

Morphometrische Untersuchungen zur Welle der Spermatogenese  
beim adulten Goldhamster (*Mesocricetus auratus*)

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Vorgelegt von: Pia Bodelier geb. Friedrich

Aus: Aachen

Erscheinungsjahr: 2007

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. A. Miething
2. Gutachter: Prof. Dr. Haidl

Tag der Mündlichen Prüfung: 08.10.2007

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Bonn  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. K. Schilling

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der  
ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

*Meinen beiden Jungs: Jonas und Noah*



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	7
1.1 Spermato-genese des adulten Goldhamsters .....	7
1.1.1 Spermato-gonien .....	7
1.1.2 Spermato-zyten .....	8
1.1.3 Spermato-iden .....	9
1.2 Räumliche Organisation der Spermato-genese .....	9
1.3 Zeitmuster der Spermato-genese.....	11
<b>2. Material und Methoden</b> .....	12
2.1 Untersuchungsmaterial .....	12
2.2 Histologische Verarbeitung .....	12
2.2.1 Gewebsentnahme und Präparation.....	12
2.2.2 Fixierung und Einbettung.....	12
2.2.3 Semidünnschnitte .....	13
2.3 Mikroskopische Auswertung und computergestützte Morphometrie .....	13
2.4 Statistik .....	14
<b>3. Ergebnisse</b> .....	15
3.1 Stadien der Spermato-genese und Segmente im adulten Keimepithel .....	15
3.2 Segmentlängen in Zahlen und graphischer Darstellung .....	16
3.3 Statistische Auswertung.....	17
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	17
<b>4. Diskussion</b> .....	19
4.1 Methodenbetrachtung .....	19
4.1.1 Semidünnschnitt-Histologie .....	19
4.1.2 Isoliert eingebettete Hodentubuli .....	19
4.1.3 Technik der Fixierung und Einbettung.....	19
4.1.4 Morphometrische Auswertung.....	21
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	22
4.2.1 Beziehung zwischen Segmentlängen und Stadiumdauer.....	22
4.2.2 Streuung der Segmentlängenwerte .....	22
4.2.3 Subsegmente: Synchronisation und lokale Stimulation .....	24
4.3 Wahl des Tiermodells.....	25

5. <b>Zusammenfassung</b> .....	27
6. <b>Tabellen und Abbildungen</b> .....	28
7. <b>Literatur</b> .....	46
8. <b>Danksagung</b> .....	49

## 1. Einleitung

### 1.1 Spermatogenese des adulten Goldhamsters

Der Entwicklungsprozess der männlichen Keimzellen läuft im Keimepithel der Tubuli seminiferi des Hodens ab und wird als *Spermatogenese* bezeichnet. Dieser Prozess führt von den Stammzellen der Spermatogenese (den A-Spermatogonien) über zahlreiche Proliferations- und Differenzierungsschritte bis zu den reifen Spermatozoen.

Die Spermatogenese lässt sich in drei aufeinander folgende Entwicklungsphasen gliedern:

Zunächst erfolgt die mitotische Proliferation der Spermatogonien, darauf folgen die beiden Reifeteilungen (Meiosen) der Spermatozyten, und schließlich durchlaufen die Spermatozoen eine Differenzierungsphase, die als Spermiozytogenese bezeichnet wird. Das sukzessive Auftreten der morphologisch unterscheidbaren Keimzelltypen lässt sich in der schematischen Darstellung des Keimepithelzyklus des Goldhamsters nach Clermont (1954; vgl. Abb. 1) ablesen. Der Entwicklungsgang der Keimzellen ist hier zeilenweise von unten nach oben, innerhalb jeder Zeile von links nach rechts dargestellt.

Im Folgenden soll zunächst ein Überblick über die zellulären Aspekte und das räumliche sowie zeitliche Organisationsmuster der Spermatogenese im Keimepithel des Goldhamsters gegeben werden.

#### 1.1.1 Spermatogonien

Die Spermatogonien sind die unreifsten Keimzelltypen und teilen sich wiederholt mitotisch. Morphologisch lassen sich aufeinander folgend A-, In- (intermediäre) und B-Spermatogonien unterscheiden. Diese Zellen liegen im basalen Kompartiment des Keimepithels.

*A-Spermatogonien* sind helle, runde oder flach-ovale Zellen mit homogen schwach gefärbtem Zellkern, der feinkörniges Chromatin enthält. Sie liegen der Basalmembran des Keimepithels auf.

*In-Spermatogonien* entstehen durch die letzte mitotische Teilung der A-Spermatogonien. Sie ähneln diesen, entlang ihrer Kernmembran sind jedoch größere Chromatinaggregate aufgereiht. Sie liegen der Basalmembran ebenso an.

*B-Spermatogonien* gehen durch mitotische Teilung aus den In-Spermatogonien hervor. Diese Zellen sind etwas kleiner als ihre Vorgängerzellen. Ihre Kerne sind rund und

weisen eine zunehmende Chromatinverdichtung und gröbere Chromatinaggregate entlang der Kernmembran auf. Sie berühren die Basalmembran des Keimepithels oder liegen zumindest in deren unmittelbarer Nähe.

### 1.1.2 Spermatozyten

Aus der mitotischen Teilung der B-Spermatogonien gehen die *Spermatozyten I* (Spermatozyten 1. Ordnung) hervor. Diese gehen zunächst in ein Präleptotän-Stadium (PL) über, in dem sie die prämeiotische DNS-Synthesephase (S-Phase) durchlaufen. Diese Zellen liegen noch in der Nähe der Basalmembran, sie besitzen ein insgesamt dunkleres Karyoplasma und überwiegend in der Kernperipherie aufgereichte Chromatinaggregate. Gleichzeitig mit dem nun erfolgenden Eintritt der Zellen in die 1. Meiose erreichen die Zellen das adluminale Kompartiment des Keimepithels, sie befinden sich nicht mehr in direkter Nähe zur Basalmembran. Die Prophase der 1. Meiose erstreckt sich über eine längere Zeitspanne und lässt sich in morphologisch erkennbare Subphasen gliedern:

Mit beginnender Entspiralisierung des Kernchromatins setzt das Leptotän-Stadium (L) ein, welches sich mit der Paarung der homologen Chromosomen in das Zygotän-Stadium (Z) fortsetzt. Es schließt sich das mehrere Tage andauernde Pachytän-Stadium (P) an. Das Zell- und insbesondere das Zellkernvolumen nehmen während dieses Zeitraumes erheblich zu. Das Chromatinmuster wandelt sich während des Leptotäns, des Zygotäns und im Verlaufe des gesamten Pachytäns von einem feinkörnigen zu einem immer grobkörnigeren, schließlich zunehmend grobscholligen Aspekt. Nach einem darauf folgenden, nur kurz andauernden Diplotän-Stadium, in dem sich die bivalenten Chromosomen trennen, folgen Meta-, Ana- und Telophase der 1. Meiose. Die durch die 1. Meiose hervorgebrachten *Spermatozyten II* (Spermatozyten 2. Ordnung) treten nach sehr kurzem Verweilen in der Interphase, und ohne erneut eine S-Phase zu durchlaufen, in die 2. Meiose ein. Diese verläuft ähnlich einer mitotischen Teilung, die entstehenden Tochterzellen sind die *Spermatiden*.



### 1.1.3 **Spermatiden**

Die *Spermatiden* treten in einen Differenzierungsprozess ein, der als *Spermiogenese* bezeichnet wird. Die Spermiogenese wird in vier Entwicklungsphasen eingeteilt: die Golgiphase, die Kappenphase, die Akrosomphase sowie die Reifungsphase. Während der Spermiogenese erfährt der Zellkern eine starke Kondensierung und längliche Verformung, es bilden sich das Akrosom sowie eine Geißel, und es wird ein beträchtlicher Anteil überschüssigen Zytoplasmas von der Zelle abgeschnürt.

Die *Golgiphase* umfasst die Spermatiden der Stufen 1 - 3. Kleine, dem sphärischen Kern der Spermatide 1 benachbarte Vesikel des Golgiapparates fließen zum Akrosombläschen zusammen.

Die *Kappenphase* (Spermatiden der Stufen 4 - 7) ist durch die kontinuierliche Größenzunahme des Akrosombläschens und dessen Abflachung entlang der Kernmembran gekennzeichnet. Das Akrosom breitet sich dabei fortschreitend nach lateral über die Kernoberfläche aus.

Während der *Akrosomphase* (Spermatiden der Stufen 8 - 13) nimmt der bis dahin noch runde Zellkern eine zunehmend längliche Form an (Elongation). Gleichzeitig legt sich der Kern mit seinem vom Akrosom bedeckten vorderen Pol der Zellmembran eng an. Infolge der zunehmenden Verdichtung des Kernchromatins stellen sich der Zellkern und die ihn bedeckende Akrosomkappe bei Spermatiden ab der Stufe 13 lichtmikroskopisch als ein homogenes, intensiv dunkel gefärbtes Stäbchen dar.

In der *Reifungsphase* (Spermatiden der Stufen 14 - 17) erfolgt sowohl die endgültige Formgestaltung des Spermatidenkopfes als auch die Differenzierung in Halsteil und Schwanzteil der Spermatiden. Die sich aus dem nahe des Zellkerns gelegenen Zentriol entwickelnde Geißel erreicht ihre endgültige Gestalt und Länge. Ein großer Anteil des Zytoplasmas der Spermatiden wird als dunkel gefärbtes, rundliches Residualkörperchen abgetrennt und die ausgereiften Spermatiden schließlich aus dem Keimepithel in das Tubuluslumen entlassen. Dieser Vorgang wird als *Spermiation* bezeichnet, die Keimzellen heißen nun *Spermatozoen*.

## 1.2 **Räumliche Organisation der Spermatogenese**

Die Keimzellen vollziehen den oben skizzierten Entwicklungsgang in Form von synchron sich fortentwickelnden Keimzellklonen, deren Mitglieder durch Interzellularbrücken

untereinander verbunden sind (Miething, 1995). Noch bevor die eine Keimzellgeneration den Spermatogeneseprozess komplett durchlaufen hat, treten in definierten Zeitabständen neue Zellen in diesen Prozess ein. Daher sind an einem gegebenen Ort des Keimepithels zu jedem beliebigen Zeitpunkt mehrere unterschiedlich weit fortgeschrittene Keimzellgenerationen nebeneinander vorhanden. Infolge des offenbar stabilen Zeitmusters des Spermatogeneseprozesses und aufgrund definierter Zeitintervalle, nach denen an demselben Epithelort neue Zellen in den Prozess eintreten, finden sich also an jedem gegebenen Ort des Keimepithels in zyklischer Abfolge charakteristische Assoziationen von verschieden weit fortgeschrittenen Keimzellgenerationen. Solche Keimzellassoziationen werden als Stadien der Spermatogenese bezeichnet (Roosen-Runge, 1952; Clermont, 1972).

Für das Keimepithel des Goldhamsters hat Clermont (1954) 13 solcher Stadien (mit römischen Zahlen I – XIII benannt) nach morphologischen Merkmalen definiert und sich dabei im wesentlichen auf die im paraffinhistologischen Bild erkennbaren Merkmale der Akrosomreifung in den Spermatiden gestützt. In dem Spermatogeneseschema der Abb. 1 ist jedes dieser Stadien I bis XIII als eigene Spalte dargestellt. Die zeitlich aufeinander folgende Wiederkehr dieser 13 Stadien der Spermatogenese an einem Epithelort wird als Zyklus des Keimepithels bezeichnet. Aus dem Schema der Abb. 1 wird ersichtlich, dass nach Ablauf eines Zyklus an einem gegebenen Epithelort alle vorhandenen Zelltypen in die nächsthöhere Zeile vorgerückt sind (bzw., im Falle der Spermatiden der Stufen 8 – 17, das Keimepithel verlassen haben).

Der Längsabschnitt eines Tubulus, der durchgehend von Keimzellen desselben Stadiums der Spermatogenese ausgefüllt ist, wird als Segment bezeichnet. Im Längsverlauf benachbarte Segmente eines Tubulus zeigen grundsätzlich das nächsthöhere oder nächstniedrigere Stadium der Spermatogenese, d. h., der Zyklus des Keimepithels stellt sich im Längsverlauf der Hodentubuli als chronologisch geordnete Reihe von Tubulussegmenten dar (Perey et al., 1961). Dabei folgt auf das Segment mit der Keimzellassoziation des Stadiums XIII regelmäßig ein Segment mit der Keimzellassoziation des Stadiums I. In umschriebenen Tubulusabschnitten kann sich die auf- bzw. absteigende Sequenz der Stadien für ein oder mehrere Segmente umkehren (Modulation der segmentalen Reihenfolge). Eine Folge von Segmenten, die einschließlich der vorhandenen Modulationen alle Stadien des Zyklus umfasst, wird als

Welle der Spermatogenese bezeichnet (Perey et al., 1961; Clermont, 1972). Diese regelhafte Aufeinanderfolge von Segmenten mit einheitlichen Keimzelloassoziationen repräsentiert das räumliche Organisationsmuster der Spermatogenese.

