der Nebenhodenpassage festgestellt werden (Tabelle 4). Vergleicht man die Chromatinkondensierung zwischen obstruierten und nicht obstruierten Seite, ergeben sich keine signifikanten intraindividuellen Unterschiede (Abb. 15).

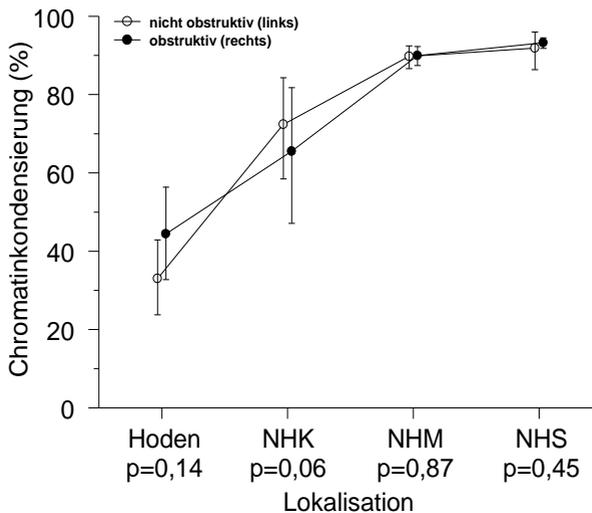


Abb. 15 Chromatinkondensierung: Verteilung der Spermatozoen mit komplett kondensierten DNA – Material in allen 4 Lokalisationen. Vergleich zwischen den beiden Seiten der unilateral vasktomierte Gruppe. NHK – Nebenhodenkopf; NHM – Nebenhodenmitte; NHS – Nebenhodenschwanz. (Die geometrischen Mittelwerte für die Chromatinkondensierung wurden mit 25%- und 75%-igen Perzentilen dargestellt.)

4. 6 Histologische Untersuchungen

4.6.1 Hodenmorphologie und Spermatogenesekinetik der Kontrollgruppe und Vasektomiegruppe II (einseitig nicht vasektomiert).

Die prozentuale Verteilung dieser Stadien der Spermatogenese für die Kontrollgruppe und die nicht obstruktive Vasektomiegruppe II sind zusätzlich in Abb. 16 graphisch dargestellt. Die einzelnen Spermatogenesestadien waren wie folgt gekennzeichnet:

Stadium I war gekennzeichnet durch Anwesenheit von runden Spermatiden adluminal, die Spermatozoen sind schon im Lumen der Tubuli freigesetzt. Zwei Generationen von primären Spermatozyten liegen vor (Abb. 16).

Stadium II charakterisiert sich mit einer Elongierung der runden Spermatiden. Ihre Kerne hatten während dieses Stadiums eine ovale Form. Zwei Generationen von primären Spermatozyten sind während dieses Stadiums erkennbar (Abb. 17).

Stadium III. Hier war eine komplette Elongierung der Spermatiden vorhanden. Auch hier wurden zwei Generationen von primären Spermatozyten beobachtet (Abb. 18).

Stadium IV war gekennzeichnet durch die meiotische Teilung der „ältere“ Generation von primären Spermatozyten und Bildung von sekundären Spermatozyten, als auch intermediären Spermatogonien. Am Ende dieses Stadium entstanden runde Spermatiden (Abb. 19).

Stadium V charakterisierte sich mit Bildung von intramedialen Spermatogonien, einer Generation von primären Spermatozyten, runden und elongierten Spermatischen (Abb. 20).

Stadium VI. Während dieses Stadiums entstanden die Spermatogonien Typ B. Eine Generation von primären Spermatozyten, runde Spermatischen, die elongierte Spermatischen wanderten in Richtung Lumen (Abb. 21).

Stadium VII war gekennzeichnet durch Anwesenheit von Spermatogonien Typ B, einer Generation von primären Spermatozyten, runde Spermatische und wandernde nach dem Lumen elongierte Spermatischen (Abb. 22).

Stadium VIII. Hier bildete sich die zweite Generation von primären Spermatozyten durch mitotische Teilung der Spermatogonien Typ B. Runde Spermatischen und Spermatozoen, die linear adluminal geordnet waren (Abb.23).

Nach den Kriterien von Swierstra und Foot [42] wurde der Prozentanteil für jedes Stadium in den genannten Gruppen nach Auszählung von 312 Tubuli in insgesamt 21 Hodenkompartimenten bestimmt. Die Aufschlüsselung ist für die Kontrollgruppe und nicht vasktomierte Seite der Vasktomiegruppe II in Tabelle 5 dargestellt. Dabei zeigte sich eine geringere Häufigkeit von Stadium IV (Tabelle 5).

	Kontrollgruppe	Vasektomiegruppe II (li nicht obstruktiv)
Stadium I (%)	19,6 ± 3	22,8 ± 3,3
Stadium II (%)	10,5 ± 2,3	11,9 ± 2,4
Stadium III (%)	10,5 ± 2,5	9 ± 1,5
Stadium IV (%)	4,6 ± 3,6	2,8 ± 2,6
Stadium V (%)	5,9 ± 3,6	5,2 ± 3,5
Stadium VI (%)	11,8 ± 3,2	11,9 ± 4,3
Stadium VII (%)	17,8 ± 3,5	13,8 ± 3,8
Stadium VIII (%)	19,8 ± 4,2	22,8 ± 10,4

Tabelle 5: Prozentanteil für jedes Spermatogenesestadium bei allen nicht obstruierten Hoden (312 Tubuli/21 Hoden)

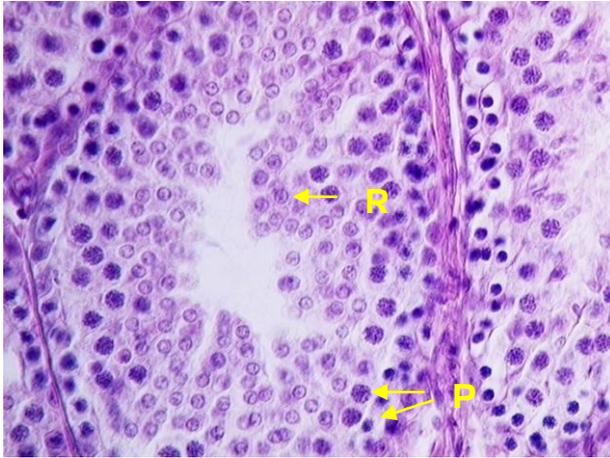


Abb. 16 Stadium I der Kaninchenspermatogenese. R – runde Spermatide; P – primäre Spermatozyten (HE, PV 40x).

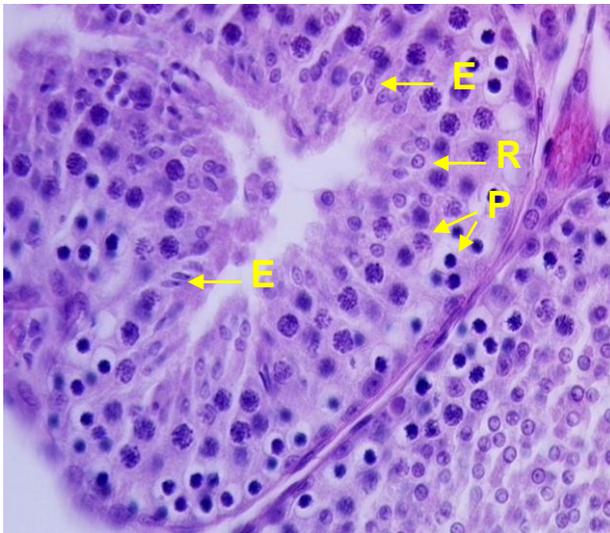


Abb. 17 Stadium II der Kaninchenspermatogenese. R – runde Spermatide; P – primäre Spermatozyten; E – elongierte Spermatiden (HE, PV 40x).

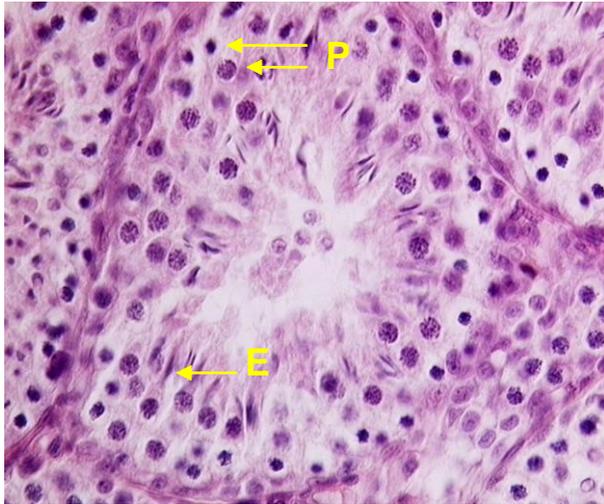


Abb. 18 Stadium III der Kaninchenspermatogenese. P – primäre Spermatozyten; E – elongierte Spermatisden (HE, PV 40x).

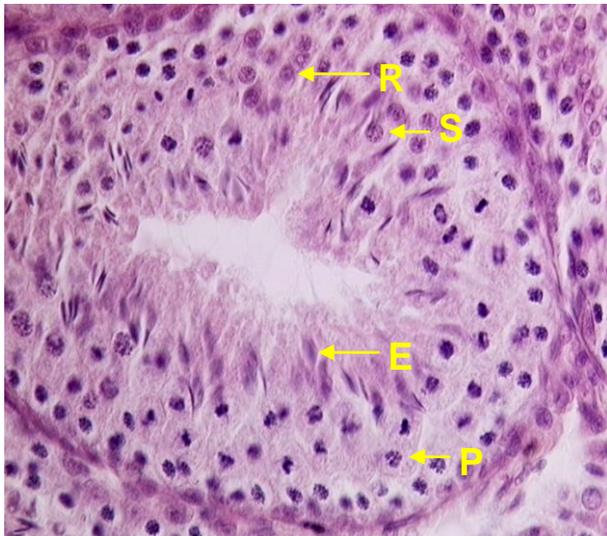


Abb. 19 Stadium IV der Kaninchenspermatogenese. P – primäre Spermatozyten; SS – sekundäre Spermatozyten; R – runde Spermatisden; E – elongierte Spermatisden (HE, PV 40x).

