

**LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE
UNTERSUCHUNGEN AM HENGSTEJAKULAT
SOWIE BIOCHEMISCHE ANALYSEN DES
SEMINALPLASMAS**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

SANDRA KATHRIN PESCH

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie für Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz sowie dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Bostedt
Prof. Dr. M. Bergmann

**LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE
UNTERSUCHUNGEN AM HENGSTEJAKULAT
SOWIE BIOCHEMISCHE ANALYSEN DES
SEMINALPLASMAS**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Sandra Kathrin Pesch

Tierärztin aus Grefrath

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Bostedt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Bergmann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2005

**Meiner Mutter,
meinem verstorbenen Vater in Liebe
und
Lasse**

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATUR	4
2.1	Elektronenmikroskopischer Aufbau des Hengstspermiums	4
2.2	Allgemeines zum Seminalplasma	10
2.3	Gewinnung des Seminalplasmas	13
2.4	Enzyme im Seminalplasma	14
2.4.1	Aspartat-Aminotransferase (AST).....	15
2.4.2	Alkalische Phosphatase (AP)	17
2.5	Mengen- und Spurenelemente im Seminalplasma.....	18
2.5.1	Mengenelemente	19
2.5.2	Spurenelemente	21
2.6	Gewinnung des Ejakulates.....	23
2.7	Untersuchung des Ejakulates.....	24
2.7.1	Volumen	24
2.7.2	Farbe, Geruch und Konsistenz sowie Beimengungen und Verschmutzungen.....	25
2.7.3	Spermiendichte und –konzentration	25
2.7.4	pH-Wert	26
2.7.5	Vorwärtsbeweglichkeit	26
2.7.6	Anteil lebender und toter sowie pathomorphologisch veränderter Spermien	27
2.8	Einfluss exogener und endogener Faktoren auf bekannte Ejakulatkriterien.....	30
2.8.1	Hodenmaße	30
2.8.2	Sexuelle Stimulation und Libido sexualis.....	31
2.8.3	Häufigkeit der Spermagewinnung.....	31
2.8.4	Saisonalität	32
2.8.5	Tieralter	33
2.9	Fertilität	34
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN:.....	37
3.1	Probandenkollektiv	37
3.2	Methodik.....	41

3.2.1	Probengewinnung	41
3.2.1.1	Entnahmezeitpunkte	41
3.2.1.2	Klinisch-andrologische Untersuchung	41
3.2.1.3	Erfassung der Libido sexualis	42
3.2.1.4	Ejakulatgewinnung	42
3.2.1.5	Gewinnung des Seminalplasmas	43
3.2.2	Durchführung der Analysen	43
3.2.2.1	Makroskopische, chemisch-physikalische und lichtmikroskopische Untersuchung des Ejakulates.....	43
3.2.2.2	Elektronenmikroskopie	45
3.2.2.3	Bestimmung der Enzyme und Mineralstoffe im Seminalplasma.....	48
3.3	Auswertung der Analysen	50
3.4	Statistische Auswertung	51
4.	ERGEBNISSE	53
4.1	Spezielle anamnestische Erhebungen	53
4.2	Beurteilung des Allgemeinzustandes	55
4.3	Spezielle andrologische Untersuchung	55
4.4	Beurteilung der Libido sexualis	56
4.5	Ejakulatuntersuchung.....	59
4.5.1	Makroskopische Untersuchung	59
4.5.2	pH-Wert	61
4.5.3	Mikroskopische Untersuchung.....	61
4.5.4	Vergleichende Darstellung dreimal untersuchter Probanden.....	67
4.6	Elektronenmikroskopie	69
4.6.1	Beobachtungen am Akrosom	70
4.6.2	Kopfveränderungen	76
4.6.3	Beobachtungen an der Geißel – Querschnitt.....	80
4.6.3.1	Proximaler Bereich (a bis c)	80
4.6.3.2	Bereiche d bis i/k.....	83
4.6.4	Beobachtungen an der Geißel – Längsschnitt.....	86
4.6.5	Sonstige Beobachtungen.....	91
4.7	Enzyme	94
4.7.1	Aspartat-Aminotransferase (AST).....	94
4.7.2	Glutamat-Dehydrogenase (GLDH)	95

4.7.3	Gamma-Glutamyltransferase (GGT).....	95
4.7.4	Alkalische Phosphatase (AP)	96
4.7.5	Saure Phosphatase (SP)	96
4.7.6	Creatininkinase (CK).....	97
4.7.7	Laktat-Dehydrogenase (LDH).....	97
4.8	Mengen- und Spurenelemente.....	98
4.8.1	Natrium	98
4.8.2	Kalium.....	99
4.8.3	Kalzium.....	99
4.8.4	Magnesium	100
4.8.5	Anorganisches Phosphat.....	100
4.8.6	Chlor	101
4.8.7	Eisen.....	101
4.8.8	Kupfer	101
4.8.9	Zink.....	102
4.9	Ergebnisse Sonderfall H 12.....	102
4.10	Korrelationen der untersuchten Parameter	106
4.10.1	Korrelationen der Parameter in der Grundgesamtheit	106
4.10.2	Vorhandene Korrelationen bei Berücksichtigung der Saisonalität der Proben.....	108
4.10.3	Korrelationen elektronenmikroskopischer Parameter	110
4.11	Einfluß der Ejakulatqualität auf die untersuchten Parameter.....	112
4.12	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse in Abhängigkeit der Fertilität der Probanden.....	116
5.	DISKUSSION	119
5.1	Elektronenmikroskopie	120
5.1.1	Akrosomenveränderungen	121
5.1.2	Kopfveränderungen	127
5.1.3	Geißelveränderungen	130
5.1.4	Sonstige Beobachtungen.....	133
5.2	Biochemische Analysen des Seminalplasmas	136
5.2.1	Enzyme.....	136
5.2.2	Mengen- und Spurenelemente	145

5.3	Saisonale Differenzen der konventionellen Untersuchungsergebnisse.....	154
5.4	Sonderfall H 12 - Urinbeimengungen	156
5.5	Einfluß der Ejakulatqualität auf die untersuchten Parameter.....	156
5.6	Korrelationen zwischen Fertilität und lichtmikroskopi- schen Parametern	158
6.	ZUSAMMENFASSUNG	161
7.	SUMMARY	166
8.	LITERATURVERZEICHNIS	170
9.	ANHANG	209
9.1	Standardsubstanzen, Reagenzien, Materialien und Geräte	209
9.1.1	Elektronenmikroskopie:	209
9.1.2	Enzyme.....	210
9.1.3	Mineralstoffe	213
9.1.4	Materialien und Geräte	217
10.	DANKSAGUNG.....	219

1. EINLEITUNG

Die Analyse von Hengstejakulaten beruht im Allgemeinen auf makroskopisch-physikalischer sowie lichtmikroskopischer Untersuchungstechnik. Damit können die wesentlichsten Feststellungen gemacht werden, die eine Abschätzung der Fertilitätschancen ermöglichen. Differenziertere Aussagen allerdings, die beispielsweise die Beschaffenheit der Akrosomenkappe oder die Mikrostruktur der Geißel betreffen, sind verständlicherweise damit nicht möglich. Aus dem Wissen heraus, dass ein Teil der Fertilitätsstörungen beim Hengst aufgrund subtiler Ursachen mit den angewandten und etablierten Verfahren bislang ungeklärt bleibt, wurde eine eingehende Literaturrecherche zu diesem Thema durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass Ansätze bereits aus dem Jahr 1979 vorliegen, die Beurteilung des Ejakulates vom Hengst durch elektronenmikroskopische Befunderhebungen intensiver zu gestalten. Allerdings musste erkannt werden, dass es sich nur um wenige Arbeiten handelt. Bei diesen liegt der Schwerpunkt eher auf der Beschreibung pathologischer Einzelfälle als auf der des physiologischen Aufbaues intakter Hengstpermien.

Ein weiterer ungeklärter Punkt ist die biochemische Zusammensetzung des Seminalplasmas. Auch auf diesem Teilsektor gibt es in der Literatur nur einzelne Hinweise, wobei sich diese hauptsächlich auf Mensch, Eber und Bulle beziehen. Über Elektrolyte und Enzyme im equinen Seminalplasma ist bisher keine umfassende, übergreifende Studie publiziert. So ist es ungeklärt, inwieweit sich Konzentrationsänderungen bestimmter Elemente fördernd oder hemmend auf die physiologischen Parameter des Samens und die Fertilitätsleistung auswirken können. Andeutungsweise wurde aber in der Literatur festgestellt, dass bei Vorliegen einer

Pathospermie partielle Veränderungen in der Zusammensetzung des Seminalplasmas vorliegen.

Als Resümée der Literaturrecherche war festzustellen, dass weder die elektronenmikroskopische Untersuchung der Spermatozyten noch die biochemische Analyse des Seminalplasmas eine erschöpfende Abhandlung fanden, die eine Umsetzung im klinischen Alltag zulassen würden. Dies bedeutet auch, dass bisher keine generellen Aussagen mit den meisten dieser Methoden zu treffen und die genannten Fragestellungen nicht endgültig beantwortet sind.

Diese Problematik stellte somit die Grundlage dieser Studie dar. Aufgrund der mangelnden Kenntnisse in beiden Teilbereichen, Elektronenmikroskopie und biochemische Analysen des Seminalplasmas, erwies es sich als Notwendigkeit, die normalen, physiologischen Verhältnisse anhand von Ejakulaten fertiler Hengste umfassend festzulegen. Diese daraus resultierenden Ergebnisse sollten, ebenso wie die aus der Literatur bekannten Phänomene, die Grundlage darstellen für eine differenzierte Bewertung von Spermienkonfigurationen und -strukturen. Ziel war hierbei, Sub- sowie Infertilitätsfälle bei Hengsten zu identifizieren und sofern möglich deren Ursachen zu eruieren.

Da die aufgeworfene Gesamtproblematik in einer bemessenen Zeit selbst bei zur Verfügungstellung von genügend Probanden nicht zu behandeln gewesen wäre, konzentriert sich die Arbeit auf folgende thesenhafte Überlegungen:

Welche Möglichkeiten bestehen, die morphologische Beurteilung mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmetechnik zu verbessern?

Kann ein Standard der Elektronenmikroskopie in Korrelation zur lichtmikroskopischen, aber auch zur makroskopisch-physikalischen Untersuchungstechnik festgelegt werden?

Ist es möglich, diesen Standard zu den Fertilitätsdaten in Bezug zu setzen?

Welcher Zusammenhang besteht zwischen den elektronenmikroskopisch und lichtmikroskopisch erhobenen Befunden und der Analyse des Seminalplasmas?

Die Untersuchungen sollten primär an Hengsten mit nachgewiesener Fertilität, sekundär an Vatertieren mit Sub- respektive Infertilität nach klassisch etablierten Methoden (Lichtmikroskopie) und mittels erweiterter Untersuchungstechnik, Transmissions-Elektronenmikroskopie und Erfassung von Konzentrationen klinisch-chemisch relevanter Parameter im Seminalplasma durchgeführt werden. Bewusst wurden Hengste aus verschiedenen Beständen ausgewählt, um so eine allgemeine Übersicht zu gewinnen.

2. LITERATUR

2.1 Elektronenmikroskopischer Aufbau des Hengstspermiums

Während bei der Lichtmikroskopie die Konfiguration des Spermiums – bestehend aus Kopf, Hals und Schwanz – erfasst werden kann, gestattet die Transmissions-elektronenmikroskopie, auf die in diesem Zusammenhang ausschließlich eingegangen werden soll, Einblicke in die inneren Feinstrukturen desselben. So ist eine Differenzierung der Geißel in Mittel-, Haupt- und Endstück im elektronenmikroskopischen Schnitt deutlich zu erkennen. Auch die das gesamte Spermium umhüllende Plasmamembran kann in ihrer Vollständigkeit einer Beurteilung unterzogen werden.

Zunächst sollen grundsätzliche Strukturen eines Spermatozoons (siehe dazu schematische Übersicht eines Humanspermiums, Abb.1), wie sie bei allen Säugetieren sowie dem Menschen vorkommen, beschrieben werden (ROVAN, 2001; SINOWATZ, 2001). Im Folgenden werden dann zusätzlich die Besonderheiten des Hengstspermiums und die in der Literatur erwähnten pathomorphologischen Veränderungen aufgeführt.

Die sogenannte Kopfkappe oder das *Akrosom* leitet sich vom Golgi-Apparat der Spermatide ab und ist mit seinen hydrolytischen Enzymen (Akrosin, Hyaluronidase, diverse Hydrolasen und Esterasen) maßgeblich an dem Durchdringen der Corona radiata und der Zona pellucida der Eizelle beteiligt. Der distale, schmalere Anteil wird als Äquatoralsegment bezeichnet. Dieser Bereich verschmilzt mit dem postakrosomalen Anteil gemeinsam bei der Befruchtung mit der Eizellmembran.

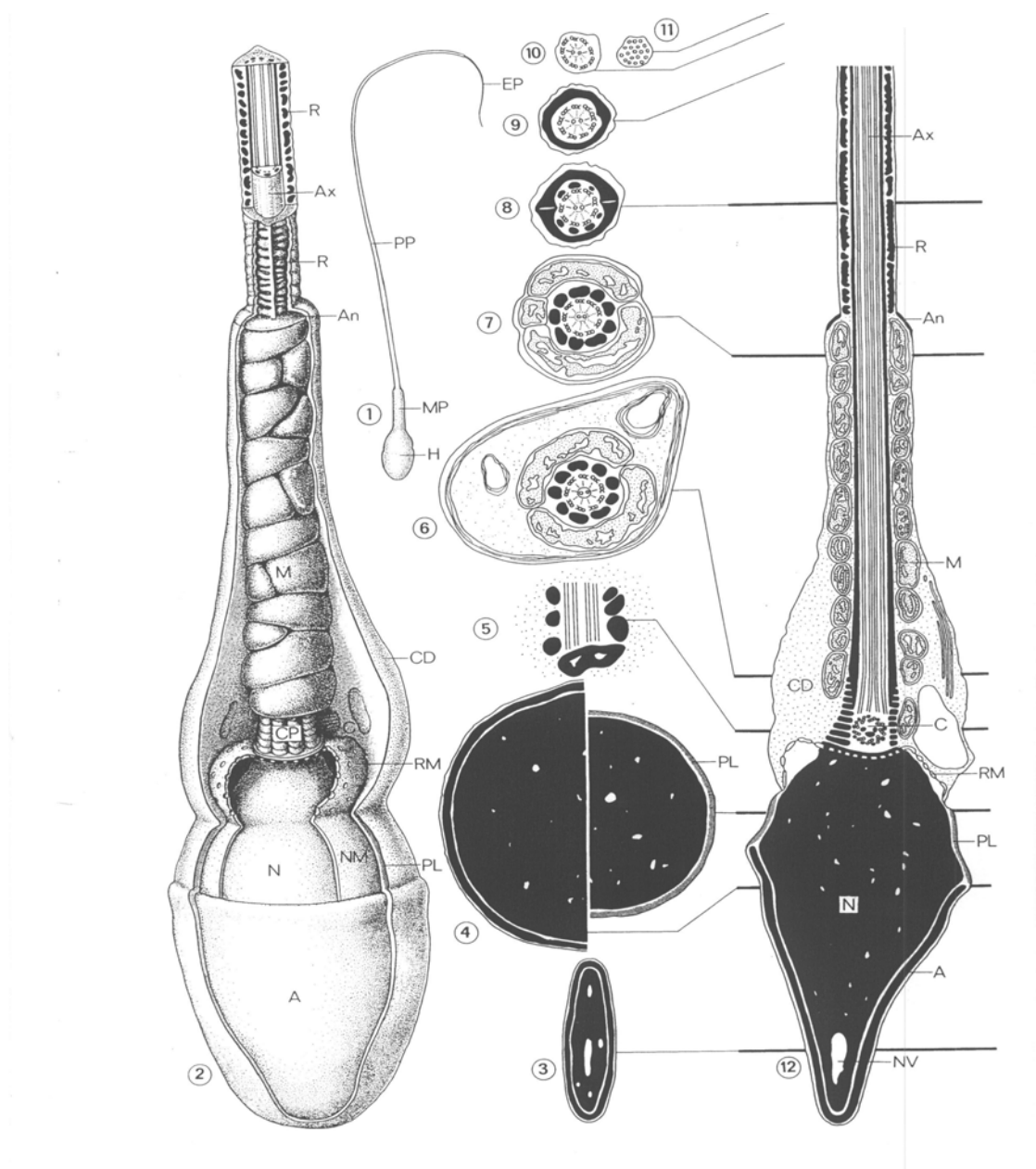
Der *Spermienkopf* besteht hauptsächlich aus dem Zellkern. Dieser erstreckt sich von der Kopfspitze bis zum Halsbereich. Die umgrenzende Membran ist - mit Ausnahme im

Halsbereich – porenlos und der inneren Akrosomenmembran angelagert. Durch die hohe Kondensation des Chromatins erscheint der Kern sehr elektronendicht und strukturlos. Nur dort, wo Kernporen sind, ist ein geringer Anteil noch unkondensiert. Chromatinfreie Areale im Kern werden als Vakuolen bezeichnet. Es wird vermutet, dass der distale Abschnitt der Kernmembran im Halsbereich als Widerlager und Anheftungsstruktur für die Implantationsgrube aus den Mantelfaserproteinen dient. Im Bereich zwischen Kopf und Hals ist die Basalplatte lokalisiert. In diesem Abschnitt weist die Kernmembran oftmals Poren auf.

Beim *Hals* handelt es sich um den kurzen, verjüngten Anteil unmittelbar hinter dem Kopf. Er ist charakterisiert durch ein senkrecht orientiertes Zentriolenpaar und Mantelfasern („outer dense fibers“). Das proximale Zentriol steht senkrecht zum distalen und ist über einen Anheftungskomplex mit dem Halscytoskelett verbunden. Das distale Zentriol oder der Basalkörper ist ein zylinderförmiges Organell, dessen Wand aus 9 Tubulstriplets besteht. Zwischen den benachbarten Triplets sowie den Triplets und dem Zentrum bestehen proteinartige Verbindungen. Die beiden äusseren Tubuli des Triplets werden durch Polymerisation zu den 9 Mikrotubulusdupletten des axonemalen Komplexes.

Das *Mittelstück* ist charakterisiert durch die mitochondriale Spirale, welche den axonemalen Komplex und die 9 Mantelfasern umgibt. Die Grenze zwischen Mittel- und Hauptstück wird vom Anulus, einem Aktinfilamentring, gebildet. Statt der Mitochondrien liegen hier Proteine außen an der Geißel. Diese Proteine bilden längsorientierte Säulen, die Ringfasern, welche über Querrippen verbunden sind. Das *Hauptstück*, der längste Anteil des Schwanzes, ist durch die fibrillären Fasern gekennzeichnet. Das *Endstück* ist relativ kurz und dünn. Hier sind weder „fibrous sheaths“ noch äußere Mantelfasern vorhanden. Außerdem fehlt teilweise das zentrale

Mikrotubuluspaar. Das Axonema spaltet sich in 20 einzelne, unterschiedlich lange Mikrotubuli auf.



Legende:	H Kopf	RM Ringmanschette	N Nukleus
	MP Mittelstück	CP Zentriolenpaar	R Ringfasern
	PP Hauptstück	C Zentriole	NM Kernmembran
	EP Endstück	CD Cytoplasmatropfen	Ax Axonem
	A Akrosom	M Mitochondrien	NV Kernvakuole
	An Anulus	PL postakrosomale Membran	

Abb. 1: Aufbau des Spermiums (entnommen aus HOLSTEIN, A.F. und ROSEN-RUNGE, E.C. Atlas of human spermatogenesis, Grosse Verlag, Berlin, 1981)

Während für *Hengstpermien* genaue lichtmikroskopische Beschreibungen vorliegen (siehe Kapitel 2.7 Untersuchung des Ejakulates sowie 2.7.8 Pathomorphologie), gibt es über die physiologische transmissionselektronenmikroskopische Struktur nur eine Publikation: BIELANSKI und KACZMARSKI (1979) stellten in ihr heraus, dass *Hengstpermien* viele typische Charakteristika anderer reifer Säugerspermatozoen besitzen, aber auch einige Besonderheiten: Die equinen Spermien zeichnen sich durch einen asymmetrischen Kopf, eine abaxiale Schwanzposition, ein kleines Akrosom sowie Mikrotubuli am Hals aus. Die Plasmamembran liegt im Bereich des Mittelstückes dicht auf der darunter liegenden Membran. Allerdings muss hierbei betont werden, dass die Autoren nur Ejakulate von drei fertilen Hengsten untersuchten.

Ultrastrukturelle pathomorphologische Veränderungen:

Zunächst sollen Schäden an den Akrosomenkappen betrachtet werden, wobei beim Hengst bisher nur wenige Arbeiten darüber angefertigt wurden. Anomalien des Akrosoms werden meist mit abnormer Spermiogenese, Sub- oder sogar Infertilität assoziiert. Ursachen können, wie auch bei anderen Spezies beschrieben, prolongierte Sexuallkarenz (BLOM, 1945), Zelltod (AUSTIN und BISHOP, 1958) und die Art der Spermienfixation (JOHNSON et al., 1976; HARASYMOWYCZ et al., 1976, HURTGEN und JOHNSON, 1982) sein. Weiterhin sind Vakuolen im Akrosom sowie im Kern beschrieben (HURTGEN und JOHNSON, 1982). HURTGEN und JOHNSON (1982) erwähnten auch, dass alle Veränderungen, mit Ausnahme der Akrosomen-degeneration und der Kernvakuolen, regelmäßig beobachtet werden können. Mit amorphem Material gefüllte Höhlen im Akrosom, die sich durch die Umhüllung mit 2 Membranen sowie der Plasmamembran auszeichnen und eine große Ähnlichkeit zu Cytoplasmatropfen besitzen, sind ebenfalls bekannt. Eine Protrusion des Akrosoms,

welche als „knobbed sperm defect“ benannt wird und häufig gemeinsam mit anderen morphologischen Defekten auftritt, wurde ebenfalls von HURTGEN und JOHNSON (1982) publiziert. Den betroffenen Spermien fehlt die Fähigkeit der Adhäsion mit der Zona pellucida, was je nach Ausprägung Ursache von Sub- oder Infertilität ist. Dies konnte beim Pferd nicht vollständig bewiesen werden, wohl aber bei Bulle und Eber.

Beim Hengst sind durchscheinende, membrangebundene Vesikel in der *Akrosomal*- und *Mittelstück*region beschrieben (ABRAHAM-PESKIR et al., 2000). Anhand der Untersuchung von je einem Ejakulat zweier Hengste äußern sich die Autoren wie folgt: „The vesicles were formed by separation and expansion of the plasmalemma away from the underlying structure... We suggest that these structures form part of the normal ultrastructure of spermatozoa...“. Differentialdiagnostisch sind dazu proximale Cytoplasmadroplets abzugrenzen, welche ein Zeichen von Unreife sind. Diese stellen sich aber dicht dar und enthalten Golgi-ähnliche Organellen. Außerdem kommen sie relativ gesehen seltener vor.

Bereits BIELANSKI und KACZMARSKI (1979, 1980) erwähnen bei 3 von 3 respektive bei 7 von 14 Hengsten sowie auch HEATH (1981) Mikrotubuli in der *Hals*region, deren Ursprung in der Manschette vermutet wird. Die Manschette ist eine mikrotubuläre Organelle, welche während der Spermiogenese existent ist. Sie liegt hinter dem Nuklearring und ist nach distal bis in den cytoplasmatischen Kragen ausgedehnt, welcher das künftige Mittelstück umgibt. Von der Manschette bleibt zunächst noch diese mikrotubuläre Organelle, welche später degeneriert. Bei reifen Spermien des Nebenhodenschwanzes fehlt diese. Das Auftreten solcher Mikrotubuli kann also eventuell, wie bei anderen Spezies auch, als Anomalie angesehen werden (GOODROWE und HEATH, 1984; HEATH und OTT, 1982; PEDERSEN und HAMMEN, 1982). GOODROWE und HEATH (1984) standen Proben von 15 Hoden

sowie dazugehörigen Nebenhoden zur Verfügung. HEATH und Mitarbeitern (1985), die 18 Ejakulate von 9 Hengsten zur Abklärung erwarteter Spermienanomalien untersuchten, publizierten über das Vorhandensein mikrotubulärer Defekte bei 7 dieser Hengste. Die Autoren berichten: „...for a total of 4 out of the 7 stallions were considered subfertile when the defect was first observed. Fertility improved with the time, either during the first breeding season or when a given stallion was used less frequently; however the MM (= **M**icrotubular **M**ass Defect) persisted....”. Bei der Untersuchung der Spermien fallen kleine unregelmäßige Protrusionen in der Halsregion in Kombination mit losen Köpfen und Schwänzen auf. Davon müssen proximale Cytoplasmadroplets und auch abnorme Mittelstücke abgegrenzt werden. Charakteristisch für die mikrotubulären Defekte sind stark verdrehte Mikrotubuli, die untereinander keine Arme oder Brücken ausbilden und einen circa 20 % kleineren Durchmesser aufweisen. Als mögliche Ursache für diesen Defekt könnte ein Mangel an bestimmten Proteinfilamenten in Erwägung gezogen werden. Eine genetische Komponente wird beim Pferd aufgrund einer gehäuften Kombination dieses Befundes mit familiärer Subfertilität nicht ausgeschlossen.

Geißeldefekte, insbesondere Abweichungen vom 9 x 2 + 2- Tubulmuster des Spermenschwanzes, sollen ebenso wie Akrosomenveränderungen eine Rolle bei Infertilität spielen. Die Spermien sind dann oft unbeweglich und können so die zu befruchtende Eizelle nicht erreichen. In der Literatur ist ein Hengst mit einem elektronenmikroskopisch nachweisbaren Verlust der Mikrotubuli des Axonems sowie einem disorganisierten Mittelstück beschrieben (HELLANDER et al., 1991). Lichtmikroskopisch fiel bei der Ejakulatuntersuchung dieses Hengstes auf, dass die Spermien keine Motilität sowie circa 90 % Mittelstück- und Schwanzdefekte aufwiesen. Weiterhin können für reduzierte Motilität Defekte oder – seltener - Anomalien der periaxonemalen Strukturen eine Ursache sein. Darunter werden zum Beispiel abnorme

Grösse oder Position der Mantelfasern („dense fiber“) und Anomalien der Mitochondrienscheide (einzelne Mitochondrien oder unorganisierte Scheide) verstanden, die beim Menschen Beschreibung fanden (COURTADE et al., 1998).

Von den Arbeitsgruppen um ARIENTI (1998) sowie um MINELLI (1998) wurden im equinen Samen prostasomenähnliche Vesikel nachgewiesen, welche aber keine direkten Veränderungen an den Spermien selbst, sondern nur im Seminalplasma darstellen. Elektronenmikroskopisch erscheinen die Partikel bei niedriger Vergrößerung elektronendicht, bei hoher Vergrößerung ist eine Lipiddoppelmembran zu sehen, welche wenig organisiertem, elektronendichtem Material anliegt. In der Literatur wird beim Hengst von einer Herkunft aus der Prostata ausgegangen. Es gilt als erwiesen, dass die Prostatasomen die Motilität ejakulierter Spermien verbessern und auch auf zahlreiche andere biologische Funktionen Einfluss nehmen, zum Beispiel die Immunsuppression bei der Befruchtung. Des Weiteren wird speziell beim Hengst, im Gegensatz zu anderen Spezies, von einem positiven Effekt auf die Fruchtbarkeit ausgegangen (ARIENTI et al., 1998; MINELLI et al., 1998).

2.2 Allgemeines zum Seminalplasma

Das Ejakulat besteht aus einer zellulären Fraktion, den Spermien, und einer flüssigen Fraktion, dem Seminalplasma. Beim Seminalplasma im engeren Sinn handelt es sich ausschließlich um die Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Im weiteren Sinne werden die Sekrete des Hodens, des Nebenhodens, des Ductus deferens und der Littre-Drüsen (kleine Harnröhrendrüsen) dazu gezählt. Das Seminalplasma macht je nach Tierart circa 75 – 85 % des Ejakulatvolumens aus.

Als spermienfreier Anteil des Ejakulates enthält das Seminalplasma zusätzlich noch Zellen und Zellpartikel. Die Inhaltsstoffe sind sehr unterschiedlich zusammengesetzt, mit einer zum Teil sehr großen tierartlichen und individuellen Varianz, wobei der grösste Anteil (circa 75 %) aus Wasser besteht. Insgesamt handelt es sich beim Seminalplasma um eine isotonische, klare, neutrale Flüssigkeit mit einem durchschnittlichen pH zwischen 7,0 bis 7,2.

Der Hengst weist eine Durchschnittsmenge an Seminalplasma von 70 ml (Minimum 30 ml, Maximum 300 ml) auf, wobei Ampulle und Seminalvesikel die Hauptherkunftsorte sind. Im Seminalplasma sind neben Hormonen Fruktose, Zitronensäure, Inositol, Ergothionine, Glycerolphosphorylcholin, aber auch Makroelemente, wie Natrium und Kalzium, und Mikroelemente, wie Zink, enthalten. Der genaue Syntheserespektive Speicherungsort der einzelnen Stoffe lässt sich beim Hengst durch die „Splitejakulatmethode“ nachweisen. Unter der Splitejakulatmethode ist die fraktionierte Gewinnung des Spermas bei der Absamung zu verstehen (BADER und HÜTTENRAUCH, 1966; SETCHELL, 1977). Gleichzeitig können durch Analyse der Inhaltsstoffe der einzelnen Fraktionen des Splitejakulates Anomalien im Funktionsstatus der verschiedenen akzessorischen Geschlechtsdrüsen sowie im Gesamtablauf der Ejakulation aufgedeckt werden (MANN und LUTWACK-MANN, 1981).

Das Seminalplasma hat verschiedene Funktionen: Einerseits fungiert es als Puffer, um schädliche Stoffwechselprodukte der Spermien zu neutralisieren. Andererseits ist es für den Transport der Spermien im männlichen Reproduktionstrakt während der Ejakulation und im Anschluß daran für den Weitertransport im weiblichen Genitaltrakt verantwortlich. Zuvor werden aber die noch unbeweglichen Spermien aktiviert. Eine große Bedeutung spielt hierbei das Prostata-spezifische Antigen (PSA) beim Menschen,

was im Jahr 2002 erkannt wurde (ELZANATY et al., 2002). Beim Pferd ist der genaue Faktor der Aktivierung noch nicht bekannt. Das Seminalplasma stellt die Ernährung der in den weiblichen Genitaltrakt ejakulierten Spermien sicher. Außerdem hat das Seminalplasma eine Bedeutung für den Epithelschutz des Reproduktionstraktes und der Samenzellen vor frei gewordenem Akrosin aus Spermienköpfen durch Proteaseinhibitoren. Es spielt eine bedeutende Rolle bei der Immunsuppression während der Befruchtung und ist auch an der Kapazitierung beteiligt. Des Weiteren wird dem Seminalplasma ein Mitwirken bei der Entwicklung des Ei-Rezeptors von Spermien während der Epididymidispassage zugeschrieben sowie eine gewisse Bakterizidie, die insbesondere bei Uterusbesamern Infektionen nach der Bedeckung oder Besamung verhindert beziehungsweise die lokale Infektionsgefahr minimiert.

Der Einfluss des equinen Seminalplasmas auf Vorwärtsbeweglichkeit und Fertilität wird kontrovers diskutiert. PICKETT und Mitarbeiter (1975, a) gehen von einem adversen Effekt aus und berichten zusätzlich von schädlichen Auswirkungen auf das Ejakulat bei zu starker Verdünnung sowie vollständigem Entfernen des Seminalplasmas. Auch MARDEN und WERTHESEN (1956) sowie BRAUN und Koautoren (1994) sehen den adversen Effekt auf die Vorwärtsbeweglichkeit, wobei die letzt genannten Autoren zusätzlich Gefrierschutz des Seminalplasmas propagieren und es artifiziell zu Hengstspermien im Rahmen der Kryokonservierung hinzufügen. Andere Autoren, wie SMITH und POLGE (1950), die Arbeitsgruppe um RAJAMANNAN (1968) sowie NISHIKAWA und Koautoren (1968) respektive NISHIKAWA (1972) sehen dagegen eine Reduktion der Motilität von tiefgefrorenen und im Anschluß aufgetauten Spermien, sofern das Seminalplasma nicht vor der Tiefgefrierung entfernt wurde.

2.3 Gewinnung des Seminalplasmas

Das Seminalplasma kann entweder aus dem Gesamtejakulat gewonnen werden oder aus einem Splitejakulat, wodurch die einzelnen Fraktionen getrennt aufgefangen werden. So sind unabhängig von der Ausgangsflüssigkeit verschiedene Methoden gängig: Seminalplasma kann durch Zentrifugation oder alternativ durch Filtration mit Hilfe von Cellulose-Acetat-Membranen mit einer Maschenweite von 0,45 µm (BARRIER-BATTUT et al., 2002), Sephadex-Glaswolle oder Glasperlen, einem Verfahren mit Leukozytenabsorptionsfilter, der SpermPrep-Methode mit Polysaccharidkugeln und der Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen werden. Weiterhin sind die Transmigration, insbesondere Swim up-, -down- und -over-Techniken, und die Chemotaxis zu erwähnen (alle Methoden siehe SIEME et al., 1998).

Bei der Zentrifugation, welche am häufigsten eingesetzt wird, sind verschiedene Angaben bezüglich der notwendigen Gravitations(g)-Zahl in der Literatur vorhanden. Allerdings wird nie erwähnt, warum welche g-Zahl verwendet wurde. So zentrifugierte die Arbeitsgruppe um AMANN (1987) equines Sperma zunächst bei 1100g über 5 Minuten; nach Abhebern des Überstandes wurde derselbe 10 Minuten bei 12000 g zentrifugiert. Andere Autoren zentrifugieren bei geringeren g-Zahlen: BRINSKO und Mitarbeiter (2000) verwendeten 400 g über 12 Minuten, CARVER und BALL (2002) 300 g über 5 Minuten. Danach wurde das Seminalplasma unmittelbar weiter untersucht. Die Arbeitsgruppe von BALL (2000) setzte zur Gewinnung des Seminalplasmas 3000 g über 10 Minuten ein. LANDECK (1997) zentrifugierte Hengstejakulate zweimal bei 2.800 U/min (entspricht circa 900 g). Wichtig sind hierbei insbesondere, wie immer erwähnt wird, eine der Desemination unmittelbar angeschlossene Aufarbeitung sowie der lichtmikroskopischer Ausschluß des Vorhandenseins von Spermatozoen. Bei nicht spermienfreiem Samenplasma kann es zu verfälschten Messergebnissen kommen, weil

durch erhöhte Permeabilität der Membranen intraspermal lokalisierte Enzyme nachträglich ausströmen und bei der Analyse mit erfasst werden (exemplarisch erwähnt bei GASTAUER, 1974, bezüglich erhöhter AST-Aktivitäten).

Die Bestimmung von Enzymen und Mineralstoffen aus dem Seminalplasma kann heute praktischerweise, wie bereits von AMANN und Mitarbeitern (1987) für Elektrolyte beschrieben, mit Hilfe von handelsüblichen automatischen Analysegeräten für Enzym- und Mineralstoffbestimmung aus dem Serum erfolgen (zum Beispiel EFOX 5053 Eppendorf oder ABL 615 von Radiometer, Copenhagen für Enzyme und EPAC 6140 Eppendorf oder EPAC 5430-TM für Mineralstoffe). Einzige Voraussetzung hierfür ist, dass das gewonnene Seminalplasma klar und ohne feste Bestandteile, wie Fibrin, sein muss. Dies eröffnet aber wiederum auch die Möglichkeit, diese Verfahren in die Routinediagnostik aufzunehmen.

2.4 Enzyme im Seminalplasma

Die biochemische Schätzung / Bestimmung der intra- und extrazellulären Verteilung von Komponenten des Spermas kann Informationen über die Intaktheit und Funktion der Spermienzellmembran geben. Der Anteil der Zellen mit intakter Plasmamembran wird durch Enzymaktivitäten sowie Metabolitengehalte in oder ausserhalb der Zelle widerspiegelt. Die Enzyme im Seminalplasma entsprechen denen der Spermatozoen, mit Ausnahme von Akrosin, welches im Seminalplasma nicht enthalten ist.

Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang auch die Arbeit von GUERIN und Mitarbeitern (1979), die folgendes herausstellten: „Deep freezing does not modify the hydrolytic enzymes of human sperm either quantitatively or qualitatively, but the

dehydrogenases of the hexose monophosphate shunt are adversely affected (60 % loss of activity for G 6 PDH...); LDH is not affected.” Dies ermöglicht bei Bestimmung bestimmter Enzyme, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollen, eine Kryokonservierung der Proben.

2.4.1 Aspartat-Aminotransferase (AST)

Ein gesicherter Zusammenhang zwischen Spermienzahl, Motilität sowie Befruchtungsvermögen zum Vorkommen des Enzyms AST ist im Ejakulat von verschiedenen Spezies bekannt. Weiterhin beschreiben diverse Autoren dieses Enzym als Indikator für den Grad der Samenzellschäden (unter anderem ROUSSEL und STALLCUP, 1965; PACE und GRAHAM, 1970; HILLMANN und TREU, 1973, 1974), was von PACE und GRAHAM (1970) so erklärt wird, dass es bei Schädigung der Spermien zu Inaktivierung beziehungsweise Zerstörung der Zellmembran kommt und so intrazelluläre Enzyme austreten können (siehe dazu auch 2.5).

Nach HILLMANN und TREU (1974) ergeben sich „hochgesicherte Beziehungen zwischen GOT-Freisetzung (= AST) ... und dem Anteil morphologisch abweichender Samenzellen ($r = 0,477$), wobei eine starke Abhängigkeit vom Anteil kopfkappengeschädigter Spermien ($r = 0,513$) auf ein primär akrosomales Vorkommen der GOT im Hengstsperma hindeutet.“ Heute ist allerdings bekannt, dass die AST ihre exakte Lokalisation im Mittelstück hat (KOSINIAK und BITTMAR, 1991). Aufgrund von Membranschädigung in diesem Bereich der Geißel kommt es zum Austritt des Enzyms ins Seminalplasma und zu einer Blockade der Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion, was Immotilität der Spermien zur Folge hat (COLENBRANDER et al., 1992). Die hochgesicherten Beziehungen zwischen AST-Freisetzung und Bewegungsaktivität der

Spermien publizierten auch bereits HILLMANN und TREU 1974. PICKETT und Mitarbeiter (1983) konnten allerdings ebenso wie KOSINIAK und BITTMAR (1991) allerdings im Rahmen ihrer Untersuchungen den Zusammenhang zur Motilität nicht bestätigen.

Es ist allgemein bekannt, dass geringfügig geschädigte Spermien bereits eine schlechtere Befruchtungsfähigkeit haben. Damit konform geht auch die Aussage von STRZEZEK (1987), welcher eine enge Korrelation zwischen der freigesetzten AST-Menge und der Befruchtungskapazität sieht.

KOSINIAK und BITTMAR (1991) untersuchten die AST-Aktivität vergleichend in zur Tiefgefrierung geeigneten sowie ungeeigneten Hengstejakulaten und fanden bei der zweiten Gruppe eine fast doppelt so hohe Aktivität (siehe Tabelle 1). Die AST scheint demnach als Indikator für Tiefgefrierfähigkeit geeignet zu sein (AMANN et al., 1987; KOSINIAK und BITTMAR, 1991; BITTMAR und KOSINIAK, 1992)

Bei allen Untersuchungen fallen starke Schwankungen auf, die sich aus Probanden (Rasse, Alter, Individuum selber), Meßmethode sowie Art der Seminalplasma-gewinnung und Lagerung begründen.

Tabelle 1: Referenzwerte für die AST-Konzentration im Sperma des Hengstes

Material	Proben	AST-Aktivität	Quelle
Sperma	n= 63	38,8 ± 28,6 U/l 187,8 ± 118,4 mU/10 ⁹ Spermien	HILLMANN und TREU, 1974
Sperma (zur Tiefgefrierung geeignet)	n= 185	54,3 miu/10 ⁹ Spermien	KOSINIAK und BITTMAR, 1991
Sperma (zur Tiefgefrierung ungeeignet)	n= 150	99,0 miu/10 ⁹ Spermien	

2.4.2 Alkalische Phosphatase (AP)

Die Funktion der AP liegt in der Hydrolyse von Phosphorsäureestern, wie Fruktose-1-Phosphat, Fruktose-6-Phosphat, Fruktose-1,6-Diphosphat.

Ein Vorkommen der AP ist nach SOUCEK und VARY (1984) im Seminalplasma, in Protoplasmatropfen sowie gekoppelt an die Spermienmembran erwiesen. Nach MANN und LUTWACK-MANN (1981) lassen sich eine Phosphatasen-Aktivität der Spermien einerseits und eine des Seminalplasmas andererseits differenzieren.

TURNER (1996) wies nach, dass der Hauptanteil der AP beim Hengst aus Hoden und Nebenhoden stammt. Gemeinsam mit SERTICH stellte er (TURNER und SERTICH, 2001) eine Eignung der AP-Bestimmung bei der Differenzierung von Oligo-beziehungsweise Azoospermien heraus (Tabelle 2). Außerdem stellten sie fest, dass die AP-Aktivitäten bei Hengsten mit Oligo- beziehungsweise Azoospermie – unabhängig von der Genese - deutlich geringer sind als bei Hengsten mit normalen Ejakulaten. In

dieser Beziehung scheint den Autoren ein Zusammenhang zwischen AP-Aktivität und Fertilität zu bestehen.

Tabelle 2: AP-Aktivitäten im Seminalplasma von Hengsten mit Oligo- beziehungsweise Azoospermie (zusammengestellt nach TURNER und SERTICH, 2001)

AP-Aktivität	Bedeutung
> 1000 I.U./l	Echte Ejakulation, das bedeutet, es besteht eine echte Oligo-/ Azoospermie zum Beispiel durch Ursprung in einer Hodenerkrankung
< 100 I.U./l	Ejakulationsversagen oder –blockade, das bedeutet, die Oligo-/ Azoospermie ist sekundär begründet
100 – 1000 I.U./l	Partielles Ejakulationsversagen oder partielle –blockade (zum Beispiel durch einen unvollständigen Ablauf der Reflexkette)

2.5 Mengen- und Spurenelemente im Seminalplasma

Mineralstoffe haben im Körper vielfältige Funktionen, wie die Bildung von Gerüstsubstanzen und die Aufrechterhaltung des osmotischen Druckes. Sie dienen als Katalysatoren bei enzymatischen Reaktionen und sind als bedeutsame Bestandteile zahlreicher organischer Verbindungen (Vitamine, Hormone, Enzyme, Proteine) bekannt. So ist die genaue Kenntnis der Mineralstoffkonzentrationen im Seminalplasma zum Beispiel für eine Erhöhung der Fertilität oder zur Optimierung von Spermienkonservierungsverfahren von elementarer Bedeutung. Diverse zellphysiologische Parameter, wie zum Beispiel das Membranpotential, der osmotische

Status, Transportprozesse über die Zellmembran werden gerade hierdurch entscheidend beeinflusst.

2.5.1 Mengenelemente

Natrium (Na^+)- und Kalium (K^+) - Konzentrationen werden generell in der Literatur gemeinsam bearbeitet. Die gängigste Methode zur Bestimmung ist die Flammenphotometrie.

Allgemeine Auffassung ist, dass im Seminalplasma die Konzentration an Na^+ generell höher ist als die an K^+ und zusätzlich die Na^+ -Konzentration in der Zelle immer niedriger ist als im Seminalplasma, was das Vorhandensein eines aktiven Transportmechanismus suggeriert.

Obwohl es beim Hengst keine Erkenntnisse darüber gibt, kann die Arbeit von DASHNIAM und Mitarbeitern (1981) als Anhaltspunkt dienen: Während die Lagerzeit (37°C und 5°C bis zu 5 Stunden) des bovinen Seminalplasmas keinen Einfluss auf die Konzentrationen der genannten Ionen hatte, fielen starke individuelle Schwankungen, bedingt durch Spermagewinnung (Zeitabstand zwischen Entnahme der Ejakulate, Erregungszustand) und Einflüsse aus der Tierhaltung (Fütterung, Stalltemperatur), auf (DASHNIAM et al., 1981). Beim Hengst ist bisher in der Literatur nur der von der Arbeitsgruppe um AMANN (1987) gesehene Zusammenhang zwischen der Konzentration an Kaliumionen im Seminalplasma sowie der Motilität 0 bis 90 Minuten nach dem Auftauen erwähnt (AMANN et al., 1987).

Kalziumionen (Ca^{2+}) sind – wie viele andere divalente Kationen (auch Zink, Magnesium) - im Ejakulat in hohen Konzentrationen enthalten. Dies lässt die Annahme

auf einen aktiven Transportmechanismus aus dem Blut zu. Beim Hengst sind die Ca^{2+} -Konzentrationen im Seminalplasma im Vergleich zu anderen Tierarten besonders hoch, wobei bislang noch keine Begründung dafür gegeben wurde, warum dies so ist.

Auffällig an Ca^{2+} -Konzentrationen sind große Differenzen zwischen verschiedenen Messungen. Gemeinsam ist allen, dass die Ca^{2+} in Folgeejakulaten immer weiter absinkt (CRAGLE et al., 1958, a/b). BARRIER-BATTUT und Mitarbeiter (2002) bestimmten bei fertilen Hengsten die Gesamt- Ca^{2+} -Konzentration im Seminalplasma. Es bestand eine signifikante Abhängigkeit vom einzelnen Individuum für die Kalziumkonzentration. Eine Korrelation zur Tiefgefrierfähigkeit der Ejakulate (gefrierfähig waren Ejakulate mit einer progressiven Motilität von $> 35\%$) konnte nicht nachgewiesen werden.

Magnesium (Mg^{2+}) kommt ebenso wie die übrigen genannten Kationen sowohl im Seminalplasma selbst als auch in den Spermien vor. Im Seminalplasma sind sehr hohe Magnesium-Konzentrationen vorhanden, deutlich höher als im Blutserum, wobei die Bedeutung unklar ist. Eine aktuell veröffentlichte Arbeit über die Mg^{2+} -Konzentration im Seminalplasma beim Pferd stammt von BARRIER-BATTUT und Mitarbeitern (2002). Die Autoren beschränkten sich auf fertile Hengste, 47 Ejakulate von insgesamt 17 Tieren, und beobachteten: „a significant effect of the stallion was observed for ... Mg ($p < 0,005$) ...“.

Für die Bestimmung des Phosphat (P_i) gehaltes, welcher im equinen Seminalplasma im Durchschnitt $0,6\text{ mmol/l}$ beträgt, ist es wichtig, dass sie umgehend geschieht, weil der Gehalt im Laufe der Zeit durch Hydrolyse anderer Phosphatester mit Herkunft aus dem Seminalplasma oder den Spermien ansteigt (SENEGACNIK, 1985).

KAVANAGH (1985) sieht in dem Chloridion (Cl^-) das zweitwichtigste Anion des Seminalplasmas. Bei dem wichtigsten handelt es sich um das Citration. Außerdem besteht eine Korrelation zwischen der Na^+ und der Cl^- -Konzentration. Das Chloridion ist bei den meisten Spezies essentiell für den osmotischen Druck, außer beim Eber, wo nur minimale Konzentrationen im Seminalplasma vorhanden sind (POLAKOSKI und KOPTA, 1982).

Abschließend sollte noch die Arbeit von AMANN und Mitarbeitern (1987) Erwähnung finden. Die Autoren stellten fest, dass „similarly, for all electrolytes, except K^+ more variation was associated with ejaculates within stallion than amongst stallions.“

Tabelle 3: Zusammenfassung bekannter Mineralstoffparameter aus dem Seminalplasma (Referenzbereiche) vom Hengst nach ¹SETCHELL und BROOKS (1988) sowie ²MANN (1964, 1969) (modifiziert und erweitert) (mmol/l)

	Natrium	Kalium	Kalzium	Magnesium	Chlorid
1:SETCHELL	112	26	6,5	3,7	23-113
2: MANN	114	26	6,5	3,8	

2.5.2 Spurenelemente

In der Literatur sind nur sehr wenige Angaben über Spurenelemente des Seminalplasmas von verschiedenen männlichen Tieren zu finden.

Eisen (Fe^{2+}) kommt im Organismus, wie auch im Seminalplasma, in freier Form, in der Transportform des Transferrins sowie als Depoteisen (Ferritin) vor. Außerdem ist Eisen

in Enzymen enthalten, welche Oxydoreduktasefunktion haben (Zytochrome, Zytochromoxydasen, Katalase und Peroxydase). Die Bestimmung des Eisens im Seminalplasma erfolgt im Allgemeinen mittels Atomabsorptionsspektrometrie (HUANG et al., 2000). Der Eisengehalt kann aber auch kolorimetrisch im Seminalplasma ermittelt werden. Die gebundene Form, Transferrin, kann mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Enzymimmunoassays (EIA) nachgewiesen werden (ASSINK et al., 1983; VAN EIJK et al., 1974). KWENANG und Mitarbeiter (1987) diskutieren freies Eisen als mögliche Ursache für Lipidoxidation.

Kupfer (Cu^{2+}) ist zum einen essentiell für verschiedene Enzyme, wie die Kupfer-Zink-Superoxiddismutase und Glutathion, zum anderen liegt es gebunden an ein Transportprotein (Coeruloplasmin) und frei als Kation vor (LEONHARD-MAREK, 2001). Die Bestimmung von Kupfer erfolgt mit Atomabsorptionsspektrometrie (PLEBAN und MEI, 1983). Ähnliches wie für Eisen und Transferrin gilt auch für Kupfer und Ceruloplasmin. Die Kupferionenkonzentration im Seminalplasma beim Pferd wurde von BARRIER-BATTUT und Mitarbeitern (2002) im Zusammenhang mit der Tiefgefrierfähigkeit (gefrierfähig waren Ejakulate mit einer progressiven Motilität von $> 35\%$) bei fertilen Hengsten untersucht. Nach den genannten Autoren bestand keine Korrelation. Allerdings bestand ein signifikanter Effekt zwischen Kupferionenkonzentration und dem einzelnen, individuellen deseminierten Hengst.

Zink (Zn^{2+}) ist ein Spurenelement, welches eine unabdingbare Bedeutung für die Fertilität hat. Zu finden ist es in gebundener Form in der Carboanhydrase einerseits, an kleine Liganden, zum Beispiel Peptide, andererseits. Auch bei der Bildung von Enzymkomplexen (zum Beispiel im Sperma für eine Elastase-like Peptidase) spielt Zink

eine wichtige Rolle, was auch für die antibakterielle Aktivität des Seminalplasmas von Bedeutung ist. Zink ist demnach gemeinsam mit anderen Stoffen, Enzymen und dem sekretorischen Immunglobulin A für die Bakterizidie verantwortlich. Die Bestimmung von Zink kann ebenfalls mittels Atomabsorption (Spektrometrie, Flammenphotometrie) erfolgen. Für das Pferd wurde jüngst eine Untersuchung zur Zinkionenkonzentration im Seminalplasma publiziert (BARRIER-BATTUT et al., 2002). Die Ergebnisse für die Tiefgefrierfähigkeit entsprechen denen für Kalzium, Magnesium und Kupfer. Allerdings gilt weiterhin, dass „no significant effect of the stallion was observed for Zn“.

2.6 Gewinnung des Ejakulates

Die Art und Weise der Spermagewinnung ist nach wie vor ein entscheidendes Kriterium für die Ejakulatqualität und hat so neben diversen anderen Faktoren den wichtigsten direkten Einfluss auf Besamungs- und Konservierungsergebnisse. Beim Hengst wird Sperma generell mit Paarungspartner oder Phantom durch Auslösen der Paarungsreflexe (zum Beispiel unter Verwendung der künstlichen Vagina) gewonnen. Dies kommt dem natürlichen Paarungsvorgang am nächsten, ist schnell und einfach zu praktizieren und bedeutet im Allgemeinen wenig Stress für die Tiere, wenn auch eine Eingewöhnungszeit benötigt wird. Im Regelfall werden alle gängigen Scheidenmodelle (Modell Hannover Standard oder Variante mit Einmalschlauch, Modell Missouri, Modell Colorado, Fort Collins) von jedem Hengst nach entsprechendem Training angenommen (KLUG und SIEME, 2003). So kann ein Hengst durchschnittlich zwei- bis sechsmal pro Woche (FOOTE, 1980) beziehungsweise täglich (WEITZE, 2001, b) abgesamt werden. Dennoch sind gelegentliche Karenztage anzustreben.

2.7 Untersuchung des Ejakulates

Ein Ejakulat wird im Regelfall makroskopisch auf Volumen, Farbe, Geruch und Beimengungen untersucht. Lichtmikroskopisch erfolgt eine Überprüfung der Vorwärtsbeweglichkeit, Dichte, Lebend-Tot-Verhältnis und Pathomorphologie. Von den chemisch-physikalischen Parametern findet nur eine pH-Wert-Messung mittels Indikatorpapier in der Routine Anwendung (WEITZE, 2001, a).

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen setzen jedoch Erfahrung des Untersuchers voraus. Um die Beurteilung von vielen Proben im Rahmen einer Untersuchung möglichst einheitlich zu gestalten, sollten solche Untersuchungen immer von einem Untersucher durchgeführt werden. *Hengstspemien* zeichnen sich in der Lichtmikroskopie durch einen asymmetrischen Kopf sowie eine abaxiale Schwanzposition aus (BIELANSKI et al., 1982).

2.7.1 Volumen

Das Volumen des Ejakulates ist von verschiedenen Faktoren abhängig, wobei Alter, Rasse, Fütterung, Krankheiten allgemein, Sexualbeanspruchung, Absamhäufigkeit und –technik sowie eventuelle Zufälle bei der Absamung zu nennen wären. Zusätzlich sind gewisse individuelle Unterschiede von Ejakulat zu Ejakulat und zwischen den einzelnen Hengsten festzustellen.

2.7.2 Farbe, Geruch und Konsistenz sowie Beimengungen und Verschmutzungen

Farbe und Konsistenz sind bei der Beurteilung der Spermaqualität von erheblicher Bedeutung, da sie eng mit der Dichte korrelieren. Die typische Farbe des Hengstejakulates ist grau-weiß bis bläulich, während die Konsistenz zumindest milchig sein sollte. Farbe sowie Geruch werden durch Beimengungen zum Teil erheblich beeinträchtigt: Eine Rot- oder Braunfärbung deutet auf Blutbeimengungen (Hämospermie) hin, wohingegen Harnbeimengungen (Urospermie) am Geruch zu erkennen sind und die Farbe dann deutlich ins Gelb wechselt. Andere Beimengungen können ausschließlich mikroskopisch erkennbar sein (zum Beispiel Bakterien). Während die zuvor genannten Beimengungen direkt mit dem Hoden beziehungsweise den samenableitenden Wegen in Beziehung stehen, sind Kotpartikel, Haare oder ähnliche Verunreinigungen ausschließlich auf eine mangelnde Hygiene bei der Spermagewinnung zurückzuführen (WEITZE, 2001 a).