Ergänzend ist festzuhalten, dass die Spermatogenese als ein kontinuierlich ablaufender Entwicklungsprozess anzusehen ist. Die dargestellte Unterteilung des Prozesses in Stadien stellt somit die willkürliche Gliederung eines dynamischen Geschehens nach festgelegten morphologischen Kriterien dar (u.a. Roosen-Runge, 1952; Leblond und Clermont, 1952; Clermont, 1954; Clermont und Perey, 1957).

### 1.3 **Zeitmuster der Spermatogenese**

Das Zeitintervall, nach dessen Ablauf an einem gegebenen Ort des Keimepithels alle Stadien der Spermatogenese durchlaufen sind, entspricht der Zyklusdauer des Keimepithels.

Die Dauer eines vollen Zyklus ist für den Goldhamster mit 9,0 Tagen (de Rooij, 1968) bzw. mit 8,74 Tagen (Clermont und Trott, 1969) bestimmt worden. Für die jeweilige Dauer der 13 Einzelstadien wurden in diesen Untersuchungen z.T. abweichende Werte ermittelt (vgl. Tab. 4). Die längsten Stadien sind aber beiden Untersuchungen nach übereinstimmend die Stadien VI und VII, die mit der kürzesten Dauer die Stadien IX - XII (de Rooij, 1968; Clermont und Trott, 1969).

Die Dauer des gesamten Spermatogeneseprozesses beträgt beim Goldhamster etwa 35 Tage (Clermont und Trott, 1969).

## 2. **Material und Methoden**

### 2.1 **Untersuchungsmaterial**

Als Untersuchungsmaterial diente Hodengewebe von vier adulten Syrischen Goldhamstern, *Mesocricetus auratus*. Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte im Tierstall des Anatomischen Institutes der Universität Bonn. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und artgerechtem Trockenfutter. Durch zusätzliche künstliche Beleuchtung war der tägliche Lichtrhythmus auf 14 h hell zu 10 h dunkel festgelegt.

### 2.2 **Histologische Verarbeitung**

#### 2.2.1 **Gewebsentnahme und Präparation**

Nach intraperitonealer Barbiturat-Injektion (Nembutal®; Dosierung: 40 mg / 100 g Körpergewicht) wurden die Tiere thorakotomiert, das Herz freigelegt und der linke Ventrikel punktiert sowie der rechte Vorhof eröffnet. Durch den punktierten linken Ventrikel wurde das Gefäßsystem des Tieres langsam mit 0,5%igem Karnovsky-Gemisch (0,5 % Glutaraldehyd und 0,5 % Paraformaldehyd in 0,066 M Phosphatpuffer) perfundiert. Nach etwa fünfminütiger Perfusion wurden Skrotalhaut und Hodenhüllen eröffnet und beide Hoden entnommen. Zur weiteren Präparation wurden die Hoden bei Raumtemperatur in eine Petrischale mit 0,066 M Phosphatpuffer gelegt und zunächst von der Tunica albuginea befreit. Unter einer Stereolupe wurden aus dem Hodenparenchym durch sehr vorsichtiges Herauszipfen und Präparieren einzelne Tubuli seminiferi isoliert und Abschnitte von etwa 10 - 20 mm Länge herausgeschnitten.

#### 2.2.2 **Fixierung und Einbettung**

Die freischwimmenden Tubulusabschnitte wurden für 20 - 30 min in 4%igem Glutaraldehyd (in 0,066 M Phosphatpuffer) immersionsfixiert, zweimal in 0,066 M Phosphatpuffer gespült und für 15 min in 1%igem Osmiumtetroxyd (in 0,066 M Phosphatpuffer) nachfixiert. Die Hodentubuli wurden erneut in Puffer gespült, dann in aufsteigender Ethanolreihe sowie Propylenoxyd entwässert und schließlich in Araldit (Durcupan ACM : Fluka, Buchs, Schweiz) überführt. Als Polymerisationsbeschleuniger wurde 2,4,6-Tris-(dimethyl-aminomethyl)-phenol (Serva, Heidelberg) in 2%iger Konzentration zugegeben.

Die Tubuli wurden nun sehr vorsichtig jeweils einzeln in einem kleinen Araldittropfen auf Objektträger aufgebracht. Um die plane Orientierung des Tubulus während der folgenden Polymerisation zu gewährleisten, wurde ein vorher ausgehärteter, an seiner dem Objektträger zugewandten Seite völlig planer Aralditstempel aufgesetzt. Auf diese Weise war der Tubulus während des Polymerisationsprozesses zwischen Glasoberfläche und Stempelunterseite fixiert (Miething, 1996). Die Polymerisation erfolgte im Wärmeschrank bei 40 °C, 50 °C und 60 °C für jeweils 12 h. Nach der Polymerisation des nun mit dem Stempel verbundenen Araldits konnte der Stempel mit dem in Araldit eingebetteten Tubulusstück durch kurzes Erwärmen und vorsichtiges Abhebeln vom Glasobjektträger entfernt werden. Jeder so entstandene Aralditblock schloss an seiner planen Oberfläche ein eingebettetes, flach ausgebreitetes Tubulusstück ein.

### 2.2.3 **Semidünnschnitte**

An einem Reichert Om U3-Ultramikrotom wurden von den plan in die Aralditblöcke eingebetteten Tubulusabschnitten mit Hilfe eines Glas- oder Histodiamant-Messers 1 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt und auf Glasobjektträger aufgezogen.

Die Schnitte wurden mit einem Gemisch aus 4 Teilen 1%igem Toluidinblau (Merck, Darmstadt) in 1%iger Borax-Lösung und 1 Teil 1%igem Pyronin G (Fluka, Buchs, Schweiz) in Aqua bidest. 2 - 10 min bei 80 °C gefärbt (Ito und Winchester, 1963; Holstein und Wulfhekel, 1971).

### 2.3 **Mikroskopische Auswertung und computergestützte Morphometrie**

Die Schnitte wurden an einem Zeiss-Lichtmikroskop (Photomikroskop III) analysiert. Das Mikroskop war mit einer Videokamera ausgestattet und diese an einen Computer angeschlossen. Mittels des interaktiven Bildanalyse-systems vids-V (Fa. Aitektron, Meerbusch) konnten die Längen der auf dem jeweiligen Tubulus aufeinanderfolgenden Segmente markiert und exakt bestimmt werden.

Zunächst wurde ein geeigneter, d. h. ein über die gesamte Länge weitgehend zentral getroffener Längsschnitt des zu untersuchenden Tubulus im Lichtmikroskop eingestellt (vgl. Abb. 5). Anhand der in Abschnitt 1 dieser Arbeit genannten morphologischen Kriterien wurden die vorhandenen Stadien der Spermatogenese identifiziert (vgl. Abb.

5a - 5k) und die Segmente und Segmentgrenzen auf dem jeweiligen Tubulus festgelegt (vgl. Abb. 5). Für die genaue morphometrische Auswertung wurde das mikroskopische Bild mittels der dem Mikroskop aufsitzenden Kamera auf den Bildschirm des Computers übertragen. Die vorher gefundenen Segmente und Segmentgrenzen wurden wieder aufgesucht und in stärkerer Vergrößerung auf dem Bildschirm abgebildet. Nun konnten die Segmente mit Hilfe der Computer-Maus einzeln abgefahren und markiert und auf diese Weise deren Längen bestimmt werden. Auch Segmente auf stark gebogenen Tubulusabschnitten konnten so exakt gemessen werden. Das jeweils erste und letzte Segment auf jedem Tubulusstück wurde nicht in die quantitative Auswertung einbezogen, da diese Segmente möglicherweise nicht in ihrer kompletten Längenausdehnung erfasst waren. Die ermittelten Werte wurden im Bildanalyseprogramm vids-V mit Angabe der Versuchstier- und Einbettungsnummer gespeichert.

#### 2.4 **Statistik**

Die Darstellung und Auswertung der ermittelten morphometrischen Daten erfolgte mit den Software-Programmen „Excel XP“ und „WinSTAT“ als Excelplugin unter dem Betriebssystem „WindowsXP“.

Die statistische Auswertung umfasste die Bestimmung folgender Parameter:

Mittelwerte, Standardabweichung, Varianz, minimale und maximale Werte. Außerdem wurde die Signifikanz zwischen den Gruppen und innerhalb der Gruppen berechnet.

Die folgenden statistischen Testverfahren kamen zur Anwendung:

- 1) Kolmogorov-Smirnov-Test als Test auf Normalverteilung der ermittelten Werte für die einzelnen Segmente.
- 2) winSTAT-Ausreißertest, der mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % Messwerte identifiziert, die bei der jeweils errechneten Standardabweichung nicht zur vorliegenden Normalverteilung gehören.
- 3) Varianzanalyse (ANOVA) sowie Bartlett-Test zur Bestimmung der Signifikanz zwischen den Versuchstieren und der Signifikanz zwischen den einzelnen Messwerten eines Versuchstieres, um auf eine gemeinsame Grundgesamtheit schließen zu können. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde für alle Testverfahren jeweils mit  $p=0,05$  festgelegt.

### 3. **Ergebnisse**

Die isoliert eingebetteten, exakt längs geschnittenen Stücke von Tubuli seminiferi aus dem Hodengewebe adulter Goldhamster wurden in folgender Weise lichtmikroskopisch analysiert:

- (1) Die Sequenz der jeweils vorhandenen Segmente (d. h. der Tubulusabschnitte mit Keimzellen einer einheitlichen Stadienzugehörigkeit) wurde ermittelt,
- (2) die Längsausdehnung aller komplett angeschnittenen Segmente (Segmentlängen) wurden ausgemessen.

#### 3.1 **Stadien der Spermatogenese und Segmente im adulten Keimepithel**

Die mikroskopische Identifizierung der jeweiligen Stadien der Spermatogenese stützte sich auf die Beurteilung der Zellkernmorphologie der jeweils vorhandenen Spermatogonien und Spermatozyten sowie auf die Beurteilung des Entwicklungsstandes der Akrosome der Spermatiden. Anhand der schematischen Darstellung des Zyklus des Keimepithels des Goldhamsters nach Clermont (1954; vgl. Abb.1) wurde jedes gefundene Segment einem der Spermatogenesestadien I - XIII zugeordnet (staging).

Abb. 5 sowie Abb. 5a - 5k zeigen beispielhaft den mikroskopischen Aspekt eines der ausgewerteten Tubulusstücke. Abb. 5 zeigt eine Übersicht bei geringer Vergrößerung, in der die ermittelten Segmente und die Segmentgrenzen eingetragen sind. Die Abb. 5a - 5k demonstrieren bei höherer Vergrößerung den Aspekt des Keimepithels in den jeweiligen Stadien der Spermatogenese für jedes der auf diesem Tubulusabschnitt gefundenen Segmente X - XIII und I - VI.

Bei der Analyse der Segmentabfolge innerhalb eines jeden untersuchten Tubulusstückes zeigten unmittelbar benachbarte Segmente immer die jeweils nächsthöhere oder die nächstniedrigere Stadiennummer. Das Stadium XIII war dem Stadium I benachbart. Es wurden keine Ausnahmen von der Kontinuität der Spermatogenesewelle gefunden.

Bei den 107 ausgewerteten Tubulusstücken konnten Modulationen in 22 Fällen beobachtet werden.

### 3.2 Segmentlängen in Zahlen und graphischer Darstellung

Die ermittelten morphometrischen Daten sind in den Tabellen 1 - 3 dargestellt.

Tab. 1 zeigt sämtliche gemessenen Segmentlängenwerte aller vier untersuchten Tiere im Überblick. Für jedes der Segmente I – XIII wurden pro Tier zwischen 6 und 12 Einzelwerte bestimmt. Für jedes der Segmente I - XIII ergaben sich insgesamt zwischen 30 und 44 gemessene Längenwerte. In Tab. 1 sind die erhaltenen Messwerte spaltenweise für die Segmente I – XIII dargestellt. Die Werte für die einzelnen Tiere sind dabei blockweise untereinander angeordnet.

Tab. 2 zeigt für jedes der Segmente I – XIII zunächst die Gesamtzahl der gemessenen Längenwerte ohne differenzierte Darstellung nach den vier Tieren, daneben das jeweils kürzeste und längste gefundene Segment sowie Mittelwert und Standardabweichung. Aus dieser Übersicht gehen zum einen die erheblichen Unterschiede der durchschnittlichen Segmentlängen hervor. So wiesen die Segmente IV, V, VI und insbesondere VII die mit Abstand höchsten durchschnittlichen Längenwerte auf, kurz waren dagegen die Segmente VIII, vor allem aber IX und X. Graphisch ist dieser Befund in Abb. 2 in Form eines Säulendiagramms dargestellt. Jede Säule entspricht der ermittelten durchschnittlichen Segmentlänge der Segmente I – XIII. Aus dieser Darstellung geht anschaulich hervor, dass die Segmentlängen über den Zyklusverlauf hinweg eine fast durchgehend kontinuierliche Steigerungstendenz zeigen. Vom Segment IX an, dem kürzesten Segment, ist ein fast kontinuierlicher Anstieg bis zum längsten Segment, dem Segment VII festzustellen. Geringfügige Verkürzungen der Segmentlängen finden sich nur zwischen den Segmenten XI und XII sowie zwischen den Segmenten V und VI. Auf das sehr lange Segment VII folgt das kurze Segment VIII, und mit dem benachbarten kürzesten Segment IX ist wieder der Beginn der kontinuierlichen Segmentlängenzunahme erreicht.