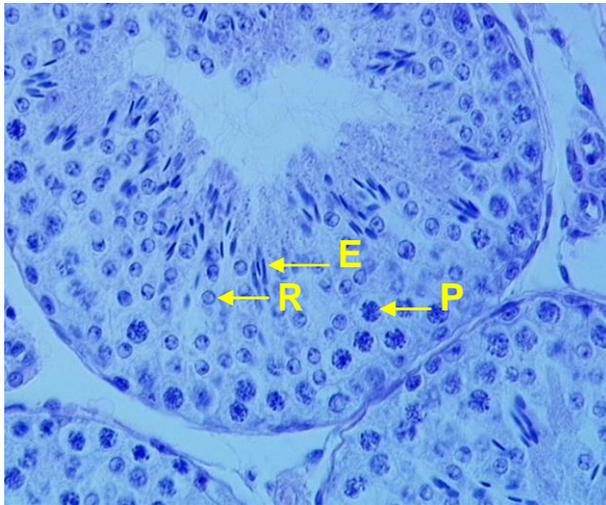


Abb. 20 Stadium V der Kaninchenspermatogenese. R – runde Spermatide; P – primäre Spermatozyten; E – elongierte Spermatiden (HE, PV 40x). Blaufärbung bei Verwendung von UV - Filter



Abb. 21 Stadium VI der Kaninchenspermatogenese. R – runde Spermatide; P – primäre Spermatozyten; E – elongierte Spermatiden (HE, PV 40x).

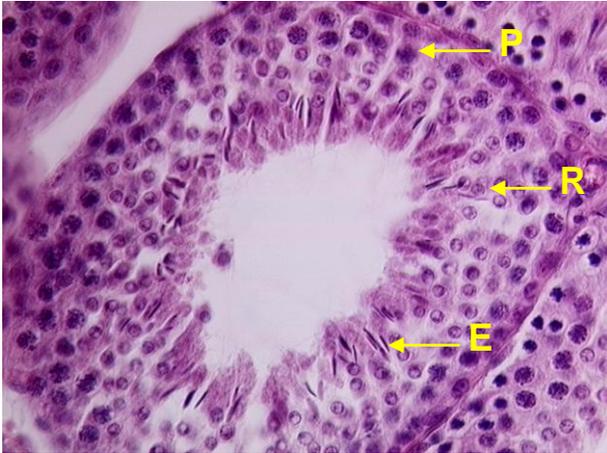


Abb. 22 Stadium VII der Kaninchenspermatogenese. R – runde Spermateide; P – primäre Spermatozyten; E – elongierte Spermateiden (HE, PV 40x).

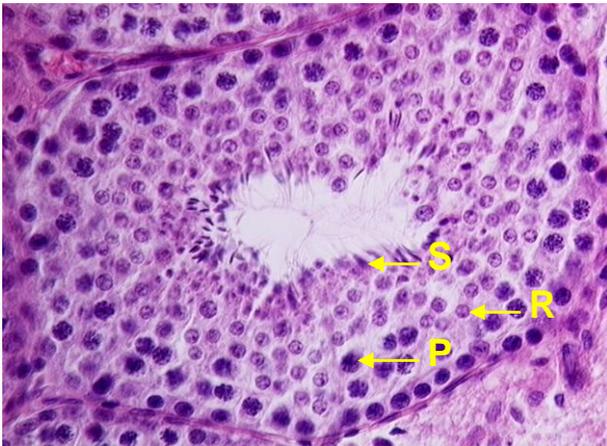
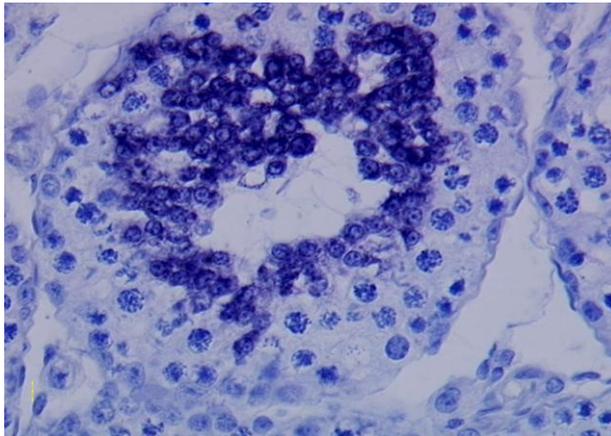


Abb. 23 Stadium VIII der Kaninchenspermatogenese. R – runde Spermateide; P – primäre Spermatozyten; S – Spermatozoen (HE, PV 40x).

4.6.2 Expression der mRNA für die Kernproteine in den nicht obstruierten Hoden

In allen nicht obstruierten Hoden wurde ein deutliches Signal für die mRNA des Transitionsproteins 1 und der beiden Protamine beobachtet (Abb. 24). Die positiven runden und elongierten Spermatischen Zellen waren stark angefärbt und konnten problemlos von den anderen Zellen unterschieden werden. Das Signal für PRM 1-mRNA war etwas schwächer im Vergleich zu den anderen zwei Kernproteinen, aber dennoch stark genug um die positiven Zellen von den negativen zu unterscheiden. Eine leichte Gegenfärbung mit Hämatoxylin machte das Bild noch deutlicher. Eine Expression für mRNA von Transitionsprotein 2 konnte nicht nachgewiesen werden.



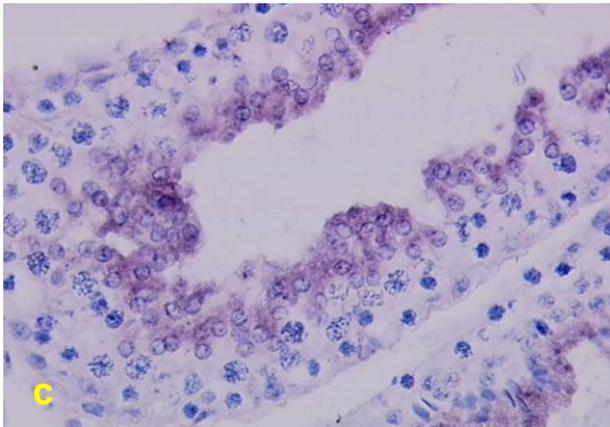
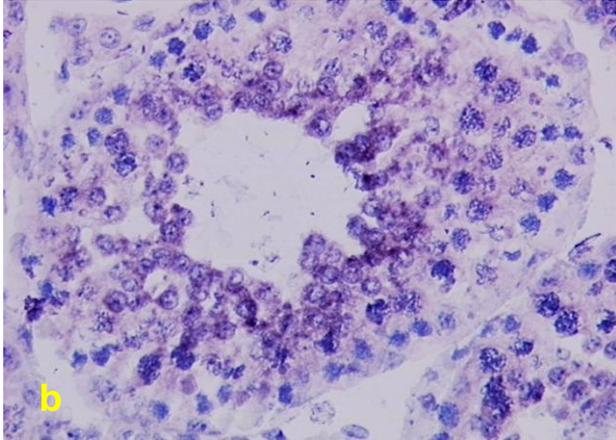


Abb. 24 Expression der mRNA für TP 1 (a), PRM 1 (b) und PRM 2 (c) im Zytoplasma der runden Spermatiden während des Stadiums I. der Kaninchenspermatogenese. Bräunlich markierte Felder stellen Zytoplasma mit mRNA für das entsprechende Protein dar (ISH, PV 40x).

In Tabelle 6 ist die Verteilung der Expression für Transitionsprotein 1 und die Protamine 1 und 2 für die verschiedenen Stadien der Kaninchenspermatogenese dargestellt. Hier erschien das Signal für die mRNA in den runden und elongierten Spermatisiden.

							
							
							
rStd	r-e Std	eStd	eStd	eStd	eStd	eStd	Spr
pSz II	pSz II	pSz II	pSz II, sSz, rStd	rStd	rStd	rStd	rStd
pSz I	pSz I	pSz I	pSz I	pSz	pSz	pSz	Sg B, pSz I
Sg A	Sg A	Sg A	Sg A, I	Sg A, I, Sg B	Sg A, Sg B	Sg A, Sg B	Sg A,
St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8

Tabelle 6: Verteilung der Expression von TP 1-mRNA, PRM 1-mRNA und PRM 2-mRNA in den 8 Stadien der Kaninchenspermatogenese. Positives Signal bei den runden und elongierten Spermatisiden (rot markiert).

Legende: Sg A – Spermatisiden A; Sg B – Spermatisiden B; pSz – primäre Spermatisiden; rStd – runde Spermatisiden; eStd – elongierte Spermatisiden; Spr – Spermatisiden.

 TP 1-mRNA  PRM 1-mRNA  PRM 2-mRNA

Aus Tabelle 6 ist zu sehen, dass die Expression des Transitionsprotein 1 während des Stadiums VIII beginnt und bis zum Stadium IV zu beobachten ist. Die mRNA für die beide Protamine begann später zu exprimieren – erst im späteren Stadium I und dauerte etwas länger. Zytoplasmaresten für PRM 1-mRNA der elongierten Spermatozoen wurden bis zum Stadium VII beobachtet, die Expression für PRM 2-mRNA endete im Stadium VI.

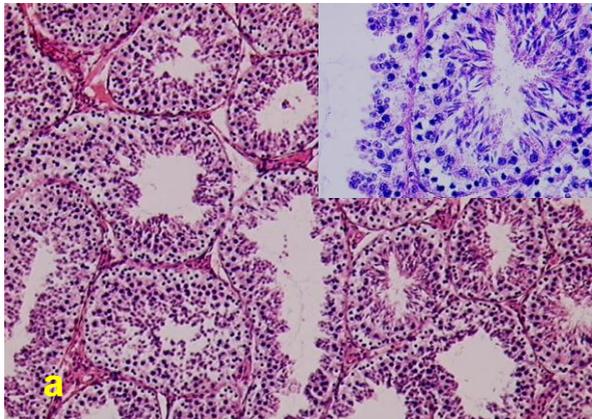
Die Expression für alle 3 Kernproteine beginnt bei den runden Spermatozoen (Abb. 6, 24). Nach der Elongation im Stadium II bleibt das Signal im Zytoplasma der elongierten Spermatozoen bis zum entsprechenden Stadium für jedes Kernprotein nachweisbar. Nach dem Stadium IV war die nächste Generation von runden Spermatozoen nachweisbar, aber diese sind logischerweise negativ. Das Signal für diese Generation von runden Spermatozoen beginnt im Stadium VIII, bzw. I.

