

AUGUSTO FERNÁNDEZ VERGANO

Bedeutung der morphometrischen  
Variationen und des Protamingehaltes  
von Spermatozoen  
in Korrelation zur Fruchtbarkeit  
bei Warmbluthengsten



INAUGURAL-DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DR. MED. VET.  
BEIM FACHBEREICH VETERINÄRMEDIZIN DER JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN



*édition scientifique*  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

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

1. Auflage 2015

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 Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie,  
Veterinärmedizinische Fakultät, Justus-Liebig-Universität Gießen

**Betreuer: Prof. Dr. M. Bergmann**

und

das Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universität Münster.

**Betreuerin: Prof. Dr. S. Kliesch**

**Bedeutung der morphometrischen Variationen und  
des Protamingehaltes von Spermatozoen in Korrelation  
zur Fruchtbarkeit bei Warmbluthengsten**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Augusto José Fernández Vergano**

Tierarzt aus Buenos Aires

Gießen 2015



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

DEKAN

**Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer**

MITGLIEDER DER PRÜFUNGSKOMMISSION

Vorsitzender und 1. Gutachter: **Prof. Dr. Bergmann**

2. Gutachter: **Prof. Dr. Kliesch**

Prüfer: **Prof. Dr. Wrenzycki**

TAG DER DISPUTATION

**16. 12. 2015**



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	9
<b>2. Relevante Parameter der andrologischen Fertilitätsbeurteilung von Spermien. Stand des Wissens</b> .....	11
2. 1 Morphologische Aspekte der equinen Samenzelle.....	12
2. 2 Morphometrie .....	12
2. 3 DNS-Integrität.....	15
2. 4 Protamine .....	19
2. 5 Spermatologische Standarduntersuchungen .....	23
<b>3. Material und Methoden</b> .....	25
3. 1 Hengste und Hodengewebe.....	25
3. 2 Samengewinnung .....	26
3. 3 Spermatologische Standarduntersuchung (Zählung, Motilität und Morphologie).....	26
3. 4 Probenaufbereitung.....	29
3. 5 Morphometrische Untersuchung.....	30
3. 6 Durchführung der Untersuchung der DNS-Integrität .....	30
3. 7 Bestimmung des Protamingehaltes.....	31
3. 8 Immunohistochemische Untersuchung im Hodengewebe.....	34
3. 9 Fertilitätsparameter .....	35
3. 10 Statistische Analyse .....	36

<b>4. Ergebnisse</b> .....	37
4. 1 Spermatologische Standarduntersuchung .....	38
4. 2 Morphometrie.....	41
4. 3 DNS-Integrität.....	43
4. 4 Kernproteine.....	46
4. 4. 1. Protamin-Expression im Vergleich der physiologischen zur beeinträchtigten Spermatogenese des Hengstes .....	46
4. 4. 2. Die Korrelation zwischen Fruchtbarkeitsparametern und dem Protamin-1/ Protamin-2-mRNA-Verhältnis bei Warmblut Hengsten .....	48
<b>5. Diskussion</b> .....	51
5. 1 Non-Return-Rate 28 Tage (NRR 28%).....	52
5. 2 Spermatologische Standarduntersuchungsparameter .....	53
5. 3 Morphometrie.....	55
5. 4 DNS-Integrität.....	55
5. 5 Protamine.....	57
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	59
<b>7. Summary</b> .....	63
<b>8. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	67
<b>9. Literaturverzeichnis</b> .....	69
<b>10. Publikation</b> .....	83
<b>11. Danksagung</b> .....	85
<b>12. Anhang</b> .....	87

# 1. Einleitung

Die morphologische Klassifizierung von Spermatozoen wird häufig für die klinische Überprüfung der Fruchtbarkeit bei diversen Spezies verwendet (Blom 1973; Chandler et al. 1988), einschließlich bei Equiden (Bielanski und Kaczmarek 1979; Jasko et al. 1990). Eine Zunahme der Zahl von morphologisch anormalen Spermatozoen wurde bei Hengsten mit niedriger Fruchtbarkeit nachgewiesen. Insbesondere ist eine Zunahme von Kopfdefekten mit einer niedrigen Fruchtbarkeit korreliert (Jasko et al. 1990).

Beim Menschen zeigen viele Studien, dass die Spermatozoenmorphologie einen wichtigen Bestandteil für die Überprüfung der Fruchtbarkeit darstellt (Kruger et al. 1988; Chan et al. 1989; Mansour et al. 1995). Die physiologische Morphologie der Spermatozoen hat eine prädiktive Funktion für den Erfolg der In-vitro-Fertilisation (IVF) (Kruger et al. 1988), der natürlichen Konzeption (Check et al. 1992) und der intrauterinen Insemination. Bei infertilen Männern (Katz et al. 1986) und bei Vätern von Kindern mit Hypospadie (Fritz und Czeizel 1996) ist eine erhöhte Inzidenz von veränderten Spermatozoenköpfen gefunden worden. Die Morphologie der Spermatozoenköpfe korreliert ebenfalls positiv mit den IVF-Ergebnissen (Kruger et al. 1993) und ist bei schweren Fertilitätsstörungen neben der Spermienvitalität ein wesentlicher prädiktiver Parameter für den Erfolg der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) (Mansour et al. 1995; Steger et al. 2003).

Die Beurteilung der Größe der Spermatozoenköpfe von klinisch gesunden Hengsten wurde bereits früher untersucht. Später wurde diese erweitert durch die morphometrischen Analysen (Bielanski 1951; Bielanski und Kaczmarek 1979), obwohl diese Parameter nicht zur klinischen Routineuntersuchung der Hengstspermatozoen gehören. Die Studien von Gravance et al. (1996, 1997) wiesen nach, dass

die Kopfgröße der Spermien eine negative Korrelation zur Fruchtbarkeit der Hengste zeigt. Subfertile Hengste zeigen größere Köpfe im Vergleich zu fertilen Hengsten. Casey et al. (1997) postulierten, dass dieser Unterschied in der Kopfgröße möglicherweise einen Zusammenhang mit der Chromatinkondensation aufweisen könnte.

Bei infertilen Männern ist gezeigt worden, dass Spermien mit großen Köpfen Ausdruck von Pathologien sind, die sich auf die Chromatinstruktur während der Spermatozoenmaturation erstrecken (Steger et al. 2003). Bei Männern, deren Spermioogramm über 95% Kopfdefekte aufweisen, fand sich eine anormale Kondensation des Chromatins (Dadoune et al. 1988). Zwei Arbeitsgruppen konnten bei der Katze (Hingst et al. 1995) und bei runden Spermatisden im Keimepithel (Steger et al. 2001) zeigen, dass Spermatozoenköpfe mit anormaler Morphologie, insbesondere makrozephalische Formen, mit unvollständiger Kondensation des Chromatins stark korreliert sind. Aufgrund dieser Beobachtung wird angenommen, dass eine normale Kopfmorphologie von einer normalen Chromatinkondensation begleitet wird.

Der Prozess der Kondensation von Chromatin findet während der Spermio-genese durch den Austausch zwischen Histonen und Protaminen [Protamin-1 (P1) und Protamin-2 (P2)] in zwei Schritten statt (Oliva und Dixon 1991). Im ersten Schritt ersetzen die Transitionsproteine die Histone, die Kernproteine der somatischen Zellen. In einem zweiten Schritt, während des Stadiums der Elongation, werden die Transitionsproteine durch die Protamine ersetzt. Das Ergebnis ist ein hoch kondensierter Chromatingehalt.

Beim Menschen haben viele Studien nachgewiesen, dass ein Protaminmangel mit Infertilität assoziiert ist (Chevaillier et al. 1987; Balhorn et al. 1988; Carrell und Liu 2001; Steger et al. 2001; Aoki und Carrell 2003; Steger et al. 2003; Aoki et al. 2005, 2006; Oliva 2006; Zhang et al. 2006). Insbesondere ein abweichendes Verhältnis von Protamin-1 zu Protamin-2, sowie von Histonen zu Protaminen, ist mit Störungen der Fruchtbarkeit signifikant korreliert (Blom 1973; Steger et al. 2001; Steger et al. 2003; Zhang et al. 2006).

Die nachfolgende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob mit Hilfe der computergestützten morphometrischen Analysen von Spermien oder der molekular biologischen Analyse der Kernkondensation die Fertilität eines Hengstes prädiktiv beurteilbar ist.

## **2. Relevante Parameter der andrologischen Fertilitätsbeurteilung von Spermien. Stand des Wissens**

Das Spermium ist das Endprodukt der Gametogenese. Bei den männlichen Säugetieren findet dieser Prozess in den Tubuli seminiferi der Hoden statt. Als hochspezialisierte Zelle durchläuft die männliche Keimzelle auf zellulärer und molekularer Ebene zahlreiche strukturelle und funktionelle Veränderungen, die eine Befruchtung der Eizelle im Eileiter ermöglichen.

Während der Spermatogenese im Hoden und der Reifung im Nebenhoden kommt es zu einem Verlust der meisten Organellen und eines Großteils des Zytoplasmas.

Neben den Umstrukturierungen des Zellkerns finden weitreichende Veränderungen an der Plasmamembran statt, die von der Aufnahme bestimmter Proteine aus dem Sekret und Epithel des Nebenhodens, über die Bindung an das Eileiterepithel mit Bildung des funktionellen Spermienreservoirs bis hin zu einer Serie positiv destabilisierender Ereignisse reichen, die als Kapazitation zusammengefasst werden (Yanagimachi 1994).

Das Spermium der Säugetiere hat drei Hauptkomponenten: den Kopf, das Mittelstück und das Flagellum oder den Schwanz. Der Kopf beinhaltet den Kern sowie das Akrosom. Das Akrosom ist am anterioren Ende des Kopfes platziert.

Die Spermatogenese umfasst eine Serie von mitotischen Teilungen der Spermatogonien. Danach folgen zwei meiotische Teilungen der Spermatozyten, ebenfalls große morphologische Remodelationen der Spermatiden während der Spermio-genese und zuletzt die Befreiung von Zellen in das Lumen der Tubuli seminiferi (Spermiation).

Der diploide Chromosomensatz der Keimzelle wird während der Meiose auf den haploiden Satz reduziert. Das Ersetzen der Histone, Hauptproteine des euka-

riotischen Zellkerns, durch Protamine, Hauptproteine des reifen Spermiums, verursacht die Kondensierung des Chromatins. Daraus resultiert eine tiefe Veränderung der Form und der Größe des Kernes (Steger et al. 1999). Die Protamine dienen als Schutz der nuklearen DNS vor schädlichen Umwelteinflüssen (Oliva 2006).

Der Histon-Protamin-Austausch wurde bei Menschen und anderen Säugetieren sehr intensiv erforscht. (Seyedin und Kistler 1980; Meistrich et al. 1985; Koppel et al. 1994; Drabent et al. 1996, 1998; Steger et al. 1998).

Bei der Spermatogenese des Hengstes ist dieser Histon-Protamin-Austausch bereits untersucht worden (Cavalcanti et al. 2009). Bislang gibt es keine weiteren Studien, die diesen Austausch und dessen Auswirkungen im Zusammenhang zur Fertilität untersucht haben. Im Kern des Spermiums befindet sich das hoch kondensierte Chromatin. Dessen Umfang ist auffallend kleiner als das des Kernes der somatischen Zellen. Diese Organisation, die Menge an DNS, die Gestaltung und die Komposition der Nukleoproteine sind einzelne Beschaffenheiten des Spermiumkerns.

## **2.1 Morphologische Aspekte der equinen Samenzelle**

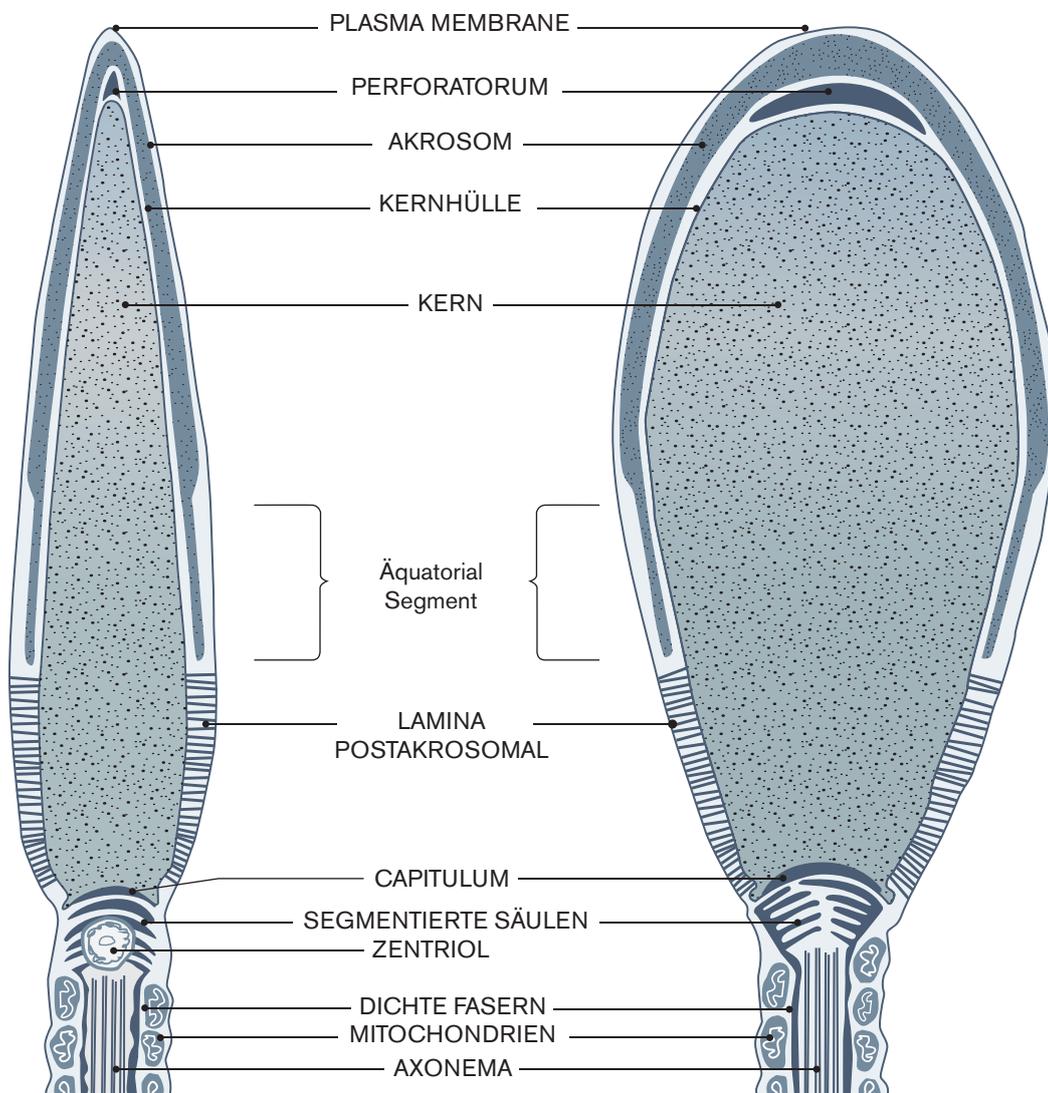
Der niederländische Handelsmann Antoni von Leeuwenhoek beschrieb 1677 erstmalig die kaulquappenförmige Gestalt eines Spermiums und seine Bedeutung für die Befruchtung (Schiekbeek 1951). Seither haben wachsendes Interesse an der männlichen Keimzelle und Entwicklungen in der Mikroskopie zu einem detaillierten Wissen über die Struktur (Abb. 1) (Saacke und Almquist 1964; Eddy 1991) und Funktion des Spermiums während der Befruchtung geführt.