Zum anderen zeigen auch die Einzelwerte für die Längenwerte eines Segmentes eine teilweise erhebliche Streuung, erkennbar an der jeweiligen, in der letzten Spalte der Tab. 2 angegebenen Standardabweichung.

Die prozentualen Längenverhältnisse aufeinander folgender Segmente zueinander sowie ihr Verhältnis zur Gesamtlänge eines aus mehreren Segmenten bestehenden Tubulusabschnittes weisen teilweise deutliche Unterschiede auf. Dies wird aus einer vergleichenden Gegenüberstellung mehrerer Tubulusstücke mit jeweils



übereinstimmender Segmentfolge deutlich. Abb. 6 zeigt beispielhaft in einer schematischen Darstellung die jeweils prozentualen Segmentlängen für sieben ausgewertete Tubulusstücke, die alle die identische Segmentfolge VIII, IX, X, XI, XII, XIII, I und II aufwiesen. In etwa übereinstimmende Werte ergeben sich für die Segmente X (5,57 % +/- 1,01) und I (14,43 % +/- 3,05). Dagegen unterscheiden sich insbesondere die Segmente VIII und XII in ihren relativen Längen erheblich (vgl. Tab. 5b). Die absoluten Längenwerte der in Abb. 6 gezeigten Tubulusstücke und der darin enthaltenen Segmente sind in Tab. 5a aufgeführt.

### 3.3 **Statistische Auswertung**

Mit dem winSTAT-Programm konnten drei Messwerte als „Ausreißer“ identifiziert werden, die in Tab.1 durch Kursivdruck markiert wurden. Möglicherweise sind diese Werte auf Messfehler zurückzuführen. Sie wurden nur aus Dokumentationsgründen aufgeführt, wurden aber bei der weiteren statistischen Auswertung und Interpretation nicht berücksichtigt.

Die Varianzanalyse zeigte: Es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchstieren vor und es gab bei jedem einzelnen Tier keine signifikanten Unterschiede zwischen den ermittelten Längenwerten für jedes Segment.

### 3.4 **Zusammenfassung der Ergebnisse**

Als Resultat der durchgeführten Untersuchungen lassen sich folgende Ergebnisse zusammenfassen:

Die Stadien der Spermatogenese ließen sich im Keimepithel der für die Semidünnschnittshistologie flach eingebetteten und längs geschnittenen Tubulusstücke verlässlich identifizieren.

Unmittelbar aufeinanderfolgende Segmente auf einem Tubulusstück zeigten regelmäßig das Spermatogenesestadium mit der nächsthöheren oder der nächstniedrigeren Nummer bzw. die Aufeinanderfolge der Stadien XIII und I.

Die Grenzen zwischen benachbarten Segmenten waren ausreichend scharf zu bestimmen, um genaue Längenmessungen vorzunehmen.

Die 30 – 44 durchgeführten Einzelmessungen für die Längen der jeweiligen Segmente I – XIII ergaben für jedes der Segmente einen durchschnittlichen Längenwert. Diese 13

Längenwerte zeigen erhebliche Unterschiede, lang waren die Segmente IV, V, VI und insbesondere VII, am kürzesten die Segmente VIII, IX und X.

Bei Betrachtung der Segmentlängen über den Zyklusverlauf hinweg zeigte sich eine nahezu kontinuierliche Zunahme der Längenwerte von Segment IX bis zum Segment VII.

Die Einzelmessungen für die Längenwerte eines Segmentes wiesen eine teilweise große Streuung auf.

Auch die relativen Längenwerte benachbarter Segmente zueinander und im Verhältnis zur Gesamtlänge eines Tubulusabschnittes mit definierter Segmentfolge unterschieden sich zum Teil erheblich.

## 4. **Diskussion**

### 4.1 **Methodenbetrachtung**

#### 4.1.1 **Semidünnschnitt-Histologie**

Die Semidünnschnitt-Histologie verbindet eine hochauflösende Lichtmikroskopie mit der Option, dasselbe Material auch für die Elektronenmikroskopie aufzuarbeiten. Dies wird durch eine hochwertige Aldehyd- und Osmium-Fixierung des Gewebes und dessen anschließende Kunstharzeinbettung ermöglicht. Diese Methode wurde von Holstein und Wulfhekel (1971) speziell für die Untersuchung von Hodengewebe modifiziert und erlaubt bei der lichtmikroskopischen Analyse des Keimepithels auch diskrete morphologische Differenzierungen.

#### 4.1.2 **Isoliert eingebettete Hodentubuli**

Die Verarbeitung und Untersuchung isolierter, flach eingebetteter Hodentubuli ermöglicht eine übersichtliche Analyse der Organisation des Keimepithels im Längsverlauf der Tubuli. So sind wesentliche Befunde über die Topografie des Keimepithels der Ratte an Längsschnitten einzelner, paraffineingebetteter Tubuli (Perey et al., 1961) sowie durch die Analyse von „whole mount“-präparierten Tubuli (Roosen-Runge, 1952; Clermont und Bustos-Obregon, 1968; Huckins, 1978) erhoben worden. Für den Überblick über längere Tubulusabschnitte und die Bestimmung von Segmentlängen sind räumliche Rekonstruktionen von Hodentubuli anhand von Schnittserien (Perey et al., 1961; Schulze et al., 1986) ihrer allzu großen Aufwendigkeit wegen weniger gut geeignet.

Für die vorliegende Untersuchung wurden isolierte Hodentubuli flach in Araldit eingebettet und exakt in Längsrichtung semidünn geschnitten (Miething, 1993, 1996). Die beschriebene Einzeleinbettung längerer Tubulusabschnitte, verbunden mit den Vorteilen der detailgenauen Semidünnschnitt-Histologie erlaubte es, aufeinander folgende Tubulussegmente abzugrenzen und deren Längenausdehnung zu bestimmen.

#### 4.1.3 **Technik der Fixierung und Einbettung**

Da die vorliegende Arbeit auch dem Zweck diene, die Einzeleinbettung von Tubulusabschnitten methodisch zu optimieren, soll im Folgenden genauer auf einige problematische Aspekte der Fixierung und Einbettungsprozedur eingegangen werden.

(1) In mehreren Fällen zeigte sich eine deutliche, das histologische Bild sehr störende Schrumpfung der basal liegenden Keimzellen. Diese Schrumpfungartefakte standen möglicherweise mit der außerordentlich dünnen Lamina propria der Tubuli bei Kleinsäugetern wie Maus, Ratte und Goldhamster in Zusammenhang (Miething, 1996). Da die einzeln einzubettenden Tubuli zunächst aus dem Verband des Hodengewebes herauspräpariert werden mussten, bestand die Gefahr, die zarte Lamina propria zusätzlich zu überdehnen oder lokal zu zerreißen. Daraus resultierende etwaige Schäden im Keimepithelverband könnten das Fixierungsergebnis beeinträchtigen und zu den genannten Schrumpfungartefakten beitragen. Bei den mehr als zehn Einbettungsreihen von Hodentubuli verschiedener Tiere wurden folgende Parameter des Fixierungsprozesses verschiedentlich modifiziert, um Fixierungsartefakte zu minimieren:

- Die Konzentration des während der Tubuluspräparation sowie für den Ansatz der Fixierungslösungen verwendeten Phosphatpuffers (0,1 M oder 0,066 M),
- Die Zusammensetzung des für die Immersion der isolierten Tubuli verwendeten Fixans (Glutaraldehyd-Lösungen zwischen 1 % und 5 % bzw. Karnovsky-Lösungen von 1 % oder 2 %),
- Eine fakultative Zugabe von 1 % Betain zu den Puffer- und Fixierlösungen. Betain ist als Osmoprotektor bekannt und kann einzelne Zellen vor osmotischer Beschädigung während der Fixierung schützen. Es soll die Strukturhaltung der Keimzellen (insbesondere der Spermatozoen) verbessern (Swan, 1997), ohne die Osmolarität der Fixationslösungen wesentlich anzuheben.

Zwar konnte keines der modifizierten Fixationsschemata konstant gute Fixierungs- und Einbettungsergebnisse liefern und die Schrumpfungartefakte blieben nur teilweise aus. Die relativ besten Ergebnisse wurden jedoch bei Verwendung eines 0,066 M Phosphatpuffers und der Immersionsfixierung mit 4%igem Glutaraldehyd erzielt.

(2) Der Gebrauch von Glutaraldehyd als Fixanskomponente hatte eine gewisse Sprödigkeit des Gewebes zur Folge. Daher drohten längere Tubulusstücke während der manuell durchgeführten Passage durch die Fixations- und Dehydrierungslösungen sowie während der Immersion in den dickflüssigeren Kunstharzgemischen zu zerbrechen und mussten hierbei mit größter Vorsicht behandelt werden. Tubulusstücke von mehr als 15 mm Länge konnten meist nicht unversehrt verarbeitet werden.

(3) Nach erfolgter Durchdringung mit dem noch flüssigen Kunstharz wurden die Tubuli jeweils in einen kleinen Araldittropfen auf einen Objektträger aufgebracht. Der vorbereitete Aralditstempel musste dann mit Fingerspitzengefühl und einem mittleren Druck so aufgesetzt werden, dass der durch die Fixierung versteifte Tubulus in seiner gesamten Länge möglichst flach auf dem Glas ausgebreitet wurde. Dabei durfte der Tubulus jedoch nicht gequetscht werden oder sogar brechen.

Durch eine erhöhte Konzentration des Polymerisationsbeschleunigers (bis zu 10 %) bei der Herstellung der Aralditstempel wurde die konkave Einziehung der Stempelunterseite weitgehend verhindert (Miething, 1996). Somit konnten die flach eingebetteten Tubuli über ihre gesamte Länge annähernd zentrisch geschnitten werden.

(4) Nach Anfertigung der Semidünnschnitte musste deren Anfärbbarkeit individuell erprobt werden. Die Erfahrung zeigte, dass eine Einwirkungszeit des Toluidinblau-Pyronin-Gemisches zwischen zwei und zehn Minuten die für die morphometrische Auswertung am besten geeigneten Färbeergebnisse ergab.

#### 4.1.4 **Morphometrische Auswertung**

Die morphometrische Auswertung des gewonnenen Materials und der Umgang mit dem Bildanalysesystem vids-V brachte einige Ungenauigkeiten mit sich, die aus der tabellarischen Darstellung der ermittelten Werte nicht unmittelbar hervorgehen.

Beim Mikroskopieren eines Tubulusabschnittes traf die Untersucherin anhand der morphologisch definierten Stadienkriterien eine subjektive Entscheidung über die Positionen der Segmentgrenzen. Die ausgewählten Segmentgrenzen mussten anschließend auf dem Farbmonitor wiedererkannt werden. Wegen der unterschiedlichen Dimension geschah dies nicht immer  $\mu\text{m}$ -genau. Wurden im nächsten Schritt der Auswertung die jeweiligen Segmentlängen per Mausklick markiert, konnten geringe Abweichungen von den festgelegten Segmentgrenzen auftreten und so Ungenauigkeiten der schließlich ermittelten Längenwerte resultieren.

Die in Tab. 1 auf eintausendstel- $\mu\text{m}$  genau angegebenen Längenwerte sind in dieser Genauigkeit daher nicht gerechtfertigt und eher als Rohwerte aufzufassen, wie sie von dem Bildverarbeitungsprogramm ausgegeben wurden. Für die weitere Auswertung wurden deshalb alle Messwerte auf eine Stelle hinter dem Komma gerundet.