Im nicht obstruierten Hoden wurde der Prozentanteil der positiven runden Spermatozoen von allen runden Spermatozoen pro Tubulus bestimmt. Das konnte gut im Stadium I durchgeführt werden. Das Transitionsprotein 1 wurde in $92\% \pm 4,2\%$ aller runden Spermatozoen exprimiert. Für die beide Protamine ergaben sich mittlere Werte von $91\% \pm 2,8\%$ (PRM 1), bzw. $92\% \pm 3,4\%$ (PRM 2).

4.6.3 Hodenmorphologie und Spermatogenesekinetik bei den obstruierten Hoden

Eine Besonderheit dieses obstruktiven Tiermodells war die Vielfalt der Veränderungen nach 6-monatiger Vasektomie. Es wurden sowohl Hoden mit ganz schwach ausgeprägten Veränderungen, als auch solche mit Spermatogenese-arrest bis zur Stufe der Spermatogonien und massiver lymphozytärer Infiltration gefunden.

Die häufigste Störung, die bei der histologischen Untersuchung zu beobachten war, war der Spermatogenese-arrest, d. h. Abwesenheit von reifen Zellformen im Keimepithel (Abb. 25).



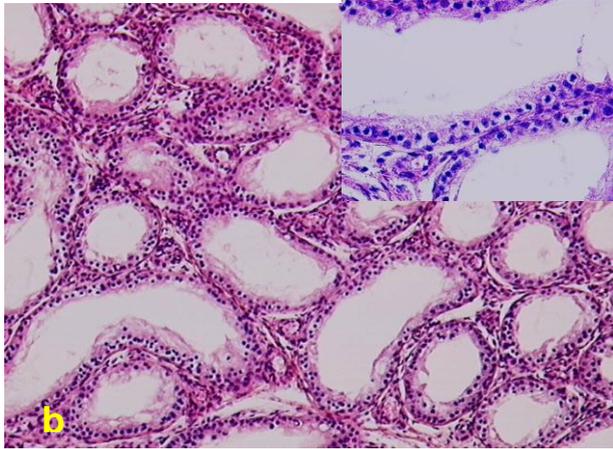


Abb. 25 Spermatogenese-arrest auf der Stufe der runden und elongierten Spermatiden (a) und der Spermatogonien (b). (HE, PV 20x). Ausschnitt – Darstellung des Keimepithels bei 40 – facher primärer Vergrößerung.

In einigen Hoden war der Spermatogenese-arrest von massiver lymphozytärer Infiltration im Interstitium und in manchen Fällen auch in den Tubuli begleitet (Abb. 26). In der Tubuli von einigen Hoden wurden zahlreiche Spermatozoenköpfe beobachtet (Abb. 27). Es wurden sowohl Hoden mit Spermatogenese-arrest bis zur Stufe der Spermatogonien als auch solche mit elongierten Spermatiden bis zum Stadium VII gefunden. Stadium VIII der Kaninchenspermatogenese, d. h. die lineare Anordnung entlang des Keimepithels vor Freilassung in das Lumen (Spermiation) wurde nicht nachgewiesen.

Andere Besonderheiten, die in den vasktomierten Hoden auffielen waren multinukleäre Spermatozyten (Abb. 31 a, b) und zahlreiche Fragmente vom DNA – Material (Abb. 28).

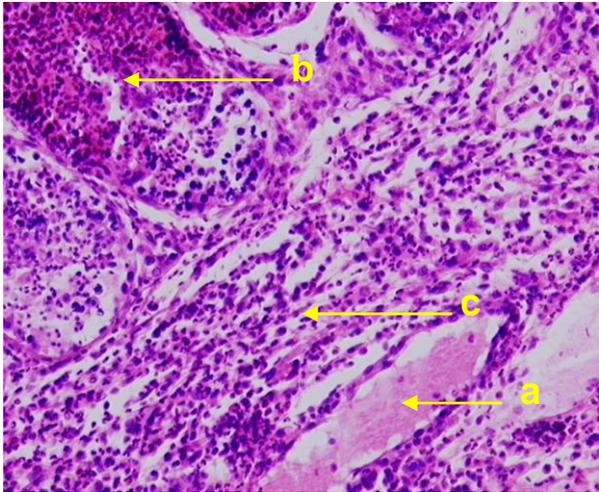


Abb. 26 Vasektomierter Hoden (HE, PV 40x); a – Blutgefäß, b – Tubulus, c – lymphozytäre Infiltration im Interstitium

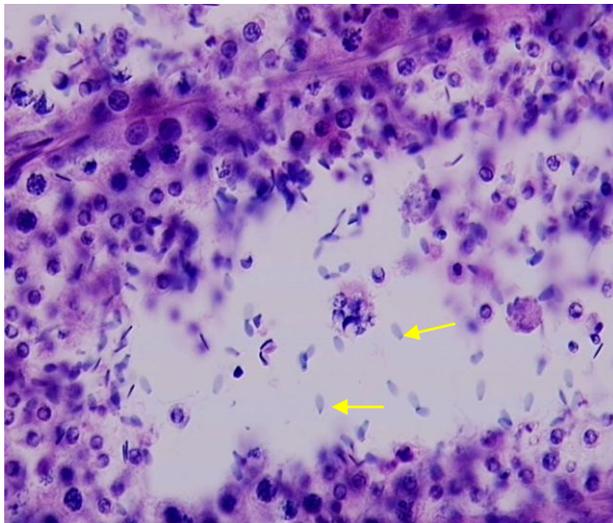


Abb. 27 Spermatozoenköpfe (Pfeil) im Lumen der Tubuli (HE, PV 40x)

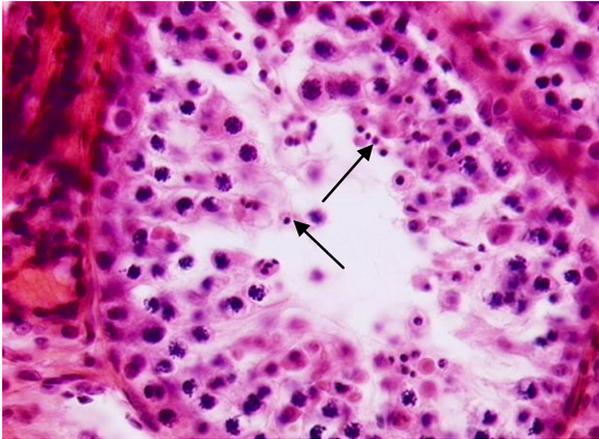


Abb. 28. Fragmente vom Chromatin (Pfeil) in einem vasktomierten Hoden (HE, PV 40x).

Tabelle 7 fasst die histologischen Befunde und die prozentuale Verteilung der einzelnen Spermatogenesestadien bei allen obstruierten Hoden zusammen, wobei Stadium VIII komplett fehlte.

Vasektomiegruppe I	St. I	St. II	St. III	St. IV	St. V	St. VI	St. VII	St. VIII
1 li	Spermatogenese-arrest b. z. prim. Spermato-cyten							
1 re	Spermatogenese-arrest b. z. runden Spermato-iden							
2 li	Spermatogenese-arrest b. z. prim. Spermato-cyten							
2 re	Spermatogenese-arrest b. z. prim. Spermato-cyten							
3 li	Spermatogenese-arrest b. z. prim. Spermato-cyten							
3 re	Spermatogenese-arrest b. z. runden Spermato-iden							
4 li	Spermatogenese-arrest b. z. Spermato-gonien							
4 re	33,3	26,7	10	13,3	10	6,7	0	0
5 li	Spermatogenese-arrest b. z. Spermato-gonien							
5 re	Spermatogenese-arrest b. z. prim. Spermato-cyten							
6 li	Spermatogenese-arrest b. z. elongierten Spermato-iden							
6 re	Spermatogenese-arrest b.z. prim. Spermato-cyten							
7 li	Spermatogenese-arrest b. z. elongierten Spermato-iden							
7 re	Spermatogenese-arrest b.z. prim. Spermato-cyten. Wenig runde Spermato-iden							
Vasektomiegruppe II	St. I	St. II	St. III	St. IV	St. V	St. VI	St. VII	St. VIII
1 re	Spermatogenese-arrest b. z. prim. Spermato-cyten							
2 re	Spermatogenese-arrest b.z. Spermato-gonien							
3 re	26,7	23,3	16,7	13,3	10	10	0	0
4 re	23,3	6,7	13,3	13,3	13,3	16,7	13,3	0
5 re	26,7	26,7	10	6,7	3,3	10	10	10
6 re	Spermatogenese-arrest b. z. prim. Spermato-cyten							
7 re	Spermatogenese-arrest b. z. prim. Spermato-cyten							

Tabelle 7: Histologischer Befund und prozentuelle Verteilung der einzelnen Stadien der Spermatogenese bei der beidseitig vasektomierten Gruppe. Abwesenheit von Stadium VIII (Spermatozoenfreigabe im Lumen) bei den vasektomierten Hoden.

4.6.4 Expression der mRNA für die Kernproteine in den obstruierten Hoden

Der Zustand einer 6-monatigen Vasektomie hat deutliche quantitative Veränderungen in der Expression der mRNA für Transitionsprotein 1 und Protamine 1 und 2 gebracht. Tabelle 8 fasst die Anwesenheit der Expression der Kernproteine in jedem einzelnen Hoden zusammen (Abb. 29, 30). Die Expression von mRNA für TP1 und PRM2 wird in Abb. 29 und Abb. 30 exemplarisch dargestellt.

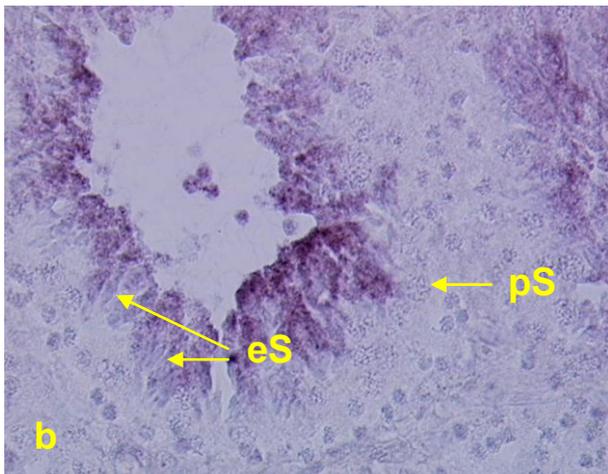
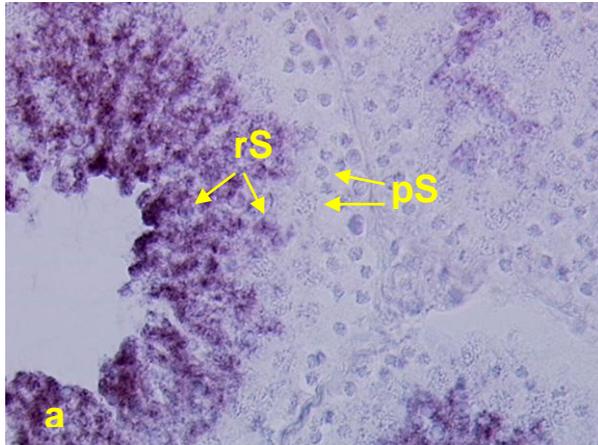


Abb. 29 Expression von mRNA für TP1 bei vasktomierten Hoden in den runden (a) und elongierten (b) Spermatiden (ISH, PV 40x). Die bräunlich markierte Felder um die runden (a) und elongierten (b) Spermatiden stellen eine Expression für TP 1 mRNA dar. Legende: pS – primäre Spermatozyten, rS – runde Spermatiden, eS – elongierte Spermatiden.

