

Aus dem Anatomischen Institut II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. T. Filler

**Immunhistochemische Studien zur Proliferation der
Makrophagen im Rattenhoden
von der Geburt bis zum Senium**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nevena Trifonova Ilieva

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. Haider

Korreferent: Prof. Dr. Schulz

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALC	Adulttyp-Leydig-Zelle
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
DAB	3,3'Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
ED1	Der Name des Antikörperclones (CD 68)
ED2	Der Name des Antikörperclones (CD163)
et al.	und andere
FLC	Fetaltyp-Leydig-Zelle
FSH	Follikel Stimulierendes Hormon
g	Gramm
ICH	Immunhistochemie
IL-1	Interleukin-1
LH	Luteinisierendes Hormon
mAb	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
Min.	Minuten
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
MP	Makrophage
pnd	Postnataltag
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor α
u.a.	und andere
vs.	versus

1. Enleitung	6
1.1. Immunologie des Hodens	6
1.2. Immunhistochemische Marker	7
1.2.1. Lysosomales Membranprotein CD 68 (auch bezeichnet als ED1)	7
1.2.2. Zellmembranprotein CD 163 (auch bezeichnet als ED2)	7
1.3. Interaktionen zwischen Makrophagen und Leydig-Zellen	8
1.4 Fragestellungen der Arbeit	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Versuchstiere	13
2.2. Gewebefixierung und Herstellung der Schnitte	13
2.2.1. Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd (PLP)	14
2.2.2. Bouin-Lösung	14
2.3. Immunhistochemie und Färbungen	15
2.3.1. Immunhistochemische Darstellung von ED1-positiven Makrophagen	15
2.3.2. Immunhistochemische Darstellung von ED2-positiven Makrophagen	15
2.4. Lichtmikroskopische Asuwertung	19
2.4.1. Quantitative Auswertung der ED1-positiven Makrophagen	19
2.4.2. Quantitative Auswertung der ED2-positiven Makrophagen	21
2.5. Statistische Methoden	22
3. Ergebnisse	23
3.1. Befunderhebung über mit ED1 markierten Makrophagen	23
3.1.1. Lichtmikroskopische Befunde	23
3.1.2. Quantifizierung der mit ED1 markierten Makrophagen	29
3.1.2.1. Gesamtanzahl der ED1-positiven Makrophagen	29
3.1.2.2. Topografische Verteilung der ED1-positiven Makrophagen	29
3.1.2.3. Signifikante Unterschiede	30

3.2. Befunderhebung über mit ED2 markierten Makrophagen	37
3.2.1. Lichtmikroskopische Befunde	37
3.2.2. Quantifizierung der mit ED2 markierten Makrophagen	44
3.2.2.1. Gesamtanzahl der ED2-positiven Makrophagen	44
4. Diskussion	47
4.1. Ursprung der Makrophagen	47
4.2. ED1-positive Makrophagen	50
4.3. ED2-positive Makrophagen	53
4.4. Schlussfolgerungen	54
5. Literatur	56
6. Anhang	63
7. Zusammenfassung	66
8. Danksagung	67
9. Lebenslauf	68

1. Einleitung

1.1. Immunologie des Hodens

Der Hoden gilt neben Auge, Gehirn und Plazenta als immunologisch privilegierte Region des Körpers, in die allogenes Gewebe transplantiert werden kann, ohne dass es zu einer akuten Abstoßungsreaktion kommt.

Die Urkeimzellen (Gonozyten) wandern bereits in der pränatalen Entwicklungsphase in das zukünftige Hodengewebe, während die Differenzierung der Keimzellen erst mit der Pubertät eintritt. Während der Proliferation der Spermatogonien und deren Differenzierung in Spermatozyten und Spermatiden werden keimzellspezifische Antigene erst nach der vollständigen Selbsttoleranzentwicklung exprimiert. Die physiologische Bedeutung einer besonderen testikulären Immunregulation liegt in der Vermeidung einer Aktivierung des Immunsystems durch diese spezifischen Antigene (Mainhardt and Schuppe, 2003; Neill et al., 2006; Nieschlag et al., 2009).

Im Gegensatz zu ubiquitär vorkommenden Selbstantigenen sind die keimzellspezifischen Antigene nicht an der bereits perinatal erfolgenden klonalen Deletion autoreaktiver T-Lymphozyten im Thymus beteiligt und als „nicht-selbst“ einzustufen. Dementsprechend können autologe Keimzellen bzw. deren Antigene außerhalb des Genitaltraktes, z.B. nach Injektion in die Haut, spezifische Immunantworten mit der Folge schwerer Autoimmunreaktionen auslösen, während sie in situ toleriert werden. Auch die Transplantation xenogener Keimzellen in das tubuläre Kompartiment des Hodens führt nicht zu Abstoßungsreaktionen. Aus immunologischer Sicht nimmt der Hoden damit eine Sonderstellung ein, die nicht nur mit dem Vorhandensein der Blut-Hoden-Schranke erklärt werden kann. Andererseits hat der Hoden durchaus die Fähigkeit, auf virale und bakterielle Infektionen effektiv zu reagieren (Mainhardt and Schuppe, 2003; Nieschlag et al., 2009).

Obwohl das interstitielle Gewebe von Rattenhoden als immunprivilegiert betrachtet wird, befinden sich dort eine grosse Anzahl von Leukozyten. Quantitative Studien über die Anzahl der Makrophagen im Hoden, die immunhistochemische Marker verwenden, zeigen, dass die Makrophagen bezüglich ihrer Funktion keine homogene Gruppe darstellen (Neill et al., 2006). Mit Hilfe von immunhistochemischen Methoden können diese interstitiellen Immunzellen dargestellt, charakterisiert und unterteilt werden. Ungefähr 80% dieser Zellen sind ED1- und/ oder ED2-positiv (Wang et al. 1994). ED1

(= CD 68) und ED2 (= CD 163) sind zwei Marker, die charakteristisch für Makrophagen sind. Makrophagen stellen nach Leydig-Zellen den zweithäufigsten Zelltyp im Hodeninterstitium dar. Die Bezeichnungen ED1 und ED2 beziehen sich auf die Namen der Zellklone, die diese Antikörper produzieren.

1.2. Immunhistochemische Marker

1.2.1. Lysosomales Membranprotein CD 68 (auch bezeichnet als ED1)

Der Marker ED1 wird stark auf den Membranen von Lysosomen und schwach auf den Zellmembranen von myeloiden Zellen wie Makrophagen, Monozyten, Dendritischen Zellen und ebenfalls von peripheren Blutgranulozyten exprimiert (Dijkstra et al., 1985). Ein signifikanter Anteil der Makrophagen im Rattenhoden bilden dieses lysosomale Antigen (Neill's et al., 2006). Dieser Marker kennzeichnet hauptsächlich spezifisch „nicht-residente“ (= mobile bzw. eingewanderte) Makrophagen, die entweder vor kurzem eingewandert sind und sich „niederlassen“ werden oder intratestikuläre Monozyten. Diese Zellen kommen zudem in der Früh-Phase (early-onset) einer inflammatorischen Reaktion vor (Gerdprasert et al., 2002; Schmidt et al., 2007). Eine Beteiligung dieses Antigens am lysosomalen Metabolismus sowie eine Zell-Zell-Interaktion und Zell-Pathogen-Reaktion wird diskutiert (Bauer et al, 1994).

1.2.2. Zellmembranprotein CD 163 (auch bezeichnet als ED2)

Der Antikörper ED2 erkennt das Membranantigen CD 163, das für residente (= ortsständigen) Gewebsmakrophagen spezifisch ist (Dijkstra et al., 1985, Barbé et al., 1990; Fabrick et al., 2007). CD 163 gehört zur Gruppe B der cysteinreichen Scavenger-Rezeptor-Proteinfamilie. Diese Proteine kommen vorwiegend auf Zellen des Immunsystems vor. Sie sind an der Entwicklung des Immunsystems und der Regulation der Immunantwort beteiligt.

Der besagte Rezeptor ist an der Stimulation der IL-10-Produktion von Makrophagen nach der Endozytose von Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexe beteiligt (Niell's et al., 2006). Die CD 163-Expression erfolgt unter anderem durch die Reifung von Monozyten

zu Makrophagen. Da CD 163 rasch von der Oberfläche der Makrophagen verschwinden kann, wird eine mögliche Abspaltung (Shedding) dieses Moleküls von der Zelloberfläche diskutiert. Weiterhin wird auf eine antiinflammatorische Wirkung hingewiesen. CD 163-positive Zellen scheinen an der Downregulation eines inflammatorischen Geschehens beteiligt zu sein (Högger et al., 1998; Zwaldo et al., 1987). Jedenfalls erscheinen diese Zellen erst in der späten Phase einer Entzündungsreaktion (Topoll et al., 1989) und sind in der Lage antiinflammatorische Zytokine zu bilden. Proinflammatorische Zytokine wie LPS, IFN- γ und TNF- α unterdrücken die CD 163-Expression (Buechler et al., 2000). Außerdem wird eine Assoziation von CD163-Zellen mit Neoangiogenese-Prozessen vermutet (Rehman et al., 2003; Clear et al., 2010).

1.3. Interaktionen zwischen Makrophagen und Leydig Zellen

Die Regulation von immunologischen Reaktionen innerhalb des Hodens geschieht auf eine Art und Weise, die einerseits Schutz für die heranwachsenden Keimzellen bietet, und andererseits eine normale immunologische Antwort sowie einen Schutz gegen Infektionen zulässt (Gerdprasert et al., 2002; Hedger, 2002; Wei et al., 1988).

Die große Population von Makrophagen im Hoden nimmt einen besonderen Stellenwert in der Aufrechterhaltung dieses speziellen immunologischen Milieus ein (Hedger, 2002). Mehrere Studien zeigen, dass die Hodenmakrophagen ihre zytotoxische und phagozytotische Fähigkeit beibehalten haben, aber eine eindeutig verminderte proinflammatorische Funktion haben, und sogar eine antiinflammatorische Aktivität aufweisen (Kern et al., 1995; Miller et al., 1983; Wang et al., 1994).

Zudem scheinen die Entwicklungen von Leydig-Zellen und Hodenmakrophagen voneinander abhängig zu sein. Die Anzahl der Makrophagen im unreifen Rattenhoden ist relativ gering. Jedoch zeigt sich eine bemerkenswerte Vermehrung dieser Zellen mit zunehmendem Alter, insbesondere um die Zeit der Pubertät und Adulenz, wenn die adulten Leydig-Zellen selber entstehen, heranwachsen und reifen, parallel zum Vorgang der Spermatogenese (Ariyaratne and Mendis-Handagama, 2000; Raburn et al., 1993).

Es existieren eindeutige Hinweise, dass die Makrophagen die Leydig-Zell-Funktion und Entwicklung beeinflussen (Cohen et al., 1996; Gaytan et al., 1995; Lukyanenko et al., 2001). Umgekehrt scheint die Makrophageneinwanderung und Anzahl von der Wirkung

des Luteinisierendes Hormons (LH) und speziell von den Leydig-Zellen abhängig zu sein (Lukyanenko et al., 2002; Niell's et al., 2006).

Die Makrophagen produzieren als Immunzellen eine Reihe von Substanzen und Cytokinen, die im Hodeninterstitium nicht nur eine immunregulatorische, sondern auch eine parakrine Wirkung auf die benachbarten Zellen, und hauptsächlich auf die Leydig-Zellen, ausüben(s. Abbildung 1); (Chen et al., 2002) .

Allerdings, wie in anderen peripheren Geweben, bilden auch die „Nicht-Immun“-Zellen im Hoden, wie z.B. die Sertolli-Zellen, eine Vielzahl von Stoffen (s. Tabelle 1), die wiederum immunmodulatorische Eigenschaften haben (Hedger, 2002; Meinhardt et al., 1998; Niell's et al., 2006).

Zusätzlich existieren auch strukturelle bzw. ultrastrukturelle Kontaktmechanismen zwischen benachbarten Zellen im Hodeninterstitium (Hutson, 1991; Tran et al, 2006). Solche morphologischen Korrelate sind auch zwischen den Hodenmakrophagen und Leydig-Zellen eindeutig beschrieben worden. Dabei bilden sich diese Brücken oder zytoplasmatische Digitationen im Altersverlauf häufiger.

Tabelle 1

Teilüberblick über die immunregulatorischen Faktoren im Hoden (Quellen: Philippidis et al., 2004; Buechler et al. 2000; Fujisawa, 2006; Filippini et al., 2001; Brzoska et al., 2008)

Faktor	Quelle	Hauptfunktionen
TGF- β	Sertoli-Zellen, peritubuläre Zelle, residente Makrophagen	anti-inflammatorisch
IL-1 α	Sertoli-Zellen Spermatogonien	Stimulation der NO- und PG-Synthese
α - MSH	Leydig-Zellen Makrophagen	Stimulation der IL-10- Produktion, Hemmt IL- 2-Antworten
M-CSF	unbekannt	Stimulation der Makrophagen- Entwicklung
IL-6	Sertoli-Zellen Leydig Zellen	Regulation der Entwicklung der Dendritischen Zellen und Makrophagen
IL-10	Residente Makrophagen	Th-2-Zytokin anti-inflammatorisch immunsuppressiv
PGE2	Residente Makrophagen, Leydig Zellen	Modulation der inflammatorischen Funktionen der Makrophagen

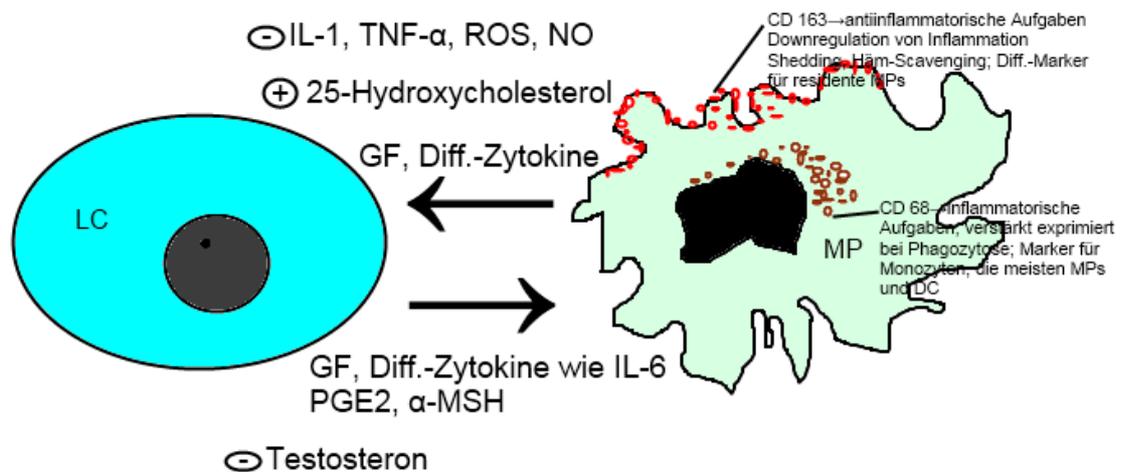


Abbildung 1

Eine schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Leydig-Zellen (LC, in blau) und Makrophagen (MP, hellgrün). Dabei ist auch die bevorzugte Antigen-Lokalisation von CD 68 (ED1, braun) intrazellulär und von CD 163 (ED2, rot) zellmembranständig, mit einigen Funktionen dieser Moleküle. Abkürzungen: GF = Growth Faktor; IL = Interleukin; α-MSH = Melanozyten-stimulierendes Hormon α; NO = Stickstoffmonoxid; Diff.-Zytokine = Differenzierungszytokine; PGE2 = Prostaglandin 2; ROS = Reactive Oxygen Species; TNF-α = Tumor Nekrose Faktor α. (Quellen: Haider, 2004; Chen et al., 2002; Buechler et al., 2000; Philippidis et al., 2004; Damoiseaux et al., 1994; Hales, 2002; Hutson, 2006; Brzoska et al., 2008)

1.4. Fragestellungen der Arbeit

Die vorliegende immunhistochemische Studie geht folgenden drei Fragen nach:

1. Wie ist der Verlauf der Entstehung der Makrophagen im Hoden von Wistarraten von der Geburt bis zum Senium? Hierzu sollen die testikulären Makrophagen mit ED1 bzw. ED2 markiert werden und anschließend im Paraffinschnitt gezählt werden.
2. Wo ist die bevorzugte Lokalisation der Makrophagen im Hodeninterstitium? Treten Veränderungen in der Topik mit dem zunehmendem Alter auf?
3. Wie ist die Kinetik der ED1-positiven („nicht-residenten“) und bzw. der ED2-positiven („residenten“) Makrophagen im Hoden während der Entwicklung?

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Die Aufzucht der männlichen Wistarratten erfolgte unter standardisierten Bedingungen in einem speziell angepassten, pathogenfreien Raum bei einer Temperatur zwischen 21 und 23 °C, 53 bis 57 % relativer Luftfeuchtigkeit und Licht von 7.00 Uhr bis 19.00 Uhr im Zentralen Tierlabor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Wasser (entkeimtes Sauerwasser) und Futter (Rattenfutter von Firma Altromin, Lage) standen unbegrenzt zur Verfügung. Die Untersuchungen erfolgten an 9 Altersgruppen von Tieren, um Veränderungen von Makrophagendichte und deren Verteilung während der Entwicklung zu untersuchen.

Tabelle 2

Alter und Anzahl der Wisterratten

Alter (Postnataltag = pnd)	Anzahl der Tiere
1	5
5	5
10	5
15	5
20	5
30	5
50	5
100	5
2 Jahre	2

Die Tiere wurden morgens zwischen 10 und 11 Uhr mit Äther betäubt, getötet und anschliessend wurden die Gonaden herauspräpariert.

2.2. Gewebefixierung und Herstellung der Schnitte

Zwei verschiedene Fixierungslösungen wurden angewendet. Der linke Hoden wurde mit Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd (PLP), der rechte mit Bouin-Lösung fixiert.

2.2.1. Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd (PLP)

PLP wurde erstmals von McLean & Nakane (1974) beschrieben und wird deshalb als nützlich beurteilt, da Perjodat Zucker zu Aldehyden oxidiert und diese wiederum mit Lysin quervernetzt werden. Der Paraformaldehyd stabilisiert die Proteine (Boenisch, 2003).

3% Paraformaldehyd	50 ml
0,1 M di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	100 ml
Lysin	0,9 g
Natriumperjodat	0,15 g
pH-Wert auf 7,4 einstellen	

Fixiert wurde für 24 Stunden bei 25°C. Anschließend wurde eine Spülung und eine Entwässerung über die aufsteigende Propanolreihe, Methylbenzoat, Toluol und Paraffin durchgeführt. Danach fand die Einbettung in Paraffin statt. Die Präparate wurden mittels eines Mikrotoms (Leica) mit einer Schnittdicke von 6 µm quer geschnitten, aufgezogen und nummeriert (30 Serienschritte pro Hoden).

Für eine immunhistochemische Reaktion von ED2 (= CD 163) an Paraffinschnitten wurde eine PLP-Fixierung empfohlen (Firma Serotec, s. Anhang). Zudem haben die ED2-Vorversuche an Paraffinschnitten, die mit Bouin-Lösung fixiert wurden, keine Reaktivität gezeigt. Dabei ist zu vermerken, dass die Erhaltung des Gewebes und der Zellmorphologie nach einer PLP-Fixierung nicht so gut ist, wie mit anderen Fixativen, wie z.B. Bouin-Lösung.

2.2.2. Bouin-Lösung

Fixierung für die immunhistochemische Reaktion von ED1

Gesättigte (1,2%ige) wässrige Pikrinlösung	75 ml
Formalin (ca. 37%ige wässrige Formaldehyd-Lösung)	25 ml
Eisessig	5 ml

Der Fixierungsvorgang verlief wie oben beschrieben (PLP). Von den in Bouin-Lösung fixierten Hoden wurden auch jeweils 30 Serienschnitte (Querschnitte) pro Hoden angefertigt.