## **2.2 Morphometrie**

Ein Parameter der Samenqualität, der für die Bestimmung der Fruchtbarkeit genutzt wird, ist die durchschnittliche Menge an Spermien mit normaler Morphologie. Mehrere Studien unter Säugetieren haben gezeigt, dass die Morphologie der Spermien

eine wichtige Komponente bei der Bestimmung der Fruchtbarkeit ist (Kruger et al. 1988; Morgentaler et al. 1995). Bei Hengsten konnte eine direkte Korrelation zwischen morphologisch veränderten Spermienköpfen und einer Abnahme von Trächtigkeiten pro Zyklus nachgewiesen werden (Jasko et al. 1990).

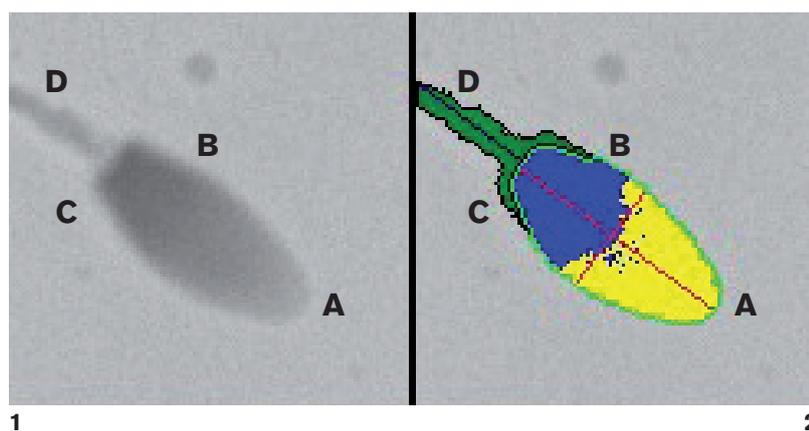
Die Dimensionen der Spermienköpfe für normale Hengste sind bereits früher beschrieben worden (Bielanski 1951), obwohl diese Parameter nicht in Zusammenhang mit einer klinischen Applikation zu bringen sind.



**Abb. 1: Schematische Darstellung des Kopfes eines Hengstspermiums.** Der Kopf und der Hals im Sagittal- und im Querschnitt (modifiziert nach McKinnon et al. 1993).

In einigen Studien sind die Abmessungen der Spermienköpfe mit morphologischen Veränderungen assoziiert, ebenso mit fertilen und subfertilen Hengsten. Allerdings sind die Untersuchungen manuell bzw. mit subjektiven Methoden durchgeführt worden.

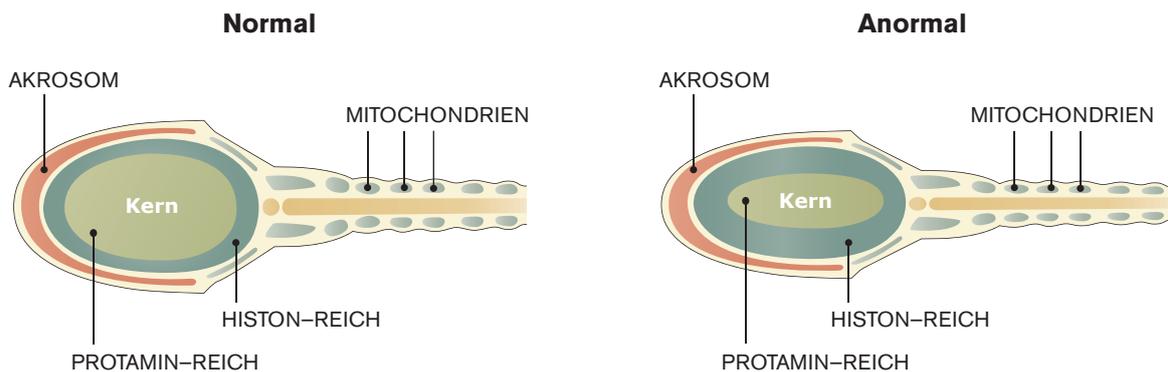
Um die Subjektivität der morphologischen Untersuchung der Spermienköpfe zu reduzieren, wurden Computerprogramme entwickelt, die automatisiert und objektiv die Morphometrie bestimmen können. Die Komponenten dieser Systeme wurden bereits früher beschrieben (Jagoe et al. 1986; Moruzzi et al. 1988; Boyle et al. 1992; Davis et al. 1992). Es handelt sich dabei um mikroskopische Untersuchungen von nach Papanicolaou-Verfahren gefärbten Spermien. An das Mikroskop ist eine digitale Kamera angeschlossen, die in direkter Verbindung mit dem Rechner steht. Insgesamt werden 200 Spermien einzeln fokussiert und fotografiert, danach wird jeder einzelne Spermienkopf morphometrisch analysiert (Abb. 2). Mittlerweile liegen verschiedene Programme zur Durchführung dieser Untersuchung vor. Die Applikation dieser Methoden in der Analyse von menschlichen Spermienköpfen ergab eine Zunahme der Inzidenz der morphologisch abnormalen Spermienköpfe bei subfertilen Männern (Katz et al. 1986).



**Abb. 2: Fotografie der morphometrischen Untersuchung des Hengstpermiums.**

1. Papanicolaou-Färbung. 2. Morphometrische Analyse. (A: akrosomaler Bereich; B: postakrosomaler Bereich; C: Halsregion; D: Mittelstück).

Die größeren Spermienköpfe, die bei Männern mit Fertilitätsproblemen gefunden werden, spiegeln eine Pathologie der Spermienreifung bzw. der Spermiogenese wider, hauptsächlich während der Maturation und der Kondensation des Chromatins. Beim Mann sind mehr als 95% der Anomalien der Spermienköpfe mit Alterationen in der Kondensation des Chromatins assoziiert (Dadoune et al. 1988). Hingst et al. (1995) wiesen nach, dass anormale Spermienköpfe, besonders die makrocephalischen Formen, in direkter Korrelation zu einer unvollständigen Kondensation des Chromatins stehen. Beim Hengst kann der Histon-Protamin-Austausch während der Spermatogenese einen entscheidenden Faktor für die Entstehung von Anomalien des Spermienkopfes darstellen, welches ein Grund für Sub- oder Infertilität sein kann (Cavalcanti et. al 2009) (Abb. 3).



**Abb. 3: Schematische Darstellung des Histon-Protamin-Verhältnisses.**

Normal: Chromatinkondensation mit höherem Anteil an Protamin assoziierter DNS. Anormal: Chromatinkondensation mit höherem Anteil an Histon assoziierter DNS (modifiziert nach Cavalcanti et al. 2009).

## 2.3 DNS-Integrität

Das im Spermatozoon in einzigartiger Weise verpackte paternale Genom muss unbeschadet die Eizelle erreichen und dort dekodensieren, um die Weitergabe der männlichen Gene und damit das Entstehen neuen Lebens zu ermöglichen. DNS-Schäden lassen sich mit verschiedenen Tests erfassen. Unabhängig vom Ort und der Ursache der Entstehung scheint die Rate fragmentierter DNS in Spermatozo-

en ein von den Standardsamenzellparametern unabhängiger Parameter zu sein, mit dessen Hilfe prädiktiv die fertile Kompetenz in vivo und in vitro bestimmt werden kann. Der Erfassung der DNS-Fragmentation im Rahmen der andrologischen Abklärung der männlichen Infertilität kommt somit zunehmende Bedeutung zu.

Während die kompakte Organisation des Chromatins für den Transport der Erbinformation essentiell ist, kann eine Befruchtung der Eizelle nur dann stattfinden, wenn nach der Fusion der Gameten eine ordnungsgemäße Dekondensation des Chromatins in Gang kommt (Amann 1989; Hammadh et al. 2005). Auf diesen Prozess können sich zahlreiche inhärente nukleare Faktoren störend auswirken: Anomalien der chromosomalen Struktur wie Mikrodeletionen, Translokationen und Aneuploidien (Nagvenkar et al. 2005; Tesarik 2005). Die unvollständige morphologische Ausreifung ist in Zusammenhang mit der Apoptose und der Disruption des mitochondrialen Membranpotentials korreliert (Aziz et al. 2007). Zunehmend kristallisiert sich heraus, dass Fragmentationen der DNS trotz Kondensation möglich und transient erforderlich sind. Allerdings müssen diese physiologischerweise erforderlichen Brüche zeitnah repariert werden. Im Falle einer Persistenz ist die fertile Kompetenz des Spermatozoons in vitro und in vivo negativ mit der Frequenz der DNS-Fragmentation korreliert (Spano et al. 2000; Henkel et al. 2004). Unter einer DNS-Fragmentation werden Strangbrüche verstanden. Solche Brüche können entweder an einem einzelnen Strang auftreten („single stranded“, sogenannte „Nicks“) oder beide Stränge betreffen („double strand breaks“). Unterschiedliche Methoden zur Erfassung solcher Brüche werden in verschiedenen Testsystemen angewendet. Der SCSA-Test, der TUNEL-Test und der COMET-Assay werden am häufigsten eingesetzt (Evenson und Jost 1994; Sun et al. 1997; Chan et al. 2001). Es gibt keine einheitlichen Referenzbereiche, um zwischen physiologischen und bereits pathologischen DNS-Fragmentationen sicher zu differenzieren, so dass eine Vergleichbarkeit von Studienergebnissen bislang nicht gegeben ist.

Da Chromatin ausgereifter Spermien transkriptionell inaktiv ist (Miller und Ostermeier 2006), wird die DNS-Schädigung erst bei Beginn der Mitose nach Spermien-Oozyten-Fusion sichtbar. Da beim Hengst diese Schädigung nicht durch eine Erhöhung der Besamungsdosis ausgeglichen werden kann, wird sie auch als

nicht-kompensierbare Beeinträchtigung der biologischen Samenbeschaffenheit bezeichnet (Varner 2008).

Mit Hilfe der verschiedenen Tests wird versucht, die Chromatinintegrität und ihren Einfluss auf die paternale Fertilität zu untersuchen. Mit Hilfe des TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) -Assays (Gadella et al. 1999; Schlegel und Paduch 2005), der DNS-Breakage Detection des FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) (Muriel et al. 2004), der in situ Nick-Translation (Sakkas et al. 1996) und dem COMET (Einzelstranggelektrophorese) -Assay (Linfor und Meyers 2002) wird unter neutralen pH-Bedingungen der Grad der DNS-Denaturierung bestimmt.

Anhand des von Evenson et al. (1980) eingeführten Spermienchromatinstruktur-Assays (SCSA), des COMET-Assay (unter alkalischen oder sauren Bedingungen) und der Spermienchromatindispersion (SCD) (Garcia-Macias et al. 2007) wird hingegen die induzierbare Denaturierung gemessen (Alvarez 2005).

Während der TUNEL- und der COMET-Assay in der assistierten Reproduktionsmedizin des Menschen Anwendung finden, wird bei der Zuchttauglichkeitsuntersuchung des Hengstes vorrangig der gut reproduzierbare SCSA-Test eingesetzt (Evenson und Jost 2000).

Der SCSA erfasst die Suszeptibilität von Spermatozoen gegenüber einer Säuredenaturation der DNS in situ (Evenson et al. 1980). Diese wird durch Färbung mit Akridinorange im FACS gemessen (Evenson et al. 1986; Evenson und Darzynkiewicz 1990). Das Ausmaß einer DNS-Schädigung wird anhand des metachromatischen Wechsels von grüner Fluoreszenz (Bindung an Doppelstrang-DNS) zu roter Fluoreszenz (Bindung an Einzelstrang-DNS) quantifizierbar (Darzynkiewicz et al. 1976). Ausgedrückt wird der DNS-Fragmentationsindex DFI in Prozent. Repräsentiert wird die Population von Spermatozoen mit geschädigter DNS (Evenson et al. 2002). Zusätzlich werden Zellen mit stark gefärbter DNS (high DNS stainability cells, HDS) angegeben. Diese Subpopulation besteht aus Zellen, bei denen intakte Doppelstrang-DNS aufgrund einer fehlerhaften Histon-Protamin-Transition vermehrt anfärbbar wird (Evenson et al. 2002).

Der DFI und die HDS korrelieren nicht miteinander und bilden daher unterschiedliche aberrante Spermatozoenpopulationen ab.

Der SCSA misst quantitativ kontinuierlich das Ausmaß eines potentiellen DNS-Schadens und ist daher besser geeignet, Aussagen zum reproduktiven Potenzial eines Mannes zu liefern (Larson-Cook et al. 2003). Insbesondere haben der DFI und die HDS einen geringeren Variationskoeffizienten als die klassischen Samenzellparameter (Smit et al. 2007). Mit Hilfe des DFI kann unabhängig von den klassischen Variablen des SpermioGRAMMS das Zustandekommen einer Schwangerschaft *via naturalis* eingeschätzt werden (Evenson et al. 1999). Werte >27-30% sind mit einer signifikant erniedrigten Wahrscheinlichkeit für eine Schwangerschaft assoziiert (Larson-Cook et al. 2003; Boe-Hansen et al. 2006). Die Aussagekraft des SCSA nimmt bei Anwendung auf die Verfahren der assistierten Reproduktion (IUI, IVF und ICSI) mit zunehmender Überwindung natürlicher Barrieren ab. Es besteht eine gute Vergleichbarkeit zum TUNEL-Test (Stahl et al. 2006).