2.7.3 Spermindichte und –konzentration

Die Spermindichte ist neben der Vorwärtsbeweglichkeit ein entscheidender Parameter für die Qualität des Ejakulates. Im deutschsprachigen Raum werden als Maßeinheit die Anzahl der Spermien pro Mikroliter (μl), im englischsprachigen Raum die Spermien pro Milliliter angegeben. Zur Bestimmung der Spermienkonzentration können makro-, mikroskopische und physikalisch-photometrische Meßmethoden eingesetzt werden. Makroskopisch kann mit Hilfe eines Densitometers, zum Beispiel nach Karras, die Trübung im Ejakulat quantifiziert werden. Mikroskopisch erfolgt die Dichtebestimmung in einer Neubauer Zählkammer. Als technisch neuere Verfahren zur Ermittlung der

Spermiendichte im Ejakulat werden Coulter Counter verwendet, deren Basis die Durchflußcytometrie ist, sowie computergesteuerte Videomikroangiographiesysteme (WEITZE und MÜLLER, 1991).

2.7.4 pH-Wert

Der pH-Wert wird direkt nach Gewinnung der Spermaprobe bestimmt. Für eine grobe Einteilung ist pH-Indikatorpapier geeignet, für eine schnelle, sehr genaue Messung ein elektrisches pH-Meter. Der pH-Wert ist im Wesentlichen vom Seminalplasma beziehungsweise den Sekreten von Nebenhoden und akzessorischen Geschlechtsdrüsen abhängig (MANN und LUTWACK-MANN, 1981).

2.7.5 Vorwärtsbeweglichkeit

Die Bestimmung der Vorwärtsbeweglichkeit erfolgt auf einem konstant 37°C warmen Tisch unter einem Phasenkontrastmikroskop bei 100 – 200-facher Vergrößerung. Sie bezieht sich auf den prozentualen Anteil der Gesamtpopulation. Darunter ist die lineare Vorwärtsbewegung aufgrund der Eigenmotorik des Einzelspermiums zu verstehen. Alternativ kann die Motilität mit Hilfe einer computergestützten Analyse (CASA, computer-assisted semen motility analysis, QUINTERO-MORENO et al., 2003) beurteilt werden.

2.7.6 Anteil lebender und toter sowie pathomorphologisch veränderter Spermien

Zum Nachweis des Anteils lebender beziehungsweise toter Spermien sowie der Pathomorphologie sind verschiedene Anfärbemethoden, wie die Nigrosin-Eosin- (BLOM, 1950), die Opalblau- und Anilin-Kongorot- Färbung, geeignet.

Das Prinzip der Anfärbbarkeit beruht darauf, dass der Farbstoff nur in geschädigte oder tote Spermien über die poröse Zellmembran eindringen kann und sie so total oder partiell anfärbt. Andere Theorien gehen davon aus, dass der Farbstoff in alle Zellen eindringt, die lebenden Spermien aber in der Lage sind, ihn mittels eines aktiven Transportes wieder aus der Zelle herauszuschleusen und so als farblos erscheinen. Erwünscht sind mindestens 80 % lebende Spermien (WEITZE, 2001, a, b). Die Bestimmung und Beurteilung von Spermienveränderungen erfolgt derzeit ausschließlich mittels lichtmikroskopischer Untersuchung.

Unter Spermienanomalien werden pathomorphologisch veränderte Spermien, aber auch ein unphysiologisches Verhalten (zum Beispiel Rückwärtsbewegung), verstanden. Es sind zwei verschiedene Einteilungen der Anomalien bekannt, welche für den Hengst vom Bullen sowie Schafbock übernommen wurden.

BRETSCHNEIDER (1948) klassifiziert die Anomalien nach ihrem Entstehungsort. Primäre Spermienanomalien entstehen im Keimepithel und äußern sich in einer abnormen Kopfform, einem proximal anhaftenden cytoplasmatischen Droplet, Mittelstückveränderungen und deformierten, eingedrehten Schwänzen. Sie können spezifisch, das bedeutet genetisch, oder unspezifisch, das bedeutet durch eine Noxe, bedingt sein. Unter den sekundären Veränderungen werden solche verstanden, die beim Transport der Spermien durch den Nebenhoden und bei der Ejakulation entstehen (distal

noch anhaftendes cytoplasmatisches Droplet, beschädigte normale Köpfe, abgerissene Schwänze). In der Gruppe der tertiären Veränderungen werden alle diejenigen zusammengefaßt, welche den Spermien nach dem Absamen zugefügt werden (insbesondere lose Köpfe). Die Einteilung der Spermienanomalien nach LEIDL und Mitarbeitern (1971) beruht dagegen auf rein deskriptiver Ebene und beschreibt ausschließlich die Veränderungen: Es werden Kopfanomalien aufgeführt - Makro-, Mikro-, Doppelköpfe, Keulen- Birnenkopfform - Akrosomenveränderungen - schräg aufsitzendes Schwanzstück, wie Lockenschwanz, haarnadelähnliche Krümmung, leichte Biegung, Doppelschwänze, Brüche an Nacken und Mittelstückbrüche. Zusätzlich gibt es zwei Formen der Spermienagglutination: „Kopf auf Kopf“ und „Kopf an Kopf“.

Im Gegensatz zu den anderen Nutztierarten ist die Literatur speziell über die Verteilung pathomorphologischer Veränderungen von Hengstspermien lückenhaft. Bei der Routineuntersuchung werden insgesamt 30 % pathomorphologisch veränderte Spermien akzeptiert (WEITZE, 2001, a, b- institutseigene Richtwerte Reproduktionsmedizin TiHo Hannover). Es bleibt allerdings bislang unklar, welche Aberrationen als unbedeutend anzusehen, welche als echte pathologische Veränderungen der Spermien zu interpretieren sind und welche sekundär durch pathische Prozesse durch die mit Spermienproduktion, -reifung und -transport assoziierten Organe entstehen. BIELANSKI (1951, 1981) sowie BIELANSKI und seine Arbeitsgruppe (1982) stellten neben den bereits oben erwähnten physiologischen Besonderheiten von Hengstspermien, die bei der Beurteilung berücksichtigt werden müssen, zusätzliche Referenzwerte heraus. Bei den Untersuchungen aus dem Jahr 1982 (BIELANSKI et al., 1982) ergab sich: „ The results show that it is possible to predict that a stallion is fully fertile... if 80 % of the spermatozoa are normal and there are < 10 % with cytoplasmic droplets, < 3 % with tail loops, < 3 % with loose heads and < 1 % with other individual

abnormal forms.“ FOOTE (1980) fand bei den von ihm untersuchten Hengsten zwischen 0 und 90 % pathomorphologisch veränderter Spermien, machte aber keine Aussage über die daraus resultierende Fertilitätsleistung.

Die Pathomorphologie ist von entscheidender Bedeutung für die Fruchtbarkeit. So ist zum Beispiel nachgewiesen, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Anteil an sogenannten „major defects“ (abnorme Kopfform sowie proximal anhaftende cytoplasmatische Droplets) und der Fertilität von Hengsten gibt (JASKO et al., 1990). Nach einer Studie der Arbeitsgruppe um GRAVANCE (1996) sind die Spermienköpfe subfertiler Hengste in Bezug auf alle morphometrischen Grössen (Länge, Breite, Umfang und Fläche) grösser als die von Hengsten mit normaler Fruchtbarkeit (Tab. 4).

Tabelle 4: Physiologische Werte ausgewählter Ejakulatcharakteristika beim Hengst

Literatur	Volumen (ml)	Dichte (10 ⁶ /ml)	Spermien/ Ejakulat x 10 ⁹	Motilität	pH-Wert
HOLST v.d. (1975) Decksaison Ruhephase	150 80		19 15	60 50	
KLUG (1982)	75,6 ± 40,7	304,5 ± 191	21,6 ± 4,8	63,1 ± 15,9	7,0 - 7,4
LEIDL (1983)	30 - 300			70 – 80	7,2 - 7,6
JASKO et al. (1990)	59 ± 14,5	173 ± 115	8,9 ± 4,6	74,0 ± 10,6	
PARLEVLIET et al. (1994)	65 ± 26	206 ± 168,5	11,3	68 ± 9	7,5 ± 0,2
PICKETT et al. (1975, b; 1976) a.)Erstejakulat b.)Zweitejakulat	65,5 51,6	281 170	14,7 7,9	73 74	7,47 7,59
WEITZE und MÜLLER (1991)	30 – 300	50 – 300	9	50	6,8 - 7,4
FOOTE (1980)	30-100	150-300	5-15	40-75	

Die großen Spannweiten weisen auf die saisonalen Einflüsse hin (siehe 2.8.4), welche von v. d. HOLST (1975) konkret aufgezeigt werden. Auf die Ursachen für Differenzen bei Erst- und Zweitejakulaten wird in 2.8.3 näher eingegangen.

2.8 Einfluss exogener und endogener Faktoren auf bekannte Ejakulatkriterien

Obwohl die Sexualfunktion und damit verbunden auch die Ejakulatkriterien insbesondere von zentralen, neuroendokrinen Regulationsmechanismen abhängig sind, können sie darüber hinaus von weiteren exogenen und endogenen Faktoren, zum Teil auch speziesabhängig, beeinflusst werden.

2.8.1 Hodenmaße

Die Hodenmaße beim Hengst können neben einer Rasseabhängigkeit einerseits aufgrund saisonaler Unterschiede, andererseits altersabhängig differieren. Wenn auch Hengste saisonal bedingt keine deutlichen Unterschiede in der Sexualaktivität zeigen, gibt es innerhalb und ausserhalb der Zuchtsaison deutliche Schwankungen des Hodengewichts und -umfangs. Die äußerlich feststellbaren Verringerungen drücken Veränderungen an den Leydigschen Zwischenzellen bezüglich Größe, Morphologie und Steroidaktivität aus. Gleichzeitig nimmt außerhalb der Zuchtsaison der Durchmesser der Tubuli seminiferi ab, die Aktivität der akzessorischen Geschlechtsdrüsen ist reduziert (JOHNSON et al., 1991, b).

Die Arbeitsgruppen um LOVE (1991) sowie PARLEVLIET (1994) stellten heraus, dass die Hodenmaße bei Hengsten in einem bestimmten physiologischen Rahmen altersabhängig schwanken können. Diese physiologischen Schwankungen in Abhängigkeit vom Alter beobachteten JOHNSON und Mitarbeiter (1991, b) ebenfalls bei der täglichen Spermienproduktion. Bei Hoden, die unterhalb der Normgrößen liegen, sind geringere Ejakulatvolumina zu erwarten. Außerdem produzieren zu kleine Hoden, zum Beispiel aufgrund von Kryptorchismus oder infolge chronischer Orchitiden, nur ungenügende Mengen an Spermatozoen, was zu Subfertilität führt (PICKETT et al., 1987; PICKETT, 1995; LOVE et al., 1991). LOVE und Mitarbeiter (1991) stellen additional physiologische, saisonalbedingte Größenveränderungen der Hoden heraus.

2.8.2 Sexuelle Stimulation und Libido sexualis

Die sexuelle Stimulation ist Voraussetzung für eine gute Ejakulatqualität. Bei Hengsten, die zur sexuellen Stimulation über 10 Minuten vor der Absamung Kontakt zu rossigen Stuten hatten, war das Volumen des gelfreien Ejakulates statistisch signifikant erhöht gegenüber Hengsten ohne Stutenkontakt (THOMSON et al., 1996). Beim Hengst wird die Libido sexualis gemeinsam mit dem Ablauf der Paarungsreflexe, insbesondere der Anzahl der Aufsprünge, beurteilt (BADER und TISCHNER, 1982; WEITZE, 2001, b).

2.8.3 Häufigkeit der Spermagewinnung

Es besteht eine direkte Abhängigkeit zwischen der Absamfrequenz pro Woche beziehungsweise der Ejakulationshäufigkeit am Tag und der Veränderung typischer

Ejakulatparameter. Diese Unterschiede zwischen Erst- und Zweitejakulaten wurden von den Arbeitsgruppen um PICKETT (1975, b), JASKO (1990) sowie PARLEVLIET (1994), aber auch von KLUG (1982) beim Hengst herausgestellt. Zum Beispiel finden PARLEVLIET und Mitarbeiter (1994) in Zweitejakulaten nur rund die Hälfte der Gesamtpermienanzahl des Erstejakulates. Es kann also behauptet werden, dass Volumen, Dichte und Gesamtpermienzahl bei Folgeejakulaten grundsätzlich niedriger sind.

Die Arbeitsgruppe um PICKETT (1975, b) kam zu dem Ergebnis, dass Hengste, deren Absamfrequenz auf drei- bis sechsmal pro Woche gesteigert wurde, eine zweiwöchige Anpassungszeit benötigen, nach welcher Libido und Ejakulatvolumen wieder das Ausgangsvolumen erreichen, während die Motilität der Spermien über den gesamten Untersuchungszeitraum unverändert konstant blieb. Auch SULLIVAN und PICKETT (1975) gehen von einer einwöchigen Anpassungszeit aus, um die extragonadalen Spermienreserven zu stabilisieren.

CUTLER (1974) sieht bei alten Hengsten (24 Jahre) zunächst eine Vorwärtsbeweglichkeit von circa 15 % zu Beginn der Saison, welche sich aber auf 85 % bei Absamungen im 2-Tage-Intervall verbessern ließ. Dieser Effekt ließ sich bei 2 jungen Hengsten mit einer Vorwärtsbeweglichkeit von maximal 15 % nicht bestätigen.

2.8.4 Saisonalität

Hormonelle Variationen prägen die saisonale Geschlechtsaktivität und Ejakulatqualität auch beim Hengst. Photoperiodische Einflüsse stellen den primären Stimulus für die Freisetzung von Releasing-Hormonen des Hypothalamus dar. Von sehr großer Wichtigkeit ist die Glandula pinealis mit ihrer Melatonin-Ausschüttung. Beim Pferd

scheint aber Prolactin und den endogenen Opioiden eine größere Bedeutung beizumessen zu sein, da bisher keine hypothalamischen Melatoninrezeptoren gefunden wurden (GERLACH und AURICH, 2000). Andere Umweltfaktoren - wie Hitze, Ernährung und soziales Umfeld - können das Ausmaß der Freisetzung dieser Neurohormone beeinflussen beziehungsweise dominieren. Allerdings ist auch festzuhalten, dass die Trennung in eine sexuell aktive Phase und sexuelle Ruhephase bei weiblichen Tieren im Regelfall wesentlich stärker ausgeprägt ist als bei männlichen. Während der Paarungszeit sind das Ejakulatvolumen und die Gesamtspermienzahl signifikant größer als im Winter (JANETT et al., 2003). JOHNSON und Mitarbeiter (1991, b) gehen ebenfalls davon aus, dass „...DSP/g (Erläuterung: daily sperm production per gram of parenchyma) were higher ($p < 0,05$) in the breeding season“. Ebenso gilt nach HENDRIKSE (1972), dass der Anteil an pathomorphologisch normalen Spermien während der Zuchtsaison zwischen März und Juli ansteigt. Über die saisonalen Schwankungen der Enzyme und Mineralstoffe beim Hengst ist in der Literatur nichts bekannt.

2.8.5 Tialter

Für den Hengst gibt es nur wenige Informationen über den Einfluss des Alters auf die Fertilität und Ejakulatqualität. So ist es sicher, dass die Höhe der Spermienproduktion beim Hengst nach Eintritt der Geschlechtsreife noch bis ungefähr zu einem Alter von vier bis fünf Jahren kontinuierlich ansteigt (JOHNSON und THOMPSON, 1983) und danach bis zum 16. Lebensjahr relativ konstant bleibt (AMANN et al., 1979; GALLOWAY, 1977). In diesem Zusammenhang beobachteten SQUIRES und Mitarbeiter (1979), dass die Gesamtspermienzahl pro Ejakulat bei 4- bis 6-jährigen im

Vergleich zu 9- bis 16-jährigen Hengsten nicht differiert. Für das Senium stellte GALLOWAY (1977) bei 16- bis 22-jährigen Hengsten eine nachlassende Reproduktionsleistung fest.

2.9 Fertilität

Die Aussage, ob ein Hengst fertil, sub- oder infertil ist, ist schwierig zu treffen. Die größte Bedeutung für eine Aussage bezüglich der Fertilität hat immer noch die Non-Return-Rate und der prozentuale Anteil an tragenden Stuten von der Gesamtzahl besamter/bedeckter Stuten. WEITZE (2001, b) gibt zur Erfassung der Befruchtungspotenz den „Befruchtungshundertsatz“ an, welcher mindestens 5 Stuten beinhalten muss. „70 % der von einem Hengst zum richtigen Zeitpunkt belegten, gesunden und konzeptionsfähigen Stuten sollten tragend sein.“ Die Arbeitsgruppe um BIELANSKI (1982) geht von einer guten Fertilität aus, wenn normales Sexualverhalten, keine Infektion, normale Spermindichte und Vorwärtsbeweglichkeit vorliegen sowie die pathomorphologischen Kriterien nicht überschritten werden.

Unterschiede in der Ejakulatqualität erklären über 80 % der Unterschiede bezüglich der Fertilität (JASKO et al., 1991). So weisen im Regelfall Hengste mit reduzierten Trächtigkeitsraten einen hohen Anteil an morphologisch veränderten Spermien (VOLOSKOV, 1936; BIELANSKI, 1951; HAAG, 1959; KENNEY et al., 1971), eine geringe Spermindichte (KENNEY et al., 1971) sowie eine geringe Gesamtspermienzahl (DAY, 1940) auf. DOWSETT und PATTIE (1982) betonen in diesem Zusammenhang die Bedeutung des Volumens und des Anteils an toten Spermien. Zusätzlich wies die Arbeitsgruppe um CHEVALIER-CLEMENT (1991) bei Hengsten mit reduzierter

Fertilität eine schlechtere Vorwärtsbeweglichkeit für den Zeitraum unmittelbar bis 48 Stunden nach der Ejakulatgewinnung nach. VOSS und Mitarbeiter (1981) dagegen sehen keinen Zusammenhang zwischen dem Volumen respektive dem Anteil vorwärtsbeweglicher oder pathomorphologisch veränderter Spermien sowie der Fertilität.

Oftmals weisen aber sub- beziehungsweise infertile Hengste anhand des Spermigrammes keine oder nur geringgradige Unterschiede zu normal fertilen Hengsten auf (BADER et al., 1991). Einerseits können bei normal fertilen Hengsten durchaus Veränderungen des Ejakulates auftreten, andererseits können sub- beziehungsweise infertile Hengste in der routinemäßigen Spermauntersuchung bei den genannten Parametern weitestgehend unauffällig sein (GRONDAHL et al. 1994). Letztere Ejakulate lassen aber, wie beispielhaft gezeigt wurde (siehe 2.1), teilweise im elektronenmikroskopischen Bild Erscheinungen erkennen, die als Ursache für mangelhafte Fruchtbarkeit gelten könnten. Erschwert wird die Definition der Fertilität zusätzlich durch teilweise starke Schwankungen in der Ejakulatqualität einzelner Hengste innerhalb einer Saison aufgrund verschiedener Einflußfaktoren, wie Jahreszeit, Wetter, Gesundheit des Hengstes, Absamfrequenz und Status der extragonadalen Spermienreserven. Es ist nicht bekannt, ob dies direkte Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit hat. PATTIE und DOWSETT (1982) betonen: „The efficiency of ranking stallions on their semen characteristics could be considerably improved by assessing them on the basis of 2 or 3 collections.“

Wie aus der Literaturübersicht ersichtlich, fanden beim Hengst im Gegensatz zu anderen Spezies weder die Transmissionselektronenmikroskopie noch biochemische Analysen des Seminalplasmas bisher weitreichende Beachtung in der Literatur oder

etwa praktische Anwendung. So fehlt es noch an speziellen Informationen über die Differenzierung physiologischer und pathologischer Strukturen bei der transmissionselektronenmikroskopischen Evaluierung von Hengstejakulaten.

Aus diesem Grund war die Aufgabe gestellt, an einem Probandengut TEM-Beurteilungen von Hengstenejakulaten durchzuführen, um zu eruieren, ob bestimmten Phänomenen eine Bedeutung zur Fruchtbarkeit zuzusprechen ist, was bei den Probanden eine abgesicherte Fertilität als Einschlusskriterium in die Studie voraussetzte. Ein weiteres Defizit ist aus der Literatur bei der Gegenüberstellung von Analysen des Seminalplasmas zur Fertilität für Hengste zu erkennen gewesen, was hier auch bearbeitet werden sollte. Ebenfalls ist es eine Tatsache, dass der Einsatz der Hengste im Natursprung respektive in der künstlichen Besamung mittels flüssigkonserviertem Sperma sich zeitlich auf die Monate Februar bis Juli konzentriert und die Gewinnung von Tiefgefriersperma meist auf Oktober/November bis Dezember limitiert ist. Unklar ist bislang, ob saisonale Unterschiede in der Seminalplasma-zusammensetzung vorliegen. Wenn davon auszugehen wäre, könnte es sich dabei um einen entscheidenden Faktor für die Eignung der Samenproben zur Konservierung und Weiterverarbeitung handeln.

Ziel war insgesamt durch die Ergänzung der klassischen Ejakulatuntersuchung mittels TEM und biochemischer Analysen des Seminalplasmas eine weitreichende Aussage über einen Hengst und seine Fertilität treffen zu können. Letztendlich wären diese Methoden, falls sich ihre Eignung herausstellen sollten, für die Routinediagnostik, insbesondere bei unklaren Fällen, zu empfehlen.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN:

Probanden und Methoden

3.1 Probandenkollektiv

Für die Untersuchungen standen insgesamt 73 Zuchthengste im Alter von 3 bis 25 Jahren, im Mittel $9,7 \pm 5,3$ Jahren, zur Verfügung, von denen 67 Warmblüter auf verschiedenen Gestüten untersucht wurden, wo sie zur Gewinnung von Frisch- und Tiefgefriersperma genutzt werden. Des Weiteren erfolgte in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Gross- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz die Probengewinnung von fünf Hengsten unterschiedlicher Herkunft, die dort zur andrologischen Untersuchung vorgestellt wurden. Außerdem konnte für die Elektronenmikroskopie zusätzlich auf eine vorhandene, entsprechend fixierte Probe eines infertilen, klinisch gesunden Hengstes (H 46) zurückgegriffen werden.

Die Rassenverteilung des Probandenkollektivs ergab sich wie folgt: Der größte Anteil der Hengste waren Warmblüter (84,9 %). Weiterhin fanden Englisches Vollblut (4,1 %), Traber (2,7 %), Friesen (2,7 %), Arabisches Vollblut (1,4 %), American Quarter Horse (1,4 %), Isländer (1,4 %) sowie Deutsches Reitpony (1,4 %) Eingang in die Studie.

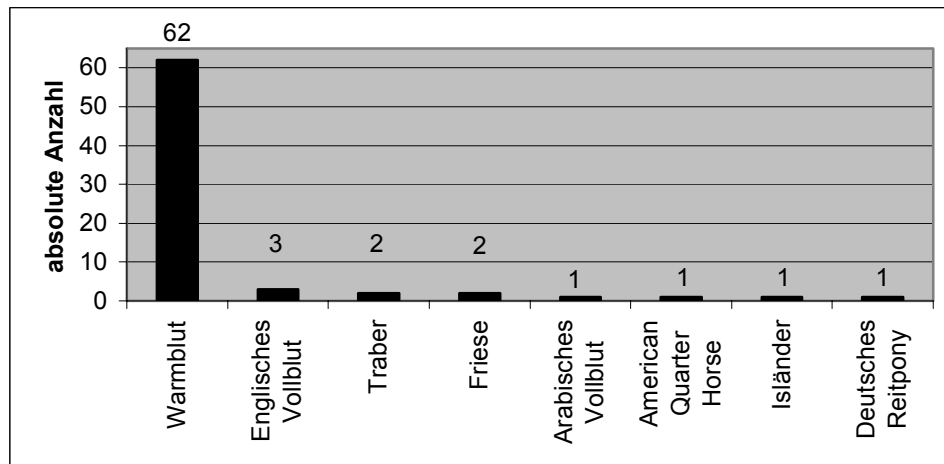


Diagramm 1: Absolute Rassenverteilung der untersuchten Probanden

Die Grundgesamtheit aller Hengste wurde eingeteilt in eine Gruppe 1 bestehend aus 46 Hengsten, von denen die Fertilitätsdaten bekannt waren, und eine Gruppe 2, die 27 Hengste umfasste, deren Fertilität unbekannt war.

Von allen beprobten Hengsten wurden 63 im Untersuchungsjaar zur künstlichen Besamung genutzt; zwei Tiere deckten im Natursprung und 8 fanden ausschließlich als Reitpferde Verwendung. Insgesamt war mit Ausnahme von 7 Hengsten allen die Absamung mittels künstlicher Vagina bekannt.

Alle Tiere wurden ganzjährig im Stall auf Stroh oder Späne gehalten und täglich geritten.

Die Fütterung erfolgte ohne eine Veränderung der Futterzusammensetzung innerhalb des gesamten Untersuchungszeitraumes wie folgt: Als Grundration wurden den Hengsten Standardfuttermittel, Hafer, Mineralfutter und Heu oder Silage sowie bei einzelnen Gestüten noch zusätzliche Futtermittel, wie Mais, Mineral- oder Kräutermischungen, angeboten.

Bezüglich des Impfstatus ist zu sagen, dass regelmäßige Impfungen gegen EHV-1 (Equines Herpes Virus) und EHV-4, Influenza, Tetanus sowie EAV (Equine Arteritis

Virus, bei den Hengsten eines Gestütes) durchgeführt wurden. Alle Hengste waren zudem periodisch entwurmt (fast ausschließlich mit Ivermectin- Equalan ®, Merial Animal oder Furexel®, Janssen).

Vorberichtlich ließen sich generell die Fertilität, das übliche Deckverhalten, Libido, Anzahl der Aufsprünge, Sprungpartner und sonstige Besonderheiten der Probanden erfassen. Angegeben wurde hierbei, dass 6 Tiere (H 4, 43, 53, 54, 55, 56) durch eine reduzierte Libido aufgefallen waren, was insbesondere bei einem Hengst (H 4) im Zusammenhang mit großer Leistungsanforderung – entweder hartes Training oder Turnierstart – stand. Von einigen Probanden wurde berichtet, dass sie bei Zufütterung eines bestimmten Mineralstoffpräparates (Reformin®, Hoeveler) eine besonders ausgeprägte Libido zeigten. Weiterhin waren die Ejakulate zweier Hengste (H 51, 52) durch geringe Haltbarkeit im Samenversand und infolgedessen reduzierte Fertilität auffällig. Einer der beiden (H 51) wurde aus diesem Grund letztendlich nur noch für die Besamung unmittelbar nach Gewinnung des Ejakulates auf dem Gestüt eingesetzt. Außerdem fiel ein Tier (H 24) im vorangegangenen Deckjahr, während er in der künstlichen Besamung stand, durch Urinbeimengungen im Ejakulat auf.

Tupferproben des Penisschaftes, der Fossa glandis und der Urethra wurden bei allen Hengsten zu Beginn der Zuchtsaison genommen und mikrobiologisch untersucht. Sofern eine Besiedlung mit pathogenen Keimen bestand, wurde diese behandelt und eine Kontrolltupferprobe genommen, so dass letztendlich nur genitalgesunde Hengste Aufnahme in das Probandenkollektiv fanden.

Bei 72 der 73 untersuchten Tiere lagen keine Allgemeinerkrankungen vor. Nur ein Hengst (H 54) war eine Woche vor der Untersuchung von Leistungsabfall, Fieberschüben und einem hohen EHV-Titer betroffen.

Vor der Absamung erfolgte eine tierärztliche Untersuchung mit andrologischem Schwerpunkt. Bei der Samengewinnung wurden die Libido, die Anzahl der Aufsprünge, der Sprungpartner und Besonderheiten beobachtet und notiert. Außerdem wurde das Vagina-Modell, welches Verwendung fand, vermerkt.

Tabelle 5: Gestüte und Probennahmetermin (2002)

	1. Probennahmetermin		2. Probennahmetermin		3. Probennahmetermin
Gestüt 1	11.03.	22.04.			
Gestüt 2	08.04.		22.07.		
Gestüt 3	09.04.	24.04.	25.07.		
Gestüt 4	11.04	29.04.	30.07.	20.08.	
Gestüt 5	23.04.		05.08.		
Gestüt 6	30.04.		18.07.		
Gestüt 7	02.05.	07.05.	24.07.	22.08.	05.12.

Tabelle 6: Einzelprobenentnahmen bei Hengsten, die in der Klinik aufgrund andrologischer Probleme vorgestellt wurden.

Hengst 0 (= H 46)	28.04.1999	
Hengst 1 (= H 23)	03.04.2002	
Hengst 2 (= H 44)	08.05.2002	
Hengst 3(= H 47)	12.06.2002	16.07.2002
Hengst 4(= H 33)	21.08.2002	
Hengst 5(= H 54)	26.08.2002	
Hengst 6(= H 53)	12.11.2002	

3.2 Methodik

3.2.1 Probengewinnung

3.2.1.1 *Entnahmezeitpunkte*

Von jedem Hengst wurde mindestens eine Spermaprobe gewonnen. Die Probenentnahme geschah in der Regel vormittags.

Von den 73 zur Verfügung stehenden Probanden wurden 27 ausschließlich einmal, 35 zweimal und 11 dreimal untersucht.

Die Einzelentnahmezeitpunkte ergaben sich wie folgt: Einmal in der Hauptzuchtsaison für Warmblüter, im April bis Mai, und das zweite Mal gegen Ende der Zuchtsaison. Zeitpunkt der zweiten Untersuchung waren somit die Monate Juli und August. Sie fand in allen Gestüten statt, in denen auch im ersten Zeitraum Hengste deseminiert wurden. Untersuchungsende war im Dezember des Jahres, um die bekannten saisonalen Einflüsse zu berücksichtigen. Dabei wurden allerdings nur noch auf einem Gestüt Proben genommen. Von der Gesamtprobenzahl wurden 57 Ejakulate im Zeitraum April-Mai (entspricht Termin 1), 60 Ejakulate im Zeitraum Juli-August (entspricht Termin 2) und 15 Ejakulate im Zeitraum November-Dezember (entspricht Termin 3) gewonnen.

3.2.1.2 *Klinisch-andrologische Untersuchung*

Zunächst erfolgte eine allgemeine klinische Untersuchung jedes Hengstes mit Beurteilung des Allgemeinbefindens, Messung der Körperinnentemperatur, Auszählung der Puls- und Atemfrequenz, Auskultation der Darmquadranten sowie Adspektion der

Mundschleimhaut. Im Anschluss wurde eine spezielle klinische Untersuchung durchgeführt. Hierbei wurden Skrotum, Hoden, Nebenhoden, Samenstrang, Penis und Präputium adspektorisch und palpatorisch untersucht.

3.2.1.3 Erfassung der *Libido sexualis*

Bei der *Libido sexualis* wurden die Reaktionszeit, das bedeutet der Zeitraum zwischen Erkennen des Deckpartners beziehungsweise des Phantoms bis zum Aufsprung, sowie die Anzahl der Aufsprungversuche berücksichtigt. Für Hengste gilt eine Reaktionszeit von unter einer Minute als sehr gut, von unter fünf Minuten als gut, von 10 bis 15 Minuten noch als ausreichend (LANDECK, 1997). Die ermittelten Reaktionszeiten wurden gemeinsam mit der Anzahl der Aufsprungversuche bewertet. Berücksichtigung fand auch die Tatsache, ob dem Hengst die Absamung mittels künstlicher Vagina bekannt war. Von 73 untersuchten Hengsten der Grundgesamtheit waren 66 bereits mit Hilfe einer künstlichen Vagina deseminiert worden (Ausnahmen: H 47, 48, 50, 53, 54, 57).

3.2.1.4 Ejakulatgewinnung

Die Desemination erfolgte durch das Personal der Gestüte oder einen Tierarzt. Es wurden entweder die künstliche Vagina, Modell „Hannover“ oder das Modell „Colorado“, einmal das Modell „Missouri“, jeweils mit einem Einmalinnenschlauch (Firma Minitüb, Tiefenbach) ausgekleidet, angewandt. Als Sprungpartner diente ein Phantom sowie in der Klinik eine Stute. Das Ejakulat wurde durch eine sterile Gaze in einen Standzylinder abfiltriert. Von dem so gewonnenen Sperma stand ein Teilaliquot unterschiedlichen Volumens, meistens 5 ml, zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

3.2.1.5 Gewinnung des Seminalplasmas

Von jedem Ejakulat aller Probanden der Grundgesamtheit (n= 73) wurde Seminalplasma zur weiteren Analyse folgendermaßen gewonnen: Circa vier Milliliter des Ejakulat-Teilaliquotes wurden unmittelbar nach der Gewinnung in sterilen Röhrchen der Firma Sarstedt bei einer Umdrehungszahl von 3000 U/min (circa 1000 g) für 10 Minuten zentrifugiert. Hierdurch konnte die Intaktheit der Spermien gewährleistet werden. Danach wurde der Überstand dekantiert und erneut bei circa 1000g für 10 Minuten zentrifugiert. Das so gewonnene Seminalplasma wurde bis zur Messung in Eppendorf Tubes (à 1,5 ml) aufbewahrt. Eine Kontrolle auf das Freisein von Spermien erfolgte lichtmikroskopisch. Das Spermienpellet wurde verworfen.

3.2.2 Durchführung der Analysen

3.2.2.1 Makroskopische, chemisch-physikalische und lichtmikroskopische Untersuchung des Ejakulates

Makroskopisch wurden von jedem gewonnenen Ejakulat Volumen, Farbe, Konsistenz, Geruch und Beimengungen beurteilt. Weiterhin wurde eine pH-Wert-Messung (chemisch-physikalische Untersuchung) mittels Merck Indikatorpapier durchgeführt. Lichtmikroskopisch erfolgte eine Untersuchung auf Vorwärtsbeweglichkeit, Dichte, Lebend-Tot-Verhältnis und Pathomorphologie.

Die Vorwärtsbeweglichkeit (Motilität) wurde bestimmt durch Beurteilung eines Spermotropfens im Deckglaspräparat auf einen vorgewärmten Objektträger im Phasenkontrastmikroskop bei 400-facher Vergrößerung. Es wurde der prozentuale

Anteil an Spermien geschätzt, die das Gesichtsfeld zu mindestens 2/3 geradlinig durchqueren.

Die Dichtebestimmung erfolgte mit Hilfe eines Spermacue®-Gerätes der Firma Eppendorf. Alternativ erfolgte sie in der Neubauer Zählkammer: Dazu wurden 0,1 ml Sperma mit 1+99 Teilen Wasser vermischt. Nach Verwerfen der ersten Tropfen des Gemisches kam ein Tropfen in die Zählkammer. Im Anschluss wurden in 5 Erythrozytenfelder mit jeweils 16 Kleinstquadraten alle Spermatozoen unter Berücksichtigung der L-Form ausgezählt. Zur Berechnung der Dichte fand die Formel nach Neubauer Anwendung (siehe Formel 1). Aus dem gemessenen Ejakulatvolumen sowie der Spermindichte ließ sich so die Gesamtspermienzahl errechnen.

Formel 1: Dichtebestimmung in der Neubauer-Zählkammer

$$\text{Dichte/ } \mu\text{l} = \frac{z \times V \times 4000}{80}$$

z = gezählte Spermien in 80 Kleinstquadraten

V = Verdünnungsstufe (100)

$1/4000 \mu\text{l}$ = Referenzvolumen (Tiefe 0,1mm x 0,0025 mm²)

Sowohl das Lebend-Tot-Verhältnis als auch die Pathomorphologie der Spermatozoen wurden im Eosin-Ausstrich ausgewertet. Zur Beurteilung des prozentualen Anteils an lebenden Spermatozoen wurden insgesamt 200 Spermien ausgezählt; die ungefärbten wurden als lebend, die rot gefärbten als tot bewertet. Für die Pathomorphologie wurden 200 Spermien ausgezählt, sowohl lebende als auch tote, und Veränderungen an Kopf und Geißel notiert.

3.2.2.2 *Elektronenmikroskopie*

Eine transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung wurde jeweils an einem Ejakulat aller Hengste mit bekannter Fertilität (n= 46) durchgeführt. Es wurden also sowohl Hengste untersucht, welche eine sehr gute, gesicherte Fertilität aufwiesen, als auch Hengste, welche infertil waren. Wurde der Hengst mehrfach zur Probengewinnung deseminiert, wurde immer das zuerst gewonnene Ejakulat untersucht. Hierfür wurde unmittelbar nach der Gewinnung ein Milliliter Ejakulat in 2 Eppendorf Tubes (à 2 ml) überführt und mit „Yellow Fix“ (Formaldehyd-Glutaraldehyd-Trinitro-Fixation, zur Übersicht der verwendeten Reagenzien siehe **ANHANG**) im Verhältnis 1:2 für circa 40 Minuten fixiert. Im Anschluss wurden die Proben 15 Minuten in einer Hettich® Zentrifuge bei circa 1000 g (3000 U/min) zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abpipettiert und das entstandene Spermienpellet sechsmal mit 0,1 molarem Phosphatpuffer (pH = 7,36) gewaschen. Um das Spermienpellet zu erhalten, erfolgte die Waschung mit Hilfe einer 5-minütigen Zentrifugation bei circa 450 g (2000 U/min). Danach verblieben die Proben über Nacht bei 4°C im Kühlschrank.

Am folgenden Tag wurde mit 1 % iger Osmiumsäure über eine Stunde nachfixiert. Im Anschluß wurde erneut sechsmal eine Waschung mit 0,1 molarem Phosphatpuffer (pH = 7,36) durchgeführt. Zwischen den Waschungen war jeweils eine circa zweiminütige Zentrifugation essentiell. In der aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte die Entwässerung des Spermienpellets, indem zu den Proben zunächst nacheinander für jeweils 15 Minuten 50 % iger, 70 % iger, 80 % iger, 96 % iger und absoluter Alkohol gegeben wurden. Vor Zugabe der nächsthöheren Alkoholkonzentration wurden die vorherigen Lösungen wieder abpipettiert. Die weitere Entwässerung erfolgte dreimal für je 40 Minuten mit absolutem Alkohol und danach dreimal für je 10 Minuten mit Xylol. Danach wurde zu jeder Probe ein Gemisch aus Epon und Xylol im Verhältnis 1:1

zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Am folgenden Tag wurden circa 400 µl reines Epon pro Probengefäß zugegeben. Nach 4 Stunden Einwirkzeit wurden die Proben ausgebettet und 20 Stunden im Wärmeschrank bei 60°C polymerisiert.

Die spermahaltigen Eponblöcke wurden getrimmt. Dann wurden zunächst Semidünnschnitte zur Evaluierung eines geeigneten, spermiendichten Areal angefertigt, die mit 1 % iger Toluidinblau-Natriumboratlösung gefärbt wurden. Von diesem Areal wurden nach Präparation Ultradünnschnitte mit Hilfe eines Diamantmikrotoms angefertigt. Nach Aufziehen auf Kupfernetze (300 mesh) erfolgte die automatische, maschinelle Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat mit Hilfe des Leica Reichert Ultrastainers und im Anschluss die Beurteilung am Zeiss EM 109 Elektronenmikroskop bei 80 kV (Kilovolt).

Jeweils 200 Spermienköpfe wurden auf das Vorhandensein von Kernvakuolen, Kondensationsstörungen, Doppelköpfe sowie auf das Vorhandensein und die Struktur ihres Akrosoms durchgemustert. Weiterhin wurden 200 Mittel-/ proximale Schwanzstücke (im Bereich des Cytoplasmotropfens, siehe Abb. 2 Bereiche a/b sowie c) und 200 Schwanzstücke (Bereiche d bis i/k) beurteilt, wobei mindestens 50 Beurteilungen aus dem Bereich d kamen. Schließlich wurden noch 100 Geißellängsschnitte evaluiert. Besondere Berücksichtigung fand bei der Beurteilung des Axonems das Tubulmuster. Schließlich wurden in allen untersuchten Bereichen der Spermatozoen jegliche Besonderheiten sowie das Vorhandensein weiterer Zellen notiert. Demnach belief sich die Gesamtzahl aller Erhebungen eines jeden Spermienbereiches auf 9400 Beobachtungen, von den Längsschnitten der Geißel wurden 4700 evaluiert.

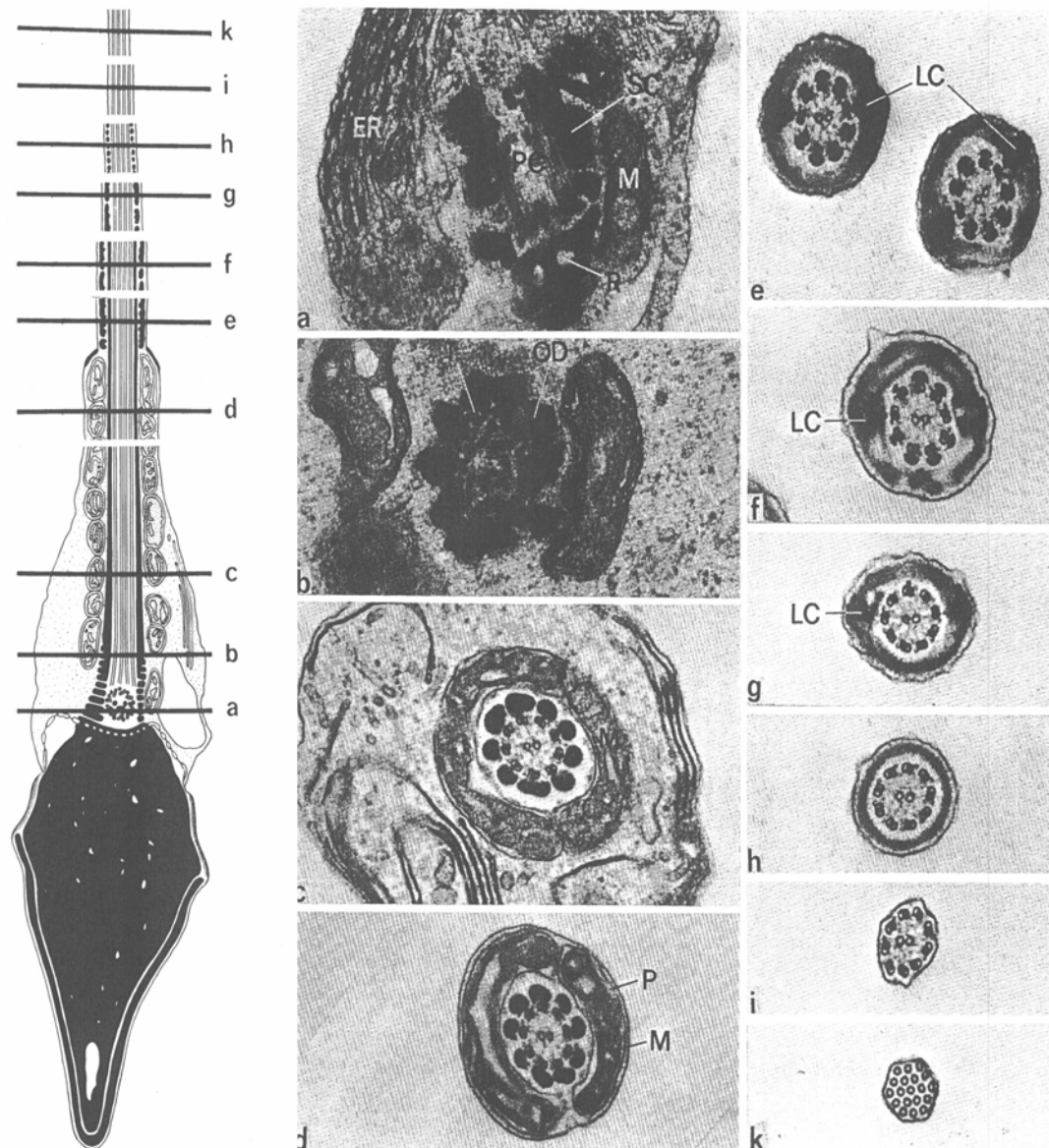


Abb. 2: Schematische Graphik eines Spermienquerschnittes sowie korrespondierende Ebenen anhand elektronenmikroskopischer Darstellung (entnommen aus HOLSTEIN, A.F. und ROOSEN-RUNGE, E.C. Atlas of human spermatogenesis, Grosse Verlag, Berlin, 1981)

3.2.2.3 **Bestimmung der Enzyme und Mineralstoffe im Seminalplasma**

Folgende Enzymaktivitäten wurden im Seminalplasma ermittelt: Aspartat-Amino-Transferase (AST), Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), γ -Glutamyl-Transferase (GGT), Creatininkinase (CK), Laktatdehydrogenase (LDH), Saure Phosphatase (SP) sowie Alkalische Phosphatase (AP). Außerdem wurden die Gehalte der nachfolgend aufgeführten Mineralstoffe gemessen: Natrium, Kalium, Kalzium (Gesamtkalzium sowie ionisiertes Kalzium), Magnesium, anorganisches Phosphat und Chlorid als Mengen- sowie Eisen, Kupfer und Zink als Spurenelemente.

Die Bestimmung der Enzyme im Seminalplasma erfolgte mittels EFOX 5053 Eppendorf oder ABL 615 von Radiometer, Copenhagen und die der Mineralstoffe mittels EPAC 6140 Eppendorf oder EPAC 5430-TM. In den Tabellen 6 und 7 sind die Methoden wiedergegeben, die durch die entsprechenden oben genannten Geräte Anwendung fanden.

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Bestimmungsmethoden zur Ermittlung der Enzymaktivitäten

Enzym	Methode (Wellenlänge, Sonstiges)
AST ¹	UV-Photometrie (Hg 365 nm, Messung gegen Luft)
GLDH ¹	Optimierte Standardmethode (Hg 340 nm)
GGT ²	Kinetischer Farbtest nach Persijn und van der Slik (1976) (Hg 405 nm)
CK ¹	Optimierte Standardmethode (UV-Test: 340 nm, Messung gegen Luft)
LDH ¹	Optimierte Standardmethode (UV-Test: 340 nm, Messung gegen Luft)
AP ¹	Optimierte Standardmethode (Hg 405 nm, Messung gegen Luft)
SP ¹	Humanzym M-Farbtest, Farbtest nach Hillmann (1971)

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Bestimmungsmethoden zur Ermittlung der Mengen- und Spurenelementkonzentrationen

Element	Methode (Wellenlänge, Sonstiges)
Natrium ¹	Flammenphotometrie (589 nm)
Kalium ¹	Flammenphotometrie (Turbidimetrische Methode, 768 nm)
Gesamtkalzium ¹	Flammenphotometrie (o-Kresolphthalein-Methode, 622 nm)
Ionisiertes Kalzium ¹	Näherungsbestimmung durch 5 Standardreferenzlösungen
Magnesium ¹	Photometrischer Farbtest (520 nm, Messung gegen Leerwert; Xilidylblau-Methode)
Anorganisches Phosphat ¹	Photometrie (340 nm, Messung gegen Leerwert; Molybdat-Methode)
Chlorid ¹	Thiocyanat TPTZ-Methode
Kupfer ¹	Flammenphotometrie (Farbtest 3,5-diBr-PAESA)
Zink ¹	Flammenphotometrie (5-Br-PAPS-Zinkkomplex-Methode mit Enteiweissung)
Eisen ¹	Photometrischer Farbtest (578 nm, Messung gegen Leerwert)

Optimierte Standardmethoden entsprechen den Empfehlungen der DGKC (Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie).

Hersteller der verwendeten Bestimmungskits sind:

¹ Rolf Greiner BioChemica GmbH, Bahnhofstrasse 32, 65558 Flacht

² Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Max-Planck-Ring 21, 65205 Wiesbaden

3.3 Auswertung der Analysen

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte zunächst in Abhängigkeit vom Untersuchungstermin, an dem das beurteilte Ejakulat gewonnen wurde. Weiterhin wurden die gewonnenen Samenproben retrospektiv unabhängig von der Jahreszeit und der Fertilität aufgrund der Spermaqualität in verschiedene Gruppen eingeteilt. Hierbei wurden sowohl makroskopische, chemisch-physikalische, als auch lichtmikroskopische Befunde berücksichtigt. Als Mindestanforderungen wurden die in Tabelle 9 dargestellten prozentualen Angaben angesehen. Demnach wurden die Proben wie folgt klassifiziert: Gruppe A. den Mindestanforderungen entsprechende Ejakulate, Gruppe B. geringgradig von den Mindestanforderungen abweichende Befunde, Gruppe C. hochgradig abweichende Befunde. Der Gruppe C wurden Samenproben zugeordnet, die entweder durch hochgradig abweichende Einzelbefunde auffielen oder bei denen Abweichungen von der Norm bei mehreren untersuchten Parametern vorhanden waren. Die statistische Auswertung der explorativen Gruppenvergleiche (Gruppe A versus Gruppe B: A vs. B, Gruppe B versus Gruppe C: B vs. C, Gruppe A versus Gruppe C: A vs. C) wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests (U-Tests) durchgeführt. Es erfolgte der Vergleich der Parameter der konventionellen Ejakulatanalyse sowie der Ergebnisse der biochemischen Analysen, der Enzyme, Makro- und Mikroelemente.

Tabelle 9: Mindestanforderungen, die an die untersuchten Hengstejakulate gestellt wurden

Parameter	Mindestanforderung
Volumen	≥ 40 ml
pH-Wert	6,8 – 7,2
Dichte	100×10^6
Gesamtspermienzahl	6×10^9
Gesamtmotilität	≥ 70 %
Vorwärtsbeweglichkeit	≥ 50 %
Lebende Spermien	≥ 80 %
Pathomorphologie	≤ 35 %

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Dabei wurden verschiedene Programme des Statistikprogrammpaketes BMDP (1993) verwendet: BMDP/Dynamic, Release 7.0 (DIXON, 1993), BMDP 3S- Darstellung nicht-parametrischer Statistik. Ziel waren die einfache und komplexe Datenbeschreibung zur Darstellung von Mittelwert ($\bar{x}$), Standardabweichung (s), Variationskoeffizient (VK), Minimal- und Maximalwert, der Spannweite (max – min), Median ($\tilde{x}$) sowie geometrisches Mittel ($\bar{x}_g$) und Streufaktor (SF). Zum Nachweis saisonaler Unterschiede fand der Friedman-Test Anwendung. Bei den dreifach untersuchten Probanden wurde zudem die Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft. Falls vorhanden wurden zur Verifizierung einer

saisonalen Abhängigkeit einfaktorielle Varianzanalysen mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors Zeit durchgeführt. Die Korrelationsanalysen erfolgten durch den Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten (SACHS, 1984). Schließlich wurden die Unterschiede bezüglich der Ejakulatqualität anhand explorativer Gruppenvergleiche mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ermittelt. Bei der Bewertung statistischer Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Spezielle anamnestische Erhebungen

Der Mittelwert der bekannten Konzeptionsraten der untersuchten Hengste ($n= 46$) aus der Gruppe 1 betrug $72,0 \pm 23,7 \%$ ($\bar{x} \pm s$). In Abhängigkeit des Probenentnahmetermins lag das arithmetische Mittel der Fertilität zum ersten Untersuchungstermin (April/Mai) bei $70,4 \pm 24,8 \%$; zum zweiten Untersuchungstermin (Juli/August) bei $74,6 \pm 19,8 \%$ ($\bar{x} \pm s$) und zum dritten Untersuchungstermin (November/Dezember) bei $77,8 \pm 15,9 \%$ ($\bar{x} \pm s$).

Unter der Festlegung, dass aus klinischer Sicht Konzeptionsraten von 10 bis 70 % als subfertil und solche unter 10 % als infertil gelten, wurde das Probandenkollektiv der Gruppe 1 wie folgt klassifiziert: 63 % der Hengste ($n=29$) wurden als fertil (Klasse 1), 30,4 % ($n= 14$) als subfertil (Klasse 2) sowie 6,6 % ($n= 3$) als infertil (Klasse 3) eingestuft.

Ergebnisse

Tabelle 10: Bekannte Fertilitätsdaten aller untersuchten Hengste, klassifiziert nach

fertil (%)		subfertil (%)		infertil (%)	
Hengst-Nr.	Fertilität	Hengst-Nr.	Fertilität	Hengst-Nr.	Fertilität
1	100	30	67,7	44	6,6
2	100	31	66,6	45	0
3	100	32	66,6	46	0
4	100	33	66,6		
5	100	34	64,7		
6	100	35	61,1		
7	95	36	60		
8	91,7	37	56,5		
9	90,9	38	54,2		
10	90	39	50		
11	90	40	50		
12	88,9	41	50		
13	87,5	42	45,9		
14	87,5	43	40		
15	85,3				
16	84,6				
17	83,7				
18	83,3				
19	82,6				
20	81,3				
21	80				
22	78,3				
23	75				
24	75				
25	73,3				
26	72,7				
27	72,7				
28	72				
29	71,4				

Die meisten Hengste (n= 61) standen zu Beginn der Untersuchungen in regelmäßigem Deck- beziehungsweise Besamungseinsatz.

Die letzte Absamung vor der Probengewinnung erfolgte bei 32,9 % der Hengste (n= 21) am Tag vorher, bei 24,7 % der Hengste (n= 18) in einer Frist von einer Woche vorher. Bei 13,7 % der in die Untersuchung eingeschlossenen Hengste (n= 10) war die letzte Desemination zwischen einer und 4 Wochen, bei 6,9 % der Hengste (n= 5) war sie sogar länger als 4 Wochen her. Für 19,1 % der Hengste (n= 14) konnte keine Auskunft

über den Zeitpunkt der letzten Absamung gegeben werden. Zwei Hengste (3,7 %) waren vorher noch nie deseminiert worden. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Probenentnahmetermine ergab sich folgende Verteilung: Im April/Mai lag bei 36,8 % der Hengste (n= 21) die letzte Absamung vor der Probengewinnung einen Tag zurück. Im Allgemeinen wurden diese Hengste täglich deseminiert. Innerhalb einer Frist von circa einer Woche waren 26,3 % der Hengste (n= 15) zuletzt abgesamt worden. Beim 2. Untersuchungstermin fand bei 23,4 % der Hengste (n= 14) die letzte Desemination am Tag vorher, bei 31,7 % der Tiere (n= 19) in einem Zeitraum von einer Woche vor der Probennahme statt. Die letzte Desemination vor dem 3. Untersuchungstermin lag bei allen Hengsten (n= 15) länger als 12 Wochen zurück.

4.2 Beurteilung des Allgemeinzustandes

Die jeweilig vor der Desemination vorgenommene klinische Untersuchung verlief stets ohne besondere Befunde, so dass der Allgemeinzustand aller Hengste als gut zu bezeichnen war. Ein Hengst (H 52) hatte sich vor der zweiten Untersuchung einen Sehnenschaden zugezogen, eine Absamung konnte aber dennoch problemlos vorgenommen werden. Auswirkungen auf die Libido machten sich bei ihm nicht bemerkbar.

4.3 Spezielle andrologische Untersuchung

Die spezielle andrologische Untersuchung erbrachte mit Ausnahme bei einem Hengst ebenfalls keine klinisch relevante Aberration. Bei einem Hengst (H 44) ergab allerdings

die Palpation des linken Hodens eine leichte Unregelmäßigkeit der Oberfläche sowie eine Eindellung am kaudalen Pol. Beide Nebenhoden wiesen kleine, lokale Verhärtungen auf, stellten sich aber gut abgesetzt dar.