2.3. Immunhistochemie und Färbungen

2.3.1. Immunhistochemische Darstellung von ED1-positiven Makrophagen

Die Immunhistochemische Darstellung der ED1-positiven Makrophagen wurde an den in Bouin-Lösung fixierten Hoden durchgeführt. Es wurden folgende Paraffinschnitte wie folgt behandelt:

- Jeder 1., 11., 21.Schnitt => nur Immunhistochemische Färbung;
- Jeder 2., 12., 15. und 22.Schnitt => Immunhistochemische Färbung + Hämalaun;
- Jeder 3.Schnitt => NEGATIVKONTROLLE (s. unten).

Reaktionsmethode

- Entparaffinierung der Schnitte über absteigende Propanolreihe
- Mit Aqua dest. Spülen
- Schnitte in feuchter Kammer inkubieren

Immunreaktion

- Vorbehandlung mit Proteolytischen Enzymen ¹ 5 Min
- Abspülen mit TBS ², Spülen mit TBS 5 Min
- 3% H₂O₂ (zur Blockierung der endogenen Peroxidase) 20 Min
- Primär-AK ED1 (CD68) ³ bei +4°C 16 Stunden
- NEGATIVKONTROLLE:
TBS (statt ED1-Primär-AK) bei +4°C 16 Stunden
- Abspülen mit TBS, Spülen mit TBS 5 Min
- EnVision ⁵ Anti-Mouse bei Raumtemperatur(23°C) 30 Min
- Abspülen mit TBS, Spülen mit TBS 5 Min
- DAB-Lösung ⁶ bei Raumtemperatur(23°C) 10 Min
- Abspülen mit Aqua dest., Spülen mit Aqua dest. 2 Min
- (Falls erwünscht, kurze Kernfärbung mit Hämalaun 1 Min)
- (Bläuen unter fließendem Leitungswasser 3 Min)
- Entwässern in aufsteigender Propanolreihe jeweils 2 Min
- Xylol, Eindecken mit DePeX .

2.3.2. Immunhistochemische Darstellung von ED2-positiven Makrophagen

Die immunhistochemische Darstellung der ED2-positiven Makrophagen wurde an den in PLP-Lösung fixierten Hoden durchgeführt. Die Paraffinschnitte wurden wie folgt behandelt:

- Jeder 1., 11., 21.Schnitt => nur immunhistochemische Färbung;
- Jeder 2., 12., 15. und 22.Schnitt => immunhistochemische Färbung + Hämalaun;
- Jeder 3.Schnitt => NEGATIVKONTROLLE (s. unten).

Reaktionsmethode

- Entparaffinierung der Schnitte über absteigende Propanolreihe
- Mit Aqua dest. spülen

Immunreaktion

- Mikrowellenvorbehandlung bei 800 Watt mit Zitronensäure-Zitrat-Puffer⁸ 5 + 5 Min
- Im Wasserbad abkühlen lassen 20 Min
- Abspülen mit TBS, Spülen mit TBS 5 Min
- 3% H₂O₂ (zum Blockieren der endogenen Peroxidase) 20 Min
- Primär-AK ED2 (CD163)⁴ bei +4°C 16 Stunden
- NEGATIVKONTROLLE:
TBS (statt ED1-Primär-AK) bei +4°C 16 Stunden
- Abspülen mit TBS, Spülen mit TBS 5 Min
- EnVision⁵ Anti-Mouse bei Raumtemperatur(23°C) 30 Min
- Abspülen mit TBS, Spülen mit TBS 5 Min

- DAB-Lösung⁶ bei Raumtemperatur(23°C) 10 Min
- Abspülen mit Aqua dest., Spülen mit Aqua dest. 2 Min
- (Falls erwünscht, kurze Kernfärbung mit Hämalaun 1 Min)
- (Bläuen unter fließendem Leitungswasser 3 Min)
- Entwässern in Aufsteigender Propanolreihe jeweils 2 Min
- Xylol, Eindecken mit DePeX⁷

⇒ Reaktionsprodukt: braun; Kerne blau;

3% H₂O₂: 1 Tablette Perhydrit in 10 ml Aqua dest. Lösen; (Perhydrit[®] tablets 1g, Hydrogen peroxide –Urea, Merck 1.07201.0100);

¹ = Proteolytische Enzyme: Proteolytic Enzyme, Ready-to-Use, Dako Cytomation, (Code No.: S3007);

² = TBS (Tris buffered saline), 0,05 M Trispuffer mit Kochsalz:

- 6,1 g Tris (Trishydroxymethylaminomethan, Merck 1.08382.0500) und 9 g NaCl in 800 ml Aqua dest. lösen
- 37 ml 1N HCl hinzufügen, mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
- pH-Wert auf 7,4 einstellen

³ = ED1-Antikörper: Mouse anti rat CD68 (MCA341R, Serotec Product Data Sheet), Purified IgG-liquid, 0,25 mg, Verdünnung: 1:500 mit TBS verdünnen;

⁴ = ED2-Antikörper: Mouse anti rat CD163 (MCA342R, Serotec Product Data Sheet), Purified IgG-liquid, 0,25 mg, Verdünnung: 1:50 und 1:100 mit TBS verdünnen;

⁵ = EnVision: Dako Cytomation EnVision+ System-HRP, Labelled Polymer Anti-mouse (Code K4000), vorverdünnt;

⁶ = DAB-Lösung:

- 1 Tablette DAB (Dako, Code No.: S3000) in 10 ml TBS lösen;
- In 5 Portionen à 2 ml aufteilen. Nicht benötigte Lösung wird für begrenzte Zeit bei - 25°C aufbewahrt. Bei Braunfärbung verwerfen!
- Unmittelbar vor Gebrauch zu 2 ml DAB-Lösung 15 µl 3% H₂O₂ hinzufügen;

⁷ = DePeX = Eindeckungsmittel (SERVA Electrophoresis GmbH, Ct. No.: 18243);

⁸ = Zitronensäure-Zitrat-Puffer: Mikrowellen-Puffer

- 1,0505 g Zitronensäure Monohydrat in 500 ml Aqua dest. lösen
- 2,941 g Natriumzitat x 2 H₂O in 1000 ml Aqua dest. lösen
- 380 ml Zitronensäure-Lösung + 1660 ml Natriumzitat-Lösung = 2040 ml Puffer
- pH-Wert auf 6,0 einstellen.

2.4. Lichtmikroskopische Auswertung

Jeder 2., 12., 15. und 22. Schnitt (= ED1 bzw. ED2-Reaktion + Hämalaun) wurde quantitativ lichtmikroskopisch (Leitz) bei 25. Objektiv (d.h. mit 25 x Vergrößerung) ausgewertet. Zur Quantifizierung wurde ein Mess-Strichgitter der Firma Leitz Köln verwendet. Dieses Messgitter besteht aus 25 gleich grossen Quadraten (Abb.3 a.) in einem Feld von 100 mm² (Quadratmillimeter), so dass ein Quadrat in dem Gitter ein Feld von 4 mm² repräsentiert. Bei dem Zählvorgang wurden alle Zellen, die sich innerhalb der Gitter befanden und die Zellen, die die rechte und obere Kante der Messgitter durchschnitten, gezählt (Gundersen, 1977). Die Zellen, die die untere und die linke Kante des Messgitters durchschnitten, wurden nicht mitgezählt (Gundersen, 1977). Aufgrund der unterschiedlichen Gewebserhaltung wurden 2 unterschiedliche Auswertungsmethoden bei den in Bouin (ED1) und bzw. in PLP (ED2) fixierten Hoden durchgeführt.

2.4.1. Quantitative Auswertung der ED1-positiven Makrophagen

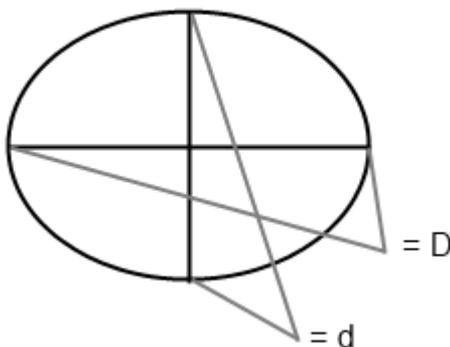
Die Erhaltung der Gewebe und der Zellen erwies sich bei der Bouin-Fixierung als gut. Dadurch war eine genaue semiquantitative Erfassung der ED1-positiven Makrophagen und deren Verteilung im Hodeninterstitium möglich. Es wurde die relative topographische Lokalisation der ED1-positiven Makrophagen in Verhältnis zu den anderen Hodenstrukturen betrachtet und wie folgt erfasst:

1. perivaskuläre Makrophagen,
2. peritubuläre Makrophagen,
3. Makrophagen in der Nähe von FLC und
4. Makrophagen in der Nähe von ALC.

Die Schnitte von Tieren mit Alter 1. und 5.pnd (pnd = postnatal day) wurden komplett ausgewertet. Es wurden alle reaktionspositiven Zellen in einem Schnitt gezählt. Dabei wurde jeder Schnitt als Ellipse betrachtet und die beiden Durchmesser gemessen. Mit Hilfe der beiden Durchmesser jedes einzelnen Schnittes wurde mit der folgenden Formel die Fläche des entsprechenden Schnittes berechnet:

Abbildung 2

Mathematische Formel für die Fläche von Ellipse:



$$A = \pi \cdot D \cdot d/4$$

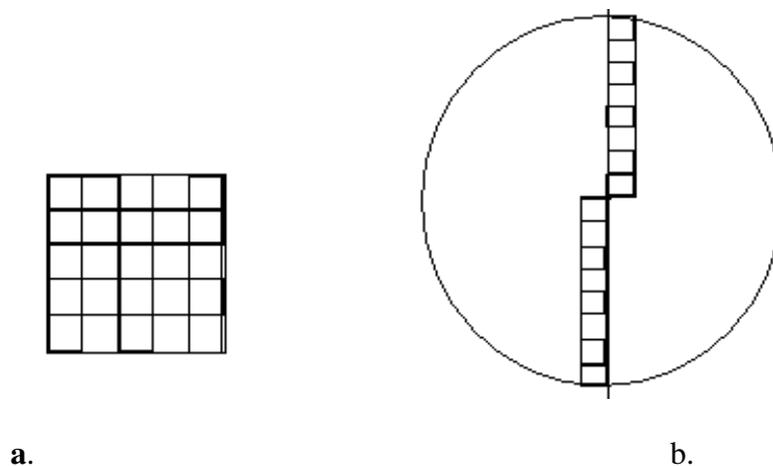
D = grosser Durchmesser; d = kleiner Durchmesser; $\pi = 3.14$.

Die Dichte der Makrophagen (MP) pro Quadratmillimeter ergab sich aus der folgenden Berechnung:

$$MP \text{ pro } mm^2 = \text{Gesamtanzahl MP pro Schnitt} / \text{Fläche des Schnittes in } mm^2$$

Die Zellen in den Schnitten von Tieren mit dem Alter von 10., 15., 20., 30., 50., 100.pnd (postnatal day) und 2 Jahren wurden nach der Zählmethode ausgewertet, wie in Abbildung 3 **b.**, **c.** dargestellt.

Abbildung 3



Alter in pnd	Gesamtanzahl Messgitter/Schnitt
10	6
15	10
20	10
30	16
50	20
100	24
2 Jahre	24

c.

Abbildung 3: Zählmethode, die bei der Auswertung der ED1-positiven Makrophagen angewendet wurde. **a.** Messgitter. **b.** Zählmethode. Es wurde der Durchmesser auf den Schnitt aufgezeichnet. Entlang der beiden Seiten des Durchmessers wurde gegenläufig die Zählgitter transliert, angefangen bei der Tunica albuginea bis zur ungefähren Mitte des Durchmessers. Dabei wurden auf beiden Seite des Diameters immer dieselbe Anzahl von Messgittern ausgewertet (z.B. bei jedem Schnitt der Altersgruppe 15.pnd => 5 unten + 5 oben = 10 pro Schnitt). **c.** Gesamtanzahl von Messgittern pro Schnitt für die verschiedenen Altersgruppen.

2.4.2. Quantitative Auswertung der ED2-positiven Makrophagen

Die Gewebserhaltung der mit PLP fixierten Hoden war schlechter als die mit Bouin. Es zeigten sich grössere artifizielle Spalträume im Hodeninterstitium. Aufgrund dieser Artefakte wurde keine topographische Auswertung der Makrophagenlokalisierung im Interstitium durchgeführt. Für die Quantifizierung der ED-2 positiven Makrophagen wurden die ganzen Schnitte ausgewertet und die Dichte der positiven Zellen pro mm² nach der oben beschriebenen Methode berechnet.

2.5. Statistische Methoden

Die Dichte der Zellen je Altersgruppe wurde pro mm² Fläche umgerechnet und die Messdaten wurden graphisch dargestellt. Zum Vergleich von Messdaten wurde der statistische Student's T-Test angewandt. Eine Fehlerwahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p < 0,05$) wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Befunderhebung: ED1 markierte Makrophagen

3.1.1. Lichtmikroskopische Befunde

Makrophagen konnten in allen untersuchten Altersgruppen mit Hilfe der ED1-Antikörper dargestellt werden. Die körnerartige Immunreaktion ist in diesen Zellen im Zytoplasma verteilt, wobei der Zellkern frei von der Immunreaktion geblieben ist (Abb. 1, 5, 7). ED1-positive Zellen wurden im Bereich des interstitiellen Kompartiments und der Tunica albuginea gefunden. Sie wurden niemals innerhalb der Tubuli seminiferi beobachtet. Makrophagen finden sich peritubulär (Abb. 7), zwischen den Leydig-Zellen (Abb. 4, 9), die selber für diesen Marker nicht positiv sind und in größerer Anzahl in der Umgebung der Blutgefäße (Abb. 6, 9, 12, 13). Da „ED1“ ein Marker für „Monocyte-like“- Makrophagen ist, zeigten sich ED1- positive Zellen gelegentlich auch innerhalb der Gefäße (Abb. 9, 13). Weil sich diese Zellen in der Blutbahn, also nicht direkt innerhalb des Hodengewebes befanden, wurden sie bei den quantitativen Auswertungen nicht berücksichtigt.

Die Form der untersuchten Zellen ist meist rundlich bis oval (Abb. 8, 13). Diese Zellen haben oft entlang der Gefäße, aber auch zwischen eng aneinander liegenden Hodenkanälchen eine verlängerte, spindelförmige Gestalt (Abb. 9, 10, 11, 12). Gelegentlich sind sie mantelförmig um die kleinen Kapillaren lokalisiert (Abb. 11). Häufig zeigten die ED1-Makrophagen lange zytoplasmatische Ausläufer (Abb. 9, 11). Gelegentlich waren ED1-positive Zellen in der Phase der Mitose anzutreffen (Abb. 5).

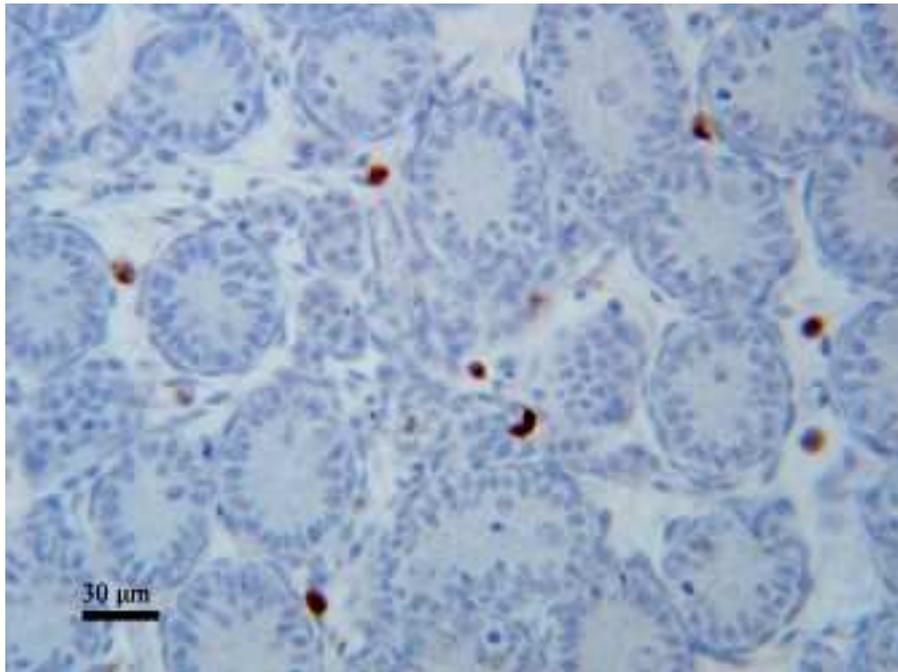


Abb. 4

Hoden, Ratte, 5. pnd, ED1-Makrophagen.

Immunohistochemische Reaktion (IHC) + Hämalaun- Färbung.

Querschnitt durch mehrere Tubuli seminiferi. Die Makrophagen (MP, braun dargestellt) sind im Interstitium deutlich zu erkennen. Zentral im Bild: MP in der Nähe eines Fetal Leydig-Zell (FLC)-Clusters.

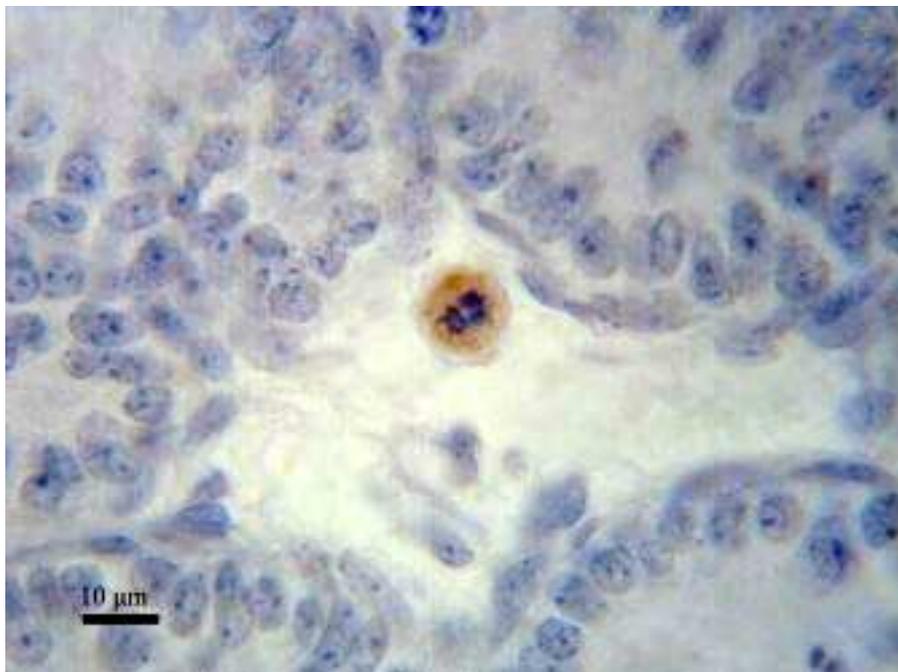


Abb. 5

Hoden, Ratte, 5. pnd, ED1-Makrophagen. IHC + Hämalaun- Färbung.

Der Makrophage (MP), hier peritubulär gelegen, weist eine mitotische Teilung (Anaphase) auf.