## 4.2 **Diskussion der Ergebnisse**

### 4.2.1 **Beziehung zwischen Segmentlängen und Stadiumdauer**

Bei der vergleichenden Betrachtung der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse und der bekannten Daten und Theorien zum Keimepithelzyklus und zur Welle der Spermatogenese beim Kleinsäuger lassen sich folgende Zusammenhänge erkennen:

Die ermittelten durchschnittlichen Segmentlängen der Segmente I bis XIII im Keimepithel des Goldhamsters unterschieden sich zum Teil erheblich. Es gab durchschnittlich lange und durchschnittlich kürzere Segmente. Weitgehend ähnliche Tendenzen fallen bei Betrachten der jeweiligen Zeitdauer der 13 Spermatogenesestadien des Goldhamsters auf, wie sie von de Rooij (1968) und von Clermont und Trott (1969) ermittelt worden sind (vgl. Abb. 3 und Abb. 4). Segmente, die die charakteristischen Keimzelloassoziationen zeitlich lang andauernder Spermatogenesestadien enthielten, nahmen regelmäßig eine längere Strecke auf dem Längsverlauf des Tubulus seminiferus ein. Segmente, die ein Spermatogenesestadium mittlerer oder kurzer Dauer repräsentierten, nahmen hingegen durchschnittlich eine mittlere bzw. kürzere Tubuluslänge ein. Die durchschnittliche Länge eines Segmentes korrelierte also tendenziell mit der zeitlichen Dauer des jeweiligen Spermatogenesestadiums. Während die gemessenen Einzelwerte für die Segmentlängen bei allen 13 Segmenten eine erhebliche Streuung um den jeweiligen Mittelwert zeigten, ist die zeitliche Dauer jedes einzelnen Spermatogenesestadiums und die Dauer des gesamten Keimepithelzyklus des Goldhamsters weitgehend konstant (de Rooij, 1968; Clermont und Trott, 1969; Tab. 4). Somit können auch durchschnittlich lange Segmente im Einzelfall kürzere Tubulusstrecken einnehmen und umgekehrt durchschnittlich kurze Segmente mitunter längere Tubulusstrecken.

### 4.2.2 **Streuung der Segmentlängenwerte**

Die gemessenen Einzelwerte für die Längen der Segmente variierten teilweise erheblich (vgl. Tab. 1). Dies mag zum einen mit den bereits erwähnten geringen Ungenauigkeiten bei der subjektiven Bestimmung der Segmentgrenzen sowie mit der Anwendung des Bildanalyseprogramms vids-V zusammenhängen.

Sehr viel bedeutsamer dürfte jedoch der Umstand sein, dass sich die dem Prozess der Spermatogenese innewohnende lokale Dynamik in den Messergebnissen niederschlägt. Wie bereits dargestellt, diente für die vorliegende Untersuchung das Spermatogeneschema von Clermont (1954) als Orientierungsbasis, demzufolge der Keimepithelzyklus beim Goldhamster aufgrund bestimmter morphologischer Kriterien willkürlich in 13 feststehende Stadien untergliedert wird. Tatsächlich jedoch verläuft die Spermatogenese an einem gegebenen Ort des Keimepithels als ein kontinuierlicher Proliferations- und Differenzierungsprozess der Keimzellen ab. Zum Zeitpunkt der Fixierung des Gewebes wurde dieser Prozess jeweils schlagartig angehalten. Jeder untersuchte und ausgewertete Tubuluslängsschnitt stellte somit eine zeitlich zufällig herausgegriffene Momentaufnahme aus diesem kontinuierlich fortschreitenden Prozess dar.

Zu einem gegebenen Zeitpunkt sind die Keimzellen innerhalb eines Segmentes nicht komplett synchron in ihrer Entwicklung. In dem Bemühen präzise synchronisierte Einheiten im Keimepithelverband auszumachen sind sogenannte „unit-segments“ (Perey et al., 1961) oder „Subsegmente“ (Ren und Russell, 1991) definiert worden. Die von Perey et al. (1961) aufgestellte „unit-segment-theory“ besagt: Jedes Segment besteht aus mehreren unit-segments (oder Subsegmenten), also aus kleineren Keimepithelbezirken mit tatsächlich exakt synchron entwickelten Keimzelloassoziationen. Der Wechsel der Keimzellen in ein nächsthöheres Stadium der Spermatogenese erfolgt subsegmentweise, d.h. die Segmentgrenzen wandern gleichsam schrittweise, Subsegment nach Subsegment den Tubulus entlang. Aus dieser Vorstellung einer dynamischen Wanderungsbewegung des Spermatogeneseprozesses entlang dem Tubulus wird verständlich, dass verschiedene Segmente (ein und desselben Segmenttyps) je nach Anzahl und Entwicklungsstand der zu einem zufällig gegebenen Zeitpunkt gerade vorhandenen Subsegmente durchaus variable Längen aufweisen können. Die Dauer jedes einzelnen Entwicklungsschrittes bzw. jedes einzelnen Stadiums der Spermatogenese ist dennoch konstant.

Die unit-segments oder Subsegmente liegen innerhalb eines Segmentes nicht nach Entwicklungsstand kontinuierlich von distal nach proximal geordnet, sondern folgen einander entlang dem Tubulus in leicht unregelmäßiger Reihenfolge (Perey et al., 1961). So kann es dazu kommen, dass die Längen der einzelnen Segmente erheblich

variieren, wie die Segmentlängenmessungen der vorliegenden Arbeit bestätigen. Es ergibt sich daraus auch, dass die kontinuierliche segmentale Abfolge durch Modulationen unterbrochen wird. Liegen Subsegmente mit Keimzelloassoziationen eines weiter fortgeschrittenen Entwicklungsstandes proximal und distal von Subsegmenten mit etwas geringerem Entwicklungsstand der Keimzellen, so können zu einem bestimmten Zeitpunkt die Keimzellen der proximal und distal gelegenen Subsegmente bereits ein nächsthöheres Stadium der Spermatogenese erreicht haben. Die Keimzellen der dazwischen liegenden Subsegmente würden dann (vorübergehend) ein niedrigeres Spermatogenesestadium repräsentieren.

Jedes gegebene Segment kann unterschiedlich viele Subsegmente enthalten. Jedes Segment kann somit je nach Anzahl und Entwicklungsstand der vorhandenen Subsegmente eine sich dynamisch verändernde Länge aufweisen. Die Länge einer gesamten Welle der Spermatogenese ist damit ebenfalls von der Anzahl, Anordnung und dem jeweiligen Entwicklungsstand der vorhandenen Subsegmente abhängig und entsprechend variabel.

In der vorliegenden Untersuchung konnte nur ein einziger isoliert eingebetteter Tubulusabschnitt gefunden werden, in dessen Längsverlauf eine komplette Welle der Spermatogenese repräsentiert war.

Um dennoch einen anschaulichen Eindruck von dem dynamischen Verhältnis einzelner Segmentlängen untereinander und zur Länge eines definierten Teilabschnitts der Welle der Spermatogenese zu vermitteln, wurden in Abb. 6 sieben Tubulusabschnitte mit jeweils denselben acht Segmenten vergleichend dargestellt.

#### 4.2.3 **Subsegmente: Synchronisation und lokale Stimulation**

Lokal benachbarte Keimzellen entwickeln sich von Beginn des Spermatogeneseprozesses an nicht zufällig und unabhängig voneinander, sondern in enger räumlicher und zeitlicher Koordination (Leblond und Clermont, 1952; Clermont, 1972). Neben dem Einfluss der unmittelbar benachbarten Sertoli-Zellen ist es insbesondere der klonale Zusammenhang der Keimzellen mittels Interzellularbrücken, welcher für den hohen Grad lokaler Synchronisation bei der Keimzellvermehrung und -differenzierung verantwortlich ist (Fawcett, 1961; Gondos, 1984; Weber und Russell, 1987). Ein Keimzellklon ist die mit jedem Zellteilungsschritt größer werdende Gruppe



von synchron sich entwickelnden Keimzellen, die über Interzellularbrücken kommunizieren und aus der initialen Teilung einer Stammzelle der Spermatogenese entstanden sind.

Die räumliche Ausdehnung einzelner Subsegmente des Keimepithels und die auffallend präzise Synchronisation der Keimzellen innerhalb dieser Areale sollen direkte Folge der klonalen Verbindung der beteiligten Keimzellen sein (Ren und Russell, 1991). Im Keimepithel der Ratte wurden zusammenhängende Keimzellklone mit bis zu 650 Spermatozyten demonstriert (Ren und Russell, 1991).

Neueren Untersuchungen nach sind die unreifsten Spermatogonientypen  $A_{\text{single}}$ ,  $A_{\text{paired}}$  und  $A_{\text{aligned}}$ , unter denen die Stammzellen der Spermatogenese vermutet werden und von deren Proliferation ausgehend somit die Besiedelung der Subsegmente des Keimepithels erfolgt, nicht zufällig im Tubulusverlauf verteilt. Vielmehr weisen diese Zellen im Keimepithel der Maus und der Ratte eine vorwiegende Lokalisation in solchen Bereichen entlang der Basallamina auf, die dem Interstitium zugewandt sind, d.h. die keine nähere Nachbarschaft zu anderen Tubuli zeigen (Chiarini-Garcia et al., 2001, 2003). Das Vorhandensein solcher charakteristisch lokalisierter Stammzell-Nischen (Chiarini-Garcia et al., 2003) könnte für die räumliche Anordnung der Subsegmente im Tubulusverlauf mit von Bedeutung sein. Darüberhinaus deutet diese interstitium-orientierte Lokalisation der Stammzell-Nischen auf die Einwirkung regulierender Faktoren aus Richtung des interstitiellen Gewebes hin, die entweder direkt oder über Vermittlung der Sertoli-Zellen die Keimzellen beeinflussen (Chiarini-Garcia et al., 2003).

#### 4.3 Wahl des Tiermodells

Der Syrische Goldhamster, *Mesocricetus auratus*, sowie die ebenfalls häufig untersuchten Kleinsäugerspezies Ratte und Maus zeigen ein prinzipiell ähnliches räumliches und zeitliches Organisationsmuster der Spermatogenese im Keimepithel der Hodentubuli. Für die vorliegende morphometrische Untersuchung der Segmentlängen in den Tubuli seminiferi wurde der Goldhamster gewählt, weil diese Spezies ihrer kurzen Tragzeit und ihrer Vermehrungsaktivität wegen günstige Untersuchungsbedingungen bot. Außerdem standen für die morphologische Analyse und lokale Stadienzuordnung des Keimepithels (staging) anschauliches Daten- und Bildmaterial für den Goldhamster zur Verfügung (Miething, 1998).

Die räumliche Organisation der Spermatogenese und insbesondere das Ordnungsprinzip der Welle der Spermatogenese sind bei Kleinsäugetieren wie dem hier untersuchten Goldhamster vergleichsweise übersichtlich. Einen direkten Bezug auf die Spermatogenese bei größeren Säugern, insbesondere bei höheren Primaten und beim Menschen, ermöglicht dieses Tiermodell nicht. Beim Menschen verläuft die Spermatogenese nach einem wesentlich komplexeren zeitlichen wie räumlichen Organisationsmuster (Schulze und Rehder, 1984; Schulze et al., 1986). Die unmittelbare Gültigkeit der vorliegenden Ergebnisse ist demnach auf die genannten Kleinsäugetierspezies beschränkt. Dennoch können die vorgelegten Resultate zum Grundverständnis der Organisation und der Dynamik der Spermatogenese im Säugerhoden beitragen.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden morphometrische Untersuchungen zur Welle der Spermatogenese im Keimepithel des adulten Goldhamsters durchgeführt. Ziel war die Längenbestimmung einzelner Segmente innerhalb der Welle der Spermatogenese.

Hierzu wurden Semidünnschnittpräparate von isoliert eingebetteten Abschnitten der Tubuli seminiferi angefertigt. Die Längenausdehnung der im Tubuluslängsverlauf aufeinander folgenden Segmente wurde lichtmikroskopisch analysiert. Die Segmente wurden aufgrund morphologischer Kriterien jeweils einem der 13 Stadien der Spermatogenese zugeordnet, die Segmentgrenzen identifiziert und die Segmentlängen mittels eines Bildanalyse-Systems gemessen.

Im Verlauf der Untersuchungen wurden die Fixierungs- und Einbettungsschemata mehrfach modifiziert, um Artefakte zu verringern und die Methode zu optimieren.

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben:

In den für die Semidünnschnitt-histologie flach eingebetteten und längs geschnittenen Tubulusstücken ließen sich die Stadien der Spermatogenese verlässlich identifizieren. Hierbei waren die Segmentgrenzen ausreichend scharf erkennbar, um Längenmessungen vorzunehmen. Die ermittelten Einzelwerte für die Länge eines jeweiligen Segmentes streuten teilweise breit. Für jedes der Segmente I-XIII wurde ein durchschnittlicher Längenwert errechnet. Diese Durchschnittswerte zeigten erhebliche Unterschiede. Es gab durchschnittlich längere und durchschnittlich kürzere Segmente. Auch die relativen Längenwerte eines Segmentes bezogen auf die Gesamtlänge eines bestimmten Tubulusabschnittes mit definierter Segmentfolge unterschieden sich zum Teil erheblich.

Deutlich war die Tendenz erkennbar, dass die durchschnittliche Länge der Segmente mit der Dauer des jeweils repräsentierten Spermatogenesestadiums korrelierte.

Die auffallende Streuung der gemessenen Einzelwerte der Segmentlängen um den jeweiligen Durchschnittswert, die großen Unterschiede der für jedes der 13 Segmente ermittelten Durchschnittslängenwerte sowie die annähernde Korrelation zwischen durchschnittlicher Segmentlänge und zeitlicher Dauer des betreffenden Spermatogenesestadiums lassen sich am besten mit Hilfe der "unit-segment-theory" des Keimepithels erklären. Die Befunde der vorliegenden Arbeit können dieses differenzierte Konzept der dynamischen Organisation des Keimepithels im Kleinsäugerhoden somit unterstützen.