4.4 Beurteilung der Libido sexualis

Die Libido wurde in Kombination mit der Anzahl der Aufsprungversuche sowie der Deck-/ Absamerfahrung des Hengstes bewertet, aber auch unter Berücksichtigung der Tatsache, ob dem Hengst die künstliche Vagina zur Absamung bekannt war.

Unter der Voraussetzung, dass die Reaktionszeit vom Erkennen des Phantoms oder des Deckpartners unter einer Minute lag, konnte die Libido bei 58,3 % der Hengste (n= 42), die nur einmal beprobt wurden ($n_{\text{gesamt}} = 73$), als sehr gut charakterisiert werden (Diagramm 2). Eine gute Libido, mit einer Reaktionszeit zwischen einer und 5 Minuten, wiesen 29,2 % der Hengste (n= 21) auf. Eine befriedigende Libido mit einer Zeitspanne von 5 bis 10 Minuten vor dem Aufsprung war bei 5,6 % (n= 4) vorhanden. Ausreichend war die Libido bei ebenfalls 5,6 % der Hengste (n= 4). Ausschließlich ein Hengst hatte eine schlechtere Libido (1,3 %). Unmittelbar nach dem ersten Aufsprung ejakulierten 56,5 % (n= 39) der Hengste, 23,2 % (n= 16) ejakulierten im Verlauf des 2. Aufsprungs. Zur Ejakulation nach drei bis 5 Aufsprüngen kam es bei 18,8 % (n= 13) der Probanden. Ein Hengst (1,5 %) sprang häufiger als fünfmal auf das Phantom, bevor der Ejakulationsreflex ablief.

Unter Berücksichtigung der Saison ergab sich bei der Auswertung der Ergebnisse eine differente Verteilung (Diagramm 2): Insgesamt zeigten anlässlich des ersten Untersuchungstermines 55,4 % der Hengste (n= 31) eine sehr gute, 35,6 % eine gute (n= 20) und 3,6 % (n= 2) eine befriedigende Libido. Eine schlechtere Libido hatten

5,4 % der Hengste (n= 3). Die Ejakulation erfolgte bei 57,4 % der Hengste (n= 31) beim ersten Aufsprungversuch, bei 25,9 % der Tiere (n= 14) beim zweiten, bei 14,8 % (n= 8) zwischen dem dritten bis fünften Aufsprungversuch; ein Hengst (1,9 %) benötigte mehr als 5 Aufsprünge bis zur Ejakulation. Im Verlauf des zweiten Untersuchungstermines wiesen 61,7 % der Hengste (n= 37) eine sehr gute, 16,7 % (n= 10) eine gute, 4,9 % (n= 3) eine befriedigende Libido sowie 16,7 % (n= 10) eine schlechtere Libido auf. Beim ersten Aufsprungversuch samten 62,5 % der Hengste (n= 35) ab, 19,6 % (n= 11) beim zweiten, 16,1 % (n= 9) zwischen dem dritten bis fünften und 1,8 % (n= 1) erst nach mehr als 5 Aufsprungversuchen. Bei der dritten Probengewinnung ergaben sich folgende Ergebnisse: 46,7 % der Hengste (n= 7) hatten eine sehr gute, 13,3 % (n= 2) eine gute, 26,7 % (n= 4) eine befriedigende Libido sowie 13,3 % der Hengste (n= 2) eine Libido, die ausreichend oder schlechter war. Es ejakulierten 61,5 % Hengste (n= 8) beim ersten Aufsprungversuch, 23,1 % (n=3) beim zweiten und 15,4 % (n= 2) erst nach mehr als 4 Aufsprungversuchen (siehe auch Tabelle 11).

Tabelle 11: Darstellung der Anzahl der Aufsprünge, die die untersuchten Hengste benötigten, bevor es zur Ejakulation kam (n= Probenanzahl)- sowohl bezogen auf die Grundgesamtheit als auch auf die unterschiedlichen Probenentnahmetermine

Zeitraum	n	$\bar{x}_g$ (SF)	Median	Minimum	Maximum
Grundgesamtheit	69	1,52 (1,72)	1,0	1	10
1: April-Mai	54	1,50 (1,72)	1,0	1	10
2: Juli/August	56	1,45 (1,76)	1,0	1	16
3: November/Dezember	13	1,45 (1,71)	1,0	1	4

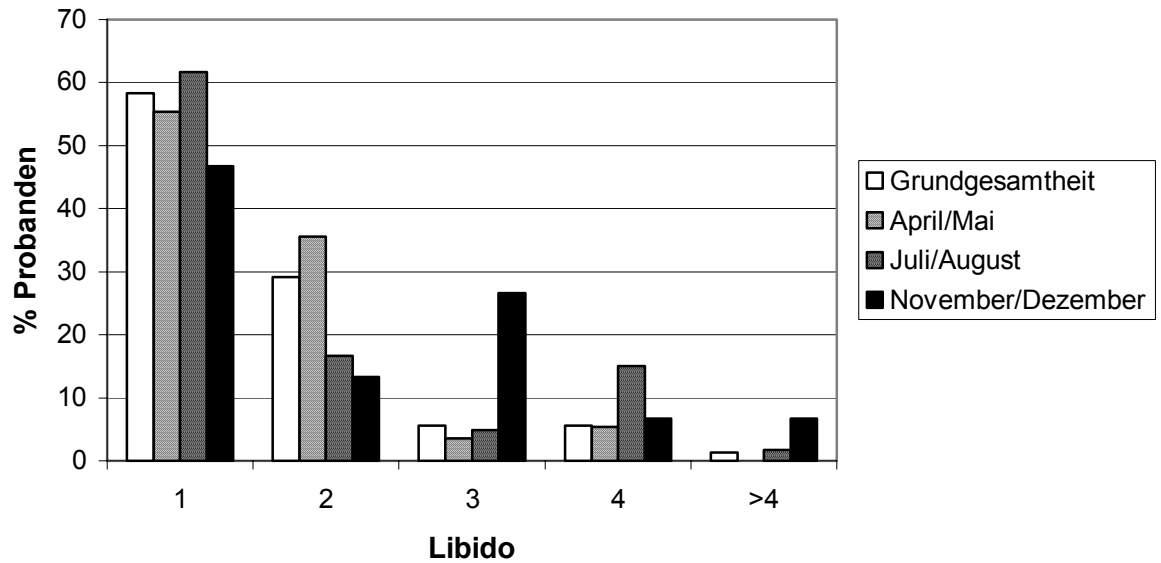


Diagramm 2: Darstellung der Libido sexualis aller untersuchter Hengste (Grundgesamtheit) sowie zu unterschiedlichen Untersuchungsterminen

Legende: Libido 1 = sehr gut = Reaktionszeit < 1 Minute
 Libido 2 = gut = Reaktionszeit < 5 Minuten
 Libido 3 = befriedigend = Reaktionszeit 5 – 10 Minuten
 Libido 4 = ausreichend = Reaktionszeit 10 – 15 Minuten
 Libido >4 = Reaktionszeit > 15 Minuten

Die Entwicklung der Libido sexualis der untersuchten Probanden in Abhängigkeit des Untersuchungstermins ist in Diagramm 2 dargestellt. Es ist erkennbar, dass die Libido im Juli/August etwas besser war als im April/Mai, während sich im November/Dezember die Libido im Vergleich zu den beiden anderen Terminen als am schlechtesten ergab.

Unter Berücksichtigung des saisonalen Aspektes war bei 12 Hengsten (52,2 %) eine Verbesserung der Libido zwischen den Probenahmen im April/Mai und Juli/August, bei 11 Tieren (47,8 %) dagegen eine Verschlechterung zu beobachten. Zwischen den Terminen Juli/August und November/Dezember verbesserte sich die Libido bei 7 (63,6 %), verschlechterte sich allerdings bei 4 Tieren (36,4 %). Diese Unterschiede ließen sich statisch allerdings nicht verifizieren ($p > 0,1$).

4.5 Ejakulatuntersuchung

4.5.1 Makroskopische Untersuchung

Von den in die Untersuchung einbezogenen 73 Hengsten wiesen 46,6 % (n= 34) der untersuchten Ejakulate ein Volumen unter 40 ml, 38,4 % (n= 28) ein solches zwischen 40 und 60 ml und 15 % (n= 11) eines über 60 ml auf. Weiterhin wurde überprüft, ob ein saisonaler Einfluss auf das Volumen vorlag (Diagramm 3). Die Ejakulatmenge war bei 23 Hengsten im Juli/August größer, bei 19 allerdings kleiner als im April/Mai. Bei drei Probanden war das Volumen unverändert. Im Vergleich zum Juli/August besaßen 9 Tiere im November/Dezember ein größeres und 5 ein kleineres Ejakulatvolumen. Es war erkennbar, dass die meisten Hengste mit anfänglich kleinvolumigen Samenportionen auch zu den folgenden Absamterminen eher geringe Volumina erbrachten.

Die Verteilung der Ejakulatvolumina aller zu den verschiedenen Terminen untersuchten Hengste wird in Diagramm 3 wiedergegeben. Dabei zeigte sich, dass keine deutlichen saisonalen Unterschiede bezüglich des Probandenkollektivs zu existieren scheinen (siehe auch Tabelle 12).

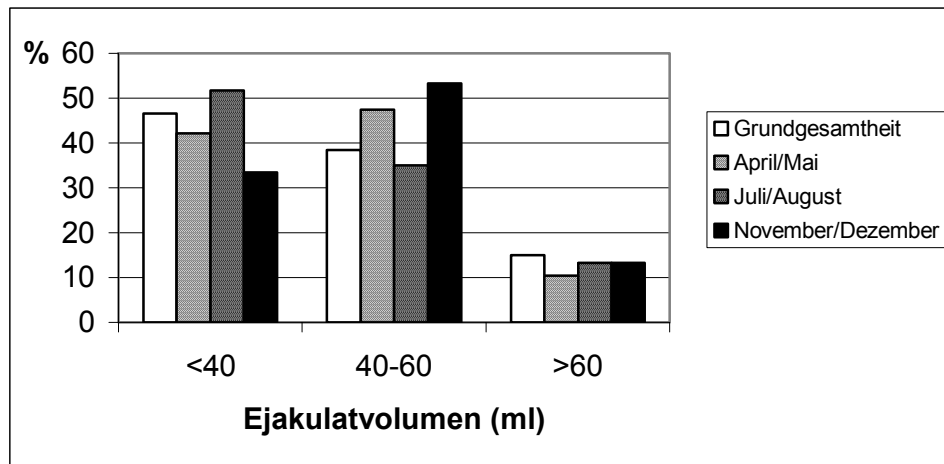


Diagramm 3: Prozentuale Verteilung der Proben bezüglich der Ejakulatvolumina nach Einteilung in die Gruppen < 40 ml, 40 bis 60 ml und > 60 ml, Darstellung in Abhängigkeit der Grundgesamtheit beziehungsweise der Untersuchungstermine

Tabelle 12: Samenvolumen von 73 Hengsten der Grundgesamtheit sowie von allen Probanden zu den drei verschiedenen Untersuchungszeitpunkten im Vergleich (in ml)

Kriterium	n	$\bar{x}_g$ (SF)	Median	Minimum	Maximum
Grundgesamtheit	73	40,7 (1,8)	40	8	300
1: April-Mai	57	39,1 (1,6)	42,0	8	110
2: Juli/August	60	42,4 (1,7)	37,5	20	300
3: November/Dezember	15	76,2 (1,2)	40,0	5	75

Die Farbe aller Ejakulate entsprach mit einer Ausnahme (H 12) den Richtwerten und war entweder elfenbeinfarben oder blau-/grauweiss. Das abweichende Ejakulat des dritten Untersuchungstermines (H 12) hatte eine gelblich-trübe Färbung. Der Geruch der Ejakulate war tierartspezifisch; das Ejakulat von H 12 roch stechend, urinös.

Von allen Proben besaßen 6,9 % der Ejakulate (n= 5) eine wässrige, 24,4 % (n= 17) eine molkeartige, 41,5 % (n= 29) eine milchige und 27,2 % (n= 19) eine rahmige Konsistenz. Bei Betrachtung unter Berücksichtigung der Saison hatten im April/Mai 3,6 % der Ejakulate (n= 2) eine wässrige, 27,3 % (n= 15) eine molkeähnliche, 43,6 % (n= 24) eine milchige und 25,5 % (n= 14) eine rahmige Konsistenz. Zum Termin

Juli/August war die Konsistenz von 8,3 % der Ejakulate (n= 5) wässrig, von 23,3 % (n= 14) molkeähnlich, von 36,7 % (n= 22) milchig und von 31,7 % (n= 19) rahmig. Beim dritten Untersuchungstermin (November/Dezember) besaßen 20 % der Ejakulate (n= 3) eine molkeähnliche, 33,3 % (n= 5) milchige und von 46,7 % (n= 7) rahmige Konsistenz. In den Ejakulaten von zwei Hengsten (2,7 %) waren Schleimbeimengungen vorhanden, bei 37 Hengsten (50,7 %) enthielt das Ejakulat nur geringgradig Schmutzpartikel als Beimengungen. Nach Filtration wiesen mit Ausnahme des Ejakulates von H 12 vom 3. Untersuchungstermin (Urin) keine Beimengungen mehr auf.

4.5.2 pH-Wert

Der pH-Wert lag mit Ausnahme von zwei untersuchten Ejakulaten (2,7 %) immer innerhalb des Referenzbereiches von 6,8 bis 7,2, im Mittel bei 7,0. Bei einem Hengst (H 47) wurde ein pH-Wert von 8 mittels Indikatorpapier bestimmt. Bei einem anderen Hengst (H 12, 3. Untersuchungstermin) lag der mit pH-Papier ermittelte pH-Wert bei 7,7, was auf Urin-Beimengungen zurückzuführen war.

4.5.3 Mikroskopische Untersuchung

Von 73 Ejakulaten hatten 91,6 % (n= 65) eine Dichte, die oberhalb der Mindestanforderung von 100×10^6 Spermien/ml lag. Im Median lag die Dichte bei $247 \pm 91,3 \times 10^6$ Spermien/ml. Die Gesamtzahl untersuchter Ejakulate betreffend wiesen 6,9 % (n= 5) eine Dichte unter 100×10^6 Spermien/ml, 24,4 % (n= 17) eine Dichte zwischen 100×10^6 und 200×10^6 Spermien/ml auf. In 41,5 % (n= 29) der Ejakulate wurde eine Dichte zwischen 200×10^6 und 300×10^6 Spermien/ml sowie in 27,2 % (n= 19) der Ejakulate eine Dichte über 300×10^6 Spermien/ml bestimmt. Nur

18,6 % der Samenproben des Kollektivs unterschritten die geforderte Mindest-Gesamtspermienzahl von $6 \times 10^9/\text{ml}$ (*Tabelle 13*). Beziehungen zur Saison wurden ebenfalls überprüft (*Diagramm 4*). Es ließ sich statistisch jedoch keine Abhängigkeit von der Jahreszeit feststellen ($p > 0,1$), wenn auch tendenziell die höchste Dichte im November/Dezember mit $286 \pm 90,9 \times 10^6$ Spermien/ml versus $244 \pm 108,2 \times 10^6$ Spermien/ml (April/Mai) und $259,2 \pm 85,9 \times 10^6$ Spermien/ml (Juli/August) ermittelt werden konnte (siehe auch *Tabelle 14*). Im Juli/August konnte bei 27 Probanden (64,3 %) eine Erhöhung, bei 15 (35,7 %) eine Verringerung der Dichte im Vergleich zum April/Mai beobachtet werden. Bei 4 Deckhengsten (28,6 %) hatte die Samenprobe im November/Dezember eine höhere, bei 10 (71,4 %) eine geringere Dichte als im Juli/August.

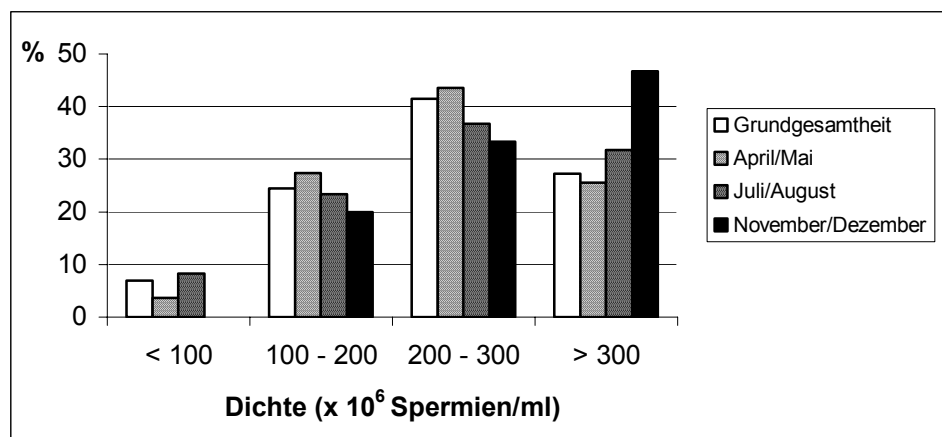


Diagramm 4: Prozentuale Verteilung der Proben bezüglich Ejakulatdichte nach Einteilung in die Gruppen < 100, 100 bis 200, 200 bis 300, > 300 $\times 10^6$ Spermien/ml. Darstellung in Abhängigkeit der Grundgesamtheit beziehungsweise der Untersuchungstermine

Tabelle 13: Geometrischer Mittelwert und Streufaktor, Median, Minimum und Maximum der Gesamtspermienzahl der untersuchten Ejakulate: Darstellung der Grundgesamtheit sowie der saisonalen Unterschiede ($\times 10^9$ Spermien)

Kriterium	n	$\bar{x}_g$ (SF)	Median	Minimum	Maximum
Grundgesamtheit	70	8,6 (1,6)	8,8	2,2	18,9
1: April-Mai	54	8,6 (1,7)	8,8	2,2	18,9
2: Juli/August	60	9,7 (1,5)	9,7	3,3	21,5
3: November/Dezember	15	8,8 (2,2)	11,1	0,86	19,1

Tabelle 14: Geometrischer Mittelwert und Streufaktor, Median, Minimum und Maximum der Dichte aller in die Untersuchung eingeschlossenen Ejakulate: Darstellung der Grundgesamtheit sowie der saisonalen Unterschiede ($\times 10^6/\text{ml}$)

	n	$\bar{x}_g$ (SF)	Median	Minimum	Maximum
Grundgesamtheit	71	214,7 (1,6)	247	40	470
1: April-Mai	55	224,5 (1,5)	244,0	76	470
2: Juli/August	60	227,5 (1,7)	259,2	40	555
3: November/Dezember	15	270,5 (1,4)	286,0	152	506

Die geforderte Gesamtmotilität von mindestens 70 % aller Spermatozoen erreichten 68,5 % der Ejakulate ($n= 50$). Dabei lag die Vorwärtsbeweglichkeit im Median bei $60 \pm 18,5$ % [$\bar{x}_g$ (SF) = 46,3 % (2,2)]. Es wiesen 76,8 % der Probanden ($n= 56$) mindestens 50 % Progressivmotilität auf. Die übrigen Proben teilten sich wie folgt auf: 16,4 % der Ejakulate ($n= 12$) hatten einen Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien zwischen 20 und 45 %, 4,1 % ($n=3$) einen Anteil zwischen 5 und 10 %, 2,7 % ($n=2$) weniger als 5 % progressiv motile Spermatozoen. Unter Berücksichtigung des saisonalen Aspektes (Diagramm 5) konnte mittels Friedman-Test ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) für die Vorwärtsbeweglichkeit ermittelt werden. Eine Gesamtmotilität von mindestens 70 % wurde beim 1. Untersuchungstermin von 75,4 % ($n= 43$), beim 2. Untersuchungstermin von 53,3 % ($n= 32$) sowie beim 3.

Ergebnisse

Untersuchungstermin von 60 % der Probanden (n= 9) erreicht (siehe auch *Tabelle 15*). Bei 9 Hengsten (20,5 %) des Kollektivs kam es zu einer Verbesserung, bei 28 (63,6 %) zu einer Verschlechterung der progressiven Motilität zwischen den Probenentnahmetermen April-Mai und Juli-August. Bei 7 Tieren (15,9 %) war der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien konstant. Im November-Dezember besaßen 10 Probanden (71,4 %) eine bessere, drei (21,4%) eine schlechtere und einer (7,2 %) die gleiche Vorwärtsbeweglichkeit wie im Juli-August.

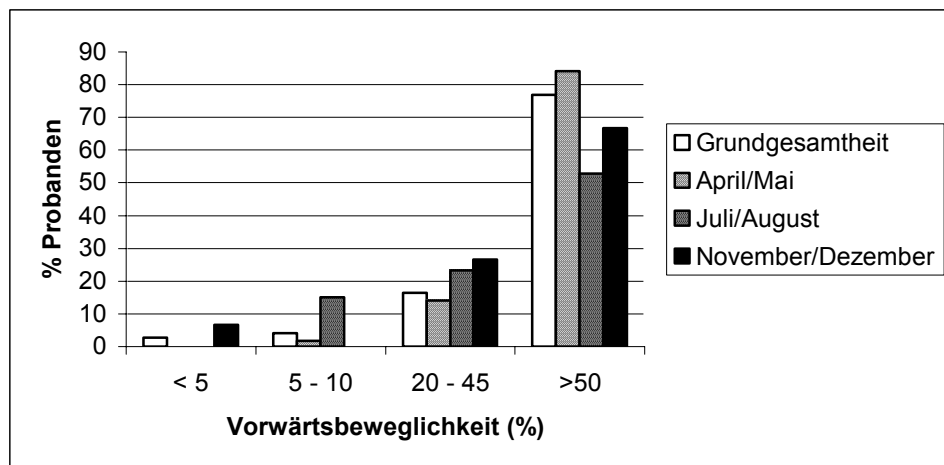


Diagramm 5: Prozentuale Verteilung der Proben bezüglich Vorwärtsbeweglichkeit nach Einteilung in die Gruppen < 5 %, 5 bis 10 %, 20 bis 45 % sowie > 50 %. Darstellung in Abhängigkeit der Grundgesamtheit beziehungsweise der Untersuchungstermine

Tabelle 15: Darstellung von geometrischem Mittelwert und Streufaktor, Median, Minimum und Maximum der geschätzten Gesamtmotilität sowohl in der Gruppe der Grundgesamtheit, als auch in Abhängigkeit der unterschiedlichen Probenentnahmetermine (Gesamtmotilität in %)

	n	$\bar{x}_g$ (SF)	Median	Minimum	Maximum
Grundgesamtheit	73	61,1 (1,9)	70	2	90
1: April-Mai	57	68,7 (1,4)	75	10	90
2: Juli/August	60	52,2 (2,1)	70	0	85
3: November/Dezember	15	63,1 (1,3)	70	0	90

Das geforderte Lebend-Tot-Verhältnis der Spermien von mindestens 80 %: 20 % lag in 43,5 % (n= 30) der Proben vor. Wurde der saisonale Aspekt berücksichtigt, ergab sich, dass im April-Mai 46,3 % der Ejakulate (n= 25), im Juli-August 41,8 % (n= 23) sowie im November-Dezember 26,6 % (n= 4) mindestens 80 % lebende Spermatozoen enthielten (*Diagramm 6, Tabelle 16*). Der mediane Anteil lebender Spermatozoen lag zum Zeitpunkt 1 bei $78,8 \pm 14,3$ %, zum Zeitpunkt 2 bei $77 \pm 18,1$ % und zum Zeitpunkt 3 bei $72,5 \pm 23,2$ %. Mittels Friedman-Test konnte ein signifikanter Zusammenhang ($p < 0,05$) zwischen Saison sowie prozentualem Anteil lebender Samenzellen ermittelt werden. Beim Vergleich der einzelnen Deseminationstermine ergab sich, dass zwischen dem ersten und zweiten bei 13 Probanden (35,1 %) ein größerer Anteil, bei 23 (62,2 %) ein geringerer Anteil sowie bei einem (2,7 %) ein konstanter Anteil lebender Spermien im Ejakulat enthalten war. Bei 8 Tieren (66,7 %) waren beim dritten Termin im Vergleich zum zweitem mehr, bei 4 (33,3 %) weniger lebende Samenzellen existent.

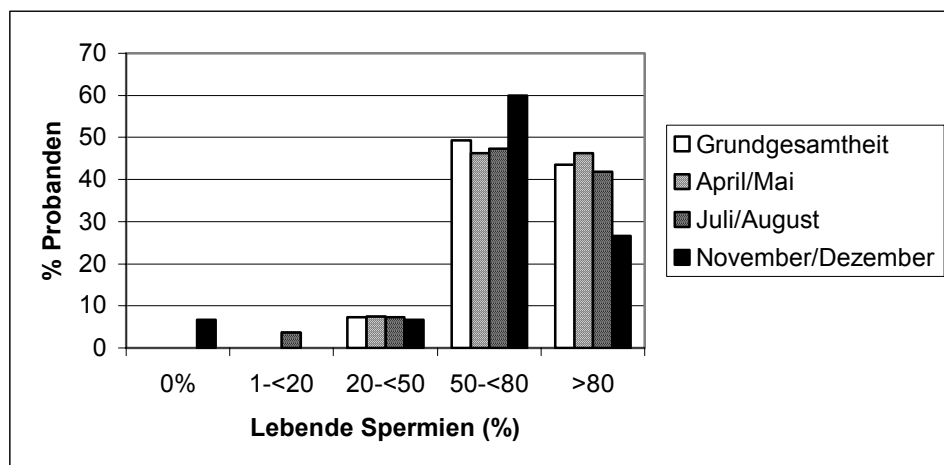


Diagramm 6: Verteilung der Proben bezüglich des prozentualen Anteils an lebenden Spermatozoen nach Einteilung in die Gruppen 0 %, 1 bis < 20 %, 20 bis < 50 %, 50 bis < 80 % sowie > 80 % lebende Spermien, Darstellung in Abhängigkeit der Grundgesamtheit beziehungsweise der Untersuchungstermine

Tabelle 16: Darstellung von geometrischer Mittelwert und Streufaktor, Median, Minimum und Maximum des prozentualen Anteils an lebenden Spermien (%)

	n	$\bar{x}_g$ (SF)	Median	Minimum	Maximum
Grundgesamtheit	73	73,7 (1,3)	78,5	25	96
1: April-Mai	54	73,9 (1,3)	78,8	25	96
2: Juli/August	55	68,6 (1,5)	77,0	9	93
3: November/Dezember	15	69,7 (1,3)	72,5	0	91

Die Pathomorphologie betreffend erfüllten 64,4 % der untersuchten Ejakulate (n= 47) die Anforderung, weniger als 35 % veränderten Spermien zu enthalten. Ein prozentualer Anteil zwischen 35 und 45 % pathomorphologisch abweichender Samenzellen war bei 12,3 % aller Proben (n= 9) nachweisbar. In 23,3 % der Proben (n= 17) konnten mehr als 45 % pathomorphologisch veränderte Spermatozoen ausgezählt werden. Zum 1. Untersuchungstermin wurde von 66,7 % der Ejakulate (n= 38), von 66,6 % (n= 40) zum 2. sowie von 73,3 % (n= 11) zum 3. Untersuchungstermin die Anforderung, bis maximal 35 % pathomorphologisch veränderte Spermien zu enthalten, erfüllt (Tabelle 17). Die ermittelten saisonalen Unterschiede (Diagramm 7) waren statistisch signifikant (Friedman-Test, $p < 0,05$). Von Hengsten, deren Samenproben sowohl im April/Mai als auch im Juli/August untersucht wurden, hatten 17 (38,6 %) zum 2. Termin einen höheren Anteil und 27 (61,4 %) einen geringeren Anteil an Pathomorphologie. Im Vergleich zum Juli/August war die prozentuale Gesamtsumme aller pathomorphologisch modifizierten Spermatozoen im November/Dezember bei 9 Versuchstieren (64,3 %) höher, bei 5 (35,7 %) dagegen geringer.

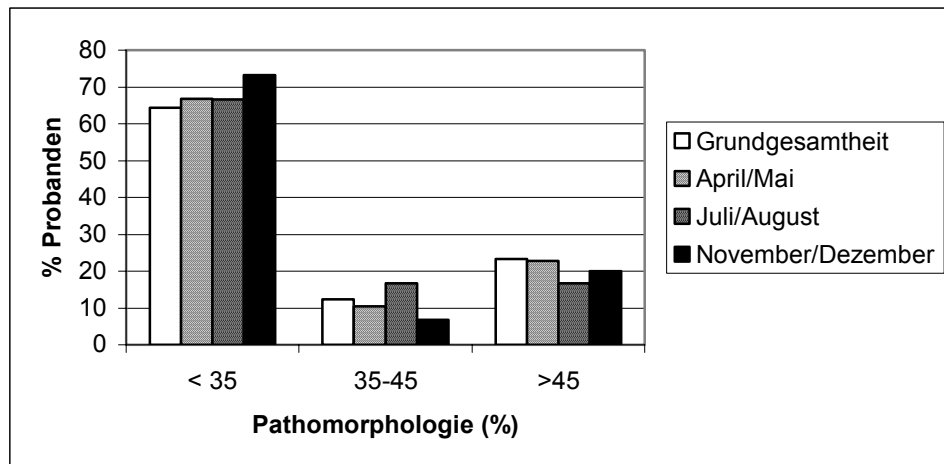


Diagramm 7: Verteilung der Proben bezüglich des prozentualen Anteils an pathomorphologisch veränderten Spermatozoen nach Einteilung in die Gruppen < 35 %, 35-45 % sowie > 45 % von der Norm abweichende Spermien, Darstellung in Abhängigkeit der Grundgesamtheit beziehungsweise der Untersuchungstermine

Tabelle 17: Darstellung von geometrischem Mittelwert, Median, Minimum und Maximum des prozentualen Anteils an pathomorphologisch veränderten Spermien in Prozent (%)

Kriterium	n	$\bar{x}_g$ (SF)	Median	Minimum	Maximum
Grundgesamtheit	73	30,0 (1,7)	30,5	9,5	83
1: April-Mai	57	29,7 (1,7)	29,0	9,5	83
2: Juli/August	60	27,2 (1,6)	27,3	6,5	67
3: November/Dezember	15	28,4 (1,4)	30,5	7,5	68

4.5.4 Vergleichende Darstellung dreimal untersuchter Probanden

Die in den vergangenen Abschnitten gegebene Darstellung der spermatologischen Parameter aller Hengste gestattet keine direkte Aussage darüber, ob diesbezüglich saisonale Abhängigkeiten bestehen. Dies liegt daran, dass es versuchstechnisch nicht möglich war, alle Tiere der Grundgesamtheit über alle 3 Termine hin zu deseminieren.

Dies gelang zwar nur bei 11 Probanden, aber die ermittelten Ergebnisse sollen dennoch einer besonderen Betrachtung unterzogen werden (*Tabelle 18*).

Bei der Betrachtung der Libido zeigt sich, dass diese Probanden im April/Mai eine besonders gute Libido im Vergleich zu den beiden anderen Terminen aufwiesen. Allerdings fiel auch auf, dass die Hengste H 22 sowie H 48 unabhängig von der Jahreszeit eine sehr gute Libido besaßen. Demnach gibt es also Hengste, die saisonunabhängig libidostark sind. Statistisch ließ sich trotz der tendenziellen Beobachtung kein saisonaler Unterschied ($p > 0,05$) verifizieren.

Wird das Ejakulatvolumen der 11 Probanden zu den drei Untersuchungsterminen verglichen, so konnte dieses im April/Mai als besonders hoch eingestuft werden. Obwohl auch dies in der Tendenz erkennbar war, ließ sich das statistisch nicht sichern ($p > 0,05$). Es fiel hierbei ein Hengst (H 38) auf, dessen Spermaproben immer ungefähr auf gleichem Volumenniveau lagen.

Bezüglich Gesamtmotilität sowie Vorwärtsbeweglichkeit konnte eine Verschlechterung im Juli/August beobachtet werden. Dieser saisonale Zusammenhang ließ sich mittels Friedman-Test allerdings nur für die Vorwärtsbeweglichkeit ($p = 0,035$) nachweisen.

Wurde der prozentuale Anteil lebender Spermatozoen in den Samenproben bei diesen Hengsten terminabhängig verglichen, so ließ sich feststellen, dass zum 1. Termin der Anteil lebender Spermien maximal war, zum zweiten deutlich abfiel, um dann zum dritten erneut anzusteigen. Dieser Zusammenhang wurde mittels Friedman-Test ($p = 0,045$) erwiesen.

Bei der Evaluierung der dreimal untersuchten Probanden des Kollektivs konnte bezüglich der Pathomorphologie ebenfalls eine charakteristische Abhängigkeit von der Jahreszeit ermittelt werden ($p = 0,035$). Im April/Mai war der prozentuale Anteil an pathomorphologisch veränderten Spermien maximal, das Minimum wurde im Juli/August erreicht, danach kam es wieder zu einem Anstieg veränderter Spermatozoen.

Tabelle 18: Ergebnisse einzelner untersuchter Parameter bei dreimal untersuchten Probanden unter Berücksichtigung saisonaler Abhängigkeiten (Median [$\bar{X}_g$ (SF)])

	April/Mai	Juli/August	November/ Dezember
Vorwärtsbeweglichkeit (%)	50 [49,9 (1,3)]	40 [28,2 (2,1)]	50 [48,4 (1,4)]
Anteil lebender Spermien (%)	81,5 [79,2 (1,1)]	61 [50,8 (1,9)]	78 [70,1 (1,3)]
Anteil pathomorphologisch veränderter Spermien (%)	43,5 [36,3 (1,7)]	25,5 [27 (1,5)]	31 [33,5 (1,4)]

4.6 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Auswertung der Ejakulte erfolgte grundsätzlich in Form einer Blindstudie ohne Kenntnis über die Konzeptionsraten. Erst zur Auswertung bezüglich der klinischen Relevanz der Daten für die Fertilitätsdiagnostik bei Hengsten wurden die Probanden nachträglich den verschiedenen Fruchtbarkeitsgruppen zugeordnet: 1. sehr gute bis gute Fertilität (Konzeptionsraten 70-100 %, Klasse 1), 2. Subfertilität (Konzeptionsraten 10 - 70 %, Klasse 2), 3. Infertilität (Konzeptionsraten < 10 %, Klasse 3). Dies erfolgte, um Häufigkeiten des Auftretens verschiedener Phänomene zur Fruchtbarkeitsgruppe in Beziehung setzen zu können.

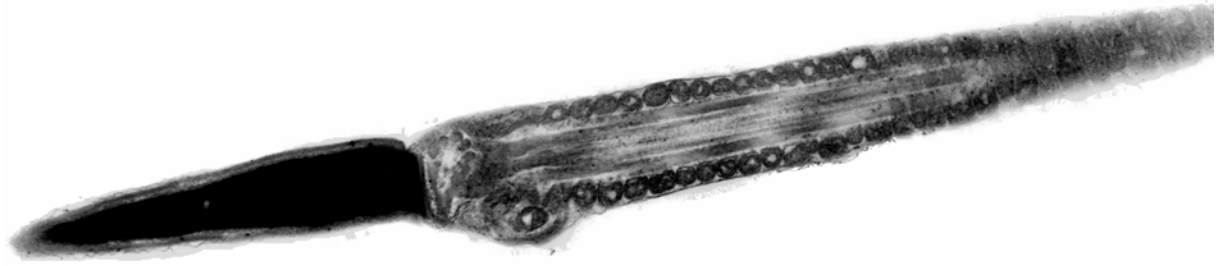


Abb. 3: Physiologisches Spermium mit unverändertem Akrosom im Längsschnitt (Primärvergrößerung: x 5108)

4.6.1 Beobachtungen am Akrosom

Die Beurteilung des Akrosoms erfolgte gemeinsam mit der umhüllenden Plasmamembran. Es waren sowohl Akrosomen nachweisbar, die vollständig intakt waren und gemeinsam mit der Plasmalemma dem Nukleus anlagen, als auch solche die eine Vielzahl verschiedener Abweichungen von dieser Idealnorm aufwiesen. So war die umhüllende Plasmamembran im Mittel bei 52,4 % (1,6) [$\bar{x}_g$ (SF)] der untersuchten Akrosomen nicht glatt anliegend sondern gewellt. In 19,9 % (1,8) [$\bar{x}_g$ (SF)] aller Akrosomen stellte sich die Membran gefranst dar. Des Weiteren waren Köpfe zu sehen, bei denen sowohl Akrosom als auch Plasmamembran abgehoben und gewellt waren [5,9 % (2,9), $\bar{x}_g$ (SF); siehe Abb. 4, 6]. Außerdem waren im Mittel bei 2,3 % (2,2) [$\bar{x}_g$ (SF)], im Maximalfall bei 21,9 % der Spermien die Membran und das Akrosom teilweise oder deutlich seltener vollständig abgelöst (Abb. 5, 6, 7, 8). Der häufigste Nachweis vollständig abgelöster Akrosomen lag bei 2,4 %, betraf aber nur einen Probanden mit einer Fertilität von 66,6 %. In Einzelfällen stellte sich die Membran aufgerollt dar (Abb. 9, 10). Es fiel auf, dass ein sehr großer Anteil (92,0 % (1,1) [$\bar{x}_g$ (SF)]) an Akrosomen und den zugehörigen Plasmamembranen nicht den Erwartungen

entsprach und stattdessen in irgendeiner Form Veränderungen oder Abweichungen aufwies.

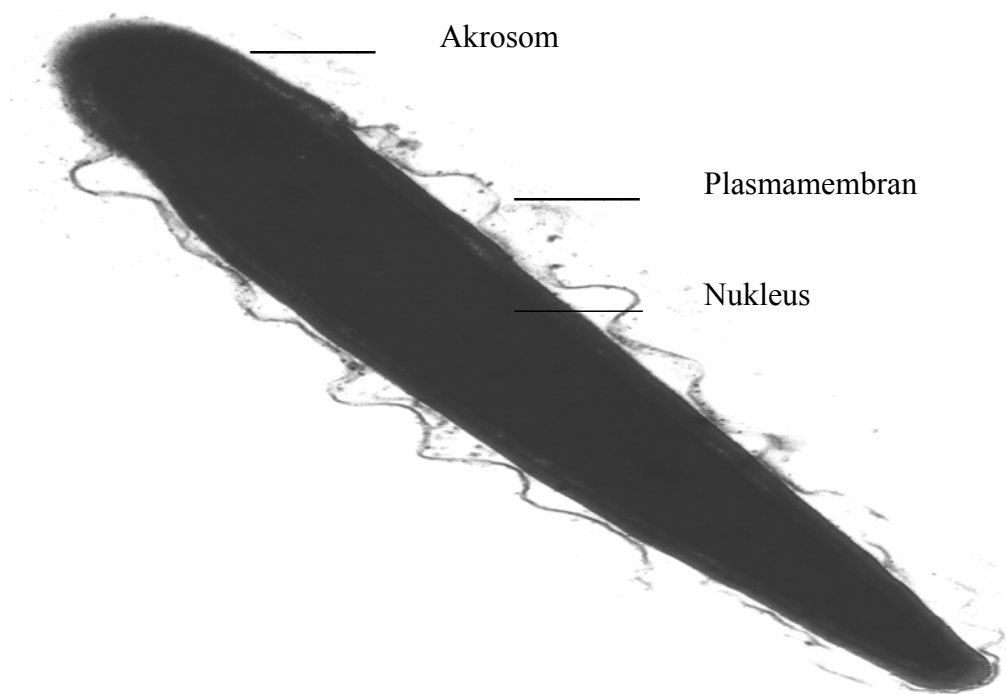


Abb. 4: Spermienkopf mit gewellter Plasmamembran, Akrosom unverändert (Primärvergrößerung: x 20840)



Abb. 5: Spermienkopf mit teilweise abgehobenem Akrosom sowie gewellter und teilweise abgehobener Plasmamembran (Primärvergrößerung: x 20840)

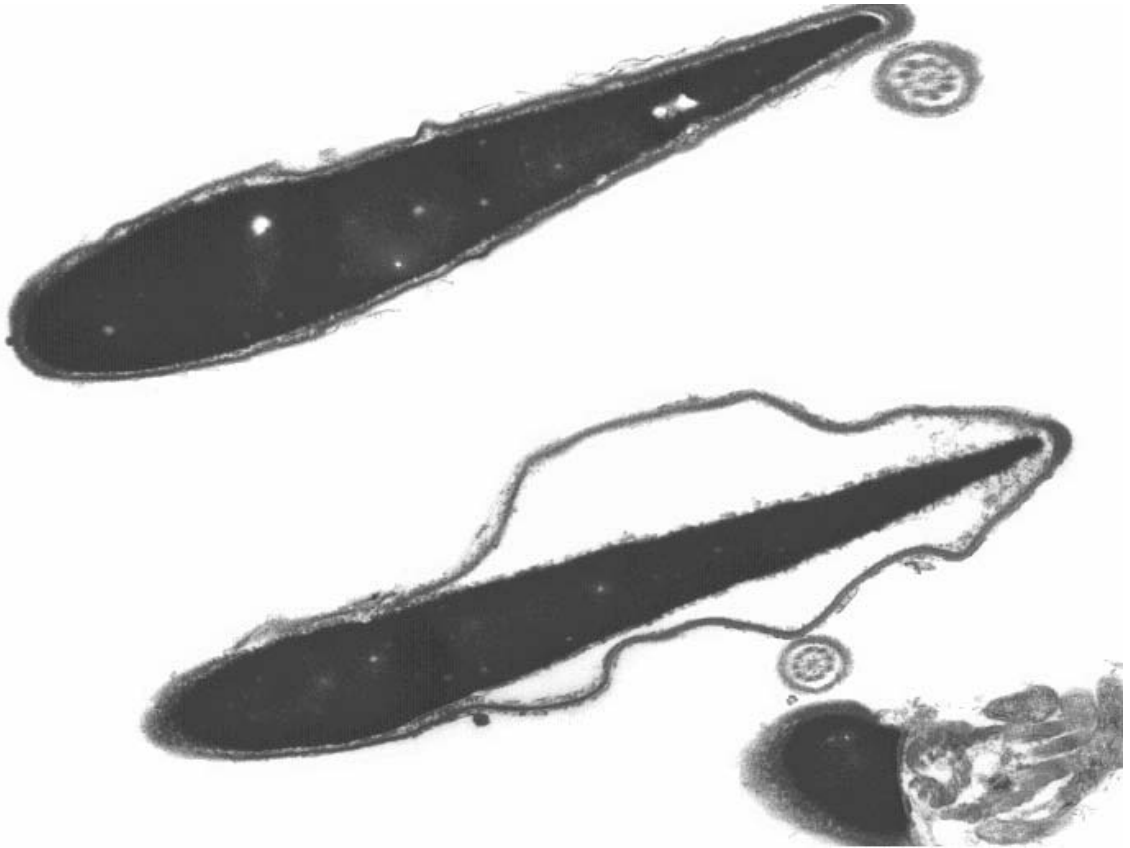


Abb. 6: Zwei Köpfe mit verschiedenen Akrosomenveränderungen sowie Beschädigungen der Plasmamembran: oben Akrosom gewellt, nicht vollständig anliegend, unten Akrosom großflächig abgehoben (Primärvergrößerung: x 12770)

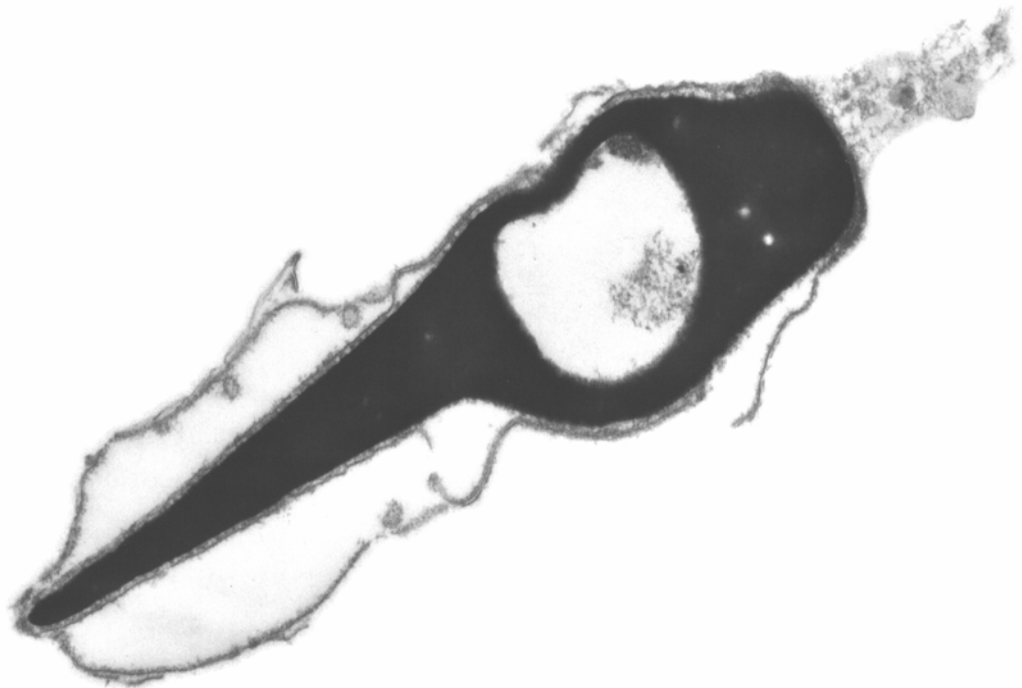


Abb. 7: Spermienkopf mit Vakuole und abgehobener Plasmamembran sowie teilweise abgehobenem Akrosom (Primärvergrößerung: x 12770)

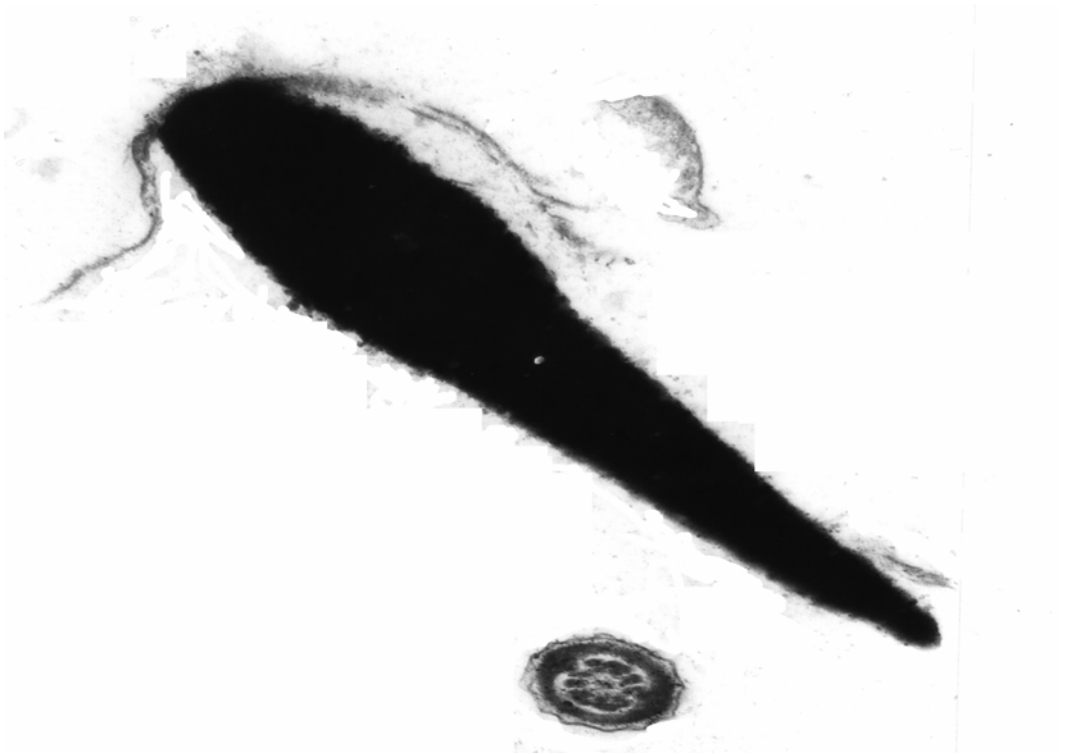


Abb. 8: Plasmamembran und Akrosom fast vollständig abgelöst (Primärvergrößerung: x 20840)

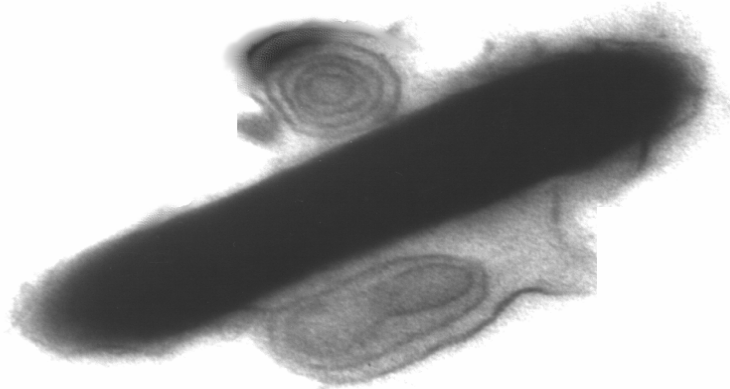


Abb. 9: Plasmamembran des Kopfes aufgerollt (Primärvergrößerung: x 20840)

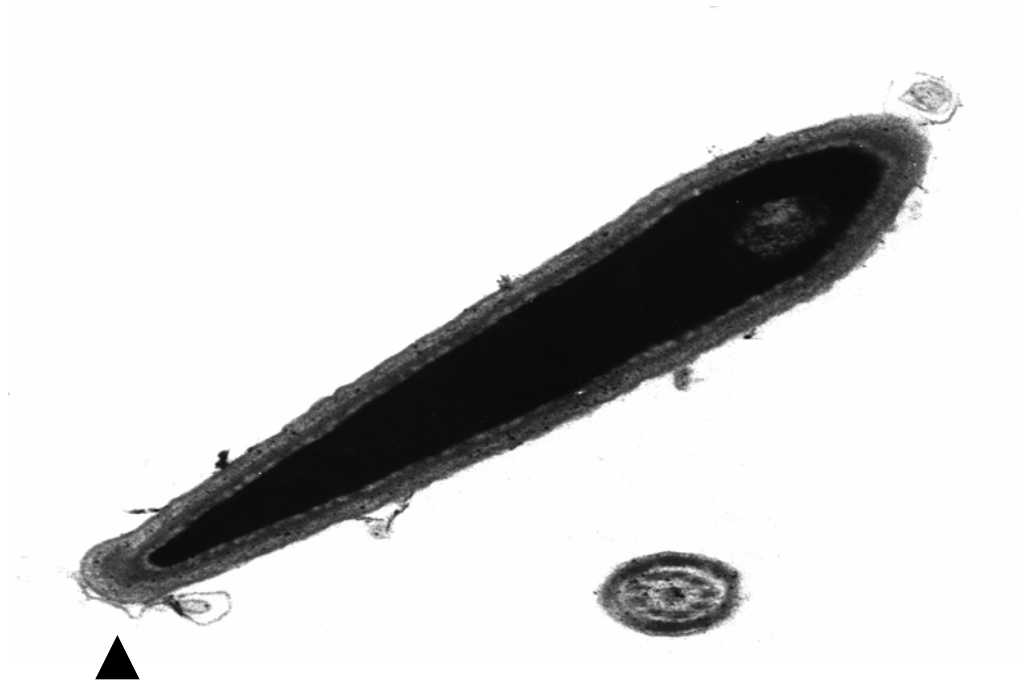


Abb. 10: Spermienkopf mit aufgequollenem Akrosom (▲) und teilweise aufgerollter Plasmamembran (Primärvergrößerung: x 23180)

Weiter fielen mit amorphem Material gefüllte Höhlen im Akrosom auf. Diese Strukturen sind von mehreren Membranen und der Plasmamembran umhüllt und ähneln Cytoplasmatropfen sehr stark (Abb. 11). Teilweise waren im Randbereich des Chromatins diffuse Einschlüsse mit direktem Übergang zum Akrosom zu erkennen, die wohl als Fältelung der akrosomalen Membran in den Nukleus gewertet werden können (Abb. 12).

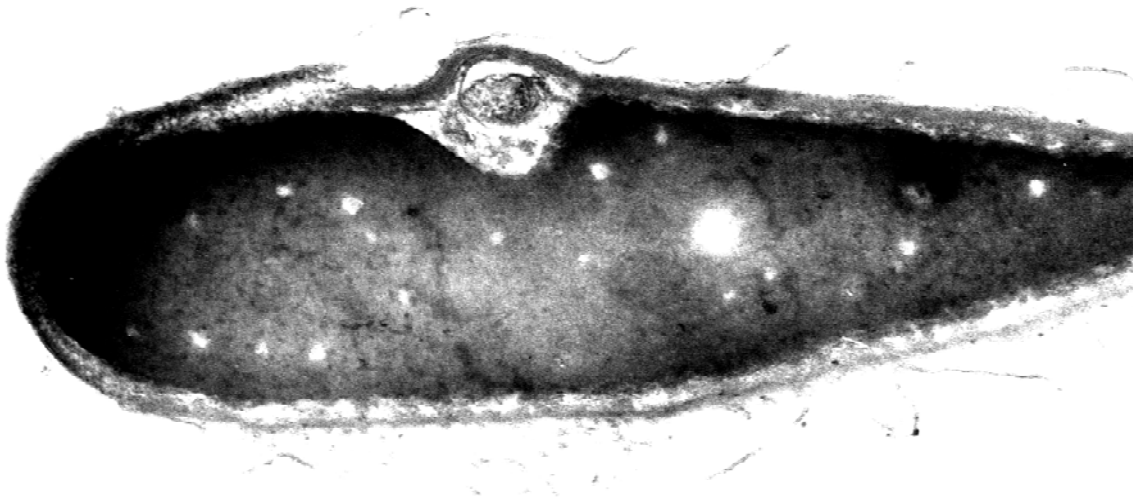


Abb. 11: Membranhüllter amorpher Einschluss zwischen Nukleus und Akrosom
(Primärvergrößerung: x 36040)

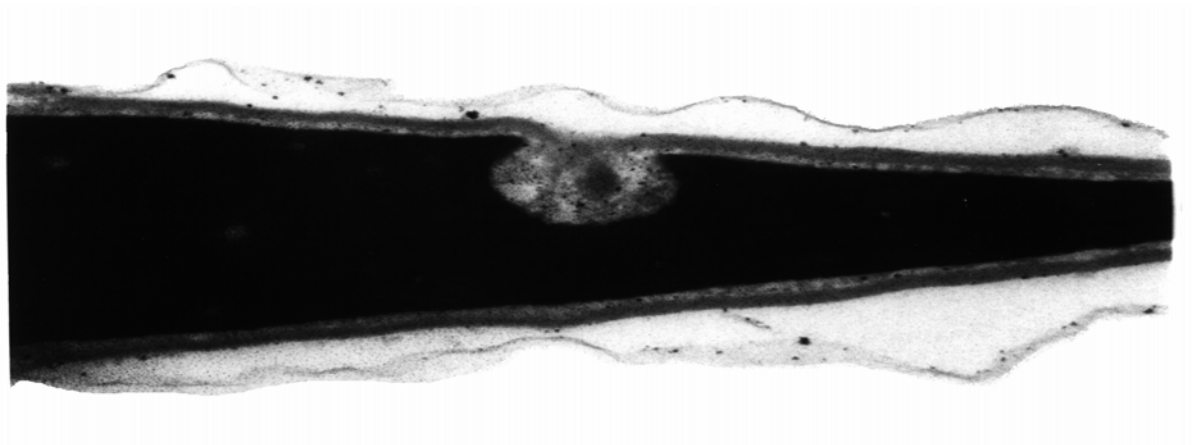


Abb. 12: Amorpher, vom Akrosom ausgehender Einschluss im Chromatin des Nukleus
(Primärvergrößerung: x 34000)

In Einzelfällen war kein intaktes Akrosom am Kopf zu sehen, sondern eine Vielzahl kleiner Granula, die den Kopf umhüllten. Hierbei handelte es sich um spontan akrosomenreagierte Spermien (Abb. 13). Bei den Hengsten, bei denen gehäuft Akrosomenreaktionen nachweisbar waren, lagen im Seminalplasma stets hohe

Konzentrationen an ionisiertem Kalzium sowie hohe Gesamtkalziumkonzentrationen vor.