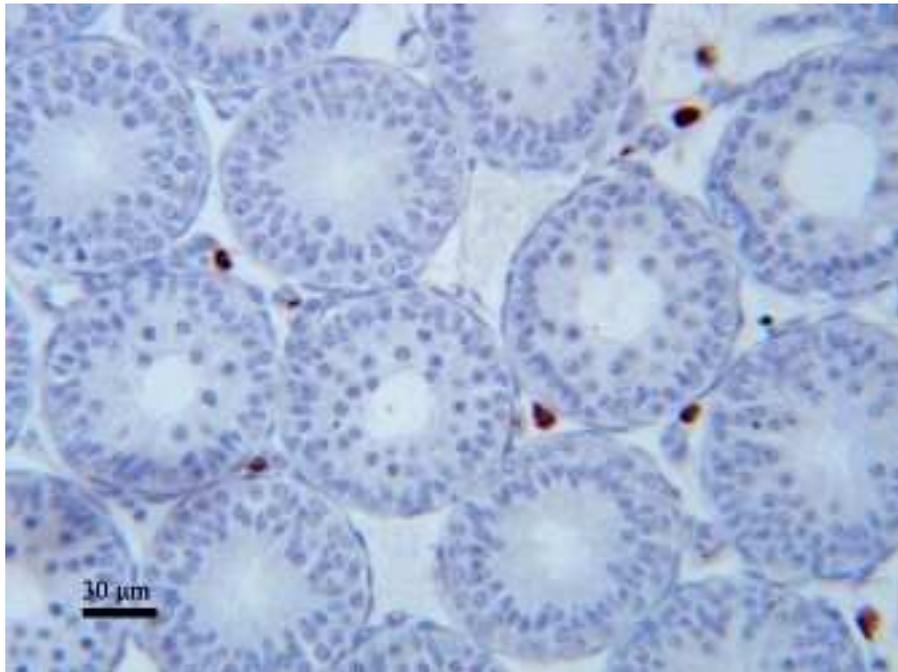


Abb. 6

Hoden, Ratte, 15. pnd, ED1-Makrophagen. IHC + Hämalaun- Färbung. Querschnitt durch mehrere Hodenkanälchen. Grobe Übersicht der verschiedenen Verteilung der MPs in dieser Altersgruppe (am meisten perivaskulär).

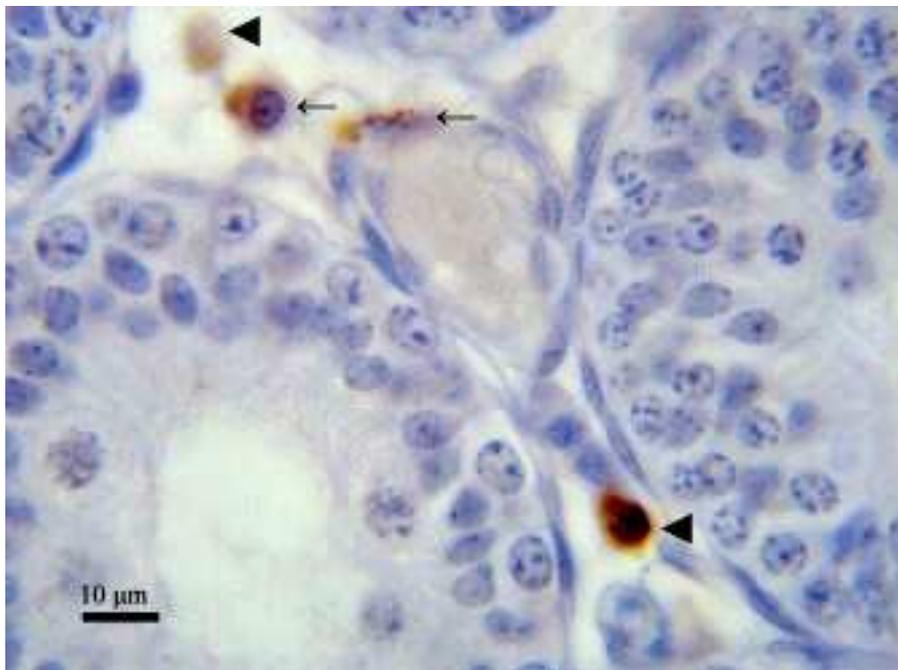


Abb. 7

Hoden, Ratte, 15. pnd, ED1-Makrophagen. IHC + Hämalaun- Färbung. Zentral im Bild: größeres Gefäß und ein direkt an der Gefäßwand liegender MP. Zu sehen sind noch weitere perivaskuläre (kleine Pfeile) und peritubuläre (Pfeilspitze) MPs.



Abb. 8

Hoden, Ratte, 30. pnd, ED1-Makrophagen. IHC + Hämalaun- Färbung.
Übersichtsbild der MPs-Verteilung.

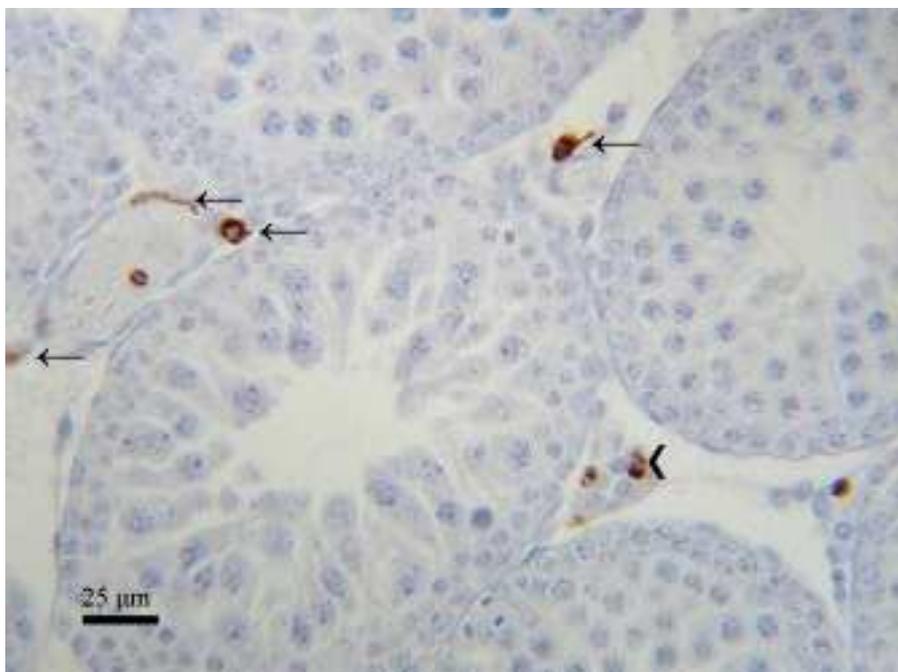


Abb. 9

Hoden, Ratte, 30. pnd, ED1-Makrophagen. IHC + Hämalaun- Färbung.
MPs in der Nähe von Adulten Leydig-Zellen (ALCs) (Pfeilspitze) und perivaskuläre MPs (kleiner Pfeil). Ausserdem 2 intravasal lokalisierte ED1-positive Zellen (eine links oben und eine rechts unten)

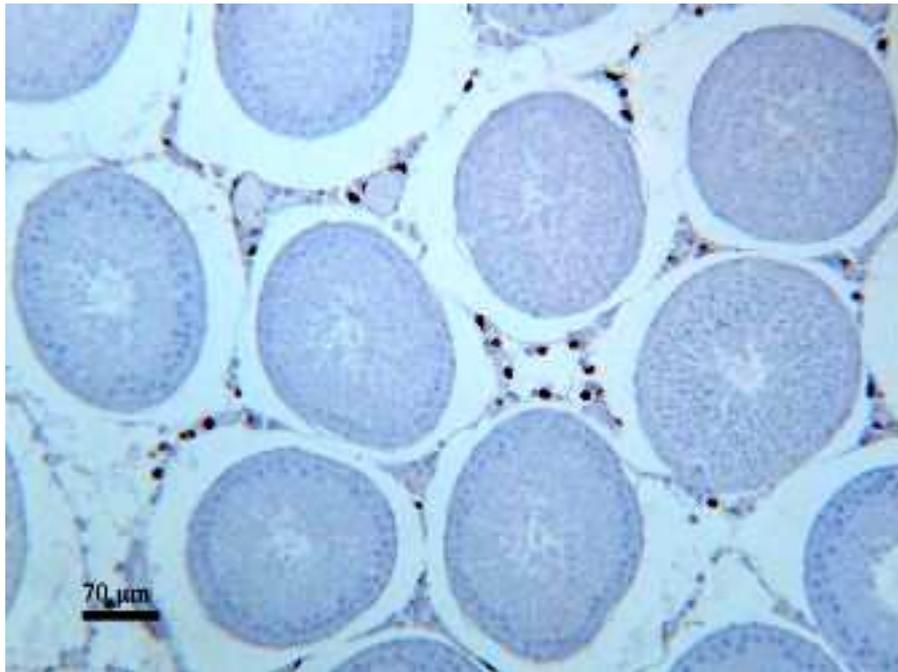


Abb. 10

Hoden, Ratte, 50. pnd, ED1-Makrophagen. IHC + Hämalaun- Färbung. Querschnitt durch mehrere Hodenkanälchen. Zu beachten ist die deutliche Vermehrung positiver Zellen im Interstitium im Vergleich zu den jüngeren Tieren.



Abb. 11

Hoden, Ratte, 50. pnd, ED1-Makrophagen. IHC + Hämalaun- Färbung. Zentral im Bild: eine kleine Kapillare, die beinahe komplett von den zytoplasmatischen Ausläufern einer MP umgeben ist.

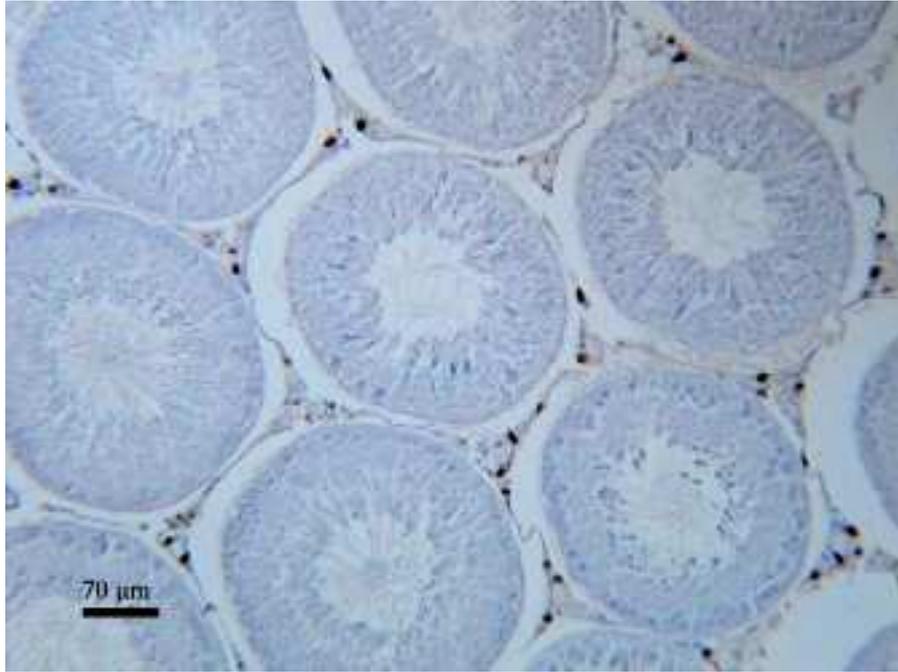


Abb. 12

Hoden, Ratte, 100. pnd, ED1-Makrophagen. IHC + Hämalaun- Färbung.
Übersichtsbild: Deutliche Vermehrung der ED1-Makrophagen.

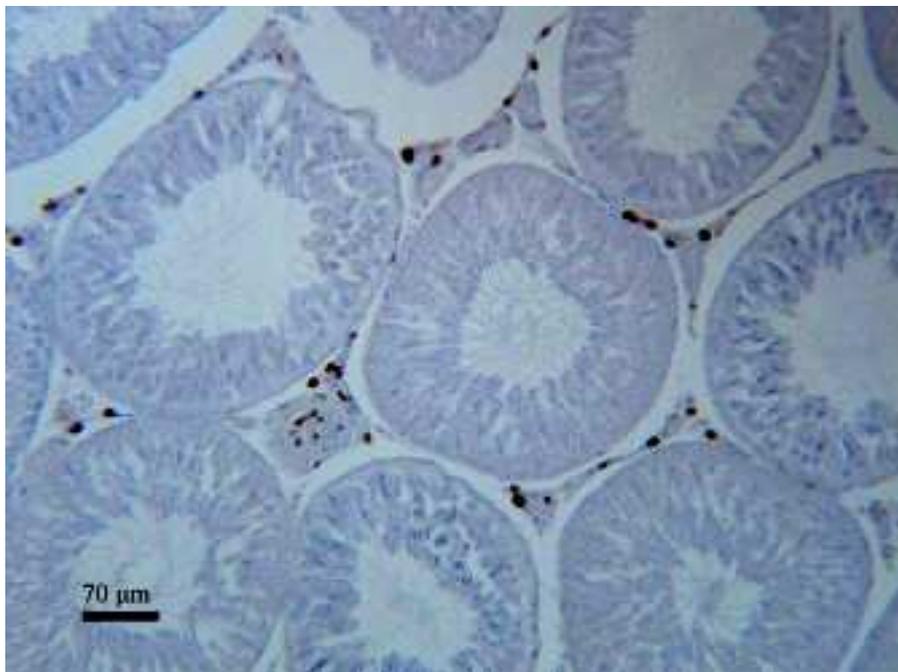


Abb. 13

Hoden, Ratte, 2. Jahre, ED1-Makrophagen. IHC + Hämalaun- Färbung.
Hier sind mehrere MPs im interstitiellen Gewebe lokalisiert.

3.1.2. Quantifizierung der mit ED1 markierten Makrophagen

3.1.2.1. Gesamtanzahl der ED1-positiven Makrophagen

Die Veränderungen der Gesamtanzahl von ED1-positiven Makrophagen pro Fläche im Verlauf des Alters sind in der Abb. 14 dargestellt. Die Anzahl dieser Zellen steigt bedeutend vom 1. pnd bis zu einem Maximum am 5. pnd (Abb. 14, Tabelle 3). Nach diesem ersten Anstieg kommt es zu einem Abfall, wobei die Anzahl der ED1-positiven Makrophagen am 15. pnd ihr Minimum erreicht. Vom 20. bis zum 30. pnd bleibt die Zellzahl ungefähr gleich und während der Pubertät der Tieren (50. pnd) nimmt sie erneut zu. Der Anstieg der ED1-Makrophagen bei den adulten Tiere (100. pnd) ist im Vergleich zu den 50 Tage alten Tieren nicht signifikant (Tabelle 3). So zeigt sich in diesen Altersgruppen das Maximum der Zellzahl. Im Senium (2. Jahre) kommt es zu einem Rückgang der Zellkonzentration.

3.1.2.2. Topografische Verteilung der ED1-positiven Makrophagen

Die Abb. 15 veranschaulicht die topografische Verteilung der ED1-positiven Makrophagen im Hodeninterstitium. Die Mehrzahl der Makrophagen sind in der Umgebung der Blutgefäße (= perivaskulär) zu finden. Der Kurvenverlauf der perivaskulären ED1-Makrophagen ähnelt dem Kurvenverlauf der Gesamtanzahl von ED1-positiven Zellen (Abbildung 15).

Vom 1. pnd bis zum 5. pnd steigt die Anzahl der perivaskulären Makrophagen und danach fällt sie wieder ab, bis das Minimum am 15. pnd erreicht wird (Abbildungen 15 und 16). Am 20. pnd kommt es zu erneutem Anstieg und folgend am 30. pnd zu einem leichten Abfall der Zellen. Nach dem 30. pnd nimmt die Zellzahl kontinuierlich bis zur Adulenz (100. pnd) zu, danach bis zum Senium (2 Jahre) bleibt die Anzahl der perivaskulären ED1-Makrophagen mehr oder weniger gleich. Eine maximale Zellzahl zeigt sich in den letzten beiden genannten Altersgruppen.

Die peritubulär gelegenen Makrophagen zeigen auch einen Anstieg vom 1. pnd bis zum 5. pnd, wo auch das Maximum dieser Zellen zu sehen ist (Abbildungen 15 und 17). Danach kommt es zu einem langsamen, kontinuierlichen, annähernd linear verlaufenden

Abfall der peritubulären ED1-Makrophagen bis zu ihrem Minimum am 30. pnd. In der Pubertät nimmt die Zellzahl nur leicht zu, bleibt bis zum 100. pnd ungefähr gleich und im 2. Lebensalter nimmt sie wieder ab.

In den Abbildungen 15 und 18 ist der Verlauf der in der Nähe von Leydig-Zellen vom Fetaltyp (FLC) gelegenen ED1-Makrophagen zu sehen. Das Maximum dieser Zellen zeigte sich am 1. pnd. Ab dem 1. pnd an nimmt die Anzahl dieser ED1-Makrophagen kontinuierlich ab. Da ab dem 30. pnd keine FLC-Cluster mehr beobachtet wurden, wurde die Anzahl der ED1-Makrophagen in deren Nähe mit ± 0 angegeben.

Leydig-Zellen vom Adulttyp (ALC) wurden erstmals am 15. pnd beobachtet. Aus diesem Grund wird die Anzahl der ED1-positiven Makrophagen in deren Nähe bis zu diesem Alter mit ± 0 angegeben. Von dem 15. pnd bis zum 50. pnd steigt die Anzahl der ED1-Makrophagen in der Nähe vom ALC bis zum ihrem Maximum (Abbildungen 15 und 19) an. Der Wert erreicht bei der Pubertät ca. das 5-fache des Wertes am 15. pnd. Nach der Pubertät bis zum Senium beobachtet man einen kontinuierlichen Abfall.

3.1.2.3 Signifikante Unterschiede

Die Tabelle 1 gibt die p-Werte, die nach dem Student's T-Test ermittelt worden sind, wieder. Die p-Werte in Tabelle 1 beziehen sich auf die in Abbildung 14 gezeigten Werte.

Wobei zu beachten ist, dass:

$p < 0,001$ = statistisch hoch gesichert;

$p < 0,01$ = statistisch gut gesichert;

$p < 0,05$ = statistisch signifikant;

$p > 0,05$ = nicht signifikant.

Abbildung 14

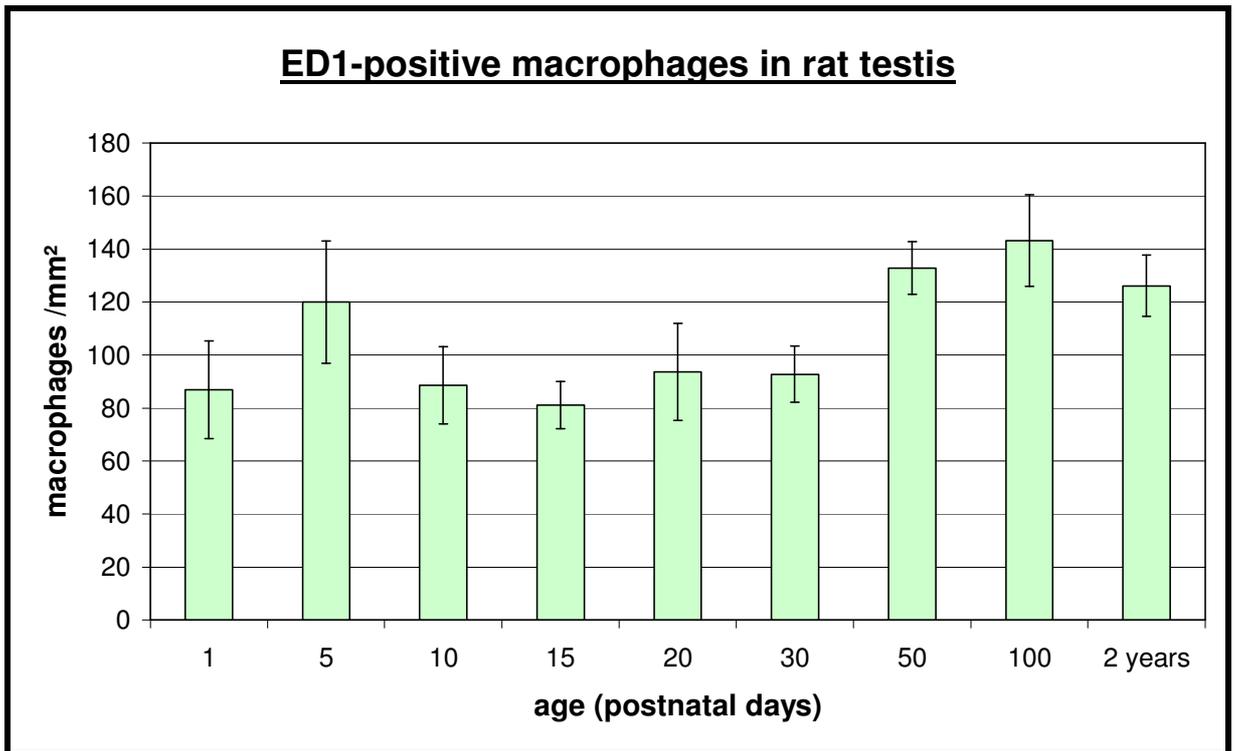


Abbildung (Abb.) 14 zeigt die Gesamtanzahl der ED1-positiven Makrophagen pro Fläche in Quadratmillimetern im Rattenhoden im Alter vom 1. pnd bis zu 2 Lebensjahre.