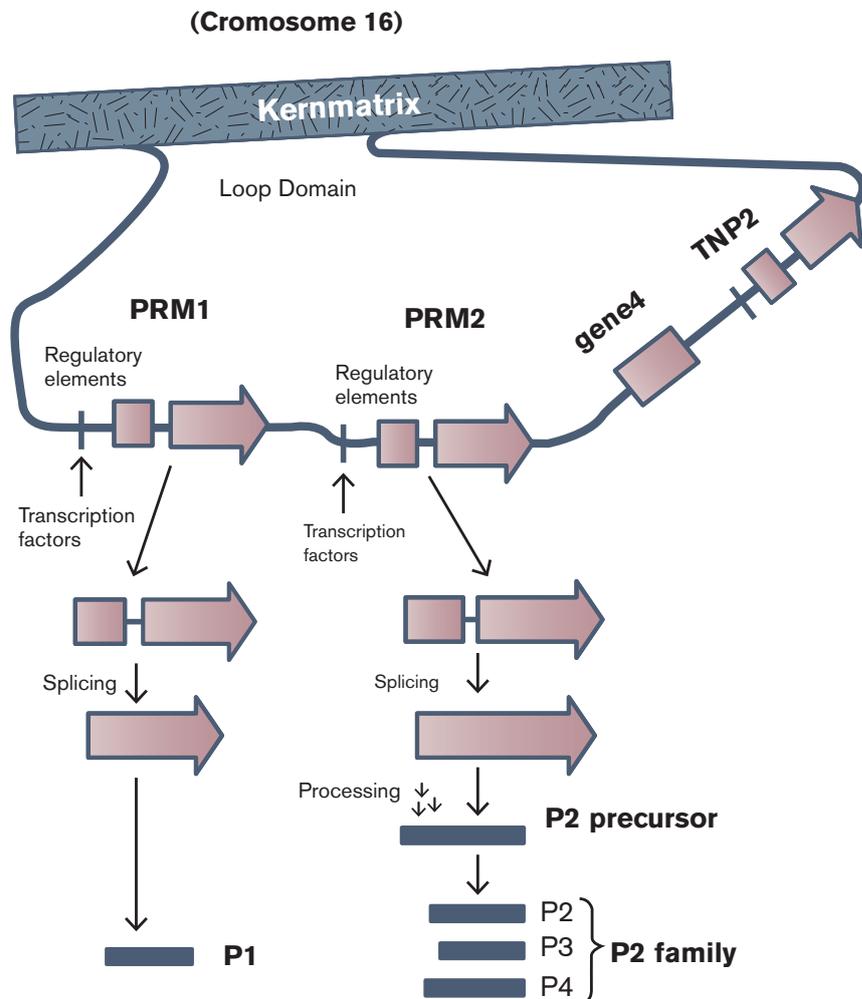
Akridinorange wird zur Bestimmung der DNS-Fragmentation auch dann einsetzbar, wenn die zu untersuchenden Zellen nur mit dem Fluoreszenzmikroskop evaluiert werden können (Tejada et al. 1984). Diese Vereinfachung bedeutet jedoch eine nicht standardisierte Evaluation der Zellen.

Verschiedene Studien mit Bulle-Hengst- (Ballachey et al. 1987; 1988; Madrid-Bury et al. 2005), (Love und Kenney 1998; Evenson und Jost 2000) und Ebersperma (Evenson et al. 1994) bestätigten den Wert der Spermienchromatinstrukturanalyse (SCSA) für die Fertilitätsdiagnostik auch bei diesen Spezies. Love und Kenney (1998) stellten die Wichtigkeit des SCSA-Tests zur Erkennung der Fruchtbarkeit der Hengste dar; im Gegensatz zu der morphologischen Untersuchung, mit der keine Unterscheidung zwischen der Fertilität dreier verschiedener Hengstgruppen möglich war.

Nach der Untersuchung der Chromatinstabilität und der Morphologie von Hengstpermien konnten Morrel et al. (2008) eine positive Korrelation beider Parameter zu der Fertilität nachweisen.

## 2.4 Protamine

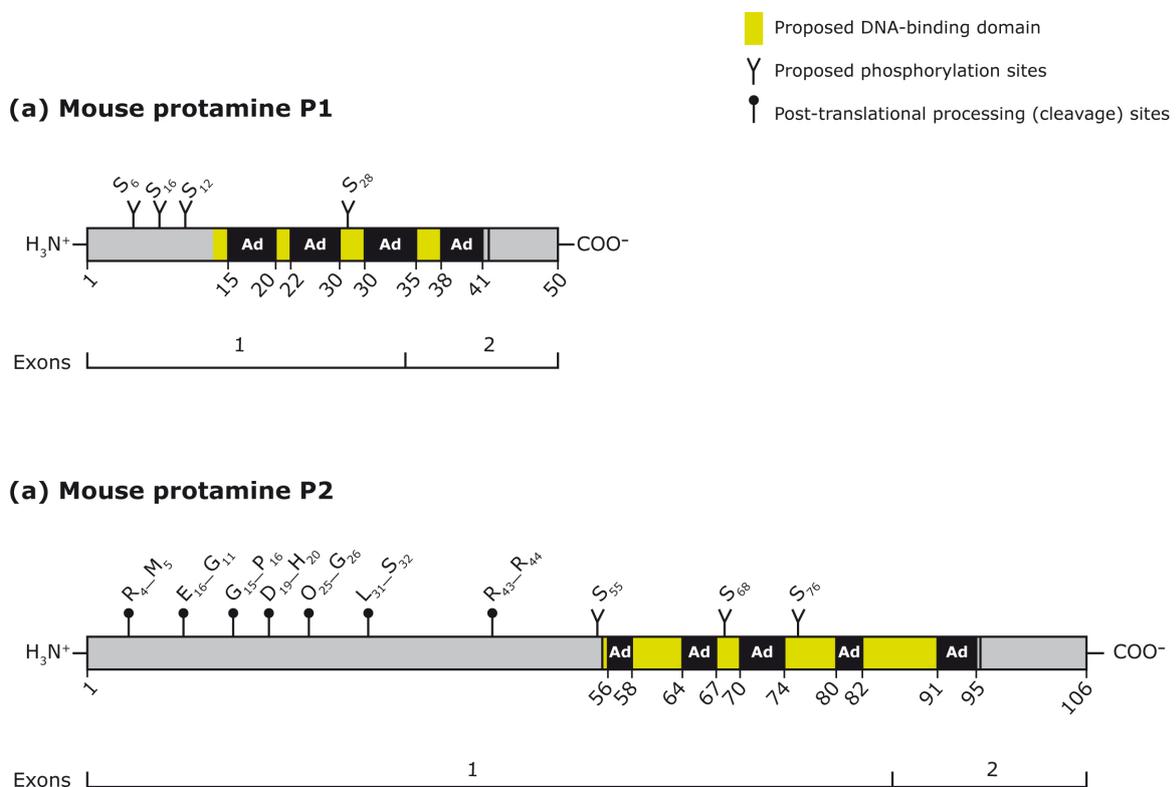
Protamine und DNS wurden vor mehr als hundert Jahren von Friederich Miescher entdeckt. Sie sind die meist verbreiteten Kernproteine in Spermien verschiedener Spezies und wirken als „Verpackungsmaterial“ des paternalen Genoms. Bei Säugtieren sind zwei Typen von Protaminen bekannt: die „P1-Proteine“, vorhanden in den Spermien aller Säugtiere, sowie die Familie von „P2-Proteinen“, die nur in wenigen Säugtier-Spermiumkernen nachgewiesen werden können (Abb. 4). Dazu



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Protaminsynthese** (modifiziert nach Oliva 2006).

gehören Primaten (einschl. Mensch), Perissodactyla (Pferd, Zebra und Tapir) Lagomorpha (Kaninchen und Hasen) ebenso wie Probosciden (Elefanten). Die P1 und P2 Familie beinhaltet bei Säugetieren nur ein einziges Intron (Abb. 5), im Gegensatz zu den Protamingenen von Vögeln und Salmoniden, denen ein Intron fehlt (Balhorn 2007).

Das nukleare Remodelling der Spermien erfordert den Ersatz somatozellulärer Histonproteine durch Transitionsproteine und schließlich den Einbau von Protaminen, die die dichte Packung des Chromatins überhaupt erst ermöglichen (Poccia 1986). Die basische Natur der Protamine überführt das Chromatin in eine kristallartige Struktur, so dass daraus eine sechsfache Verkleinerung der Chromosomen resultiert (Fuentes-Mascorro et al. 2000). Dadurch wird das Kernvolumen nahezu ausschließlich von den Protaminen ausgefüllt, während die eigentliche DNS den geringeren Teil ausmacht. So wird die stabile und gesicherte Lagerung des Chromatins im Nukleus ermöglicht.



**Abb. 5: Schematische Darstellung des Protamingens bei der Maus** (modifiziert nach Balhorn 2007).

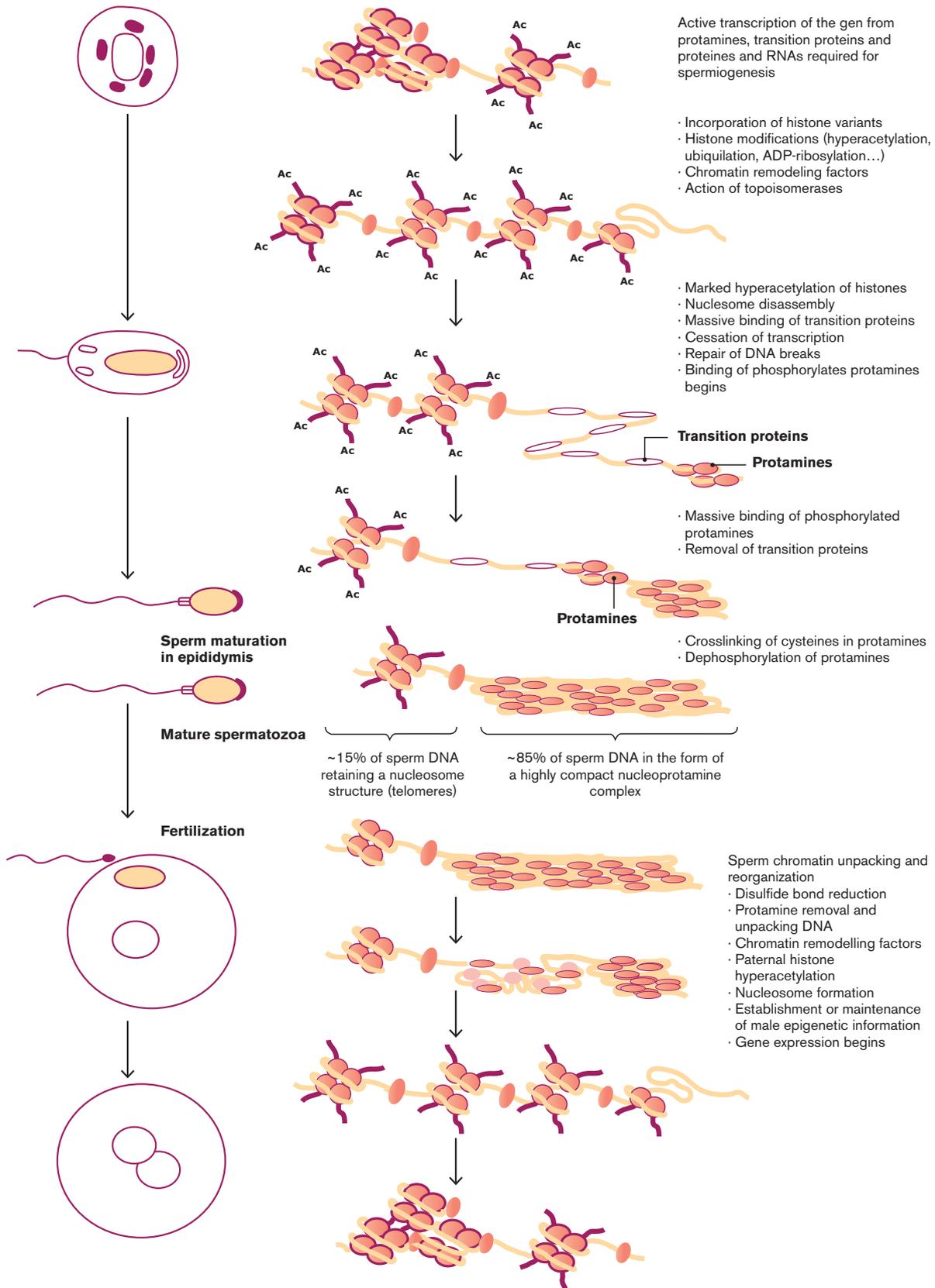
Die im Einzelnen ablaufenden Schritte umfassen zunächst die Verpackung der DNS somatischer Zellkerne in Nukleosomen (Pienta und Coffey 1984). Ein Oktamer von Histonen formiert zunächst einen Proteinkern, um den sich zwei Lagen von DNS wickeln. Diese Nukleosomen werden dann weiter in regelmäßigen Helices aufgewickelt (Finch und Klug 1976). Diese Variante der DNS-Packung vergrößert das Volumen des Chromatins (Ward und Coffey 1991), jedoch weisen Spermatozoenköpfe durchschnittlich nur die Hälfte des Volumens eines Nukleosoms auf (van Holde und Zlatanova 1996). Aus diesem Grund bedarf es einer vollständig differenten Packungsvariante des haploiden Chromosomensatzes in Spermatozoen. Im Jahr 1991 wurde ein Vier-Ebenen-Modell der Packung vorgeschlagen (Ward und Coffey 1991). Das Modell erklärt die Ursachen, die zur Kondensation in eine kompaktere, an Doughnuts erinnernde Form, sowie der chromosomalen Positionierung führt. Dazu gehören zuerst die chromosomale Verankerung durch Bindung der DNS an den nuklearen Anulus, außerdem die Formation von „DNA loop domains“, sobald diese an eine neu formierte, nukleare Matrix binden. Danach folgt der Ersatz von Histonen durch Protamine, durch die die oben genannte Kondensation ermöglicht wird (Abb. 6).

Bei Säugetieren gibt es ein Minimum von sechs somatischen Subtypen von Histonen (H1.1-H1.5 und H1<sup>o</sup>), eine eizellenspezifische und zwei hodenspezifische H1t (Lennox und Cohen 1983; Drabent et al. 1996; Khochbin 2001; Iguchi et al. 2003).

Während der Meiose wird ein Teil der somatischen Histone allmählich durch hodenspezifische Subtypen wie der H1t ersetzt und von der Zelle eliminiert (Abb. 6) (Doenecke et al. 1994; Franke et al. 1998; Steger et al. 1999).

Bei Menschen mit normaler Spermatogenese kann die hodenspezifische Histon-mRNA (H1t) in der Mitte und am Ende der Pachytänen in den Spermatozyten erscheinen (Stadium III-V), gleichzeitig mit dem Anfang der Transkription von H1t. Die Proteine H1t erscheinen in den Pachytänen Spermatozyten (Stadium III) und bleiben als Kernprotein bis zur Stufe 5 der Spermatiden bestehen (Stadium V) (Steger et al. 1998).