Gruppe/Tier/Seite	TP 1-mRNA	PRM 1-mRNA	PRM 2-mRNA
Vasektomiegruppe I			
1 li	-	-	-
1 re	-	-	-
2 li	-	-	-
2 re	-	-	-
3 li	-	-	-
3 re	-	-	-
4 li	-	-	-
4 re	+	-	+
5 li	-	-	-
5 re*	+	-	-
6 li	+	-	-
6 re	-	-	-
7 li	+	-	-
7 re	+	-	-
Vasektomiegruppe II			
1 li	+	+	+
1 re	-	-	-
2 li	+	+	+
2 re	-	-	-
3 li	+	+	+
3 re	+	+	+
4 li	+	+	+
4 re	+	+	+
5 li	+	+	+
5 re	+	+	+
6 li	+	+	+
6 re	-	-	-
7 li	+	+	+
7 re	-	-	-

Tabelle 8: Anwesenheit von Expression von den Kernproteine für jeden einzelnen Hoden.

*- Hoden mit multinuklearen Spermatozyten, positiv für TP 1-mRNA.

In einigen Hoden betraf die Depopulation der Keimzellen die elongierten und die runden Spermatozoen, d. h. im Keimepithel waren Sertoli Zellen, Spermatozyten und Spermatozoen vorhanden. Demzufolge war in diesen Hoden auch keine Expression der Kernproteine zu beobachten. In diesen Hoden, in denen die Veränderungen nicht so stark ausgeprägt und runde und elongierte Spermatozoen vorhanden waren, war eine Expression nachweisbar, insbesondere für Transitionsprotein 1. Protamin 1 wurde ganz selten und ganz schwach exprimiert. Protamin 2 zeigte eine Expression sowohl bei den runden, als auch bei den elongierenden Spermatozoen (Abb. 30).

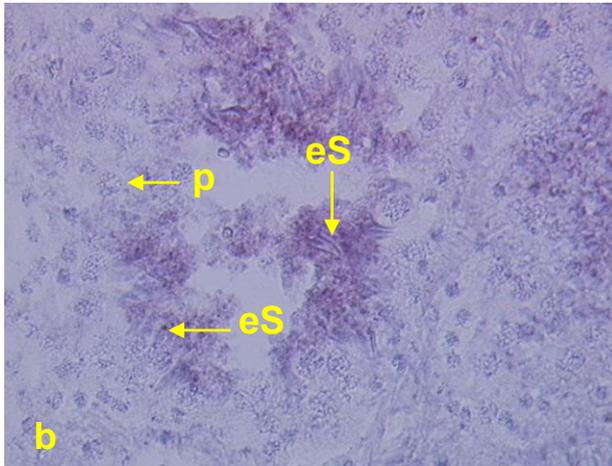
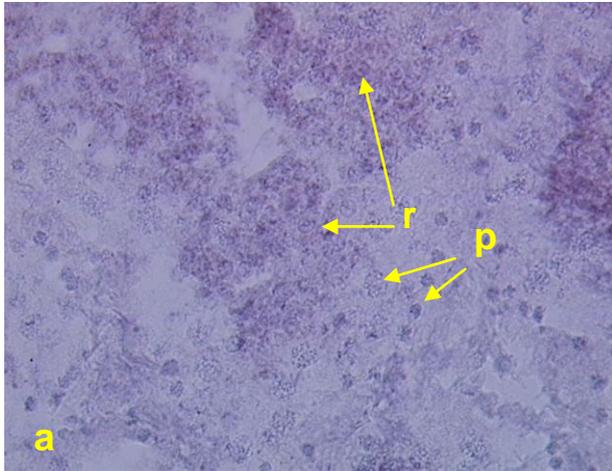


Abb. 30 Vasektomierter Hoden. Expression für PRM 2 mRNA in den runden (a) und elongierten Spermatiden (ISH, PV 40x). Die bräunlich markierten Felder um die runden (a) und elongierten (b) Spermatiden stellen eine Expression für PRM 2 mRNA dar. Legende: pS – primäre Spermatozyten, rS – runde Spermatiden, eS – elongierte Spermatiden.

Grundsätzlich wurden die vasktomierten Hoden in zwei Gruppen unterteilt: Hoden, die eine Expression von mRNA für eines der Kernproteine (meist TP 1) und solche, die keine Expression aufweisen. In 8 von 21 obstruierten Hoden wurde eine Expression für TP 1-mRNA nachgewiesen. Es gab aber quantitative Unterschiede in der Expression in den verschiedenen Hoden – in einigen Hoden sind zahlreiche Tubuli positiv, in anderen nur einige, manchmal sogar nur eins oder zwei.

Obwohl die Spermatogenese bei den obstruierten Hoden quantitativ reduziert war, blieb das Expressionsmuster der Kernproteinen erhalten. Wie bei der Kontrollgruppe wurde das Signal in den runden und elongierten Spermatiden während der gleichen Stadien festgestellt. Die einzige Ausnahme von diesem Expressionsmuster war die von TP 1 für die multinukleären Spermatozyten. In einem Hoden wurden zahlreiche multinukleäre Spermatozyten entdeckt. Diese waren positiv für Transitionsprotein 1 (Abb. 31), aber negativ für die beiden Protamine.

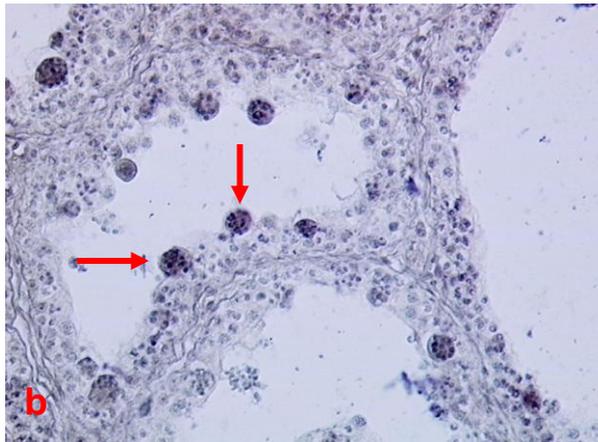
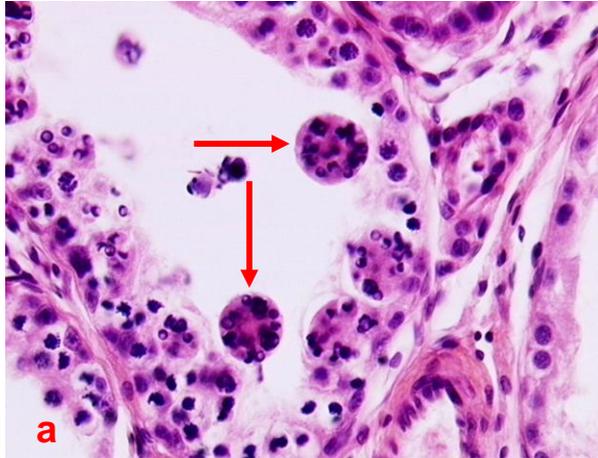


Abb. 31 Multinukleäre Spermatozyten in einem vasktomierten Hoden. Hämatoxylin – Eosin a) (PV 40x) und positives Signal für TP 1-mRNA, ISH b) (PV 10x).

5. DISKUSSION

5.1 Das „Giessener“ Kaninchen Verschlussazospermiemodell

Methodik der Spermioqrammerstellung und Spermioqramme vor Vasektomie:

Die von uns ermittelten Spermioqrammwerte der Rammler zeigten eine gute Übereinstimmung mit den von Pauffler angegebene Normwerten [41], sie stimmten auch mit den Voruntersuchungen unserer eigenen Arbeitsgruppe überein [103].

Operationsverläufe:

Das Kaninchen wird von einigen Autoren als problematisches Narkosetier angesehen [43, 47]. Nach sorgfältiger Planung der Anästhesie kam es bei 23 Operationen zu keinem ernsten Narkosezwischenfall. Wir sehen dadurch die aufwendige Narkoseführung gerechtfertigt.

Vasektomie:

Die von uns vorgenommene „Standard“ – Vasektomie führte bei allen operierten Tieren zu einer kompletten Azoospermie, wie bereits früher von uns beschrieben [103].

Organentnahme und –bearbeitung:

Die Organentnahme wurde vor Euthanasierung der Tiere vorgenommen. Spermatozoen konnten von allen Kompartimenten des Hoden – Nebenhoden – Komplexes, wie von Moore und Bedford [39] beschrieben extrahiert werden, wobei ähnlich zu dieser Arbeitsgruppe eine quantitative Analyse des entnommenen Materials möglich war.

5.2 Spermatozoendichte und Globalmotilität der entnommenen Spermatozoen in Abhängigkeit der Nebenhodenlokalisation

Die Spermatozoendichte wurde im Homogenat in der Neubauerkammer bestimmt. Aus technischen Gründen haben wir die Nebenhodenteile in 3 ml statt 2 ml homogenisiert. Deswegen sind unsere Absolutwerte höher im Vergleich zu Moore und Bedford [39]. Sowohl bei den nicht obstruierten, als auch bei den obstruierten Nebenhoden sind die Spermatozoen im Nebenhodenschwanz konzentriert, stärker in der obstruierten Situation bei den vasktomierten Nebenhoden. Eine zunehmende Spermatozoendichte nach der Vasektomie haben auch Moore und Bedford [39] in ihrem Kaninchenmodell festgestellt: Der Nebenhodenschwanz ist damit der „Speicher“ für Spermatozoen in der Obstruktion.