Tabelle 3

Signifikanz zwischen den Altersgruppen:	Signifikanz* (p)
1.pnd und 5.pnd	$p < 0,001$
5.pnd und 10.pnd	$p < 0,001$
10.pnd und 15.pnd	$0,05 < p < 0,10$
15.pnd und 20.pnd	$0,01 < p < 0,02$
20.pnd und 30.pnd	$p > 0,10$
30.pnd und 50.pnd	$p < 0,001$
50.pnd und 100.pnd	$0,05 < p < 0,10$
100.pnd und 2.Jahre	$p < 0,01$

* Ermittelt durch den Student's T-Test

Abbildung 15

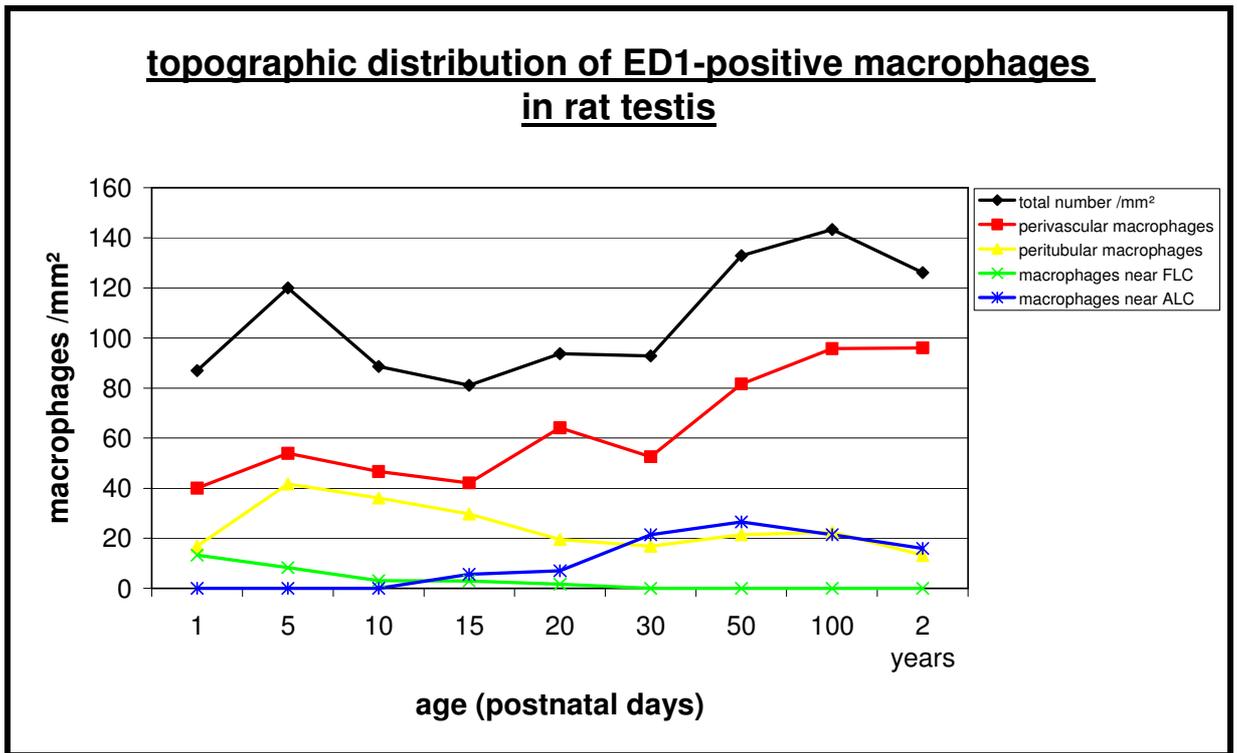


Abb. 15 zeigt die topografische Verteilung der ED1-Makrophagen im Hodeninterstitium.

Abbildung 16

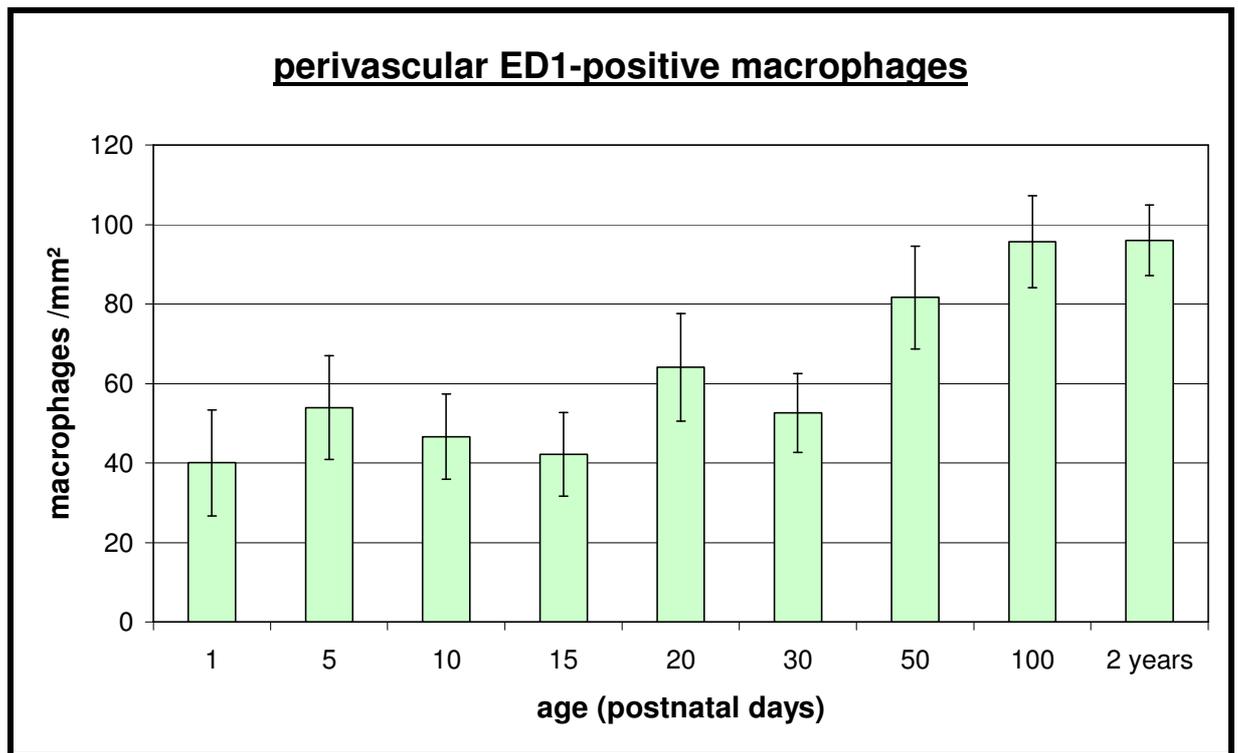


Abb. 16 zeigt die Dichte pro Quadratmillimeter der perivaskulär gelegenen ED1-Makrophagen. Die ED1-positiven Zellen innerhalb der Gefäße wurden nicht mitgezählt.

Abbildung 17

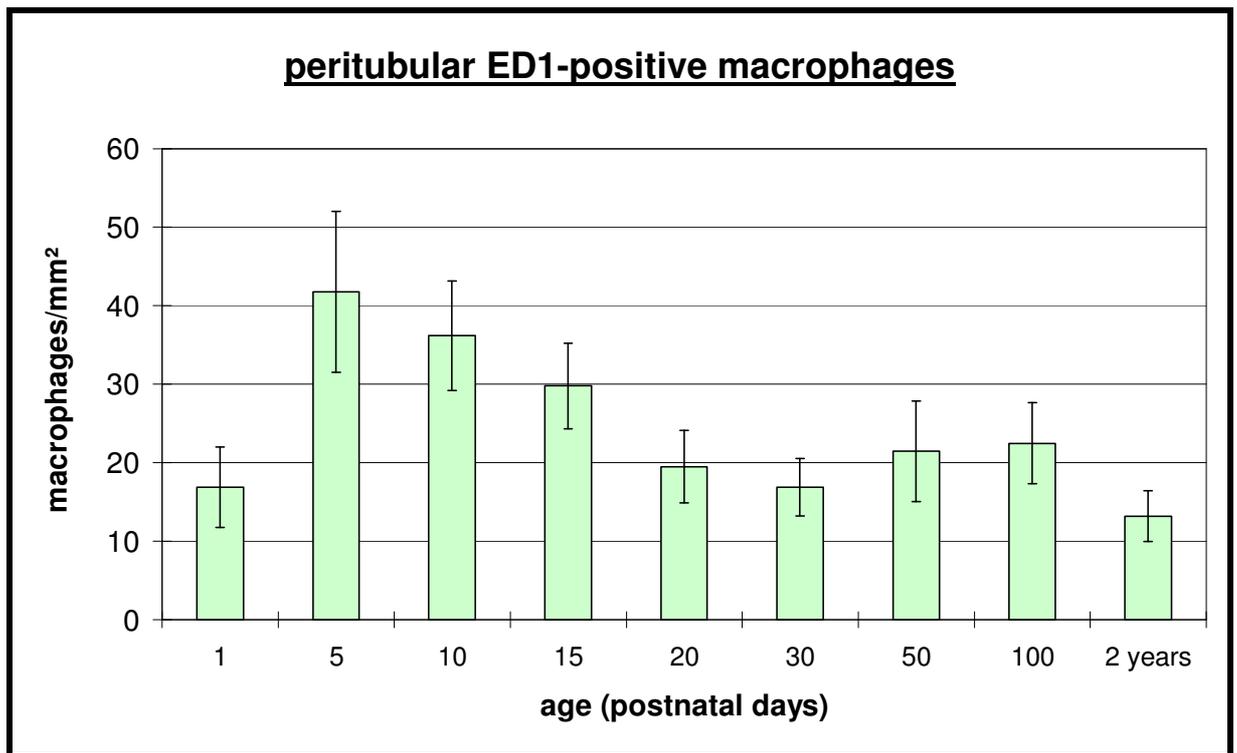


Abb. 17 zeigt die peritubulären ED1-Makrophagen pro Fläche in Quadratmillimeter.

Abbildung 18

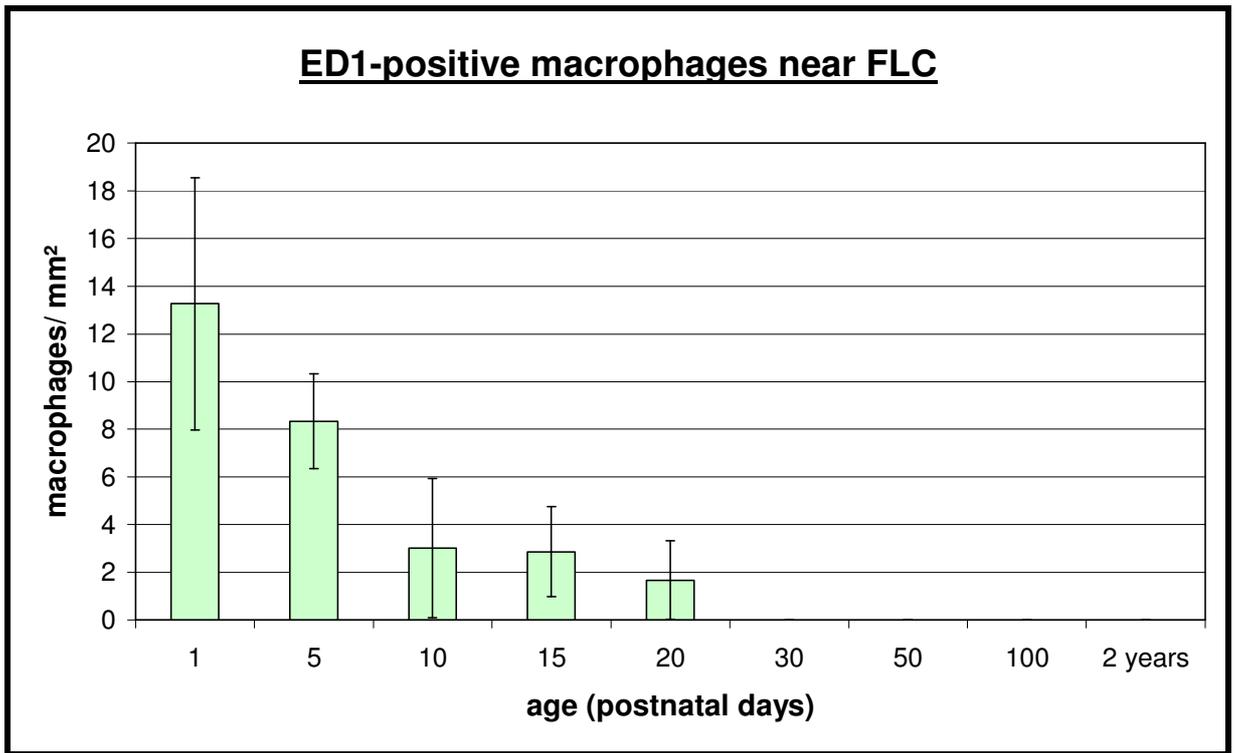


Abb. 18 zeigt die in der Nähe von Leydigzellen vom Fetaltyp (FLC) gelegenen ED1-positiven Makrophagen. Ab dem 30. pnd wurden keine FLC-Cluster mehr beobachtet und aus diesem Grund wurden die Werte für die Makrophagen ab diesem Alter mit ± 0 angegeben.

Abbildung 19

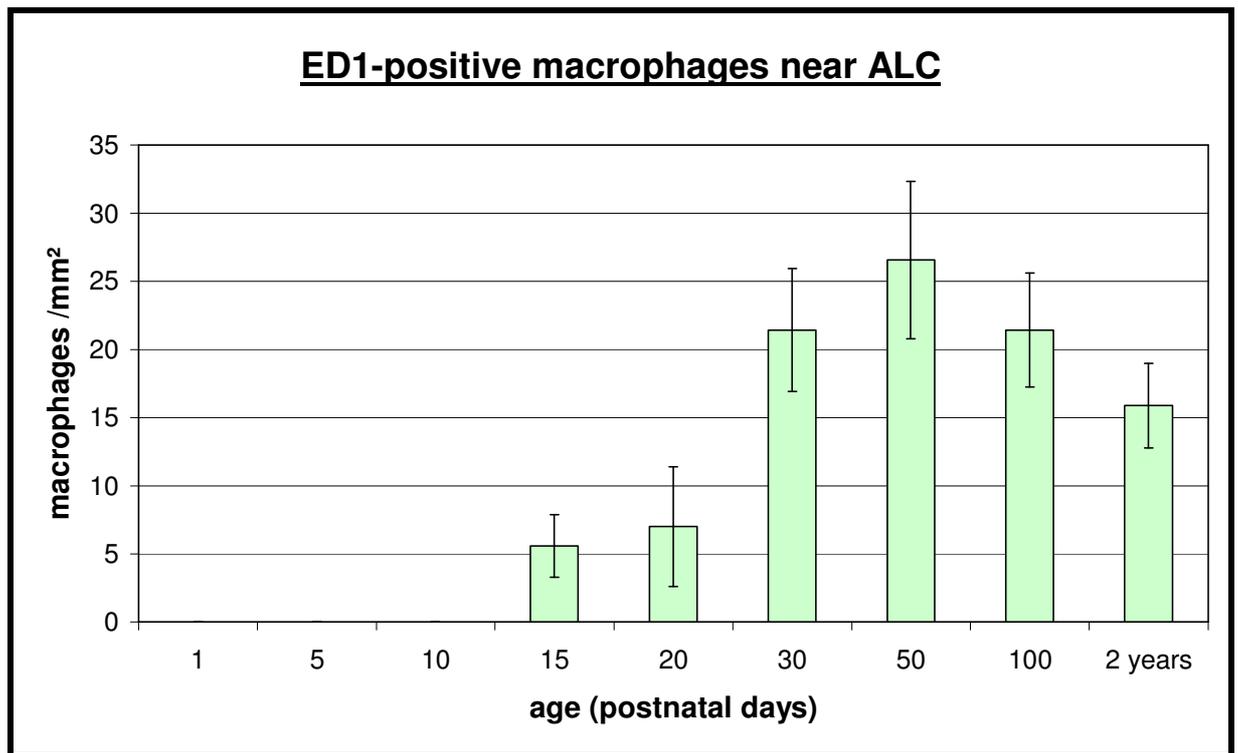


Abb. 19 zeigt die in der Nähe von Leydigzellen vom Adulttyp (ALC) gelegenen ED1-positiven Makrophagen. Vom 1. pnd bis zum 10. pnd wurden keine ALCs beobachtet und aus diesem Grund wurden die Werte für die Makrophagen in diesen Altersgruppen mit ± 0 angegeben.

3.2. Befunderhebung: ED2 markierte Makrophagen

3.2.1. Lichtmikroskopische Befunde

Vom 1. bis zum 10.pnd konnten keine ED2-positiven Makrophagen beobachtet werden. Am 15. pnd konnte die ED2-Immunreaktion in den Makrophagen zum ersten Mal nachgewiesen werden.

Das braune Reaktionsprodukt bei den ED2-Makrophagen zeigt sich als membrangebunden bis diffus verteilt (Abb. 20, 21, 25, 27).

ED2-Makrophagen waren nie innerhalb der Hodenkanälchen anzutreffen. Wie bei ED1, waren auch die ED2-positiven Makrophagen vermehrt entlang der Blutgefäße lokalisiert, d.h. perivaskulär (Abb. 21, 22, 25, 26, 28, 29, 30). Im Gegensatz zu den ED1-Makrophagen wurden ED2-positive Zellen nie innerhalb eines Blutgefäßes beobachtet. Ansonsten waren sie in der Nähe von Leydig-Zellen (Abb. 22, 24), peritubulär (Abb. 21, 25, 27) und innerhalb der Tunica albuginea lokalisiert. Ihre Form war meist rundlich bis oval. Sie wiesen, wenn auch seltener als ED1-Zellen, zytoplasmatische Fortsätze auf (Abb. 25, 30).

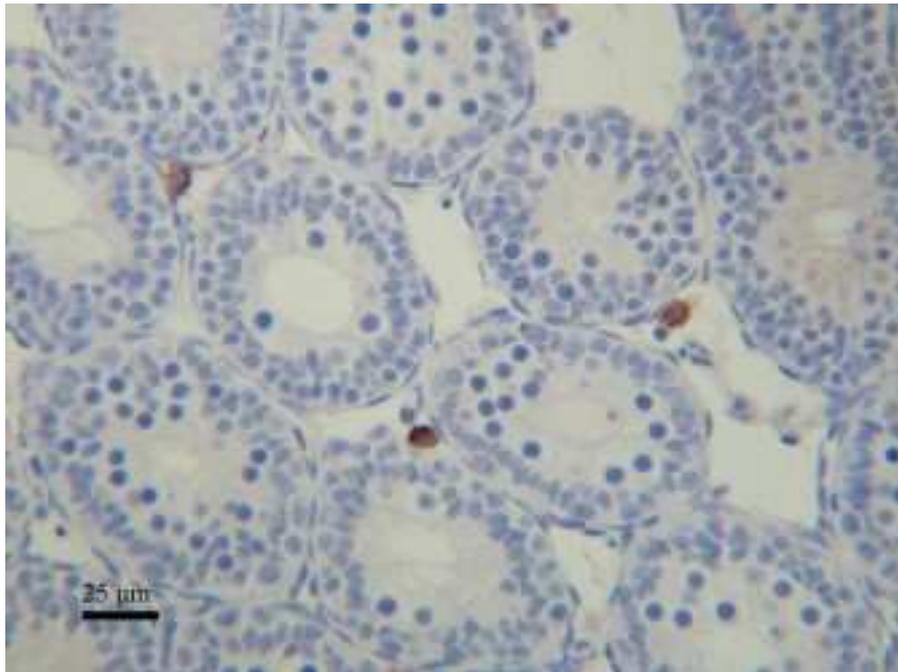


Abb. 20

Hoden, Ratte, 15. pnd, ED2-Makrophagen (braun). IHC + Hämalaun-Färbung.
 Querschnitt durch mehrere Tubulli seminiferi. Hier sind durch die Fixierungsmethode (PLP) die interstitiellen Räume erweitert.