Bei Menschen mit normaler Spermatogenese werden die Histone zum Teil im Kern der reifen Spermatiden und Spermatozoen einbehalten, wo sie in Kombination mit den Protaminen vorkommen. Die Protamine erscheinen erstmals im Kern der



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Protamine während der Spermatogenese und der Befruchtung.** (Modifiziert nach Oliva 2006)

Spermatiden (Stadium IV) (Clermont 1963) und bleiben in den Spermatozoen erhalten (Gatewood et al. 1990; Le Lannic et al. 1993; Lescoat et al. 1993; Prigent et al. 1996). Der nukleare Status der Spermatozoen ist ein sehr wichtiger Parameter für die Einschätzung der männlichen Fruchtbarkeit. Demzufolge ist es evident, dass eine strikte, temporale sowie stadiumspezifische Genexpression eine Voraussetzung für die korrekte Differenzierung von runden Spermatiden zu reifen Spermatozoen ist (Steger et al. 1999).

## 2.5 Spermatologische Standarduntersuchung

Zu den spermatologischen Standardparametern beim Hengst zählen das gelfreie Volumen, die Spermienkonzentration, die Gesamtspermienzahl, die Motilität und die Morphologie der Spermien (Jasko et al. 1992; Blanchard und Varner 1996). Als klinischer Parameter für das Spermienbildungsvermögen wird die sogenannte Anzahl morphologisch-normaler, beweglicher Samenzellen pro Ejakulat (TNB) ermittelt, die nach amerikanischen Anforderungen bei 1,0 Milliarde TNB beim Pferd liegt (Kenney et al. 1983). Die einfachste und schnellste Methode, um sich einen Überblick über die Spermaqualität zu verschaffen, stellt die lichtmikroskopische Beurteilung der Motilität dar (Waberski et al. 1999). Mit einem Phasenkontrastmikroskop (150 bis 200fache Vergrößerung mit auf +37°C beheizbarem Objektträgtisch) werden die prozentualen Anteile vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher und unbeweglicher Spermien im nativen und verdünnten Ejakulat ermittelt. Die Aussagekraft dieses Parameters zur Erstellung einer Fertilitätsprognose ist jedoch umstritten (Colenbrander et al. 2003). Vidament et al. (1999) sahen die Langzeitmotilität von Hengstspermien nach Lagerung für 24 und 48 Stunden bei +4°C als ein wichtiges Kriterium zur Auswahl von Hengsten an, deren Samen für die Tiefgefrierung genutzt werden kann. In den achtziger Jahren untersuchten verschiedene Autoren bei den Hengstspermien die Motilität und deren Veränderung in Korrelation zu der Fertilität, ohne eine klare Aussage in dieser Beziehung machen zu können (Voss et al. 1981; Dowsett et al. 1982). Ein wertvoller spermatologischer Standardparameter zur Erstellung

einer Fertilitätsprognose ist die Spermienmorphologie. Blom (1977) unterteilte die morphologischen Abweichungen in primäre und sekundäre Anomalien. Primäre Veränderungen (z. B. Kopfdeformationen, Kernvakuolen) entstehen während der Spermatogenese im Hodenparenchym, während sekundäre Anomalien (z. B. proximale Plasmatropfen) im Bereich der ableitenden Samenwege auftreten. Andere Kategorisierungen sehen die Unterteilung in „Major Defects“ (z. B. Kopfdeformationen, proximale Plasmatropfen, geschwollene Mittelstücke), die die Fertilität stark beeinflussen, und „Minor Defects“ (z. B. distale Plasmatropfen) mit einem untergeordneten Einfluss auf die Fruchtbarkeit vor (Parlevliet und Colenbrander 1999). Saacke et al. (2000) unterschieden anhand der Auswirkung der Spermienmorphologie auf die Fertilität, kompensatorische und nichtkompensatorische Defekte. Bei kompensatorischen Defekten (z. B. Halsbrüchen, abgelösten Akrosomen) erfolgt aufgrund der Anomalie keine Befruchtung durch das betroffene Spermium. Der Defekt kann jedoch bei einer ausreichenden Spermienzahl durch morphologisch intakte, befruchtungsfähige Spermien ausgeglichen werden. Spermatozoen mit nicht-kompensatorischen Defekten (z. B. einer gestörten Chromatinkondensation) sind zwar in der Lage, die Eizelle zu befruchten, führen jedoch zu Störungen in der Embryonalentwicklung.

Mehrere Publikationen wurden in den letzten dreißig Jahren veröffentlicht, die den direkten Zusammenhang zwischen Spermienmorphologie und Fertilität nachweisen (Bielanski et al. 1979; Voss et al. 1981; Held et al. 1991; Brito et al. 2007). Die Spermienmorphologie und die Chromatinintegrität wurden als prädiktive Indikatoren der Fruchtbarkeit der Hengste in den Vordergrund (Morrel et al. 2008) gestellt.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Hengste und Hodengewebe**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zusammenarbeit mit dem Nordrhein-Westfälischen Landgestüt in Warendorf (Landstallmeisterin Frau Susanne Schmidt-Rimkus), das insgesamt 55 Warmbluthengste im Alter zwischen 3 und 19 Jahren für die nachfolgenden Untersuchungen am Anfang der Besamungssaison 2009 (Januar-Februar 2009) zur Verfügung stellte.

Die Samengewinnung und -aufbereitung sowie die spermatologische Standarduntersuchung der Ejakulate erfolgte in der Hengstprüfungsanstalt des Nordrhein-Westfälischen Landgestüts Warendorf.

Die morphometrischen Untersuchungen sowie die DNS-Integritätsanalysen wurden im Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Münster (nachfolgend CeRA UKM genannt) durchgeführt.

Die Untersuchung und Analyse der Protamine wurde in der Klinik für Urologie, Pädiatrie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (nachfolgend URO GI genannt) durchgeführt.

Durch transskrotale bedeckte Kastration von zwei Hengsten, im Alter von 3 und 5 Jahren, mit vollständig deszendierten Hoden und von Professor Bergmann zur Verfügung gestelltes Hodenmaterial eines dreijährigen Hengstes mit bilateralem Kryptorchidismus wurde das Hodengewebe für die histologischen und immunohistochemischen Analysen gewonnen. Die Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Veterinärmedizinische Fakultät, der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Bei Versuchsbeginn bezogen die 55 Warmbluthengste ihre Boxen im Landgestüt und waren während der Decksaison auf eine tägliche Samengewinnung eingestellt. Ihr Allgemeinbefinden war ungestört, sie waren erb- und geschlechtsgesund und zeigten ein normales Deckverhalten. Die Tiere wurden in Einzelboxen mit Stroh Einstreu eingestallt und erhielten eine Fütterung, die aus Heu, Hafer und pelletiertem Mischfutter bestand. Wasser stand jederzeit zur Verfügung.

### **3.2 Samengewinnung**

Die Samenentnahme erfolgte mittels künstlicher Scheide (Modell Hannover) gefüllt mit +38°C lauwarmem Wasser an einem Phantom (Modell „Celle“) in Anwesenheit einer rossigen Stute. Für jede Samenentnahme wurde eine Einmalschlauchfolie (Fa. Minitüb, Tiefenbach) in die künstliche Scheide eingezogen. Als Auffanggefäß diente eine sterile, skalierte Glasflasche, die mit einem Gazefilter (Fa. Minitüb, Tiefenbach) versehen war, um grobe Verunreinigungen und die Gelfraktion vom spermienreichen Erstejakulat abzutrennen. Das Auffanggefäß wurde mit einem gepolsterten Schutzüberzug versehen, der zugleich vor Temperaturschwankungen während der Samengewinnung schützte. Die weitere ca. 20minütige Aufbereitung und spermatologische Standarduntersuchung des Ejakulats erfolgte bei Raumtemperatur.

### **3.3 Spermatologische Standarduntersuchung (Zählung, Motilität und Morphologie)**

Im direkten Anschluss an die Samengewinnung wurde in der makroskopischen Untersuchung das Volumen (ml), die Farbe (grau, weiß, gelb) und die Konsistenz (wässrig, milchig, rahmig) beurteilt sowie das Vorhandensein von Beimengungen überprüft. Die Dichtebestimmung (Mio.Spermien/ml) erfolgte mit Hilfe eines Photometers („SpermaCue“, Fa. Minitüb, Tiefenbach). Durch Multiplikation von Volumen und Dichte wurde die Gesamtspermienzahl errechnet. Die Motilität des Nativsa-

mens sowie der verdünnten Frischspermaprobe wurde durch visuell mikroskopische Schätzung mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops (BX 60, Fa. Olympus, Hamburg) mit einem vorgewärmten Objektisch (+38°C) (HAT 400, Fa. Minitüb, Tiefenbach) ermittelt. Die Einteilung in vorwärts-, orts- und unbewegliche Spermatozoen erfolgte als subjektive Schätzung drei unterschiedlicher Gesichtsfelder bei 200facher Vergrößerung.

Zur Beurteilung der Spermienmorphologie wurde ein Ausstrich mit einer modifizierten Papanicolaou-Färbung, nach Anleitung des CeRA UKM, untersucht (Tabelle 1). 10µl des Nativspermas wurden auf einen Objektträger gegeben, ausgestrichen und luftgetrocknet. Pro Ejakulat wurden zwei Ausstriche angefertigt. Die Objektträger wurden in einem Äther-Alkohol-Gemisch (das Fixans besteht zu gleichen Teilen aus 96%igem Alkohol und Äther) und für 30 Minuten fixiert.

Alkohol 96%	30 Sekunden
Alkohol 80%	30 Sekunden
Alkohol 70%	30 Sekunden
Alkohol 50%	30 Sekunden
Aqua dest	30 Sekunden
Papanicolaou 1 (Hämatoxylin)	6 Minuten
Aqua dest.	30 Sekunden
Salzsäure (0,25%)	zweimal eintauchen
Leitungswasser	10 Minuten
Aqua dest.	30 Sekunden
Alkohol 50%	30 Sekunden
Alkohol 70%	30 Sekunden
Alkohol 80%	30 Sekunden
Alkohol 96%	30 Sekunden
Papanicolaou 2 (Orange G)	1 Min. 30 Sekunden
Alkohol 96%	30 Sekunden
Papanicolaou 3 (Polychrom)	1 Min. 30 Sekunden
Alkohol 96%	30 Sekunden
Alkohol 99%	30 Sekunden
Intermedium Rotisol	3 Stunden

**Tabelle 1: Modifizierte Papanicolaou-Färbung**

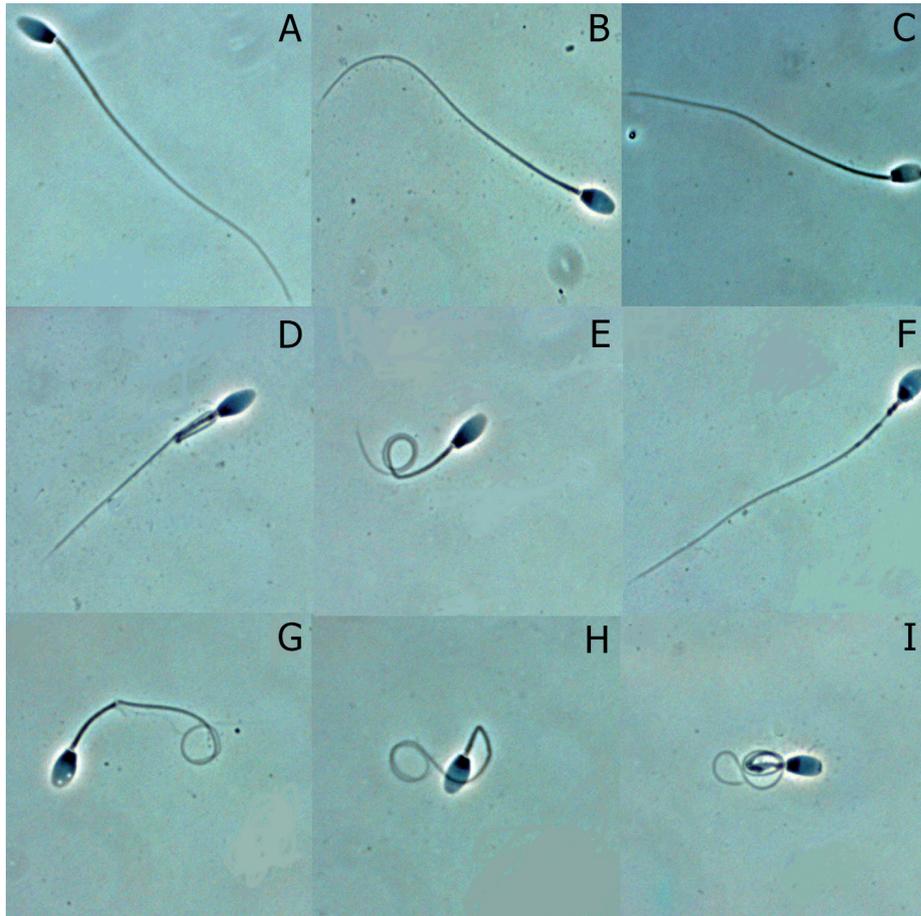
Die Präparate wurden mit Hilfe des 100er Objektivs (Öl) bei Phase 3 mikroskopiert. Ausgezählt wurden zweimal 200 Spermien (Abb. 7). Als Ergebnis wurde der Mittelwert angegeben.

Die Kategorien der Spermienmorphologie sind:

MORPHOLOGISCHE KATEGORIE	ABKÜRZUNG
Normale Form	N
Kopfdefekt	K
Mittelstückdefekt	M
Schwanzdefekt	S
Kopfdefekt + Mittelstückdefekt	K+M
Kopfdefekt + Schwanzdefekt	K+S
Mittelstückdefekt + Schwanzdefekt	M+S
Kopf-, Mittelstück- und Schwanzdefekt	K+M+S

**Tabelle 2: Morphologische Kategorien**

Ein Knick im Kopf-Mittelstück-Bereich wird als Mittelstückdefekt, ein Knick im Mittelstück-Schwanz-Bereich wird als Schwanzdefekt und separate Spermienköpfe ohne Schwanz als Mittelstückdefekte angegeben.