## 6. Tabellen und Abbildungen

**Tab. 1: Zusammenstellung aller gemessenen Segmentlängen (Rohwerte), Teil 1**

I	II	III	IV	V	VI	
792,195	952,251	971,134	3078,55	1747,03	2474,21	
879,076	1282,88	1394,75	1824,98	2429,09	2887,17	
344,53	775,046	922,51	1203,11	1125,11	1341,58	
867,329	1441,13	718,80	955,079	802,46	1544,83	
542,194	1794,58	1334,70	1052,73	988,263	2953,39	
712,648	893,456	1178,03	930,188	3742,18	943,326	
669,99	976,51	925,228	1344,71	1254,14	1465,88	
756,257	1011,243	1454,94		1403,76		
			1661,80	2190,15	1393,21	
1599,99	1445,28	1818,69	1376,76		1995,25	
821,479	899,498	1821,97	1848,08	805,07	2273,36	
560,498	956,076	1455,53	1549,99	1063,78	602,518	
1365,33	750,317	650,372	1274,85	994,884	1134,93	
440,365	587,684	579,218	1216,745	1331,06	1248,05	
670,722	1183,27	768,166	795,64	2452,78	1110,41	
1034,62	587,391	854,698	1657,97	2580,51		
		848,881	1071,78	1072,87	2409,35	
864,501	597,864	992,52		4286,84	1656,39	
805,012	1295,421		1621,53		1604,88	
367,808	758,086	277,59	1395,13	1728,39	2184,64	
560,414	637,426	879,232	2736,90	2041,25	1465,82	
649,742	1294,71	1225,66	1951,87	2234,23	1528,16	
712,151	902,236	1292,14	1330,334	2898,98	1867,69	
980,202	1439,61	1649,74	1180,04	2791,79	1935,28	
767,244	1080,401	983,70		785,651		
		1189,90	1579,15	2391,96	2129,02	
634,109	826,014		788,434		2052,17	
563,807	850,796	372,236	2029,86	1705,40	1600,32	
765,834	963,627	846,561	1417,84	859,672	1707,70	
742,818	521,552	1427,28	793,758	1804,51	682,156	
1091,89	817,808	1025,58	841,869	1409,70	740,894	
671,158	835,14	867,002	1219,90	1733,07	3234,94	
1434,03	751,93	1397,91	1993,64	753,688	3382,35	
	1593,25	1570,16	3034,88	848,273		
				3584,38		
				2277,20		
				2201,55		
				2131,53		
788,9	990,4	1086,9	1508,3	1841,5	1785,0	<i>Mittelwert</i>
83785,9	103541,5	151579,3	361021,8	809752,9	520889,0	<i>Varianz</i>
289,5	321,8	389,3	600,9	899,9	721,7	<i>Standardabweichung</i>
749,5	902,2	992,5	1376,8	1733,1	1630,6	<i>Median</i>

Sämtliche gemessenen Längenwerte sind in  $\mu\text{m}$  angegeben und spaltenweise nach Segmenten geordnet aufgelistet. Innerhalb der Spalten sind die Werte für die einzelnen Versuchstiere blockweise angeordnet. Die in den statistischen Testverfahren als Ausreißer identifizierten Werte sind ***kursiv fett*** gedruckt. Diese Werte wurden nicht in die weitere Auswertung einbezogen.

Tab. 1: Zusammenstellung aller gemessenen Segmentlängen (Rohwerte), Teil 2

VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	
5208,06	528,442	423,486	984,147	1055,35	996,606	660,38	
4016,23	277,39	248,63	616,707	763,61	420,126	343,177	
3427,72	450,292	636,786	807,834	1244,41	137,662	1208,12	
1206,144	624,891	911,565	247,067	1043,01	494,048	943,339	
2398,21	1416,26	174,621	367,309	1469,98	675,648	1028,93	
1742,33	219,05	362,972	200,401	226,615	795,345	1335,68	
4144,68	1124,81	272,143	346,899	457,173	682,328		
4711,14	543,462	231,489	354,744	<b>3333,89</b>	1104,84	1283,75	
3731,48	201,008	372,138	637,724	1613,94		975,153	
1334,97	385,056	361,775	584,911	457,579	1720,52	770,906	
	191,848	715,423	276,425	514,628	1287,77	1489,68	
5286,43	289,485	607,316	281,67	742,126	1264,93	725,181	
3853,85	333,192	267,923		607,932	821,084	1168,04	
3080,65	393,321	341,784	349,656		923,95	579,308	
1673,95			702,507	<b>3375,66</b>	537,673	566,073	
1025,71	326,547	<b>1100,05</b>	424,989	910,609	255,933	670,09	
1303,41	475,403	206,452	127,522	604,898	760,94		
2159,06	350,842	782,241	1026,60	530,814		1133,87	
856,301	405,677	444,267	724,31	706,458	735,163	1531,25	
	684,286	157,106	450,826	284,875	1540,78	588,052	
2315,59	1081,01	412,27	252,645	803,075	222,03	727,768	
2327,30	1053,01	312,724	311,049		463,143	801,146	
1296,66	1053,61	306,841		717,446	884,611	927,217	
1868,87		625,704	600,017	886,914	534,283	779,404	
2268,45	275,764	178,68	425,69	456,683	443,119	1058,24	
3486,22	518,108		372,646	504,819	323,07		
1552,83	937,119	170,383	368,566	624,327	781,747	1335,68	
4066,04	560,777	330,925	278,182	358,435		1418,24	
	997,957	406,833	300,944	605,91	787,042	682,156	
2546,86	179,596	697,903	330,823	599,021	500,084	1003,59	
2491,08	340,393	209,012	295,522	447,547	319,424	1395,94	
3795,87	216,288	253,405	202,414		573,066	1178,38	
2581,79		199,026	317,217	958,225	604,293	813,745	
4893,75	1446,61	343,48		1442,80	507,09	903,647	
5498,32	650,815	243,832	391,448	1042,15	556,248		
3863,76	743,487		434,399	478,062	1191,59		
1344,69	215,44	540,308	371,786	471,226	990,067		
2430,38	282,098	380,869	330,583	209,60			
	453,394	365,407	410,828	487,851			
	265,538	184,021	354,822	2714,37			
	534,75	230,408	475,024				
	631,972	182,814	364,528				
	394,97	367,686	171,868				
	646,271	346,661	288,785				
		176,054	406,415				
		409,342	560,725				
		657,426					
2851,1	553,7	373,3	421,6	772,6	730,5	968,6	<i>Mittelwert</i>
1818782,1	112614,7	35006,8	39461,0	234037,6	137446,5	96318,2	<i>Varianz</i>
1348,6	335,6	187,1	198,6	483,8	370,7	310,4	<i>Standardabweichung</i>
2491,1	453,4	343,5	367,3	607,9	679,0	943,3	<i>Median</i>

**Tab. 2: Zusammenfassung der Segmentlängenwerte**

Segment	Anzahl gemessener Segmente	kürzestes Segment [µm]	längstes Segment [µm]	Mittelwert [µm]	Standardabweichung
I	30	344,5	1600,0	788,9	289,5
II	31	521,6	1794,6	990,4	321,8
III	31	277,6	1822,0	1086,9	389,3
IV	31	788,4	3078,6	1508,3	600,9
V	35	753,7	4286,8	1841,5	899,9
VI	30	602,5	3382,4	1785,0	721,7
VII	35	856,3	5498,3	2851,1	1348,6
VIII	41	179,6	1446,6	553,7	335,6
IX	44	157,1	911,6	373,3	187,1
X	43	127,5	1026,6	421,6	198,6
XI	37	209,6	2714,4	772,6	483,8
XII	34	137,7	1720,5	730,5	370,7
XIII	31	343,2	1531,3	968,6	310,4

Für jedes der 13 Segmente sind folgende Parameter angegeben: Anzahl gemessener Einzelsegmente, die jeweils niedrigste und höchste gemessene Segmentlänge, Mittelwert und Standardabweichung.

**Tab. 3: Segmentlängenwerte für die vier untersuchten Tiere**

Segment	Mittelwert der gemessenen Längen [ $\mu\text{m}$ ]	Mittelwert der gemessenen Längen [ $\mu\text{m}$ ]	Mittelwert der gemessenen Längen [ $\mu\text{m}$ ]	Mittelwert der gemessenen Längen [ $\mu\text{m}$ ]
	<b>Tier 1</b>	<b>Tier 2</b>	<b>Tier 3</b>	<b>Tier 4</b>
I	695,5	927,6	713,4	843,4
II	1140,9	915,6	1000,7	895,0
III	1112,5	1087,8	1071,1	1072,4
IV	1484,2	1383,7	1702,6	1522,1
V	1742,5	1823,5	2124,6	1755,4
VI	1944,3	1394,0	1831,5	1941,2
VII	3192,1	2404,9	2397,7	3271,8
VIII	498,5	678,8	503,3	569,6
IX	423,4	380,7	317,2	349,2
X	475,5	485,6	349,2	380,1
XI	849,7	640,1	577,9	975,5
XII	663,3	946,6	658,7	669,9
XIII	919,9	914,2	943,4	1091,4

Für jedes untersuchte Tier wurde für jedes Segment ein durchschnittlicher Längenwert (Mittelwert) errechnet.

**Tab. 4: Zeitdauer der Stadien der Spermatogenese des Goldhamsters nach de Rooij (1968) sowie Clermont und Trott (1969)**

Stadium	Stadiendauer nach de Rooij [h]	Stadiendauer nach Clermont und Trott [h]
I	18,0	25,2
II	10,2	18,9
III	10,6	12,1
IV	18,2	10,4
V	19,2	17,4
VI	36,3	30,2
VII	37,2	25,7
VIII	19,7	15,4
IX	10,2	8,2
X	9,1	7,6
XI	6,3	9,5
XII	7,6	13,3
XIII	13,4	15,7

De Rooij (1968) sowie Clermont und Trott (1969) haben getrennt voneinander die Zeitdauer der einzelnen Spermatogenesestadien untersucht. Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse dieser beiden Arbeiten fallen bei tendenziell vergleichbarem Zeitmuster zum Teil deutliche Unterschiede der absoluten Werte auf.



**Tab. 5a: Segmentlängen ( $\mu\text{m}$ ) der in Abb. 6 dargestellten Tubulusabschnitte**

Tubulus	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	I	II
1	395,0	182,8	288,8	487,9	556,2	1395,9	742,8	521,6
2	632,0	176,1	171,9	209,6	507,1	1003,6	765,8	963,6
3	219,1	174,6	247,1	1055,4	137,7	660,4	792,2	952,3
4	277,4	206,5	349,7	607,9	1104,8	1028,9	712,6	775,0
5	1053,0	625,7	252,6	803,1	760,9	670,1	670,7	587,7
6	560,8	406,8	372,6	886,9	1540,8	1531,3	712,2	637,4
7	998,0	697,9	278,2	504,8	463,1	727,8	560,4	597,9

Die Werte aus dieser Tabelle bilden die Grundlage für die errechneten Werte aus Tabelle 5b und für Abbildung 6. Es wurden 7 Tubulusabschnitte mit der gleichen Segmentfolge (VIII, IX, X, XI, XII, XIII, I, II) gefunden. Für jedes einzelne dieser 8 Segmente sind hier die ermittelten Längswerte ( $\mu\text{m}$ ) dem jeweiligen Tubulus 1 bis 7 zugeordnet.