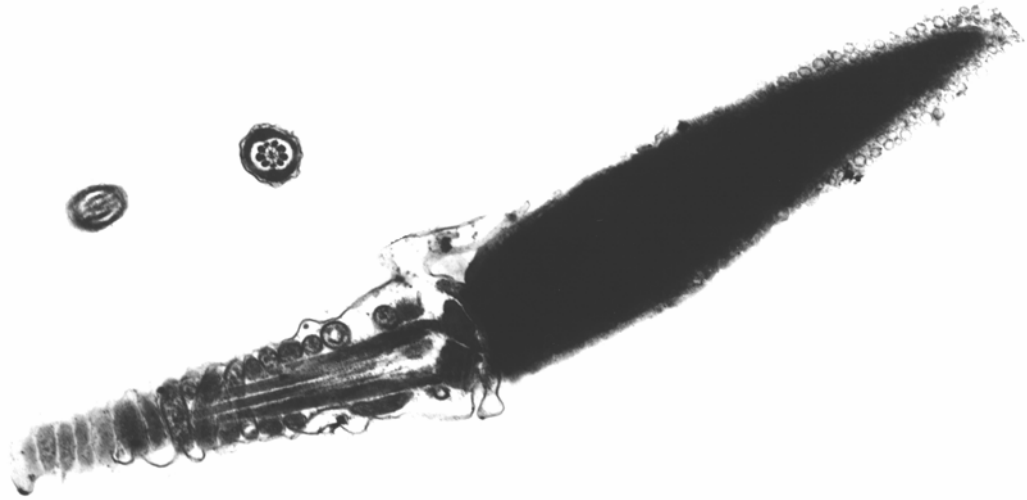


Abb. 13: Spontane Akrosomenreaktion (Primärvergrößerung: x 6900)

Bei einer fertilitätsbezogenen Betrachtung des Auftretens der einzelnen Akrosomenveränderungen ließ sich konstatieren, dass abgehobene Akrosomen im Mittel bei 4,9 % (3,2) bei fertilen Probanden (Fertilität > 70 %, Klasse 1), bei 7,9 % (1,9) bei subfertilen (Fertilität 10 - 70 %, Klasse 2) sowie bei 11,4 % (4,2) [$\bar{x}_g$ (SF)] der untersuchten Kopfkappen bei infertilen Probanden (Fertilität < 10 %, Klasse 3), nachzuweisen waren ($p = 0,034$).

4.6.2 Kopfveränderungen

Bei der Beurteilung der Spermatozoenköpfe ließ sich zwischen Veränderungen am Kopf selbst und zusätzlichen Strukturen zu einem oder mehreren Köpfen in einer Membran eine Unterscheidung treffen. Einzelne Köpfe zeigten Abweichungen von der normalen, elektronendichten Struktur sowie der elliptischen Form (Abb. 14).

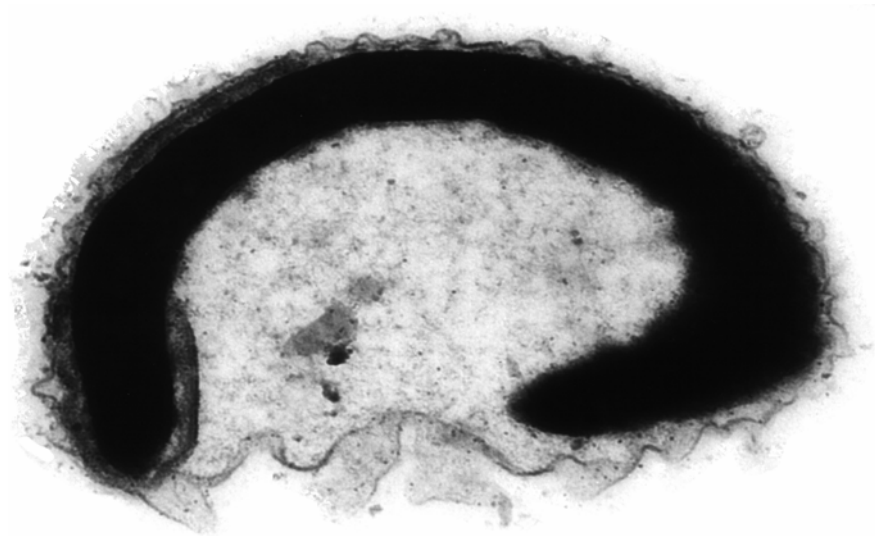


Abb. 14: Deformierter Kopf mit abgelöster Membran (Primärvergrößerung: x 20840)

Veränderungen am Kopf traten in Form von Kernvakuolen im Durchschnitt bei 23,3 % (1,8) [$\bar{x}_g$ (SF)] der untersuchten Spermienköpfe (Abb. 7, 15, 16) sowie als Kondensationsstörungen des Chromatins im Mittel bei 17,1 % (2,1) [$\bar{x}_g$ (SF)] (Abb. 15, 16) auf. Aber es konnten auch Doppelköpfe differenziert werden (Abb. 17), wobei dies maximal bei 14,3 % der untersuchten Köpfe eines Probanden auftrat. Sehr selten waren Mehrfachköpfe (3 Köpfe oder mehr in einer umhüllenden Membran) darzustellen.



Abb. 15: Kopf mit Kondensationsstörung, abgelöstem Akrosom sowie zwei Geißelanschnitten (Primärvergrößerung: x 13600)

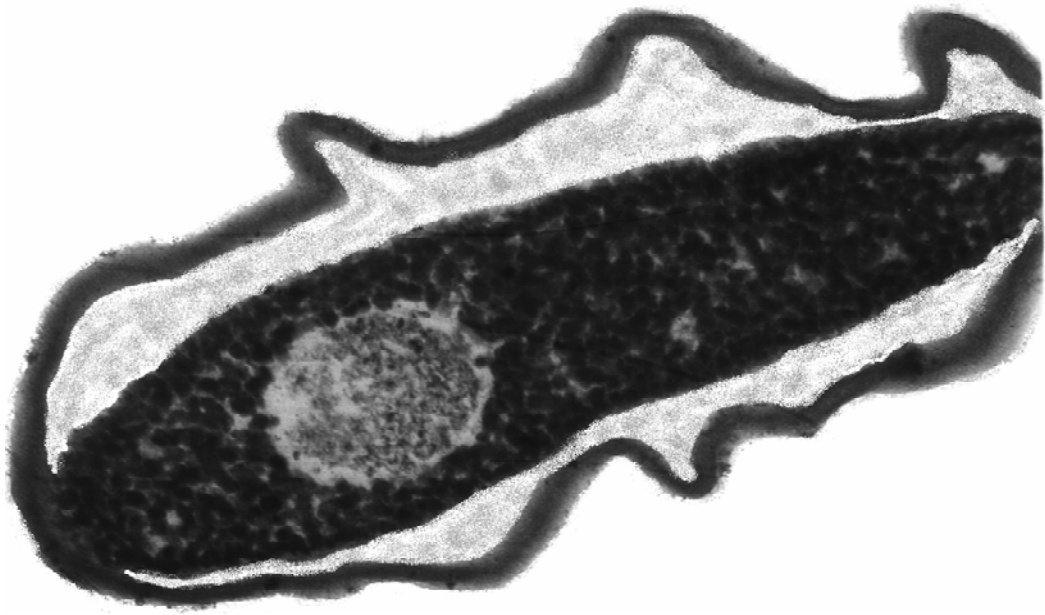


Abb. 16: Nukleus mit Kondensationsstörung, abgelöstem Akrosom und amorpher Masse in Kernvakuole (Primärvergrößerung: x 20840)

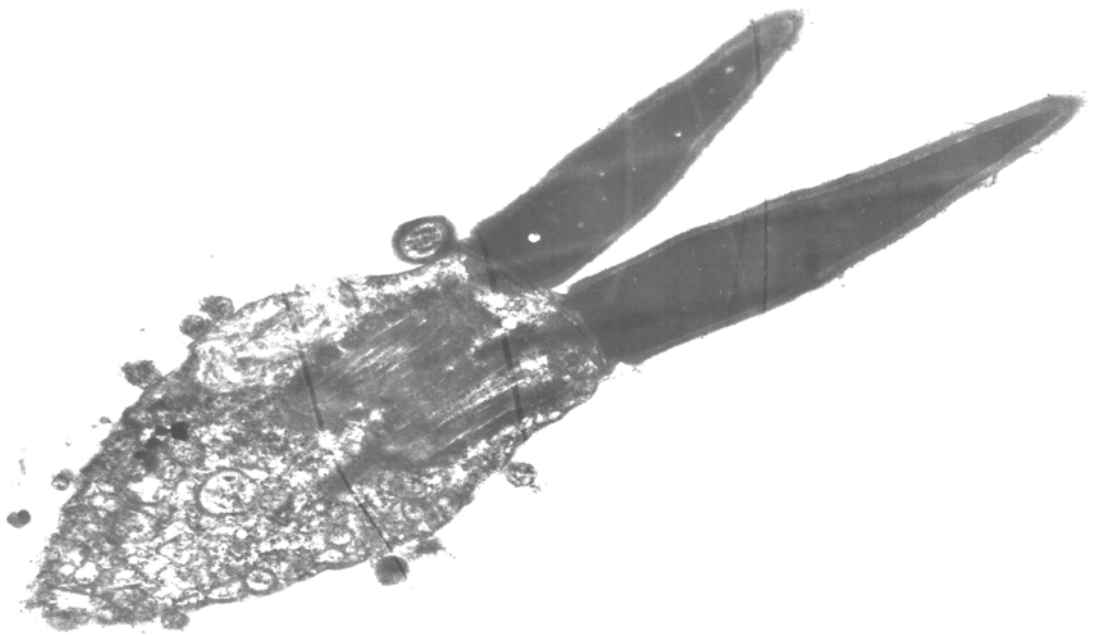


Abb. 17: Doppelkopf mit Doppelgeißel; Geißeln von einer gemeinsamen Membran umhüllt, Köpfe einzeln liegend (Primärvergrößerung: x 9272)

Weitere Veränderungen, welche in den meisten Fällen nicht die Struktur des Kopfes direkt betrafen, waren zum Beispiel ein Kopf mit einem oder mehreren

Geißelanschnitten in einer Membran (Abb. 18, 13,8 % (2,2) [$\bar{x}_g$ (SF)]). Die eingeschlossenen Geißelanschnitte umfassten alle Ebenen, waren längs oder quer geschnitten und wiesen dieselben Veränderungen auf wie normale, einzelne Geißelanschnitte (siehe 4.6.3). Des Weiteren konnten auch Mittelstücke mit einem Kopf gemeinsam von einer Membran umgeben sein und ebenfalls weitere Veränderungen besitzen (siehe 4.6.3).



Abb. 18: Kopf mit 6 Geißelanschnitten in verschiedenen Ebenen (Primärvergrößerung: x 13600)

Außerdem gab es vereinzelt Mikrotubulimassen am Kopf (Abb. 19). Diese mikrotubulären Massen zeichneten sich durch eine Vielzahl von Mikrotubuli aus, die ungeordnet in einer Membran lagen und stark verdrillt waren.

Selten wurden auch Cytoplasmastrukturen am Kopf beobachtet. Diese Strukturen waren ebenfalls von einer Membran umhüllt. Das Cytoplasma war durch seine hohe Elektronendichte sowie teilweise vorhandene Golgi-ähnliche Strukturen zu identifizieren.



Abb. 19: Mikrotubuli am Kopf (→) (Primärvergrößerung: x 9272)

4.6.3 Beobachtungen an der Geißel – Querschnitt

4.6.3.1 Proximaler Bereich (a bis c)

Die physiologische Struktur eines Geißelquerschnittes im proximalen Bereich (Mittelstück) ist gekennzeichnet durch endoplasmatisches Reticulum und einen Geißelanschnitt mit $9 \times 2 + 2$ Tubulmuster, Mantelfasern und Mitochondrien (vergleiche Abb. 2, Abb. 20).

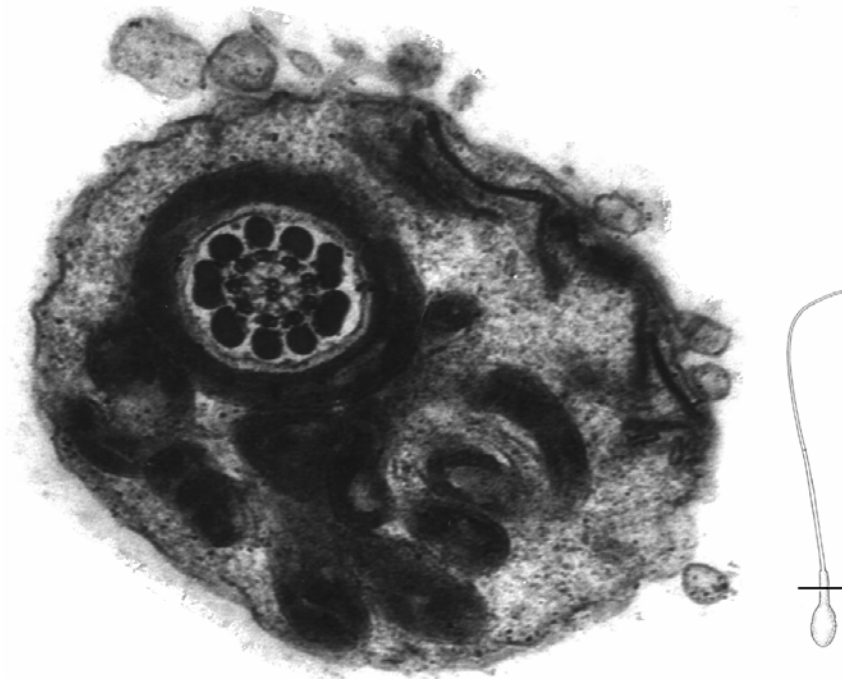


Abb. 20: Physiologischer Geißelquerschnitt im proximalen Bereich (Primärvergrößerung: x 20840)

Bei 6 Tieren stellte sich die Plasmamembran einzelner Geißelquerschnitte gewellt, abgehoben, teilweise oder auch vollständig abgelöst dar. Bei dem Probanden, bei dem dies besonders häufig vorkam, waren 3,8 % aller untersuchten proximalen Schwanzbereiche auf diese Art modifiziert. Weiterhin war die Mitochondrienscheide, welche den axonemalen Komplex und die 9 Mantelfasern umgab, nicht immer intakt ($n = 27$); es fehlten im Mittel bei 2,3 % (2,2) [$\bar{x}_g$ (SF)] aller untersuchten proximalen Geißelquerschnitte einzelne Mitochondrien. Zusätzlich waren Strukturen existent, die das Aussehen eines Mittelstücks besaßen, denen aber der Geißelanschnitt mit Tubulmuster fehlte (Abb. 21).

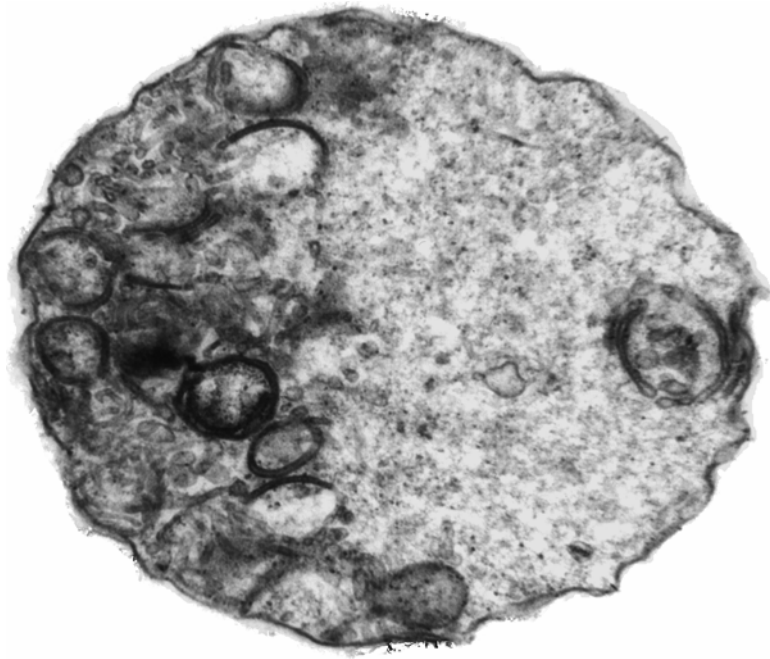


Abb. 21: Querschnitt im Bereich des Mittelstückes mit Endoplasmatischem Retikulum, es fehlen Geißelanschnitt mit Tubuli, Mantelfasern und Mitochondrien (Primärvergrößerung: x 20840)

Bei 8,0 % (2,2) [$\bar{x}_g$ (SF)] waren Geißelanschnitte des proximalen Bereiches mit einem oder mehreren weiteren Schwanzquerschnitten, meist aus dem distalen Bereich kombiniert. Bei 16 Hengsten traten bei maximal 3 % der untersuchten Schwanzanschnitte Geißellängsschnitte gemeinsam in einer Membran mit proximalen Querschnitten auf; die übrigen Ejakulate der Probanden wiesen diese Veränderungen nicht auf. Bei allen beschriebenen Beobachtungen konnten auch Abweichungen vom normalen Tubulmuster nachgewiesen werden: Anomalien des Tubulmusters traten bei Einzelanschnitten bei 1,3 % (1,8) [$\bar{x}_g$ (SF)], bei Kombinationen proximaler Geißelquerschnitt mit zusätzlichem distalem Querschnitt bei 1,9 % (2,2) [$\bar{x}_g$ (SF)] der untersuchten proximalen Spermischwänze auf.

Außerdem waren bei 18 Probanden vereinzelt Cytoplasmatropfen und bei 10 Probanden selten Mikrotubulmassen am Hals zu sehen. Cytoplasmatropfen kennzeichneten sich

dadurch, dass sie elektronendurchlässig, also mit hellem, durchsichtigem Material gefüllt und von der Plasmamembran umgeben waren.

4.6.3.2 Bereiche d bis i/k

Der physiologische Aufbau der Geißel ist abhängig von der Höhe des Querschnittes: Proximal ist das Axonema von 9 Mantelfasern sowie Mitochondrien umgeben, im Bereich des Hauptstückes werden Axonema und Mantelfasern von Ringfasern umschlossen und im Bereich des Endstücks liegt nur noch die Plasmamembran um das Axonema (vergleiche Abb. 2, Abb. 22). 93,3 % (1,1) [$\bar{x}_g$ (SF)] aller untersuchten distalen Schwanzquerschnitte waren im Mittel als der Norm entsprechend zu bewerten.

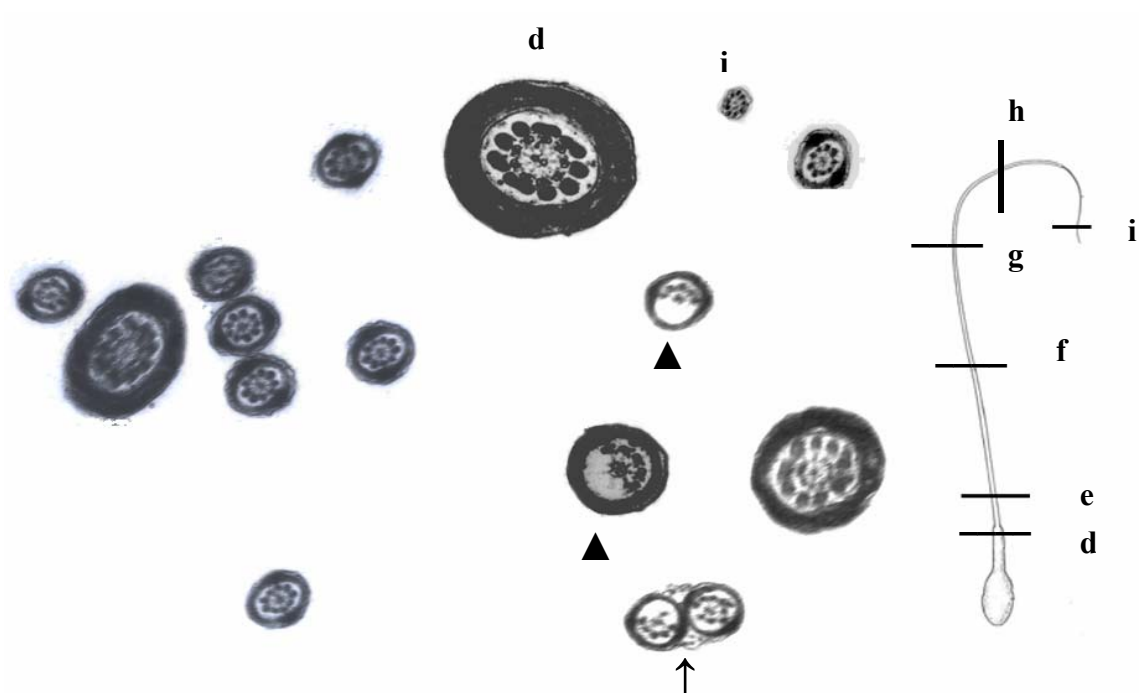


Abb. 22: Diverse Geißelanschnitte in allen Ebenen (d-i) mit $9 \times 2 + 2$ Tubuli, $5 \times 2 + 2$ Tubuli (▲) sowie Doppelgeißel mit $9 \times 2 + 2$ und $6 \times 2 + 2$ (↑) (Primärvergrößerung: $\times 20840$)

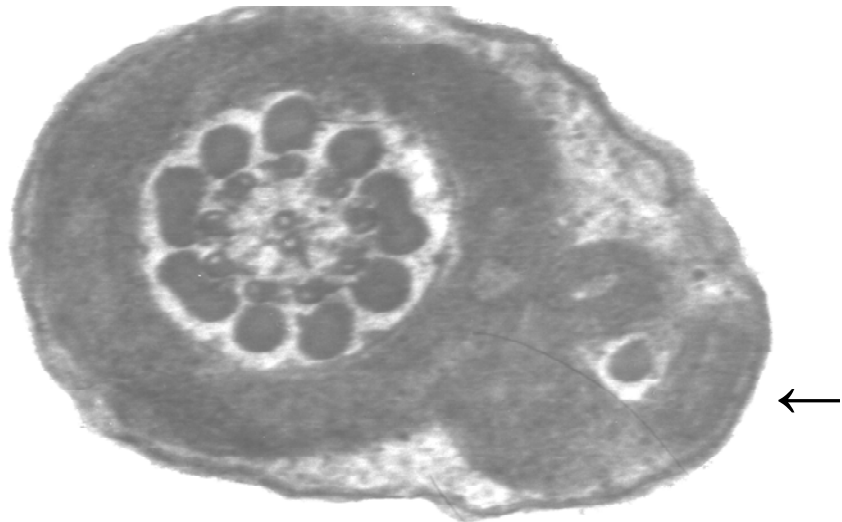


Abb. 23: Geißelquerschnitt mit zusätzlicher Struktur ($\leftarrow$) in der Membran (Primärvergrößerung: x 58920)

Im Bereich von Haupt- und Endstück der Geißel traten wiederum gewellte, abgehobene sowie abgelöste Plasmamembranen ebenso wie Schäden in der Mitochondrienscheide auf (bei 1,0 % (2,5) $[\bar{x}_g \text{ (SF)}]$ der examinieren distalen Querschnitte). Ebenso gab es Abweichungen vom charakteristischen 9 x 2 + 2 Tubulmuster, wobei entweder ein oder mehrere periphere Tubuli (Abb. 22) und/oder das zentrale Geißelpaar fehlten. Diese Anomalie konnte bei 2,7 % (2,5) $[\bar{x}_g \text{ (SF)}]$, im Präparat eines Probanden sogar bei 18 %, der Spermiengeißeln nachgewiesen werden. Typisch und auch aus der Lichtmikroskopie bekannt sind Doppelgeißeln, die in 1,1 % (1,8) $[\bar{x}_g \text{ (SF)}]$ aller Geißelquerschnitte vorhanden waren. Dabei lagen zwei Geißelanschnitte in einer gemeinsamen Plasmamembran (Abb. 24), wobei die Plasmamembran defekt sein konnte. Die Schnittebenen beider Geißeln waren hierbei gleich, weil beide am Kopf nebeneinander ansetzten und parallel verliefen. Allerdings traten auch Doppelgeißeln auf, bei denen unterschiedliche Schnittebenen nebeneinander in einer Membran lagen (Abb. 33). Neben Doppelgeißeln kamen auch Dreifachgeißeln und mehr vor (Abb. 25). Bei den „Mehrfachgeißeln“, die mit einer mittleren Häufigkeit von 1,2 % (1,9) $[\bar{x}_g \text{ (SF)}]$

auftraten, konnten ebenfalls Abweichungen vom charakteristischen Tubulmuster oder eine defekte Membran beobachtet werden (Abb. 22, 24). Cytoplasmatropfen sowie sehr selten Mikrotubulimassen wurden ebenso beobachtet.



Abb. 24: Doppelgeißel mit normalem $9 \times 2 + 2$ Tubulmuster (Primärvergrößerung: x 20840)

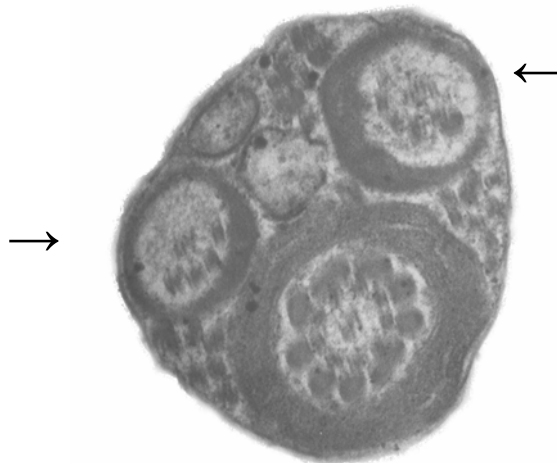


Abb. 25: Dreifachgeißel mit zwei Geißelquerschnitten ($\uparrow$), die ein abnormes Tubulmuster aufweisen (Primärvergrößerung: x 20840)

4.6.4 Beobachtungen an der Geißel – Längsschnitt

Bei der Betrachtung des Schwanzes im Längsschnitt war darauf zu achten, dass es sich um ein möglichst langes Geißelstück handelt und der Ansatz des Halses am Kopf ebenfalls zu beurteilen war.

Der Hals am Pferdespermium setzt häufig physiologischerweise nicht mittig, sondern abaxial an, wie Abb. 27 zeigt. Dies war bei vielen Spermien ersichtlich, wenn der Anschnitt exakt median war. Im Halsbereich war das proximale Zentriol zu identifizieren. In der Mitte des Geißellängsschnittes waren das zentrale Tubuluspaar sowie zwei der neun peripheren Doppeltubuli, zum Rand hin Mantelfasern und Mitochondrien erkennbar (Abb. 26, 27). Im Mittel waren 85,1 % (1,1) [$\bar{x}_g$ (SF)] aller untersuchten Geißellängsschnitte physiologisch.



Abb. 26: Geißellängsschnitt am Ende der Mitochondrienscheide (↑)
(Primärvergrößerung: x 13600)

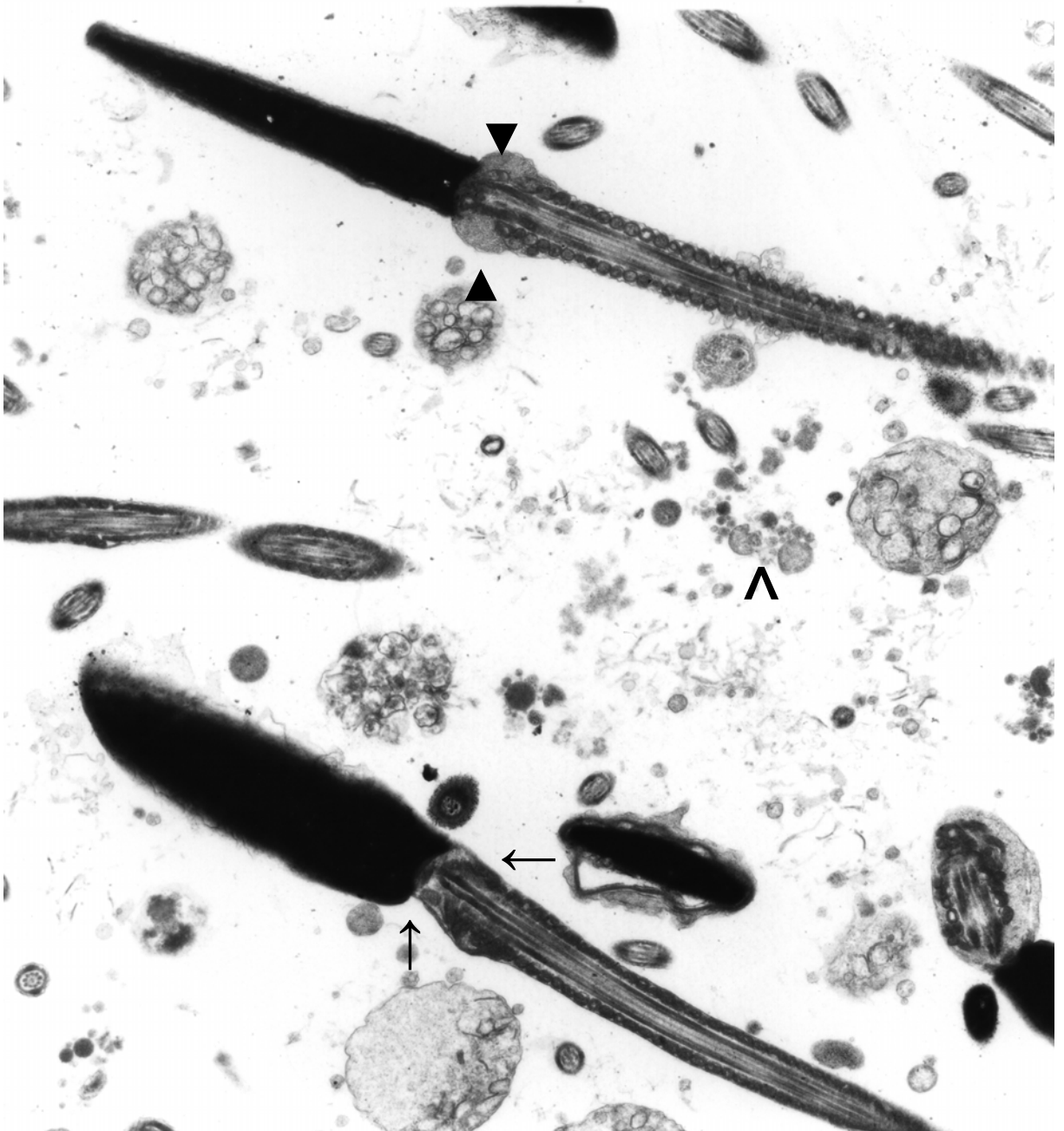


Abb. 27: Zwei Spermien im Längsschnitt mit abaxialem Schwanzansatz, besonders gut ersichtlich am unteren (↑), oberes Spermatozoon mit Mikrotubulimassen am Hals (▼), kleine membranumhüllte Vesikel mit granuliertem Inhalt (△) (Primärvergrößerung: x 5108)

Ebenso wie im Geißelquerschnitt konnten Veränderungen der umhüllenden Plasmamembran sowie der Mitochondrienscheide (Abb. 28) und der Mantelfasern

beobachtet werden. Außerdem fielen auch hier Abweichungen vom normalen Tubuluster, insbesondere das Fehlen des zentralen Tubuluspaares, auf.

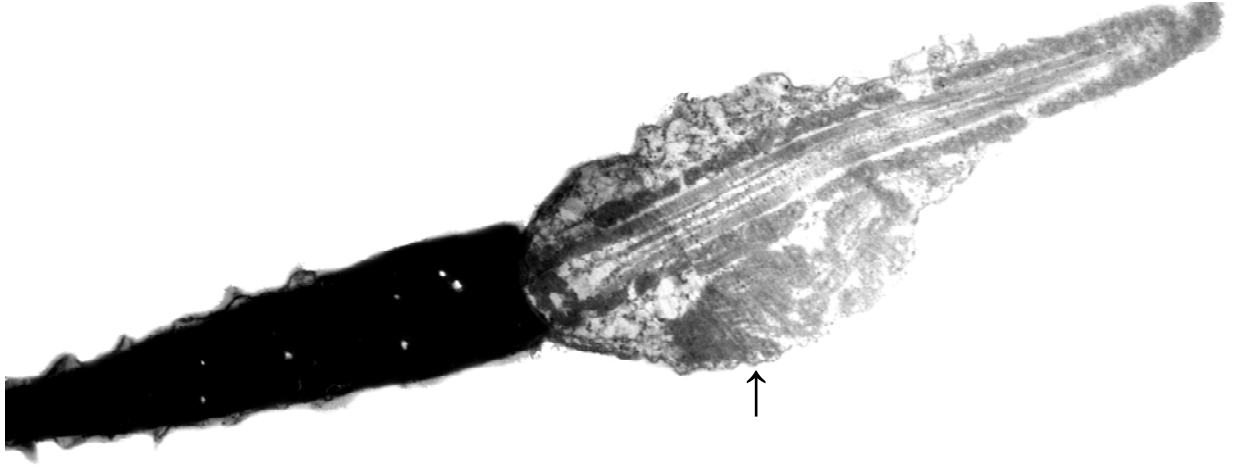


Abb. 28: Spermium mit zusätzlichen disorganisierten Mitochondrien (↑)
(Primärvergrößerung: x 9272)

Konform mit der Beobachtung der Doppel- oder Mehrfachgeißel in der Lichtmikroskopie und bei den Geißelquerschnitten war das gleichzeitige Auftreten mehrerer Spermienschwänze im Längsanschnitt, was im Mittel bei 3,3 % (1,8) [$\bar{x}_g$ (SF)], maximal bei 20 % der Längsgeißeln auftrat. Elektronenmikroskopisch war darstellbar, dass die Doppelgeißeln entweder an einem gemeinsamen Kopf (Abb. 29) oder an zwei Köpfen (Abb. 17) ansetzten. In seltenen Fällen standen die Doppelgeißeln im 45° bis 90° Winkel zueinander oder waren konfus zueinander angeordnet.



Abb. 29: Doppelgeißel an einem Kopf ansetzend (Primärvergrößerung: x 13600)

Geknickte Geißeln (Abb. 30, 31), mit differenter Lokalisation der Knickstellen, konnten bei 5,3 % (1,9) [$\bar{X}_g$ (SF)], in einem Probandenejakulat sogar bei 14,3 % der Geißellängsschnitte beobachtet werden. Gleichzeitig kam es durch die Knickung häufig zusätzlich zu einem Verlust an Mitochondrien (Abb. 31).

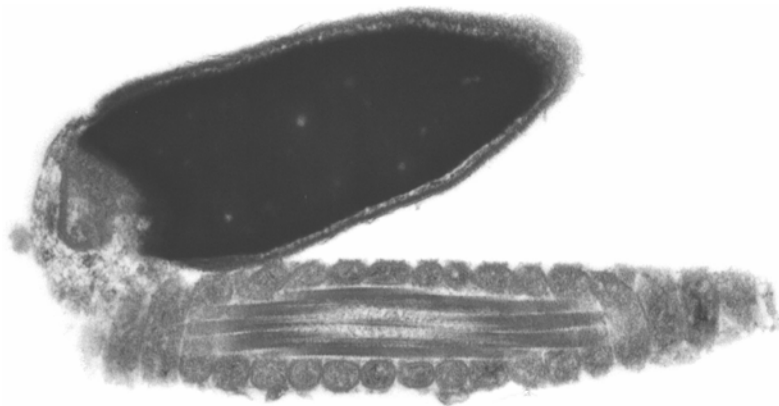


Abb. 30: Geknickte Geißel (Primärvergrößerung: x 12770)

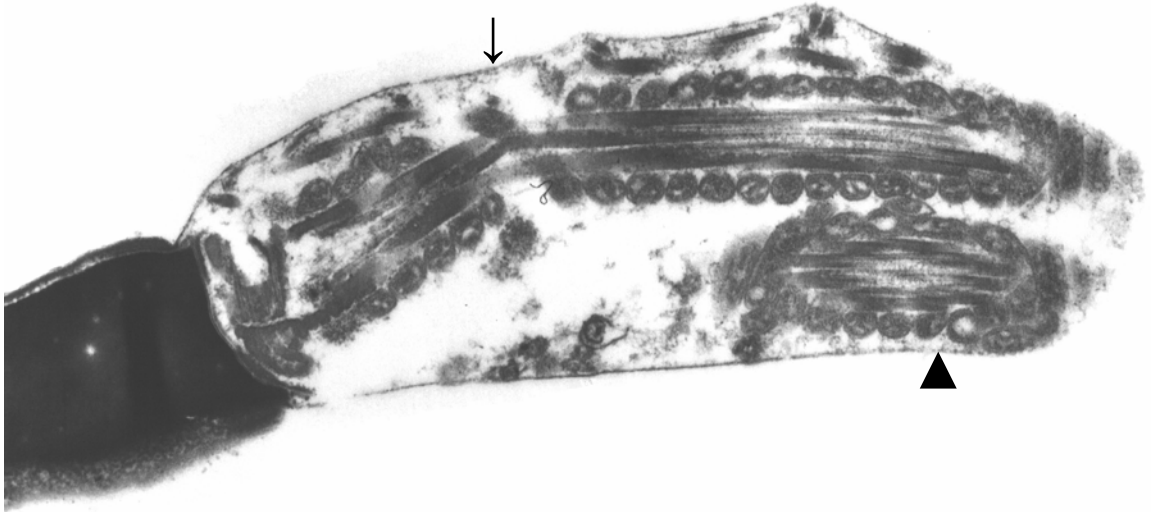


Abb. 31: Geißel mit unterbrochener Mitochondrienscheide und geknickten Tubuliröhren (↓), zusätzlich zum Längsanschnitt ein Schwanzquerschnitt (▲) (Primärvergrößerung: x 12770)

In einem einzigen Fall war eine Geißel deutlich schleifenförmig zusammen gelegt darstellbar (Abb. 32), wie es in der Lichtmikroskopie ein häufiger Befund bei den untersuchten Ejakulaten war.

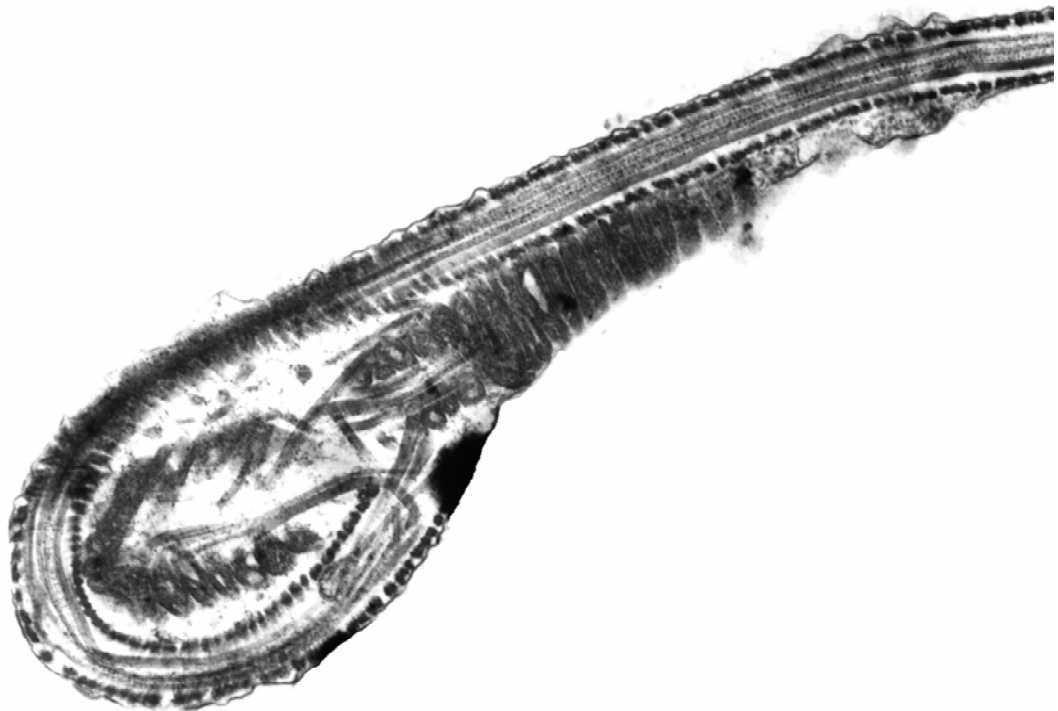


Abb. 32: Geißel schleifenförmig (Primärvergrößerung: x 12770)

Eine weitere typische Veränderung war der Cytoplasmatropfen, der im Längsschnitt besonders gut identifiziert werden konnte. Er ist differentialdiagnostisch von Mikrotubulimassen (MM) abzugrenzen. Die MM konnten anhand der enthaltenden Mikrotubuli deutlich von den Cytoplasmatropfen differenziert werden.

4.6.5 Sonstige Beobachtungen

Bei 12 von 46 Hengsten waren weiterhin zu verschiedenen Anteilen große runde bis ovale Strukturen mit granuliertem Inhalt zu erkennen.

Einerseits handelte es sich hierbei um runde Spermatiden. Diese Strukturen zeichneten sich durch wechselnd starke Kondensation des Kernes, beginnende Akrosombildung (das Akrosomenbläschen) und endoplasmatisches Retikulum aus (Abb. 33).

Andererseits konnten Zellen wie in Abb. 34 identifiziert werden. Sie zeichneten sich durch einen unterschiedlichen Anteil elektronendichter, membranumhüllter Einschlüsse, vereinzelt Geißelquerschnitte sowie weiterhin helle, membranummantelte Einschlüsse aus. Das Cytoplasma war stark strukturiert und granuliert.

Auch fielen runde, membranumhüllte Vesikel in unterschiedlicher Größe auf (siehe Abb. 27 ^Λ). Diese Vesikel waren in differenter Häufigkeit vorhanden und besaßen einen granulierten, elektronendichten Inhalt.

Insbesondere im Ejakulat des Hengstes H 12 waren Strukturen in verschiedenen Größen wie in Abb. 35 A und B sichtbar. Es ist anzunehmen, dass es sich um Harnkristalle handelte, da im Deseminat des Hengstes H 12 nahezu keine Spermien, sondern fast ausschließlich die dargestellten runden Strukturen enthalten waren und die Probe makroskopisch und lichtmikroskopisch ebenfalls durch hochgradige Harnbeimengung auffiel.

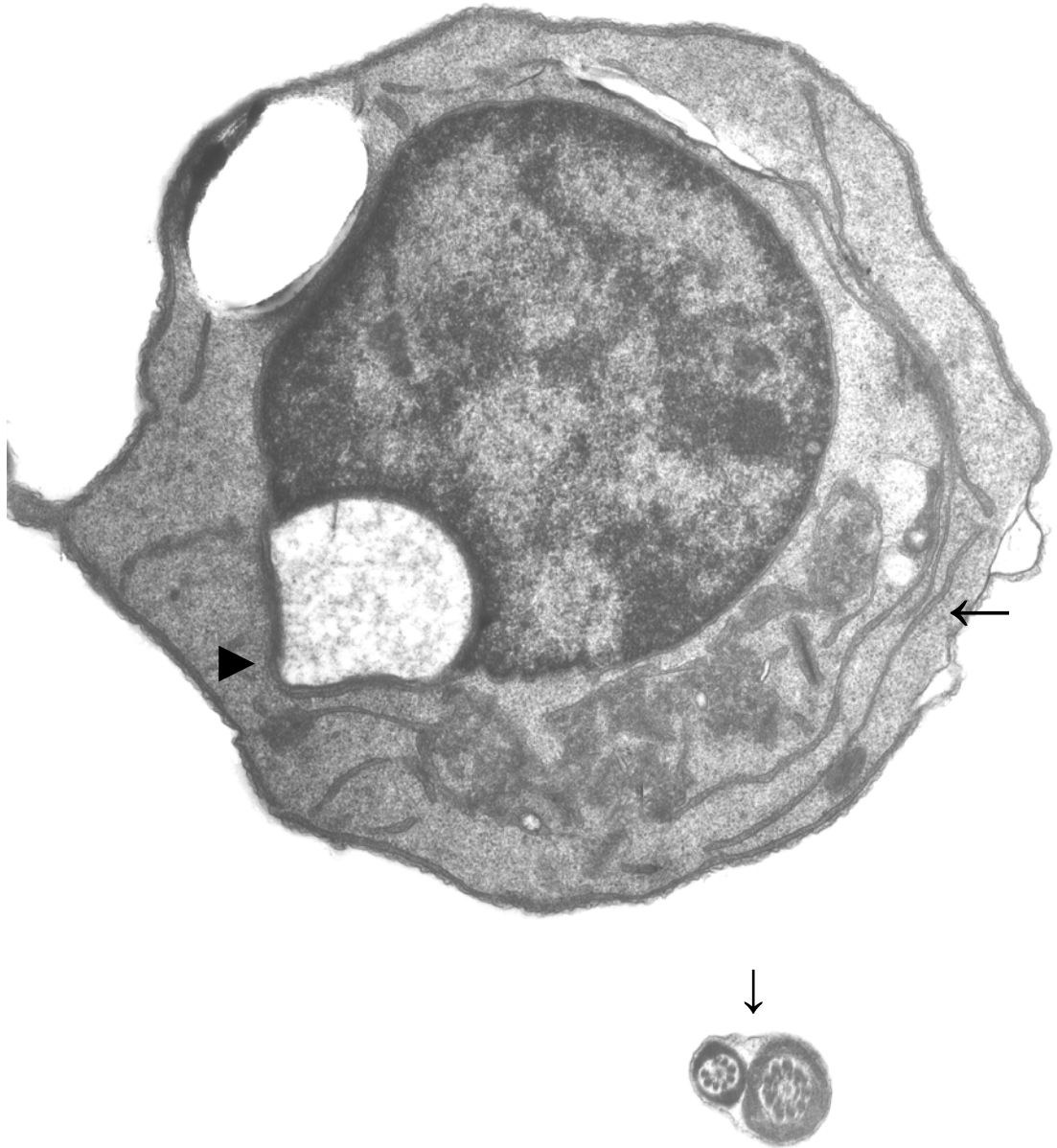


Abb. 33: Runde Spermatide mit Akrosomenbläschen (►) und endoplasmatischem Reticulum (←), daneben Doppelgeißel (↓) (Primärvergrößerung: x 9272)

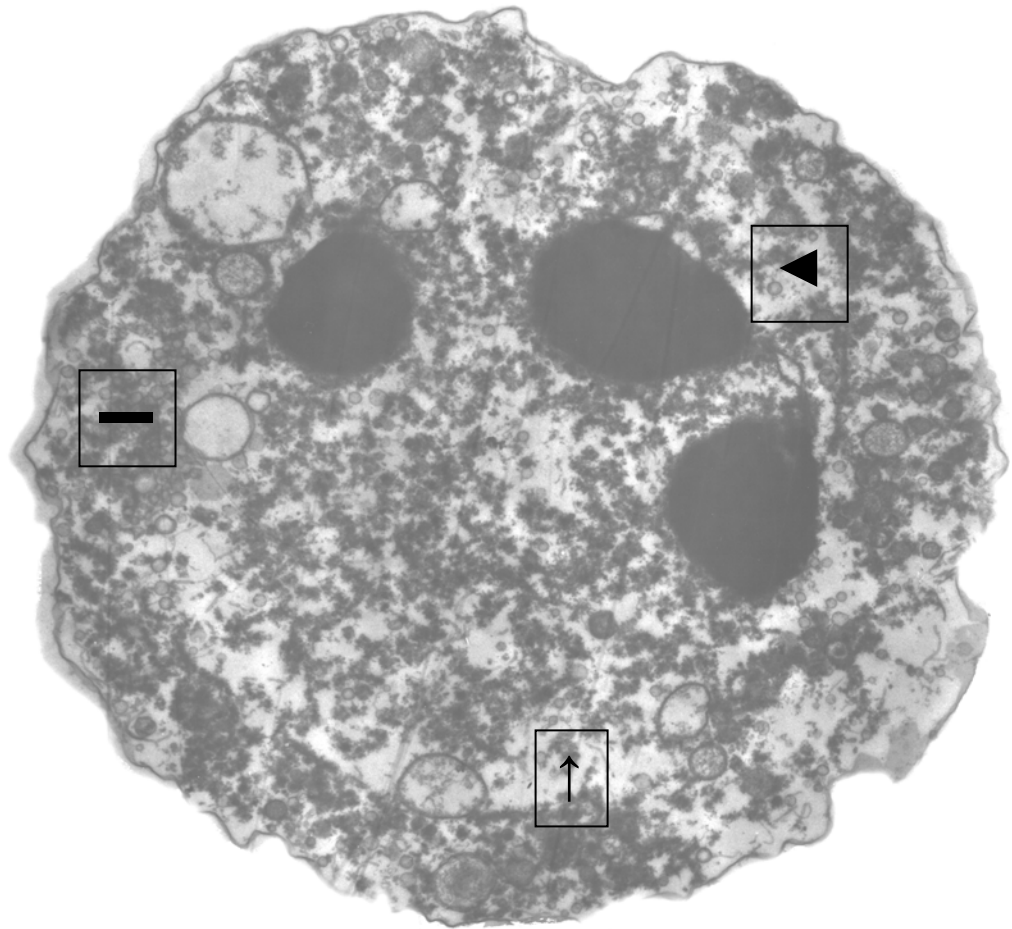


Abb. 34: Zellen mit elektronendichten Einschlüssen (▲) sowie hellen membran-
umhüllten Einschlüssen (—) und granuliertem Cytoplasma (↑) (Primärvergrößerung:
x 5108)

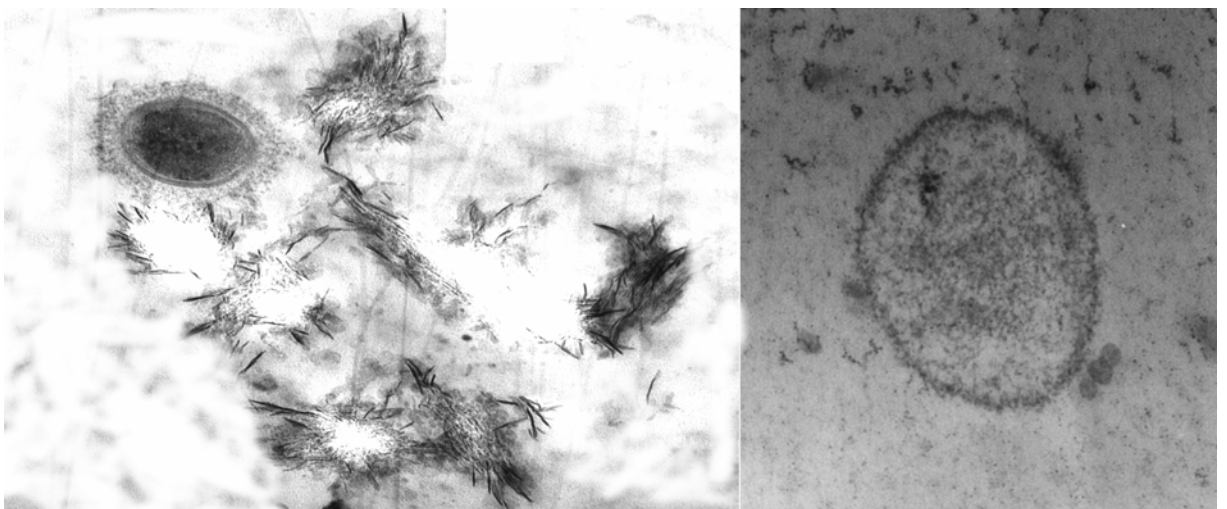


Abb. 35 A und B: Harnkristalle im Hengstejakulat, verschiedene Strukturen und
Kristalle (Primärvergrößerung: x 34000)

Zusammenfassend ist bezüglich der elektronenmikroskopischen Auswertung der Ejakulate zu sagen, dass sich ausschließlich zum prozentualen Anteil abgehobener Akrosomen eine statistisch gesicherte Korrelation zur Fertilität nachweisen ließ. Während der lichtmikroskopisch ermittelte Gesamtanteil pathomorphologischer Veränderungen mit der Fertilität korrelierte, ließ sich dies für die Elektronenmikroskopie nicht bestätigen.

Biochemische Analysen des Seminalplasmas

4.7 Enzyme

4.7.1 Aspartat-Aminotransferase (AST)

Die durchschnittliche AST-Aktivität im Seminalplasma aller Ejakulate betrug 89,5 I.U./l (1,6) $[\bar{x}_g \text{ (SF)}]$ I.U./l. Bei Berücksichtigung aller untersuchten Proben schwankten die Aktivitäten dieses Enzyms im Seminalplasma zwischen minimal 5 I.U./l und maximal 400 I.U./l. Die Aktivität stieg von 87,7 I.U./l (1,6) $[\bar{x}_g \text{ (SF)}]$ im April/Mai auf 90,7 I.U./l (2,1) im Juli/August an und sank dann im November/Dezember auf 51,4 I.U./l (2,6) ab. Die Unterschiede bezüglich der Jahreszeit, die mittels Friedman-Test für alle Probanden berechnet wurden, waren statistisch signifikant ($p = 0,025$). Wurden die 11 Hengste, die dreimal beprobt wurden, bezüglich der jahreszeitlichen AST-Aktivitäten verglichen, ergab sich im April/Mai eine mittlere Aktivität des Enzyms von 78,7 I.U./l (1,5), im Juli/August von 84,5 I.U./l (1,6) sowie im November/Dezember von 52,3 I.U./l (2,0). Auch diese Differenzen waren statistisch zu sichern ($p = 0,025$).