**Abb. 7: Morphologische Untersuchung der Spermien.** A: Normale Form; B-C: Kopfdefekt; D: Mittelstückdefekt; E: Schwanzdefekt; F: Kopfdefekt + Mittelstückdefekt; G: Kopfdefekt + Schwanzdefekt; H: Mittelstückdefekt + Schwanzdefekt; I: Kopf-, Mittelstück- und Schwanzdefekt. (modifizierte Papanicolaou-Färbung, 100x)

### 3.4 Probenaufbereitung

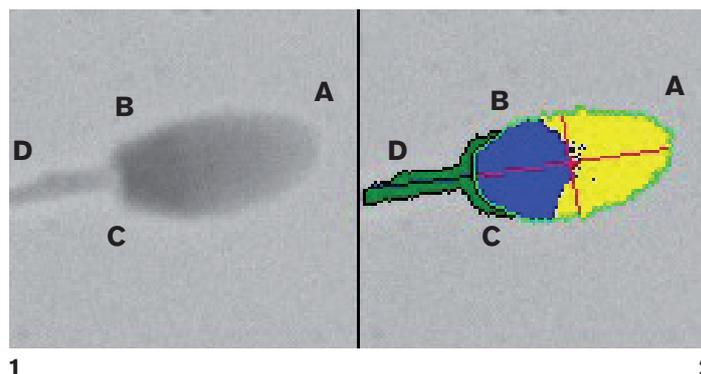
Vor der weiteren Aufbereitung der Proben wurden von jedem Ejakulat 2ml des Nativspermas in zwei verschraubbare Kryoröhrchen (jeweils mit 1ml) gefüllt. Danach wurden die Aliquoten zentrifugiert und das Seminalplasma abgehoben und verworfen. Die Pellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung bis zur Untersuchung der Spermienchromatinstruktur erfolgte in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5 Morphometrische Untersuchung

Für die morphometrische Untersuchung wurden 10 µl Nativsperma auf einen Objektträger gegeben, ausgestrichen und luftgetrocknet. Pro Ejakulat wurden zwei Ausstriche angefertigt. Die Objektträger wurden in einem Äther-Alkohol-Gemisch (Das Fixans besteht zu gleichen Teilen aus 96%igem Alkohol und Äther) für 30 Minuten fixiert.

Die Ausstriche wurden nach der modifizierten Papanicolaou-Färbung aufbereitet.

Die Präparate wurden mit Hilfe des 100er Objektivs (Öl) bei Phase 3 mikroskopiert, fotografiert und morphometrisch mit Hilfe des Computerprogramms ISAS (Integratet semen analysis system) Version 1.0.19 analysiert (Proiser, Valencia, Spanien) (Abb. 8).



**Abb. 8: Fotografie der morphometrischen Untersuchung der Hengstspemien.**

1. Papanicolaou-Färbung, A: akrosomaler Bereich; B: postakrosomaler Bereich; C: Halsregion; D: Mittelstück. 2. Morphometrische Analyse, A: akrosomaler Bereich, in Gelb; B: postakrosomaler Bereich, in Blau; C: Halsregion, in Grün; D: Mittelstück, in Grün).

### 3.6 Durchführung der Untersuchung der DNS-Integrität

Zur Bestimmung der Spermienchromatinintegrität nach der von Evenson et al. (1999) beschriebenen Methode „flow cytometric of acridine orange test“ (FCAOT) wurden die schockgefrorenen Nativspermaproben 2 Minuten im Wasserbad bei +37°C aufgetaut. Anschließend wurde mit TNE-Puffer eine verdünnte Spermien-

pension (Konzentration 1-2 Mio/ml) hergestellt, von der 200µl zunächst mit 0,4ml Säuredetergenz-Lösung versetzt und für 30 Sekunden auf dem Vortexer vermischt wurde. Anschließend wurden 1,2ml Akridinorange-Gebrauchslösung zugegeben, 3 Minuten im Eiswasser inkubiert und anschließend gemessen.

Für die Messungen wurden der FL-1-Filter für die grüne Fluoreszenz sowie der FL-3-Filter für die rote Fluoreszenz genutzt. Die Geräteeinstellungen wurden zu Beginn einer jeden Messreihe und nach jeder zehnten Messung anhand einer Referenzprobe überprüft. Die Auswertung der Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Gerätes Cytomics FC 500 (Beckmann Coulter, California, USA) ermittelt, wobei jede der Proben mit einer Gesamtzahl von 50.000 Spermien durchgeführt wurde. Die Daten wurden durch das Computerprogramm CXP Cytometry List Mode Data Acquisition & Analysis Software CXP Cytometer 2.2 erhoben. Alle Ergebnisse wurden durch das Computerprogramm FCS Express V 3.0 Research Edition in Form von DNS-Fragmentationsindex (DFI) berechnet.

### **3.7 Bestimmung des Protamingehaltes**

Das eingefrorene Spermienpellet wurde auf Eis aufgetaut. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation des Ejakulats bei 4000rpm und +4°C über insgesamt 10min. Das überschüssige Seminalplasma wurde abpipettiert. Danach wurde 1ml PBS pH 7,4 dazugegeben und 10min bei 4000rpm und +4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Der Vorgang wurde noch ein weiteres Mal wiederholt.

Am Ende der Prozedur wurde das Pellet in ein 2ml Eppendorfhütchen mit 250µl PBS aufgenommen.

Jede Probe wurde 30 Sekunden mit dem UltraTurrax behandelt. Zwischen den Proben erfolgte eine Spülung des Mixstabes mit 4N NaCl, 70% Ethanol und DEPC-Wasser. Die Proben wurden mit 1ml Trizol versetzt und 25µl 0,1M DTT hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben 2 Minuten vorgetext und über Nacht bei -20°C gelagert. Nach 24 Stunden wurden die Proben erneut bei 13000rpm und +4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein 2ml Röhrchen überführt. Danach wurden 300µl Chloroform hinzugeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine weitere Zentrifugation über 20 Minuten bei 13 000rpm und +4°C wurde durchgeführt. Die obere klare Phase wurde abpipettiert und in ein neues 2ml Röhrchen überführt. 10µl Glykogen (2mg/ml), 0,1 Volumen NaAC 3M und 1 Volumen Isopropanol -20°C wurden hinzugeben und über Nacht bei -20°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben 20 Minuten bei 13 000rpm und +4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 5-10 Minuten mit offenem Deckel unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 10-15µl DEPC-Wasser gelöst.

Die DNS-Verdauung mit RQ1 RNase-Free DNSse nach dem Promega Protokoll (Promega, Hamburg Germany) wurde wie folgt durchgeführt:

RNS in DEPC-Wasser	8µl
RQ1 RNase-Free DNSse 10x Reaction Buffer	1µl
RQ1 Rnase-Free DNSse	1µl
<b>Final Volume</b>	<b>10µl</b>

30 Minuten bei +37°C inkubiert.

1 µl Stopp-Solution wurde hinzugefügt und 10 Minuten bei +65°C inkubiert.

Anschließend wurde die Probe auf Eis gelegt.

**cDNS-Synthese mit iScript cDNS Kit von BioRad:**

5x iScript reaction Mix	4µl
iScript reverse transcriptase	1µl
Nuclease free-Water	5µl
RNS aus DNSse-Verdau	10µl
<b>Total Volume</b>	<b>20µl</b>

5 Minuten +25°C inkubiert

30 Minuten +42°C inkubiert

Die Proben wurden 5 Minuten bei +85°C inkubiert und anschließend auf Eis gelegt.

Im Folgenden wurde mit den Proben der Real-Time PCR-Ansatz durchgeführt:

Syber Green Supermix von BioRad	12,5µl	
Primer R	0,5µl	
Primer F	0,5µl	
Nuklease Free-Water	6,5µl	
<b>Final Volume</b>	<b>20µl + 5µl</b>	cDNS auf eine Konzentration von 5ng/µl eingestellt.

**ICycler BioRad:**

Cycle 1	+95°C für 3 Minuten	
Cycle 2 (40x)	+95°C für 30 Sekunden	
	+60°C für 30 Sekunden	
	+72°C für 1 Minute	
Cycle 3	+95°C für 1 Minute	
Cycle 4	+55°C für 1 Minute	
Cycle 5	+55°C für 10 Sekunden	Schmelzkurve: Temperatur-Anstieg jeweils um 0,5°C

Folgende Primer wurden in der Untersuchung verwendet:

Gene	Gene Bank Zugang Nr.	Primer Forward 5'-3'	Primer Reverse 5'-3'	Amplicon Lenwgh Bp
Prm 1	NC009156	ACCTCAGGACAGTGTAGCGG	GGAGACGWAAGATGTGCGCAG	81
Prm2	BK006494	GCCGTCTACGGAGCCTGT	ACCGCCGGGAGCTACTAC	73
Prm3		CTCCTCTTCCTCTGCCTCCT	TCCTCCATGAAGAAGCTGGT	93
GAPDH	AF157626	GACTCCACAACATATTCAGC	GCCATCACCATCTTCCAG	77
$\beta$ -actin	AF035774	ATCTGGGTCATCTTCTCG	CACCACACCTTCTACAAC	107
18S	AJ311673	GCTATCAATCTGTCAATCCTGTCC	ATGCGGCGGCGTTATTCC	204

**Tabelle 3: Primer**

### 3.8 Immunohistochemische Untersuchung im Hodengewebe

Das durch die Routinekastration gewonnene Hodenmaterial und der von Professor Bergmann zur Verfügung gestellte Hoden des kryptorchiden Hengstes wurden aufbereitet und in Paraffin fixiert. Danach wurden Gewebeschnitte mit einer Breite von 6 $\mu$ m angefertigt.

Die 6 $\mu$ m Schnitte wurden in Xylen deparaffiniert. Danach erfolgte eine Hydratation über eine Ethanol Reihe. Anschließend wurden die Schnitte für 30min bei +98°C in Zitratpuffer inkubiert und mit 0.02M PBS mit einem pH von 7,4 gewaschen. Um die Zugänglichkeit des Protaminantigens zur ermöglichen, wurde das hoch kondensierte Chromatin mit dem „Decondensing-Mix“ (frisch hergestellte 25mM Dithiothreiol, 0,2% Triton x-100 und 200 IU Heparin/ml in PBS) nach der Methode von van der Heijden et al. (2006) für 10min behandelt. Danach wurden die Schnitte mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 30min behandelt, gefolgt von einer Waschung mit PBS (inklusive 1,5% BSA) über 20min. Eine Inkubation mit monoklonalen anti-Protamin-1 Maus Antikörper (Hub 1N; MAb-001), bezogen von Briar Patch (Livermore, CA, USA), oder mit anti-Protamin-2 Maus Antikörper (Hub 2B; MAb-002, Briar Patch Verdünnung 1:200 in DAKO Verdünner) wurde durchgeführt.

Die Schnitte wurden über Nacht in einer Feuchtkammer bei +4°C inkubiert, gefolgt von einer Anwendung des DAKO EnVision System HRP (DAKO Hamburg, Deutschland) für 30min bei Raumtemperatur.

Abschließend wurde eine Immunodetektion mit dem Reagenz DAB durchgeführt.

### 3.9 Fertilitätsparameter

Um die Ergebnisse der spermatologischen Untersuchungen mit den Befruchtungsleistungen der Hengste in Relation zu setzen, wurde von 55 Hengsten anhand der Deckregister des Landgestüts NRW die Non-Return-Rate 28 (NRR 28%) bestimmt (van Buiten et al.1999).

Die Non-Return-Rate 28 gibt den Prozentsatz der Stuten an, die 28 Tage nach der letzten Besamung eines Rossezyklus nicht erneut zur Besamung vorgestellt wurden.

Für die NNR 28% wurden Quartile bestimmt, anhand derer die Hengste in drei Fertilitätsgruppen unterteilt wurden. Das erste Quartil entspricht der Hengstgruppe mit niedriger (n=14), das zweite und dritte der mit mittlerer (n=27) und das vierte Quartil (n=14) der mit hoher Befruchtungsleistung (Tabelle 4).

QUARTILE	ANZAHL DER HENGSTE (N)	FERTILITÄTSGRUPPE
1	14	niedrige
2	27	mittlere
3	14	höhere

**Tabelle 4: Unterteilung der Hengste in Fertilitätsgruppen**

### 3.10 Statistische Analyse

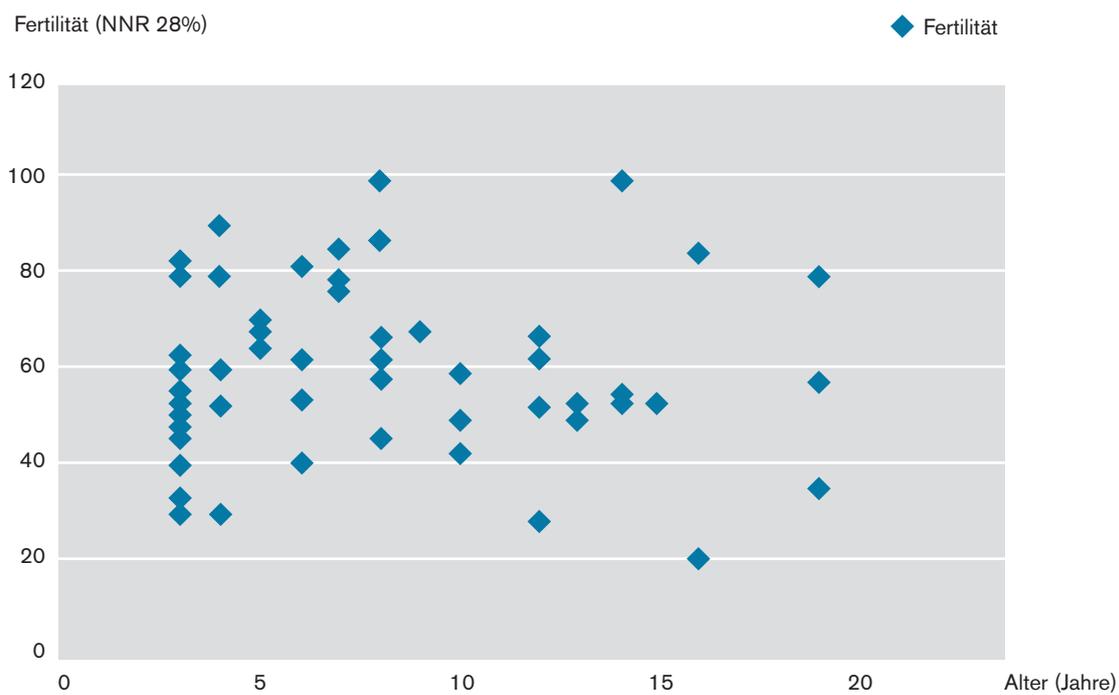
Die Statistische Datenanalyse wurde mit Hilfe verschiedener Computerprogramme durchgeführt. Zur Anwendung kamen Microsoft Excel 2010 (Microsoft USA), Statistica 8 (Statsoft USA) und Sigma Plot 10 (Systat Software Inc., USA). Die Auswertung wurde nach den in Biostatistics zweite Auflage (Lewis AE., van Nostrand Reinhold Company, New York, 1984) beschriebenen Kriterien durchgeführt.

Die Nullhypothese wurde verworfen bei  $p < 0,05$ . Die Normalverteilung wurde über den Shapiro-Wilk W Test und den Kolmogorov-Smirnov Ein-Proben Test evaluiert.

Wenn die Hypothese der Normalverteilung verworfen wurde, wurde der Mann-Whitney Test durchgeführt, und die Spearman Korrelation für nicht parametrische Variablen wurde kalkuliert. Es wurde angenommen, dass  $r < 0,2$  eine schwache Korrelation bedeutet.  $r > 0,2$  zeigte eine höhere Korrelation, was weitere Auswertungen ermöglichte.