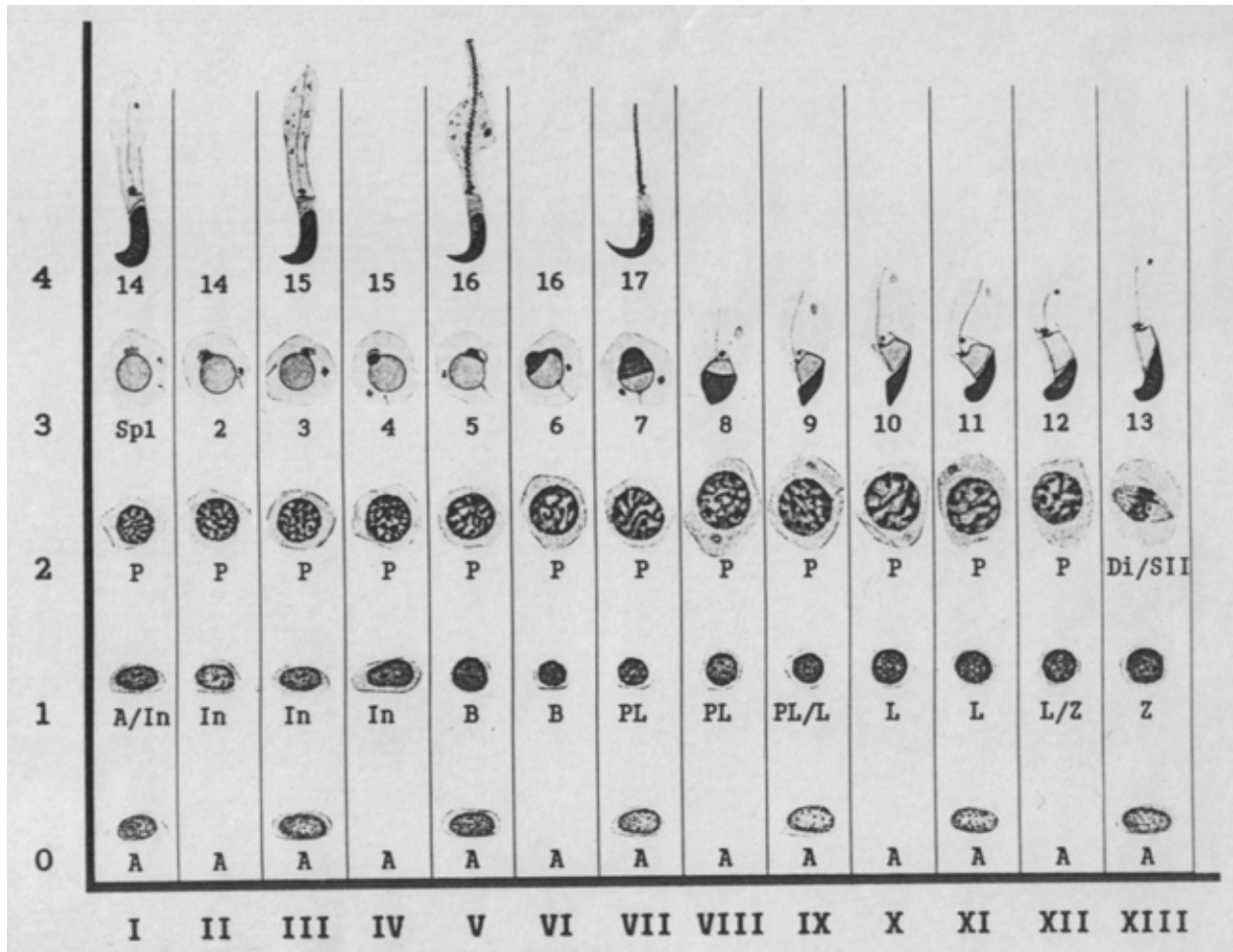
**Tab. 5b: Relative (prozentuale) Länge der einzelnen Segmente der in Abb. 6 dargestellten Tubulusabschnitte**

Tubulus	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	I	II
1	8,64	4,00	6,32	10,67	12,17	30,54	16,25	11,41
2	14,27	3,98	3,88	4,73	11,45	22,66	17,29	21,75
3	5,17	4,12	5,83	24,90	3,25	15,58	18,69	22,47
4	5,48	4,08	6,91	12,01	21,82	20,32	14,08	15,31
5	19,41	11,54	4,66	14,81	14,03	12,35	12,37	10,84
6	8,43	6,12	5,60	13,34	23,17	23,03	10,71	9,56
7	20,67	14,45	5,76	10,46	9,59	15,07	11,61	12,38
Mittelwert	11,72	6,90	5,57	12,99	13,64	19,94	14,43	14,82
Standard- abweichung	6,43	4,32	1,01	6,14	6,94	6,19	3,05	5,29

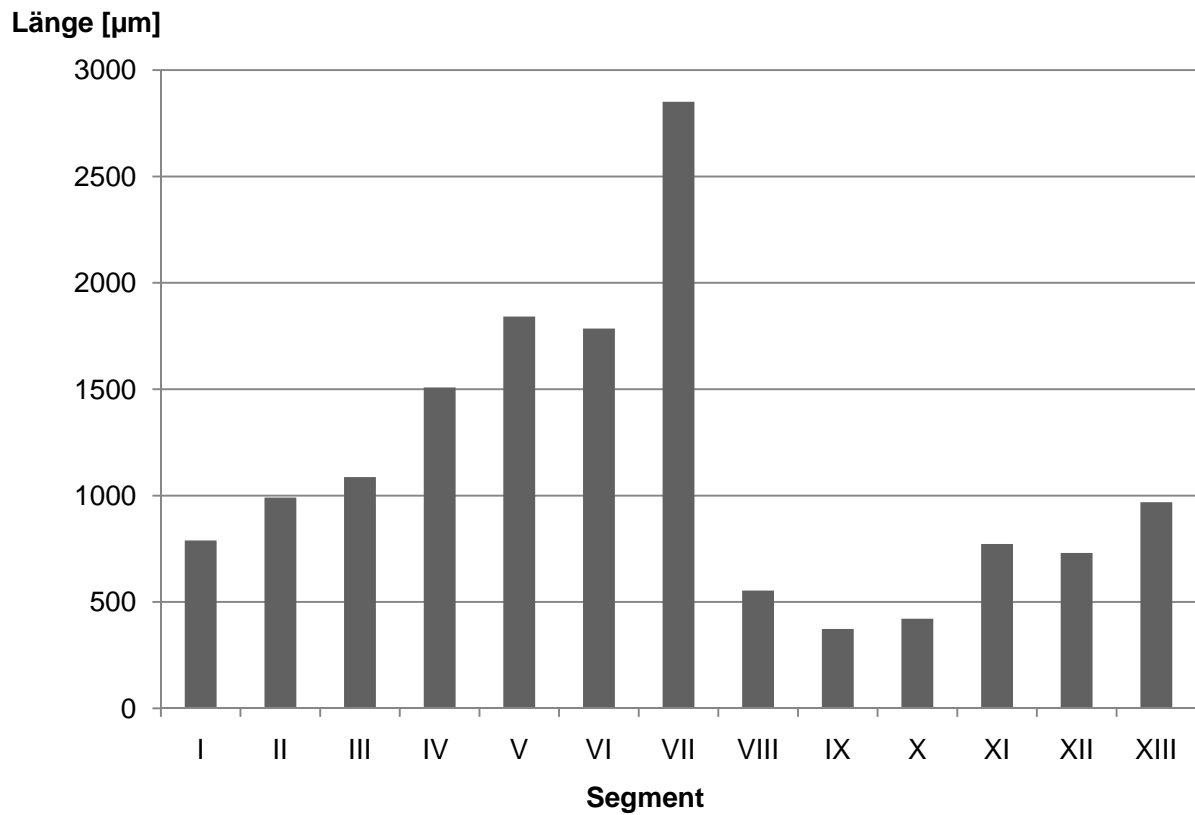
Für jeden der 7 Tubulusabschnitte wurde das Verhältnis der Länge der jeweiligen einzelnen Segmente zur Gesamtlänge berechnet.

Für die 8 erfassten Segmente wurde daraus jeweils ein Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

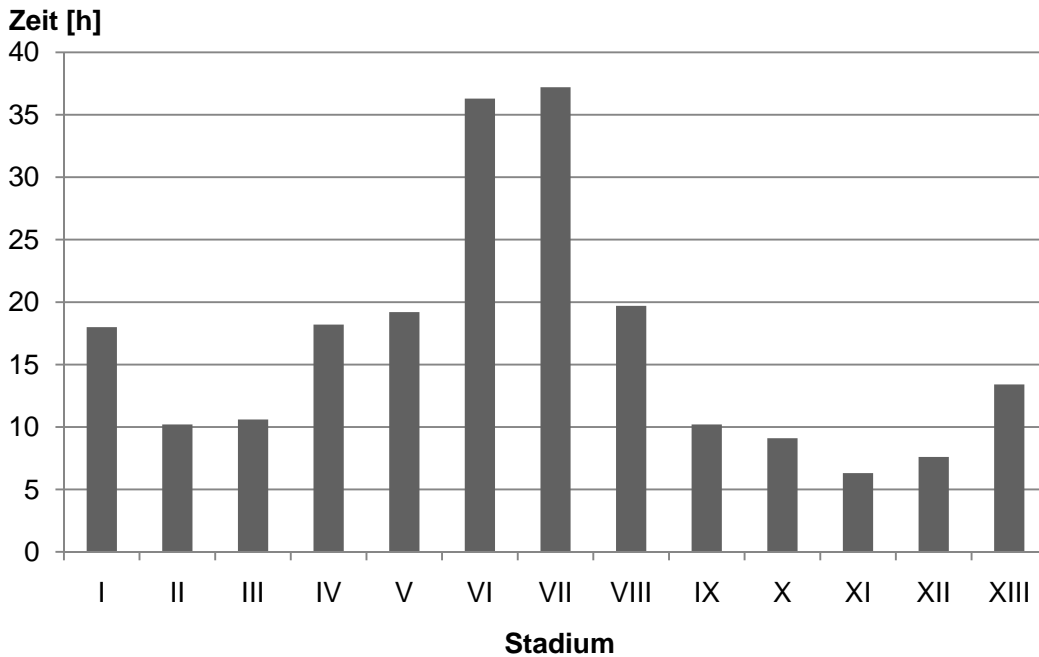
Abb. 1: Schema des Keimepithelzyklus des Goldhamsters nach Clermont (1954), modifiziert nach Miething (1998)



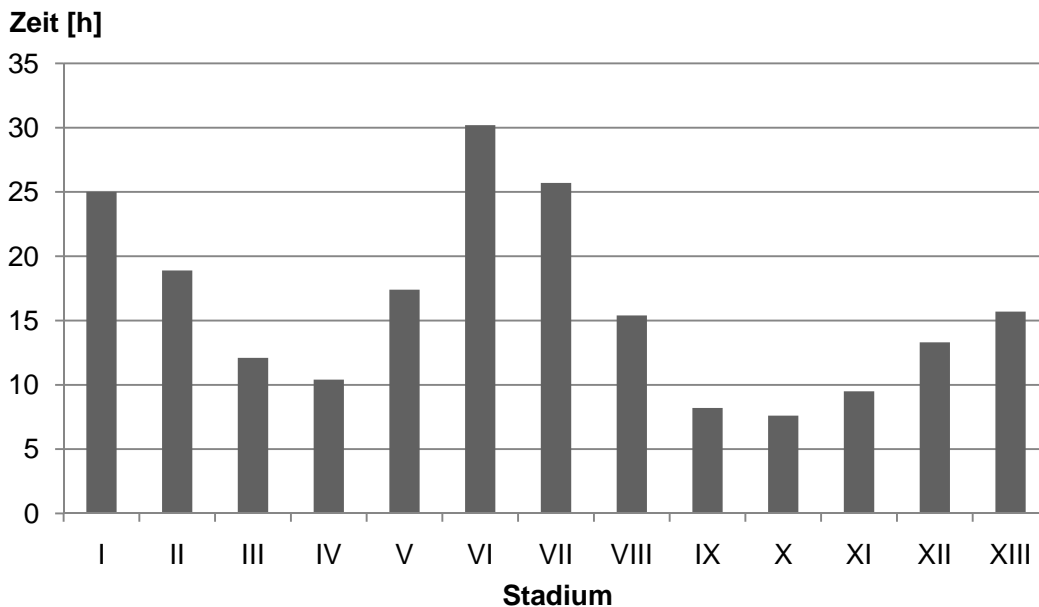
Clermont hat den Zyklus des Keimepithels für den Goldhamster aufgrund bestimmter morphologischer Kriterien in 13 Stadien unterteilt, die mit römischen Ziffern I - XIII bezeichnet sind. In dem gezeigten Schema sind diese aufeinanderfolgenden Stadien mit den jeweils charakteristischen Keimzelloassoziationen als Spalten nebeneinander dargestellt. Die chronologisch aufeinanderfolgenden einzelnen Entwicklungsschritte einer Keimzelle sind in dieser Darstellung zeilenweise von unten nach oben angeordnet.

**Abb. 2: Mittelwerte der gemessenen Segmentlängen**

Diese Abbildung stellt die ermittelten durchschnittlichen Längen (Mittelwerte) der einzelnen Segmente in Form eines Säulendiagramms dar.