Die Globalmotilität der Spermatozoen wurde mittels CASA (MIKA[®]) analysiert. In den nicht gestauten Nebenhoden zeigte sich eine statistisch signifikante, zunehmende Motilität im Laufe der Nebenhodenpassage. Ähnliche Ergebnisse berichtet Perez-Sanchez [56] für Kaninchenspermatozoen der selben Rasse und Haidl [17] für humane Spermatozoen. Dies entspricht der gängigen Auffassung, dass der Epididymis mit seiner Passage eine wichtige Rolle für die progressive Steigerung der Motilität spielt [17].

In unserem Tiermodell wurde in den obstruierten Nebenhoden keine Motilität der Spermatozoen mit einer einzigen Ausnahme registriert. Humane Spermatozoen reagieren unter obstruktiven Bedingungen anders. Bei mikrochirurgischen Refertilisierungen hat Schroeder-Printzen [57] festgestellt, dass über 60% der Spermatozoen aus dem Nebenhodenkopf zur Klasse Silber 1 gehören, d. h. motil sind, auch das Aspirat von epididymalen Spermatozoen zeigt eine hohe Ausbeute motiler Spermatozoen in diesem Bericht [57], so dass die tierexperimentellen Daten nicht ohne Einschränkung auf den Menschen übertragen werden können.

5.3 Chromatinkondensierung

Der Grad der Kondensierung vom DNA – Material wurde mittels Anilinblaufärbung bestimmt. Sowohl bei den nicht gestauten, als auch bei den vasktomierten Einheiten ergab sich ein signifikanter Unterschied im Grad der

Chromatinkondensierung zwischen den testikulären und den epididymalen Spermatozoen. Für die humanen Spermatozoen wurden solche Untersuchungen von Haidl [17] durchgeführt, dabei zeigte sich auch hier die Bedeutung des Nebenhodens im Prozeß der Ausreifung der Spermien. Die Veränderungen in der Struktur des Chromatins während der Nebenhodenpassage wurde früh in einigen Studien aus den 70-er Jahren (Calvin und Bedford [58], Meistrich [59]) aufgezeigt. Neuere Untersuchungen der Chromatinkondensierung mit anderen Methoden, wie z. B. die Flow Zytometrie mit Acridine Orange – Färbung haben die Bedeutung des Nebenhodens im Prozess der Kondensierung des DNA – Materials bestätigt (Golan et al. , 1996 [60]).

In der Literatur konnten keine konkreten Erklärungen für die Verteilung von Spermatozoen mit verschiedenem Grad der Chromatinkondensierung gefunden werden. Nach dem Modell von Ward [23, 24] findet der Austausch der Kernproteine noch im Keimepithel statt. Eine spätere Abgabe von Histonen beim kondensiertem DNA – Material durch die Kernmembran im Laufe der Nebenhodenpassage scheint wenig wahrscheinlich zu sein. Nach Untersuchungen von Moore [61] und Fornes [62] findet eine Interaktion zwischen den Spermatozoen und dem epididymalen Epithel statt. Es ist aber noch völlig unklar, ob die Spermatozoen mit Störungen der Chromatinkondensierung durch das epididymale Epithel eliminiert werden.

Der direkte Vergleich zwischen den nicht vasktomierten und vasktomierten Seiten hat gezeigt, dass die Konzentration der Spermatozoen aus der Klasse A der vasktomierten Gruppe signifikant höher im Hoden und im Nebenhodenhodenkopf ist, während am Ende der Nebenhodenpassage (Nebenhodenschwanz) die Verhältnisse umgekehrt sind – d.h. hier finden sich die Spermatozoen mit komplett kondensierten DNA – Material signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe. Im Mittelstück gibt es fast kein Unterschied für die beiden Gruppen.

Wie schon am Anfang der vorliegenden Arbeit erwähnt wurde, spielt die Kondensierung des DNA – Material für den ICSI - Erfolg eine wichtige Rolle [19]. Aus diesem Grund wird viel über die optimale Lokalisation der Spermatozoenentnahme für eine ICSI – Massnahme diskutiert. Da der Anteil der Spermatozoen mit komplett kondensiertem DNA – Material im Nebenhoden höher ist als in den Lokalisationen des Hodens, wäre die Entnahme aus diesem Gebiet nach diesem experimentellen Modell vorzuziehen, was bei der Obstruktion unter humanen Bedingungen dazu führen würde, eine epididymale Spermatozoenaspiration (MESA) oder eine testikuläre Extraktion (TESE) vorzuziehen [91, 97, 100].

5.4 Histologischer Befund in nicht obstruierten und obstruierten Hoden

Die Hoden aus allen Gruppen wurden histologisch durch konventionelle Hämatoxylin – Eosin Färbung untersucht. Bei den nicht vasktomierten Hoden wurde die Morphologie und Kinetik der Kaninchenspermatogenese unter nicht obstruktiven Bedingungen beurteilt. Die Spermatogenese des Kaninchens ist in 8 Stadien unterteilt [42]. Wir haben die prozentuale Verteilung von jedem Stadium bestimmt. Unsere Daten unterscheiden sich von Swiestra's Daten [42] grundsätzlich nicht.

Nach 6-monatiger Vasektomie ließ sich ein deutlicher Einfluß auf die Hodenmorphologie feststellen. Allgemein war die lymphozytäre Infiltration im Interstitium und in manchen Fälle sogar in den Tubuli auffällig. An der ersten Stelle hodenspezifischer Störungen waren Spermatogeneearreste auf verschiedenen Ebenen nachzuweisen, d. h. der Prozeß der Bildung von reifen Keimzellen ab einer bestimmten Stufe von Keimzellen war unterbrochen. Zusammenfassend konnte bei keinem vasktomierten Hoden eine vollständig erhaltene Spermatogenese beobachtet werden. Die Veränderungen waren jedoch sehr variabel. Bei einigen Hoden waren die Störungen sehr stark ausgeprägt. Im Keimepithel sind nur Spermatogonien und Sertoli Zellen zu beobachten, in anderen Hoden wird die Abwesenheit des Stadiums VIII und eine leichte allgemeine Depopulation der Keimzellen auffällig.

In der Literatur liegen widersprüchliche Ergebnisse über die Veränderungen der Hodenmorphologie nach Vasektomie beim Kaninchen vor. Einige Autoren (Moore und Bedford [39], Lohiya [63]) beschreiben keine signifikante Störungen in der Hodenanatomie, wobei sogar elektronmikroskopische Untersuchungen unauffällig waren (Lohiya [63]). Andere Untersuchungen (Alexander [64], Bigazzi [65], MacMillan [66]) berichten über Spermatogenesestörungen unterschiedlicher Art nach Vasektomie. In einer Studie an Kaninchen findet Hooker [40] sowohl normale, als auch pathologisch veränderte Tubuli. Auch hier ist die auch von uns festgestellte Depopulation der Keimzellen die Hauptstörung. Als pathophysiologischer Mechanismus dieser Veränderungen wird die Störung der Blut – Hoden – Schranke mit nachfolgender autoimmuner Entzündung diskutiert [65]. Flickinger [76] fand in 1 von 5 vasktomierten Kaninchen degenerative tubuläre Veränderungen.

Diese Veränderungen sind nicht generell auf den Mann zu übertragen, obwohl über Veränderungen der Hodenmorphologie nach Vasektomie in der Literatur viel publiziert wurde. Zusammenfassend ist aus den meisten Literaturquellen zu ersehen, dass die anhaltende Obstruktion der ableitenden Samenwege zu Veränderungen der humanen Spermatogenese führt. Es wurden Veränderungen wie Hodenatrophie, Verdickung der basalen Membran, interstitielle Fibrose und Hyalinose, aber auch Veränderung im Durchmesser des Tubulus und der Breite des Epithels [14, 27,

67] gefunden. Die langzeitige Obstruktion betrifft quantitativ die verschiedenen Zelltypen im Keimepithel unterschiedlich. Eine Reduktion der Anzahl der Keimzellen bis zu kompletter Abwesenheit von einem bestimmten Zelltyp wurde von den meisten Autoren beschrieben, wobei zuerst die Produktion der reifen Zelltypen (Spermatiden, Spermatozoen) [14, 68] gestört erscheint.

Die Dauer der Obstruktion scheint ein wichtiger Faktor für den Grad der Veränderungen zu sein. Untersuchungen von Matsuda [69] von zwei Gruppen von Patienten mit unterschiedlicher Dauer der obstruktiven Azoospermie zeigten, dass die Spermatogenese bei Patienten mit dem längeren Obstruktionsintervall mehr geschädigt wird als die Gruppe mit dem kürzeren Obstruktionsintervall. Andererseits vermutet Gupta [70], dass auch eine spontane Wiederherstellung der Spermatogeneseaktivität während der Obstruktion ohne Rekanalisation auftreten kann. Ähnliche Ergebnisse beschreibt Derrick – nach einem Spermatogenesearestart (100 – 300 Tage post Vasektomie) kann es zur einer neuen spontanen Aktivität der Spermatogenese kommen [94].

Zusammenfassend ist vergleichend für die unterschiedlichen Spezies zu sagen, dass die Hodenmorphologie und insbesondere die Spermatogenese bei jeder Tierart völlig unterschiedlich auf eine Obstruktion reagiert, wobei nach Silber das Kaninchenmodell der humanen Situation am nächsten kommt [32].

Aufgrund dieser Daten und unserer Ergebnisse kann man schlussfolgern, dass die testikulären histologische Veränderungen nach einer langzeitigen Vasektomie kein einheitliches Bild ergeben.

5.5 Expression der mRNA für Transitionsprotein 1, Protamin 1 und Protamin 2 bei den nicht obstruierten und obstruierten Hoden

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der TP 1-mRNA, PRM 1-mRNA und PRM 2-mRNA mittels In situ Hybridisierung beurteilt. Ein positives Signal für jedes Kernprotein wurde im Zytoplasma der runden und elongierten Spermatozoen nachgewiesen. Eine Expression von Transitionsprotein 2 beim Kaninchen konnten wir mit dieser Methode nicht feststellen. Die Verteilung der Expression in den einzelnen Stadien der Kaninchenspermatogenese wurde in 12. 5. 1. 2 beschrieben. Eine an unseren Ergebnisse vergleichbare Beschreibung der Expression dieser Kernproteine in der Kaninchenspermatogenese konnte in der Literatur nicht gefunden werden. Dass eine Expression dieser Kernproteine beim Kaninchen auftritt, wurde bereits von Courtens mittels Immunhistochemie nachgewiesen [71], so dass zumindest qualitativ unsere Ergebnisse deckungsgleich sind.