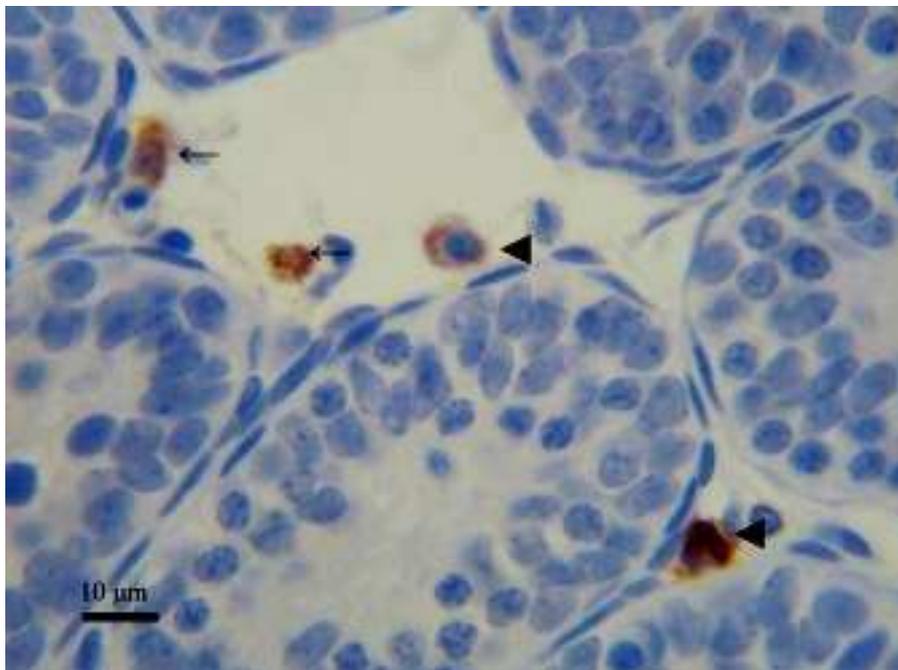


Abb. 21

Hoden, Ratte, 15. pnd, ED2-Makrophagen. IHC + Hämalaun- Färbung.
 Peritubuläre (Pfeilspitzen) und perivaskuläre MPs (kleine Pfeile). Bei dem mittig lokalisierten MP ist eine deutliche membrangebundene bis diffuse Verteilung der Immunreaktion zu erkennen.

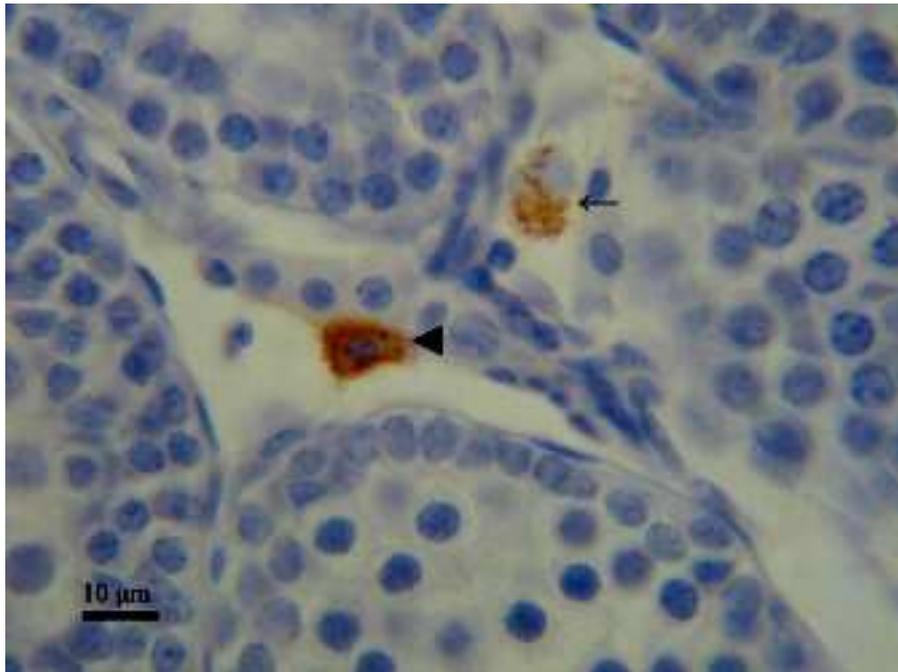


Abb. 22

Hoden, Ratte, 20. pnd, ED2-Makrophagen. ICH + Hämalaun- Färbung. Mittig: MP in der Nähe von einem FLC-Cluster (Pfeilkopf). Der Zellkern ist dabei von der Immunreaktion ausgespart. Oben: ein perivaskulärer MP (kleiner Pfeil).

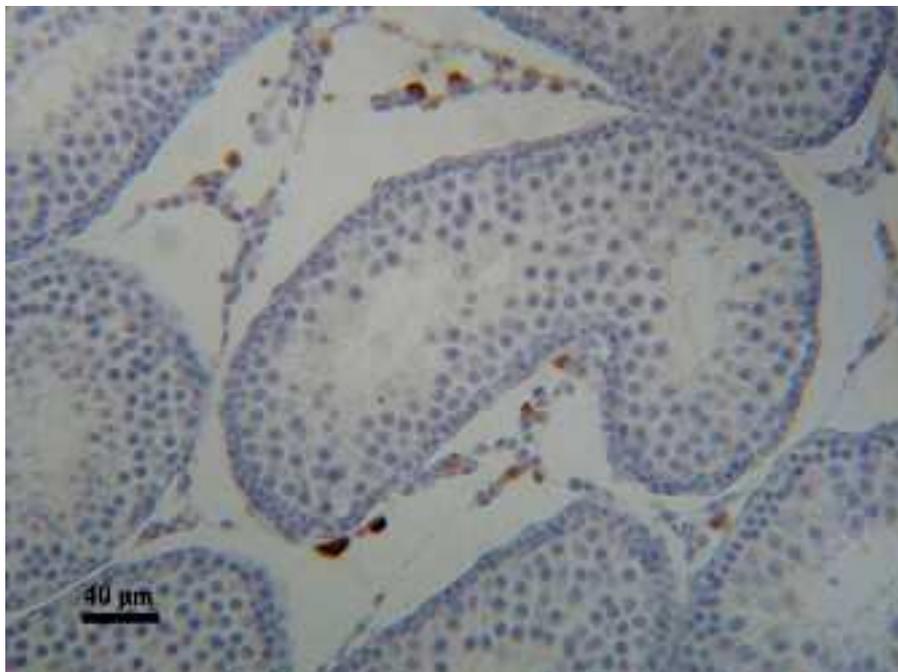


Abb. 23

Hoden, Ratte, 30. pnd, ED2-Makrophagen. ICH + Hämalaun- Färbung. Übersichtsbild. Die artefiziell vergrößerten Interstitialräume sind fixierungsbedingt (Schrumpfungsartefakte).

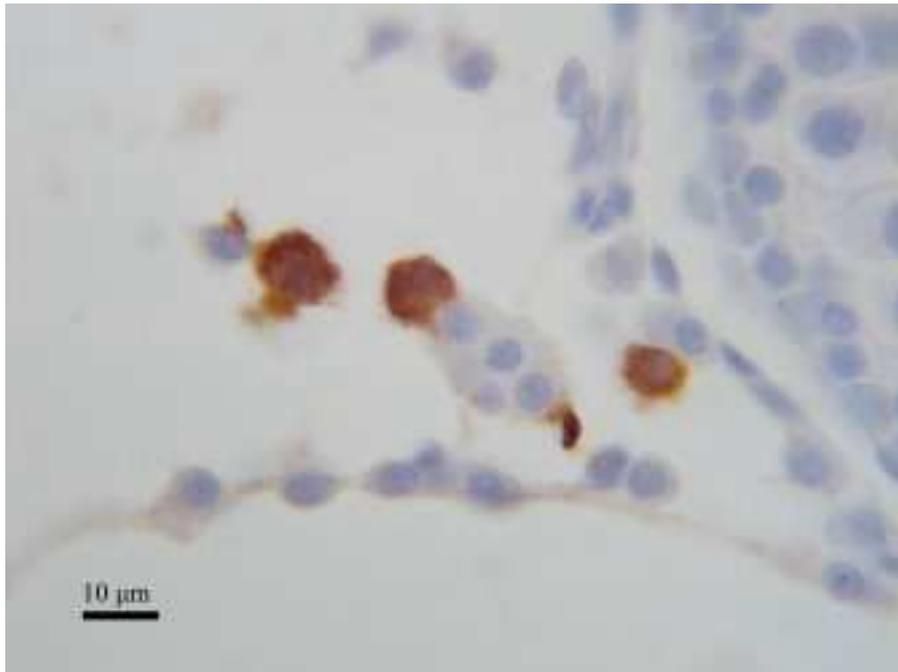


Abb. 24

Hoden, Ratte, 30. pnd, ED2-Makrophagen. ICH + Hämalaun- Färbung. Makrophagen in der Nähe von ALCs.

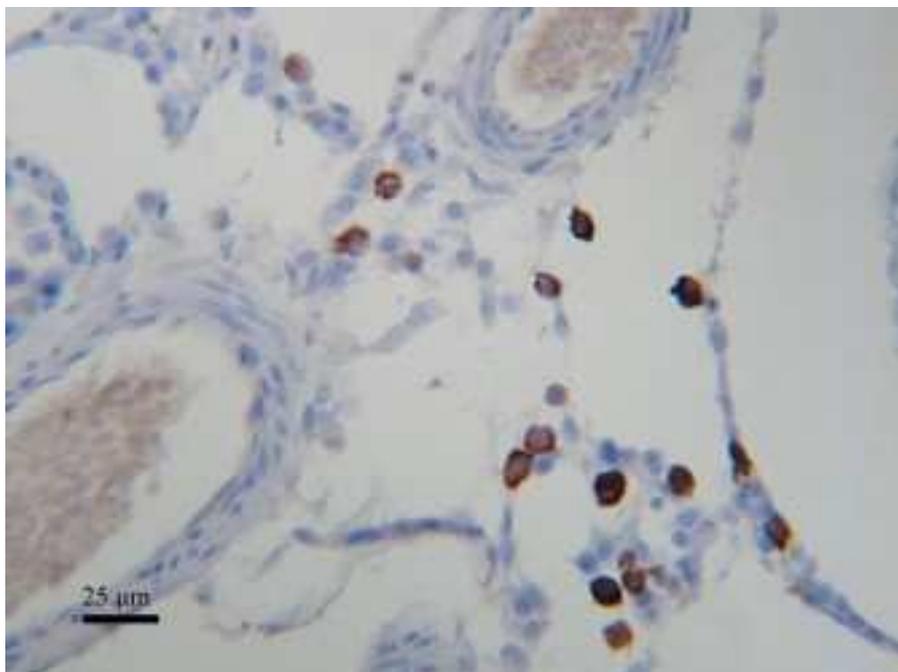


Abb. 25

Hoden, Ratte, 50. pnd, ED2-Makrophagen. ICH + Hämalaun- Färbung. Großes Gefäß in der Nähe von Tunica albuginea. Auch hier ist bei einigen MPs die membrangebundene bis diffuse Reaktion gut sichtbar.

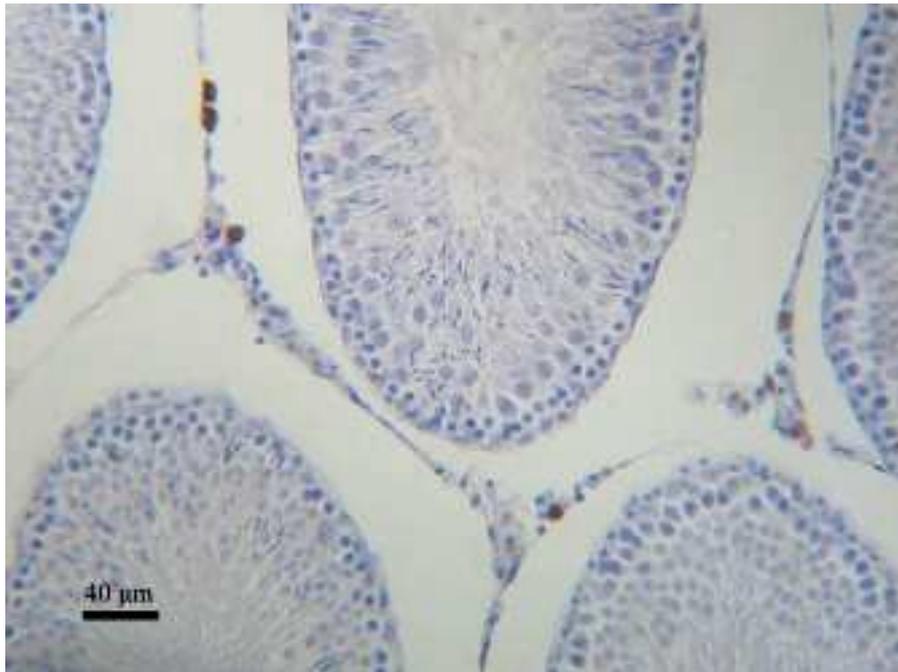


Abb. 26

Hoden, Ratte, 100. pnd, ED2-Makrophagen. ICH + Hämalaun- Färbung.

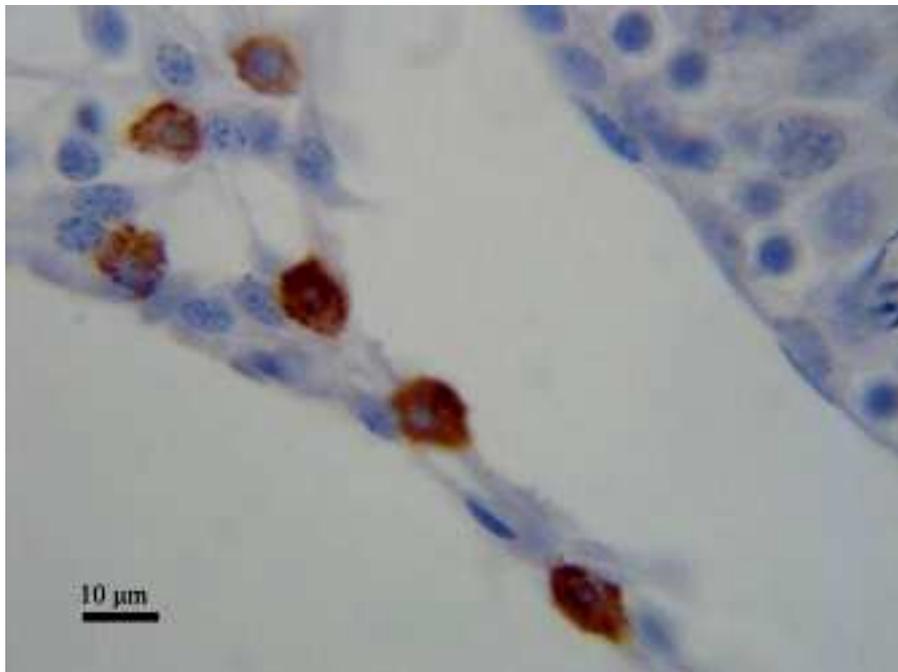


Abb. 27

Hoden, Ratte, 100. pnd, ED2-Makrophagen. ICH + Hämalaun- Färbung.
Hodeninterstitium mit peritubulär lokalisierten ED2-Makrophagen.

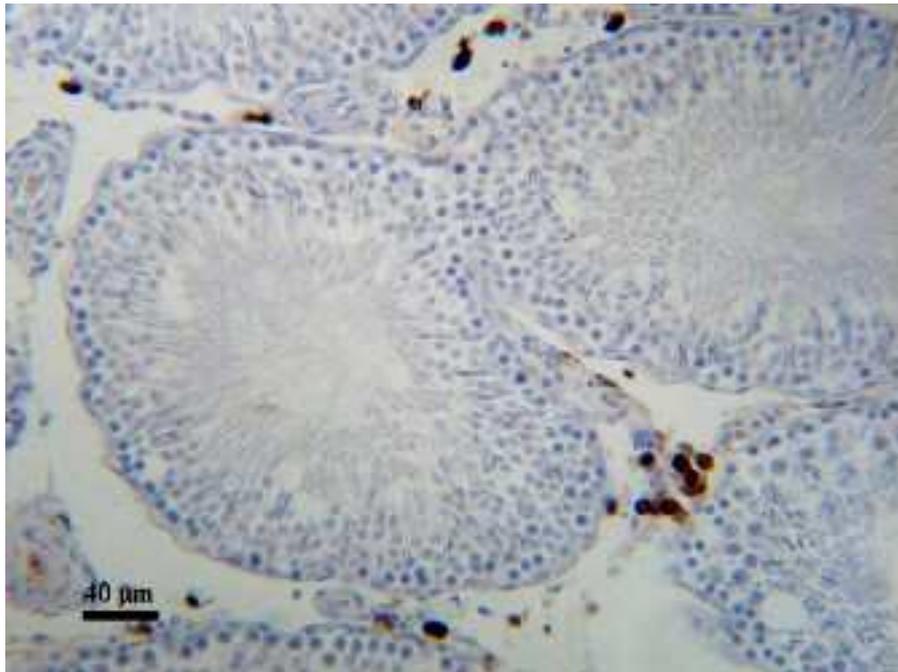


Abb. 28

Hoden, Ratte, 2. Jahre, ED2-Makrophagen. ICH + Hämalaun- Färbung.
Verdünnung des AK: 1:100.

Deutliche Vermehrung der Makrophagen, besonders in der Umgebung der Gefäße.

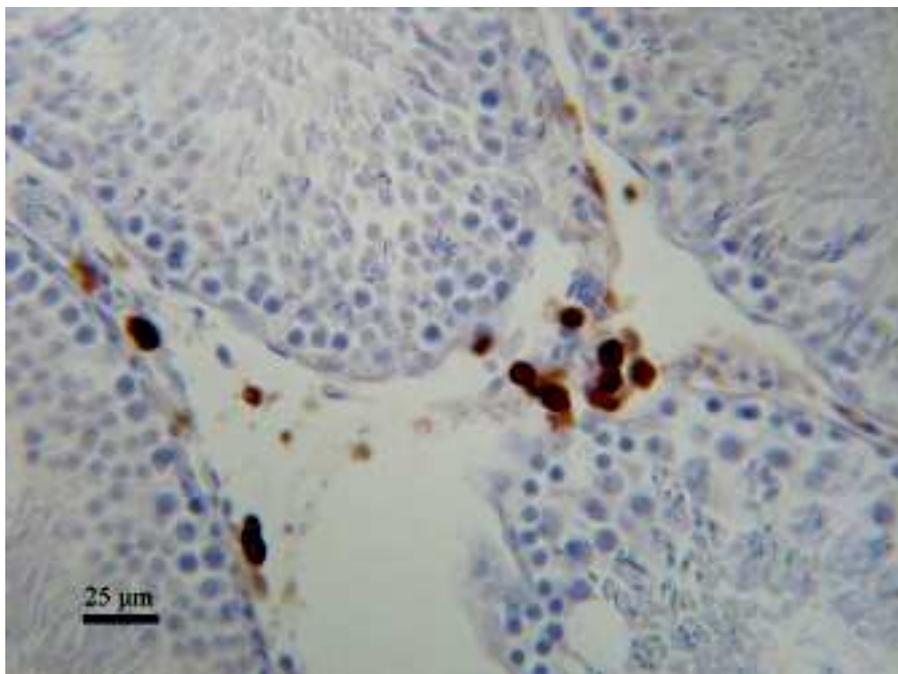


Abb. 29

Hoden, Ratte, 2. Jahre, ED2-Makrophagen. ICH + Hämalaun- Färbung.
Vergrösserte Darstellung des rechten unteren Bereiches von Abb. 28.