## 4. Ergebnisse

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Lebensalter der Hengste festgestellt werden (Durchschnitt  $8,05 \pm 4,8$  Jahre) (Tabelle 8; Abb. 9).



**Abb. 9: Korrelation zwischen Alter und Fertilität**

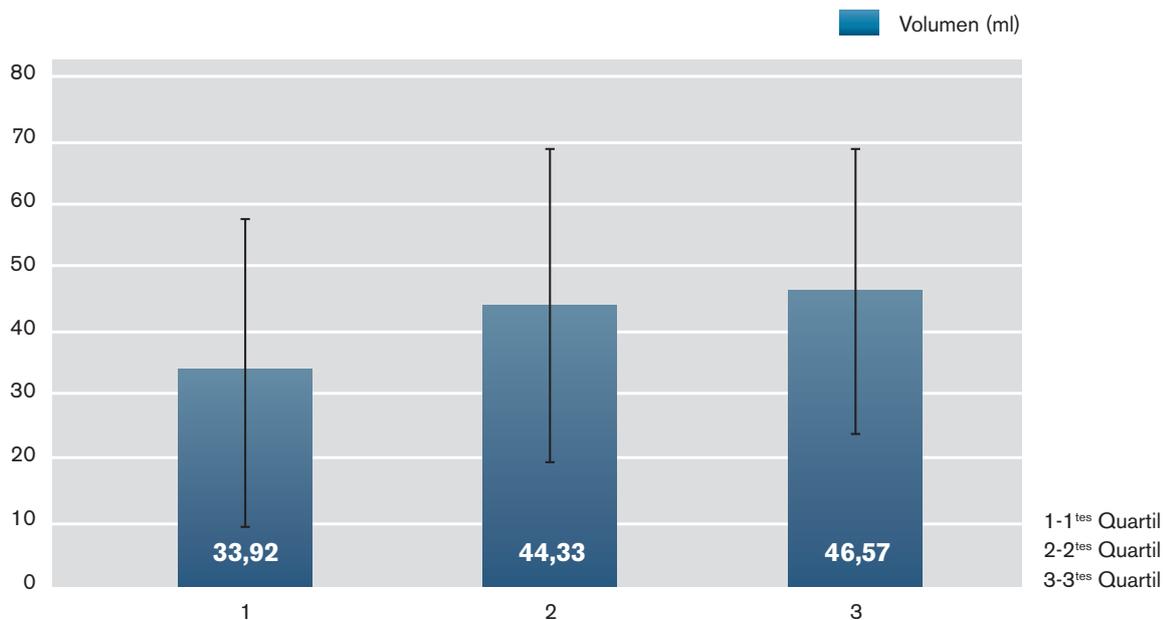
## 4.1 Spermatologische Standarduntersuchung

Bei der statistischen Auswertung stellte sich Folgendes dar: Hengste mit hoher durchschnittlicher Befruchtungsleistung (Quartil 3) ( $272,07 \pm 64,5$  Millionen Spermien pro Milliliter MioS/ml) wiesen eine niedrigere Spermienkonzentration auf, verglichen mit den Hengsten mit niedriger Befruchtungsleistung (Quartil1) ( $336.14 \pm 123.2$  MioS/ml) ( $p$ -Wert= 0,076). Die Spermienkonzentration zeigte auch einen Unterschied zwischen den Hengsten der Quartile 1 und 2 ( $p=0.022$ ) (Tabelle 5; Abb. 11).

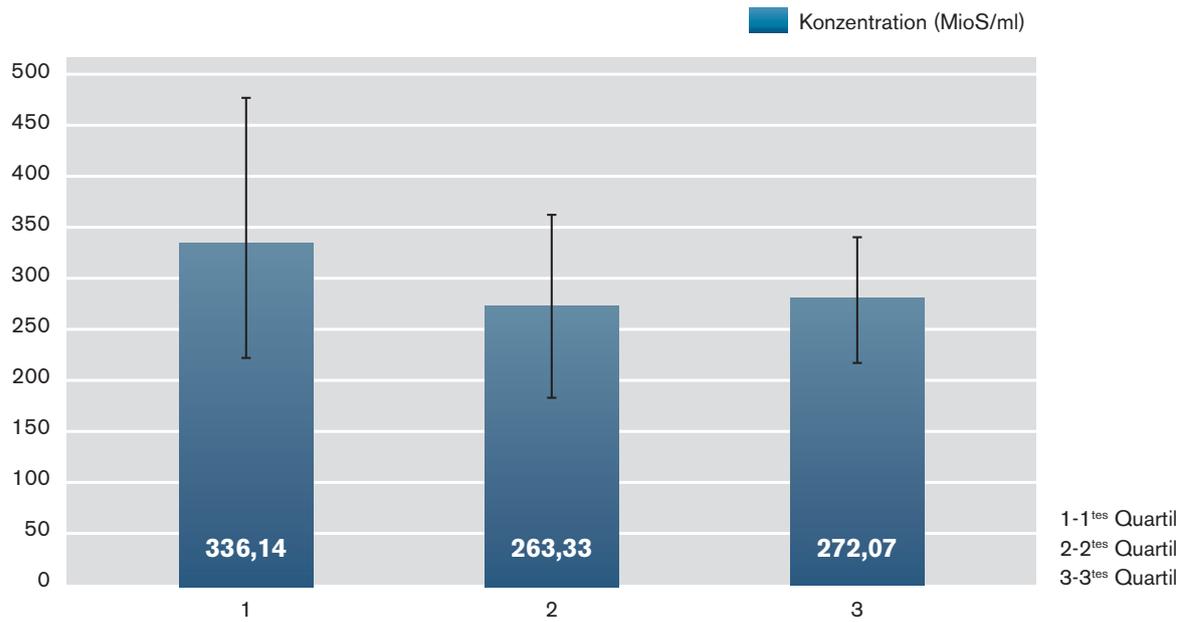
Gruppe	n	Volumen (ml)	Konzentration (MioS/ml)	Progressive Motilität (%)	Morphologische Defekte (%)
1-Niedrige Fertilität	14	33.92±24.28	336.14±123.20 <sup>a</sup>	33.11±7.31	33.11±7.341
2-Mittlere Fertilität	27	44.33±24.58	263.33±88.58	59.64±12.98	28.03±5.023
3-Höhere Fertilität	14	46.57±22.43	272.07±64.54	26.73±4.715	26.73±4.715
	total 55	42.25±24.06	284.09±96.90	60.29±12.50	28.97±6.039

a. 1 vs. 2;  $p$ -Wert 0.022. Die Daten sind als Mittelwert mit der Standardabweichung SD präsentiert

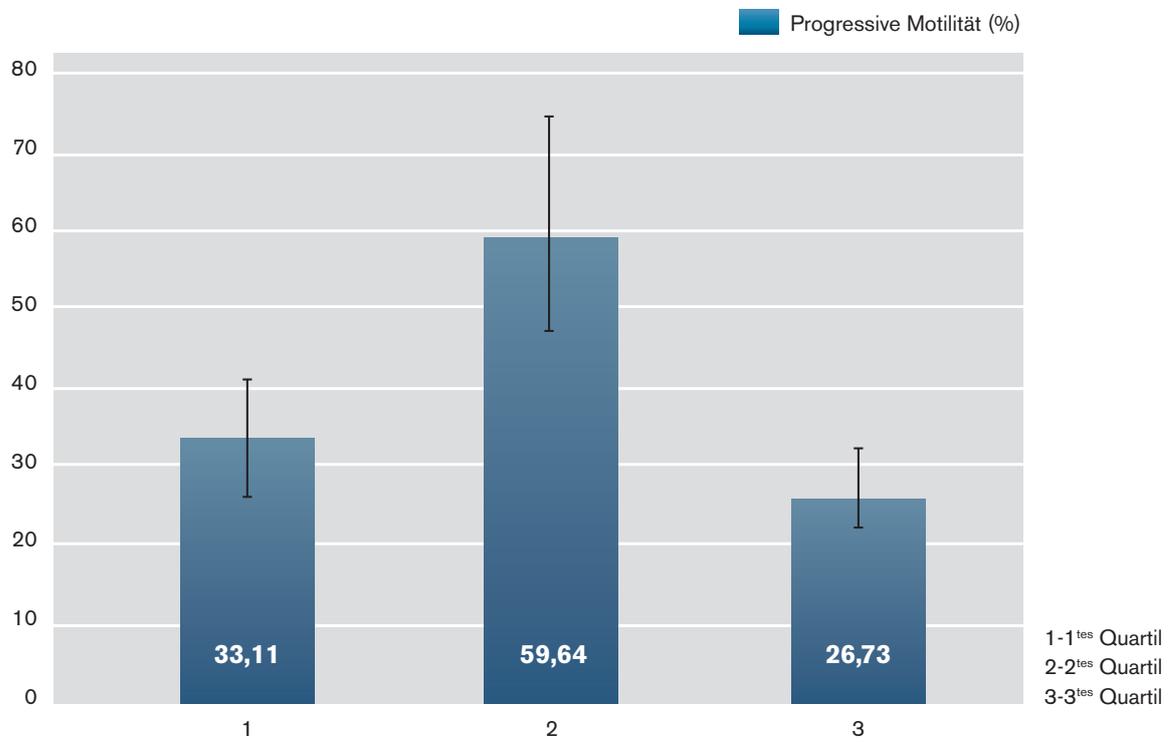
**Tabelle 5: Ejakulatparameter der Hengste**



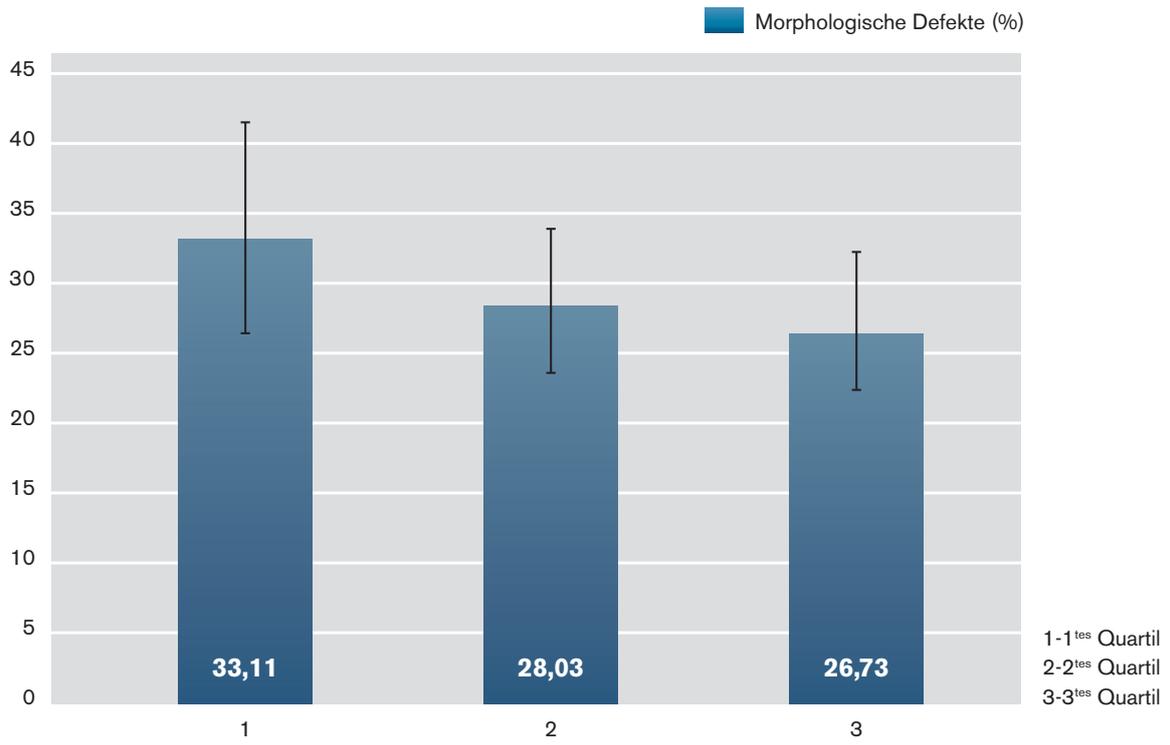
**Abb. 10: Ejakulatparameter der Hengste (Volumen/ml)**



**Abb. 11: Ejakulatparameter der Hengste (Konzentration/ Mios/ml)**



**Abb. 12: Ejakulatparameter der Hengste (Progressive Motilität/%)**



**Abb. 13: Ejakulatparameter der Hengste** (Morphologische Defekte/%)

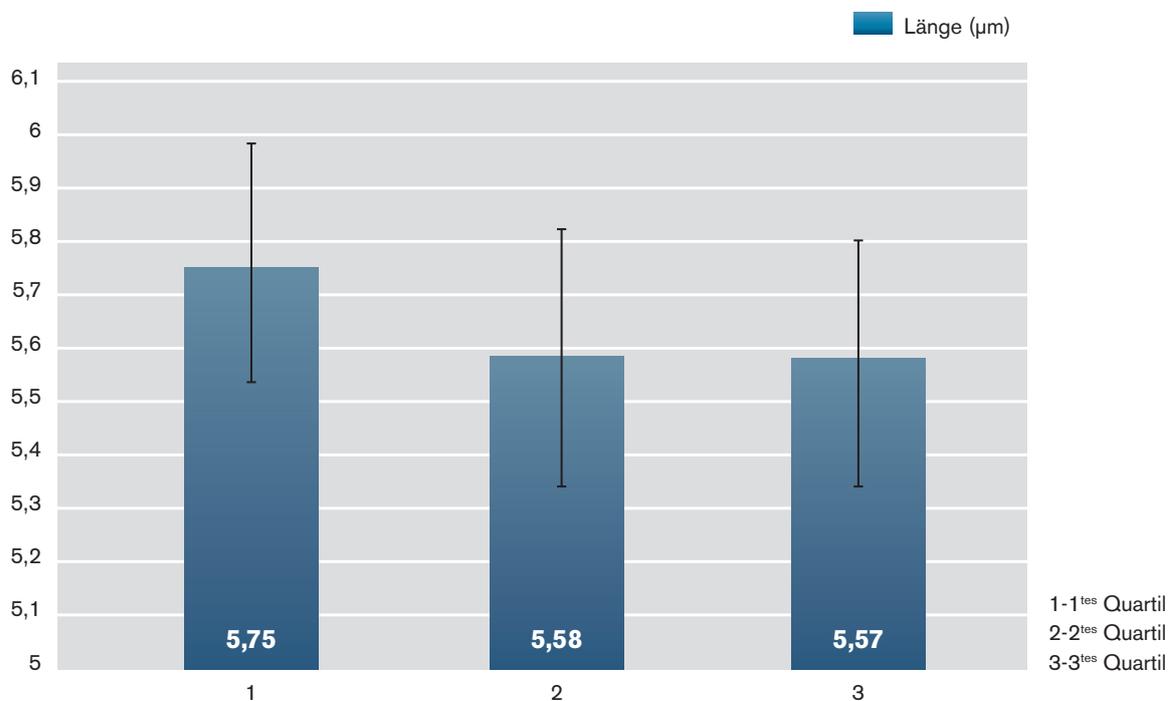
## 4.2 Morphometrie

Die morphometrische Untersuchung der Spermien zeigte Unterschiede in der Länge der Spermienköpfe zwischen den Gruppen (1 vs. 2:  $p=0,036$ ), (1 vs. 3  $p=0,049$ ). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 2 und 3 festgestellt ( $p=0,071$ ). Auch zeigte sich kein Unterschied im Perimeter sowie der Breite und Area der Spermienköpfe in den verschiedenen Gruppen (Tabelle 6; Abb. 14, 15, 16,17).