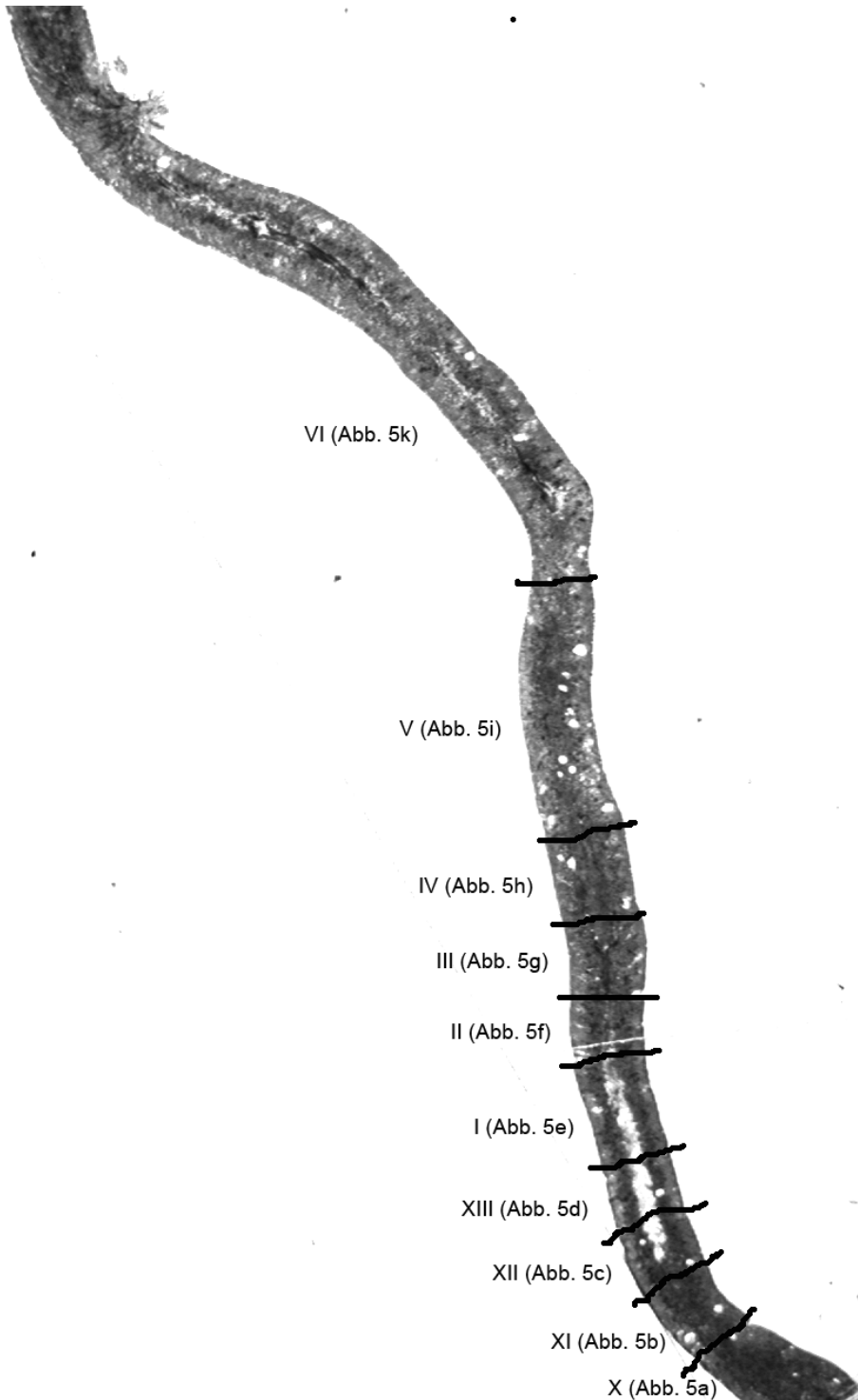
**Abb. 3: Dauer der Spermatogenesestadien nach de Rooij (1968)**

Die von de Rooij (1968) ermittelte Dauer der einzelnen Spermatogenesestadien beim Goldhamster ist in Form eines Säulendiagramms dargestellt (vgl. Tab. 4).

**Abb. 4: Dauer der Spermatogenesestadien nach Clermont und Trott (1969)**

Die von Clermont und Trott (1969) ermittelte Dauer der einzelnen Spermatogenesestadien beim Goldhamster ist in Form eines Säulendiagramms dargestellt. Die entsprechenden Werte sind Tabelle 4 zu entnehmen.

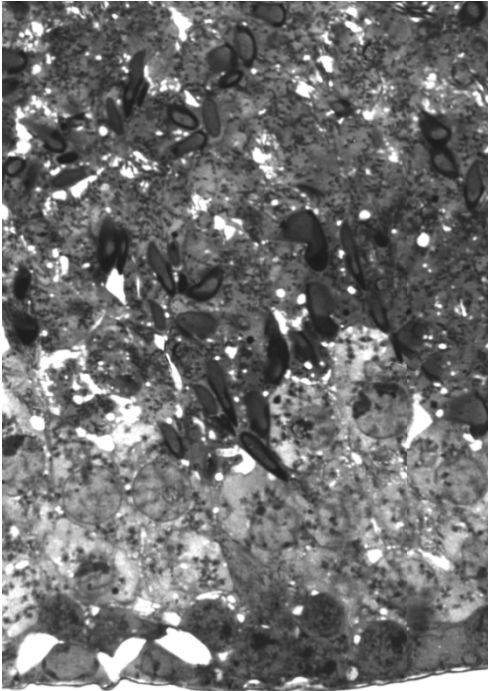
**Abb. 5: Übersicht eines Tubuluslängsschnittes**



Das Foto zeigt einen weitgehend zentral getroffenen Längsschnitt eines zu untersuchenden Tubulusabschnittes bei Übersichtsvergrößerung. Die bei höherer Vergrößerung (Abb. 5a - k) identifizierten Segmente und Segmentgrenzen sind markiert.

**Abb. 5a-k:** Ausschnittvergrößerungen des Keimepithels einzelner Segmente zur Identifizierung des jeweiligen Spermatogenesestadiums. Am unteren Bildrand ist jeweils die sehr dünne Lamina propria erkennbar, im oberen Bildteil ist der lumenseitige Teil des Keimepithels, zum Teil auch das Lumen selbst zu sehen.

Anhand der beschriebenen morphologischen Kriterien konnte das jeweils vorliegende Stadium bestimmt und damit das zugehörige Segment bzw. die Segmentgrenzen auf dem zu untersuchenden Längsschnitt festgelegt werden (zur Übersicht vgl. Abb. 5).



**Abb. 5a: Stadium X der Spermatogenese**

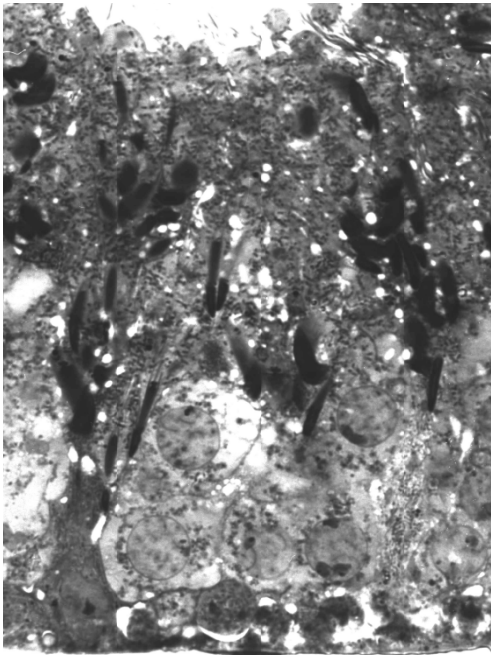
Die Zellkerne der Spermatiden 10 sind verlängert, weiter gebogen und spitzer. Sie besitzen ein zunehmend dunkleres Karyoplasma.



**Abb. 5b: Stadium XI der Spermatogenese**

Die Spermatiden 11 zeigen erstmals eine leicht hakenartig abgewinkelte Form ihres elongierten Zellkerns.

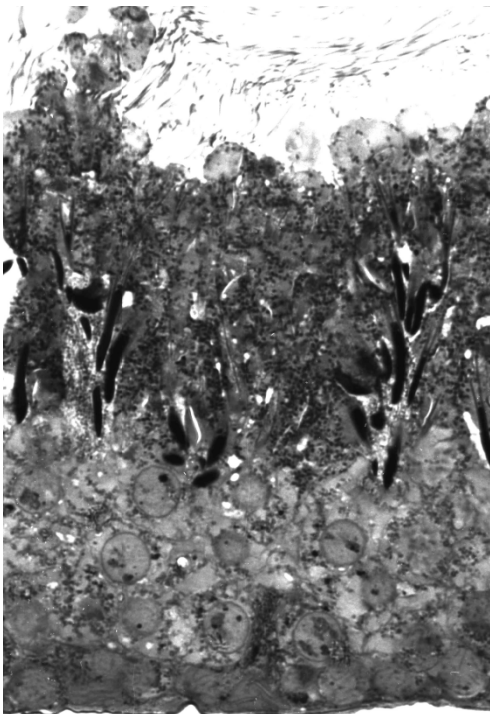




**Abb. 5c: Stadium XII der Spermatogenese**

Die Spermatozyten I treten in das Zygotänstadium ein.

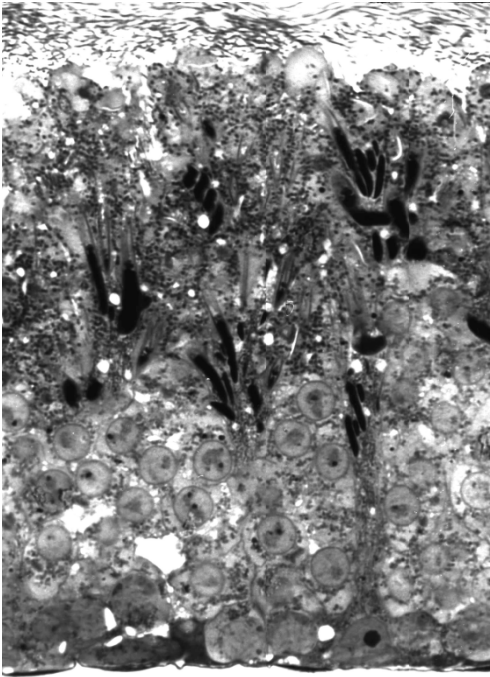
Die Kerne der Spermatischen 12 sind schmaler und dichter.



**Abb. 5d: Stadium XIII der Spermatogenese**

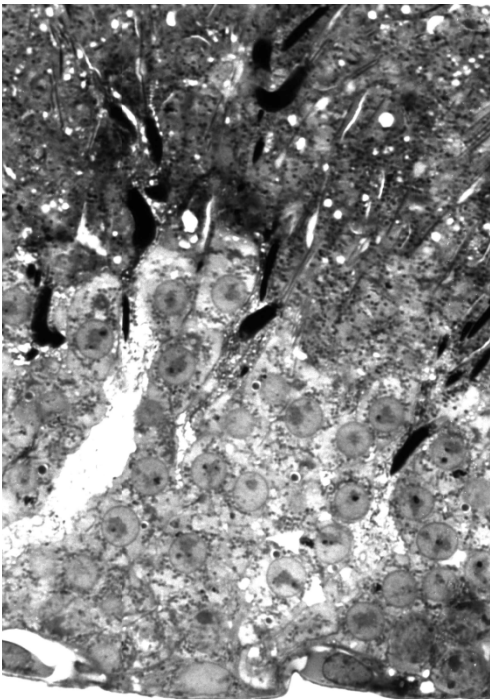
Neben basal liegenden zygotänen Spermatozyten I finden sich diplotäne Spermatozyten I sowie Spermatozyten II. Teilungsfiguren sind häufig.

Die Spermatischen 13 besitzen fast rechtwinklig abgebogene Kernformen mit maximal verdichtetem Karyoplasma.



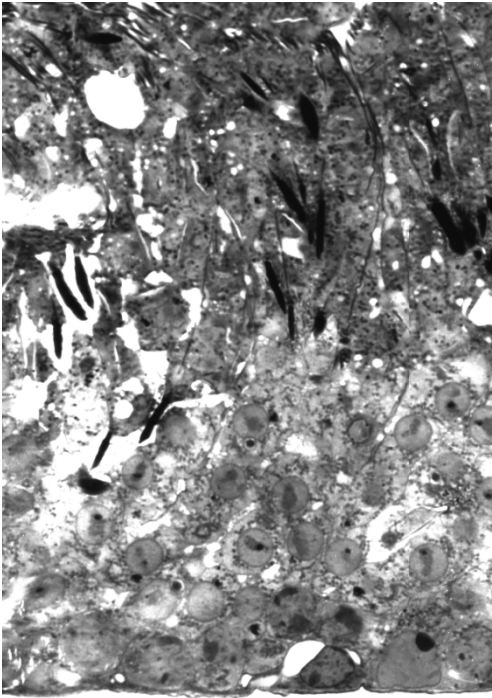
**Abb. 5e: Stadium I der Spermatogenese**

Die Spermatogonien liegen der Basalmembran flach oval auf. Die Spermatozyten I besitzen kreisrunde Kerne mit unscharfer Kern-Zytoplasma-Grenze. Die Spermatiden 1 ähneln in Kernform und Kernstruktur den Spermatozyten II des Stadiums 13, sind aber deutlich kleiner als diese.