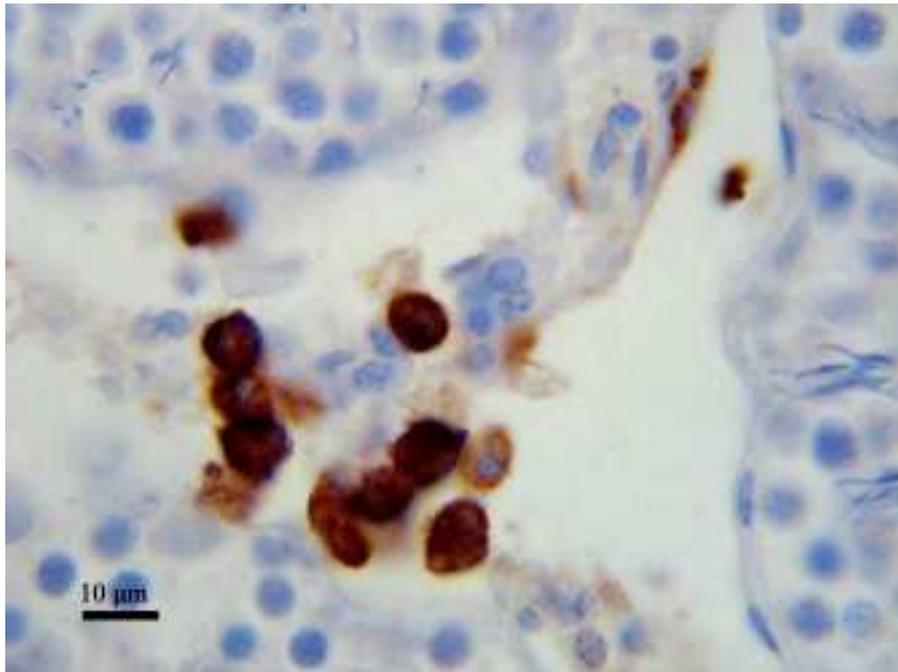


Abb. 30

Hoden, Ratte, 2.Jahre, ED2-Makrophagen. ICH + Hämalaun- Färbung.
Weitere Vergrößerung aus der Abb. 29. Die MPs sind sehr dicht aneinander
gelegen, teilweise überlappend.

3.2.2. Quantifizierung der mit ED2 markierten Makrophagen

3.2.2.1. Gesamtanzahl der ED2-positiven Makrophagen

In der Abbildung 31 ist die Anzahländerung der ED2-positiven Makrophagen mit zunehmendem Alter dargestellt. Wie bei den ED1-Makrophagen ist das Minimum der ED2-positiven Zellen am 15. pnd. Vom 15. pnd bis zum 20. pnd kommt es zu einem ca. 1,8-fachen Anstieg der Zellzahl der ED2-Makrophagen. Am 30. pnd zeigt sich ein signifikanter Rückgang (Tabelle 4) und während der Pubertät (50. pnd) steigt die Anzahl pro Fläche wieder an. Bei den adulten Tieren (100. pnd) nimmt die Zellzahl erneut ab. Schließlich wird im Alter von 2 Jahren das Maximum der residenten ED2-Makrophagen erreicht.

In Tabelle 4 sind, ähnlich dem in Tabelle 3, die p-Werte angegeben, die nach dem Student T-Test ermittelt worden sind. Diese p-Werte beziehen sich auf die Werte in Abb 31.

Zum Schluss ist ein Vergleich zwischen den Gesamtanzahl -Verläufen der ED1- versus (vs.) ED2- positiven Makrophagen in Abbildung 32 dargestellt. Trotz ähnlichem Kurvenverlauf vom 15. bis zum 50. pnd kommt es mit fortschreitendem Alter zu deutlichen Unterschieden. Zu beachten ist, dass die ED1-Makrophagen bei den 2 Jahre-alten Tieren deutlich abfallen, während die Anzahl der ED2-Makrophagen deutlich zunimmt.

Abbildung 31

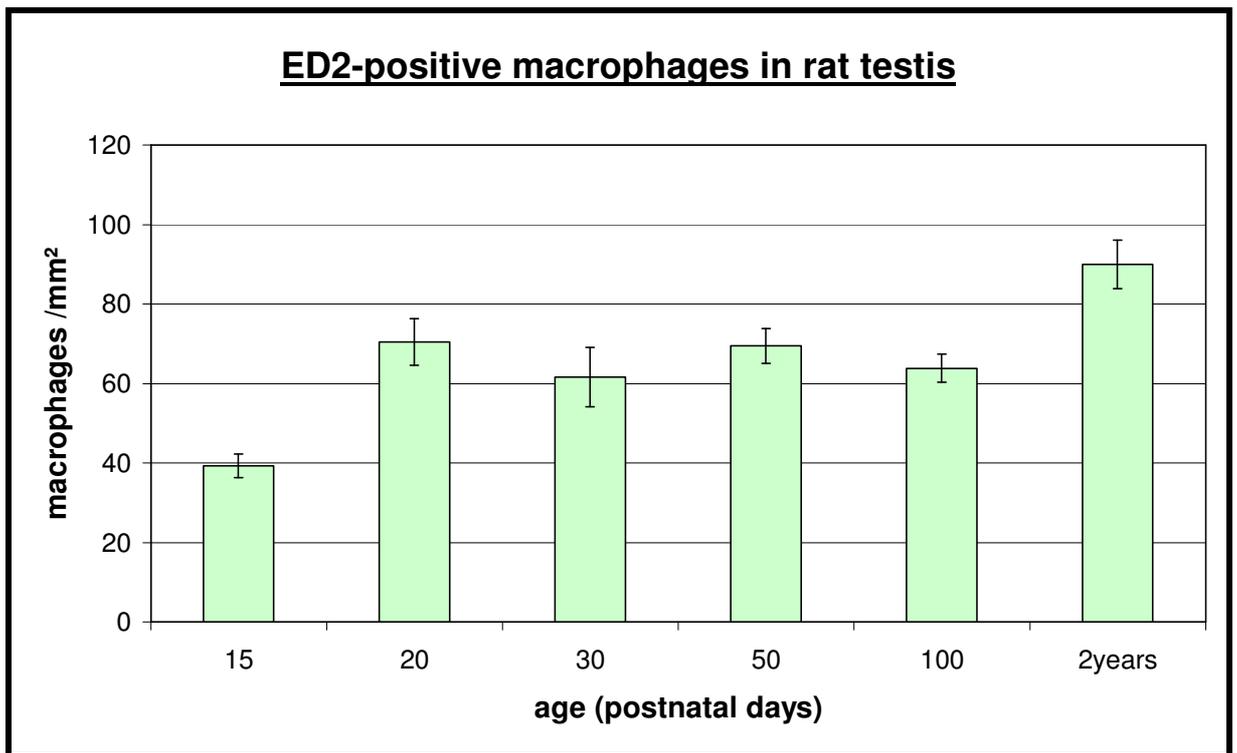


Abb. 31 zeigt die Gesamtanzahl der ED2-positiven Makrophagen pro Fläche in Quadratmillimeter im Rattenhoden im Alter vom 15. pnd bis zum 2. Lebensjahr. In den Altersgruppen vom 1.pnd bis zum 10.pnd konnten die ED2-Makrophagen mit unseren Methoden nicht dargestellt werden.

Tabelle 4

Signifikanz zwischen den Altersgruppen:	Signifikanz* (p)
15.pnd und 20.pnd	p < 0,001
20.pnd und 30.pnd	p < 0,001
30.pnd und 50.pnd	p < 0,001
50.pnd und 100.pnd	p < 0,001
100.pnd und 2.Jahre	p < 0,001

* Ermittelt durch den Student's T-Test

Abbildung 32

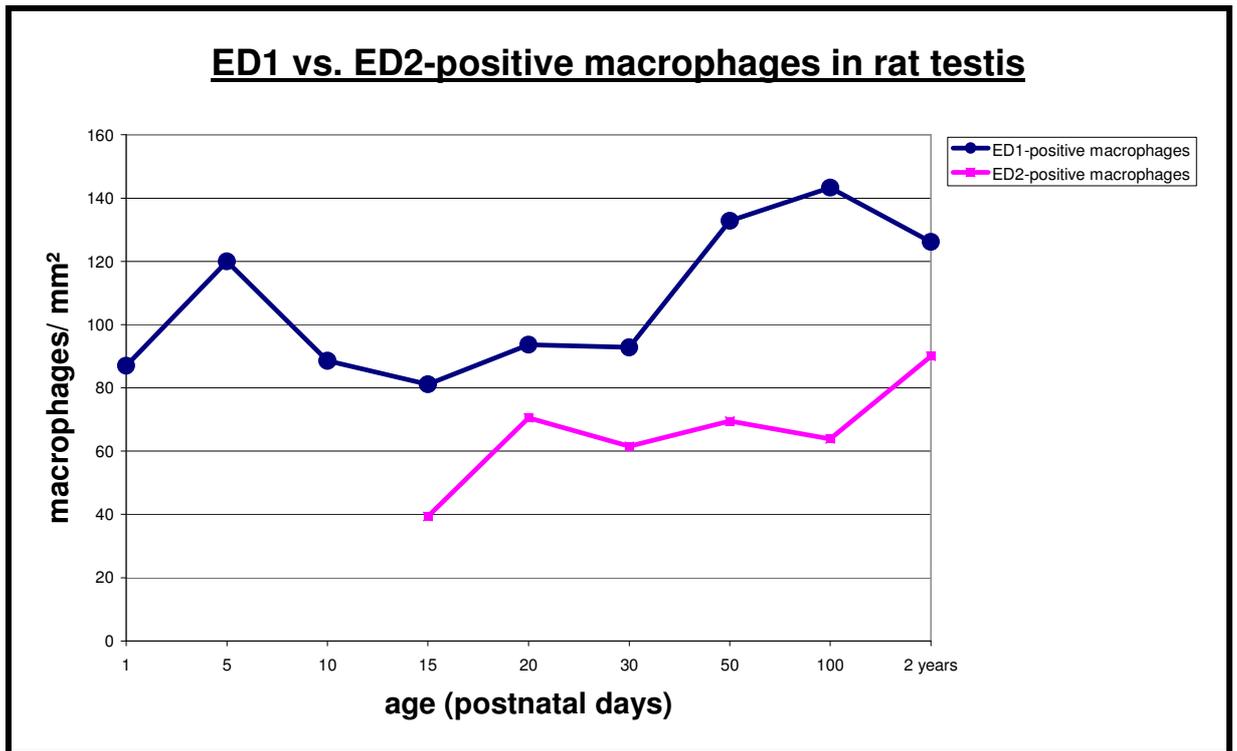


Abb. 32 stellt einen Vergleich der Gesamtanzahl-Verläufe der ED1- versus der ED2-positiven Makrophagen im Rattenhoden mit zunehmendem Alter dar.

4. Diskussion

4.1. Ursprung der Makrophagen

Die myeloide Vorläuferzelle im Knochenmark ist die Vorstufe der Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Mastzellen. Makrophagen sind einer der drei Typen von Phagozyten im Immunsystem (Janeway et al., 2002). Sie gelangen von der Knochenmark ins Blut, wo sie ca. 40 Stunden in Form von Monozyten. Sie wandern dann in verschiedene Gewebe aus und differenzieren sich dort. Im

Bindegewebe werden ortsständige (= residente) Makrophagen oft als Histozyten bezeichnet, in der Leber als Kupffer-Zellen, in der Haut als Langerhans-Zellen, in der Lunge als Alveolarmakrophagen, im Knochenmark als Osteoklasten usw..

Zur Abgrenzung gegenüber neutrophilen Granulozyten (= Mikrophagen) mit ihrem segmentierten Kern, die ebenfalls phagozytieren, werden die Makrophagen auch als mononukleäre Zellen bezeichnet. Die Makrophagen des gesamten Körpers werden als mononukleäres Phagozytensystem (MPS) zusammengefasst (Junqueira et al., 2004). Sie sind darauf spezialisiert, Reste abgestorbener Zellen, gealterte Matrix, Fremdkörper, antikörperbedeckte Bakterien, Tumorzellen u.v.a. zu phagozytieren. Makrophagen haben jedoch viele weitere Funktionen im Rahmen von Immun- und Abwehrprozessen, darunter Antigenpräsentation für T-Zellen und die Sekretion von Faktoren wie Zytokinen, die eine zentrale Rolle bei der antigenspezifischen Aktivierung von B- und T- Zellen spielen. Eine ganze Reihe von sekretorisch abgegebenen Produkten bewirkt pro- und antientzündliche Effekte und reguliert andere Zellen (Welsch, 2006).

Makrophagen lassen sich entsprechend unterschiedlichen Aktivitätszuständen in „residente“, nicht stimulierte („fixe“) Makrophagen und aktivierte („freie“) Makrophagen gliedern (Welsch, 2006).

Makrophagen bilden die größte Population von Immunzellen im gesunden Rattenhoden (Hedger, 1997). Zahlreiche Arbeiten befassen sich mit der Rolle und Funktion dieser Zellen im Hoden. Dagegen gibt es leider nur wenige Untersuchungen der Kinetik dieser Zellen im Hoden während der Entwicklung. Zudem ist die vorliegende Arbeit die erste Studie mit der Zielsetzung zur Klärung der bevorzugten Lokalisation der Makrophagen und ihrer Veränderungen mit zunehmendem Lebensalter.

Zu diesem Zweck wurden die Makrophagen im Rattenhoden mit Hilfe der ED1- und ED2-Antikörper immunhistochemisch dargestellt, um den Verlauf der Veränderungen in ihrer Gesamtzahl und topographischen Verteilung im Hodeninterstitium zu untersuchen. ED1 markiert dabei ein lysosomales Antigen, das von allen Monozyten und einem Teil der residenten Makrophagen exprimiert wird (Damoiseaux et al., 1994; Dijkstra et al., 1985). Den ED1 Zellen werden eher inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Hierbei zeigt sich eine verstärkte Exprimierung nach phagozytotischer Aktivität.

Der ED2-Antikörper erkennt ein Integrin, das alleine von residenten Makrophagen exprimiert wird, jedoch wenig bis kaum von Monozyten (Barbé et al., 1990; Buechler et al., 2000). Das CD 163-Antigen konnte weiter als der Hämoglobin Scavenger Receptor der cysteinreichen Familie Gruppe B identifiziert werden (Fabrick et al., 2007; Högger et al., 1998). ED2-Zellen werden bei einer Immunreaktion eher mit der Down-Regulation und Wiederherstellung des normalen Milieus in Verbindung gebracht. Also scheint die anti-inflammatorischen Funktion zu überwiegen.

Es muss hier betont werden, dass es sich bei den Zellen, die durch diese zwei Marker gekennzeichnet sind, nicht um zwei komplett unabhängige Populationen von Makrophagen handelt (Wang et al., 1994; Gerdprasert et al., 2002; Dijkstra et al., 1985). Wang et al. (1994) zeigten, dass die meisten Testikularmakrophagen das ED2-Antigen exprimieren, und wiederum ca. die Hälfte von diesen Zellen auch gleichzeitig für den ED1-Marker positiv sind. Wenn man die Ergebnisse von Wang et al. (1994) zusammenfasst, werden mit Hilfe dieser 2 Antikörper 3 Subpopulationen von Testikularmakrophagen dargestellt, nämlich: 1). ED1+ED2-, 2). ED1+ED2+ und 3). ED1-ED2+.

Weiterhin haben ED1-ED2+ Makrophagen einen deutlich größeren Zellkerndurchmesser als die ED1+ Population, was auf eine unterschiedliche Kernaktivität hindeutet. Dieses Muster passt zu einer Entwicklungsprogression von Monozyten, welche in den Testis als ED1+ED2- Zellen einwandern, nach wenigen Tagen immunoreaktiv für ED2 werden, und schließlich die ED1-Expression verlieren (siehe Abb. 33; Hedger, 2002).

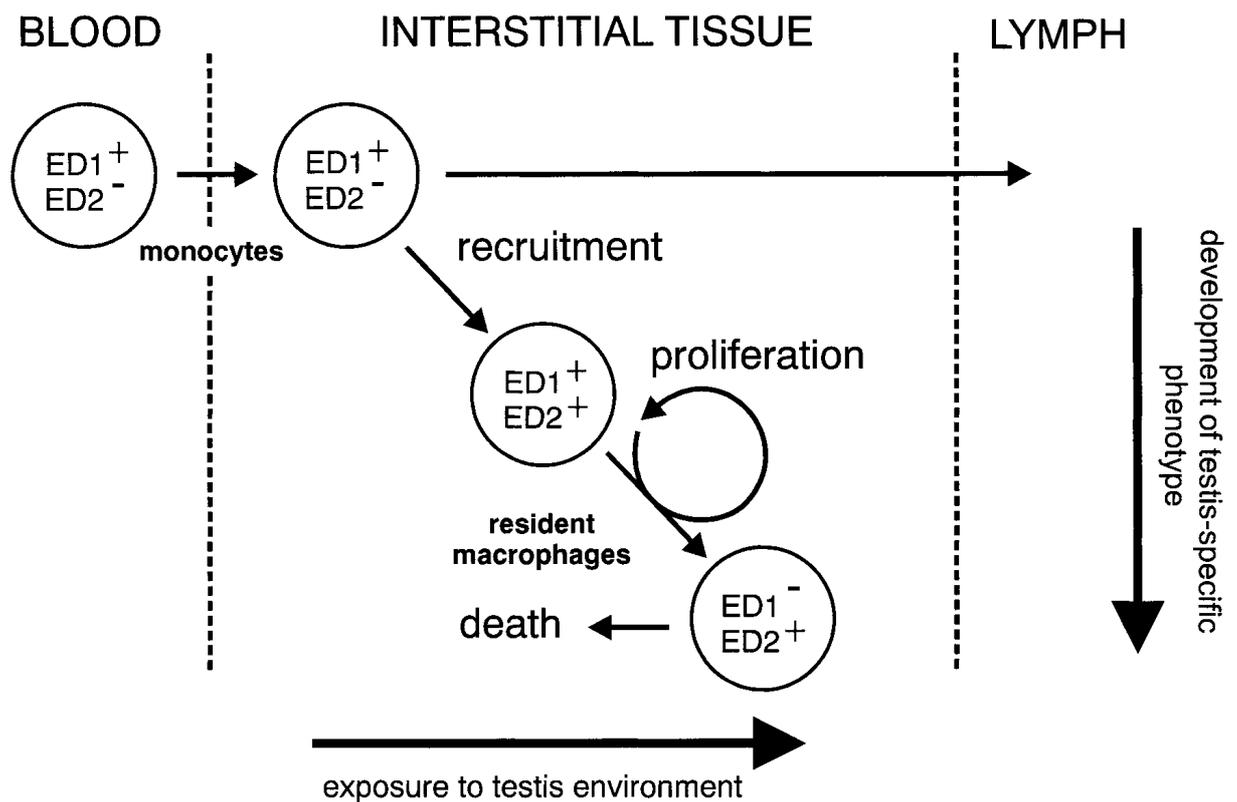


Abbildung 33

Hypothetische Darstellung der Entwicklung der Population von residenten Makrophagen im Rattenhoden. Beachtenswert sind hier die unterschiedlichen Expressionsmuster von ED1 und ED2 durch die Makrophagen im „Blut-Hoden-Kreislauf“ (Aus: Hedger, Journal of Reproductive Immunology (2002); 57: 19-34).

Im Konsens mit der oben dargestellten Hypothese ist auch die Tatsache, dass, im Falle eines immunologischen bzw. inflammatorischen Geschehens, primär ED1⁺-Zellen bei dem Early Onset der Immunantwort fungieren. Mit einer gewissen Verzögerung kommt es zu einem Anstieg der ED2⁺-Makrophagen (Late Onset). Einige Arbeiten belegten sogar nur eine schwache Beeinflussung dieser Population durch inflammatorische Stimuli (Gerdprasert et al., 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass ED2⁺-Zellen in der Lage sind, zu proliferieren oder sich mitotisch zu teilen (Schlatt et al., 1999). Allerdings wurde von Schlatt et al. (1999) keine Doppelfärbung für ED1 und ED2 durchgeführt. So ist es gut möglich, dass die in seiner Arbeit dargestellten ED2⁺-Makrophagen auch gleichzeitig für den ED1 Marker positiv waren.