Gruppe	n	Länge (µm)	Breite (µm)	Fläche (µm <sup>2</sup> )	Perimeter (µm)
1-Niedrige Fertilität	14	5.75±0.24 <sup>a</sup>	2.96±1.08	14.03±0.7 <sup>d</sup>	18.09±0.76
2-Mittlere Fertilität	27	5.58±0.22	2.91±1.31 <sup>c</sup>	13.35±1.0	17.84±0.77
3-Höhere Fertilität	14	5.57±0.23 <sup>b</sup>	3.00±1.30	13.70±0.91	17.73±0.67
	total 55	5.62±0.24	2.94±1.28	13.61±0.94	17.87±0.74

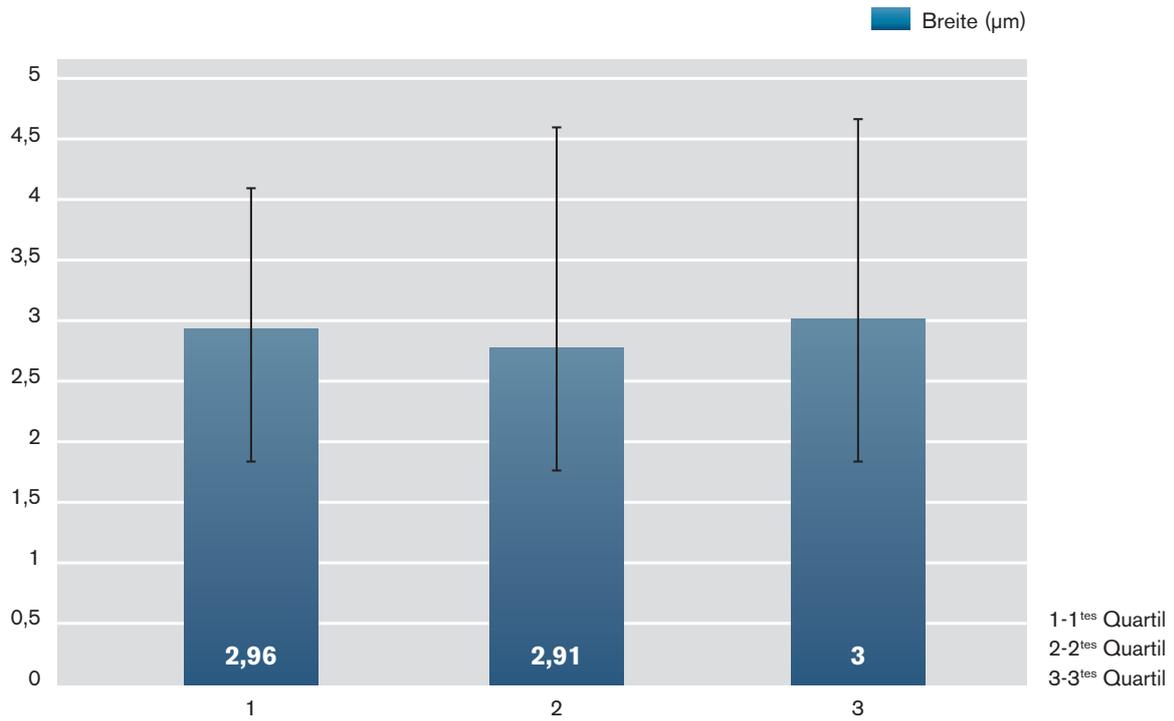
a; 1 vs. 2 p-Wert 0.036. b; 1 vs. 3 p-Wert 0.049 c; 2 vs. 3 p-wert 0.034 d; 1 vs. 2 p-Wert 0.029

**Tabelle 6: Morphometrische Untersuchung der Spermienköpfe**

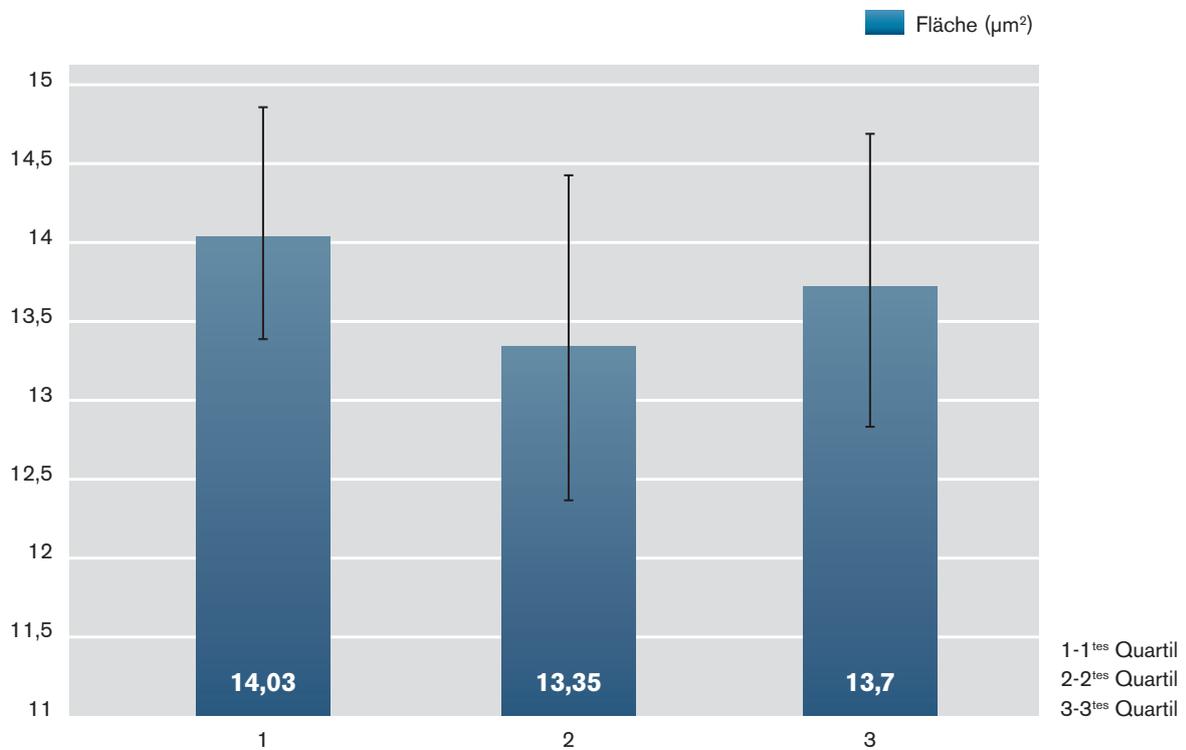


**Abb. 14: Morphometrische Untersuchung der Spermienköpfe (Länge/µm)**

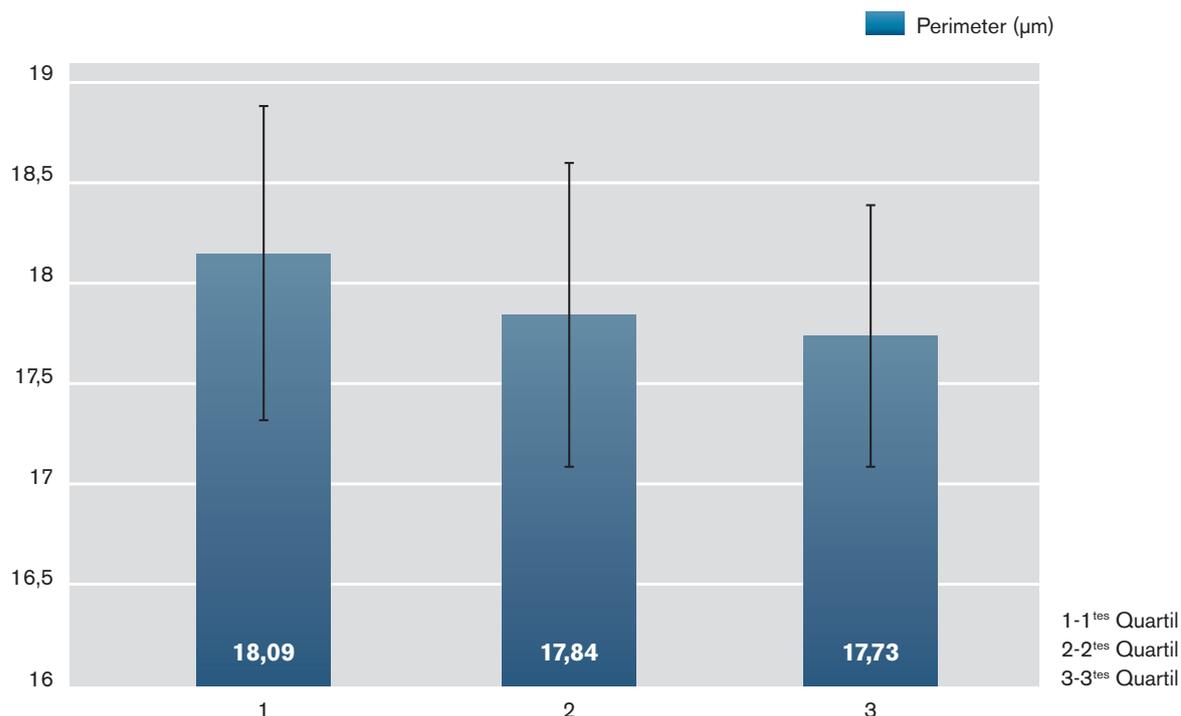
ERGEBNISSE



**Abb. 15: Morphometrische Untersuchung der Spermienköpfe (Breite/ $\mu\text{m}$ )**



**Abb. 16: Morphometrische Untersuchung der Spermienköpfe (Fläche/ $\mu\text{m}^2$ )**



**Abb. 17: Morphometrische Untersuchung der Spermienköpfe (Perimeter/µm)**

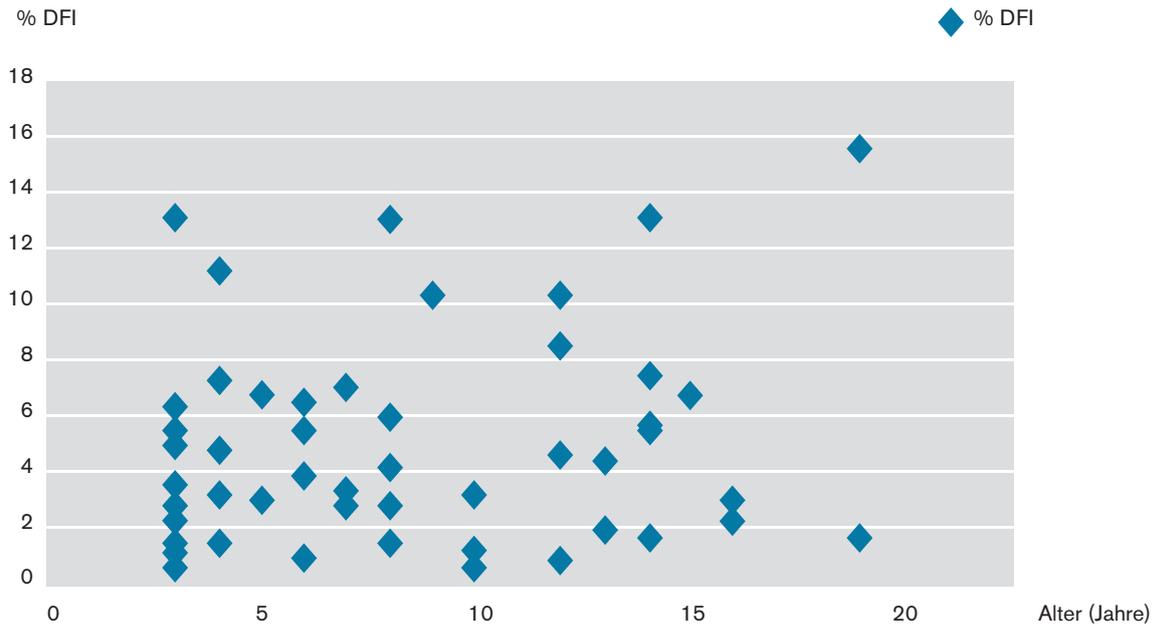
### 4.3 DNS-Integrität

Bei der Untersuchung der DNS-Integrität wurde ein Durchschnitt von ca. 5% DFI in der gesamten Hengstpopulation festgestellt. Ein relevanter statistischer Unterschied zwischen dem Alter und den drei Fertilitätsgruppen konnte bei der Auswertung nicht festgestellt werden (Tabelle 7, 9. Abb. 18, 19, 20).