4.7.2 Glutamat-Dehydrogenase (GLDH)

Die gemessenen GLDH-Aktivitäten im Seminalplasma schwankten insgesamt zwischen nicht messbar und 350 I.U./l. Bezüglich der Grundgesamtheit des Probandenkollektivs betrug die mittlere Aktivität des Enzyms im Seminalplasma 9,5 I.U./l (2,4) $[\bar{x}_g \text{ (SF)}]$. Im Vergleich dazu lag der berechnete Mittelwert vom November/Dezember mit 30,9 I.U./l (2,6) $[\bar{x}_g \text{ (SF)}]$ deutlich höher. Außerdem fiel auf, dass im April/Mai und November/Dezember Maximalaktivitäten des Enzyms von 310 und 350 I.U./l gemessen werden konnten, während im Juli/August nur maximal 80 I.U./l erreicht wurden. Im Friedman-Test stellten sich die Unterschiede bezüglich der Jahreszeit signifikant dar ($p = 0,0013$).

Beim saisonalen Vergleich der dreimal beprobten Tiere ergab sich eine etwas andere mediane Verteilung: Es kam nämlich von April/Mai [11,7 I.U./l (3,3)] über Juli/August [16,5 I.U./l (1,7)] zum November/Dezember [40,7 I.U./l (2,4)] zu einem stetigen Aktivitätsanstieg des Enzyms im Seminalplasma, wobei die Schwankungen zwischen den einzelnen Bestimmungen im Juli/August am geringsten waren. Diese saisonale Abhängigkeit stellte sich ebenfalls als signifikant heraus ($p = 0,0013$).

4.7.3 Gamma-Glutamyltransferase (GGT)

Die errechneten Mediane der im Seminalplasma gemessenen GGT-Aktivitäten aller untersuchten Probanden lagen zwischen 7500 I.U./l im April/Mai $[\bar{x}_g \text{ (SF)} = 7677 \text{ I.U./l (1,6)}]$; November/Dezember: $\tilde{x} = 7700 \text{ I.U./l, } 4806 \text{ I.U./l (4,4)]}$ und 8350 I.U./l [Juli/August; 8034 I.U./l (1,9)]. Es bestanden große Differenzen zwischen den bestimmten Einzelwerten, so dass als geringste Enzymaktivität 30 I.U./l gemessen wurde und die höchste Aktivität bei 24100 I.U./l lag. Bei Berücksichtigung aller Ergebnisse ließen sich keine signifikanten Korrelationen im Friedman-Test ableiten

($p > 0,05$ Gleiches galt auch für die dreifach beprobten Tiere, wenn auch die mittlere GGT-Aktivität mit 6700 I.U./l {6372 I.U./l (1,6) [$\bar{x}_g$ (SF)]} im April/Mai minimal war, im Juli/August deutlich anstieg $\{\tilde{x} = 9500$ I.U./l; 8209 I.U./l (1,8) [$\bar{x}_g$ (SF)]} und im November/ Dezember erneut abfiel $\{\tilde{x} = 7700$ I.U./l, 6592 I.U./l (1,7) [$\bar{x}_g$ (SF)]}. Beispielhaft war beim Hengst H3 allerdings saisonunabhängig kaum eine Aktivitätsänderung des Enzyms messbar.

4.7.4 Alkalische Phosphatase (AP)

AP-Aktivitäten zwischen 300 und 75300 I.U./l wurden mit der optimierten Standardmethode bestimmt. Wenn auch zu den Untersuchungszeiträumen 2 und 3 extrem niedrige Aktivitäten des Enzyms (344 sowie 300 I.U./l) nachzuweisen waren, differieren die Mittelwerte aller sowie auch speziell der dreimal in Folge untersuchten Probanden nicht wesentlich. Bei der Grundgesamtheit lag die mediane AP-Aktivität bei 30200 I.U./l [$\bar{x}_g$ (SF) = 26941 (2,1)].

4.7.5 Saure Phosphatase (SP)

Wurden die SP-Ergebnisse aller Probanden betrachtet, so ergaben sich durchschnittliche Aktivitäten von 19,5 I.U./l (1,7) [$\bar{x}_g$ (SF), Termin 1], 22,5 I.U./l (2,1) [$\bar{x}_g$ (SF), Termin 2] und 23,6 I.U./l (1,6) (Termin 3), die deutlich unter denen der AP lagen. Als Minimalwerte wurden jahreszeitlich abhängig 2 (Juli/August) bis 8 I.U./l (April/Mai; November/Dezember) gemessen, während die Maxima bei 42 (November/Dezember) beziehungsweise 92 I.U./l (April/Mai; Juli/August) lagen. Die Grundgesamtheit betreffend wurde eine mittlere Aktivität von 19,1 I.U./l (1,9) ermittelt. Beim saisonalen Vergleich der medianen SP-Aktivitäten der dreimal beprobten Hengste fiel zunächst ein

Aktivitätsanstieg von 16,5 I.U./l (1,7) (April/Mai) auf 28,9 I.U./l (1,8), dann ein Abfall auf 21,6 I.U./l (1,7) auf. Wiederum wies ein Hengst, hier H 38, eine konstante, saisonunabhängige Enzymaktivität im Seminalplasma auf. Ebenso wie bei der AP ließen sich auch bei der SP weder für alle noch für die dreimal in Folge untersuchten Tiere keine statistischen Bezüge zur Saison herstellen ($p > 0,05$).

4.7.6 Creatininkinase (CK)

Bei Auswertung der CK-Aktivitäten der Grundgesamtheit wurde eine mittlere Aktivität dieses Enzyms im Seminalplasma von 388 I.U./l (2,2) [$\bar{x}_g$ (SF)] ermittelt. Zum Untersuchungszeitraum 1 betrug die mittlere CK Aktivität 410 I.U./l (2,0), zum Termin 2 349 I.U./l (2,5) und im November/Dezember 151 I.U./l (4,4). Die Unterschiede hierbei bezüglich der Jahreszeit, die mittels Friedman-Test berechnet wurden, waren statistisch signifikant ($p = 0,035$), was sich auch anhand der Minimal- und Maximalaktivitäten erläutern lässt. So lag zum Termin 1 die minimale CK-Aktivität bei 58 I.U./l, die maximale bei 2580 I.U./l; während zum Termin 3 das Minimum bei 3,0 I.U./l, das Maximum bei 1090 I.U./l lag. Durch einen stetigen Aktivitätsabfall von 353 I.U./l (1,6, Termin 1), über 222 I.U./l (1,9, Termin 2) auf 194 I.U./l (2,6, Termin 3) fielen die dreimal untersuchten Probanden auf, was ebenfalls signifikant war ($p = 0,035$).

4.7.7 Laktat-Dehydrogenase (LDH)

Bei allen untersuchten Seminalplasmaproben wurden LDH-Aktivitäten zwischen 3 und 1700 I.U./l gemessen. Während die ermittelten Mittelwerte vom 1. und 2. Untersuchungszeitraum ähnlich waren [$\bar{x}_g$ (SF) = 63,9 I.U./l (3,9) und 80,9 I.U./l (3,7)],

wich der 3. mit einem Wert von 302 I.U./l (3,0) deutlich von den beiden anderen ab. Die saisonalen Differenzen waren statistisch signifikant ($p = 0,001$). Jahreszeitliche Abhängigkeit der Enzymaktivität fiel ebenfalls bei den dreifach beprobten Tieren auf ($p = 0,001$). So war ein stetiger saisonaler Anstieg erkennbar: im Mittel lag nämlich die LDH-Aktivität im April/Mai bei 38,0 I.U./l (3,7), im Juli/August 96,8 I.U./l (2,2) sowie im November/Dezember bei 378 I.U./l (2,1). Wurde allein das Ergebnis der Hengste der Grundgesamtheit berücksichtigt, lag die durchschnittliche Aktivität bei 64,5 I.U./l (4,0).

4.8 Mengen- und Spurenelemente

4.8.1 Natrium

Bezüglich aller examinierten Proben lagen die berechneten mittleren Natriumkonzentrationen bei 106,6 mmol/l (1,2) [$\bar{x}_g$ (SF)], im Median bei $110,5 \pm 13,5$ mmol/l, also in ähnlichen Bereichen wie die Blutkonzentrationen. Als Minimalkonzentration wurden 69 mmol/l Natrium im Seminalplasma, als Maximalkonzentration 126 mmol/l gemessen. Insgesamt gab es bei den dreimal untersuchten Tieren Probanden, deren Natriumgehalt immer saisonunabhängig im unteren Referenzbereich lag, während bei anderen eher mittlere oder obere Werte vorlagen. Bei den meisten dieser Hengste waren nur geringgradige Schwankungen zwischen den einzelnen Untersuchungsterminen existent, was auch anhand der Mediane dieses Probandenkollektivs ersichtlich war.

4.8.2 Kalium

Die Kaliumionenkonzentrationen im Seminalplasma des gesamten Probandenkollektivs waren deutlich höher, als sie im Blut vorkommen. Sie schwankten durchschnittlich zwischen Konzentrationen von 21,8 mmol/l (1,4) [$\bar{x}_g$ (SF), Termin 1], 22,1 mmol/l (1,2) (Termin 2) sowie 15,5 mmol/l (1,8) (Termin 3). Der Minimalgehalt betrug 2,1 mmol/l (Termin 3), während der Maximalgehalt bei 53 mmol/l lag. Bei den 11 dreimal examinieren Hengsten wurden ähnliche Kaliumgehalte ermittelt [April/Mai: 21,5 mmol/l (1,2), Juli/August 20,7 mmol/l (1,2), November/Dezember 17,9 mmol/l (1,8)].

4.8.3 Kalzium

Die Gehalte an Gesamtkalzium schwankten bei Betrachtung der gesamten Ergebnisse im Mittel je nach Untersuchungszeitraum zwischen 2,3 mmol/l (2,0) [$\bar{x}_g$ (SF), Termin 1] und 1,6 mmol/l (1,8) (Termin 3). Die Konzentrationen an ionisiertem Kalzium waren im April/Mai mit 1,6 mmol/l (1,8) am höchsten und sanken über 1,5 mmol/l (1,9) im Juli/August auf 1,2 mmol/l (1,6) im November/Dezember. Weder bezüglich der Gesamtkalziumionenkonzentration noch des Gehaltes an ionisiertem Kalzium ließen sich im jahreszeitlichen Vergleich statistische Korrelationen ableiten ($p > 0,05$). Bezüglich der Grundgesamtheit konnte ein durchschnittlicher Gehalt an Gesamtkalzium von 2,4 mmol/l (2,0) sowie ein Gehalt an ionisiertem Kalzium von 1,7 mmol/l (1,9) im Seminalplasma ermittelt werden. Minimal wurden Konzentrationen an ionisiertem beziehungsweise Gesamtkalzium von 0,5 beziehungsweise 0,7 mmol/l, maximal Gehalte von 8,9 beziehungsweise 13,3 mmol/l bestimmt.

Beim dreifach untersuchten Probandenkollektiv konnte sowohl für den Gesamtkalziumgehalt als auch für den Gehalt an ionisiertem Kalzium ein Konzentrationsabfall vom ersten bis zum dritten Termin ermittelt werden

(Gesamtkalzium: 2,5 mmol/l (2,2) versus 1,8 mmol/l (1,8) versus 1,5 mmol/l (1,8); ionisiertes Kalzium: 1,8 mmol/l (2,0) versus 1,3 mmol/l (1,6) versus 1,2 mmol/l (1,6); jeweils $p > 0,05$).

4.8.4 Magnesium

Die mittleren Magnesiumionenkonzentrationen, die bei der photometrischen Messung im Seminalplasma des gesamten Kollektivs gemessen wurden, waren zum 3. Untersuchungszeitraum mit $3,8 \pm 1,3$ mmol/l maximal. Bei Betrachtung der Grundgesamtheit lag der Durchschnitt des Magnesiumgehaltes bei $3,0 \pm 1,2$ mmol/l [$\bar{x}_g$ (SF) = 2,5 mmol/l (1,7)], das Minimum bei 0,5 mmol/l sowie das Maximum 4,2 mmol/l. Wurden die mittleren Gehalte bei den dreimal beprobten Tieren saisonal vergleichend betrachtet, fiel ein konstanter Anstieg der Konzentration von 2,0 mmol/l (2,0) im April/Mai über 2,5 mmol/l (1,7) im Juli/August auf 2,6 mmol/l (2,1) im November/Dezember auf ($p > 0,05$).

4.8.5 Anorganisches Phosphat

Die Konzentration an Phosphat im Seminalplasma betrug bei der Grundgesamtheit 1,2 mmol/l (1,7) [$\bar{x}_g$ (SF)]. Bei allen untersuchten Hengsten schwankte der Gehalt zwischen 1,3 mmol/l (1,7) April/Mai beziehungsweise 1,3 mmol/l (1,8) im Juli/August und 1,7 mmol/l (1,6) im November/Dezember. Die dreimal untersuchten Probanden wiesen in Abhängigkeit vom Untersuchungstermin mittlere Phosphatkonzentrationen von 1,3 mmol/l (2,0), 1,7 mmol/l (1,5) und 1,8 mmol/l (1,4) auf. Mit Ausnahme des Hengstes H 28 fielen bei allen dieser 11 Probanden starke Schwankungen im Phosphatgehalt auf.

4.8.6 Chlor

Die Chloridionenkonzentrationen waren denen der Natriumkonzentrationen sehr ähnlich, da diese beiden Elemente gemeinsam auftraten. Die mittleren Gehalte zeigten nur geringgradige Variation [$\bar{x}_g$ (SF) = 113,4 (1,1) Termin 1, 113,6 mmol/l (1,1) (Termin 2) und 120,8 mmol/l (1,1) (Termin 3)], was sich auch bei Betrachtung der dreifach beprobten Hengsten bestätigte.

4.8.7 Eisen

Die Eisenkonzentrationen aller Hengste schwankten zwischen nicht meßbar und 252 µg/dl, die Durchschnittswerte lagen mit 10,5 µg/dl (2,6) [$\bar{x}_g$ (SF), April/Mai], 16,1 µg/dl (3,5) (Juli/August) sowie 5,9 µg/dl (2,8) (November/Dezember) µg/dl deutlich unterhalb des Maximums. Die dreimal untersuchten Tiere wiesen mit 8,2 µg/dl (1,9) (April/Mai), 11,8 µg/dl (3,0) (Juli/August) und 4,9 µg/dl (2,9) (November/Dezember) starke jahreszeitliche Differenzen auf.

4.8.8 Kupfer

Zum ersten Untersuchungszeitraum lag der Kupfergehalt bei 111,4 µg/dl (1,7) [$\bar{x}_g$ (SF)], für den 2. Termin bei 119,6 µg/dl (2,0), beim 3. Termin allerdings nur bei 58,3 µg/dl (1,9). Der Nachweis der saisonalen Signifikanz war statisch möglich ($p = 0,025$). Wurden die Kupfergehalte im Seminalplasma der 11 Hengste des Kollektivs saisonabhängig verglichen, wurde der gleiche Trend ersichtlich wie für alle Probanden erwähnt. Für April/Mai lagen im Mittel Konzentrationen von 123,8 µg/dl (1,4) und für Juli/August 127,3 µg/dl (1,8) vor. Mit 63,9 µg Kupfer pro dl (1,7) war im November/Dezember nur ungefähr die Hälfte der Konzentration des Termins 2 im

Seminalplasma enthalten. Diese saisonalen Unterschiede waren statistisch ebenfalls signifikant ($p = 0,025$).

4.8.9 Zink

Bei den Zinkionenkonzentrationen aller Probanden fiel, ebenso wie bei den Kupferkonzentrationen, ein deutlich niedrigerer Mittelwert des 3. Untersuchungszeitraumes im Vergleich zu ähnlichen Werten der ersten beiden Beprobungsterminen auf. Während zum Termin 1 und 2 Gehalte von 86,1 µg/dl (1,4) sowie 83,6 µg/dl (1,6) einander stark ähnelten, enthielt das Seminalplasma zum Termin 3 nur 58,0 µg Zink/dl (1,8). Diese saisonalen Differenzen waren signifikant (Friedman-Test, $p = 0,038$). Bei Betrachtung der Ergebnisse der Dreifachuntersuchung war im Juli/August der Zinkgehalt maximal [93,0 µg/dl(1,4)], während im April/Mai [79,6 µg/dl (1,3)] und November/Dezember [54,4 µg/dl (1,8)] die Gehalte geringer waren. Hierbei konnte mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse eine Signifikanz bezüglich der Saison belegt werden ($p = 0,017$). In der Grundgesamtheit lag die mittlere Konzentration des Seminalplasmas bei 83,9 µg Zink/dl (1,5), wobei als Minimalwert 14 µg/dl und als Maximalwert 178 µg/dl bestimmt wurden.

4.9 Ergebnisse Sonderfall H 12

Die Ergebnisse von H 12 sollen aufgrund der von der Norm abweichenden Ejakulatbefunde, insbesondere der Urinbeimengungen, gesondert dargestellt werden.

Der Hengst wurde im August sowie im Dezember abgesamt, so dass zwei Ejakulate für die Untersuchung zur Verfügung standen. Während im August nur bei

lichtmikroskopischer Kontrolle vereinzelt Harnkristalle auffielen, war das Ejakulat im Dezember hochgradig mit Urin kontaminiert. Dies äußerte sich sowohl in der Farbe als auch im Geruch der gewonnenen Probe. Die Probe vom 2. Untersuchungszeitraum zeigt deutlich stärkere Abweichungen von der Norm als das Ejakulat vom 1. Termin.

Aufgrund des geringen Volumens konnten die biochemischen Analysen des Seminalplasmas im Dezember nicht vollständig durchgeführt werden. Bei der Elektronenmikroskopie fielen neben einer sehr geringen Spermiendichte insbesondere die in Abb. 35 A und B dargestellten Harnkristalle auf.

Wurde die Libido des Hengstes H 12 zu beiden Untersuchungstermine mit den Medianen der Ergebnisse verglichen, so zeigte sich, dass er eine deutlich schlechtere Libido hatte als der errechnete Median aller untersuchten Hengste zur korrespondierenden Jahreszeit.

Beim Vergleich der makroskopischen Befunde fiel auf, dass neben den im Dezember vorhandenen Abweichungen in Farbe, Konsistenz, Geruch und Beimengungen auch deutliche Abweichungen im Volumen vorhanden waren. Im August lag das Ejakulatvolumen des Hengstes ebenfalls unter dem errechneten Median. Sowohl Dichte als auch Gesamtspermienzahl zeigten hochgradige Abweichungen von den Medianen sowie den geforderten Richtwerten. Die chemisch-physikalischen Untersuchungen, demnach der pH-Wert der Dezemberprobe, differierte mit einem $\text{pH} = 7,7$ ebenfalls deutlich von der Norm.

H 12 wies in beiden untersuchten Ejakulaten weniger Gesamtmotilität sowie weniger vorwärtsbewegliche Spermien auf als im Durchschnitt für alle untersuchten Hengste errechnet wurde. Im Dezemberejakulat war kein bewegliches Spermium enthalten, im Eosinausstrich stellten sich alle Spermien rot, das heißt tot, dar. Der Anteil pathomorphologisch veränderter Spermien lag in der im Dezember gewonnenen Probe mit 12 % im Vergleich zu 30,5 % deutlich unter dem Mittelwert.

Bei der biochemischen Analyse des Seminalplasmas waren die Aktivitäten aller untersuchten Enzyme deutlich niedriger als die Mediane. Natrium- und Kalziumkonzentrationen sowie der Gehalt an anorganischem Phosphat lagen unterhalb, der Magnesiumgehalt über dem Median.

Die Daten sind in Tabelle 19 zusammengestellt.

Ergebnisse

Tabelle 19: Gegenüberstellung der Untersuchungsergebnisse von H 12 ohne (Juli/August) sowie mit Urinbeimengungen (Dezember) und den Medianen der Untersuchungsergebnissen (Juli/August sowie November /Dezember)

Parameter	H 12 August	H 12Dezember	Mediane
Libido	3	> 4	1 / 1,5
Anzahl Aufsprünge	1	Mehrere	1,8 / 1,7
Volumen	30	5	37,5 / 40,0
Dichte (x 10 ⁶)	267	161	259,2 / 286,0
Gesamtspermienzahl (x 10 ⁹)	8,0	0,86	9,7 / 11,1
pH	7,0	7,7	7,0 / 7,0
Gesamtmotilität/ Vorwärtsbeweglichkeit (%)	60 / 40	0 / 0	70/50 / 70/50
Anteil lebender Spermien (%)	*	0	77 / 72,5
Anteil pathomorphologisch ver- änderter Spermien (%)	37	12	27,3 / 30,5
AST	80	6	80 / 53
GLDH	3	21	10,5 / 32
GGT	7300	30	8350 / 7700
AP	46300	300	30000 / 25100
SP	20	#	25 / 28
CK	205	3	378 /155
LDH	73	29	78,5 / 309
Natrium	110	101	107 / 119
Kalium	22,8	+	21,8 / 18,1
Kalzium (Gesamt-/ionisiertes)	1,79/1,18	2,17/0,87	1,9/1,3 / 2,0/1,2
Magnesium	4,19	4,26	3,7 / 3,8
Phosphat	1,1	0,5	1,2 / 1,9
Chlorid	116	#	116 / 124
Eisen	4	#	11,5 / 6,0
Kupfer	126	#	116 / 53,5
Zink	96	#	85 / 57,5

* nicht auswertbar

+ zu hoch, nicht messbar

nicht genug Probenmaterial

4.10 Korrelationen der untersuchten Parameter

4.10.1 Korrelationen der Parameter in der Grundgesamtheit

Mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman konnten bei Betrachtung der Grundgesamtheit die folgenden Korrelationen erarbeitet werden:

- Die Anzahl der Aufsprünge, die ein Hengst benötigte, bevor es zur Ejakulation kam, war eng mit der Libido assoziiert ($p = 0,045$, $r = 0,24$).
- Zwischen dem prozentualen Anteil deformierter Köpfe und dem Alter der Hengste bestand ein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,0005$, $r = - 0,4$).
- Weiterhin konnte eine charakteristische Beziehung zwischen dem Zeitraum von der letzten Absamung bis zur Probengewinnung (Intervall) und der Spermienzahl ($p = 0,0032$, $r = 0,39$) einerseits und der Pathomorphologie ($p = 0,018$, $r = 0,31$) andererseits nachgewiesen werden.
- Die Fertilität war eng mit dem Anteil lebender Spermatozoen ($p = 0,016$, $r = 0,35$) sowie der Pathomorphologie ($p < 0,0001$, $r = - 0,59$) verbunden, wobei insbesondere dem prozentualen Anteil an Geißelveränderungen ($p = 0,005$, $r = - 0,39$) sowie den Cytoplasmotropfen ($p = 0,0003$, $r = - 0,49$) Bedeutung zuzukommen scheint.
- Das Volumen stand in charakteristischer Abhängigkeit zur Dichte ($p = 0,0017$, $r = - 0,37$).
- Für den pH-Wert konnte trotz geringer Schwankungen zwischen 6,7 und 8,0 eine signifikante Beziehung zur Motilität ($p = 0,016$, $r = - 0,28$) und Progressivmotilität ($p = 0,011$, $r = - 0,3$) nachgewiesen werden.
- Bei Betrachtung lichtmikroskopischer Parameter war sowohl für die Motilität (Mot) als auch für die Vorwärtsbeweglichkeit (VW) ein signifikanter Zusammenhang zum prozentualen Anteil lebender ($p_{\text{Mot}} < 0,0001$, $r_{\text{Mot}} = 0,51$;

$p_{VW} = 0,002$, $r_{VW} = 0,43$) und pathomorphologisch veränderter Spermien ($p_{Mot} = 0,036$, $r_{Mot} = -0,25$; $p_{VW} = 0,04$, $r_{VW} = -0,24$) existent.

- Weiterhin ließ sich zwischen Geißelveränderungen (Gesamtanteil geknickter, schleifenförmiger, aufgerollter und sonstiger lichtmikroskopisch nachgewiesener Schwanzveränderungen) und dem Anteil an Cytoplasmatropfen eine direkte Beziehung ($p < 0,0001$, $r = 0,46$) herleiten.
- Sowohl zum Volumen (Vol) als auch zur Dichte des Ejakulates konnten von den im Seminalplasma untersuchten Enzymen AST ($p_{vol} = 0,0024$, $r_{vol} = -0,35$; $p_{Dichte} = 0,0198$, $r_{Dichte} = 0,28$), GGT ($p_{vol} = 0,0068$, $r_{vol} = -0,31$; $p_{Dichte} < 0,0001$, $r_{Dichte} = 0,48$), LDH ($p_{vol} = 0,009$, $r_{vol} = -0,31$; $p_{Dichte} = 0,025$, $r_{Dichte} = 0,27$), SP ($p_{vol} = 0,0004$, $r_{vol} = -0,41$; $p_{Dichte} < 0,0001$, $r_{Dichte} = 0,48$) und AP ($p_{vol} < 0,0001$, $r_{vol} = -0,57$; $p_{Dichte} < 0,0001$, $r_{Dichte} = 0,62$) signifikante Zusammenhänge verifiziert werden.
- Für die LDH-Aktivität wurden weitere Zusammenhänge ermittelt: Eine Signifikanz war vorhanden zur Motilität ($p = 0,0062$, $r = 0,32$) und Progressivmotilität ($p = 0,0048$, $r = 0,33$), zum Anteil der lebenden Spermien ($p = 0,0038$, $r = 0,35$) sowie zur Pathomorphologie ($p = 0,041$, $r = -0,24$).
- Ebenso waren Wechselbeziehungen zwischen GGT-Aktivität und Gesamt- sowie Vorwärtsbeweglichkeit ($p_{Mot} = 0,022$, $r_{Mot} = 0,27$; $p_{VW} = 0,018$, $r_{VW} = 0,28$) existent.
- Die Enzyme SP und AP standen in enger Beziehung zueinander ($p < 0,0001$, $r = 0,54$).
- Die Phosphatkonzentration korrelierte mit dem pH-Wert ($p = 0,0427$, $r = 0,24$), der Dichte ($p = 0,0044$, $r = 0,34$) und der Gesamtspermienzahl ($p = 0,0068$, $r = 0,32$).

- Sowohl für den Gehalt an Gesamt- (Ca ges) als auch an ionisiertem Kalzium (Ca ion) konnte ein Bezug zum Ejakulatvolumen nachgewiesen werden ($p_{\text{Ca ges}} = 0,0094$, $r_{\text{Ca ges}} = 0,31$; $p_{\text{Ca ion}} = 0,0018$, $r_{\text{Ca ion}} = 0,36$).
- Für die Mikroelemente Eisen und Zink existierten signifikante Zusammenhänge zum Volumen ($p_{\text{Eisen}} = 0,0059$, $r_{\text{Eisen}} = -0,33$; $p_{\text{Zink}} = 0,0001$, $r_{\text{Zink}} = -0,43$) und zur Dichte ($p_{\text{Eisen}} = 0,0011$, $r_{\text{Eisen}} = 0,39$; $p_{\text{Zink}} < 0,0001$, $r_{\text{Zink}} = 0,53$).
- Der Kupfergehalt korrelierte mit dem Volumen ($p = 0,0101$, $r = -0,3$) und dem Anteil lebender Spermien im Ejakulat ($p = 0,0494$, $r = 0,24$).

4.10.2 Vorhandene Korrelationen bei Berücksichtigung der Saisonalität der Proben

Wurden die Ergebnisse aller Proben unter Berücksichtigung des Untersuchungstermins mit den korrespondierenden Parametern in Beziehung gesetzt, ließen sich folgende Resultate ermitteln:

- Bei saisonaler Betrachtung aller Probanden konnte die genannte Beziehung (4.10.1) zwischen Libido und Anzahl der Aufsprünge nur für den ersten sowie zweiten, nicht aber dritten Untersuchungstermin nachgewiesen werden ($p_1=0,036$, $r=0,29$, $p_2=0,048$, $r=0,27$, $p_3>0,05$).
- Gleiches galt für den erwiesenen Zusammenhang zwischen Volumen und Dichte ($p_1 = 0,037$, $r = -0,28$, $p_2 < 0,0001$, $r = -0,59$, $p_3 > 0,05$) sowie den zwischen prozentualem Anteil lebender und pathomorphologisch veränderten Spermien ($p_1 = 0,017$, $r = -0,32$, $p_2 = 0,0038$, $r = -0,38$, $p_3 > 0,05$).
- Zusätzlich ließ sich für die Termine 2 und 3 eine signifikante Wechselbeziehung der Aufsprünge zum Volumen ($p_2 = 0,0091$, $r = 0,35$, $p_3 = 0,013$, $r = 0,67$) belegen.

- Es existierten weiterhin signifikante Zusammenhänge zwischen Ejakulatvolumen und SP- ($p_1 = 0,037$, $r = -0,29$, $p_2 = 0,0001$, $r = -0,49$) beziehungsweise AP-Aktivität ($p_1 = 0,0002$, $r = -0,48$, $p_2 < 0,0001$, $r = -0,58$) sowie zum Zink-Gehalt ($p_1 = 0,0063$, $r = -0,36$, $p_2 < 0,0001$, $r = 0,55$) im April/Mai und Juli/August.
- Von der Dichte bestand die charakteristische Abhängigkeit für die AST- ($p_2 = 0,0116$, $r = 0,32$, $p_3 = 0,0003$, $r = 0,8$) sowie LDH-Aktivität ($p_2 = 0,0004$, $r = 0,45$, $p_3 = 0,0024$, $r = 0,72$) zu den Terminen 2 und 3. Eine signifikante Beziehung ließ sich weiterhin zwischen Dichte und AP- ($p_1 < 0,0001$, $r = 0,6$, $p_2 < 0,0001$, $r = 0,7$, $p_3 < 0,0001$, $r = 0,86$), SP-Aktivität ($p_1 = 0,00011$, $r = 0,44$, $p_2 < 0,0000$, $r = 0,54$, $p_3 = 0,0053$, $r = 0,66$), Phosphat- ($p_1 = 0,0191$, $r = 0,32$, $p_2 = 0,0013$, $r = 0,41$, $p_3 = 0,0118$, $r = 0,63$) und Zinkkonzentration ($p_1 < 0,0001$, $r = 0,57$, $p_2 < 0,0001$, $r = 0,54$, $p_3 < 0,0001$, $r = 0,91$) für alle Untersuchungstermine verifizieren.
- Die Gesamtspermienzahl korrelierte allerdings ausschließlich mit dem Phosphatgehalt signifikant und dies zu den Terminen 1 und 2 ($p_1 = 0,0015$, $r = 0,42$, $p_2 = 0,0483$, $r = 0,26$).
- Zur Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit (VW) konnte lediglich die Verbindung zur LDH-Aktivität ($p_1 = 0,004$, $r = 0,38$, $p_2 = 0,0104$, $r = 0,33$; VW: $p_1 = 0,0018$, $r = 0,41$, $p_2 = 0,0076$, $r = 0,34$) im April/Mai und Juli/August belegt werden.
- AP- und SP-Aktivität standen erneut in enger Abhängigkeit zueinander, die für alle Termine nachgewiesen werden konnte ($p_1 = 0,0011$, $r = 0,43$, $p_2 < 0,0001$, $r = 0,75$, $p_3 = 0,0053$, $r = 0,7$).
- Weiterhin ließ sich eine signifikante, bisher nicht ermittelte Verbindung zwischen Zinkgehalt im Seminalplasma und Fertilität zu den

Probenahmeterminen 2 und 3 aufzeigen ($p_2 = 0,0168$, $r = 0,36$, $p_3 = 0,0482$, $r = 0,61$).

4.10.3 Korrelationen elektronenmikroskopischer Parameter

- Für den prozentualen Anteil an pathomorphologisch veränderten Spermien existierte zwischen Transmissionselektronenmikroskopie und Lichtmikroskopie ein statistisch signifikanter positiver Zusammenhang ($p = 0,0207$, $r = 0,34$).
- Der Anteil der veränderten Akrosomen war signifikant korreliert mit der Aktivität der GGT ($p = 0,0225$, $r = 0,34$).
- Weiterhin bestand eine signifikante Beziehung zwischen dem prozentual ermittelten Anteil an veränderten Akrosomen sowie der Motilität der Spermien ($p = 0,0259$, $r = 0,33$), die in der lichtmikroskopischen Untersuchung ermittelt wurde.
- Zur Fertilität war ausschließlich ein signifikanter Bezug der abgehobenen Akrosomen existent ($p = 0,0336$, $r = -0,314$). Ein erhöhter prozentualer Anteil an abgehobenen Akrosomen korrelierte mit einem Defizit bezüglich der Fertilität. So wurden im Mittel 4,9 % (3,2) [$\bar{x}_g$ (SF)] abgehobene Akrosomen bei Hengsten mit sehr guter und guter Fertilität (Trächtigkeitsrate 70-100 %), 7,9 % (1,9) [$\bar{x}_g$ (SF)] bei subfertilen (Trächtigkeitsrate 40-69 %) und 11,4 % (4,4) bei infertilen Probanden (Trächtigkeitsrate < 40 %) nachgewiesen. Jedoch standen weder Anomalien des Kopfes, des Mittelstücks noch der Geißel in signifikanter Beziehung zur Fertilität.

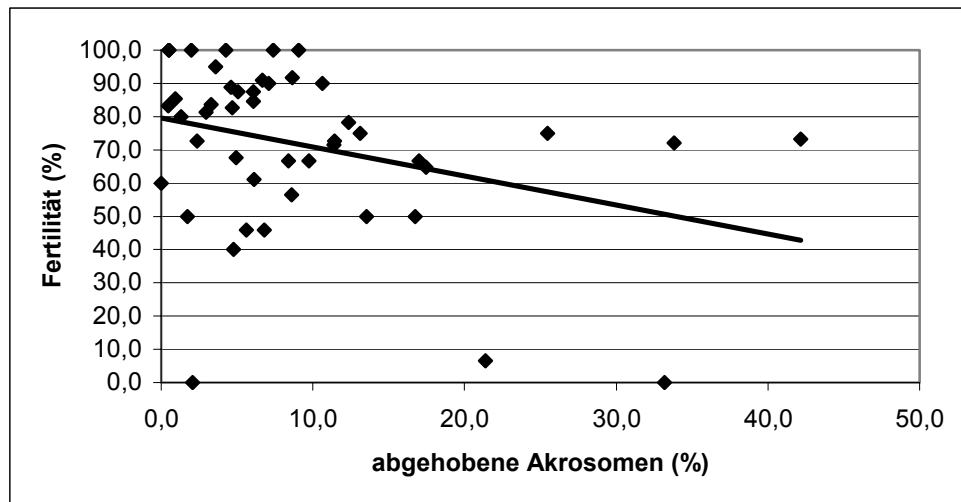


Abb. 36: Gegenüberstellung von Fertilität (%) und dem prozentualen Anteil elektronenmikroskopisch nachweisbarer abgehobener Akrosomen (die Linie gibt den linearen Trend wieder.)

- Elektronenmikroskopisch nachweisbare Kernvakuolen im Spermienkopf korrelierten mit dem lichtmikroskopisch ermittelten prozentualen Anteil an Kopfveränderungen ($p = 0,036$, $r = - 0,31$). Weiterhin bestand ein Zusammenhang zwischen Mehrfachköpfen in der elektronenmikroskopischen Auswertung und Doppelköpfen ($p = 0,023$, $r = 0,34$) einerseits sowie Kopfpathomorphologie ($p = 0,046$, $r = 0,3$) in der Lichtmikroskopie andererseits.
- Des Weiteren korrelierten signifikant mit der lichtmikroskopisch erfassten Pathomorphologie sowohl unveränderte Geißelquerschnitte im proximalen Bereich (a/b/c unverändert, $p = 0,008$, $r = - 0,38$) als auch die elektronenmikroskopisch erhobenen Schwanzveränderungen im proximalen Bereich (Geißelanschnitte im Bereich a bis c mit zusätzlichen Schwanzanschnitten: $p = 0,004$, $r = 0,41$ sowie zusätzlich gegebenenfalls vorhandene Abweichungen von der normalen Tubulusanzahl: $p = 0,006$, $r = 0,40$) signifikant.
- Für den distalen Geißelbereich gilt ebenfalls, dass eine signifikante Beziehung zwischen dem Anteil an Geißeln, welche eine Anomalie bezüglich des

Tubulismustern aufweisen, und der Pathomorphologie bestand ($p = 0,009$, $r = 0,38$).

- Zwischen dem Anteil physiologischer Geißel-Längsanschnitte ließ sich wie auch zu den übrigen Geißelanschnitten ein signifikanter Bezug zur Pathomorphologie ($p = 0,011$, $r = - 0,37$) verifizieren.
- Für die geknickten Längsgeißelanschnitte wurde eine signifikante Korrelation zur Konzentration an Natrium ($p = 0,03$, $r = - 0,32$) und Chlorid ($p = 0,044$, $r = - 0,3$) im Seminalplasma ermittelt.

4.11 Einfluß der Ejakulatqualität auf die untersuchten Parameter

Alle Ejakulate wurden wie unter 3.3 beschrieben den folgenden Gruppen zugeordnet: A. den Mindestanforderungen entsprechend ($n = 149$), B. geringgradig von den Mindestanforderungen abweichende Befunde bei der makroskopischen, chemisch-physikalischen und lichtmikroskopischen Ejakulatuntersuchung ($n = 54$) sowie C. hochgradig abweichende Befunde ($n = 19$) (siehe Tabelle 20, 21, 22).

Bei der statistischen Auswertung konnte eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$, $r = 0,3$) zwischen der Qualität der Ejakulate (Gruppe A, B oder C zugeordnet) und der Fertilität der Probanden ermittelt werden. Das bedeutet, dass Probanden mit „normalen“ Ejakulaten statistisch verifizierbar bessere Fertilitäten besitzen als Probanden mit Dys- und Pathospermie.

Weiterhin bestanden für alle Gruppen signifikante Korrelationen zwischen dem Intervall, das bedeutet vom Zeitraum zwischen letzter Absamung und Probengewinnung, und der Ejakulatqualität (1 vs. 2: $p = 0,016$; 1 vs. 3: $p = 0,0005$; 2 vs.

3: $p = 0,027$). Hinsichtlich der Anzahl der Aufsprünge ließ sich nur zwischen den Gruppen A (normale Ejakulate) und C (hochgradig abweichende Ejakulate) eine signifikante Korrelation ($p = 0,049$) herausstellen. Der pH-Wert war bei Hengsten mit hochgradig von der Norm abweichender Ejakulatqualität signifikant höher ($p = 0,026$) als bei Hengsten mit normaler Ejakulatqualität. Der Maximalwert lag bei der Gruppe C bei $\text{pH} = 7,7$ im Vergleich zu $\text{pH} = 7,2$ bei der Gruppe A. Die Gesamtmotilität unterschied sich signifikant beim Vergleich der Gruppe A mit den Gruppen B und C (A vs. B: $p < 0,0001$; A vs. C: $p < 0,0001$). Auch die im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test berechneten Korrelationen zwischen den Gruppen B und C (geringgradig (B) versus hochgradig (C) abweichend) waren signifikant (B vs. C: $p = 0,025$). Dieselben Beobachtungen wurden bezüglich Vorwärtsbeweglichkeit gemacht (A vs. B: $p < 0,0001$; A vs. C: $p < 0,0001$; B vs. C: $p = 0,036$). Weiterhin ergaben sich mittels des explorativen Gruppenvergleiches signifikante Beziehungen zwischen allen drei Gruppen zum Anteil der lebenden Spermien (A vs. B: $p < 0,0001$; A vs. C: $p < 0,0001$; B vs. C: $p = 0,004$) sowie zum Anteil pathomorphologisch veränderter Spermien (A vs. B: $p = 0,0008$; A vs. C: $p < 0,0001$; B vs. C: $p = 0,0001$).

Libido, Volumen sowie Dichte und Gesamtspermienzahl standen beim untersuchten Kollektiv in keinem signifikanten Zusammenhang zur Ejakulatqualität.

Tabelle 20: Mittelwerte sowie Streufaktor der untersuchten Parameter bezogen auf die Ejakulatqualität

Parameter	der Norm ent- sprechende Ejakulate [n/ $\bar{x}_g$ (SF)]		Ejakulate mit gering- gradigen Abweichun- gen [n/ $\bar{x}_g$ (SF)]		Ejakulate mit hoch- gradigen Abwei- chungen [n/ $\bar{x}_g$ (SF)]	
	Gruppe A		Gruppe B		Gruppe C	
Alter (J)	149	8,6 (1,8)	54	7,8 (1,8)	19	7,5 (1,6)
Intervall (Tage)	43	1,9 (2,3)	38	3,9 (4,6)	11	19,3 (7,1)
Libido	59	1,4 (1,6)	53	1,4 (1,6)	19	1,7 (2,0)
Anzahl Aufsprünge	58	1,4 (1,7)	50	1,5 (1,6)	15	2,0 (2,1)
Fertilität (%)	45	74,2 (2,6)	39	70,5 (1,6)	13	74,3 (1,2)
Volumen	59	39,8 (1,5)	54	41,7 (1,9)	19	35,6 (2,0)
pH-Wert	59	7,0 (1,0)	54	7,0 (1,2)	19	7,1 (1,0)
Dichte	58	250,8 (1,4)	53	217,1 (1,6)	19	212,4 (1,6)
Spermienzahl	58	10,0 (1,4)	52	8,9 (1,7)	19	7,3 (2,0)
Motilität	59	75,2 (1,2)	54	60,2 (1,4)	19	28,6 (3,2)
Vorwärtsbeweglichkeit	59	58,3 (1,5)	54	44,1 (1,6)	19	19,0 (3,8)
Anteil Lebende (%)	55	81,2 (1,1)	51	68,5 (1,3)	18	51,2 (1,7)
Pathomorphologie (%)	59	23,1 (1,5)	54	30,0 (1,6)	19	46,5 (1,7)

Für die GGT, LDH- sowie AP-Aktivitäten konnten statisch signifikante Korrelationen beim Vergleich der Gruppe Hengste mit normaler Ejakulatqualität mit der Gruppe geringgradig abweichender Ejakulate (GGT: $p = 0,018$, LDH: $p = 0,024$, AP: $p = 0,028$) sowie zwischen normalen und hochgradig abweichenden Ejakulaten (GGT: $p = 0,0035$, LDH: $p = 0,019$, AP: $p = 0,048$) verifiziert werden.

Die statistische Auswertung mittels explorativer Gruppenvergleiche ergab weder für die AST noch für die GLDH oder die CK statistische Signifikanzen.

Ergebnisse

Tabelle 21: Mittelwerte sowie Streufaktor der untersuchten Enzyme in I.U./l bezogen auf die Ejakulatqualität

Parameter	der Norm entsprechende Ejakulate [n/ $\bar{x}_g$ (SF)]		Ejakulate mit gering-gradigen Abweichungen [n/ $\bar{x}_g$ (SF)]		Ejakulate mit hoch-gradigen Abweichungen [n/ $\bar{x}_g$ (SF)]	
	Gruppe A		Gruppe B		Gruppe C	
AST	59	88,9 (1,8)	53	81,1 (2,1)	19	76,3 (2,5)
GLDH	59	11,5 (2,0)	53	11,1 (2,8)	19	13,4 (3,4)
GGT	59	9014,5 (1,7)	53	7130,2 (1,8)	19	4568,6 (3,8)
CK	59	372,2 (2,1)	53	337,8 (2,8)	19	260,2 (3,7)
LDH	59	120,3 (3,5)	53	64,9 (4,4)	18	61,6 (3,5)
SP	59	23,1 (1,7)	52	21,0 (2,1)	17	16,6 (1,7)
AP	59	31913,2 (1,6)	53	25054,2 (1,8)	19	14367,1 (5,1)

Tabelle 22: Mittelwerte sowie Streufaktor der untersuchten Mengen- und Spurenelemente im Seminalplasma in mmol/l (*) beziehungsweise µg/dl (+) bezogen auf die Ejakulatqualität

Parameter	der Norm entsprechende Ejakulate [n/ $\bar{x}_g$ (SF)]		Ejakulate mit gering-gradigen Abweichungen [n/ $\bar{x}_g$ (SF)]		Ejakulate mit hoch-gradigen Abweichungen [n/ $\bar{x}_g$ (SF)]	
	Gruppe A		Gruppe B		Gruppe C	
Natrium*	59	112,2 (1,4)	53	107,2 (1,2)	19	108,0 (1,2)
Kalium*	59	21,6 (2,2)	53	22,0 (1,3)	19	18,6 (1,8)
Magnesium*	59	2,6 (1,6)	53	2,4 (1,9)	19	3,0 (1,6)
Kalzium, gesamt*	58	1,9 (1,8)	51	2,2 (2,0)	18	2,4 (2,0)
Kalzium,ionisiert*	59	1,4 (1,7)	53	1,6 (1,9)	19	1,8 (2,0)
Phosphat*	59	1,4 (1,6)	53	1,2 (1,7)	19	1,5 (1,9)
Chlorid*	59	113,1 (1,1)	53	115,0 (1,1)	18	115,8 (1,1)
Kupfer+	59	122,1 (1,8)	52	99,7 (2,1)	18	86,3 (1,7)
Eisen+	55	17,3 (3,3)	50	8,4 (3,0)	16	10,8 (2,0)
Zink+	59	85,4 (1,5)	53	79,6 (1,7)	18	74,5 (1,4)

Für die Kupferkonzentration konnte eine statistisch signifikante Korrelation ($p = 0,045$) beim Vergleich des Probandenkollektivs an Hengsten mit normalem Spermiogramm mit den Vatertieren, die ein hochgradig abweichendes Spermiogramm aufwiesen, ermittelt werden. Der Eisengehalt des Seminalplasmas war statistisch signifikant verschieden bei Tieren mit normalem Ejakulat gegenüber solchen mit geringgradig abweichenden Samenproben ($p = 0,023$).

Eine statistische Signifikanz mittels der genannten Methode konnte für keines der untersuchten Makroelemente und ebenfalls nicht für Zink belegt werden.

4.12 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse in Abhängigkeit der Fertilität der Probanden

Einige der untersuchten Parameter besaßen deutliche Unterschiede bei den Probanden verschiedener Fertilitätsklassen. Waren diese Differenzen zwar teilweise deutlich, so ließen sich zur Fruchtbarkeit auf elektronenmikroskopischer Ebene ausschließlich die Beziehung zum prozentualen Anteil abgehobener Akrosomen sowie auf Ebene der Seminalplasmaanalysen an zwei Zeitpunkten die Korrelation zum Zinkgehalt statistisch signifikant verifizieren. Da aber aus klinischer Sicht auch bereits Tendenzen beachtenswert erscheinen, sollen die Ergebnisse der wichtigsten Parameter für fertile, sub- und infertile Hengste in den Tabellen 23 und 24 einander gegenübergestellt werden.

Ergebnisse

Tabelle 23: Vergleichende Darstellung des geometrischen Mittels mit Streufaktor [$\bar{x}_g$ (SF)] ausgewählter elektronenmikroskopischer Parameter in Bezug auf die Fertilität der Probanden sowie die statistische Korrelation (p) des Parameters zur Fertilität. (n.s. = nicht signifikant)

Parameter	Fertilität < 10%	Fertilität < 70 %	Fertilität $\geq$ 70 %	p
Gesamtanteil an Akrosomenveränderungen (%)	97,2 (1,0)	95,8 (1,1)	91,5 (1,1)	0,078
Anteil abgehobener Akrosomen (%)	11,4 (4,4)	7,9 (1,9)	4,9 (3,2)	0,034
Anteil teilweise abgelöster Akrosomen (%)	8,1 (4,1)	2,3 (1,9)	2,0 (2,2)	n.s.
Gesamtanteil an Kopfaberrationen (%)	98,6 (1,0)	88,2 (1,1)	73,1 (1,4)	n.s.
Anteil an modifizierten Spermienköpfen (%)	82,2 (1,3)	67,3 (1,6)	57,0 (1,7)	n.s.
Anteil an Kopfvakuolen (%)	26,1 (1,6)	24,6 (2,2)	22,7 (1,6)	0,1
Anteil an Köpfen mit zusätzlicher Geißel, gegebenenfalls mit Abweichungen vom Tubulismuster (%)	8,9 (2,9)	13,3 (2,0)	16,1 (2,1)	0,1
Anteil an unveränderten Geißelquerschnitten, quer (%)	84,2 (1,1)	93,9 (1,0)	94,2 (1,0)	n.s.
Abweichungen vom Tubulismuster (%)	9,6 (2,1)	2,5 (2,4)	2,5 (2,4)	n.s.
Anteil an unveränderten Geißellängsschnitten (%)	72,2 (1,1)	84,6 (1,1)	86,3 (1,1)	n.s.
Anteil an Mehrfachgeißeln (längs, %)	9,6 (1,1)	3,6 (2,1)	2,9 (1,6)	n.s.
Anteil an geknickten Geißeln (%)	7,9 (1,4)	5,8 (1,8)	4,9 (2,0)	n.s.

Ergebnisse

Tabelle 24: Vergleichende Darstellung des geometrischen Mittels mit Streufaktor [$\bar{x}_g$ (SF)] ausgewählter biochemischer Seminalplasmaparameter in Bezug auf die Fertilität der Probanden sowie die statistische Korrelation (p) des Parameters zur Fertilität. (n.s. = nicht signifikant)

	Fertilität			
Parameter	< 10%	<70 %	≥ 70 %	p
GGT-Aktivität (I.U./l)	10553 (1,3)	9543 (1,6)	7983 (1,5)	n.s.
AP-Aktivität (I.U./l)	52600 (1,0)	30646 (1,5)	26258 (2,5)	n.s.
SP-Aktivität (I.U./l)	49,5 (1,0)	20,0 (1,9)	19,7 (1,6)	0,07
Ca _{ges} -Gehalt (mmol/l)	1,1 (2,1)	2,1 (2,0)	2,2 (1,9)	n.s.
Ca _{ion} -Gehalt (mmol/l)	0,8 (1,9)	1,4 (1,8)	1,5 (1,7)	n.s.
Chloridgehalt (mmol/l)	102,3 (1,1)	110,0 (1,1)	113,5 (1,1)	n.s.
Kupfergehalt (µg/dl)	76,9 (2,5) $\tilde{x} = 94,0$	132,1 (1,9) $\tilde{x} = 99$	114,2 (1,6) $\tilde{x} = 110$	n.s.
Eisengehalt (µg/dl)	38,9 (1,6)	12,6 (3,9)	12,0 (2,4)	n.s.
Zinkgehalt (µg/dl)	138,0 (1,0)	93,1 (1,3)	86,5 (1,5)	0,08

5. DISKUSSION

Einer ausbleibenden Reproduktionsleistung beim Hengst liegen häufig, neben Managementfehlern, Dysspermien zu Grunde. Aufgrund subtiler Ursachen bleibt ein Teil der Fertilitätsstörungen mit den etablierten Verfahren ungeklärt. Über die Aussagekraft der konventionellen Ejakulatanalyse bezüglich der Fruchtbarkeit liegen in der Literatur zahlreiche Arbeiten vor. Während schlechte Spermaqualität generell als aussagekräftiger Indikator für Subfertilität angesehen wird, stellt demgegenüber eine gute Ejakulatqualität bezüglich Dichte, Motilität sowie Pathomorphologie keine Garantie für akzeptable Befruchtungsergebnisse dar (COLENBRANDER et al., 2003). Die Bedeutung der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) sowie biochemischer Analysen des Seminalplasmas fand beim Hengst im Kontext mit der *Potentia generandi* in der Literatur bisher kaum Beachtung.

Ziel dieser Studie war es deshalb, anhand von Probanden mit gesicherter Fertilität ($n = 46$) einen Standard für beide Methoden zu eruieren. Einerseits sollten durch die TEM zusätzlich neue Informationen für die detailliertere morphologische Beurteilung, sowohl entlang der Vertikalebene als auch der Horizontalebene, gewonnen und diese zur Zeugungsfähigkeit in Bezug gesetzt werden. Andererseits war zu evaluieren, ob und welche Enzymaktivitäts- respektive Konzentrationsänderungen bestimmter Elemente in Korrelation zu Abweichungen im Spermogramm stehen und so die Reproduktionsleistung beeinflussen.

Aufgrund differenzierter Betrachtung der einzelnen Spermensektionen (Akrosom, Kopf, proximaler und distaler Geißelquerschnitt sowie Geißellängsschnitt) an einer großen Einzelzahl ($n = 900$) von Beobachtungen pro Proband (pro Sektion $n = 200$, außer Geißellängsschnitt: $n = 100$) sowie der Anzahl an Hengsten ($n = 46$) im Vergleich

zu bisherigen Studien in der Literatur wird eine genaue Aussage über physiologische und pathologische Strukturen ebenso wie über deren Häufigkeit ermöglicht.

5.1 Elektronenmikroskopie

Der TEM wird bei diversen Spezies eine weitreichende diagnostische Eignung bezüglich der Erfassung genitaler Erkrankungen sowie von Sub- und Infertilität zugeschrieben (COLENBRANDER et al., 1992; VEERAMACHANENI und SAWYER, 1996; CARBONE et al., 1998). So kann anhand der eigenen Ergebnisse ausgesagt werden, dass sie sich auch beim Hengstejakulat als wichtiger Prüfparameter herausgestellt hat. Die besondere Eignung der TEM beruht auf höherer Auflösung in der Detektion von Akrosomendefekten. Im Gegensatz dazu werden lose Köpfe und geknickte, schleifenförmige beziehungsweise aufgerollte Schwänze, die in der Lichtmikroskopie (LM) ungefähr ein Drittel aller pathomorphologisch veränderten Spermien ausmachen, selten in der Elektronenmikroskopie entdeckt. Als Ursache für diese Diskrepanzen zwischen TEM und Lichtmikroskopie (LM) sehen KOEHLER und Koautoren (1998) die Tatsache, dass Dünnschnitte nur eine geringe Anzahl an Spermatozoen umfassen „which does not allow easy determination of gross cell morphology, such as the connection between head and tail“. Selbst durch die Zentrifugation der Spermien zu einem Pellet, um gezielt Lokalisationen mit hoher Spermiedichte zur Evaluierung auszuwählen, ist diese Problematik nicht zu lösen. Weiterhin wurde eine hohe Anzahl an Beobachtungen berücksichtigt. Problematisch ist aber dennoch, dass es sich um unterschiedliche Schnittebenen handelt, so dass andere Anomalien ausserhalb der Ebene keine Beachtung finden können.

Insgesamt existierte im eigenen Untersuchungsgut ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem in der TEM sowie in der LM nachweisbaren prozentualen Anteil pathomorphologisch veränderter Spermatozoen ($p = 0,021$), wie es auch aus dem humanen Bereich berichtet wird ($p < 0,0001$; CARBONE et al., 1998). Weiterhin konnte in dieser Studie eine signifikante Beziehung zwischen dem lichtmikroskopisch als lebend ermittelten Anteil an Samenzellen sowie dem elektronenmikroskopisch diagnostizierten Anteil pathomorphologisch veränderter herausgestellt werden ($p = 0,033$). Der Prozentsatz an morphologischen Veränderungen war generell, aber insbesondere am Akrosom, sehr hoch, was den Schluss auf Fixierungsartefakte zulässt. Auch in der Literatur differiert bei verschiedenen Spezies der Gesamtanteil an prozentual morphologisch modifizierten Spermatozoen in Abhängigkeit der angewandten Technik teilweise sehr stark (KROGENAES et al., 1994; KOEHLER et al., 1998), eine Tatsache, die andersartigen Fixier- und Kontrastiermethoden des Materials zugeschrieben wird. Aufgrund der konsequent gleichgerichteten Aufarbeitung der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Ejakulate ist die Problematik der Fixierungsartefakte für die Auswertung primär als nicht gravierend anzusehen, da alle Samenproben auf dieselbe Art und Weise behandelt wurden. Dass die Ergebnisse dennoch differieren, deutet auf eine unterschiedliche Ausgangssituation bezüglich Widerstandsfähigkeit, Resistenz, und Vorschädigung der Spermatozoen hin.