In der vorliegenden Arbeit konnte auch eindeutig über die ED1+-Makrophagen gezeigt werden, dass diese zu Mitose fähig sind (siehe Ergebnisse, Abb. 5). Man könnte in diesem Fall spekulieren, dass ED2+ED1- -Zellen hochdifferenzierte, gewebsständige Makrophagen darstellen.

Für die Darstellung der ED2-Makrophagen war von der Firma Serotec eine PLP-Fixierung des Gewebes empfohlen. Leider war die Gewebserhaltung bei den PLP-fixierten Hoden bei weitem nicht so gut wie bei den Bouin-Hoden. Da bei den zwei Antikörpern jeweils zwei unterschiedliche Gewebsfixierungen und außerdem zwei unterschiedliche Reaktionsmethoden angewendet wurden, können die Absolutwerte der ED1- und ED2-Makrophagenanzahl nicht miteinander verglichen werden. Das ist auch möglicherweise der Grund, weshalb, im Gegensatz zu anderen Berichten (Wang, 1994; Gerdprasert et al., 2002), die Gesamtanzahlwerte der ED1- Makrophagen weitaus grösser als die der ED2-Makrophagen sind. Auch auf Grund der schlechteren Gewebsfixierung bei den PLP-Hoden konnten keine topographischen Auswertungen bei den ED2-Makrophagen durchgeführt werden.

4.2. ED1-positive Makrophagen

Bei der Gesamtanzahl der ED1-positiven Makrophagen hat man einen 2-gipfligen Verlauf beobachten können. Wie in den anderen peripheren Organen (Welsch, 2006) fanden sich die meisten ED1-Makrophagen auch im Hoden entlang der Gefäße (Abb. 15). Dabei ähnlich dem Gesamtanzahl-Verlauf zeigten sich auch hier 2 Spitzen bei den perivaskulären Zellen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man vermuten, dass diese Zellen einerseits direkt den Austausch von Stoffen zwischen dem Blut und Hodengewebe überwachen bzw. beeinflussen (Abb. 11), und andererseits sie selber das Hodeninterstitium verlassen und/ oder dahin einwandern. Als ein möglicher Hinweis auf letztere Hypothese könnte gewertet werden, dass ED1-positive Zellen oft auch in der Blutbahn beobachtet wurden. All das kann die Theorie unterstützen, dass die ED1 - Testikularmakrophagen direkte Knochenmark-Abkömmlinge sind, obwohl sie sich im Hodengewebe auch durch mitotische Teilung vermehren können (Abb. 5).

Das erste Maximum in der Gesamtzellzahl zeigte sich am 5.pnd. Bei der Betrachtung der topographischen Verteilung dieser Zellen zeigen auch die perivaskulären

Makrophagen ihr erstes Maximum. Nach diesem postnatalen Tag zeigte Haider et al. (2004) einen beginnenden Abfall der FLC-Anzahl. Einerseits ist bekannt, dass die Makrophagen im Hoden zur Phagozytose fähig sind (Damoiseaux et al., 1994; Wei et al., 1988; Yee and Hutson, 1983), und dass es auch bei LC-Apoptose zu einer Zunahme deren Anzahl kommt (Wang et al., 1994; Gaytan et al., 1995). Beobachtet man zeitgleich den Verlauf der ED1-positiven Zellen in der Nähe von FLC, so ist dort das Maximum am 1. pnd. Danach kommt es zu einem kontinuierlichen Abfall bis zum 30. pnd. Wie bereits erwähnt, sind die ED1-Makrophagen in der Frühphase eines immunologischen Geschehens als Erste vor Ort. Andererseits zeigten andere Arbeiten eindeutig, dass die Makrophagen für die Leydig-Zell-Differenzierung und Entwicklung von großer Bedeutung sind, und umgekehrt (Gaytan et al., 1994; Hedger 1997). Eine mögliche Erklärung dieses ersten Maximums der ED1-positiven Zellen könnte sein, dass diese die Reste von apoptotischen FLC „abräumen“ (Tran et al., 2006; Yokoi et al., 1998). Andere Autoren berichten wiederum von einer unveränderten Anzahl an FLC von der Geburt bis zur Sexualreife (Ariyaratne and Mendis-Handagama, 2000). Das endgültige Schicksal der FLC ist immer noch nicht endgültig geklärt. Diese Ergebnisse stellen möglicherweise einen guten Hinweis in dieser Hinsicht dar, und schaffen gleichzeitig die Basis für zukünftige Arbeiten, die auf diesem Gebiet notwendig sind.

Die peritubulären ED1-Makrophagen zeigen ein deutliches Maximum am 5. pnd. Die Anzahl an diesem pnd ist um mehr als das Doppelte angestiegen im Vergleich zum 1. pnd. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem langsamen kontinuierlichen Abfall der peritubulären Makrophagen bis zum 30. pnd. Bis zum Senium bleibt deren Konzentration weitgehend gleich. Auch bei den perivaskulären Makrophagen zeigte sich eine leichte Erhöhung am 5. und am 20. pnd. Ab dem 10. pnd werden die ersten Progenitor-Zellen von ALC beobachtet (Haider, 2004; Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001). Als Vorstufen dieser Progenitor-Zellen werden peritubulär und perivaskulär gelegene spindelförmige Mesenchymzellen (mesenchymale Präkursor-Zellen) angesehen (Haider, 2004; Ge et al., 2006; Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001). Es ist aus anderen Studien bekannt, dass einige Makrophagenprodukte die Differenzierung dieser mesenchymalen Präkursor-Zellen zu Progenitor-Zellen positiv beeinflussen (Chen et al., 2002; Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001). Von Gaytan et al. (1994) erhobene Befunde zeigten, dass die Makrophagen im Rattenhoden für die Entwicklung der Leydig Zellen sogar notwendig sind. Es ist nicht genau bekannt, wie lange dieser Differenzierungsprozess der spindelförmigen

Mesenchymzelle zur Progenitorzelle in vivo dauert. Jedoch liefern all diese Befunde eine andere zusätzliche Erklärung zu dem Maximum an ED1-Makrophagen am 5. pnd.

Weiter folgt ein Minimum am 15. pnd. Zum gleichen Zeitpunkt wurde ein Minimum an endogener Gesamtsteroidkonzentration und an Leydig-Zellen im Rattenhoden beobachtet (Tapanainen et al., 1984). Tran et al. (2006) beobachtete auch auf ultrastruktureller Ebene nur wenige intakte Leydig-Zellen. Makrophagen und Leydig-Zellen beeinflussen sich gegenseitig sowohl funktionell als auch in ihrer Differenzierung und Entwicklung (Gaytan et al., 1994; Hedger, 1997; Lukyanenko et al., 2001, 2002; Chen et al., 2002), was wahrscheinlich macht, dass all diese Befunde zusammenhängen. Nach dem Minimum am 15.pnd steigt die ED1-Makrophagen-Anzahl bis zum 20.pnd deutlich an, und bleibt danach bis zum 30. pnd unverändert. Trotz der gleichbleibenden Gesamtzellanzahl zwischen dem 20. und 30.pnd kam es bei den in der Nähe von ALCs gelegenen ED1-Makrophagen zu einem über 2-fachen Anstieg. In der gleichen postnatalen Periode zeigte eine andere Arbeit einen ca. 2-fachen Anstieg der ALCs-Anzahl (Ariyaratne and Mendis-Handagama, 2000). Weiterhin fand Hutson (1992) in seinen elektronmikroskopischen Untersuchungen, dass sich zytoplasmatische Digitationen zwischen Leydig-Zellen und Makrophagen im Alter zwischen 20.pnd und 30.pnd bilden. Außerdem zeigte Hardy et al. (1989) in seiner Studie, dass sich die Vermehrung der Leydig Zell-Anzahl zwischen dem 14. und 28. pnd durch Rekrutierung aus dem Kompartiment der mesenchymalen Zellen ergibt, und, dass sich im Gegensatz dazu die Leydig-Zellen nach dem 28. pnd durch Zellteilung vermehren. Das kann erklären, warum es bei den in der Nähe von ALCs lokalisierten Makrophagen zu diesem Anstieg kam, und gleichzeitig auch warum die Konzentration der peritubulären Makrophagen im Verlauf abnimmt. Als eine weitere Bestätigung der Theorie, dass die ED1-Makrophagen eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Hodenfunktion spielen, kann angesehen werden, dass sich das Maximum in ihrer Gesamtzellanzahl während der Pubertät (50.pnd) und der Adoleszenz (100.pnd) der Tieren zeigte. Am 50.pnd zeigte sich auch das Maximum der in der Nähe von ALC lokalisierten Zellen. An diesen Postnataltagen beobachtete auch Tran et al. (2006) häufiger Assoziationen zwischen Makrophagen und ALCs.

Mit zunehmendem Alter (im Senium = 2 Jahre) nimmt das absolute Volumen des glatten endoplasmatischen Retikulums pro Zelle und das durchschnittliche Zellvolumen der ALC deutlich ab. Die Leistungsfähigkeiten dieser Zellen ist eindeutig vermindert

(Ichihara et al., 1993; Kim et al., 2002). Anzunehmen ist, dass auch andere sekretorische und modulatorische Funktionen von der einzelnen ALC mit steigendem Alter abnehmen. Mitunter wäre auch die Rekrutierung von neuen ED1+- Makrophagen beeinflusst. Das würde den leichten Abfall sowohl der Gesamtzellzahl, als der nahe der ALCs gelegenen ED1-Makrophagen erklären.

Es sind allerdings weitere Studien notwendig, um zu klären, ob tatsächlich auch die immunregulatorischen Funktionen der ALC im Alter vermindert sind.

4.3. ED2-positive Makrophagen

Bis zum 10. pnd konnten keine ED2-positive Makrophagen im Hoden nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich am 15. pnd nur eine schwache Immunreaktion mit der üblichen Verdünnung des Antikörpers (1:100). Daher wurde bei dieser Altersgruppe eine geringere Verdünnung (1:50) angewendet. Der Grund dafür lässt sich in der schwachen Expression des entsprechenden Antigens und/oder in dem Einfluss des Fixierungsmediums auf dasselbe vermuten. Bei den von Hutson (1990) durchgeführten Experimenten an Hoden-Gefrierschnitten von Wistarratten konnten ED2-positive Makrophagen sogar schon im Alter von 19 Fetaltagen dargestellt werden. Diese Tatsache macht wahrscheinlicher, dass das Hauptproblem bei der Darstellung der ED2-Makrophagen im frühen postnatalen Alter an dem entsprechenden Einfluss des Fixierungsmediums liegt. Dazu kommt die Tatsache, dass CD 163 von der Zelloberfläche durch chemische Einflüsse abgespalten bzw. abgeworfen werden kann (Droste et al., 1999).

Jedenfalls konnten ab dem 15. pnd ED2-positive Makrophagen erfolgreich dargestellt werden. Dabei kam zwischen dem 15. und 20. pnd zu einem ca. 1,8-fachen Anstieg dieser Zellen. Obwohl die hier erzielten Einzelwerte der Makrophagenkonzentrationen im Vergleich zu den Werten in der Arbeit von Hutson (1990) deutlich höher liegen, hat er auch zu diesem Zeitpunkt genau den gleichen Konzentrationsanstieg beobachten können. Wenn man auf das oben Aufgeführte zurückkommt: die ED1 – positiven Makrophagen als Early-Onset-Zellen mit einem ersten Maximum am 5. pnd mit weiterfolgendem Abfall und die ED 2-Makrophagen als Late-Onset-Zellen mit downregulatorischer Funktion mit einem deutlichen Anstieg am 20. pnd, könnten diese zwei Befunde die Hypothese über das Absterben und Abräumen von FLCs bestärken

(Yokoi et al., 1998; Tran et al., 2006). Zur gleichen Zeit auch, mit dem Anfang der prepubertären Veränderungen, werden neue ED1-Makrophagen rekrutiert, die im Zeitverlauf sich weiterdifferenzieren und zu ED2-positive Zellen werden, die für die normale Hodenentwicklung von grosser Bedeutung sind (Gaytan et al., 1994; Hedger 1997; Lukyanenko et al., 2001, 2002; Chen et al., 2002).

Im weiteren Verlauf zeigt sich ein geringer, aber signifikanter Abfall der ED2-Makrophagengesamtanzahl am 30. pnd. Ähnlich zeigt sich das auch bei den ED1+-Makrophagen. Zum gleichen Zeitpunkt kommt es zu einer deutlichen Volumenzunahme des Hodens und zum ersten Mal wird eine luminale Komponente der Tubuli seminiferi beschrieben. Die absolute Anzahl und das absolute Volumen der Makrophagen pro Hoden nimmt auch zu, jedoch bei weitem nicht in einem solchen Ausmaß wie das Hodenvolumen, die Tubuli seminiferi und die restlichen Hodenkomponenten (Ariyaratne et al., 2000). Das könnte diesen Abfall erklären.

Am 50. pnd, also in der Pubertätsphase der Wistarratten, nimmt die ED2-Zellanzahl deutlich zu. Ähnliche Ergebnisse erzielte auch Hutson (1990). Zu erklären ist das mit den Veränderungen, die in der Pubertät eintreten, und mit der Tatsache, dass die ALC-Funktionen sozusagen von den Makrophagen mitabhängig sind (Gaytan et al., 1994; Hedger 1997; Lukyanenko et al., 2001, 2002; Chen et al., 2002).

Im weiteren Verlauf über eine leichte, aber signifikante Abnahme der Zellanzahl am 100. pnd kommt es im Senium (2 Jahre alte Tiere) zu einem Maximum. Die ED1+-Makrophagen zeigten dort einen geringen, aber signifikanten Abfall. Das könnte sich so erklären lassen: - Die ALCs zeigen im fortgeschrittenen Alter verminderte Leistungsfähigkeit/ Produktivität (Chen et al., 2002; Kim et al., 2002; Ichihara et al., 1993). Dadurch sinkt die ED1-Rekrutierungsanzahl. Viele der vorhandenen Hodenmakrophagen sind zu ED2+ -Makrophagen ausdifferenziert, die eher anti-entzündliche und zellfunktionsbeeinflussende Aufgaben zeigen. Diese sind wiederum vermehrt, um die „leistungsgeschwächten“ ALCs zu unterstützen/ stimulieren.

4.4. Schlussfolgerungen

Erkenntnisse aus dieser Arbeit

1. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Kinetik der Proliferation der ED1- und der ED2-positiven Makrophagen im Rattenhoden von der Geburt bis zum Senium.
2. Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal die mitotische Teilung der ED1-Makrophagen im Rattenhoden.
3. Es wurde hier erstmals die topographische Lokalisation der Makrophagen im interstitiellen Hodengewebe beschrieben:
 - perivaskulär,
 - peritubulär,
 - in der Nähe der FLCs,
 - in der Nähe der ALCs.
4. Die Abnahme der FLCs und die Zunahme der ED1-Makrophagen finden zeitlich parallel statt. Dieser Befund hat eine mögliche Bedeutung für die Apoptose der FLCs und für die Entstehung der Vorläufer der ALCs.
5. Die vorliegende Arbeit bestätigt die Befunde anderer Autoren über eine Zunahme der ED1- und ED2-positiven Makrophagen während der Pubertät.
6. Ein auffälliges Merkmal des Seniums ist eine Zunahme der ED2 - positiven Makrophagen mit dem gleichzeitigen Abfall der ED1 - positiven Makrophagen.

5. Literatur

Ariyaratne, H.B.S., and Mendis-Handagama, S.M.L.C.

Changes in the testis interstitium of sprague dawley rats from birth to sexual maturity.
Biology of Reproduction (2000); 62: 680-690

Barbé, E., Damoiseaux, J.G.M.C., Döpp, and E. A., Dijkstra, C.D.

Characterization and expression of the antigen present on resident rat macrophages recognized by monoclonal antibody ED2.
Immunobiology (1990); 182: 88-99

Bauer, J., Sminia, T., Wouterlood, F.G. and Dijkstra C.D.

Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis.
Journal of Neuroscience Research(1994); 38(4): 365-375

Beelen, R.H.J., Eestermans, I.L., Döpp, E.A., and Dijkstra

Monoclonal antibodies ED1, ED2, and ED3 against rat macrophages: expression of recognized antigens in different stages of differentiation.
Transplantation Proceedings(1987); Vol XIX, 3: 3166-3170

Boenisch, T., M.S.

Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden
Dako Cytomation Corp., Carpinteria, CA, USA, 3.Auflage 2003

Brzoska, T., Luger, T.A., Maaser, C., Abels, C., and Böhm, M.

α -Melanocyte-Stimulating Hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspective for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases.
Endocrine Reviews (2008); 29(5): 581-602

Buechler, C., Ritter, M., Orsó, E., Langmann, T., Klucken, J. And Schmitz, G.

Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli.
Journal of Leukocyte Biology (2000); 67: 97-103

Chen, H., Hardy, M. P., and Zirkin, B.R.

Age-related decreases in leydig cell testosterone production are not restored by exposure to LH in vitro.
Endocrinology (2002), 143(5): 1637-1642

Chen, J.-J., Lukyanenko, Y.O., Hutson, J.C.

25-hydroxycholesterol is produced by testicular macrophages during the early postnatal period and influences differentiation of leydig cells in vitro.
Biology of Reproduction (2002 a); 66: 1336-1341

Clear, A.J., Lee, A.M., Calaminici, M., Ramsay, A.G., Morris, K.J., Hallam, S., Kelly, G., MacDougall, F., Lister, T.A. and Gribben, J.G.
Increased angiogenic sprouting in poor prognosis FL is associated with elevated numbers of CD163⁺ macrophages within the immediate sprouting microenvironment.
Blood (2010); 115(24): 5053-5056

Cohen, P.E., Chisholm, O., Arceci, R.J., Stanley, E.R., and Pollard, J.W.
Absence of colony-stimulating factor-1 in osteopetrotic (csfmOP/ csfmOP) mice results in male fertility defects.
Biology of Reproduction (1996); 55: 310-317

Damoiseaux, J.G.M.C., Döpp, E.A., Calame, W., Chao, D., MacPherson, G.G.
Rat macrophage lysosomal antigen recognized by monoclonal antibody ED1.
Immunology (1994); 83: 140-147

Dijkstra, C.D., Döpp, E.A., Joling, P., and Kraal, G.
The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3.
Immunology (1985); 54: 589-599

Droste, A., Sorg, C. and Högger, P.
Shedding of CD 163, a novel regulatory mechanism for a member of the scavenger receptor cysteine-rich family.
Biochemical and Biophysical Research Communications (1999); 256: 110-113

Fabriek, B.O., Polfliet, M.M., Vloet, R.P.M., van der Schors, R.C., Ligtenberg, A.J.M., Weaver, L.K., Geest, C., Matsuno, K., Moestrup, S.K., Dijkstra, C.D. and van den Berg, T.K.
The macrophage CD 163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor.
Blood (2007); 109(12): 5223-5229

Filippini, A., Riccioli, A., Padula, F., Lauretti, P., D'Alessio, A., De Cesaris, P., Gandini, L., Lenzi, A., and Ziparo, E.
Immunology and immunopathology of the male genital tract. Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen.
Human Reproduction Update (2001); 7(5): 444-449

Fujisawa, M.
Regulation of testicular function by cell-to-cell interaction.