Nach 6-monatiger Vasektomie blieb dieses Expressionsmuster unverändert, d. h. die Expression war

quantitativ reduziert, aber qualitativ unverändert. In den meisten vasktomierten Hoden wurde keine Expression der mRNA für die Kernproteine gefunden, aber dort wo sie vorhanden war, wurden keine qualitative Unterschiede beobachtet. Da die Zellen wo sich normal die mRNA für das entsprechende Protein exprimiert nicht vorhanden sind, kann man nicht schlussfolgern ob der Expressionsmuster hier verändert ist oder nicht. Das Signal für jedes Kernprotein blieb in den selben Zellen wie in den nicht obstruierten Hoden nachweisbar. Eine Ausnahme ist die Erscheinung eines positiven Signals für TP 1-mRNA in den multinuklearen Spermatozyten bei den vasktomierten Hoden. Eine große Anzahl dieser Zellen wurde auch von Flickinger in den Tubuli von vasktomierten Kaninchen gefunden [76]. Die Entstehung solcher Zellen in der humanen Spermatogenese wurde ausführlich von Miething [74] beschrieben und ist ein Zeichen von degenerativen Veränderungen des Keimepithels [74, 75]. Der Prozentanteil der positiven runden Spermatischen pro Tubulus im Stadium I ist auch nicht verändert.

Die mRNA – Expression von TP 1, PRM 1 und PRM 2 wurde gründlich von Steger ([48], [54], [72]) untersucht. Bei Patienten mit obstruktiver Azoospermie und normaler Spermatogenese wurden keine Unterschiede in der Expression beider Protamine gefunden [72].

Die oben präsentierten Ergebnisse bei diesem Tiermodell lassen einige Fragen für weitere Untersuchungen. Die quantitative Veränderung der Prozentanteil der Spermatozoen

mit komplett kondensiertem DNA-Material im Laufe der Zeit könnte Objekt weiterer Untersuchungen sein. Die Dauer einer Vasektomie ist von Bedeutung für pathologische Veränderungen der Hodenmorphologie und der Spermatozoen sowohl beim Kaninchen [31] als auch beim Mann [69].

Das histologische Bild des vasktomierten Kaninchenhodens stellte vielfältigen Veränderungen des Keimepithels dar. Es fanden sich sowohl unauffälligen Einheiten, als auch solche mit kompletter Abwesenheit von Spermatozyten und Spermatischen. Ähnliche Veränderungen nach Vasektomie fanden Kong et al. [106]. Sie beschreiben eine Reduktion unterschiedlicher Keimzellen im Epithel, wobei auch hier wurden nicht alle Hoden gleichmäßig beteiligt waren. Bei der Hodenmorphologie spielt wahrscheinlich die Dauer der Obstruktion eine Rolle. Einige Autoren [70, 94, 106] sprechen über Wiederherstellung der Spermatogenese nach unterschiedlichem Zeitraum. Offen bleibt die Frage ob sich das Expressionsmuster der Kernproteinen nach kürzer oder längerer Zeit als 6 Monaten sich verändert und damit auch die Chromatinkondensierung bei den Spermatozoen. Ferner könnte das so etablierte Kaninchenmodell zeigen wann nach der Vasektomie die unterschiedlichen Veränderungen stattfinden. Die Ergebnisse dieser Studie übertragen auf den Mann mögliche klinische Bedeutung für die Refertilisierungsmaßnahmen, bzw. für verschiedene Techniken der assistierten Reproduktion.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die freiwillige Sterilisation des Mannes mittels Vasektomie stellt heute eine weit verbreitete Methode zur Schwangerschaftsverhütung dar. Etwa 6% aller vasektomierten Männer lassen sich nach einer gewisser Zeit refertilisieren. Neben der einfachen Wiederherstellung der Durchgängigkeit der ableitenden Samenwege (Vasovasostomie) steht die operative Spermatozoenentnahme für ICSI zur Verfügung. Dabei stellt sich die Frage zur Qualität der Spermatozoen und ihrer Befruchtungsfähigkeit nach langzeitiger Obstruktion. Ein Aspekt dieses Problems ist die Kondensierung des DNA – Materials in den Spermatozoen und dessen Störungen unter dem Einfluß verschiedener Faktoren. Es ist bekannt, dass Spermatozoen mit gestörter Chromatinkondensierung bei ICSI und IVF schlechter fertilisieren.

Die Chromatinkondensierung bei den testikulären und epididymalen Spermatozoen ist Ergebnis eines komplizierten Prozesses von Austausch verschiedener Kernproteine im Keimepithel während der Spermatogenese. Dabei werden die testis – spezifischen Histone durch Transitionsproteine ausgetauscht, später werden beide Transitionsproteine gegen Protamine ersetzt. Dieser Prozess findet in den runden und elongierten Spermatiden statt.

Ziel unserer tierexperimentellen Arbeit war es festzustellen, ob eine Obstruktion der ableitenden Samenwege Veränderungen in der Chromatinkondensierung bei testikulären und epididymalen Spermatozoen und in der Expression des Transitionsproteins 1 und der Protamine 1 und 2 verursacht. Weiterhin sollte geklärt werden, ob die Nebenhodenpassage die Chromatinkondensierung der Spermatozoen beeinflusst. Dazu wurden 7 männliche Kaninchen beidseitig vasktomiert, 7 einseitig, 9 Kaninchen wurden als Kontrolle benutzt. Alle Tiere hatten normale Ejakulatparameter. 6 Monate nach der Vasktomie folgte die Organentnahme und die entsprechende Untersuchungen wurden durchgeführt. Die Chromatinkondensierung wurde mittels Anilinblau Färbung untersucht, die mRNA – Expression von TP 1, PRM 1 und PRM 2 wurde mittels In situ Hybridisierung nachgewiesen. Die 6-monatige Obstruktion verursachte eine deutliche Stauung des Nebenhodens im Bereich des Schwanzes, eine zunehmende Spermatozoendichte im Nebenhodenschwanz, eine abnehmende Dichte in den anderen beiden Kompartimenten des Nebenhodens, sowie eine Reduktion der Spermatozoenmotilität. Die Anzahl der Spermatozoen mit dem komplett kondensierten DNA – Material war signifikant höher im Nebenhodenschwanz im Vergleich mit den Nebenhodenkopf und Hoden. Das galt für alle drei Gruppen. Der Vergleich zwischen den vasktomierten und nicht vasktomierten Hoden und Nebenhoden brachte folgendes Ergebnis für die

vasektomierte Tiere: eine signifikant höhere Anzahl der Spermatozoen im Hoden und im Nebenhodenkopf, kein Unterschied im epididymalen Corpus und einen signifikant niedrigeren Anteil im Nebenhodenschwanz im Vergleich mit der Kontrolle.

Die 6-monatige Obstruktion der ableitenden Samenwege verursachte verschiedene Veränderungen in der Hodenmorphologie. Die häufigsten Störungen, die beobachtet wurden, waren eine Degeneration des Keimepithels und ein Spermatogenese-arrest. Aber nicht alle obstruierten Hoden wiesen den gleichen Grad der Veränderungen auf, die Morphologie blieb bei manchen Hoden erhalten. Es wurde keine Spermatogenese beobachtet, was mit der äußerst geringeren Spermatozoendichte im Nebenhodenkopf übereinstimmt. Zusammenfassend sind die morphologischen Veränderungen im vasektomierten Hoden in unserer Arbeit nicht einheitlich.

Die Expressionsmuster von TP 1-mRNA, PRM 1-mRNA und PRM 2-mRNA blieben nach der Obstruktion unverändert. Es wurden große quantitative Schwankungen beobachtet.

7. SCHLUSSFOLGERUNG

Im vorliegenden tierexperimentellen Versuch konnten wir einen deutlichen Einfluß der Vasektomie auf die Verteilung der Spermatozoen mit unterschiedlichem Grad der Chromatinkondensierung beobachten. In diesem Tiermodell störte die Obstruktion sowohl die normale Verteilung der Spermatozoen mit komplett kondensiertem DNA – Material, als auch die Hodenmorphologie. Schwierig ist die Übertragbarkeit dieses Tiermodells auf den Mensch zu beurteilen. Aufgrund der Bedeutung der Chromatinkondensierung für den ICSI – Erfolg wären Spermatozoen aus dem Nebenhodenkopf optimal für ICSI hinsichtlich der Chromatinkondensierung. Diskutabel ist ob die Veränderungen in der Hodenmorphologie in diesem Tiermodell vergleichbar sind mit dem Bild beim humanen vasektomierten Testis. Die Expression von TP 1-mRNA, PRM 1-mRNA und PRM 2-mRNA war quantitativ reduziert, aber das Expressionsmuster für das mRNA dieser Proteine blieb unverändert.

8. SUMMARY

Aim of the study: The maturity of spermatozoa and more specifically condensation of their DNA-material can influence ICSI-outcomes; germ cells with disturbances of the chromatin packaging have poor fertilization capacity. Testicular (TESE) and epididymal (MESA) spermatozoa in men after vasectomy are available for ICSI. In order to investigate how condensation of the DNA-material is altered in the different locations in the male reproductive tract under obstructive and non-obstructive conditions and how vasectomy influences chromatin condensation, we have established an experimental animal model of obstructive azoospermia.

Material and methods: 23 New Zealand white male rabbits were vasectomized unilateral (7 animals) and bilateral (7 animals). A group of 9 rabbits with normal spermatogenesis were used as control. 6 months after vasectomy testes and epididymes of all animals were removed; spermatozoa were obtained from caput, corpus and cauda epididymis and also from the testis. Testicular tissue samples were taken for histological investigation and in-situ hybridization. Chromatin condensation in testicular and epididymal spermatozoa were determined with aniline blue staining and classified according to Henkel et al. (1994). The histone-to-protamine replacement in the round and elongated spermatids during spermatogenesis is responsible for the final shape and condensation of the DNA-material in the mature spermatozoa. Expression of transition protein 1 and protamine 1 and 2 in

round and elongated spermatids, assessed by in-situ hybridization, indicates normal and abnormal status of chromatin condensation.