5.1.1 Akrosomenveränderungen

Über morphologische Details des equinen Akrosoms gibt es nur wenige allgemeine Informationen, während beim humanen Spermatozoon dagegen der Kopf sowie das Akrosom einer detaillierten morphologischen Untersuchung unterzogen wurden. Schäden in diesem Bereich gelten als einer der wichtigsten Fertilitätsparameter bei sub-

und infertilen Spezies (DE MARTINO et al., 1989, COLENBRANDER et al., 1992). Nur Spermien mit intakter Membran können Kapazitation und Akrosomenreaktion vollziehen (YANAGIMACHI, 1981).

Ein „normales“ Pferdespermium weist bei elektronenmikroskopischer Untersuchung nach HURTGEN und JOHNSON (1982) ein Akrosom auf, welches dem Kern anliegt; die darüber liegende Plasmamembran stellt sich gewellt dar, steht aber zumindest in Kontakt mit dem Akrosom. Wenn das Akrosom nicht direkt dem Kern anliegt und der subakrosomale Raum sich dadurch vergrößert, ist dies bereits als pathologisch zu interpretieren (HURTGEN und JOHNSON, 1982). Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten Spermatozoen dargestellt werden, deren Plasmamembranen der akrosomalen Membran vollständig oder zumindest weitestgehend anlagen. Dies entspricht einem vollständig intakten, unveränderten Spermium. Es wurden aber auch die von den genannten Autoren beschriebenen Formen - „normale“ Akrosomen (als „Plasmamembran gewellt“ bezeichnet), aber auch zu einem hohen Prozentsatz Spermien mit vergrößertem subakrosomalem Raum (als „Akrosom abgehoben“ bezeichnet) nachgewiesen. Bei den gewellten Akrosomen war die Tendenz erkennbar, dass fertile Hengste über deutlich mehr solcher Akrosomen verfügten als infertile (62,6 % versus 19,4 %). Dies stützt die Vermutung, dass es sich hierbei um eine „physiologische“, gegebenenfalls ausschließlich fixierungsbedingte Beobachtung handelt, der bezüglich Fertilitätseinschränkungen keine Bedeutung beizumessen ist. Im Rahmen dieser Studie ließ sich allerdings kein statistischer Zusammenhang belegen.

Der prozentuale Anteil abgehobener Akrosomen konnte dagegen in der eigenen Arbeit als geeigneter Indikator für die Fertilität herausgestellt werden. Dass diese Veränderung bei infertilen Probanden mit 11,4 % (4,4) [$\bar{x}_g$ (SF)] häufiger auftritt als bei subfertilen [7,9 % (1,9)] sowie fertilen [4,9 % (3,2)] erscheint plausibel, da das Akrosom im Fall einer solchen Aberration nicht funktionstüchtig sein kann. Im Rahmen dieser

Untersuchungen stellte sich die Evaluierung des Anteils abgehobener Akrosomen als scheinbar geeignet zur Einstufung der Hengste bezüglich ihrer Konzeptionsraten dar. Die Eignung zur Klassifizierung von Probanden mit unbekannter Fruchtbarkeit muss in einer weiterführenden Studie untersucht werden. Generell ist aber davon auszugehen, dass die TEM-Beurteilung des Akrosoms auch hier geeignet sein und wichtige Hinweise auf eventuell vorliegende Fertilitätseinschränkungen geben kann. Demnach sollte die elektronenmikroskopische Akrosomenbeurteilung in Fällen unklarer Infertilität, aber auch versuchsweise bei Hengsten unklarer Fertilität Anwendung finden.

Des Weiteren waren Spermienköpfe vorhanden, bei denen die Plasmamembran defekt und teilweise oder vollständig abgelöst war, während die akrosomale Membran intakt war. Dies wurde bisher nur bei nativen Samenzellen vom Fuchs sowie bei Bullensperma nach Kryokonservierung entdeckt (HOFMO und ANDERSEN BERG, 1989; KROGENAES et al., 1994). Außerdem gab es Spermatozoen, bei denen sowohl Plasmamembran als auch Akrosom teilweise oder vollständig abgelöst waren. Eine Beschreibung hiervon lag bis dato für den Hengst nur aus rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen (GRONDAHL et al., 1994) sowie für Rüdenspermien nach Tieffrier- und Auftauprozess (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1993) vor. Es erscheint hierbei auffällig, dass der Nachweis dieser Veränderungen bisher insbesondere an kryokonservierten Spermatozoen gelang, so dass in Erwägung gezogen werden muss, ob es sich um ein konservierungsbedingtes Artefakt handelt. Allgemein bekannt ist nämlich, dass es beim Tiefgefrierprozess von Spermien zu Akrosomendefekten kommt (FRIEND und RUDOLF, 1974; GRONDAHL et al., 1994; KROGENAES et al., 1994). Bei den eigenen Proben könnte diese Veränderung, falls es sich um ein Artefakt handelt, durch die Probenaufarbeitung bedingt sein. Einerseits könnten das Fixans, also die enthaltenen Chemikalien (Glutaraldehyd, Pikrinsäure) oder dessen Konzentration, an sich, andererseits die

Zeitdauer der Fixierung verantwortlich sein. Als mögliche Bestätigung für diese Hypothese könnte der hohe Gesamtanteil an Akrosomenveränderungen gewertet werden. Andererseits ist davon auszugehen, dass auch bei nativen Spermatozoen Akrosomenverluste auftreten, wobei es sich gemäß der Literatur in 29- 81 % der Fälle um tote Spermien handelt (CASEY et al., 1993). In dieser Studie ließ sich kein Zusammenhang toter Zellen und solcher mit Akrosomverlust nachweisen.

Des Weiteren konnte in dieser Studie auch vereinzelt eine Anschwellung des equinen Akrosoms dargestellt werden, welche bislang nur von der Arbeitsgruppe um RODRIGUEZ-MARTINEZ (1993) an Rüdenspermatozoen beschrieben worden ist. Bei einigen Akrosomen der untersuchten Ejakulate ließen sich auch Vakuolen im Akrosom selber darstellen, was auch HURTGEN und JOHNSON (1982) beim Hengst sowie KOEHLER et al. (1998) beim Rotwolf beobachten konnten.

Weiterhin gelangten sowohl am Akrosom als auch am Mittelstück bei einzelnen Hengsten durchscheinende, membrangebundene Vesikel zur Beobachtung, wie sie auch von ABRAHAM-PESKIR et al. (2000) in der Literatur erwähnt werden. Diese unterschieden sich von Cytoplasmatropfen durch ihre durchscheinende, transparente Struktur. Differentialdiagnostisch ist hierzu der „knobbed sperm defect“ zu sehen, welcher im eigenen Probenmaterial nur mit sehr geringer Inzidenz auftrat. Dabei handelt es sich um eine Faltung beziehungsweise kugelhähnliche Protrusion am apikalen Rand des Akrosoms (OTT et al., 1982), bei der manchmal der Inhalt des Cytoplasmatropfens in der Plasma- oder Akrosomenmembran sichtbar ist. Gehäuftes Auftreten wird beim Hengst mit Subfertilität (HURTGEN und JOHNSON, 1982) und bei anderen Spezies, wie Bullen und Ebern, mit vollständiger Sterilität assoziiert (HANCOCK und TREVAN, 1957; BANE, 1961; BLOM und BIRCH-ANDERSEN, 1962).

In diesem Zusammenhang erscheint es verwunderlich, dass mit Ausnahme der abgehobenen Akrosomen keine Beziehung solch scheinbar gravierender Akrosomenveränderungen zur Fertilität verifiziert werden konnte, wo doch davon auszugehen ist, dass die Funktionalität solcher Akrosomen vollständig oder zumindest teilweise verloren geht. Dass aber dennoch ein gewisser Einfluß auf die Konzeptionsrate vorhanden ist, darauf deutet die Beziehung des Gesamtanteils an Akrosomenaberrationen zur Fertilität hin, die zwar nicht signifikant ist, aber dennoch beachtenswert erscheint ($p = 0,077$; $r = - 0,26$). Spermien, bei denen aufgrund von Formveränderungen, Ablösung, Vakuolen oder ähnlichem keine normale Akrosomenreaktion ablaufen kann, wären demnach nicht befruchtungsfähig. Dass dennoch keine Beziehung zur Fertilität existierte, könnte möglicherweise in der insgesamt geringen Inzidenz dieser erwähnten Defekte liegen. Aus diesem Grund kann in dieser Studie bezüglich der Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit somit keine generelle Aussage getroffen werden. Bezüglich der seltener auftretenden Akrosomenaberrationen ist festzustellen, dass ihre Auswirkungen auf die Fertilität nicht abschließend zu beurteilen sind. Eine weiterführende Studie mit einem größeren Anteil an sub- und infertilen Hengsten könnte dazu zusätzliche Hinweise geben. Derzeit besitzen diese Veränderungen noch keine Eignung zur erweiterten Fertilitätsdiagnostik beim Hengst.

Vereinzelt ließen sich Spermien mit bereits begonnener Akrosomenreaktion nachweisen, obwohl die Kapazitation normalerweise erst durch engen Kontakt zwischen Spermienkopf und Cilien des Oviduktepithels induziert wird (HYTTEL et al., 1991; POLLARD et al., 1991). Bei diesen spontanen Akrosomenreaktionen kommt es durch Fusion der äußeren Akrosomenmembran und der darüber liegenden Plasmamembran zu Bildung von Vesikeln aus beiden Membranen, was multiple Fenestrations des akrosomalen Kompartiments bedingt (MEIZEL, 1985; VARNER et al., 1987; BLUE et

al., 1989; KROGENAES et al., 1994). Im Gegensatz dazu sind die von RODRIGUEZ-MARTINEZ und Koautoren (1993) am kryokonservierten Rüdenejakulat erwähnten „false acrosome reactions“ zu sehen. Charakteristisch für letztere sind Beschädigungen der Akrosomen, auch in der Äquatorialregion, Vesikulation der Akrosommembranen und häufig eine intakte Plasmalemma. Außerdem unterscheiden sich „falsche“ Akrosomenreaktionen von „richtigen“, insbesondere durch zusätzliches Auftreten von Zelltod und/oder irreversiblen Zellschäden (BEDFORD, 1970; MEIZEL, 1978). Bei den Spermatozoen, die im Rahmen der eigenen Untersuchungen als akrosomenreagiert beschrieben wurden, war die Plasmalemma stets an der Bildung der Vesikel beteiligt, so dass davon auszugehen ist, dass es sich um echte, spontane Akrosomenreaktionen handelt. In diesen Ejakulaten lagen jedoch nicht vermehrt tote oder defekte Spermien vor, was ebenfalls auf das Ablaufen spontaner Akrosomenreaktionen hindeutet.

Charakteristisch für Ejakulate mit vermehrt spontanen Akrosomenreaktionen waren in dieser Studie hohe, deutlich über dem Median liegende Konzentrationen an ionisiertem Kalzium. So wies zum Beispiel das Seminalplasma vom Hengst H 51 einen Gehalt an ionisiertem Kalzium von 5,23 mmol/l auf, während der Median bei 2,0 mmol/l lag. Dies könnte so interpretiert werden, dass in Ejakulaten mit hohen Konzentrationen an ionisiertem Kalzium eher spontane Akrosomenreaktionen ablaufen als in Ejakulaten mit niedrigen Konzentrationen. Das erscheint insofern plausibel, da in vitro Akrosomenreaktionen durch Zusatz von Kalziumionophoren (VARNER et al., 1987), aber auch bei Spermatozoen in kalziumfreiem Medium durch Zusatz von Kalziumionen induziert werden können (YANAGIMACHI und USUI, 1974). Wenn auch die Arbeitsgruppe um VARNER (2000) bei einer Untersuchung subfertiler und fertiler Hengste keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen bezüglich der Häufigkeit des Auftretens spontaner Akrosomenreaktionen nachweisen konnte, so wäre es dennoch denkbar, dass in der erhöhten Bereitschaft der Spermatozoen des Hengstes H 51 zu

spontanen Akrosomenreaktionen ein Grund liegt, warum sich das Ejakulat nach Verdünnung nicht zum Versand eignete. Gegebenenfalls ist ein Großteil der Spermien bereits innerhalb des Verdünnungsmediums akrosomenreagiert und deshalb nach der Samenübertragung in der Stute nicht mehr in der Lage, das Ovum zu befruchten. Es wäre also hypothetisch durch Zugabe von Kalziumfängern zum Ejakulat eine erhöhte Haltbarkeit des Samens zu erreichen gewesen, eine Methode, deren Anwendung beispielhaft Erprobung finden könnte. Eine elektronenmikroskopische Kontrolle auf die Reduktion des Ablaufens spontaner Akrosomenreaktionen sollte ebenso erfolgen wie die Überprüfung, ob es sich eventuell um einen einmaligen Befund bei dem betroffenen Hengst handelt.

5.1.2 Kopfveränderungen

An den Spermienköpfen wurden Kondensation des Chromatins, Form des Kopfes, das Vorhandensein von Vakuolen sowie anderen abweichenden Strukturen beurteilt. Das Chromatin von Hengstspermien stellte sich im elektronenmikroskopischen Schnitt als sehr dicht und homogen dar. Diese Befunde wurden auch von LIVOLANT (1984) erhoben. Neben den normalen Kondensationsbefunden waren unvollständig kondensierte sowie vakuolisierte Köpfe existent. Dies wurde für Rotwolf-Spermatozoen von der Arbeitsgruppe um KOEHLER (1998) beschrieben. Beim Menschen wird die unvollständige Kondensation mit geringer Chromatinstabilität und infolgedessen mit Teratozoospermie des Spermatozoonkopfes assoziiert (TEJADA et al., 1984; CLAASSENS et al., 1992). Im Rahmen des vorliegenden equinen Probandengutes fiel zwar auf, dass bei infertilen Vatertieren Kondensationsstörungen deutlich häufiger auftraten als bei subfertilen und fertilen $\bar{x}_g$ (SF) = 27,0 % (1,5) versus 15,9 % (2,6)

versus 16,5 % (1,8)], es war aber kein Zusammenhang zwischen Kondensationsstörungen und Kopfveränderungen respektive Befruchtungserfolg zu eruieren.

Ebenso wie bei der lichtmikroskopischen Untersuchung waren im elektronenmikroskopischen Schnitt Doppelköpfe nachweisbar. Die Häufigkeit des Auftretens war ähnlich. Statistisch ließ sich zwischen elektronenmikroskopisch ermittelten Mehrfachköpfen und den in der Lichtmikroskopie nachgewiesenen Doppelköpfen ($p = 0,023$, $r = 0,34$) sowie den Kopfveränderungen ($p = 0,046$, $r = 0,3$) eine signifikante Korrelation nachweisen. Diese Beziehung erscheint nachvollziehbar. Obwohl auch hier im Probenmaterial die von KOEHLER und Koautoren (1998) erwähnten Diskrepanzen zwischen TEM und Lichtmikroskopie existieren, ist in Bezug auf den Nachweis von Doppelköpfen eine Übereinstimmung gegeben.

Die bei der Arbeitsgruppe um KOEHLER (1998) erwähnten Diskrepanzen beziehen sich insbesondere auf Geißelveränderungen. Hier sind gerade die Veränderungen zu nennen, die bei Evaluierung der gesamten Struktur des Spermatozoons auffallen, wie geknickte, schleifenförmige oder aufgerollte Geißeln. Mit einer Häufigkeit von 15,0 % (2,1) [$\bar{x}_g$ (SF), maximal 50 %] waren von einer gemeinsamen Membran umhüllte Strukturen mit Nukleus und verschiedener Anzahl an Geißellängs- und -querschnitten nachweisbar. Obwohl elektronenmikroskopische Darstellungen hiervon bereits vereinzelt publiziert sind, gibt es bislang keine Erklärung, worum es sich hierbei handelt. Die Arbeitsgruppe um KOEHLER (1998) beschrieb „bizarre forms showing a multitude of nuclear and cytoplasmic deformities“ bei Rotwolspermatozoen. Die Autoren vermuten, dass es sich bei diesen weniger häufig auftretenden Strukturen wahrscheinlich um fehlerhafte Entwicklungsformen (primäre Anomalien) handelt. Auffällig ist bei den eigenen Untersuchungen, dass diese Strukturen in den Ejakulaten fertiler Probanden häufiger [16,1 % (2,1), $\bar{x}_g$ (SF)] vorkamen als bei sub- [13,3 % (2,0)] und infertilen [8,9 % (2,9)]. Dieser Trend ließ sich allerdings nicht statistisch

verifizieren ($p = 0,1$), so dass nur spekuliert werden kann, ob es sich um eine zufällige Verteilung handelt, wofür die grossen Schwankungen innerhalb der einzelnen Gruppen sprechen würden.

BACETTI und Koautoren (1996) sehen Spermienköpfe mit geschwollenen Akrosomen, geschwollenen, kompakt im Mittelstück gruppierten Mitochondrien und aufgerolltem Axonem im Cytoplasmatropfen als apoptotische Spermien an. Das Phänomen von Apoptose im Ejakulat wurde bisher beim Hengst nicht beschrieben. Es liegt ausschließlich eine aktuelle Publikation bezüglich Apoptose im Hengsthoden vor (HENINGER et al., 2004). Die von BACETTI und Koautoren (1996) beschriebenen Veränderungen wurden im Probenmaterial sowohl einzeln (als „disorganisierte“ Mitochondrien bezeichnet, Mehrfachgeißel, zum Beispiel 3 + 3 Schwanzquerschnitte) als auch gemeinsam beobachtet. Denkbar wäre, dass es sich bei der zuvor beschriebenen Sonderform (Kopf mit Mitochondrien und mehreren Geißelquerschnitten) ebenfalls um Apoptose handeln könnte. Dies erscheint aufgrund der relativen Häufigkeit jedoch eher als unwahrscheinlich. Falls diese Strukturen wirklich als pathologisch anzusehen sind, müsste aufgrund der Häufigkeit des Nachweises theoretisch eine Beziehung zur Fertilität verifizierbar sein, welche jedoch nicht ermittelt werden konnte. Die Frage, ob die gefundenen Strukturen als physiologisch oder pathologisch anzusehen sind, kann mit den hier durchgeführten Methoden somit nicht endgültig beantwortet werden. Sie bedarf demnach der genaueren Abklärung, zum Beispiel durch die TUNEL-Methode zum Nachweis von apoptotischen Prozessen.

5.1.3 Geißelveränderungen

Die Geißel des equinen Spermiums differiert nicht wesentlich von der Struktur der Geißel bei anderen Spezies, wie zum Beispiel beim Menschen (AFZELIUS et al., 1995).

Im Bereich des Mittelstückes fielen im Querschnitt neben der physiologischen Struktur auch zahlreiche Veränderungen, wie deformierte Gestalt, unvollständige Anlage der Axialfilamente, Vakuolisierung der Geißel und abnorme Anordnung der mitochondrialen Spirale auf. Weiterhin wurden allgemein auftretende Veränderungen, wie Anomalien der äußeren Cytoplasmamembran und Invagination sowie Vakuolisierung nachgewiesen. Abweichungen dieser Art finden sich bislang in der Literatur ausschließlich vom bovinen Spermium (ROB et al., 1979). Des Weiteren waren Malformation der Mitochondrienscheide, das Fehlen einzelner Mitochondrien sowie unregelmäßige Axialfaserbündel zu beobachten, die in der Literatur mit einer lichtmikroskopisch erkennbaren Verdrehung beziehungsweise einem Bruch der Geißel beim Bullen, dem sogenannten „Dag defect“, assoziiert werden (BARTH und OKO, 1989; ANDERSEN BERG et al., 1996). Eine Bedeutung für die Fertilität konnte nicht statistisch verifiziert werden, was wiederum mit der geringen Häufigkeit des Auftretens in Verbindung stehen könnte. Für solche Anomalien ließ sich keine besondere Eignung zur erweiterten Fertilitätsdiagnostik bei den untersuchten Probanden ermitteln.

HELLANDER und Mitarbeiter (1991) beschrieben fehlende und disarrangierte Mantelfasern sowie das Nichtvorhandensein einzelner oder mehrerer Mikrotubuli im Axonem des Hengstspermatozoons. In der eigenen Studie wurden in der Gruppe der fertilen und subfertilen Probanden drastisch weniger Geißeln mit abnormem Tubulmuster nachgewiesen als bei den infertilen [fertil/subfertil: 2,5 % (2,4) versus infertil 9,6 % (2,1)]. Sowohl im proximalen als auch im distalen Geißelbereich waren alle möglichen Abweichungen vom Tubulmuster existent. Besonders häufig waren

die Mikrotubuli in den Positionen 4 bis 9 beziehungsweise das zentrale Tubuluspaar betroffen, wie es auch die genannten Autoren beschrieben. Einige Geißeln besaßen im distalen Teil nur 3 bis 4 Mikrotubuli. Vereinzelt waren auch hier einzelne Mikrotubuli ohne Faserscheide vorhanden. Insgesamt wird die Bedeutung der Geißelveränderungen hinsichtlich Sub- und Infertilität beim Hengst kontrovers diskutiert: Einerseits weist die Arbeitsgruppe um HELLANDER (1991) in Anlehnung an den Menschen (CARBONE et al., 1998) auf die bedeutende Rolle von Geißeldefekten hin, andererseits beschreiben die Autoren einen Fall mit 90 % abnormen Mittelstücken und Geißeln, wobei insbesondere Abweichungen vom Tubulmuster und fehlende beziehungsweise disarrangierte Mantelfasern auftraten, sowie 7 % Vorwärtsbeweglichkeit und einer daraus resultierenden Fruchtbarkeitsrate von 44 %. Trotz der kontroversen Rolle sowie den vorhandenen Schwankungen der Veränderungen in dieser Studie verdient der Trend Beachtung und bedarf weiterer Abklärung. Es besteht die Möglichkeit, dass zumindest ein Teil fertilitätsauffälliger Hengste damit detektiert werden können. Allerdings erscheint es als nicht wahrscheinlich, dass diese Veränderungen die kausale Ursache für eine vollständige Impotentia generandi darstellen, sofern nicht lichtmikroskopisch nur immotile Spermatozoen nachweisbar sind.

Defekte der periaxonemalen Strukturen, Mitochondrien und Mantelfasern wurden relativ häufig, disorganisierte Mitochondrien selten (auch HELLMAN et al., 1980), abnorme Positionen der Mantelfasern und abnorme Grösse der Mantelfasern nur in Ausnahmefällen im eigenen Probenmaterial nachgewiesen. Die beschriebenen Defekte und Anomalien der periaxonemalen Strukturen werden beim Menschen als eine Ursache für reduzierte Motilität diskutiert (ELIASSON et al., 1977; COURTADE et al., 1998; CARBONE et al., 1998), was sich für den Hengst im Rahmen dieser Untersuchungen nicht bestätigen ließ. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, dass die genannten

Autoren ausschließlich infertile humane Probanden mit Hypo- beziehungsweise Asthenozoospermie auswählten.

Im Längsschnitt der Hengstpermatozoen konnten zusätzliche Beobachtungen zu den im Querschnitt erwähnten Veränderungen gemacht werden. So waren zum Beispiel "Coiled tails", wie von der Arbeitsgruppe um KOEHLER (1998) für den Rotwolf beschrieben, vertreten. Vereinzelt fielen beim Hengst im Rahmen dieser Untersuchungen schleifenförmige sowie geknickte Schwänze auf. Eine weitere Anomalie stellt Doppelgeißeln dar, bei denen im Längsschnitt nachweisbar war, ob sie von einer gemeinsamen oder von zwei verschiedenen Plasmamembranen umhüllt wurden. Diese Beobachtung steht in Anlehnung an die Erkenntnisse der Arbeitsgruppe um KOEHLER (1998) an Rotwolfejakulaten. Interessant ist die auffällige Diskrepanz zwischen den 3 Probandengruppen: So waren nämlich bei infertilen Tieren mehr als dreimal so viele Mehrfachgeißeln im Längsschnitt existent als bei subfertilen und fertilen [9,6 % (1,1) versus 3,6 % (2,1) versus 2,9 % (1,6)]. Dieser Trend fiel auch bereits bei den Geißelquerschnitten auf, wobei die Differenzen nicht so deutlich waren.

Des Weiteren gelang der Nachweis der von BIELANSKI und KACZMARSKI (1979, 1980) beschriebenen Mikrotubulären Massen (MM). Eine eindeutige Identifikation dieser Strukturen ist ausschließlich mit Hilfe der TEM möglich, da es sich um zufällig angeordnete, schmale, hochgradig verdrehte Mikrotubuli mit einem geringeren Durchmesser als die normalerweise vorhandenen handelt. Während die Erstbeschreiber die MM als physiologisch ansehen, wurde später die Vermutung geäußert, dass der Ursprung in der Manschette, einer mikrotubulären Organelle der Spermatogenese, liegt (COURTENS und LOIR, 1981; GOODROWE und HEATH, 1984; HEATH et al., 1985). Der Nachweis in maturen Spermien des Nebenhodens beziehungsweise des Ejakulates wird als Anomalie diskutiert (HEATH und OTT, 1982; PEDERSEN und HAMMEN, 1982; GOODROWE und HEATH, 1984; HEATH et al., 1985). Generell

wiesen die Hengste in dieser Studie nur gelegentlich, mit einer Häufigkeit von 0 bis circa 1 %, MM in Hals- und Mittelstückregion auf. Nur bei einem Hengst waren hier sowohl in der Hals- und Mittelstückregion als auch am Akrosom selber Mikrotubuli sichtbar. Dies geht konform zu Erkenntnissen von HEATH und Koautoren (1985), die bezüglich der Inzidenz von MM sagen: “Although MM is not in the spermatozoa of all stallions, it is present in different amounts in different stallions...” Dass der Nachweis von MM dennoch relativ häufig gelang, könnte eventuell an der Zusammensetzung des Probandengutes liegen. HEATH und Koautoren (1985) wiesen bei ihren Untersuchungen an Warmblütern ebenfalls MM regelmäßig nach, während DOTT (1975) bei Ejakulaten von Arabischen und Englischen Vollblütern sowie Welsh Ponies keine MM erwähnt. Ein Zusammenhang zur Fertilität konnte im Rahmen dieser Untersuchungen, ebenso wie bei der zuletzt zitierten Autorengruppe (HEATH et al., 1985), nicht belegt werden.

Anhand des eigenen Materials, bei dem deutliche Schwankungen des Gesamtanteils an Geißelveränderungen, unabhängig von der Fertilität, verifiziert werden konnten, besteht derzeit scheinbar keine Eignung zur Fertilitätsdiagnostik. Die Tendenzen, welche sich für den prozentualen Anteil an Abweichungen vom normalen Tubulismuster, den Anteil an Mehrfachgeißeln im Längs- und Querschnitt sowie andere Parameter andeuteten, erscheinen aber dennoch Beachtung zu verdienen und bedürfen weiterer Abklärung.

5.1.4 Sonstige Beobachtungen

In der Literatur liegt bisher keine Beschreibung equiner Spermatiden im Ejakulat mittels transelektronenmikroskopischer Untersuchung vor. Allerdings wurden Spermatiden in elektronenmikroskopisch untersuchten Hengsthoden beschrieben (JONES und

BERNDTSON, 1986; JOHNSON et al., 1991, a). Aufgrund der Ähnlichkeit der Strukturen zueinander sowie der Übereinstimmung mit den von HOLSTEIN (1975, 1983) beim Menschen klassifizierten Strukturen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den gefundenen Zellen um Spermatiden handelt. Ob den Zellen der Spermatogenese eine besondere Bedeutung zuzuschreiben ist, oder ob sie als Nebenfunde zu deuten sind, wie von HOLSTEIN (1975, 1983) sowie SMITH und Mitarbeitern (1998) postuliert, kann wegen des insgesamt geringen Nachweises nur spekuliert werden.

Bei den anderen, zusätzlich nachgewiesenen Zellen, welche sich durch einen unterschiedlichen Anteil elektronendichter, membranumhüllter Einschlüsse, vereinzelt Geißelquerschnitte sowie weiterhin helle, membranummantelte Einschlüsse und stark strukturiertes Cytoplasma auszeichneten, könnte es sich eventuell um Makrophagen handeln. Makrophagen wurden beim Hengst im Ejakulat im Gegensatz zu anderen Spezies wie Mensch (HOLSTEIN, 1975) und Rotwolf (KOEHLER et al., 1998) ebenfalls noch nicht elektronenmikroskopisch beschrieben. Nur LÓPEZ ALVAREZ und BUSTOS OBREGÓN (1995) berichteten bereits über Spermatophagie im Nebenhoden. Die erwähnten großen Makrophagen, als Spermatophagen bezeichnet, zeichnen sich durch dünne cytoplasmatische Prozesse aus, die engen Kontakt mit den Spermien ermöglichen, und enthalten eine große Anzahl an Spermien in unterschiedlichen Stadien der Sequestration. Durch Verlust oder Diskontinuität der Plasmamembran von Kopf und Geißel sowie Disruption der akrosomalen Membranen „the spermatozoa were undergoing a process of degeneration.“ Weiter kommt es zur Auflösung der Mitochondrienscheide, der dense fibers und des Axonems. Kopf und Mantelfasern scheinen entsprechend der Literatur und eigenen Beobachtungen besonders resistent gegenüber intrazellulärer Verdauung zu sein. Während KOEHLER und Mitarbeiter (1998) bei 11 von 31 Rotwolfejakulaten Spermatophagie nachweisen

konnten, was einem prozentualen Anteil von ca. 35 % entspricht, waren in den eigenen Untersuchungen deutlich weniger dieser fragwürdigen Zellen darstellbar. Bei den Zellen, die wie in Abb. 34 keine Geißelanschnitte enthalten, sondern ausschließlich elektronendichte Strukturen, die dem Nukleus ähneln, stellt sich die Frage, ob es sich nicht auch um abnorme, unreife Vorstufen der Spermien handeln könnte. Insbesondere bei den Zellen mit zwei elektronendichten Gebilden sind Strukturen vor der Zellteilung respektive das Vorhandensein zweier oder mehrerer Kerne in Erwägung zu ziehen. Alternativ könnten Geißelteile in anderen Schnittebenen darstellbar sein. Obwohl sich mit den hier verwendeten Methoden keine eindeutige Zuordnung treffen lässt, worum es sich letztendlich handelt, kann aber abschließend festgestellt werden, dass diese Strukturen in keinem Zusammenhang zur Fertilität der Probanden standen. Denn sie kamen sowohl in Ejakulaten fertiler als auch subfertiler Hengste vereinzelt vor. Dies steht in Übereinstimmung mit HOLSTEIN (1983) sowie der Arbeitsgruppe um SMITH (1998), die auch in „normalen“ humanen Ejakulaten aktive Phagozytose und Makrophagenaktivierung fanden.

Bei den in Abb. 27 ^ dargestellten membranumhüllten Vesikeln, welche in verschiedenen Ejakulaten elektronenmikroskopisch in unterschiedlicher Größe auffielen, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um sogenannte „Prostasome-like“ Partikel handelt. Die Partikel enthielten amorphes Material, wie von MINELLI und Mitarbeitern (1998), ARIENTI und Koautoren (1998) sowie der Arbeitsgruppe um EL-HAJJ GHAOUI (2004) beschrieben.

Zusammenfassend ist bemerken, dass den Akrosomenveränderungen eine besondere Bedeutung für die Fertilität beizumessen ist. Während für den Gesamtanteil an Akrosomenveränderungen der Nachweis einer statischen Signifikanz nicht erreicht wurde ($p = 0,077$, $r = - 0,26$), gelang die Hervorhebung des elektronenmikroskopisch

nachweisbaren Anteils abgehobener Akrosomen als geeigneter Indikator für die Fertilität ($p = 0,034$). Hierbei ließ sich erwartungsgemäß eine negative Korrelation ($r = -0,31$) zur Fruchtbarkeit der Probanden verifizieren. Zwar konnten auch bezüglich anderer untersuchter Parameter, wie dem Anteil der Tubulusveränderungen oder auch dem der Mehrfachgeißeln, Tendenzen in Bezug auf die Zeugungsfähigkeit eruiert werden, jedoch ließen sich diese nicht statistisch belegen.

5.2 Biochemische Analysen des Seminalplasmas

5.2.1 Enzyme

Es gilt seit langem als erwiesen, dass die Aspartat-Amino-Transferase (AST) einen geeigneten Marker für die Membranintegrität von Bullen-, Eber-, Menschen-, Puter- und Hühnerspermatozoen darstellt (ROUSSEL und STALLCUP, 1965; GRAHAM und PACE, 1967; PACE und GRAHAM, 1970; PURSEL et al., 1970; BROWN et al., 1971; SEXTON, 1974; WESTFALL und HOWARTH, 1978). Beim Hengst kommt das Enzym im Gegensatz zu anderen Tierarten, zum Beispiel Bulle oder Eber, auch im Nativsperma in höheren Konzentrationen außerhalb der Spermien vor, was in der vorgelegten Untersuchung erneut bestätigt werden kann. Die physiologische Lokalisation der AST wird im Mittelstück gesehen (BROWN et al., 1971). Demnach hätte sich im Rahmen dieser Untersuchungen eine statistische Korrelation zwischen erhöhten AST-Aktivitäten im Seminalplasma sowie einem hohen Anteil an Geißelschädigungen im proximalen Bereich verifizieren lassen müssen, was jedoch nicht gelang. Durch Membranschädigung in diesem Bereich kommt es zur Freisetzung des Enzyms, was nach Meinung von COLENBRANDER und Mitarbeitern (1992)

sowie KOSINIAK und BITTMAR (1991) durch Blockade der Adenosintriphosphat- (ATP-) Produktion zu Immotilität der Spermien führt. Im Rahmen dieser Studie konnte allerdings zwischen AST-Aktivität und Gesamtmotilität beziehungsweise Vorwärtsbeweglichkeit ebenfalls keine Korrelation hergeleitet werden.

Eine weitere Hypothese, die von HILLMANN und TREU (1974) aufgestellt wurde, besagt, dass der extrazelluläre AST-Gehalt neben individuellen Faktoren „besonders auch von der Art und Menge formveränderter Samenzellen abhängig zu sein scheint“. Auch hier ließ sich im Rahmen der durchgeführten Analysen keine signifikante Korrelation zur Pathomorphologie belegen. Des Weiteren scheint den Ergebnissen der statistischen Auswertungen nach keine Beziehung zwischen AST-Aktivität und prozentualem Anteil lebender/toter Spermien zu existieren, was im Gegensatz zu den Beobachtungen von BILGILI und Koautoren (1985) bei Geflügelsperma steht. Die ermittelten signifikanten Bezüge einer erhöhten AST-Konzentration zu einem reduzierten Volumen ($p = 0,0024$, $r = -0,35$) respektive einer erhöhten Dichte ($p = 0,0198$, $r = 0,278$) equiner Ejakulate sind als neue Erkenntnisse zu bezeichnen. Ausschließlich für den Menschen wird eine signifikante, positive Korrelation zwischen AST und Dichte erwähnt (AAFJES et al., 1985). Die in der eigenen Studie nachgewiesene Beziehung zur Dichte des Ejakulates stellt das zelluläre Vorhandensein des Enzyms heraus.

Die gefundenen deutlichen saisonalen Abhängigkeiten ($p = 0,025$) wurden bislang ebenfalls noch nicht beschrieben. So lag die Aktivität zum Beispiel im April/Mai im Median bei 87,7 I.U./l (1,6) [$\bar{x}_g$ (SF)], im November/Dezember, also außerhalb der Decksaison, bei 51,3 I.U./l (2,6). HILLMANN und TREU (1974) ermittelten außerhalb der Paarungssaison mit $38,8 \pm 28,6$ I.U./l eine deutlich geringere mittlere Aktivität. Auffällig ist eine hohe Standardabweichung respektive Streuung, die auch in dieser Studie existent war. Diese stellt die Eignung des Parameters zur generellen Verwendung

in der Diagnostik in Frage. Der Einfluss der Parameter Volumen und Dichte im Zusammenhang mit der AST-Saisonalität ist insofern zu diskutieren, da im eigenen Probandengut keine jahreszeitlichen Abhängigkeiten von Volumen und Dichte ermittelt werden konnten. Andere Autoren sehen dagegen für die Parameter Volumen und Dichte saisonale Abhängigkeiten (van den HOLST, 1975; PICKETT et al., 1976; JANETT et al., 2003).

Die Literatur über GLDH-Aktivitäten und –Bedeutung im Seminalplasma beziehungsweise Ejakulat ist stark limitiert und bezieht sich bisher nicht auf das Pferd (SUOMINEN und SETCHELL, 1972). Im Rahmen der eigenen Untersuchungen ließen sich für die GLDH keine signifikanten Korrelationen zu einzelnen Ejakulatparametern belegen. Signifikante Unterschiede ($p = 0,0013$) waren nur für die verschiedenen Jahreszeiten zu erkennen. Dies könnte eventuell auf eine dennoch existierende Beziehung zu routinemäßig untersuchten Eigenschaften des Spermas, insbesondere der Pathomorphologie, hindeuten. Bei dieser Aussage handelt es sich jedoch um eine Spekulation, zu deren Abklärung es einer erweiterten Untersuchung bedarf.

Hinweise auf die Bedeutung der γ -Glutamyltransferase (GGT)-Aktivität im Seminalplasma sind bisher nur für den Menschen sowie für die Ratte publiziert. Beim Menschen wird die GGT unter anderem als einer von mehreren Parametern zur Diagnostik von Prostataerkrankungen eingesetzt, da die Aktivität charakteristischerweise bei Erkrankungen der akzessorischen Geschlechtsdrüsen erhöht ist (COMHAIRE et al., 1989). Bei der Ratte liegt der Ursprung insbesondere in den Epithelzellen des Epididymidis und der Glandula vesicularis (KOHDAIRA et al., 1986). Die GGT-Aktivitäten im equinen Seminalplasma schwankten in dieser Studie jahreszeitlich unabhängig zwischen minimal 30 und maximal 24100 I.U./l. Die Mittelwerte lagen

deutlich oberhalb der Aktivitäten, die im Blut vorliegen (KRAFT und DÜRR, 1999), entsprechen aber dem Bereich der Aktivitäten humanen Seminalplasmas (HEITE und WETTERAUER, 1977; JIMENEZ VERDEGO et al., 1998).

Das erarbeitete Resultat, dass die GGT-Aktivität mit der Dichte des Ejakulates ($p < 0,0001$, $r = 0,48$) sowie dem Volumen ($p = 0,0068$, $r = -0,3163$) korreliert, ist für den Hengst neu. Für den Menschen wiesen GERSHBEIN und THIELEN (1988) sowie JIMENEZ VERDEGO und Koautoren (1998) ebenfalls bei Oligospermie und nach Vasektomie signifikant niedrigere GGT-Aktivitäten als bei Normospermie nach. Aufgrund der Beziehung zur Dichte kann ein zellulärer Ursprung vermutet werden, was im Gegensatz zu den Erkenntnissen bei anderen Spezies steht, bei denen der Hauptanteil der GGT in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen liegen soll (COMHAIRE et al., 1989; KOHDARA et al., 1986). Zwischen GGT-Aktivität im Seminalplasma und Gesamtmotilität ($p = 0,0215$, $r = 0,271$) sowie Vorwärtsbeweglichkeit ($p = 0,0177$, $r = 0,2787$) konnten signifikante, positive Korrelationen verifiziert werden, was bisher für den Hengst ebenfalls noch nicht publiziert wurde. Im Gegensatz dazu gehen die Arbeitsgruppen um GONZALEZ BUITRAGO (1981) und um UCHIJIMA (1986) davon aus, dass in humanem Seminalplasma keine signifikanten Zusammenhänge der Enzymaktivität zum Volumen, zur Dichte und Motilität existieren. Nach Meinung von HINTON und Mitarbeitern (1998) "GGT appears to play an important role in the protection of spermatozoa from oxidative stress". Ein positiver Einfluß der GGT auf die Motilität wäre im Falle einer protektiven Wirkung des Enzyms auf die Spermatozoen durchaus denkbar. Weiterführende Untersuchungen bezüglich freier Radikale sowie GGT-Aktivität erscheinen zur Verifizierung der Hypothese interessant.

Die Alkalische (AP) und die Saure Phosphatase (SP) sind aufgrund ihrer signifikanten Beziehung zueinander gemeinsam zu diskutieren ($p = 0,0011$; $r = 0,43$). Bereits

KÜPFER (1972) konnte eine positive Korrelation zwischen beiden Phosphatasen, AP und SP, für den Bullen ermitteln. Für den Hengst dagegen wurde im Seminalplasma bislang ausschließlich die Bestimmung der AP durchgeführt. Der Arbeitsgruppe um LÓPEZ (1989) gelang der immunhistochemische Nachweis beider Enzyme im equinen Nebenhoden, wobei die AP in der adluminalen Oberfläche von Nebenhodenkörper und –schwanz, die SP im Golgi-Komplex, insbesondere des Nebenhodenkörpers, aber auch von Ductus epididymidis und Vas deferens lokalisiert waren.

TURNER (1996) geht zumindest für die AP davon aus, dass der Hauptanteil beim Hengst aus Hoden und Nebenhoden stammt. Die Hypothese des primär testikulären und epididymalen Ursprungs beider Enzyme scheint auch durch die ermittelte signifikante negative Korrelation zum Volumen bestätigt zu werden. Bei einem Hauptursprung aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen wäre aufgrund des Zusammenhangs zwischen Seminalplasma und Ejakulatvolumen von einer positiven Korrelation auszugehen. Dieser Nachweis gelang beispielhaft JETTMAR (1981) und ERBING (1988), die beim Eber eine positive Korrelation für die AP und das Ejakulatvolumen nachweisen konnten, was in einem möglichen kausalen Zusammenhang zur Herkunft aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen gesehen wird. Die höchsten Konzentrationen der SP finden sich bei anderen Säugetieren in der Prostata, weshalb die SP ebenfalls als geeigneter Indikator für deren sekretorische Funktion angesehen wird (MANN und LUTWACK-MANN, 1981; ERBING, 1988).

Weiterhin konnten signifikante Beziehungen zwischen beiden Enzymen (je $p < 0,0001$) sowie der Dichte im equinen Sperma belegt werden. TURNER und SERTICH (2001) sehen die AP als geeigneten Marker für „true ejaculation in stallions with severe abnormalities of the testes and epididymides.“ Aktivitäten über 1000 I.U./l sprechen für den physiologischen Ablauf des Ejakulationsreflexes. Bei dem Hengst mit Hodenveränderungen (H 51) lag die AP-Aktivität bei 52500 I.U./l, was trotz geringen

Volumens und geringer Gesamtspermienzahl auf eine vollständig abgelaufene Reflexkette hindeutet. Die AP-Aktivitäten können außerdem eine Auskunft darüber geben, ob es sich um Oligospermie/Azoospermie mit testikulärem Ursprung oder um eine sekundäre Oligo-/ Azoospermie mit einer Blockade des Ductus deferens beziehungsweise um Versagen der Ejakulation handelt. Aktivitäten unter 100 I.U./ml, die nach TURNER und SERTICH (2001) auf Ejakulationsversagen oder –blockade hindeuten, wurden bei den eigenen Untersuchungen nicht gemessen. Zum zweiten Untersuchungstermin wurden in zwei Proben, zum dritten Untersuchungstermin in einer Probe AP-Aktivitäten bis 1000 I.U./ml bestimmt, was auf einen unvollständigen Ablauf der Reflexkette hindeutet. Alle drei Proben wiesen eine geringe Dichte ($< 100 \times 10^6/\text{ml}$) auf, bei einer Probe des zweiten Termines sowie der Probe des dritten Termines wurde die gewünschte Gesamtspermienzahl von 6×10^9 unterschritten. Insbesondere bei der Probe des dritten Termins lag unabhängig von der AP-Aktivität unter anderem aufgrund der Urinbeimengungen die Vermutung nahe, dass die Reflexkette nur unvollständig abgelaufen sei. Diese Ergebnisse bestätigen die These, dass bei Hengsten mit Oligo-beziehungsweise Azoospermie – unabhängig von der Genese – eine deutlich geringere AP-Aktivität im Seminalplasma vorliegt als bei Hengsten mit der Norm entsprechender Dichte des Ejakulates. Der von den Autoren vermutete Zusammenhang zwischen der AP-Aktivität und Fertilität kann hier nicht bestätigt werden. Dies erscheint verwunderlich, wenn davon ausgegangen wird, dass die AP das zur Dichte der Spermatozoen korrelierende Enzym ist und die Dichte bekanntermaßen einen starken Einfluß auf die Fruchtbarkeit hat.

Beim Vergleich der mittleren Aktivitäten ist es offensichtlich, dass im Seminalplasma deutlich höhere AP- [26941 I.U./l (2,1); $\bar{x}_g$ (SF)] als SP-Aktivitäten [19,1 I.U./l (1,9); $\bar{x}_g$ (SF)] vorliegen. Bei tierartlicher Gegenüberstellung fällt auf, dass bei den eigenen Probanden im Seminalplasma mit im Mittel 19,5 I.U./l (1,7) bis 23,6 I.U./l (1,6)

deutlich geringere SP-Aktivitäten gemessen wurden als für den Bullen von KÜPFER (1972) (2100 ± 667 I.U./l) und GASTAUER (1974) ($1826 \pm 536,2$ I.U./l) beziehungsweise für den Eber von ERBING (1988) ($367,5$ I.U./l) beschrieben. Auffällig sind starke individuelle Unterschiede, die auch für den Bullen beschrieben sind (ABDOU et al., 1974), sowie teilweise vorhandene, deutliche Unterschiede zwischen den Aktivitäten eines Hengstes zu verschiedenen Terminen, an denen die Absamung statt fand. Während der Hengst H 26 als Beispiel für saisonale Schwankungen aufgeführt werden soll (27 I.U./l versus 51 I.U./l), zeigen andere Hengste, wie die Hengste H 58 und H 59, fast keine jahreszeitliche Variation der Aktivität.

Bei der Creatinkinase (CK) handelt es sich um ein Enzym, welches zur Gruppe der Energietransferenzyme gehört. Es katalysiert die Phosphorylierungsreaktion von Adenosintriphosphat. Obwohl bei einigen Spezies im Gegensatz zum Hengst vereinzelte Untersuchungen über die CK im Seminalplasma publiziert sind (Mensch: unter anderem GERSHBEIN und THIELEN, 1988; HALLAK et al., 2001; Eber: MICHELMANN, 1983), ist allerdings nur wenig über den diagnostischen Wert und den Zusammenhang zur männlichen Fertilität bekannt (BOSTRÖM und ANDERSON, 1971). Bei humanen Spermatozoen wird das Enzym als Marker für Maturität angesehen, der mit der Befruchtungskapazität korreliert ist.

Die Bedeutung der CK-Aktivität wird in der Literatur kontrovers diskutiert: Während einerseits „elevated levels are associated with an increased rate of functional abnormalities and increased cytoplasmic retention“ (HALLAK et al., 2001) sowie mit Oligoasthenozoospermie (ASSEO et al., 1981), sehen andererseits einige Autoren das Enzym für Mensch (ASSEO et al., 1981; GONZALEZ BUITRAGO et al., 1980) sowie Eber (MICHELMANN, 1983) als unbrauchbar im Zusammenhang mit der

Qualitätsbeurteilung von Samenproben an. Anhand des eigenen Probandengutes ließ sich für die CK keine Korrelation zu konventionellen Ejakulatparametern herleiten. Demnach besitzt dieses Enzym beim Pferd keinen diagnostischen Wert.

Die Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist ein intrazelluläres Enzym, welches insbesondere in der Spermienmitochondrienmembran lokalisiert ist. Deren extrazelluläres Vorkommen lässt einerseits auf Zerstörung der Zellmembran, andererseits auf Elimination und andere Faktoren schließen (MANN und LUTWACK-MANN, 1981). Gleichzeitig kann eine niedrige Aktivität auch durch geringe Enzymproduktion in funktionsgestörten Zellen zustandekommen (SCHMIDT und SCHMIDT, 1974; MANN und LUTWACK-MANN, 1981). Die Arbeitsgruppe um KAMP (1996) nennen für Hengstspermien LDH-Aktivitäten von $13 \pm 3 \mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$. Angaben über die Aktivität des Enzyms im Seminalplasma wurden bisher in der Literatur nicht gemacht.

Die LDH besitzt nach den eigenen Beobachtungen im Seminalplasma nur eine schwache bis mittlere Aktivität auf $[\bar{X}_g \text{ (SF)} = 64,1 \text{ (4,0)}]$. Es bestand aber eine signifikante Beziehung zum prozentualen Anteil lebender Spermien im Ejakulat ($p = 0,0038$, $r = 0,35$). Dies deutet daraufhin, dass beim Hengst wahrscheinlich extrazelluläres Vorkommen der LDH in gewissen Konzentrationen als physiologisch anzusehen ist und nicht nur, wie von MANN und LUTWACK-MANN (1981) diskutiert, auf Zerstörung der Zellmembran hindeutet. Weiterhin wurde ein Zusammenhang zur Gesamt- ($p = 0,0062$, $r = 0,32$) und Progressivmotilität ($p = 0,0048$, $r = 0,33$) in dieser Studie ermittelt, welcher weder beim Hengst noch bei anderen Spezies bisher beobachtet wurde. Ein möglicher Grund für diese Zusammenhänge könnte in der Umwandlung von Laktat zu Pyruvat durch die LDH liegen. Pyruvat ist ein Stoff, welcher zur Produktion von Energie innerhalb des Glucosestoffwechsels abgebaut wird. Durch die LDH sind die Spermien befähigt, auch unter anaeroben Bedingungen Energie zu gewinnen. Eine

erhöhte Bereitstellung von Energie im Seminalplasma könnte eine bessere Motilität bedingen. Außerdem wurde eine signifikante negative Korrelation zur Pathomorphologie nachgewiesen ($p = 0,041$, $r = -0,24$). Dies würde darauf hindeuten, dass formveränderte Spermien neben licht- und elektronenmikroskopischen Defekten weitere Schädigungen aufweisen, wie hier in der Ausstattung mit dem Enzym LDH. Infolgedessen besitzen solche Spermatozoen häufig keine normale Motilität und daher reduzierte Befruchtungschancen.

Des Weiteren konnte eine signifikante positive Korrelation zur Dichte verifiziert werden ($p = 0,025$, $r = 0,27$), was prinzipiell mit den Ergebnissen von GERSHBEIN und THIELEN (1988) konform geht. Diese Autoren wiesen eine signifikant niedrigere LDH-Aktivität im Seminalplasma vasktomierter Männer im Vergleich zu Normobeziehungsweise Oligozoospermie nach. Bei Oligozoospermie war die Aktivität im Seminalplasma ebenfalls gegenüber der Normospermie erniedrigt. Der Nachweis dieser Beziehung beim Hengst kann als Bestätigung der Hypothese gewertet werden, dass es sich bei der LDH um ein Enzym mit enger Assoziation zu den Spermatozoen handelt. Der Nachweis eines signifikant negativen Bezuges ($p = 0,009$, $r = -0,3079$) zum Volumen bestätigt dies indirekt, indem ein Zusammenhang zur Sekretionsleistung der akzessorischen Geschlechtsdrüsen ausgeschlossen wird. Beim Eber sowie beim Menschen verdient das Enzym bezüglich der LDH-C4- und der LDH-C5-Aktivität besondere Beachtung, da eine Abhängigkeit der Aktivität zur Hoden- und Spermienreife (GOLDBERG und HAWTREY, 1967; EGBUNIKE et al., 1986), zur funktionellen Integrität des Epithels der Tubuli seminiferi (VIRJI, 1985; ELIASSON und VIRJI, 1985) sowie zur akrosomalen Integrität (LAUDAT et al., 1997) gesehen wird. Diesbezüglich waren für den Hengst keine Beziehungen zu belegen. Ob sich mittels gezielter Bestimmung beider Isoformen solche Korrelationen darstellen ließen, könnte in einer weiterführenden Untersuchung geklärt werden.

5.2.2 Mengen- und Spurenelemente

Allgemein wird davon ausgegangen, dass die Konzentrationen an Natrium und Kalzium im Seminalplasma höher, die Gehalte an Kalium und Magnesium niedriger sind als in den Spermien selber. Bei Membranschädigungen kommt es zu einem Konzentrationsausgleich (BUSCH et al., 1982). Während QUINN und WHITE (1968), O'DONNELL (1969) sowie BUSCH und Mitarbeiter (1982) verminderte Gehalte als Maßstab für den Grad der Schädigung ansehen, konnten DASHNIAM und Koautoren (1981) in bovinem Seminalplasma keine Konzentrationsänderungen von Natrium und Kalium während einer Lagerung bis zu 5 Stunden messen. Um eventuell doch vorhandene Veränderungen der Ionengehalte auszuschließen, wurden die eigenen Proben immer unmittelbar nach der Gewinnung durch Zentrifugation aufgearbeitet und auf das Freisein von Spermien kontrolliert. Beim Hengst schwankten in den eigenen Untersuchungen die Mittelwerte der Natriumionenkonzentrationen zwischen 104,3 mmol/l (1,2) [$\bar{x}_g$ (SF)] und 116,1 mmol/l (1,1), was ungefähr den von MANN (1964, 1969) und SETCHELL und BROOKS (1988) publizierten Werten entspricht. Die mittlere Kaliumkonzentration im Seminalplasma, die für den Hengst in der Literatur angegeben wird, beträgt 26 mmol/l (SETCHELL und BROOKS, 1988; MANN, 1964/1969). In den eigenen Untersuchungen wurde mit 21,8 mmol/l (1,4) ein geringgradig unterhalb der angegebenen Konzentration liegender Mittelwert ermittelt. Im Rahmen dieser Studie wurden mittlere Magnesiumgehalte von 2,8 mmol/l [$\tilde{x}$; Termin 1; $\bar{x}_g$ (SF) = 2,3 (1,8)], 3,7 mmol/l [Termin 2; $\bar{x}_g$ (SF) = 2,8 (1,6)] und 3,8 mmol/l [Termin 3; $\bar{x}_g$ (SF) = 2,8 (1,9)] bestimmt, was in Übereinstimmung zu SETCHELL und BROOKS (1988) (3,7 mmol/l) sowie MANN (1964, 1969) (3,8 mmol/l) steht. In einer neueren Studie von BARRIER-BATTUT und Koautoren (2002) lagen die Konzentrationen mit $1,49 \pm 0,78$ mmol/l deutlich darunter. Die Ursache ist voraussichtlich in der anderen Methodik, Flammenphotometrie versus

photometrischer Farbttest, begründet. Es existierten sowohl Probanden mit geringen, als auch solche mit großen Schwankungen der Natrium-, Kalium-, Magnesium- und Kalzium-Konzentrationen zwischen den einzelnen Deseminationsterminen vorhanden waren, wie dies auch für Bullen beschrieben wurde (PETZOLDT et al., 1985). Als Ursachen für die teilweise starken Schwankungen der Konzentrationen, wie sie ebenfalls im eigenen Untersuchungsmaterial existent waren, werden beim Bullen die Bedingungen der Spermagewinnung (Zeitabstand zwischen Entnahme der Ejakulate, Erregungszustand) sowie Einflüsse aus der Tierhaltung (Fütterung, Stalltemperatur u. ä.) als mögliche Einflussfaktoren diskutiert (DASHNIAM et al., 1981; GASTAUER, 1974). Faktoren, wie die genannten, sind wohl auch der Grund für die geringgradig von der Literatur abweichenden Kaliumgehalte. Dies alles stellt eine Eignung der Elemente Natrium, Kalium und Magnesium für die Diagnostik für den Hengst in Frage. Zusätzlich ließen sich keine Beziehungen zu konventionellen Ejakulatparametern mit Hilfe der Statistik ermitteln.