Reproductive Medicine and Biology (2006); 5: 9-17

Gaytan, F., Bellido, C., Morales, C., van Rooijen, N. and Aguilar, E.
Role of testicular macrophages in the response of leydig cells to gonadotrophins in young hypophysectomised rats.
Journal of Endocrinology (1995); 147: 463-471

Gaytan, F., Bellido, C., Morales, C., Reymundo, C., Aguilar, E., van Rooijen, N.
Effects of macrophage depletion at different times after treatment with ethylene dimethane sulfonate (EDS) on the regeneration of leydig cells in the adult rat.
Journal of Andrology (1994); 15: 558-564

Gaytan, F., Romero, J.L., Morales, C., Reymundo, C., Bellido, C., and Aguilar, E.
Response of testicular macrophages to EDS-induced leydig cell death.
Andrologia (1995); 27: 259-265

Ge, R.-S., Dong, Q., Sottas, C.M., Papadopoulos, V., Zirkin, B.R., and Hardy, M.P.
In search of the rat stem leydig cells: identification, isolation, and lineage-specific development.
PNAS (2006); 103 (8): 2719-2724

Gerdprasert, O., O'Bryan, M.K., Muir, J.A., Caldwell, A.M., Schlatt, S., de Kretser, D.M., and Hedger, M.P.
The response of testicular leukocytes to lipopolysaccharide-induced inflammation: further evidence for heterogeneity of the testicular macrophage population.
Cell & Tissue Research (2002); 308: 277-285

Giannessi, F., Giambelluca, M.A., Scavuzzo, M.C., and Ruffoli, R.
Ultrastructure of testicular macrophages in aging mice.
Journal of Morphology (2005); 263: 39-46

Gundersen, H.J.G.
Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect.
Journal of Microscopy (1977); 111 (2): 219-223

Haider, S.G.
Cell biology of leydig cells in the testis.
International Review of Cytology (2004); 233: 181-241

Hales, D. B.
Testicular macrophage modulation of leydig cell steroidogenesis.
Journal of reproductive Immunology (2002); 57: 3-18

Hardy, M.P., Zirkin, B.R., and Ewing, L.L.
Kinetic studies on the development of the adult population of leydig cells in testes of the pubertal rat.
Endocrinology (1989); 124 (2): 762-770

Hedger, M.P.
Testicular leukocytes: what are they doing?
Reviews of Reproduction (1997); 2: 38-47

Hedger, M.P.
Macrophages and the immune responsiveness of the testis.
Journal of Reproductive Immunology (2002); 57: 19-34

Högger, P., Dreier, J., Droste, A., Buck, F. and Sorg, C.
Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid- inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163).
The Journal of Immunology (1998); 161: 1883-1890

Hutson, J.C.
Changes in the concentration and size of testicular macrophages during development.
Biology of Reproduction (1990); 43: 885-890

Hutson, J.C.
Development of cytoplasmic digitations between leydig cells and testicular macrophages of the rat.
Cell & Tissue Research (1991); 267: 385-389

Hutson, J.C.
Minireview; Physiologic interactions between macrophages and leydig cells.
Experimental Biology and Medicine(2006); 231: 1-7

Ichihara, I., Kawamura, H. and Pelliniemi, L.J.
Ultrastructure and morphometry of testicular leydig cells and the interstitial components correlates with testosterone in aging rats
Cell Tissue Research (1993); 271: 241-255

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.
Immunologie
Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin, 5. Auflage 2002

Junqueira, L.C.U., Carneiro, J., Gratzl, M.

Histologie
Springer Medizin Verlag Heidelberg, 6.Auflage 2004

Kern, S., Robertson, S.A., Mau, V.J., and Maddocks S.
Cytokine secretion by macrophages in the rat testis.
Biology of Reproduction (1995); 53: 1407-1416

Kerr, J.B. and Knell, C.M.
The fate of fetal leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis.
Development (1988); 103: 535-544

Kim, I., Ariyaratne, H.B.S. and Mendis-Handagama, S.M.L.
Changes in the testis interstitium of brown norway rats with aging and effects of luteinizing and thyroid hormones on the aged testes in enhancing the steroidogenic potential.
Biology of Reproduction (2002); 66: 1359-1366

Komohara, Y., Hirahara, J., Horikawa, T., Kawamura, K., Kiyota, E., Sakashita, N., Araki, N. and Takeya, M.
AM-3K, an anti-macrophage antibody, recognizes CD163, a molecule associated with an anti-inflammatory macrophage phenotype.
Journal of Histochemistry and Cytochemistry (2006); 54(7): 763-771

Lukyanenko, Y.O., Chen, J.-J., Hutson, J.C.
Production of 25-hydroxycholesterol by testicular macrophages and its effects on leydig cells.
Biology of Reproduction (2001); 64: 790-796

Lukyanenko, Y.O., Chen, J.-J., Hutson, J.C.
Testosterone regulates 25-hydroxycholesterol production in testicular macrophages.
Biology of Reproduction (2002 b); 67: 1435-1438

Meinhardt, A. und Schuppe, H.-Ch.
Immunologie des Hoden: Balance zwischen Immunprivileg und Entzündung.
Reproduktionsmedizin (2003); 19: 257-266

Meinhardt, A., Bacher, M., Metz, C., Bucala, R., Wreford, N., Lan, H., Atkins, R., and Hedger, M.
Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor.
Biology of Reproduction (1998); 59: 371-378

Mendis-Handagama, S.M.L.C., and Ariyarante, H.B.S.

Differentiation of the adult leydig cell population in the postnatal testis.
Biology of Reproduction (2001); 65: 660-671

Miller, S., Bowman, B.M. and Rowland, H.G.
Structure, cytochemistry, endocytic activity, and immunoglobulin (Fc) receptors of rat testicular interstitial-tissue macrophages.
The American Journal of Anatomy (1983); 168: 1-13

Neill, Jimmy D. et all
Knobil and Neill's Physiology of Reproduction.
Volume 1; Third Edition (2006): 1209-1233

Nieschlag, Behre und Nieschlag
Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes
Springer-Verlag (2009), 3.Auflage: 39-41

Philippidis, P., Mason, J.C., Evans, B.J., Nadra, I., Taylor, K.M., Haskard, D.O. and Landis, R.C.
Hemoglobin scavenger receptor CD 163 mediates interleukin-10 and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery.
Circulation Research (2004); 94: 119-126

Pollard, J.W., Dominguez, M.G., Mocci, S., Cohen, P.E., and Stanley, E.R.
Effect of the colony-stimulating factor-1 null mutation, osteopetrotic (csfmOP), on the distribution of macrophages in the male mouse reproductive tract.
Biology of Reproduction (1997); 56: 1290-1300

Rehman, J., Li, J., Orschell, C.M. and March, K.L.
Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors.
Circulation (2003); 107: 1164-1169

Rizk,T., Rebres, R., Vincent, P., Lewis, E., McKeown-Longo,P. and Saba,T.M.
ED1-containing cellular fibronectin release into lung lymph during lung vascular injury with postoperative bacteremia.
American Journal of Physiology (1993); 264: L66-73

Schmidt, A., Sucke, J., Fuchs-Moll, G., Freitag, P., Hirschburger, M., Kaufmann, A., Garn, H., Padberg, W. and Grau, V.
Macrophages in experimental rat lung isografts and allografts: infiltration and proliferation in situ.

Journal of Leukocyte Biology (2007); 81: 186-194

Tapanainen, J., Kuopio, T., Pelliniemi, L-J., Huhtaniemi, I.
Rat testicular endogenous steroids and number of leydig cells between the fetal period and sexual maturity.

Biology of Reproduction (1984); 31: 1027-1035

Tran, N., Servos, G., Haider, S.G.

Ultrastructure of cell contacts of fetal and adult leydig cells in the rat: a systemic study from birth to senium.

Anatomy and Embryology (2006); 211: 273-282

Wang, J., Wreford, N.G.M., Lan, H.Y., Atkins, R., and Hedger, M.P.

Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants.

Biology of Reproduction (1994); 51: 551-561

Wei, R.Q., Yee, J.B., Straus, D.C., and Hutson, J.C.

Bactericidal activity of testicular macrophages.

Biology of Reproduction (1988); 38: 830-835

Welsch, U.

Lehrbuch Histologie

Urban & Fischer Verlag, München-Jena, 2. Auflage 2006

Yee, J.B. and Hutson, J.C.

Testicular macrophages: isolation, characterization and hormonal responsiveness.

Biology of Reproduction (1983); 29: 1319-1326

Yokoi, H., Yamama, Y., Tsuruo, Y., Kawarada, Y., Miura, N., Sugiyama, T. And Ishimura, K.

Leydig cells undergoing apoptosis in the perinatal rat testis.

Acta Histochemica et Cytochemica (1998); Vol. 31, 4: 355-361

Zwaldo, G., Voegeli, R., Schulze Osthoff, K. and Sorg, C.

A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process.

Experimental Cell Biology (1987); 55: 295-304

6. Anhang

Serotec Product Data Sheet

MOUSE ANTI RAT CD68

MCA341R

Clone Number:	ED1
Volume/Quantity:	0.25mg
Product Form:	Purified IgG - liquid
Preparation:	Purified IgG prepared by affinity chromatography on Protein A from tissue culture supernatant
Buffer:	Phosphate buffered saline pH7.4
Preservatives Stabilisers:	0.09% Sodium Azide
Approx. Protein Concentrations:	IgG concentration 0.5 mg/ml
Immunogen:	Rat spleen cells
Fusion Partners:	Spleen cells from immunised BALB/c mice were fused with cells of the SP2/0-Ag14 mouse myeloma cell line.
Isotype:	IgG1 (Mouse)
Specificity:	MCA341R recognises a single chain glycoprotein of 110kD that is expressed predominantly on the lysosomal membrane of myeloid cells. Weak cell surface expression also occurs. The antigen is expressed by the majority of tissue macrophages and weakly by peripheral blood granulocytes. Studies have shown that the antigen recognised by ED1 is the rat homologue of human CD68.

Applications:	Yes	No	Not Tested	Suggested Working Dilution
Flow Cytometry *	■			1/50 - 1/100
Immunohistology - frozen	■			
- paraffin**	■			
- resin			■	
ELISA			■	
Immunoprecipitation	■			
Western Blotting	■			
Radioimmunoassay	■			

Where this antibody has not been tested for use in a particular technique this does not necessarily exclude its use in such procedures. Suggested working dilutions are given as a guide only. It is recommended that the user titrates the antibody for use in their own system using appropriate negative/positive control. * Results maybe enhanced using membrane permeabilisation. Serotec recommend the use of Leucoperm™ (Cat. No. BUF09) for this purpose.

Flow Cytometry: Use 10ul of the suggested working dilution to label 10^6 cells in 100ul.
Method sheets are available on request.

**Recommended
Secondary
Reagents:** IgG Goat anti mouse IgG: FITC (rat adsorbed) - STAR70
IgG Goat anti mouse IgG: RPE (rat adsorbed) - STAR76

Immunohistology: **This product requires protein digestion pre-treatment of paraffin sections e.g. trypsin or pronase

**Recommended
Secondary
Reagents:** Goat anti-mouse IgG: HRP conjugate (rat adsorbed) - STAR77

**Recommended
Negative Controls:** Mouse IgG1 Negative Control - MCA1209

References:

- Damoiseaux, J.G.M.C. *et al.* (1994). Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognised by monoclonal antibody ED1. *Immunol.* 83: 140-147.
- Dijkstra, C.D. *et al.* (1985). The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognised by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunol* 54: 589.
- Bauer, J. *et al.* (1994). Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of Acute and Chronic Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* 38: 365-375.
- Honing, W. *et al.* (2003). The rat macrophage ED1 antigen is identical to CD68 and mediates phagocytosis of oxidized low-density lipoproteins. (submitted)

Storage Conditions: Store at +4°C or at -20°C if preferred.

This product should be stored undiluted.

Storage in frost free freezers is not recommended.

Avoid repeated freezing and thawing as this may denature the antibody.

Should this product contain a precipitate we recommend microcentrifugation before use.

Shelf Life: 12 months from date of despatch.

**Health and Safety
Information:** (A full Health and Safety assessment is available upon request)

This product contains sodium azide: a POISONOUS AND HAZARDOUS SUBSTANCE which should be handled by trained staff only.

Serotec Product Data Sheet

MOUSE ANTI RAT CD163

MCA342R

Clone Number:	ED2
Volume/Quantity:	0.25mg
Product Form:	Purified IgG - liquid
Preparation:	Purified IgG prepared by affinity chromatography on Protein A from tissue culture supernatant
Buffer:	Phosphate buffered saline pH7.4
Preservatives Stabilisers:	0.09% Sodium Azide
Approx. Protein Concentrations:	IgG concentration 0.5 mg/ml
Immunogen:	Rat Spleen cell homogenate
Fusion Partners:	Spleen cells from immunised BALB/c mice were fused with cells of the SP2/0-Ag 14 mouse myeloma cell line.
Isotype:	IgG1 (Mouse)
Specificity:	MCA342R recognises the rat CD163 cell surface glycoprotein, a 175kD molecule also known as ED2. CD163 is expressed by approximately 50% of peritoneal macrophages, a subset of splenic macrophages, and by macrophages in most other tissues. However, it is not expressed by monocytes, alveolar macrophages or microglial cells. * This clone has been described reacting with paraffin-embedded material following PLP fixation (Periodate-lysine-paraformaldehyde) - refer to ref. Whiteland et al (5.)

**Species Cross
Reactivity:** Not tested

Applications: This product has been reported to work in the following applications. This information is derived from testing within Serotec laboratories, from peer-reviewed publications or from personal communications from antibody originators. Please refer to references indicated for further information

	Yes	No	Not Determined	Suggested Working Dilution
Flow Cytometry	■			1/10 - 1/100
Immunohistology - frozen	■			1/500 - 1/1000
- paraffin *	■			
- resin			■	
ELISA			■	
Immunoprecipitation	■			
Western Blotting			■	
Radioimmunoassay			■	

Where this antibody has not been tested for use in a particular technique this does not necessarily exclude its use in such procedures. Suggested working dilutions are given as a guide only. It is recommended that the user titrates the antibody for use in their own system using appropriate negative/positive controls.

Flow Cytometry: Use 10ul of the suggested working dilution to label 10^6 cells in 100ul
Method sheets are available on request.

**Recommended
Secondary
Reagents:** IgG Goat anti mouse IgG: FITC (rat adsorbed) - STAR70
IgG Goat anti mouse IgG: RPE (rat adsorbed) - STAR76

Immunohistology:

**Recommended
Secondary
Reagents:** Goat anti-mouse IgG: HRP conjugate (rat adsorbed) - STAR77

**Recommended
Negative Controls:** Mouse IgG1 Negative Control - MCA1209

References:

- Dijkstra, C.D., Dopp, E.A., Joling, P. and Kraal, G. (1985). *Immunology* 54: 589.
- Beelen, R.H.J., Eestermans, I.L., Dopp, E.A. and Dijkstra, C.D. (1987). *Transpl. Proc.* 19: 3166.
- Barbe, E., Damoiseaux, J.G.M.C., Dopp, E.A. and Dijkstra, C.D. (1990) *Immunobiol.* 182-188.
- Dijkstra, C.D. & Damoiseaux, J.G.M.C. (1993). *Progress in Histochemistry and Immunohistochemistry* 27: 1-65.
- Whiteland, J.L. *et al.* (1995). Immunohistochemical Detection of T-Cell Subsets and other Leucocytes in Paraffin-embedded Rat and Mouse Tissues with Monoclonal Antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 43: 313-320.
- Polfliet, M.M.J. *et al* (2002). Identification of the rat mature macrophage antigen ED2 as CD163: Regulation by glucocorticoids and role in the production of proinflammatory mediators. PhD Thesis. Vrije University, Amsterdam.

Storage Conditions: Store at +4°C or at -20°C if preferred.

This product should be stored undiluted.

Storage in frost-free freezers is not recommended.

7. Zusammenfassung

Die testikulären Makrophagen haben sowohl eine physiologische als auch eine immunologische Bedeutung im Hoden. Die Anzahl, die Zusammensetzung und die Lokalisation innerhalb des Interstitiums dieser Zellen im Rattenhoden ändern sich von der Geburt bis zum Senium. **Ziel** der vorliegenden Arbeit war es, die Kinetik dieser Parameter an Hoden von Wistarratten mittels immunhistochemischer Methoden systematisch von der Geburt bis im Senium (2 Jahre) zu untersuchen.

Material und Methoden: Dazu wurden 5 µm dicke Querschnitte von in Paraffin eingebetteten Wistarratten-Hoden der folgenden Alterstufen angefertigt:

1. Postnataltag (pnd), 5. pnd, 10. pnd, 15. pnd, 20. pnd, 30. pnd, 50. pnd, 100. pnd, nach Abschluss des 2. Lebensjahres. Die Makrophagen wurden immunhistochemisch mithilfe der Antikörper ED1 und ED2 getrennt in Paraffinschnitten markiert. Es wurden die folgenden quantitativen und semiquantitativen Auswertungen vorgenommen:

1. ED1-positive Makrophagen: Gesamtanzahl/ Fläche, perivaskuläre Makrophagen, peritubuläre Makrophagen, Makrophagen in der Nähe von Fetal-Typ Leydig-Zellen (FLC), Makrophagen in der Nähe von Adult-Typ Leydig-Zellen (ALC).

2. ED2-positive Makrophagen: Gesamtanzahl/ Fläche.

Befunde: Sowohl ED1- als auch ED2-Makrophagen wurden niemals innerhalb der Tubuli seminiferi beobachtet. Die Gesamtanzahl von ED1-positiven Makrophagen zeigte 2 Maxima: am 5. pnd und am 100. pnd. Die Mehrheit sowohl der ED1-positiven als auch der ED2-positiven Makrophagen waren perivaskulär im Interstitium lokalisiert. Das Maximum an peritubulären Zellen zeigte sich am 5. pnd. Die Anzahl der ED1-Makrophagen, welche in der Nähe von FLCs lokalisiert waren, fiel mit zunehmendem Alter ab, während sie gleichzeitig häufiger in der Nähe von ALCs beobachtet wurden. Das Maximum der Zellen, die in der Nähe von ALCs lagen, war am 50. pnd.

Der Kurvenverlauf der ED2-Zellen war drei-gipfelig: erster Gipfel am 20. pnd, zweiter am 50. pnd und drittes eindeutiges Maximum bei den 2 Jahre alten Tieren.

Schlussfolgerung: Die vorliegende Arbeit beschreibt die Kinetik der Proliferation der ED1- und der ED2-positiven Makrophagen im Rattenhoden von der Geburt bis zum Senium.

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal die mitotische Teilung der ED1-Makrophagen im Rattenhoden. Es wurde hier erstmals die topographische Lokalisation der Makrophagen im interstitiellen Hodengewebe beschrieben. Die Abnahme der FLCs und die Zunahme der ED1-Makrophagen finden zeitlich parallel statt. Dieser Befund hat eine mögliche Bedeutung für die Apoptose der FLCs und für die Entstehung der Vorläufer der ALCs. Die vorliegende Arbeit bestätigt die Befunde anderer Autoren über eine Zunahme der ED1- und ED2-positiven Makrophagen während der Pubertät. Ein auffälliges Merkmal des Seniums ist eine Zunahme der ED2- Makrophagen mit dem gleichzeitigen Abfall der ED1- Makrophagen.

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. S. G. Haider danke ich herzlich für die freundliche Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit, die stets hervorragende Betreuung und die Geduld.

Frau G. Berthold danke ich für die hingebungsvolle Unterstützung bei der Arbeit im Labor und für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Frau G. Servos danke ich für die technische Unterstützung bei dem Anfertigen der Bilder.

Persönlich möchte ich mich herzlich bei meiner Familie bedanken, meinen Eltern, Penka Ilieva und Trifon Iliev, sowie meiner Großmutter, Nevena Mileva, für ihre geduldige und liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen.

9. Lebenslauf

Nevena Trifonova Ilieva

Persönliche Informationen	Familienstand: ledig Nationalität: bulgarisch Alter: 29, *27.02.1982 Geburtsort: Saedinenie/ Bulgarien
Ausbildung und beruflicher Werdegang	1995 – 2000 Mathematisches Gymnasium „Akademiker Kyril Popov“ mit profilierter Ausbildung Mathematik, Deutsch und Informatik in Plovdiv/ Bulgarien, Abschluss mit dem Abitur (Note 1,0) 2000 – 2001 6 monatigen Deutschkurs Oberstufe an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit DSH-Abschlussprüfung 2001 – 2007 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 03/ 2003 Physikum (Note 3,0) 12/ 2007 Staatsexamen Medizin (Note 2,0) 25.02.2008 Approbation als Ärztin Seit dem 01.07.2008 Assistenzärztin in der Anästhesiologie