Results: Significant higher ($p < 0.01$) percentage of spermatozoa with completely condensed DNA-material in comparison with these in the testis were found in non-obstructive cauda epididymis. Similar is the situation in the obstructive testis-epididymis complex. The comparison between obstructive and non-obstructive units showed statistically significant differences only in the cauda epididymis. Various alterations were found in the morphology of the vasectomized testes – from intact spermatogenesis up to spermatogenesis arrest at different stages. We have found unchanged expression of transition protein 1 and protamine 1 and 2 in the testes where round and elongated spermatids were presented.

Conclusion: Our experimental model showed that cauda epididymis represents a suitable location for obtaining spermatozoa for ICSI; obstruction could influence the distribution of spermatozoa with completely condensed DNA-material. Vasectomy causes alterations on the testis morphology, but the process of condensation of the DNA-material remains undisturbed.

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. PHILIP T., GUILLEBAUD J., BUDD D. *Complications of vasectomy: review of 16 000 patients*. Brit J Urol 1984; 56; 745
2. ENGELMANN U. H., DEINDL F., HERTLE L., WILBERT D. M., SENGE TH. *Die Refertilisierungssituation in der Bundesrepublik Deutschland – Ergebnisse einer Umfrage*. Urologe B 1989; 29; 29
3. LISKIN L., WHARTON CH., BLACKBURN R., KESTELMANN P. *Condoms – no more than ever*. Populations report 1990; 18; 87
4. SCHILL W-B. *Zur Problematik der männlichen Antikonception. Teil 1: Physiologischen Grundlagen, Antikonception beim Mann (mechanische Verfahren, medikamentöse Antikonception*. Fortschr Med 1978; 96; 1447
5. VESSEY M., LAWLESS M., YATES D. *Efficacy of different contraceptive methods*. Lancet 1982; 1; 84
6. HENDRY W. F. *Vasectomy and vasectomy reversal*. Brit J Urol 1994; 73; 337

7. FARLEY T., MEIRIK O., MEHTA S., WAITES G. M. *The safety of vasectomy: recent concerts.* WHO Bulletin OMS 1993; 71; 413
8. FORSTE R., TANFER K., TEDROW L. *Sterilization among currently married men in the United States.* Fam Plan Prsp 1995; 27; 100
9. ENGELMANN U. H., DEINDL F., HERTLE L., WILBERT D. M., SENGE TH. *Vasectomy reversal in central Europe: results of a questionnaire of urologists in Austria, Germany and Switzerland.* J Urol 1990 ; 143; 64
10. HENDRY W., LEVISON D., PARKINSON C., PARSLOW J., ROYL M.: *Testicular obstruction: clinico-pathological studies.* Ann R Coll Surg Engl 1990; 72; 396
11. BELKER A. M., FUCHS E. F., KONNAK J. W., SHARLIP I. D., THOMAS JR A. J. *Results of 1469 microsurgical vasectomy reversals by vasovasostomy group.* J Urol 1991; 145; 505
12. SILBER S. J. *Epididymal extravasation following vasectomy as cause for failure of vasectomy reversal.* Fertil Steril 1979; 31; 309

13. NOLDUS J., OTTO U., SALAMON J., SCHULZE W., KLOSTERHALFEN H. *Vasovasostomie nach Vasektomie; Operationsergebnisse 1986 – 1989*. Urologe A 1992; 31; 103
14. NISTAL M., Riestra M., Galmes-Belmonte I., Paniagua R. *Testicular Biopsy in Patients With Obstructive Azoospermia*. Am J Surg Pathol 1999; 23; 1546
15. BELKER A. M., KONNAK J. W., SHARLIP I. D., THOMAS JR A. J. *Inoperative observations during vasovasostomy in 334 patients*. J Urol 1983; 129; 524
16. SILBER S. J. *Results of microsurgical vasoepididymostomy: role of epididymis of sperm maturation*. Hum Reprod 1989; 4; 298
17. HAIDL G., BADURA B., SCHILL W-B. *Function of Human Epididymal Spermatozoa*. J Androl 1994; 15; 23
18. LEVRAN D., NAHUM H., FARHI J., WEISSMAN A. *Poor outcome with round spermatid injection in azoospermic patients with maturation arrest*. Fertil Steril 2000; 74; 443
19. SAKKAS D., URNER F., BIANCHI P., BIZZARO D., WAGNER I., JAQUENOUD N., MANICARDI G., CAMPANA A. *Sperm chromatin anomalies can influence*

decondensation after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1996; 11; 837

20. FILATOV M., SEMENOVA E., VOROBEVA O., LEONTIEVA O., DROBCHENKO E. *Relationship between abnormal sperm chromatin packaging and IVF results. Mol Hum Reprod* 1999; 5; 825

21. HAIDL G., SCHILL W-B. *Assessment of sperm chromatin condensation: an important test for prediction of IVF outcome. Arch Androl* 1994; 32; 263

22. FORESTA C., ZORZI M., ROSSATO M., VAROTTO A. *Sperm nuclear instability and staining with anilin blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. Int J Androl* 1992; 15; 330

23. WARD St. W. *Minireview: Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. Biol Reprod* 1993; 48; 1193

24. WARD St. W., COFFEY D. *Minireview: DNA packaging and organisation in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. Biol Reprod* 1991; 44; 569

25. FUENTES-MASCORRO G., SERRANO H., ROSADO A. *Sperm chromatin. Arch Androl* 2000; 45; 215

26. SAKKAS D., URNER F., BIZZARO D., BIANCHI P., SHOUKIR Y., CAMPANA A. *Sperm nuclear damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development.* Hum Reprod 1998; 13; Suppl 4; 11
27. JAROW J. P., BUDIN R. E., DYM M., ZIRKIN B. R., NOREN S., MARSHALL F. F. *Quantitative pathologic changes in the human testis after vasectomy. A control study.* N Engl J Med 1985; 313; 1252
28. URRY R., HEATON J., MOORE M., MIDDLETON R. *A fifteen-year study of alterations in semen quality occurring after vasectomy reversal.* Fertil Steril 1990; 53; 341
29. BEDFORD J. *Adaptations of the male reproductive tract and the fate of spermatozoa following vasectomy in the rabbit, rhesus monkey, hamster and rat.* Biol Reprod 1976; 14; 118
30. FLICKINGER CH. J. *Fine structure of the rabbit epididymis and vas deferens after vasectomy.* Biol Reprod 1975; 13; 50
31. FLICKINGER CH. J. *Fine structure of the rabbit testis after vasectomy.* Biol Reprod 1975; 13; 61

32. SILBER S. J. *Vasectomy and vasectomy reversal.* Fertil Steril 1978; 29; 125
33. NEAVES W. B. *The effect of vasectomy on the testis of inbred Lewis rats.* J Reprod Fertil 1978; 54; 405
34. FLICKINGER CH. J., HERR J., HOWARDS S., SISAK J. R., GLEAVY J., FUSIA T., VAILES L., HANDLEY H. *Early testicular changes after vasectomy and vasovasostomy in Lewis rat.* Anat Rec 1990; 227; 37
35. FLICKINGER CH. J., HERR J., HOWARDS S., CALORAS D., YARBRO E., SPELL D., GALLIEN TH. *The influence of vasovasostomy on testicular alterations after vasectomy in Lewis rat.* Anat Rec 1987; 217; 137
36. FLICKINGER CH. J. *Ultrastructure of the rat testis after vasectomy.* Anat Rec 1972; 174; 477
37. FLICKINGER CH. J., HERR J., CALORAS D., SISK J. R., HOWARD S. *Inflammatory changes in the epididymis after vasectomy in the Lewis rat.* Biol Reprod 1990; 43; 34
38. FLICKINGER CH. J., HERR J., HOWARDS S. *Effects of vasectomy on the epididymis.* Micro Res Tech 1995; 30 ; 82

39. MOORE H. D. M., BEDFORD J. M. *Fate of spermatozoa in the male: 1. quantitation of sperm accumulation after vasectomy in the rabbit.* Biol Reprod 1978; 17; 784
40. HOOKER R. *Changes in the testis and epididymis of rabbits following long term vasectomy or vasocystostomy: correlation with results of vasovasostomy.* Biol Reprod 1980; 22; 297
41. PAUFLER S. K. *Die künstliche Besamung beim Kaninchen. In: Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch.* Hannover: Scharper M. 1974; 211
42. SWIERSTRA E., FOOTE R. *Cytology and kinetics of spermatogenesis in the rabbit.* J Reprod Fertil 1963; 5; 309
43. BREDDERMAN P., FOOTE R., YASSEN A. *Improved artificial vagina for collecting rabbit semen.* J Reprod Fertil 1964; 7; 401
44. JONES R. *Epididymal function in the vasectomized rabbit.* J Reprod Fertil 1973; 36; 199
45. SCHWEIGART G. *Narkose- und Sedationsverfahren bei Nagetiere und Kaninchen.* VET Impulse 1996; 5; 16

46. PEETERS M., GIL D., TESKE E., EYZENBACH V., BROM W., LUMEIJ J., DE VRIES H. *Four methods for general anesthesia in the rabbit: a comparative study.* Lab animals 1988; 22; 355
47. EHRARDT W. *Anästhesieverfahren beim Kaninchen.* Tierärztl Prax 1984; 12; 391
48. STEGER K., KLONISCH TH., GAVENIS K., DRABENT B., DOENECKE D., BERGMANN M. *Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis.* Mol Hum Reprod 1998; 10; 939
49. TERQUEM A., DADOUNE J. P. *Aniline blue staining of human spermatozoon. Evaluation of nuclear maturation.* In: The Sperm Cell. André J (ed). The Hague, Martinus Nijhoff, 1983; 249
50. MCKAY R. B. *An investigation of the anomalous staining of chromatin by the acid dyes, methyl blue and aniline blue.* Quart. J Micr Sci 1962; 103; 519
51. DADOUNE J. P., MAYAUX M. J., GUILARD-MOSCATO M. L. *correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics.* Andrologia 1988; 20; 211