Im Rahmen der durchgeführten Analysen des Seminalplasmas wurde sowohl der Gesamtkalziumgehalt als auch die Konzentration an ionisiertem Kalzium bestimmt. Während die Aussagen bezüglich der Bedeutung und Korrelationen für Kalzium im equinen Seminalplasma bisher stark limitiert sind (BARRIER-BATTUT et al., 2002), wurden insbesondere für den Bullen vielfältige Zusammenhänge zwischen Kalziumionengehalt und metabolischem Verhalten, Lebensdauer und Befruchtungsfähigkeit der Spermien sowie Rasse, Alter und Körperbau nachgewiesen (CRAGLE et al., 1958 a, b; GASTAUER, 1974; SEROUSOV und ORLOVSKIJ, 1974). Diese Tatsachen stellten auch den Grund zur Analyse dieses Makroelementes dar. Im Probenmaterial wurden Konzentrationen an Gesamtkalzium von 2,4 mmol/l (2,0) sowie an ionisiertem Kalzium von 1,7 mmol/l (1,9) gemessen. Für das Pferd sind in der

Literatur Werte von 6,5 mmol/l (SETCHELL und BROOKS, 1988; MANN, 1964, 1969) beziehungsweise $57,5 \pm 42 \mu\text{g/ml}$ (entspricht $1,4 \pm 1,04 \text{ mmol/l}$; BARRIER-BATTUT et al., 2002) angegeben, allerdings ohne Hinweis darauf, ob es sich um die Gesamtkalziumkonzentration handelt. Dass die Konzentration der erstgenannten Autoren deutlich höher liegt als die eigenen Ergebnisse sowie die von der Arbeitsgruppe um BARRIER-BATTUT, könnte an unterschiedlichen Nachweismethoden liegen. Sowohl in dieser eigenen Studie, als auch von den vorher zitierten Autoren (BARRIER-BATTUT et al., 2002) wurde die Flammenphotometrie eingesetzt. Interessant erscheint, dass beim Hengst, wie hier nachgewiesen werden konnte, circa 60 bis 75 % des Kalziums in ionisierter Form vorliegen, während dies beim Menschen nur bei maximal 4 % des Gesamtkalziums der Fall ist (ARVER und SJÖBERG, 1981). Es stellt sich die Frage, ob für die equinen Spermatozoen ein erhöhter Bedarf an ionisiertem Kalzium besteht oder eine geringere Empfindlichkeit gegenüber freiem Kalzium vorliegt. Anders als bei humanem Seminalplasma konnte bei den eigenen Beobachtungen ein signifikanter Zusammenhang zwischen Gesamt- und ionisiertem Kalzium belegt werden. Der Nachweis dieser Beziehung erscheint reell, da die Beziehung zum Volumen ebenfalls gemeinsam für beide Kalziumgehalte existierte ($p_{\text{Ca ges}} = 0,0094$, $r_{\text{Ca ges}} = 0,31$; $p_{\text{Ca ion}} = 0,0018$, $r_{\text{Ca ion}} = 0,36$).

Die Rate des Influxes an Kalziumionen in das Spermium soll ein entscheidender Parameter für die Integrität der Plasmamembran sein (COLENBRANDER et al., 1992). Nach erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentrationen in Kopf und Geißel wurde eine Destabilisierung der Membran registriert. Dennoch konnte keine negative Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil an Membrandefekten, die mittels Elektronenmikroskop detektiert wurden, und dem Kalziumgehalt belegt werden. Dies würde eventuell ebenfalls daraufhin deuten, dass equine Spermatozoen eine gewisse Resistenz gegenüber ionisiertem Kalzium aufweisen. Da Kalzium des Weiteren essentiell für die

Akrosomenreaktion ist, kann bei hohen Konzentrationen an ionisiertem Kalzium im Seminalplasma auf ein gehäuftes Auftreten spontaner Akrosomenreaktionen geschlossen werden (BUSCH und HOLZMANN, 2001). So war im Rahmen der eigenen Untersuchungen generell zu verifizieren, dass spontan akrosomenreagierte Spermien insbesondere in Ejakulaten mit hohen Konzentrationen an ionisiertem Kalzium auftraten. Neben diesem Faktor könnten zusätzliche Parameter, wie Membranschädigung oder geringere Widerstandsfähigkeit der Spermien, ebenfalls eine Rolle für die Induktion spontaner Akrosomenreaktionen spielen.

Während beim Bullen insbesondere die Ampulla ductus deferentis und die Vesicula seminalis als Herkunftsorte für die aktive Sekretion ins Seminalplasma eine Rolle spielen, wurde beim Pferd dagegen der Ursprung des vorhandenen Kalziums bisher nicht näher definiert. Aufgrund der signifikanten positiven Korrelation zwischen Gesamtkalzium ($p = 0,0094$, $r = 0,31$) und der ionisierten Form ($p = 0,0018$, $r = 0,36$) zum Spermavolumen kann davon ausgegangen werden, dass der Ursprung auch beim Hengst in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen liegt. So stellt die Kalziumkonzentration beim Hengst ebenso wie beim Bullen und beim Eber ein wichtiges Maß für die Sekretionsfähigkeit des männlichen Geschlechtsapparates dar (GASTAUER, 1974; ERBING, 1988).

Bisher gibt es noch keine Arbeit, welche sich mit Konzentration sowie Bedeutung von Phosphat im equinen Seminalplasma beschäftigt. Als Richtwerte im equinen Seminalplasma haben Konzentrationen zwischen 0,4 und 5,9 mmol/l, im Mittel zwischen 1,3 (1,7) [$\bar{x}_g$ (SF); April/Mai sowie Juli/August] und 1,7 mmol/l (1,6) [$\bar{x}_g$ (SF), November/Dezember] zu gelten. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zum pH-Wert, zur Dichte sowie zur Gesamtspermienzahl verifiziert werden. Als mögliche Ursache für die Beziehung zum pH-Wert könnte die Bedeutung des Phosphats in

gebundener Form als Puffer angesehen werden, da die Menge an vorhandener Pufferkapazität für pH-Änderungen entscheidend ist. Da beim Spermienstoffwechsel durch den Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) anorganisches Phosphat produziert wird, erscheint auch die positive Korrelation zwischen Phosphat und Dichte sowie Gesamtspermienzahl plausibel. Der Umsatz von ATP steigt, je mehr Spermien vorhanden sind. Warum allerdings in diesem Zusammenhang keine statistisch signifikante Korrelation zur Motilität oder Vorwärtsbeweglichkeit verifiziert werden konnte, bleibt unklar. In diesem Zusammenhang sollten die Beobachtungen von CRAGLE und MUNTZ (1956) sowie von GASTAUER (1974) erwähnt werden. Diese Autoren wiesen beim Bullen ebenfalls eine positive Korrelation zur Dichte nach. Erstaunlicherweise zeigten CRAGLE und MUNTZ (1956) gleichzeitig eine negative Beziehung des Phosphatgehaltes zur Motilität auf.

Für Chlorid im Seminalplasma von Hengsten sind in der Literatur nicht einzelne Werte, sondern Bereiche angegeben. So gehen SETCHELL und BROOKS (1988) von Konzentrationen zwischen 23 und 113 mmol/l, MANN und LUTWAK-MANN (1981) von solchen zwischen 22,5 und 112,8 mmol/l aus. Bei den eigenen Untersuchungen wurden Chloridkonzentrationen zwischen 84 und 132 mmol/l, im Mittel 112,8 mmol/l (1,1) gemessen. Demnach lagen deutlich geringere Schwankungen vor als von den oben genannten Autoren beschrieben. Dies könnte auf ein relativ einheitliches Probandengut in dieser Studie hindeuten, obwohl die Tiere auf unterschiedlichen Gestüten untergebracht waren. In Bezug auf die Fertilität scheint der Chloridionenkonzentration keine Bedeutung zuzukommen, auch zu konventionellen lichtmikroskopischen Parametern konnte keine Korrelation verifiziert werden.

Bei der Bestimmung von Eisen muss zwischen freiem Eisen und Eisen in gebundener Form, wie Ferritin und Transferrin differenziert werden. Aufgrund von Lipidperoxidation wird der ungebundenen Form im Seminalplasma in der Humanmedizin eine besondere Bedeutung zugeschrieben. In Anlehnung an diese Hypothese galt es die Bedeutung freien Eisens im equinen Seminalplasma zu untersuchen. Mit dem zur Bestimmung verwendeten Kit der Firma WAKO lässt sich ausschließlich das ungebundene Ion messen. Die ermittelten Eisenkonzentrationen wiesen deutliche Schwankungen von nicht messbar bis 45,12 $\mu\text{mol/l}$ auf, wobei nur bei vier Hengsten im Juli/August Konzentrationen über 17,91 $\mu\text{mol/l}$ bestimmt wurden. Im Mittel lagen die Konzentrationen an freiem Eisen im equinen Seminalplasma zwischen 1,1 (2,8) und 2,8 $\mu\text{mol/l}$ (3,5). MASSÁNYI und Mitarbeiter (2003) wiesen deutlich höhere Gehalte von $227 \pm 163 \mu\text{mol/l}$ nach. Hier ist aber darauf hinzuweisen, dass die Ejakulate verdaut und dann mittels Atomabsorptionsspektrophotometrie auf den Eisengehalt hin analysiert wurden. Es ist davon auszugehen, dass der Gehalt an freiem und vormals gebundenem Eisen gemeinsam bestimmt wurde. Beim Eber liegen mit 1,77 $\mu\text{mol/l}$ deutlich geringere Konzentrationen vor (ERBING, 1988), die den in dieser Studie beim Hengst gemessenen entsprechen. Andere Autoren ermitteln unter Berücksichtigung aller Oxidationsstufen beim Schafbock 28,65 $\mu\text{mol/l}$ (POLAKOSKI und KOPTA, 1982; BUSCH und HOLZMANN, 2001) sowie beim Rüden 10 $\mu\text{mol/l}$ (BUSCH und HOLZMANN, 2001) - demnach ähnliche Gehalte wie beim Hengst.

Während beim Hengst der Ursprung des Eisens im Seminalplasma ungeklärt ist, gilt es beim Eber als erwiesen, dass Eisen von der Anwesenheit der Spermatozoen und der Sekretion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen abhängig ist (DUBIEL et al., 1980). Im Rahmen dieser Untersuchungen ließ sich eine signifikante negative Korrelation zum Volumen ($p = 0,0059$, $r = -0,326$) verifizieren. Diese Beziehung spricht eher gegen die akzessorischen Geschlechtsdrüsen als Hauptherkunftsort. Aufgrund des ebenfalls

nachgewiesenen Zusammenhangs zur Dichte ($p = 0,0011$, $r = 0,386$) ist zum einen davon auszugehen, dass Eisen, wie auch beim Eber, vom Vorhandensein von Samenzellen abhängig ist, zum anderen ist ein primär testikulärer und epididymaler Ursprung zu diskutieren.

Aufgrund einer weitreichenden Bedeutung, die Kupfer beim Menschen bezüglich Infertilität zugeschrieben wird (STANWELL-SMITH et al., 1983; HUANG et al., 2000), stellte sich die Frage, ob beim Hengst ebenfalls eine Eignung für die Fruchtbarkeitsdiagnostik besteht. Zunächst fielen in dieser Studie deutlich saisonal differierende Kupfergehalte auf. So lag für November/Dezember eine mittlere Kupferkonzentration von $9,2 \mu\text{mol/l}$ ($1,9$) [$\bar{x}_g$ (SF)] bei circa 50 % des Gehaltes im April/Mai [$17,5 \mu\text{mol/l}$ ($1,7$)] sowie im Juli/August [$18,8 \mu\text{mol/l}$ ($2,0$)]. Diese saisonale Abhängigkeit wurde bisher nicht beschrieben. BARRIER-BATTUT und Mitarbeiter (2002) konnten mittels desselben Verfahrens - der Flammenphotometrie – entsprechende Kupfergehalte ($20,93 \pm 18,88 \mu\text{mol/l}$) ermitteln. Auch die Arbeitsgruppe um MASSÁNYI (2003) ermittelte dementsprechende Konzentrationen ($13,53 \pm 1,57 \mu\text{mol/l}$). Leider sind in den Publikationen der zitierten Autoren keine jahreszeitlichen Angaben über den Spermaentnahmezeitraum zu finden. So kann nicht definitiv erklärt werden, warum die Gehalte differieren, wenn auch anhand der eigenen Resultate und insbesondere der jahreszeitlichen Abhängigkeit die Vermutung nahe liegt, dass die Untersuchungen von BARRIER-BATTUT et al. (2002) eher im Sommer, die von MASSÁNYI et al. (2003) dagegen eher im Winter durchgeführt wurden.

Während UMEYAMA et al. (1986) im Seminalplasma infertiler Männer deutlich höhere Kupferkonzentrationen als bei fertilen Männern nachweisen konnten, lässt sich für Hengste dieser Zusammenhang nicht bestätigen. Zum Ejakulatvolumen bestand eine signifikante negative Korrelation ($p = 0,0101$, $r = - 0,3034$), die für Männer von

SKANDHAN und MAZUMDAR (1975) sowie WATASE und OHTAGURO (1988) ebenfalls postuliert wurde. Weiterhin existiert eine signifikante positive Beziehung zum prozentualen Anteil lebender Spermien ($p = 0,049$, $r = 0,2411$), die bisher nicht in dieser Form bekannt war. Kupferionen scheinen ursächlich mit dem Spermatozoon in Verbindung zu stehen.

Ein gewisser Anteil an Kupfer ist essentiell für die Funktion der Zelle. Es ist aber davon auszugehen, dass die nachgewiesene positive Korrelation nur innerhalb eines bestimmten Grenzbereiches gilt, demnach extrem hohe Kupferkonzentrationen auch schädigende Wirkung auf die Spermatozoen hätten. Innerhalb dieser Studie konnten bei keinem Probanden extrem hohe Kupferkonzentrationen und ein schädigender Einfluß nachgewiesen werden, was darauf hindeuten könnte, dass sehr hohe Gehalte in vivo nur in Ausnahmefällen vorkommen.

Da Zink als einem weiteren Spurenelement in der humanen Fertilitätsdiagnostik eine starke Bedeutung beigemessen wird, sollte wiederum abgeklärt werden, ob für den Hengst ebenfalls ein Zusammenhang zu verifizieren ist. Mittels des verwendeten Tests kann ausschließlich freies, ionisiertes Zink, nicht die gebundene Form gemessen werden. Die bestimmten Konzentrationen lagen saisonal abhängig ($p = 0,0171$) zwischen $109,4 \mu\text{mol/l}$ [(1,4); $\bar{x}_g$ (SF)] im April/Mai, $128,0 \mu\text{mol/l}$ (1,6) im Juli/August und $88,8 \mu\text{mol/l}$ (1,8) im November/Dezember. Hierzu gab es bislang keine Daten. BARRIER-BATTUT und Koautoren (2002) ermittelten mit $26,46 \pm 10,71 \mu\text{mol/l}$ deutlich niedrigere Gehalte, während bei den Bestimmungen von MASSÁNYI und Mitarbeitern (2003) den eigenen Werten entsprechende Konzentrationen von $131,89 \pm 70,2 \mu\text{mol/l}$ gemessen wurden. Interessant ist, dass letztgenannte Autoren trotz einer anderen Methode (Verdauung und Atomabsorptionsphotospektrometrie) ähnliche

Ergebnisse erhielten, BARRIER-BATTUT et al. (2002) aber trotz derselben Methodik (Flammenphotometrie) deutlich niedrigere.

Erhöhte Zinkkonzentrationen des Seminalplasmas werden in der Humanmedizin mit Infertilität assoziiert (CHIA et al., 2000; HUANG et al., 2000). Nachdem der Einfluß von Zink lange kontrovers diskutiert wurde, gilt es mittlerweile als erwiesen, dass Zink für die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien beim Menschen von essentieller Bedeutung ist (CARPINO et al., 1998; HENKEL et al., 1999, ELZANATY et al., 2002; BALDAUF et al., 2003). HENKEL et al. (2003) beschreiben Zinkelimination aus der Geißel zur Festigung der Outer dense fibers. Zink besitzt demnach motilitätsmodulierende Eigenschaften. Eine reduzierte Vulnerabilität von Spermienköpfen wird einer Zinkaufnahme aus dem Seminalplasma während der Ejakulation zugeschrieben (BJORND AHL et al., 1986). Des Weiteren wird Zink eine besondere Bedeutung bei der Funktion bestimmter Enzyme, sogenannter Zink-Metalloenzyme, wie der Sorbitol-Dehydrogenase und der Laktat-Dehydrogenase-X, beigemessen (ELZANATY et al., 2002). Bei Zinkmangel können diese Enzyme dysfunktional werden. Alle erwähnten Bedeutungen von Zink können als mögliche Ursache für die ermittelte signifikante Beziehung zur Fertilität an zumindest zwei Deseminationsterminen angesehen werden. Da bezüglich der Motilität aber im eigenen Probandengut kein Zusammenhang ermittelt werden konnte, bedarf es hinsichtlich dieses Aspektes allerdings sicher weiterer Forschung. Dagegen existierte eine signifikante negative Korrelation zwischen Zink und dem Spermavolumen ($p = 0,0001$, $r = -0,437$). Dies spricht anders als bei Hund und Mensch, wo der größte Anteil des ungebundenen Ions aus der Prostata stammt (MANN, 1964; DONDERO et al., 1972, 1974; (FRENKEL) PAZ et al., 1977), gegen einen primären Ursprung in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Ebenso deutlich war die Beziehung zur Dichte ($p < 0,0001$, $r = 0,5313$). Die letztgenannte Beobachtung entspricht denen der Arbeitsgruppen um ROBAK-CHOLUBEK (1998) und CHIA

(2000) in der Humanmedizin. Als mögliche Erklärung für die Korrelation zur Dichte und zum Volumen könnte ein zelluläres Vorhandensein des Ions gelten. Erfolgt nun eine Zinkelimination zur Stabilisierung der Geißel, wie von HENKEL und Mitarbeitern (2003) beschrieben, wäre es plausibel, dass bei steigender Dichte erhöhte Konzentrationen messbar sind.

5.3 Saisonale Differenzen der konventionellen Untersuchungsergebnisse

In dieser Studie konnten bezüglich der konventionellen Ejakulatanalyse signifikante jahreszeitliche Abhängigkeiten für die Vorwärtsbeweglichkeit ($p = 0,0341$), die Lebend-Tot-Ratio ($p = 0,045$) und ebenso die Pathomorphologie ($p = 0,0346$) verifiziert werden. Hierbei handelt es sich ausschließlich um quantitative Parameter. Dies entspricht der Beobachtung von PICKETT und Mitarbeitern (1975, b; 1976), welche herausstellten, dass vor allem quantitative Ejakulatmerkmale entsprechend dem endokrinen Jahresrhythmus saisonalen Schwankungen unterworfen sind.

Für die Gesamt- und Progressivmotilität wurde im Frühjahr zu Beginn der Decksaison der höchste Anteil an beweglichen Spermatozoen nachgewiesen. Außerhalb der Decksaison waren sowohl weniger progressiv motile als auch insgesamt weniger motile Samenzellen in den Proben vorhanden. SIEME und Koautoren (2004) ermittelten außerhalb der Zuchtsaison ebenfalls niedrigere Motilitäten. Im Gegensatz dazu lag bei der Arbeitsgruppe um JANETT (2003) die durchschnittliche Motilität im Winter über derjenigen im Sommer.

Im November/Dezember (vor der Zuchtsaison) wurde im eigenen Untersuchungsgut ein größerer Anteil an pathomorphologisch veränderten Spermatozoen ($\tilde{x} \pm s = 30,5 \% \pm$

16,9 %) als im April/Mai mit 29,0 % ($\pm 17,2$ %) sowie im Juli/August (am Ende der Zuchtsaison) mit 27,3 % ($\pm 13,9$ %) nachgewiesen. Während ein saisonaler Bezug der Pathomorphologie von diversen Autoren bestätigt werden konnte, gibt es Kontroversen darüber, zu welchem Zeitpunkt das Maximum sowie zu welchem das Minimum an morphologischen Veränderungen erreicht wird. So stellte BIELANSKI (1951) fest, dass vor Beginn der Zuchtsaison ein höherer Anteil an pathomorphologisch unveränderten Spermien im Ejakulat enthalten ist als nach der Zuchtsaison. Konform zu diesen Ergebnissen ist die Aussage der Arbeitsgruppe um JANETT (2003), die im Sommer signifikant weniger morphologisch normale Samenzellen und einen signifikant höheren Anteil an „major defects“ auszählen konnte. HENDRIKSE (1972) ermittelte während der Zuchtsaison von März bis Juli einen steigenden Anteil morphologisch normaler Zellen. Die eigenen Beobachtungen erscheinen plausibel aufgrund der bekannten Tatsache, dass sich die Ejakulatqualität durch regelmäßige Absamungen, wie sie innerhalb der Decksaison erfolgen, verbessern lässt.

Auffällig erscheint, dass das eigene Probandengut im Mittel einen deutlich höheren Anteil an morphologisch modifizierten Samenzellen aufwies als von der Arbeitsgruppe um BIELANSKI (1982) angegeben. Diese Autoren gehen nämlich davon aus, dass “the percentage of spermatozoa classified as normal is rather constant, at around 85%, before and after the breeding season”. Als mutmaßliche Ursache ist der Umstand anzusehen, dass die Autoren ausschließlich von fertilen Tieren ausgingen, während in die eigenen Untersuchungen auch sub- und infertile Probanden einfließen.

Für die Grundgesamtheit sowie für die Analysen im Juli/August sowie November/Dezember konnte ein in der Literatur bereits von SIEME und Koautoren (2004) erwähnter positiver Bezug zwischen der Anzahl der Aufsprünge und dem Spermavolumen verifiziert werden. Dieser Zusammenhang könnte insofern erläutert

werden, dass bei steigender Anzahl an Aufsprüngen die Stimulation steigt und demnach die Sekretion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen zunimmt.

5.4 Sonderfall H 12 - Urinbeimengungen

Urinbeimengungen im Ejakulat treten aufgrund einer unzureichenden sexuellen Stimulation und vegetativ neurogener Fehlsteuerungen infolge von Schädigungen oder Entzündungsprozessen an Harnblase und Urethra auf (BADER, 2001). Es ist bei verschiedenen Spezies bekannt, dass Urinbeimengungen zum Ejakulat der Grund für Infertilität sein können. Dies bedingt insbesondere Veränderungen des pH-Wertes und der Osmolarität (GRIGGERS et al., 2001). Die Arbeitsgruppe um GRIGGERS (2001) beobachtete ebenfalls, dass „Contamination of the ejaculate with urine significantly decreased sperm motility.“ Besonders deutlich war dieser Effekt bei größeren Mengen an Urin sowie bei hochkonzentriertem Urin. Die Beobachtungen bei H 12 entsprechen diesen Erkenntnissen: Der pH-Wert liegt mit 7,7 deutlich oberhalb der Norm und die Vorwärtsbeweglichkeit lag bei 0 %. Interessant ist, dass der Hengst bei der ersten Absamung im Juli/August eine gute Ejakulatqualität aufweist. Dies könnte der Grund sein, warum er trotz Urinbeimengungen im Ejakulat, die laut Vorbericht auch bereits 2001 auftraten, dennoch eine Fertilität von 88,9 % hatte.

5.5 Einfluß der Ejakulatqualität auf die untersuchten Parameter

Die Auswertung des Probenmaterials erfolgte in Abhängigkeit sowohl des Termins als auch der Ejakulatqualität, wie bereits unter 4.11 beschrieben. Hierbei konnte festgestellt

werden, dass die Spermaqualität unabhängig von der Fertilität war, wie es auch COLENBRANDER und Koautoren (2003) mitgeteilt hatten. So wiesen einzelne Hengste, die im Jahr 2001/02 als subfertil kategorisiert worden waren, der Norm entsprechende Proben auf.

Da das Material anhand der konventionellen Ejakulatuntersuchung in die verschiedenen Gruppen eingeteilt wurde, erscheint es nicht verwunderlich, dass signifikante Unterschiede zwischen denselben bezüglich Gesamt- und Progressivmotilität, Lebend-Tot-Ratio und ebenso Pathomorphologie existierten. Interessant erscheint allerdings, dass der Zeitraum von der letzten Absamung bis zur Probengewinnung einen signifikanten Einfluss auf die Qualität hat. Dies bestätigt erneut die vorher postulierte Hypothese, dass regelmäßige Absamungen, wie sie bei einem Teil der Hengste durchgeführt wurden, zumindest einige Parameter im Sperma verbessern. Erwähnenswert erscheint in dem Zusammenhang, dass kein Hengst häufiger als maximal einmal pro Tag ejakulierte, eine Überbeanspruchung der Tiere also ausgeschlossen werden konnte. MAGISTRINI und Mitarbeiter (1987) konnten bei hoher Absamfrequenz eine verbesserte Motilität ermitteln, für welche in den eigenen Auswertungen ebenfalls ein Zusammenhang zur Spermagüte belegt werden konnte. Die Autoren sahen aber bei hoher Absamfrequenz weiterhin ein reduziertes Volumen sowie eine geringere Dichte, was indirekt einen Hinweis auf schlechtere Ejakualatqualität darstellt.

Bezüglich der im Seminalplasma untersuchten Enzyme ließ sich für die GGT, die LDH und die AP ein signifikanter Bezug verifizieren. Der Grund für diese Zusammenhänge könnte in den nachgewiesenen Korrelationen der Enzyme zu allen klassischen Ejakulatparametern, wie dem Volumen, der Dichte, der Gesamt- und Progressivmotilität, der Lebend-Tot-Ratio und ebenso der Pathomorphologie liegen.

5.6 Korrelationen zwischen Fertilität und lichtmikroskopischen Parametern

Der Einfluss der konventionell lichtmikroskopisch erfassbaren Ejakulatparametern auf die Fertilität wird in der Literatur kontrovers diskutiert: So wird einerseits die Motilität als eines der besten Kriterien für die Befruchtungsfähigkeit angesehen. Gemäß der Literatur weisen Hengste mit geringer Fertilität einen signifikant niedrigeren Anteil an beweglichen und vorwärtsbeweglichen Spermien auf (BADER et al., 1991; JASKO et al., 1991, 1992; CHEVALIER-CLEMENT et al., 1991). Andererseits konnte diese Behauptung im Rahmen der eigenen Untersuchungen sowie derer von VOSS und Mitarbeiter (1981) sowie DOWSETT und PATTIE (1982) nicht bestätigt werden, was zunächst verwunderlich erscheint. Aus populationsabhängiger Sicht mag es sicher der Fall sein, dass der Vorwärtsbeweglichkeit in Bezug auf die Fertilität eine große Bedeutung zukommt. So beruhen insbesondere die Ergebnisse von JASKO und Koautoren (1991, 1992) auf massenstatistischer Grundlage. Im Einzelfall sieht es jedoch anders aus. Hier ist die in der Praxis immer wieder bestätigte Situation gegeben, dass zum einen einige sub- und infertile Hengste dennoch einen hohen Anteil an progressiv motilen Spermatozoen im Ejakulat besitzen, wie es auch bei einem der untersuchten Probanden gegeben war. Diese Beobachtung wurde auch von VOSS und Koautoren (1981) sowie DOWSETT und PATTIE (1982) gemacht. Zum anderen sind in praxi Hengste mit einer niedrigen Rate an beweglichen Spermien durchaus in einer akzeptablen Form als fertil zu bezeichnen. Natürlich werden hier keine optimalen Graviditätsergebnisse erzielt. Dennoch ist es aus klinischer Sicht nicht möglich, eine Grenze anzugeben, bei der das Verhältnis an beweglichen zu unbeweglichen Spermien eine Rolle spielt. Nur wenn das Charakteristikum motile Samenzellen nahe der Nullgrenze liegt, ist im Regelfall von einer vollkommenen Infertilität auszugehen. Bei Betrachtung der Fertilität im Kontext mit der Motilität wird deutlich, dass zur

Konzeption sicher ein Mindestmaß an motilen Spermatozoen vorhanden sein muß, jedoch der mit jedem Ejakulat abgegebene biologische Überfluß nicht die Grundvoraussetzung darstellt, um im Einzelfall doch noch eine Gravidität zu erzielen. Der Ausschluß eines Hengstes aus der Zucht aufgrund ungenügender lichtmikroskopischer Kennwerte in der Samenprobe stellt sich aus den genannten und anderen Gründen als zumindest problematisch dar.

Dennoch sollte für den Populationsdurchschnitt die Eignung der Lichtmikroskopie nicht unterschätzt werden. So ließ sich auch in dieser Studie zwischen dem Anteil lebender Spermien und der Fertilität eine signifikante Beziehung belegen ($p = 0,016$). Ebenso erscheint es durchaus plausibel, dass formveränderte Spermien eher Defizite in der Befruchtungsfähigkeit aufweisen als morphologisch unveränderte. So bestätigten diverse Arbeitsgruppen, wie die um JASKO (1990, 1991, 1992), um BADER (1991) und um CHEVALIER-CLEMENT (1991) sowie PARLEVLIET und COLENBRANDER (1999), eine signifikante Korrelation zwischen Pathomorphologie und Fertilität. Dieser Zusammenhang konnte mittels des Probenmaterials dieser Studie verifiziert werden ($p < 0,0001$). Die meisten Arbeiten, die Referenzwerte zur Pathomorphologie bringen, beziehen sich generell auf eine gute Fertilität: So wird von BIELANSKI (1951), NISHIKAWA und Mitarbeitern (1951), HENDRIKSE (1972) sowie von der Arbeitsgruppe um BIELANSKI (1982) angenommen, dass bei einem „fertilen Hengst ($> 80\%$) mindestens 80 % der Spermien normal sein müssen“. VOLOSKOV (1936) erachtet mehr als 70 % pathomorphologisch unveränderter Spermien als essentiell für eine Fertilität über 60 %. Die Resultate dieser Studie geben für Hengste mit Konzeptionsraten zwischen 70 und 100 % einen Anteil an formmodifizierten Spermien im Mittel von $25 \pm 14 \%$, bei Konzeptionsraten von 10 bis $< 70 \%$ von $36,5 \pm 12,1 \%$ sowie bei Konzeptionsraten von $< 10 \%$ von $73,5 \pm 29,9 \%$

wieder. Demnach liegen die fertilen Hengste geringgradig oberhalb der Anforderungen, die in der Literatur gestellt werden. BIELANSKI et al. (1982) geben bei 20 % Pathomorphologie „to predict that a stallion is fully fertile“ (bei normalem Sexualverhalten, Spermienkonzentration, Motilität, keine Infektion) folgende Verteilung der einzelnen Veränderungen an: < 10 % Cytoplasmatropfen, < 3 % schleifenförmige Schwänze, < 1 % andere anomale Formen. Sogenannte „major defects“, wie abnorme Köpfe, proximale Cytoplasmatropfen und abnorme Mittelstücke haben den größten Einfluß auf die Fertilität, mit der sie invers korrelieren (BIELANSKI, 1975; JASKO et al., 1990). Bei den examinieren Ejakulaten der eigenen Probanden kam dem Anteil schleifenförmiger Geißeln sowie auch dem Anteil an Cytoplasmatropfen eine besondere Bedeutung im Hinblick auf die Fruchtbarkeit zu.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Diagnostik männlicher Fertilitätsstörungen führt häufig zu unbefriedigenden Ergebnissen, da mit den klassischen, vor allem auf der Lichtmikroskopie beruhenden Untersuchungsverfahren ein erheblicher Teil der möglichen Ursachen, insbesondere Störungen der Spermatozoenfunktion, nicht erfasst werden können. Dies trifft auch für den Hengst zu, bei dem schlechte Befruchtungsergebnisse im Vergleich zu anderen Haussäugetierarten relativ häufig vorkommen.

Das Beurteilungsspektrum für equine Ejakulate sollte deshalb in der vorliegenden Arbeit durch die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und biochemische Analysen des Seminalplasmas erweitert werden. Die TEM eignet sich aufgrund ihres hohen Auflösungsvermögens besonders zur detaillierten Darstellung spermien-spezifischer Feinstrukturen, wie Akrosom und Geißel. Ebenso könnten auch biochemische Analysen des Seminalplasmas bezüglich Enzymaktivitäten und Zusammensetzung an Makro- sowie Mikroelementen beim Hengst Hinweise auf das Vorliegen sowie auf mögliche Ursachen einer Pathospermie geben. Ziel der eigenen Arbeit war es daher, zunächst an fertilen Hengsten Referenzwerte für die untersuchten Parameter zu etablieren und dann die getesteten Methoden auf ihre Eignung in der Fertilitätsdiagnostik beim Hengst zu untersuchen.

Insgesamt standen Ejakulate von 73 Hengsten für die Untersuchungen zur Verfügung, wobei von 46 dieser Probanden die Fertilität bekannt war. Basierend auf den Befruchtungsergebnissen der vorangegangenen Zuchtsaison wurde eine Klassifizierung der Probanden nach fertil (Konzeptionsraten 70-100 %), subfertil (Konzeptionsraten 10-70 %) und infertil (Konzeptionsraten < 10 %) vorgenommen. Diese Daten wurden dem

Untersucher erst nach der Auswertung der Ergebnisse bekannt gegeben. Des Weiteren erfolgte zum Vergleich klassischer Parameter mit Seminalplasmawerten eine Einteilung der Ejakulatproben in die Kategorien „normal“, „geringgradig abweichend“ und „hochgradig abweichend“. Geringgradig abweichende Ejakulate wiesen bezüglich eines Parameters leichte und hochgradig abweichende Ejakulate bei mindestens einem der untersuchten Parameter deutliche Deviationen von der Norm auf.

Nach Desemination der Hengste wurde unmittelbar im Anschluss eine konventionelle makroskopische, chemisch-physikalische und lichtmikroskopische Ejakulatuntersuchung durchgeführt sowie Seminalplasma durch Zentrifugation des Samens gewonnen. Außerdem wurde ein Spermaaliquot mit 2 % Glutaraldehyd und 0,1 % Pikrinsäure fixiert und für die TEM aufgearbeitet. Zur TEM-Evaluierung wurde jeweils eine im Frühjahr entnommene Samenprobe der 46 Tiere mit bekannten Konzeptionsraten herangezogen. Hierbei erfolgte die Beurteilung von je 200 Akrosomen, Spermienköpfen, Mittelstücken und Geißelquerschnitten sowie 100 Geißellängsschnitten jedes Ejakulates. Für die biochemischen Analysen wurden zu 3 verschiedenen Terminen (Frühling, Sommer, Spätherbst/Winter) Proben gewonnen. Dabei fanden 27 Hengste ausschließlich einmal, 35 Hengste zu zwei Terminen sowie 11 Hengste zu drei Terminen Eingang in die Studie. Bezüglich der biochemischen Analysen wurden die Aktivitäten der Enzyme AST, GLDH, GGT, AP, SP, CK und LDH sowie die Gehalte der Mengenelemente Natrium, Kalium, Kalzium (gesamt und ionisiert), Magnesium, Phosphat und Chlor sowie der Spurenelemente Kupfer, Eisen und Zink ermittelt.

Bei den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem erhöhten prozentualen Anteil

akrosomaler Deformationen (abgehobene Akrosomen) sowie einer reduzierten Fertilität ($p = 0,034$; $r = -0,31$). Bei fertilen Hengsten war ein geringerer prozentualer Anteil [$\bar{x}_g$ (SF)] von 4,9 (3,2) % nachweisbar als bei sub- [7,9 (1,9) %] respektive insbesondere infertilen Probanden [11,4 (4,2) %]. Obwohl die Eignung zur Klassifizierung von Hengsten mit unbekannter Fruchtbarkeit hier nicht überprüft wurde, legen die eigenen Ergebnisse den Schluss nahe, dass die TEM-Beurteilung des Akrosoms zur Einstufung der Hengste bezüglich ihrer Fertilität geeignet ist und wichtige Hinweise auf vorliegende Fertilitätseinschränkungen geben kann. Hilfreich ist die TEM ebenfalls zur Abklärung von Infertilitätsfällen unklarer Ätiologie.

Neben Spermien konnten in den Ejakulaten Spermatiden und Makrophagen detektiert sowie erstmals beim Hengst mittels TEM verifiziert werden. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Zellen und der Fruchtbarkeit war nicht nachweisbar. Weiterhin gelang im Hengstejakulat eine Erstbeschreibung der sogenannten „bizarre forms“, einer Ansammlung von Kopf- und Geißelquer- sowie –längsschnitten mit einer gemeinsamen umhüllenden Membran, die im Mittel mit 15,0 (2,1) % in den Proben nachweisbar waren. Diese wurden bisher erst bei Rotwölfen erwähnt und werden als eine Entwicklungsanomalie der Spermatozoen diskutiert.

Auch die Analysen des Seminalplasmas ermöglichen eine differenzierte Aussage über die Ejakulatqualität. In diesem Zusammenhang sind von den untersuchten Enzymen insbesondere die Laktat-Dehydrogenase (LDH) sowie die Alkalische Phosphatase (AP) und Saure Phosphatase (SP) zu nennen. Hier ließen sich Korrelationen der LDH zur Gesamt- ($p = 0,0062$, $r = 0,3217$) und Progressivmotilität ($p = 0,0048$, $r = 0,33$), zur Dichte ($p = 0,025$; $r = 0,2694$) und zum Volumen ($p = 0,009$; $r = -0,3079$) ermitteln. Für die testikulär und epididymal lokalisierten Enzyme AP und SP konnte ein

signifikanter positiver Zusammenhang zur Dichte (p (SP, AP) $< 0,0001$; r (SP) = 0,4808, r (AP) = 0,6154) verifiziert werden. Dies stützt die Hypothese, dass beide Enzyme eine Eignung besitzen, Auskunft über den vollständigen beziehungsweise unvollständigen Ablauf der Reflexkette zu geben. Die ebenfalls nachgewiesene, negative Beziehung der AP respektive SP zum Volumen (p (SP) = 0,0004, r (SP) = - 0,412; p (AP) $< 0,0001$, r (AP) = - 0,5696) belegt den bereits postulierten testikulären und epididymalen Ursprung.

Bezüglich der Mikroelemente gelang der Nachweis einer signifikanten Beziehung zwischen Fertilität sowie der Zinkkonzentration im Sommer ($p = 0,017$) und im Spätherbst/Winter ($p = 0,048$), nicht jedoch im Frühjahr. Weiterhin existierten signifikante Unterschiede der Kupferkonzentration im Seminalplasma zwischen normalen und hochgradig abweichenden Ejakulaten sowie der Eisenkonzentration zwischen normalen und geringgradig abweichenden Ejakulaten, was auf weiterführende diagnostische Einsatzmöglichkeiten hindeutet.

Zwischen elektronenmikroskopisch festgestellten spontanen Akrosomenreaktionen und erhöhten Gehalten an ionisiertem Kalzium im Seminalplasma konnte ein Zusammenhang ermittelt werden. Eine Eignung der Kalziumbestimmung für den diagnostischen Einsatz in speziellen Fällen wird anhand eines Hengstes mit deutlich oberhalb des Medians liegender Konzentrationen ionisierten Kalziums im Seminalplasma postuliert, welcher anamnestisch durch reduzierte Haltbarkeit des Ejakulates im Versand und durch einen im Vergleich zu den anderen Probanden relativ hohen Anteil an elektronenmikroskopisch detektierbaren Akrosomenreaktionen auffiel.

Insgesamt stellte sich die TEM im Rahmen dieser Untersuchungen als geeignete Methode zur Fertilitätsdiagnostik heraus, die in speziellen Fällen ergänzend und auch zur ätiologischen Abklärung Anwendung finden sollte. Insbesondere aufgrund des Nachweises einer deutlichen Korrelation zwischen Fertilität und prozentualem Anteil abgehobener Akrosomen stellt die TEM eine wertvolle Erweiterung des derzeitigen Methodenspektrums zur Beurteilung equiner Ejakulate in Bezug auf die Befruchtungsfähigkeit dar.

Auch die Analysen des Seminalplasmas sind somit im Rahmen der erweiterten Ejakulatdiagnostik empfehlenswert. Hierbei muss allerdings betont werden, dass hinsichtlich der Fertilität ausschließlich das Spurenelement Zink besondere Beachtung verdient, da sich trotz zahlreicher Korrelationen zu konventionellen Ejakulatparametern für die übrigen gemessenen Seminalplasmabestandteile keine signifikanten Korrelationen zu den anamnestisch erhobenen Fruchtbarkeitsdaten ergaben.

7. SUMMARY

Diagnostic of male infertility often leads to unsatisfactory results, because a substantial proportion of possible reasons, especially dysfunctions of spermatozoa, can not be detected with classical examination techniques which are mainly based on light microscopy. This also applies to stallions in which poor fertilisation occurs quite often in comparison with other mammalian species.

Thus, in this study the use of transmission electron microscopy (TEM) and biochemical analysis of seminal plasma was investigated as diagnostic tools in addition to classical routine methods. TEM may be especially suited because of its capacity to picture at high resolution sperm specific fine structures, like acrosome and tail. Likewise, biochemical analysis of enzyme activities and concentrations of macro- and microelements in seminal plasma could provide information on the occurrence of pathospermia and their causes. Thus, the aim of this work was to establish reference values in normally fertile probands for the parameters examined and then to test the methods for their suitability in fertility diagnostic in stallion.

In total, ejaculates of 73 stallions were available for examination. In 43 of these animals, fertility was known. Based on the conception rates of the last breeding season, the animals were classified as fertile (conception rates 70-100 %), subfertile (conception rates 10-70 %) and infertile (conception rates < 10 %). However, these data were provided to the examiner only after completion of evaluation. Furthermore, the ejaculates were classified into the categories “normal”, “minor deviations”, “major deviations” for comparison of classical parameters with seminal plasma dates. Samples

with “minor” deviations showed small, probes with “major” deviations considerable aberrances of at least one parameter in classical sperm analysis.

Immediately after desemination of the stallions, a conventional macroscopic, chemical-physical and lightmicroscopic semen analysis was performed and seminal plasma was obtained by centrifugation of semen. Additionally, a semen aliquot was fixed with 2 % glutaraldehyde and 0.1 % picric acid and processed for TEM. Samples for TEM sperm analysis were collected in spring from the stallions with known fertility and 200 acrosomes, sperm heads, midpieces and cross sections of tails and 100 longitudinal sections of tails were evaluated. For biochemical analysis, seminal plasma samples were collected in spring, summer and late autumn/winter. 27 stallions were examined only once, 35 animals twice and 11 three times. In seminal plasma samples, activities of Aspartate-Amino-Transferase (AST), Glutamate Dehydrogenase (GLDH), Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), Alkaline Phosphatase (AP), Acid Phosphatase (SP), Creatinine Kinase (CK) and Lactate Dehydrogenase (LDH) were measured as well as the concentrations of the macroelements sodium, potassium, calcium (total, ionised), magnesium, phosphate and chloride and of the microelements copper, iron and zinc.

With TEM, a significant correlation was found between an increased percentage of acrosomal deformities (detached acrosomes) and reduced fertility ($p = 0.034$; $r = -0.31$). In fertile stallions, with 4.9 (3.2) % a lower frequency [$\bar{x}_g$ (SF)] was found than in subfertile [7.9 (1.9)] and infertile stallions [11.4 (4.2)]. Although the suitability of TEM for identification of stallions with impaired fertility was not examined here, the results of this study suggest that TEM evaluation of acrosomes is a valuable diagnostic tool in the assessment of fertility in stallions.

Using TEM, for the first time spermatids and macrophages could be identified in equine ejaculates. A correlation between the occurrence of these cells and fertility could not be proven. Furthermore, this study provided a first description of the so called “bizarre forms”, an accumulation of head and cross and longitudinal sections of tail within one common membrane, in stallion semen succeeded. They were found in 15.0 (2.1) % in ejaculate samples. These structures were hitherto only mentioned in red wolf and were discussed as a primary anomaly of spermatozoa in this species.

Analysis of seminal plasma also allows differentiated estimation about the quality of the ejaculate. In this regard, among the enzymes examined especially LDH, AP and SP have to be mentioned. Significant correlations between LDH and motility ($p = 0.0062$, $r = 0.3217$), progressive motility ($p = 0.0048$, $r = 0.33$), sperm count ($p = 0.025$; $r = 0.2694$) and volume ($p = 0.009$; $r = -0.3079$) were found. For AP and SP which in the male genital tract are mainly expressed in the testis and epididymidis, a significant positive correlation to sperm count ($p(\text{SP, AP}) < 0.0001$; $r(\text{SP}) = 0.4808$, $r(\text{AP}) = 0.6154$) could be verified. This supports the hypothesis that both enzyme activities are useful parameters to assess the degree of semen mobilisation from testicular and epididymal reservoirs during the desemination reflexes. Consistent with the testicular and epididymal expression of AP and SP, a negative correlation of AP resp. SP to volume ($p(\text{SP}) = 0.0004$, $r(\text{SP}) = -0.412$; $p(\text{AP}) < 0.0001$, $r(\text{AP}) = -0.5696$) was found.

Concerning the microelement concentrations in seminal plasma, a significant correlation between fertility and zinc concentrations was found in summer ($p = 0.017$) and late autumn/winter ($p = 0.048$) but not in spring. Furthermore, significant differences of copper concentrations existed between normal semen samples and those with major

deviations as well as of iron concentrations between normal ejaculates and those with minor deviations which suggest that these parameters may be suitable as diagnostic tools.

A significant correlation between spontaneous acrosomal reactions detected with TEM and increased concentrations of ionised calcium in seminal plasma could also be shown. The use of calcium measurement in certain cases is illustrated by a stallion in which semen quality was profoundly reduced after storage or shipping. High concentrations of ionised calcium in seminal plasma and a high rate of acrosomal reactions have been confirmed in this animal.

In conclusion, results of this study indicate that TEM is a useful diagnostic in stallions that should be applied in addition to conventional semen analysis.

Analysis of seminal plasma is also advisable for advanced ejaculate diagnostic. However, it has to be emphasised that despite many correlations between seminal plasma parameters and parameters of conventional ejaculate analysis only zinc concentrations exhibited a significant correlation to fertility data.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aafjes, J.H.; Blijenberg, B.G.; Wolffensperger-van Oort, H.J.; Schenck, P.E. (1985)
Enzyme activity of human ejaculates, relation with abnormal liquefaction.
Andrologia 17 (1), 87-91
2. Abdou, M.S.S.; El-Guindi, M.; Mostafa, M.; El-Whishy, M.; Farahat, A. (1974)
Comparative study of the phosphatase activity in the semen of bovines (*Bubalis* and *bos taurus*) in Egypt.
Zentralbibl Vet Med 21, 759-767
3. Abraham-Peskir, J.V.; Chantler, E.; Uggerhoj, E. (2000)
Significance of plasmalemma disruption in bovine and equine spermatozoa.
Theriogenology 53, 1075-1086
4. Afzelius, B.A.; Dallai, R.; Lanzavecchia, S.; Bellon, P.L. (1995)
Flagellar structure in normal human spermatozoa and in spermatozoa that lack dynein arms.
Tissue Cell 27 (3), 241-247
5. Amann, R.P.; Thompson, D.L. (Jr.); Squires, E.L.; Pickett, B.W. (1979)
Effects of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal sperm reserves in stallions.
J Reprod Fert, Suppl 27, 1-6
6. Amann, R.P.; Cristanelli, M.J.; Squares, E.L. (1987)
Proteins in stallion seminal plasma.
J Reprod Fert, Suppl 35, 113-120

7. Andersen Berg, K.; Filseth, O.; Engeland, E. (1996)
A sperm midpiece defect in a hereford bull with variable semen quality and
freezability.
Acta vet scand 37, 367-373
8. Arienti, G.; Carlini, E.; De Cosmo, A.M.; Di Profio, P.; Palmerini, C.A.
(1998)
Prostasome-like particles in stallion semen.
Biol Reprod 59, 309-313
9. Arver, S.; Sjöberg, H. E. (1981)
Ionized calcium in human semen.
Horm Metabol Res 13, 68-69
10. Asseo, P.P.; Panidis, D.K.; Papadimas, J.S.; Ikkos, D.G. (1981)
Creatine kinase in seminal plasma of infertile men: activity and isoenzymes.
Int J Androl 4 (4), 431-439
11. Assink, H. A.; Brouwer, H.J.; Blijenberg, B.G.; Leijnse, B. (1983)
The influence of the label on the quality of a solid-phase immunoassay:
evaluation of a commercial ELISA kit for serum ferritin.
J Clin Chem Biochem 21, 695-702
12. Austin, C.R.; Bishop, M.W.H. (1958)
Some features of the acrosome and perforatorium in mammalian
spermatozoa.
Proc R Soc 149, 234-240
13. Bacetti, B.; Collodel, G.; Piomboni, P. (1996)
Apoptosis in human ejaculated sperm cells (Notulae seminologicae 9).
J Submicrosc Cytol Pathol 28 (4), 587-596

14. Bader, H. (2001)
10. Andrologie beim Hengst
In: Veterinärmedizinische Andrologie.
Busch, W.; Holzmann, A. (eds.)
Schattauer, Stuttgart, 362-364
15. Bader, H.; Hüttenrauch, O. (1966)
Fraktionierte Gewinnung von Hengstsperma.
Dtsch Tierärztl Wochenschr 73 (21), 547-548
16. Bader, H.; Tischner, M. (1982)
Künstliche Besamung beim Pferd.
In: Künstliche Besamung bei Nutztieren
Busch, W., Köhler, K.; Peter, W. (eds.)
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 563-575
17. Bader, H.; Gremmes, S.; Sieme, H.; Paar, M.; Hoppen, H.O.; Brandt, K.P.
(1991)
Subfertility in the male Przewalski horse.
J Reprod Fert 44, 676-677
18. Baldauf, C.; Miska, W.; Weidner, W.; Schill, W.B.; Henkel, R. (2003)
Principal cells in the cauda epididymidis resorb zinc eliminated from
spermatozoa.
Andrologia 35 (1): 3
19. Ball, B.A.; Gravance, C.G.; Medina, V.; Baumber, J.; Liu, I.K. (2000)
Catalase activity in equine semen.
Am J Vet Res 61 (9), 1026-1030
20. Bane, A. (1961)
Acrosomal abnormality associated with sterility in boar.

- Proc 4th Int Congr Anim Reprod, The Hague, 810-817
- zitiert nach: Hurtgen, J.P.; Johnson, L.A. (1982)
- Fertility of stallions with abnormalities of the sperm acrosome.
- J Reprod Fert, Suppl 32, 15-20
21. Barrier-Battut, I.; Dellajarraud, H.; Legrand, E.; Bruyas, J.-F.; Fiéni, F.; Tainturier, D.; Thorin, C.; Pouliquen, H. (2002)
- Calcium, magnesium, copper, and zinc in seminal plasma of fertile stallions, and their relationship with semen freezability.
- Theriogenology 58, 229-232
22. Barth, A.D.; Oko, R.J. (1989)
- Defects of the sperm tail.
- In: Abnormal morphology of bovine sperm.
- IS Iowa State University Press/Ames, Iowa, 214-270
- zitiert nach: Andersen Berg, K.; Filseth, O.; Engeland, E. (1996)
- A sperm midpiece defect in a hereford bull with variable semen quality and freezability.
- Acta vet scand 37, 367-373
23. Bedford, J.M. (1970)
- Sperm capacitation and fertilization in mammals.
- Biol Reprod Suppl 2, 128-158
24. Berndtson, W.E.; Jones, L.S. (1989)
- Relationship of intratesticular testosterone content of stallions to age, spermatogenesis, Sertoli cell distribution and germ cell- Sertoli cell ratios.
- J Reprod Fert 85, 511-518
25. Bielanski, W. (1951)
- Characteristics of the semen of the stallion. Macro- and microscopic

investigations with estimation of fertility.

Mém Acad Pol Sci Ser B 16, 1-59

zitiert nach: Bielanski, W.; Dudek, E.; Bittmar, A.; Kosiniak, K. (1982)

Some characteristics of common abnormal forms of spermatozoa in highly fertile stallions.

J Reprod Fert, Suppl 32, 21-26

26. Bielanski, W. (1975)

The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination.

J Reprod Fert, Suppl 23, 19-24

27. Bielanski, W. (1981)

Bibliography on spermatozoan morphology in the stallion.

Biblphy Reprod 38, 501-502, 595-596

zitiert nach: Bielanski, W.; Dudek, E.; Bittmar, A.; Kosiniak, K. (1982)

Some characteristics of common abnormal forms of spermatozoa in highly fertile stallions.

J Reprod Fert, Suppl 32, 21-26

28. Bielanski, W.; Kaczmarowski, F. (1979)

Morphology of spermatozoa in semen from stallion of normal fertility.

J Reprod Fert, Suppl 27, 39-45

29. Bielanski, W.; Kaczmarowski, F. (1980)

Microtubules in the neck region of stallion spermatozoa.

Proc. 9th Int Cong Anim Reprod Artif Insem, 5, 130-133

zitiert nach: Heath, E.; Aire, T.; Fujiwara, K.F. (1985)

Microtubular mass defect of spermatozoa in the stallion.