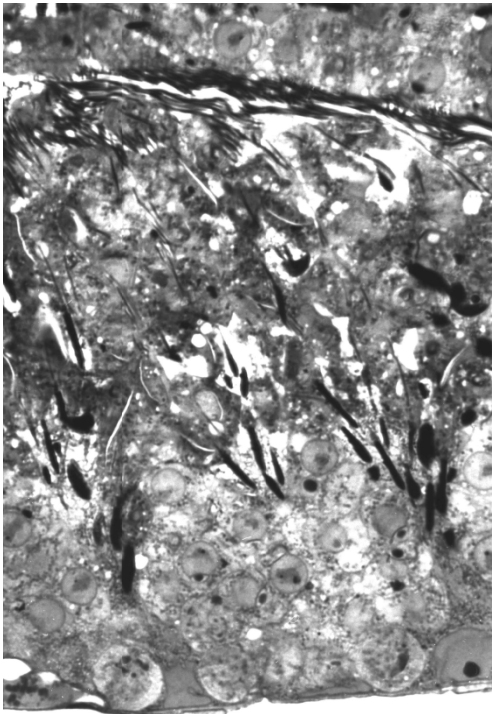
**Abb. 5f: Stadium II der Spermatogenese**

Im Zytoplasma der Spermatiden 2 zeigt sich die Formierung des kleinen, runden Akrosombläschens. Dieses besitzt um einen dunklen, zentralen Punkt einen optisch leeren Hof. Es liegt dem Zellkern unmittelbar an ohne die Kernmembran einzudellen.



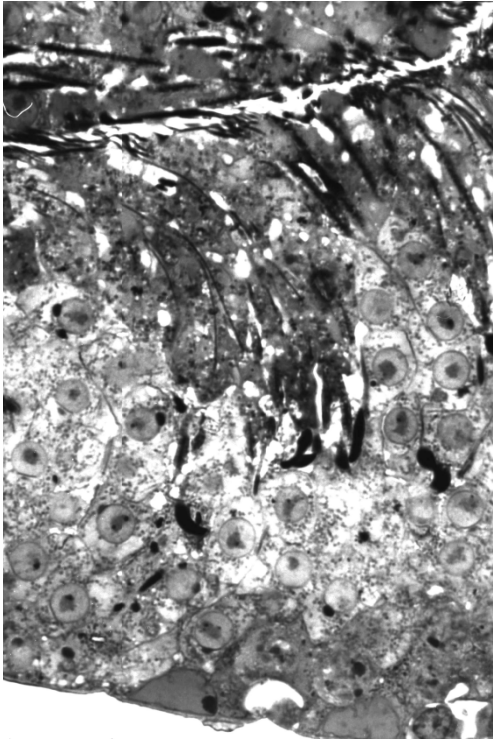
**Abb. 5g: Stadium III der Spermatogenese**

Die Spermatiden 3 zeigen ein größeres Akrosombläschen, welches die Kernmembran deutlich eindehlt. Die Spermatiden 15 haben hakenähnliche, schlank zugespitzte Kerne.



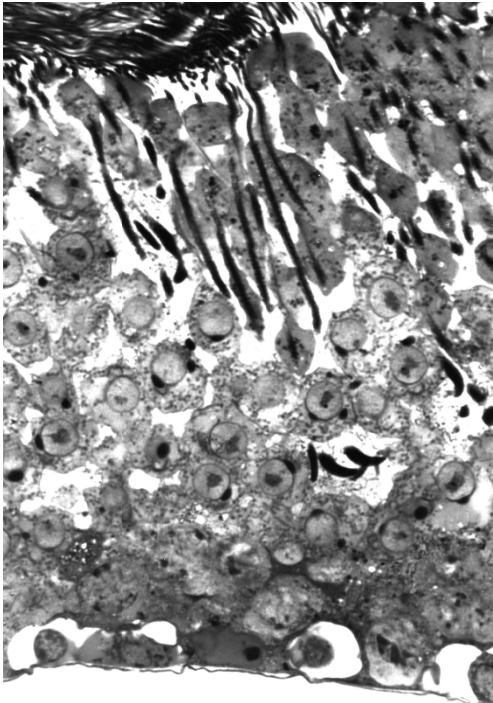
**Abb. 5h: Stadium IV der Spermatogenese**

Das Akrosombläschen bekommt eine zunehmend abgeflachte Form und beginnt sich über die Oberfläche des Zellkerns auszubreiten. Der Kern flacht an der Akrosomseite leicht ab.



**Abb. 5i: Stadium V der Spermatogenese**

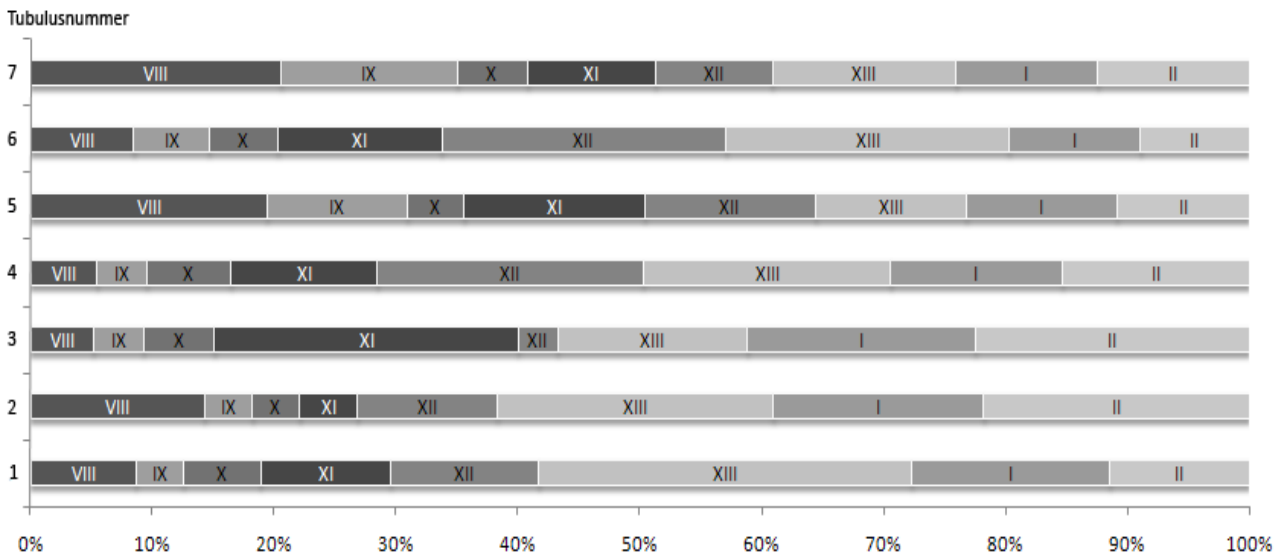
Die Spermatiden 5 zeigen breitere Akrosombläschen, welche dem abgeflachten Kernpol anliegen und sich mit ihrem Rand weiter über den Kern ausbreiten.



**Abb. 5k: Stadium VI der Spermatogenese**

Die runden Zellkerne der Spermatiden 6 sind infolge der fortschreitenden Ausbreitung des Akrosoms nun fast bis zur Hälfte von diesem bedeckt.

**Abb. 6: Relative (prozentuale) Längenverhältnisse einzelner Segmente in Relation zur Gesamtlänge eines Tubulusabschnittes. Vergleichende Darstellung von 7 Tubulusabschnitten mit jeweils identischer Segmentfolge.**



Die hier dargestellten 7 Tubulusabschnitte wurden mit den Nummern 1 - 7 bezeichnet. Auf jedem dieser Tubulusabschnitte fanden sich die Segmente VIII, IX, X, XI, XII, XIII, I und II, die in dieser Abbildung jeweils von links nach rechts aufeinanderfolgend dargestellt sind. Im Diagramm sind die relativen (prozentualen) Segmentlängen im Verhältnis zur Gesamtlänge des jeweiligen Tubulusabschnittes dargestellt.

Die zugehörigen absoluten Längenwerte finden sich in Tab. 5a, die Prozentwerte sind in Tab. 5b angegeben.

## 7. **Literatur**

- Chiarini-Garcia H, Hornick JR, Griswold MD, Russell LD. Distribution of Type-A-Spermatogonia in the mouse is not random. *Biol Reprod* 2001; 65: 1179-1185
- Chiarini-Garcia H, Raymer AM, Russell LD. Non-random distribution of Spermatogonia in rat: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Biol Reprod* 2003; 126: 669-680
- Clermont Y. Cycle de l'epithelium seminal et mode de renouvellement des spermatogonies chez le hamster. *Rev Canad Biol* 1954; 13: 208-245
- Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972; 52: 198-236
- Clermont Y, Bustos-Obregon E. Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". *Am J Anat* 1968; 122: 237-248
- Clermont Y, Perey B. The stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the rat: practical definitions in PA-Schiff-hematoxylin and hematoxylin-eosin stained sections. *Rev Canad Biol* 1957; 16: 451-462
- Clermont Y, Trott M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of 3H-thymidine and radioautography. *Fertil Steril* 1969; 20: 805-817
- de Rooij DG. Stem cell renewal and duration of spermatogonial cycle in the goldhamster. *Z Zeilforsch* 1968; 89: 133-136
- Fawcett DW. Intercellular bridges. *Exp Cell Res Suppl* 1961; 8: 174-187
- Gondos B. Germ cell differentiation and intercellular bridges. In: Van Blerkom J, Motta PM, eds. *Ultrastructure of reproduction*. Dordrecht: Nijhoff, 1984: 31-45
- Holstein AF, Wulfhekel U. Die Semidünnschnitt-Technik als Grundlage für eine cytologische Beurteilung der Spermatogenese des Menschen. *Andrologie* 1971; 3: 65-69
- Huckins C. Spermatogonial intercellular bridges in whole-mounted seminiferous tubules from normal and irradiated rodent testes. *Am J Anat* 1978; 153: 97-122

- Ito S, Winchester RJ. The fine structure of the gastric mucosa in the bat. *J Cell Biol* 1963; 16: 541-577
- Leblond CP, Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann NY Acad Sci* 1952; 55: 548-573
- Miething A. Proliferative activity of the developing seminiferous epithelium during prespermatogenesis in the golden hamster testis measured by bromodeoxyuridine labeling. *Anat Embryol* 1993; 187: 249-258
- Miething A. The bridge-partitioning complex of germ-cell intercellular bridges in the testis of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Cell Tissue Res* 1995; 281: 359-365
- Miething A. Flat plastic embedding and precise longitudinal sectioning of isolated testicular seminiferous tubules. *Andrologia* 1996; 28: 343-347
- Miething A. The establishment of spermatogenesis in the seminiferous epithelium of the pubertal golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1998; 140: 1-95
- Perey B, Clermont Y, Leblond CP. The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Am J Anat* 1961; 108: 47-77
- Regaud C. Etudes sur la structure des tubes seminiferes et sur la spermatogenese chez les mammiferes. *Arch spermatogenese Micr* 1901; 4: 101-105, 231-380
- Ren HP, Russell LD. Clonal development of interconnected germ cells in the rat and its relationship to the segmental and subsegmental organization of spermatogenesis. *Am J Anat* 1991; 192: 121-128
- Roosen-Runge EC. Kinetics of spermatogenesis in mammals. *Ann NY Acad Sci* 1952; 55: 574-584
- Schubert W. Lichtmikroskopische Untersuchungen über die Beeinflussung der Spermatogenese durch Lichtentzug beim Goldhamster (*Mesocricetus auratus*). Dissertation Medizinische Fakultät, Universität Bonn, 1977
- Schulze W, Rehder U. Organization and morphogenesis of the human seminiferous epithelium. *Cell Tissue Res* 1984; 237: 395-407

Schulze W, Riemer M, Rehder U, Höhne KH. Computer-aided three-dimensional reconstructions of the arrangement of primary spermatocytes in human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res* 1986; 244: 1-8

Swan MA. Improved preservation of ultrastructural morphology in human spermatozoa using betaine in the primary fixative. *Int J Andr* 1997; 20: 45-54

Weber JE, Russell LD. A study of intercellular bridges during spermatogenesis in the rat. *Am J Anat* 1987; 180: 1-24



## 8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. A. Miething für die Überlassung des Promotionsthemas und die Anleitung bei der Durchführung der Experimente. Ich bin ihm weiterhin für seine Anregungen und Diskussionen sowie für seine Geduld während der Erstellung der Arbeit dankbar.

Gedankt sei ebenfalls Frau M. Lindemann, die mich zusammen mit Herrn PD Dr. Miething in allen praktischen Laborarbeiten unterstützte.

Für die Einführung in den Umgang mit dem verwendeten Bildanalysesystem danke ich Frau Prof. Dr. C. Schmolke.

Für die fachgerechte Beratung danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Statistik der Universität Bonn.

Für die freundlichen Auskünfte danke ich Frau A. Cieslak, Angestellte des Medizinischen Dekanats Bonn.

Des Weiteren danke ich meinem Ehemann Ralf Bodelier für seine Hilfe bei dem Umgang mit der Computer- sowie Statistik-Software.

Mein spezieller Dank gilt außerdem meinen Eltern für die liebevolle Betreuung unserer Kinder während der schriftlichen Ausarbeitung meiner Promotionsarbeit.