52. AUGER J., MESBAH M., HUBER C., DADOUNE J. P. *Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminated between proven fertile and suspected infertile men.* Int J Androl 1990; 13; 452
53. HENKEL R., FRANKEN D., LOMBARD C., SCHILL W-B. *selective capacity of glass-wool filtration for the separation of human spermatozoa with condensed chromatin: A possible therapeutic modality for male-factor cases?* J Assist Reprod Genet 1994; 11; 395
54. STEGER K., PAULS K., KLONISCH TH., FRANKE F., BERGMANN M. *Expression of protamine-1 and-2 mRNA during human spermiogenesis.* Mol Hum Reprod 2000; 5; 219
55. STEGER K. *Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids.* Anat Embryol 1999; 199; 471
56. PEREZ-SANCHEZ F., TABLADO L., YEUNG CH., COOPER T., SOLER C. *Changes in the motility pattern of spermatozoa from the rabbit epididymis as assessed by computer-aided sperm motion analysis.* Mol Reprod Dev 1996; 45; 364

57. SCHROEDER-PRINTZEN I., HAIDL G., ERNAT E., WEISKE W-H. , DANDAL M., KÖHN F-M., WEIDNER W. *Analysis of intra-operative aspirates taken during microsurgical refertilisation in obstructive azoospermia – preliminary results.* Andrologia 1996; 28; Supp 1; 61
58. CALVIN H., BEDFORD J. *Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis.* J Reprod Fertil 1971; 13; 65
59. MEISTRICH M., REID B., BARCELLONA W. *Changes in sperm nuclei during spermiogenesis and epididymal maturation.* Exp Cell Res 1976; 99; 72
60. GOLAN R., COOPER T., OSCHRY Y., OBERPENNING F., SCHULZE H., SHOCHAT L., LEWIN L. *Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit by flow cytometry.* Hum Reprod 1996; 11; 1457
61. MOORE H., SAMAYAWARDHENA L., BREWIS I. *Sperm maturation invitro: co-culture of spermatozoa and epididymal epithelium.* J Reprod Fertil Suppl 1998; 53; 32

62. FORNES M., DE ROSAS J. *Interactions between rat epididymal epithelium and spermatozoa*. Anat Rec 1991; 231; 193
63. LOHIYA N., MATHUR N., TIWARI S., SHIPSTONE A. *Ultrastructural changes in rabbit testis and epididymis following long term study*. Acta Eur Fertil 1983; 14; 141
64. ALEXANDER N., TUNG K. *Immunological and morphological effects of vasectomy in the rabbit*. Anat Rec 1977; 188; 339
65. BIGAZZI P., KOSUDA L., HSU K., ANDRES G. *Immune complex orchitis in vasectomized rabbits*. J Exp Med 1976; 143; 382
66. MCMILLAN K., DESJARDINS C., KIRTON K., HAFS H. *Gonadal and extragonadal sperm reverses after unilateral vasoligation in rabbits*. Fertil Steril 1968; 19; 982
67. McDONALD W. *Vasectomy and the human testis*. BMJ 1990; 301; 618
68. BAIRATI A., DELLA MORTE E., GIAROLA A., PASINI M., PEROTTI M., SARI M. *Testicular biopsy of azoospermic men with vas deferens malformation using two different techniques*. Arch Androl 1986; 17; 67

69. MATSUDA T., HIURA Y., MUGURUMA K., OKUNO H., HORII Y., YOSHIDA O. *Quantitative analysis of testicular histology in patients with vas deferens obstruction caused by childhood inguinal herniorrhaphy: comparison to vasectomized men.* J Urol 1996; 155; 564
70. GUPTA A., KOTHARI L., BAPNA R. *Surgical sterilization by vasectomy and its effects on the structure and function of the testis in man.* Br J Surg 1975; 62; 59
71. COURTENS J., KISTLER W., PLOEN L. *Ultrastructural immunolocalisation of histones (H2B, H3, H4), transition protein (TP 1) and protamine in rabbit spermatids and spermatozoa nuclei. Relation to condensation of the chromatin.* Reprod Nutr Dev 1995; 35; 569
72. STEGER K., FAILING K., KLONISCH TH., BEHRE H., MANNING M., WEIDNER W., HERTLE L., BERGMANN M., KLIESCH S. *Round spermatids from infertile men exhibit decreased protamine-1 and -2 mRNA.* Hum Reprod 2001; 16; 709
73. SILBER S., DEVROEY P., TOURNAYE H., VAN STEIRTEGHEM A. *Fertilizing capacity of epididymal and*

testicular sperm using intracytoplasmic sperm injection.
Reprod Fertil Dev 1995; 7; 291

74. MIETHING A. *Multinucleated spermatocytes in the aging human testis: formation, morphology degenerative fate.* Andrologia 1993; 25; 317

75. HOLSTEIN A., ECKMANN C. *Multinucleated spermatocytes and spermatids in human seminiferous tubules.* Andrologia 1986; 18; 5

76. FLICKINGER C. *Ultrastructure of the testis, epididymis and vas deferens of the rabbit after vasectomy.* Anat Rec 1975; 181; 357

77. SILBER SJ. *Apparent fertility of human spermatozoa from the caput epididymis.* J Androl 1989; 10; 263

78. FORTI G., SERIO M. *Male infertility: is ist rising incidence due to better methods of detection or an increasing frequency?* Hum Reprod 1993; 8: 1153

79. WHO. *Manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple.* Rowe P., Comhaire F., Hargreave T., Mellows H. 1993 Cambridge Univ Press, Cambridge

80. WEISKE WH., SÄLZER N., SCHROEDER-PRINTZEN I., WEIDNER W. *Clinical findings in congenital absence of the vasa deferentia*. *Andrologia* 2000; 32; 13
81. ATTARDO T., VICARI E., MOLLIKA F., GRAZIOSO C., BURRELLO N., GAROFALO M., LIZZIO M., GARIGALI G., CANNIZZARO M., RUVOLO G., D'AGATA R., CALOGERO A. *Genetic, andrological and clinical characteristics of patients with congenital bilateral absence of the vas deferens*. *Int J Androl* 2001; 24; 73
82. OATES R., AMOS J. *Congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis*. *World J Urol* 1993; 11; 82
83. JAROW J., OATES R., BUCH J., SHABAN S., SIGMAN M. *Effect of the level of anastomosis and quality of intraepididymal sperm to the outcome of end-to-side epididymovasostomy*. *Urology* 1997; 49; 62
84. PARKHOUSE H., HENDRY W. *Vasal injuries during childhood and their effect on subsequent fertility*. *Br J Urol* 1991; 67; 91
85. ROSS L., FLOM L. *Azoospermia: a complication of hydrocele repair in a fertile population*. *J Urol* 1991; 146; 852

86. PRYOR J., HENDRY W. *Ejaculatory duct obstruction in subfertile males: analysis of 87 patients*. Fertil Steril 1991; 56; 225
87. GOLUBOFF E., STIEFELMAN M., FISCH H. *Ejaculatory duct obstruction in the infertile men*. Urology 1995; 45; 925
88. SOTOLONGO J. *Immunological effects of vascotomy*. J Urol 1982; 127; 1063
89. WITT M. HERON S., LIPHULTZ L. *The post vasectomy length of the testicular vasal remnant: a predictor of surgical outcome in microscopic vasectomy reversal*. J Urol 1994; 151; 892
90. BANDHAUER K., EIGENMANN J. *Die operative Refertilisierung nach Vasektomie – ein zunehmendes Bedürfnis*. Therapeut Umschau 1992; 49; 497
91. WEIDNER W., SCHROEDER-PRINTZEN I., WEISKE WH., HAIDL G. and the BMFT study group for microsurgery Gießen. *Microsurgical aspects of the treatment of azoospermia*. Int J Androl 1995; 18; Suppl 2; 63

92. WHO *Laborhandbuch zur Untersuchung des menschliches Ejakulates und der Spermien – Zervikalschleim – Interaktion*. 1999; Springer Verlag, Berlin
93. WEIDNER W., COLPI G., HARGREAVE T., PAPP G., POMEROL J. *EAU guidelines on male infertility*. Eur Urol 2002; 42; 313
94. DERRICK F., GLOVER W., KANJUPARAMBAN Z., MCDUGALL M., MCCOWIN K., MERCER H., ROLLINS L. *Histologic changes in the seminiferous tubules after vasectomy*. Fertil Steril 1974; 25; 649
95. SILBER S., NAGY Z., LIU J., GODOY H., DEVROY P., VAN STEITEGHEM A. *Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration*. Hum Reprod 1994; 9; 1705
96. PALERMO G., JORIS H., DEVROEY P., VAN STERTEGHEM A. *Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of a single spermatozoon into a oocyte*. Lancet 1992; 340; 17
97. SCHROEDER-PRINTZEN I. *Refertilisierung Habilitationsschrift*. Fachbereich Humanmedizin Gießen 2004

- 98 SILBER S., VAN STERTEGHEM A., LIU J., TOURNAYE H. *High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy.* Hum Reprod 1995;10;148
99. SPERLING H. *Operative Spermienentnahme aus urologischer Sicht.* Urologe A 1999; 38;563
100. DIXON W. (Hrsg). *BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2* 1993. University of California Press, Berkely, Los Angeles, London
101. EISERSMITH S. (Hrsg) *PlotIT – Graphics & Statistics.* Scientific Programming Enterprises 1993, Haslett, MI 48840, USA
102. HECHT M. *Vergleich von zwei Vasektomiemethoden in Bezug auf den Erfolg einer anschließenden mikrochirurgischen Refertilisierung, untersucht am Tiermodell des New-Zealand-White-Rabbit.* Dissertation Fachbereich Humanmedizin, Justus – Liebig Universität Gießen 2000
103. SILBER S., NAGY Z., LIU J., TOURNAYE H., LISSENS W., FEREC C., LIEBAERS I., DEVROEY P., VAN STEIRTEGHEM. *The use os epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the*

genetic implications for male fertility. Hum Reprod 1995;10; 2031

104. PASQUALOTTO F., ROSSI-FERRAGUT L., ROCHA C., IACONELLI A., BORGES E. *Outcome of in-vitro and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm obtained from patients with obstructive and non-obstructive azoospermia. J Urol* 2002; 167; 1753

105. UBALDI F., CAMUS M., TOURNAYE H., CLASEN K., NAGY Z., VAN STERTEGHAM A., DEVROEY P. *Results of microsurgical epididymal sperm aspiration (MESA) and testicular sperm extraction in azoospermic men using intracytoplasmic sperm injection. Andrologia* 1996; 28; Suppl 1; 7

106. KONG L. , HUANG A. , DENG X. , DENG X. , YANG Z. *Quantitative (stereological) study of the effects of vasectomy on spermatogenesis in rabbits. J. Anat* 2004; 11;205 (5); 413

10. ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht-veröffentlichten Schriften entnommen sind, und allen Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.