Am J Vet Res 46, 1121-1125

30. Bielanski, W.; Dudek, E.; Bittmar, A.; Kosiniak, K. (1982)
Some characteristics of common abnormal forms of spermatozoa in highly fertile stallions.
J Reprod Fert, Suppl 32, 21-26
31. Bilgili, S.F.; Renden, J.A.; Sexton, K.J. (1985)
Fluorometry of Poultry Semen: Its application in the determination of viability, enzyme leakage, and fertility.
Poult Scien 64, 1227-1230
32. Bittmar, A.; Kosiniak, K. (1992)
The role of selected biochemical components of equine seminal plasma in determining suitability for deep-freezing.
Arch Vet Pol 32, 17-29
33. Bjorndahl, L.; Kjellberg, S.; Roomans, G.M.; Kvist, U. (1986)
The human sperm nucleus takes up zinc at ejaculation.
Int J Androl 9 (1), 77-80
34. Blom, E. (1945)
Spontaneous detachment of the galea capitis in spermia of bull and stallion.
Skand Vet Tidskr 35, 779-789
zitiert nach: Bielanski, W.; Dudek, E.; Bittmar, A.; Kosiniak, K. (1982)
Some characteristics of common abnormal forms of spermatozoa in highly fertile stallions.
J Reprod Fert, Suppl 32, 21-26
35. Blom, E. (1950)
Eine Schnellfärb-Methode mit Eosin und Nigrosin zur Unterscheidung von lebenden und toten Spermien.
Wien Tierärztl Wschr 37, 441-442

36. Blom, E. (1983)
Pathological conditions in the genital organs and in semen as grounds for rejection of breeding bulls for import or export to and from Denmark.
Nord Vet Med 35, 105-130
37. Blom, E.; Birch-Andersen, A. (1962)
Ultrastructure of the sterilizing knobbed sperm defect in the bull.
Nature, Lond. 194, 989-990
38. Blue, B.J.; McKinnon, A.O.; Squires, E.L.; Seidel, G.E. Jr.; Muscari, K.T. (1989)
Capacitation of stallion spermatozoa and fertilization of equine oocytes in vitro.
Eq Vet J, Suppl 8, 111-116
39. Boström, K.; Andersson, L. (1971)
Creatine phosphokinase relative to acid phosphatase, lactate dehydrogenase, zinc and fructose in human semen, with special reference to chronic prostatitis.
Scand J Urol Nephrol 5, 123-132
40. Braun, J.; Torres-Boggino, F.; Hochi, S.; Oguri, N. (1994)
Effect of seminal plasma on motion characteristics of epididymal and ejaculated stallion spermatozoa during storage at 5°C.
Dtsch Tierärztl Wochenschr 101 (8), 301-304
41. Bretschneider, L.H. (1948)
Een normentafel ten gebruike bij de morphologische beoordeling van stierensperma.
Tijdschrift Diergeneeskunde 73, 421-433

42. Brinsko, S.P.; Crockett, E.C.; Squires, E.L. (2000)
Effect on centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage.
Theriogenology 54 (1), 129-136
43. Brown, K.I.; Crabo, B.G.; Graham, E.F.; Pace, M.M. (1971)
Some factors affecting loss of intracellular enzymes from spermatozoa.
Cryobiol 8, 220-224
44. Busch, W.; Köhle, K.; Peter, W. (1982)
Künstliche Besamung bei Nutztieren
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 219-232
45. Busch, W.; Holzmann, A. (2001)
Veterinärmedizinische Andrologie- Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren.
Schattauer Verlag, 2001
46. Carbone, D.J., Jr.; McMahon, J.T.; Levin, H.S.; Thomas, A.J., Jr.; Agarwal, A. (1998)
Role of electron microscopy of sperm in the evaluation of male infertility during the era of assisted reproduction.
Urol 52 (2), 301-305
47. Carpino, A.; Siliciliano, L.; Petroni, M.F.; De Stefano, C.; Aquila, S.; Ando, S.; Petrone, M.F. (1998)
Low seminal zinc bound to high molecular weight proteins in asthenozoospermic patients: Evidence of increased sperm zinc content in oligoasthenozoospermic patients.
Hum Reprod 13 (1), 111-114

- Erratum in: Hum Reprod 13 (6), 1750, Petrone, M.F. (corrected to Petroni, M.F.)
48. Carrell, D.T.; Emery, B.R.; Liu, L.(1999)
Charcterization of aneuploidy rates, protamine levels, ultrastructure, and functional ability of round-headed sperm from two siblings and implications for intracytoplasmic sperm injection.
Fert Steril 71 (3), 511-516
49. Carver, D.A.; Ball, B.A. (2002)
Lipase activity in stallion seminal plasma and the effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5 °C.
Theriogenology 58, 1587-1595
50. Casey, P.J.; Hillmann, R.B.; Robertson, K.R.; Yudin, A.I.; Liu, I.K.; Drobnis, E.Z. (1993)
Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm.
J Androl 14 (4), 289-297
51. Chevalier-Clément, F.; Hochereau de Reviers, M.T.; Perreau, C.; Magistrini, M. (1991)
Alterations of the semen and genital tract of infertile stallions.
J Reprod Fert, Suppl 44, 657-658
52. Chia, S.E.; Ong, C.N.; Chua, L.H.; Ho, L.M.; Tay, S.K. (2000)
Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men.
J Androl 21 (1), 53-57
53. Claassens, O.E.; Menkveld, R.; Franken, D.R.; Pretorius, E.; Swart, Y.; Lombard, C.J.; Kruger, T.F. (1992)

- The acridine orange test: determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro.
Hum Reprod 7, 242-247
54. Colenbrander, B.; Fazeli, A.R.; van Buiten, A.; Parlevliet, J.; Gadella, B.M. (1992)
Assessment of sperm cell membrane integrity in the horse.
Acta vet scand Suppl 88, 49-58
55. Colenbrander, B.; Gadella, B.M.; Stout, T.A.E. (2003)
The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility.
Reprod Dom Anim 38, 305-311
56. Comhaire, F.H.; Vermeulen, L.; Pieters, O. (1989)
Study of the accuracy of physical and biochemical markers in semen to detect infectious dysfunction of the accessory sex glands.
J Androl 10 (1), 50-53
57. Courtade, M.; Lagorce, C.; Bujan, L.; Caratero, C.; Mieusset, R. (1998)
Clinical characteristics and light and transmission electron microscopic sperm defects of infertile men with persistent unexplained asthenozoospermia.
Fertil Steril 70 (2), 297-304
58. Courtens, J.L.; Loir, M. (1981)
The spermatid manchette of mammals: Formation and relations with the nuclear envelope and the chromatin.
Reprod Nutr Dev, 21, 467-477
zitiert nach: Heath, E.; Aire, T.; Fujiwara, K.F. (1985)
Microtubular mass defect of spermatozoa in the stallion.
Am J Vet Res 46, 1121-1125

59. Cragle, R.G.; Muntz, J.H. (1956)
Mineral levels in bovine semen and seminal plasma.
J Dairy Sci 39, 922-926
60. Cragle, R.G.; Salisbury, G.W.; Vandenmark (1958, a)
Sodium, potassium, calcium and chloride distribution in bovine semen.
J Dairy Sci 39, 922-926
61. Cragle, R.G.; Salisbury, G.W.; Muntz, J.H. (1958, b)
Distribution of bulk and trace minerals in bull reproductive tract fluids and semen.
J Dairy Sci 41, 1273-1277
62. Cutler, R.S. (1974)
The fertility of stallions.
Vet Rec 94 (3), 55
63. Dashniam, B.; Glaser, R.; Petzoldt, R. (1981)
Individuelle Unterschiede der Natrium- und Kaliumkonzentration im Seminalplasma von Bullen.
Arch Exp Vet 35, 553-559
64. Day, F.T. (1940)
The stallion and fertility, the technique of sperm collection and insemination.
Vet Rec 52, 597-602
65. De Martino, C.; Francavilla, S.; Fabrinini, A.; Accinni, L. (1989)
Mammalian spermatogenesis and disorders in man.
In: van Blerkom, X; Motta, Y (eds)
Ultrastructure of human gametogenesis and early embryogenesis.
Kluwer, London, 1-32

66. Dixon, W. (1993)
BMDP Statistical Software Manual, Vol. 1 and 2.
University of California Press, Berkley, Los Angeles, London
67. Dondero, F.; Sciarra, F.; Isidori, A. (1972)
Evaluation of the relationship between plasma testosterone and human seminal citric acid.
Fol Endocrin 23, 168-171
68. Dondero, F.; Sciarra, F.; Isidori, A. (1974)
Evaluation of the relationship between plasma testosterone and human seminal acid phosphatase.
Fol Endocrin 27, 185-188
69. Dott, H.M. (1975)
Morphology of stallion spermatozoa.
J Reprod Fert 23, 41-46
70. Dowsett, K.F.; Pattie, W.A. (1982)
Characteristics and fertility of stallion semen.
J Reprod Fert, Suppl 32, 1-8
71. Dubiel, A.; Stanczyk, J.F.; Krolinski, J.; Michalewska, M. (1980)
Concentration of ions of selected trace elements in the ejaculates of boars after interruption of the flow of the secretion from the testes, epididymidis and accessory sexual glands.
Pol Arch Weter 21 (4), 485-492 (Abstract)
72. Egbunike, G.N.; Branscheid, W.; Pfister, J.; Holtz, W. (1986)
Changes in porcine sperm lactate dehydrogenase isoenzymes during sperm maturation.
Andrologia 18, 108-113

73. van Eijk, H.G., Wiltink, W.F.; Bos, G., Gossens, J.P. (1974)
Measurement of the iron content in human liver specimens.
Clin Chim Acta 50, 275-280
74. El-Hajj Ghaoui, R.; Thomson, P.C.; Evans, G.; Maxmell, W.M.C. (2004)
Characterization and localization of membrane vesicles in ejaculate fractions
from the ram, boar and stallion.
Reprod Dom Anim 39, 173-180
75. Eliasson, R. Mossberg, B.; Camer, P.; Afzelius, B.A. (1977)
The immotile-cilia syndrome: a congenital ciliary abnormality as an
etiologic factor in chronic airway infection and male sterility.
N Engl J Med 297, 1-6
76. Eliasson, R.; Virji, N. (1985)
LDH-C4 in human seminal plasma and its relationship to testicular function,
II. Clinical aspects.
Int J Androl 8 (3), 201-214
77. Elzanaty, S.; Richthoff, J.; Malm, J.; Giwercman, A. (2002)
The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm
motility.
Hum Reprod 17, 2904-2911
78. Erbing, R. (1988)
Beitrag zur Bestimmung blut- und seminalplasmatischer Parameter von
Deck- und Besamungsebern.
Vet Med Dissertation, Gießen
79. Foote, R.H. (1980)
Artificial insemination.
In: Hafez, E.S.E. (ed.)

- Reproduction in farm animals, 4 th edition
Lea & Febiger, Philadelphia: 223-238
80. Friend, D.S.; Rudolf, I. (1974)
Acrosomal disruption in sperm. Freeze-fracture of altered membranes.
J Cell Biol 63, 466-479
81. (Frenkel) Paz, G.; Sofer, A.; Homonnai, Z.T.; Kraicer, P.F. (1977)
Human semen analysis: Seminal plasma and prostatic fluid compositions and
their interrelations with sperm quality.
Int J Fert 22, 140-147
82. Galloway, D.B. (1977)
The diagnosis in practice of reduced fertility in stallions.
Proceedings No. 31, Cours for Veterinarians, University of Sydney: 197-205
zitiert nach: Landeck, A. G. (1997)
Untersuchungen zum jahreszeitlichen Vorkommen und der Korrelation
testikulärer Sexualhormone beim Hengst im Blut- und Seminalplasma, deren
Verteilung im Ejakulat und Beziehungen zur Ejakulatqualität.
Vet Med Dissertation, Gießen
83. Gastauer, R. (1974)
Beitrag zu Enzymaktivitäten und Elektrolytkonzentrationen im Blutserum und
Seminalplasma beim Bullen.
Vet Med Dissertation, München
84. Gerlach, T.; Aurich, J.E. (2000)
Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster.
Anim Reprod Sci 58 (3-4), 197-213

85. Gershbein, L.; Thielen, D.R. (1988)
Enzymatic and electrolytic profiles of human semen.
Prostate 12 (3), 263-269
86. Goldberg, E.; Hawtrey, C. (1967)
The ontogeny of sperm-specific lactate dehydrogenase in mice.
J exp Zool 164, 309
87. Gonzalez Buitrago, J.M.; Miralles, J.M.; Munoz, M.H.; Meza, S.; Alonso, M.T.; Garcia Diez, L.C. (1980)
Seminal plasma creatine kinase activity in fertility studies.
Arch Androl 5, 355-360
88. Gonzalez Buitrago, J.M.; Garcia Diez, L.C.; Meza, S.; Juanes, M. (1981)
Gammaglutamyl-transferase activity in human semen. Application to fertility studies.
Med Clin (Barc) 76 (9), 401-404
89. Goodrowe, K.L.; Heath, E. (1984)
Disposition of the manchette in the normal equine spermatid.
Anat Rec 209, 177-183
90. Graham, E.F.; Pace, M.M. (1967)
Some biochemical changes in spermatozoa due to freezing.
Cryobiol 4, 75-84
91. Gravance, C.G.; Liu, I.K.M.; Davis, R.O.; Hughes, J.P.; Casey, P.J. (1996)
Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa.
J Reprod Fert 108, 41-46
92. Griggers, S.; Paccamonti, D.L.; Thompson, R.A.; Eilts, B.E. (2001)
The effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine

spermatozoal motility.

Theriogenology 56 (4), 613-622

93. Grondahl, C.; Grondahl, M.L.; Hyttel, P.; Greve, T. (1994)

Acrosomal status in fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa evaluated by scanning electron microscopy.

Anat Embryol 190, 195-200

94. Guerin, J.F.; Menezo, Y.; Czyba, J.C. (1979)

Enzyme comparative study of spermatozoa and seminal plasma in normal and subfertile man.

Arch Androl 3, 251-257

95. Haag, F.M. (1959)

Evaluation of "dismount" semen in Thoroughbred breeding

J Am vet med Ass 134, 312-314

96. Hallak, J.; Sharma, R.K.; Pasqualotto, F.F.; Ranganathan, P.; Thomas, A.J.

Jr.; Agarwal, A. (2001)

Creatine kinase as an indicator of sperm quality and maturity in men with oligospermia.

Urology 58 (3), 446-451

97. Hancock, J.L.; Trevan, D.J. (1957)

The acrosome and post-nuclear cap of bull spermatozoa.

Jl R microsc Soc 76, 77-83

zitiert nach: Hurtgen, J.P.; Johnson, L.A. (1982)

Fertility of stallions with abnormalities of the sperm acrosome.

J Reprod Fert, Suppl 32, 15-20

98. Harasymowycz, J. Ball, L.; Seidel, G.E. (1976)

Evaluation of bovine spermatozoal morphologic features after staining and

fixation.

Am J vet Res 37, 1053-1057

99. Heath, E. (1981)

Microtubular masses. A defect in equine spermatozoa

Conf. Res. Workers in Animal Diseases, Chicago Abstr. 41

zitiert nach: Bielanski, W.; Dudek, E.; Bittmar, A.; Kosiniak, K. (1982)

Some characteristics of common abnormal forms of spermatozoa in highly fertile stallions.

J Reprod Fert, Suppl 32, 21-26

100. Heath, E.; Ott, R.S. (1982)

Diadem /crater defect in spermatozoa of a bull.

Vet Rec 110, 5-6

101. Heath, E.; Aire, T.; Fujiwara, K.F. (1985)

Microtubular mass defect of spermatozoa in the stallion.

Am J Vet Res 46, 1121-1125

102. Heite, H.J.; Wetterauer, U. (1977)

Unusually high gamma-glutamyltransferase level in the semen and its diagnostic significance.

Hautarzt 28 (5), 364-365

103. Hellander, J.C.; Samper, J.C.; Crabo, B.G. (1991)

Fertility of a stallion with low sperm motility and a high incidence of an unusual tail defect.

Vet Rec 128, 449-451

104. Hellman, E.; Plöen, L.; Settergren, I.; Nicander, L. (1980)

Nordisk Veterinärmedicin 1980, 32: 423

zitiert nach: Hellander, J.C.; Samper, J.C.; Crabo, B.G. (1991)

- Fertility of a stallion with low sperm motility and a high incidence of an unusual tail defect.
Vet Rec 128, 449-451
105. Hendrikse, J. (1972)
Some observations on the reproduction of the horse.
Proc 7th Int Congr Anim Reprod & A., Munich, 3: 2185-2188
zitiert nach: Bielanski, W.; Dudek, E.; Bittmar, A.; Kosiniak, K. (1982)
Some characteristics of common abnormal forms of spermatozoa in highly fertile stallions.
J Reprod Fert, Suppl 32, 21-26
106. Heninger, N.L.; Staub, C.; Blanchard, T.L.; Johnson, L.; Varner, D.D.; Forrest, D.W. (2004)
Germ cell apoptosis in the testes of normal stallions.
Theriogenology 62, 283-297
107. Henkel, R.; Bittner, J.; Weber, R.; Hüther, F.; Miska, W. (1999)
Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility.
Fert Steril 6: 1138-1143
108. Henkel, R.R.; Defosse, K.; Koyro, H.-W.; Weissmann, N.; Schill, W.-B. (2003)
Estimate of oxygen consumption and intracellular zinc concentration of human spermatozoa in relation to motility.
Asian J Androl 1, 3-8
109. Hillmann, G. (1971)
Continuous photometric measurement of prostate acid phosphatase activity.
Z Klin Chem Klin Biochem 9, 273-274

110. Hillmann, K.H.; Treu, H. (1973)
Darstellung und Messung morphologischer und enzymatischer
Veränderungen beim Tiefgefrieren von Eberspermien.
Zuchthygiene 8, 105-112
111. Hillmann, K.H.; Treu, H. (1974)
Zum Vorkommen der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase im Hengstsamen
und ihre Beziehungen zu anderen Eigenschaften des Spermas.
Zuchthygiene 9, 129-136
112. Hinton, B.T.; Lan, Z.J.; Rudolph, D.B.; Labus, J.C.; Lye, R.J. (1998)
Testicular regulation of epididymal gene expression.
J Reprod Fert, Suppl 53, 47-58
113. Hofmo, P.O.; Andersen Berg, K. (1989)
Electron microscopical studies of membrane injuries in Blue fox
spermatozoa subjected to the process of freezing and thawing.
Cryobiology 26, 124-131
114. van den Holst, W. (1975)
A study of the morphology of stallion semen during the breeding and non-
breeding seasons.
J Reprod Fert, Suppl 23, 87-89
115. Holstein, A.F. (1975)
Morphological studies on abnormal human spermatids and spermatozoa.
Virchows Arch A Pathol Anat Histol 367, 93-112
116. Holstein, C. (1983)
Morphology of free immature germ cells in human testis, epididymis and
ejaculate.
Andrologia 15, 7-25

117. Holstein, A.F.; Roosen-Runge, E.C. (1981)
Atlas of human spermatogenesis
Grosse Verlag, Berlin
118. Huang, Y.L.; Tseng, W.C.; Cheng, S.Y.; Lin, T.H. (2000)
Trace elements and lipid peroxidation in human seminal plasma.
Biol Trace Elem Res 76 (3), 207-215
119. Hurtgen, J.P.; Johnson, L.A. (1982)
Fertility of stallions with abnormalities of the sperm acrosome.
J Reprod Fert, Suppl 32, 15-20
120. Hyttel, P.; Callesen, H.; Greve, T.; Schmidt, M. (1991)
Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle.
Theriogenology 35, 91-108
121. Janett, F.; Thun, R.; Niederer, K.; Burger, D.; Hässig, M. (2003)
Seasonal changes of semen quality and freezability in the warmblood stallion.
Theriogenology 60, 453-461
122. Jasko, D.J.; Lein, D.H., Foote, R.H. (1990)
Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988).
J Am Vet Med Assoc 197 (3), 389-394
123. Jasko, D.J.; Little, T.V.; Lein, D.H., Foote, R.H. (1991)
Determination of stallion semen quality and its relationship with fertility.
J Reprod Fert, Suppl 44, 649-650
124. Jasko, D.J.; Little, T.V.; Lein, D.H.; Foote, R.H. (1992)
Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with

- fertility in stallion: 64 cases (1987-1988).
J Am Vet Med Assoc 200 (7), 979-985
125. Jettmar, E. (1981)
Untersuchungen über die Beziehungen zwischen dem Phosphatasegehalt im
Seminalplasma und in den Spermatozoen sowie verschiedenen
Samenparametern des Ebers.
Vet Med Dissertation, Wien
126. Jimenez Verdejo, A.; Carrillo de Albornoz, E.O.; Luna Maldonado, A.;
Jimenez Verdejo, J.; Zuluaga Gomez, A. (1998)
Comparative study of determined biochemical parameters in semen of
vasectomized and non-vasectomized subjects.
Arch Esp Urol 51 (8), 811-817; Abstract
127. Johnson, L.; Berndtson, W.E.; Pickett, B.W. (1976)
An improved method for evaluating acrosomes of bovine spermatozoa.
J Anim Sci 42, 951-954
128. Johnson, L.; Thompson, D.L. (Jr.) (1983)
Age related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm
production and serum concentrations of FSH, LH and testosterone in
stallion.
Biol Reprod 29, 777- 789
129. Johnson, L.; Varner, D.D.; Tatum, M.E.; Scrutchfield, W.L. (1991, a)
Season but not age affects Sertoli cell number in adult stallions.
Biol Reprod Suppl 45 (3), 404-410
130. Johnson, L.; Varner, D.D.; Thompson, J.R. (1991, b)
Effect of age and season on the establishment of spermatogenesis in the

horse.

J Reprod Fert, Suppl 44, 87-97

131. Jones, L.S.; Berndtson, W.E. (1986)

A quantitative study of Sertoli cell and germ cell populations as related to sexual development and aging in the stallion.

Biol Reprod 35 (1), 138-148

132. Kamp, G.; Büsselmann, G.; Lauterwein, J. (1996)

Spermatozoa: models for studying regulatory aspects of energy metabolism.

Experientia 52, 487-494

133. Katongole, C.B.; Naftolin, F.; Short, R.V. (1974)

Seasonal variations in blood LH and testosterone levels in rams.

J Endocrinol 60, 101-106

134. Kavanagh, J.P. (1985)

Sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, citrate and chloride content of human prostatic and seminal fluid.

J Reprod Fert 75 (1), 35-41

135. Kenney, R.M.; Kingston, R.S.; Rajamannan, A.H.; Rambers, C.F., Jr. (1971)

Stallion semen characteristics for predicting fertility.

Proc. Am Ass. Equine Pract., Chicago: 53-57

136. Klug, E. (1982)

Untersuchungen zur klinischen Andrologie des Pferdes.

Habilitationsschrift, Hannover

zitiert nach: Aurich, C.; Bader, H.; Töpfer-Petersen, E. (1995)

Diagnostik von Fertilitätsstörungen beim männlichen Pferd

Prakt Tierarzt 10, 905-918

137. Klug, E.; Sieme, H. (2003)
Samenübertragung beim Pferd in Theorie und Praxis.
Verlag M. & H. Schaper Alfeld, Hannover
138. Koehler, J.K.; Platz, C.C.; Waddell, W.; Jones, M.H.; Behrns, S. (1998)
Semen parameters and electron microscope observations of spermatozoa of
the red wolf, *Canis rufus*.
J Reprod Fert 114, 95-101
139. Kohdaira, T.; Kinoshita, Y.; Konno, M.; Oshima, H. (1986)
Distribution of G-Glutamyl-Transpeptidase in male reproductive system of
rats and its age – related changes.
Andrologia 18, 610-617
140. Kosiniak, K.; Bittmar, A. (1991)
Prognosis of stallion semen freezability on the basis of biochemical tests.
J Reprod Fert, Suppl 44, 653-654
141. Krogenaes, A.; Andersen Berg, K.; Hafne, A.L.; Engeland, E. (1994)
Membrane alterations in bull spermatozoa after freezing and thawing and
after in vitro fertilization.
Acta vet scand 35, 17-26
142. Kraft, W.; Dürr, U.M. (1999)
Harnapparat-Wasserstoffionenkonzentration (pH-Wert).
Kraft, W.; Dürr, U.M. (eds.)
Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.
Schattauer, Stuttgart, 5. Auflage: 173
143. Küpfer, U. (1972)
Untersuchungen über Phosphataseaktivitäten des Samenplasmas gesunder

- Bullen.
Zuchthygiene 7, 145-152
144. Kwenang, A.; Kroos, M.J.; Koster, J.F.; van Eijk, H.G. (1987)
Iron, ferritin and copper in seminal plasma.
Hum Reprod 5, 387-388
145. Landeck, A. G. (1997)
Untersuchungen zum jahreszeitlichen Vorkommen und der Korrelation
testikulärer Sexualhormone beim Hengst im Blut- und Seminalplasma, deren
Verteilung im Ejakulat und Beziehungen zur Ejakulatqualität.
Vet Med Dissertation, Gießen
146. Laudat, A.; Foucault, P.; Palluel, A.M. (1997)
Relationship between seminal plasma LDH-C4 and spermatozoa with
acrosome anomalies.
Clin Chim Acta 265 (2), 219-224
147. Leidl, W. (1983)
Fortpflanzungsstörungen beim Pferd.
In: Küst, D.; Schaetz, F. und Leidl, W. (eds.)
Fortpflanzungsstörungen bei den Haustieren.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 247-287
148. Leidl, W.; Schefels, W.; Stolla, R.; Metzger, E. (1971)
Differenzierung und Befruchtungsvermögen pathologischer Spermien.
Dtsch Tierärztl Wochenschr 78, 129-134
149. Leonhard-Marek, S. (2001)
Beeinflussung der männlichen Fertilität durch Pharmaka, Umweltgifte und
Spurenelemente- Spurenelemente und Fertilität
In: Busch, W.; Holzmann, A. (eds.)

Veterinärmedizinische Andrologie

Schattauer Verlag, Stuttgart, S. 480-484

150. Livolant, F. (1984)

Cholesteric organization of DNA in the stallion sperm head.

Tissue Cell 16 (4), 535-555

151. López, M.L.; Grez, P.; Gribbel, I.; Bustos-Obregón, E. (1989)

Cytochemical and ultrastructural characteristics of the stallion epididymis (Equus Caballus).

J Submicrosc Cytol Pathol 21 (1), 103-120

152. López Alvarez, M.L.; Bustos Obregón, E. (1995)

Spermatophagy in the stallion epididymis: A scanning and transmission electron microscopy study.

Acta Anat 153, 181-188

153. Love, C.C.; Garcia, M.C.; Ricra, F.R.; Kenney, R.M. (1991)

Evaluation of measures taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion.

J Reprod Fert, Suppl 44, 99-105

154. Magistrini, M.; Chanteloube, P.; Palmer, E. (1987)

Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing.

J Reprod Fert, Suppl 35, 127-133

155. Mann, T. (1964)

The biochemistry of semen and of the male reproductive tract.

Methuen, London

156. Mann, T. (1969)

In: Reproduction in Domestic animals.

- Cole, H.H.; Cupps, P.T. (eds.)
2nd ed., 277
Academic Press, New York
157. Mann, T.; Lutwack-Mann, C. (1981)
Male reproductive function and semen.
Springer Verlag, New York
158. Marden, W.; Werthessen, N.T. (1956)
Influence of seminal fluid on sperm motility.
Fert Steril 7, 508-515
159. Massányi, P.; Trandzik, J.; Nad, P.; Toman, R.; Skalická, M.; Koréneková
(2003)
Seminal concentrations of trace elements in various animals and their
correlations.
Asian J Androl 5, 101-104
160. Meizel, S. (1978)
The mammalian sperm acrosome reaction: A biochemical approach.
In: Johnson, M.H. (ed.)
Development in mammals. Vol. 3
North Holland Pub., Amsterdam, The Netherlands, 164
161. Meizel, S. (1985)
Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by interaction
with the mammalian sperm surface.
Am J Anat 174, 285-302
162. Michelmann, H. W. (1983)
Die Bedeutung von Cholinesterase und Kreatinkinase in Eberejakulaten.
Tierärztl Umsch 38, 166-180

163. Minelli, A.; Moroni, M.; Martínez, E.; Mezzasoma, I.; Ronquist, G. (1998)
Occurrence of prostasome-like membrane vesicles in equine seminal plasma.
J Reprod Fert 114, 237-243
164. Nishikawa, Y. (1972)
Motility and fertilizing ability of frozen horse spermatozoa.
Proc 7th Int Symp Zootech, 155-167
zitiert nach: Amann, R.P.: Cristanelli, M.J.; Squares, E.L. (1987)
Proteins in stallion seminal plasma.
J Reprod Fert, Suppl 35, 113-120
165. Nishikawa, Y.; Waide, Y.; Onma, H. (1951)
Studies on A.I. in the horse. 6. Morphological studies on the horse
spermatozoa.
Bull Natn Inst Agric Sci, Tokyo Ser G 1, 29-36
zitiert nach: Bielanski, W.; Dudek, E.; Bittmar, A.; Kosiniak, K. (1982)
Some characteristics of common abnormal forms of spermatozoa in highly
fertile stallions.
J Reprod Fert, Suppl 32, 21-26
166. Nishikawa, Y.; Wade, Y.; Shinomiya, S. (1968)
Studies on deep freezing of horse spermatozoa.
Proc 6th Int Congr Anim Reprod & AI, Paris 2, 1589-1591
zitiert nach: Amann, R.P.: Cristanelli, M.J.; Squares, E.L. (1987)
Proteins in stallion seminal plasma.
J Reprod Fert, Suppl 35, 113-120
167. O'Donnell, J.M. (1969)
Intracellular levels of sodium and potassium in bull spermatozoa in relation

to cell metabolism.

J Reprod Fert 19, 207-209

168. Ott, R.S.; Heath, E.H.; Bane, A. (1982)

Abnormal spermatozoa , testicular degeneration, and varicocele in a ram.

Am J Vet Res 42, 241-245

169. Pace, M.M.; Graham, E.F. (1970)

The release of glutamic oxalacetic transaminase from bovine spermatozoa as a test method of assessing semen quality and fertility.

Biol Reprod 3, 140-146

170. Parlevliet, J.M.; Kemp, B.; Colenbrander, B. (1994)

Reproductive characteristics and semen quality in maiden dutch warmblood stallions.

J Reprod Fert 101, 183-187

171. Parlevliet, J.M.; Colenbrander, B. (1999)

Prediction of first season stallion fertility of 3-year-old Dutch Warmbloods with prebreeding assessment of percentage of morphologically normal live sperm.

Equine Vet J 31 (3), 248-251

172. Pattie, W.A.; Dowsett, K.F. (1982)

The repeatability of seminal characteristics of stallions.

J Reprod Fert,Suppl 32, 9-13

173. Pedersen, H.; Hammen, R. (1982)

Ultrastructure of human spermatozoa with complete subcellular derangement.

Arch Androl 9, 251-259

174. Persijn, J.P.; van der Slik, W.
A new method for the determination of gamma-glutamyltransferase in serum.
J Clin Chem Clin Biochem 14, 421-427
175. Petzoldt, R.; Pietsch, P.; Pietsch, Ch. (1985)
Die Verteilung und der Verlauf der Natrium-, Kalium- und Kalziumkonzentration im Seminalplasma von Bullen.
Arch Exp Vet 39, 309-318
176. Pickett, B.W. (1995)
The stallion: Retrospective analyses and opinions.
Biol Reprod Mono 1, 547-564
177. Pickett, B.W.; Sullivan, J.J.; Byers, W.W.; Pace, M.M.; Remmenga, E.E.
(1975, a)
Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa.
Fert Steril 26, 167-174
178. Pickett, B.W.; Sullivan, J.J.; Seidel, G.E. (Jr.) (1975, b)
Reproductive physiology of the stallion V.: Effect of frequency of ejaculation on seminal characteristics and spermatozoal output.
J Anim Sci 40, 917-923
179. Pickett, B.W.; Faulkner, L.C.; Seidel, G.E. (Jr.); Berndtson, W.E.; Voss, J.L.
(1976)
Reproductive physiology of the stallion VI.: Seminal and behavioral characteristics.
J Anim Sci 43, 617-625

180. Pickett, B.W.; Voss, J.L.; Squires, E.L. (1983)
Fertility evaluation of the stallion.
Comp Cont Educ Pract Vet 5, 194-202
zitiert nach: Kosiniak, K.; Bittmar, A. (1991)
Prognosis of stallion semen freezability on the basis of biochemical tests.
J Reprod Fert, Suppl 44, 653-654
181. Pickett, B.W.; Voss, J.L.; Bowen, R.A.; Squires, E.L.; Mc Kinnon, A.O.
(1987)
Seminal characteristics and total scrotal width (TSW) of normal and
abnormal stallions.
Proc Am Assoc equine Pract 33, 487-518
182. Pleban, P.A.; Mei, D.S. (1983)
Trace elements in human seminal plasma and spermatozoa.
Clin Chim Acta 113, 43-50
183. Polakoski, K.L.; Kopta, M. (1982)
Seminal plasma.
In: Zaneveld, L.J.D.; Chatterton, R.T. (eds.)
Biochemistry of mammalian reproduction
Wiley interscience publication
184. Pollard, J.W.; Plante, C.; King, W.A.; Hansen, P.J.; Betteridge, K.J.; Suarez,
S.S. (1991)
Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding oviductal
epithelial cells.
Biol Reprod 44, 102-107
185. Pursel, V.G.; Johnson, L.A.; Gerrits, R.J. (1970)
Distribution of glutamic oxalacetic transaminase and lactic dehydrogenase

- activities in boar semen after cold shock and freezing.
Cryobiol 7, 141-144
186. Quinn, P.J.; White, I.G. (1968)
The transport of cations by ram and bull spermatozoa.
Austr J biol Scien 21, 781-787
187. Quintero-Moreno, A.; Miró, J.; Teresa Rigau, A.; Rodríguez-Gil, J.E. (2003)
Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics
in stallion ejaculates.
Theriogenology 59, 1973-1990
188. Rajamannan, A.H.J.; Zemjanis, R.; Ellery, J. (1968)
Freezing and fertility studies with stallion semen.
Proc 6th Int Congr Anim Reprod & AI, Paris 2, 1601-1604
zitiert nach: Amann, R.P.; Cristanelli, M.J.; Squares, E.L. (1987)
Proteins in stallion seminal plasma.
J Reprod Fert, Suppl 35, 113-120
189. Rob, O.; Rozinek, J.; Somol, J.; Adamovska, H.; Kopecka, J.; Kopecka, E.
(1979)
Changes in sperm ultrastructure of bulls with decreased sperm activity and
freezability.
Vet Med (Praha) 24 (10), 577-586, Abstract
190. Robak-Cholubek, D.; Jakiel, G.; Bakalczuk, S.; Bokinić, M. (1998)
Zinc levels in seminal plasma and sperm density.
Ginekol Pol 69 (6), 490-493, Abstract
191. Rodriguez-Martinez, H.; Ekwall, H.; Linde-Forsberg, C. (1993)
Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog

spermatozoa.

J Reprod Fert, Suppl 47, 279-285

192. Roussel, J.D.; Stallcup, O.T. (1965)

Parallelism between semen characteristics and glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase activity.

J Dairy Scien 48, 1684-1687

193. Rován, E. (2001)

2. Biochemie der Spermatozoa.

In: Veterinärmedizinische Andrologie.

Busch, W.; Holzmann, A. (eds.)

Schattauer, Stuttgart, 23-32

194. Sachs, L. (1984)

531. Spearman'scher Rang-Korrelationskoeffizient.

in: Angewandte Statistik – Anwendung statistischer Methoden

6. Auflage, Springer, Berlin, 309-312

195. Schmidt, E.; Schmidt, F. (1974)

The importance of enzymatic analysis in medicine.

In: Bergmeyer, H.U. (ed.)

Methods of Enzymatic analysis, 2nd Eng edn. Vol 1: 6-14

Verlag Chemie, Weinheim

196. Senegacnik, J. (1985)

Biochemische Mechanismen der EDTA-Inhibition bei Eberspermien in verschiedenen Medien.

Vortrag Fachtagung Wels, 1985

zitiert nach: Erbing, R. (1988)

Beitrag zur Bestimmung blut- und seminalplasmatischer Parameter von

- Deck- und Besamungsebern.
Vet Med Dissertation, Gießen
197. Serousov, M.V.; Orlovskij, I.A. (1974)
Kolicestvennoe sootnosenie natrija, kalija, kal'cija v pervych i vtorych
ejakulatach plazmy spermy bykov.
Beloruss sel'skochoz Akad Gorki, Sb nauc Tr 92, 167-173
zitiert nach: Gastauer, R. (1974)
Beitrag zu Enzymativitäten und Elektrolytkonzentrationen im Blutserum und
Seminalplasma beim Bullen.
Vet Med Dissertation, München, 1974
198. Setchell, B.P. (1977)
Male Reproductive Organs and Semen.
In: Cole, H.H.; Cupps, P.T. (eds.)
Reproduction in domestic animal.
2nd ed., 252-256
Academic Press, New York
199. Setchell, B.P.; Brooks, D.E. (1988)
Seminalplasma.
In: Knobil, E.; Neill, J.D. (eds.)
The Physiology of Reproduction, Vol 1: 813-819, 1105-1112
Raven Press, New York
200. Sexton, T.J. (1974)
Comparison of various cryoprotective agents on washed chicken
spermatozoa,
4. Metabolism and release of glutamic-oxalacetic transaminase.
Poult Science 53, 284-287

201. Sieme, H.; Klug, E.; Bader, H. (1998)
Separationsverfahren zur Erzielung vitaler und befruchtungskompetenter equiner Samen.
Dtsch tierärztl Wschr 104, 298-302
202. Sieme, H.; Katila, T.; Klug, E. (2004)
Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions.
Theriogenology 61 (4), 769-784
203. Sinowatz, F. (2001)
1. Morphologie und Histologie der männlichen Genitale.
In: Veterinärmedizinische Andrologie.
Busch, W.; Holzmann, A. (eds.)
Schattauer, Stuttgart, 8-11
204. Skandhan, K.P.; Mazumdar, B.N. (1975)
Semen copper in normal and infertile subjects.
Experientia 35 (7), 877-878
205. Smith, A.U.; Polge, C. (1950)
Survival of spermatozoa at low temperatures.
Nature, London 166, 668-669
206. Smith, D.C.; Barratt, C.L.; Williams, M.A. (1998)
The characterisation of non-sperm cells in the ejaculates of fertile men using transmission electron microscopy.
Andrologia 21 (4), 319-33.
207. Soucek, D.; Vary, J. (1984)
Some properties of acid and alkaline phosphatases from boar sperm plasma

- membranes.
Biol Reprod 31, 687-693
208. Squires, E.L.; Pickett, B.W.; Amann, R.P. (1979)
Effect of successive ejaculation on stallion seminal characteristics
J Reprod Fert, Suppl 27, 7-12
209. Stanwell-Smith, R.; Thompson, S.G.; Haines, A.P.; Ward, R.J.; Cashmore, G.; Stedronska, J.; Hendry, W.F. (1983)
A comparative study of zinc, copper, cadmium and lead levels in fertile and infertile men.
Fertil Steril 40 (5), 670-677
210. Strzezek, J. (1987)
Wybrane układy enzymatyczne nasienia zwierząt gospodarskich w aspekcie doskonalenia jego konserwacji oraz płodności samca.
Zesz Probl Post Nauk Rol 340, 9-40
zitiert nach: Kosiniak, K.; Bittmar, A. (1991)
Prognosis of stallion semen freezability on the basis of biochemical tests.
J Reprod Fert, Suppl 44, 653-654
211. Sullivan, J.J.; Pickett, B.W. (1975)
Influence of ejaculation frequency of stallions on characteristics of semen and output of spermatozoa.
J Reprod Fert, Suppl 23, 29-34
212. Suominen, J.; Setchell, B.P. (1972)
Enzymes and trypsin inhibitor in the rete testis fluid of rams and boars.
J Reprod Fert 30 (2), 235-45.
213. Tejada, R.I.; Cameron Mitchell, J.; Norman, A.; Marik, J.J.; Friedman, S. (1984)

- A test for practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence.
- Fert Steril 42, 87-91
214. Thomson, C.H.; Thomson, D.L. Jr.; Kincaid, L.A.; Nadal, M.R. (1996)
- Prolactin involvement with the increase in seminal volume after sexual stimulation in stallions.
- J Anim Sci 74, 2468-2472
215. Turner, R.M. (1996)
- In: Proceedings for the Annual Meeting of the society for Theriogenology, Kansas City, MD: 284-293
- zitiert nach: Turner, R.M.; Sertich, P.L. (2001)
- Use of alkaline phosphatase activity as a diagnostic tool in stallions with azoospermia and oligospermia.
- Anim Reprod Sci 68, 315-316
216. Turner, R.M.; Sertich, P.L. (2001)
- Use of alkaline phosphatase activity as a diagnostic tool in stallions with azoospermia and oligospermia.
- Anim Reprod Sci 68, 315-316
- Special Issue – Symposium on Stallion Reproduction, Proceedings of the 3rd International Symposium on Stallion Reproduction, Jan 10-12, 2001, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA
217. Uchijima, Y.; Yoshida, K.; Hiraga, S. (1986)
- Studies on gamma-glutamyl transpeptidase (gamma-GTP) in seminal plasma.
- Hinyokika Kiyo 32 (4), 553-559, Abstract

218. Umeyama, T.; Ishikawa, H.; Takeshima, H.; Yoshii, S.; Koiso, K. (1986)
A comparative study of seminal trace elements in fertile and infertile men.
Fertil Steril 46 (3), 494-499
219. Varner, D.D.; Ward, C.R.; Storey, B.T.; Kenney, R.M. (1987)
Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa.
Am J Vet Res 48 (9), 1383-1389
220. Varner, D.D.; Brinsko, S.P.; Blanchard, T.L.; Love, C.C., Heck, R.,
MacPherson, M.L.; Johnson, L. (2000)
Fertility in stallions associated with spermatozoa acrosome dysfunction.
Havemeyer Foundation workshop; stallion veterinary practice;
17.-20. Sept., Krakow, Poland; Abstracts 19-20
zitiert nach: Krienke, M. (2003)
Evaluierung durchflußzytometrischer Verfahren zur Beurteilung der Qualität
von kryokonserviertem Hengstsperma.
Vet Med Dissertation, München
221. Veeramachaneni D.N.; Sawyer, H.R. (1996)
Use of semen as biopsy material for assessment of health status of the
stallion reproductive tract.
Vet Clin North Am Equine Pract 12 (1), 101-110.
222. Virji, N. (1985)
LDH-C4 in human seminal plasma and testicular function, I. Methodological
aspects.
Int J Androl 8, 193
223. Voloskov, P.A: (1936)
Rolj zerebcaprozvoditeja v etiologii steriliteta kobyl. The role of the stud
stallion in the etiology of sterility of the mare.

Problemy Zhivot 2, 69-78

zitiert nach: Bielanski, W.; Dudek, E.; Bittmar, A.; Kosiniak, K. (1982)

Some characteristics of common abnormal forms of spermatozoa in highly fertile stallions.

J Reprod Fert, Suppl 32, 21-26

224. Voss, J.L.; Pickett, B.W.; Squires, E.L. (1981)

Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility.

J Am Vet Med Ass 178, 287-289

225. Watase, H.; Ohtaguro, K. (1988)

Copper concentration in seminal plasma of infertile men: influence of hormonetherapy on copper concentration in seminal plasma.

Hinyokika Kiyo 34 (11), 1973-1977, Abstract

226. Weitze, K.F. (2001, a)

6. Spermatologische Untersuchung.

In: Veterinärmedizinische Andrologie.

Busch, W.; Holzmann, A. (eds.)

Schattauer, Stuttgart, 87-118

227. Weitze, K.F. (2001, b)

10. Andrologie beim Hengst.

In: Veterinärmedizinische Andrologie.

Busch, W.; Holzmann, A. (eds.)

Schattauer, Stuttgart, 337-346

228. Weitze, K.F.; Müller, E. (1991)

Prinzipien der Spermauntersuchung.

In: Künstliche Besamung bei Nutztieren.

- Busch, W.; Löhle, K.; Peter, W. (eds.)
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 269-310
229. Westfall, F.D.; Howarth Jr., B. (1978)
The effect of glycerol and dilution on the release of glutamic oxaloacetic
transaminase from chicken spermatozoa.
Poult Scien 54, 1037-1041
230. Yanagimachi, R. (1981)
Mechanisms of fertilization in mammals.
In: Fertilization and embryonic development in vitro.
Mastroianni, L.; Biggers, J.D. (eds.)
Plenum Press, New York, 81-182
231. Yanagimachi, R.; Usui, N. (1974)
Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig
spermatozoa.
Exp Cell Res 89 (1), 161-74.

9. ANHANG

9.1 Standardsubstanzen, Reagenzien, Materialien und Geräte

9.1.1 Elektronenmikroskopie:

1.) Formaldehyd-Glutaraldehyd-Trinitro-Fixation („Yellow Fix“)

- Nach ITO-KARNOVSKY (1968), J. Cell Biol. 39
- 100 ml dest. Wasser
- 4 g Paraformaldehyd-Pulver
- 1 N Na(OH) tropfenweise (zur Klärung)
- 0,2 mol Phosphat-Puffer (pH= 7,2-7,4)
- 0,01- 0,1 % Trinitrokresol (20-40 mg/100 ml)
- 2 % Glutaraldehyd

2.) Epon-Einbettkunstharz (ad 100 ml) (Produkte der Firma Serva)

- 2-Dodecenylsuccinic acid anhydrid (DSSA) 28,2 ml
- Methylnadid anhydride (MNA) 25,0 ml
- Glycidether 46,1 ml
- 2,4,6 – Tris(dimethylaminemethyl) phenol

3.) **Toluidin-Borax-Färbelösung**

- 1 % Toluidinblau
- 1 % Natriumborat
- Aqua bidest

4.) **Kontrastierlösungen für den Leica Reichert Ultrastainer**

- Ultrostain 1: Uranylacetat
- Ultrostain 2: Bleicitrat

9.1.2 Enzyme

1.) **AST**

Reagenz 1, Enzymreagenz:	TRIS-Puffer (pH 7,8)	80 mmol/l
	L-Asparaginsäure	240 mmol/l
	LDH	≥ 600 U/l
	MDH	≥ 600 U/l
Reagenz 2, Startreagenz:	α -Ketoglutarat	12 mmol/l
	NADH	0,18 mmol/l

2.) **GLDH**

Reagenz 1, Pufferlösung:	Triethanolamin-Puffer (pH 8,0)	80 mmol/l
Reagenz 2, Coenzymaktivator:	Ammoniumacetat	100 mmol/l
	EDTA	6,88 mmol/l
	NADH	0,156 mmol/l
	ADP	0,833 mmol/l
	LDH	3 kU/l
Reagenz 3:	2-Ketoglutarat	7 mmol/l

3.) **GGT**

Reagenz 1, Pufferlösung:	TRIS-Puffer (pH 8,25)	100 mmol/l
	Glycylglycin	150 mmol/l
Reagenz 2, Substratlösung:	L- γ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid	20 mmol/l

4.) **AP**

Reagenz 1, Pufferlösung:	Diethanolamin-Puffer (pH 9,8)	1,0 mmol/l
	Magnesiumchlorid	0,5 mmol/l
Reagenz 2, Substratlösung:	p-Nitrophenylphosphat	10 mmol/l

5.) **SP**

Reagenz 1, Pufferlösung:	Citrat-Puffer	100 mmol/l
Reagenz 2, Substratlösung:	1-Naphthylphosphat	19 µmol/l
	Fast Red TR-Salz	2 µmol/l
	(4-Chlor-2-methylphenyl-diazonium-salz)	
Reagenz 3, Tartratlösung:	Citrat-Puffer (pH 5,2)	100 mmol/l
	Tartrat	135 mmol/l
Reagenz 4, Stabilisator:	Essigsäure	0,7 mmol/l

6.) **CK**

Reaktionslösung:	Imidazol-Puffer (pH 6,7)	100 mmol/l
	Creatinphosphat	30 mmol/l
	Glucose	20 mmol/l
	N-Acetylcystein	20 mmol/l
	Magnesiumacetat	10 mmol/l
	EDTA	2 mmol/l
	ADP	2 mmol/l
	NADP	2 mmol/l
	AMP	5 mmol/l
	Diadenosinpentaphosphat	10µmol/l
	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	≥ 1,5 KU/l
	Hexokinase	≥ 2,5 KU/l

7.) **LDH**

Reagenz 1:	Pyruvat	0,6 mmol/l
	Phosphat (pH 7,5)	50 mmol/l
Reagenz 2:	NADH	0,18 mmol/l

9.1.3 Mineralstoffe

1.) **Natrium, Kalium, Kalzium ionisiert**

Spüllösung 1:	S 4901 (5):	Kaliumchlorid	50 mmol/kg Wasser
		Natriumchlorid	50 mmol/kg Wasser
		Proteolytische Enzyme (Dän. Pat. Nr. 151379)	
	S 4932 (11):	gepufferte Elektrolytlösung, Patent angemeldet	
Kalibrierlösung 1:	S 1565 (3):	HEPES-Puffer	100 mmol/kg Wasser
		Natriumhydroxid	55 mmol/kg Wasser
		Natriumchlorid	110 mmol/kg Wasser
		pH = 7,4 ± 0,005 bei 37°C	
	S 1583 (9):	HEPES-Puffer	100 mmol/kg Wasser
		Kalziumchlorid	1,4 mmol/kg Wasser
		Natriumchlorid	97 mmol/kg Wasser
		Natriumhydroxid	50 mmol/kg Wasser
		Kaliumchlorid	4 mmol/kg Wasser
		Natriumcarbonat	0,2 mmol/kg Wasser
		Glucose	10,5 mmol/kg Wasser

		Lactat	4,2 mmol/kg Wasser
		pH = 7,4 ± 0,020 bei 37°C	
		Natrium bei 37°C	145 ± 1,0 mmol/kg
Kalibrierlösung 2:	S 1575 (4):	MOPS-Puffer	100 mmol/kg Wasser
		Natriumhydroxid	40 mmol/kg Wasser
		Natriumchlorid	120 mmol/kg Wasser
		pH = 6,8 ± 0,005 bei 37°C	
	S 1590 (10):	HEPES-Puffer	88 mmol/kg Wasser
		Kalziumchlorid	5mmol/kg Wasser
		Natriumchlorid	21 mmol/kg Wasser
		Kaliumchlorid	19 mmol/kg Wasser
		Kaliumhydroxid	22 mmol/kg Wasser
		pH = 6,87 ± 0,01 bei 37°C	
		Natrium bei 37°C	20 ± 0,2 mmol/l
		Kalium bei 37°C	40 ± 0,32 mmol/l
		Kalzium bei 37°C	5,0 ± 0,04 mmol/l
		Chlorid bei 37°C	52,7 ± 0,8 mmol/l
			(patentiert)
Salzbindungslösung:	S 4915 (2):	Kaliumchlorid	3 mol/kg Wasser
	S 4945 (8):	Natrium-Formiat	4,56 mol/kg
Reinigungslösung:	S 5345 (1):	DECONEX ^R -Lösung	200 g/kg Wasser
	S 5385 (7)	DECONEX ^R -Lösung	200 g/kg Wasser

2.) **Magnesium**

Reaktionslösung:	Tris-Puffer (pH 11,0)	0,2 mol/l
	Kaliumcarbonat	70 mmol/l
	Glycoletherdiamin–N,N,N',N'-tetraessigsäure	40 mmol/l
	Xylidylblau	0,1 mmol/l
	Natriumacid	0,095%
	Aktivatoren	
	Magnesium-Standard	1,03 mmol/l

3.) **Phosphor**

Reaktionslösung:	Schwefelsäure	210 mmol/l
	Ammoniummolybdat	0,4 mmol/l
	Detergenz	

4.) **Kupfer**

Reagenzlösung:	Acetatpuffer	95 mmol/l
	PAESA-Natriumdodecylsulfat	2,4 mmol/l
	4-(3,5-Dibrom-2-pyridylazo)-N-sulfopropylalanin-	
	Natriumdodecyl-sulfat	

Reduktionsmittel: Ascorbinsäure

Serumstandard (human) flüssig ohne NaN₃

5.) **Zink**

Enteiweissungsreagenz:	Trichloressigsäure 7%	370 mmol/l
Farbreagenz A:	5-Br-PAPS	0,08 mmol/l
	2-(5-Brom-2-Pyridylazo)-5-(N-Propyl-N-Sulfo- propyl-amino)-phenol	
	Bicarbonatpuffer (pH 9,8)	200 mmol/l
	Natriumcitrat	170 mmol/l
	Dimethylglyoxim	4 mmol/l
	Triton X-100	
Farbreagenz B:	Salicylaldoxim (pH 2,7)	29 mmol/l
Standard:	Zink, 200 µg/dl	30,6 µmol/l

6.) **Eisen**

Reagenz 1, Pufferlösung:	Acetatpuffer (pH 4,5)	800 mmol/l
	Thioharnstoff	90 mmol/l
Reagenz 2, Farblösung:	Ascorbinsäure	45 mmol/l
	Ferene	0,6 mmol/l
	Thioharnstoff	20 mmol/l
Standard	100 µg/dl (17,9 µmol/l)	

9.1.4 Materialien und Geräte

1.) Zur Untersuchung des Spermas

- Leitz-Phasenkontrastmikroskop
- Objektträger
- Detergenz TweenR
- 2 % ige Eosin-Färbelösung
- Neubauer Zählkammer
- Eppendorf Spermacue®
- Merck pH-Indikatorpapier

2.) Elektronenmikroskopische Aufarbeitung

- Eppendorf Tubes à 2 ml
- Einmalpipetten
- Hettich Zentrifuge
- Reichert Jung Ultratrimmer (Eponblöcke)
- Leica EM KMR 2 Schneidgerät für Glasmesser
- Kupfernetze (300 mesh)
- Leica Reichert Ultrastainer
- Zeiss EM 109 Elektronenmikroskop

3.) **Zur Gewinnung des Seminalplasmas**

- Kunststoffröhrchen der Firma Sarstedt à 10 ml
- Einmalpipetten
- Hettich Zentrifuge
- Eppendorf Tubes à 1,5 ml

4.) **Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten und Mineralstoffgehalte**

- Eppendorf Einmalpipettenspitzen
- Eppendorf K-Röhrchen
- EFOX 5053 Eppendorf
- ABL 615 von Radiometer, Copenhagen
- EPAC 6140 Eppendorf
- EPAC 5430-TM Eppendorf

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Bostedt und Herrn Prof. Dr. Bergmann gilt mein ganz besonderer Dank für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die jederzeit gewährte, unermüdliche Unterstützung und Hilfestellung bei der Planung und Auswertung der Arbeit. Weiterhin sei nicht nur für die wissenschaftliche, sondern gleichermaßen für die fachlich-tierärztliche Betreuung zu meiner Fortbildung an der Klinik gedankt.

Herrn Dr. Failing sowie Frau Weber und Herrn Shahsafi (Institut für Biomathematik der JLU Giessen) danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse und die vielen Anregungen im Rahmen des Statistikkurses.

Außerdem danke ich allen kooperierenden Gestütsbesitzern und –leitern für die zur Bereitstellung der Ejakulate. Insbesondere möchte ich mich bei den Angestellten der Gestüte bedanken, die alle stets hilfsbereit waren und auch für mich zusätzliche Hengste zur Absamung zur Verfügung stellten, um mein Probenmaterial zu vervollständigen.

Mein Dank gilt aber auch Frau Blad-Stahl und Frau Feth, die die Bestimmung der Seminalplasmaparameter vornahmen, sowie Frau Hild aus dem Institut für Veterinäranatomie, -Histologie und –Embryologie und insbesondere Ralph Blakey für alle Anregungen, Anleitungen und Hilfestellungen.

Ganz besonders danke ich aber auch meiner Mutter - für alles, was sie bisher und auch insbesondere während der Zeit meines Studiums und meiner Dissertation für mich getan hat. Meinem Freund Lasse danke ich für alles Verständnis, das Zuhören, die Diskussionen und die technische Hilfe.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-457-8



9 7 8 3 8 9 6 8 7 4 5 7 3