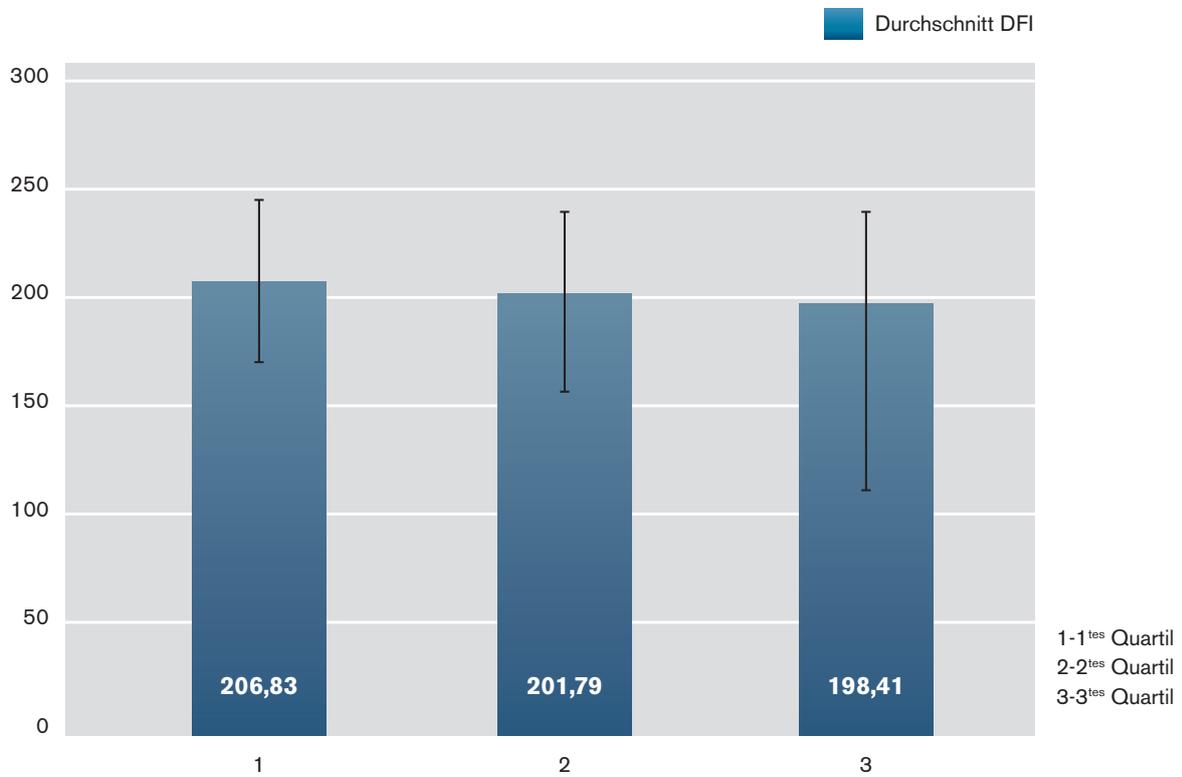
Gruppe	N	Durchschnitt DFI	% Hoch DFI
1-Niedrige Fertilität	14	206.88±38.56	4.51±3.94
2-Mittlere Fertilität	27	201.79±39.88	5.28±3.87
3- Höhere Fertilität	14	198.41±43.87	5.17±3.02
	total 55	202.23±40.56	5.06±3.64

Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung (SD) präsentiert

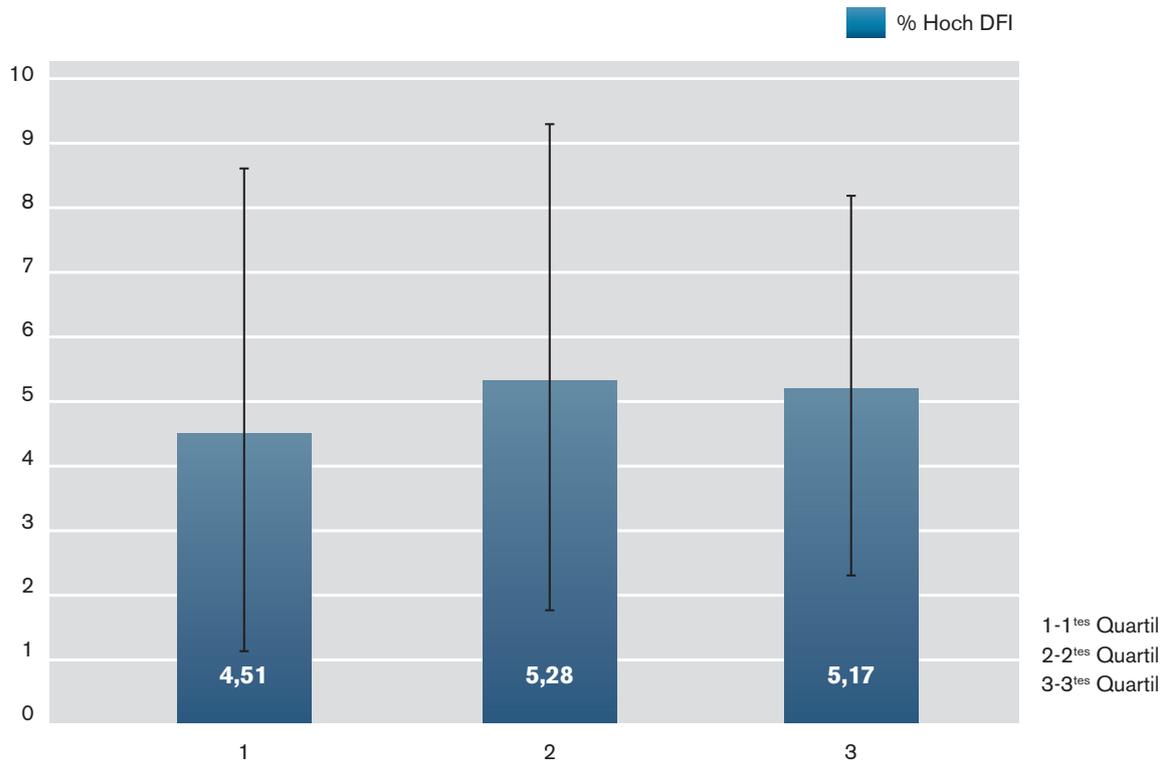
**Tabelle 7: Untersuchung der DNS-Integrität**



**Abb. 18: Korrelation zwischen DFI(%)-Wert und Alter der Hengste**



**Abb. 19: DNS-Integrität (Durchschnitt DFI)**

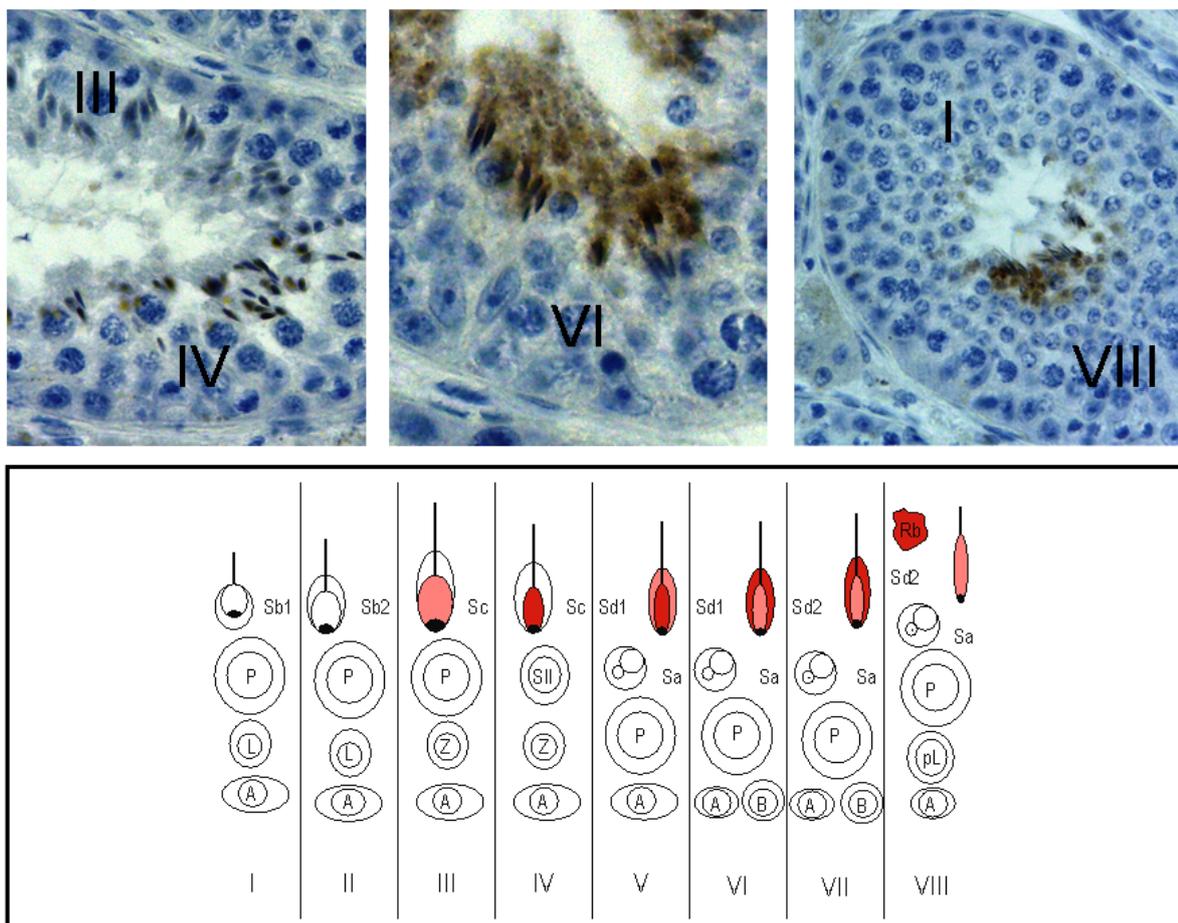


**Abb. 20: DNS-Integrität (% Hoch DFI)**

## 4.4 Kernproteine

### 4.4.1 Protamin Expression im Vergleich der physiologischen zur beeinträchtigten Spermatogenese des Hengstes

Die Expression des Protamins während der Spermatogenese beginnt im Stadium III der Spermatozyten (Johnson et al. 1990) (Abb. 21).



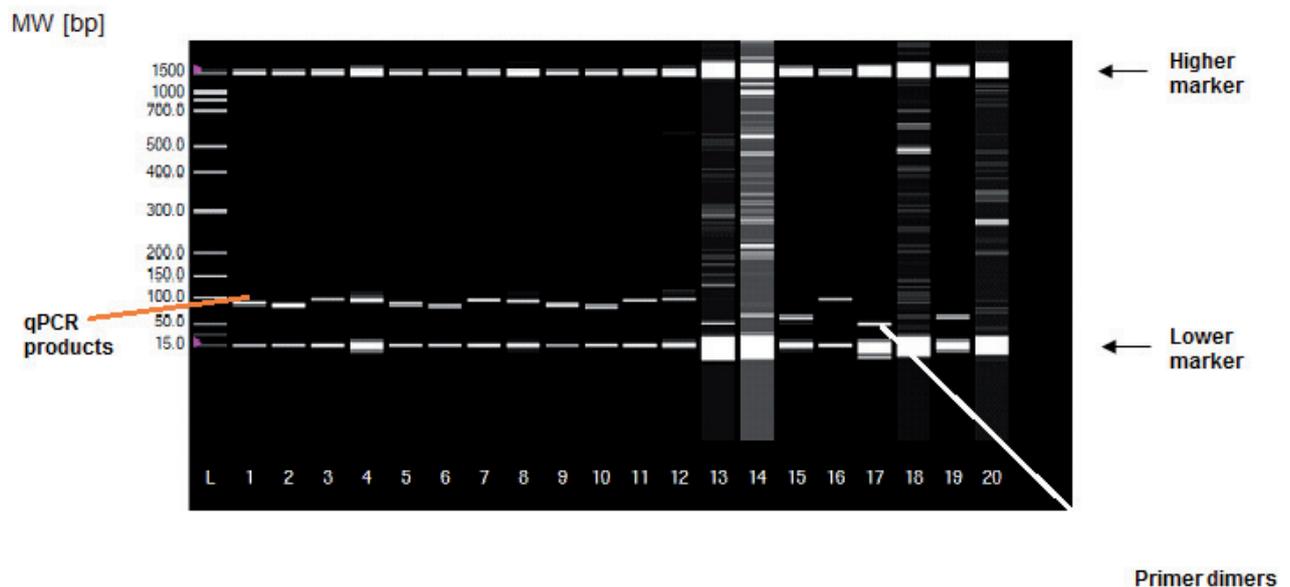
**Abb. 21: Immunohistochemische Lokalisation des Protamins-1.**

1. Die Abbildung zeigt die stadiumspezifische Expression des Protamin-1 während der Differenzierung der equinen germinalen Zellen. Die Expression des Protamin-1 wurde im Kern der elongierten Spermatozyten im Stadium III-VIII und in den vorhandenen "residual bodies" (Rb) des Stadiums VII festgestellt. Es wurde keine Expression in den Spermatozyten der Stadien I und II nachgewiesen. A- Spermatozyten Typ A; B-Spermatozyten Typ B; pl-Preleptotene Spermatozyten; L-Leptotene Spermatozyten; P-Pachytene Spermatozyten; Z-Zygotene Spermatozyten; SII-Spermatozyten II; Sa-runde Spermatozyten; Sb1-Sd2-Spermatozyten in verschiedenen Stadien.

Bei der Verwendung von monoklonalen Antikörpern konnte das spezifische Signal des Protamin-1 während der normalen Spermatogenese nachgewiesen werden. Eine vermehrte Abfärbung in den elongierten Spermatiden und auch in den Spermien war deutlich feststellbar. Im Gegensatz dazu zeigte sich in histologischen Gewebeschnitten von Hengsten mit atrophischen Hoden keine Färbung.

Durch den Einsatz von generierten Antikörpern gegen menschliches Protamin-2 konnte in den Gewebeschnitten der Hengste kein Protamin-2 nachgewiesen werden.

Durch die Verwendung von RT-qPCR spezifischen Primern, angepasst an die genomische Sequenz der Pferde, konnte die Expression in Hodengewebe und Ejakulat der 55 Hengste, Protamin-1 und zwei Varianten von Protamin-2 (Protamin-2 und Protamin-3) erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 23).



**Abb. 23: RT-qPCR Produkte der Hengstprotamine separiert durch kapillare Elektrophorese** (Experion Biorad). Die Linien (L) 1-3 repräsentieren die Spermienprodukte: P1, P2 und P3. Die Linie 4 stellt das  $\beta$ -Aktin-Referenzgen in Spermien von Ejakulat dar. Die Linien 5-8 zeigen P1-3 und  $\beta$ -Aktin in Hoden der fertilen Hengste. Die Linien 9-12 zeigen Protamine-1, -3 und  $\beta$ -Aktin in Hoden der subfertilen Hengste. Die Linien 13-16 repräsentieren Proben von Prostatagewebe ohne Nachweis von P1-3/Produkten (Linien 13-15) mit Präsenz von  $\beta$ -Aktin (Linie 16). Die Linien 17-20 zeigen die negativen Kontrollen mit Primer dimers in den Linien 17 und 19.

#### 4.4.2 Die Korrelation zwischen Fruchtbarkeitsparametern und dem Protamin-1/ Protamin-2-mRNA-Verhältnis bei Warmbluthengsten

In der gesamten Population der 55 Hengste variierte die relative Expression von Protamin-1 zwischen 10,1-8,6 und Protamin-2 zwischen -2-5,6. Die Analyse der Ratio beider Protamine ergab einen Bereich zwischen -6,4-11,2. In Gruppe 1 (Hengste mit niedriger Fertilität) lag der Durchschnitt der P1/P2 Ratio bei  $1,5 \pm 4,5$  (Abb. 24)

Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied im P2/P1-Verhältnis zwischen den Gruppen 1 und 3 ( $p=0,014$ ) (Abb. 24).

Auffallend ist, dass der signifikante Unterschied nur für die Expression der Protamine-1 ( $p=0,019$ ) nachgewiesen werden konnte, nicht jedoch für die Protamine-2 ( $p=0,049$ ) im Vergleich der Gruppen 1 und 3.

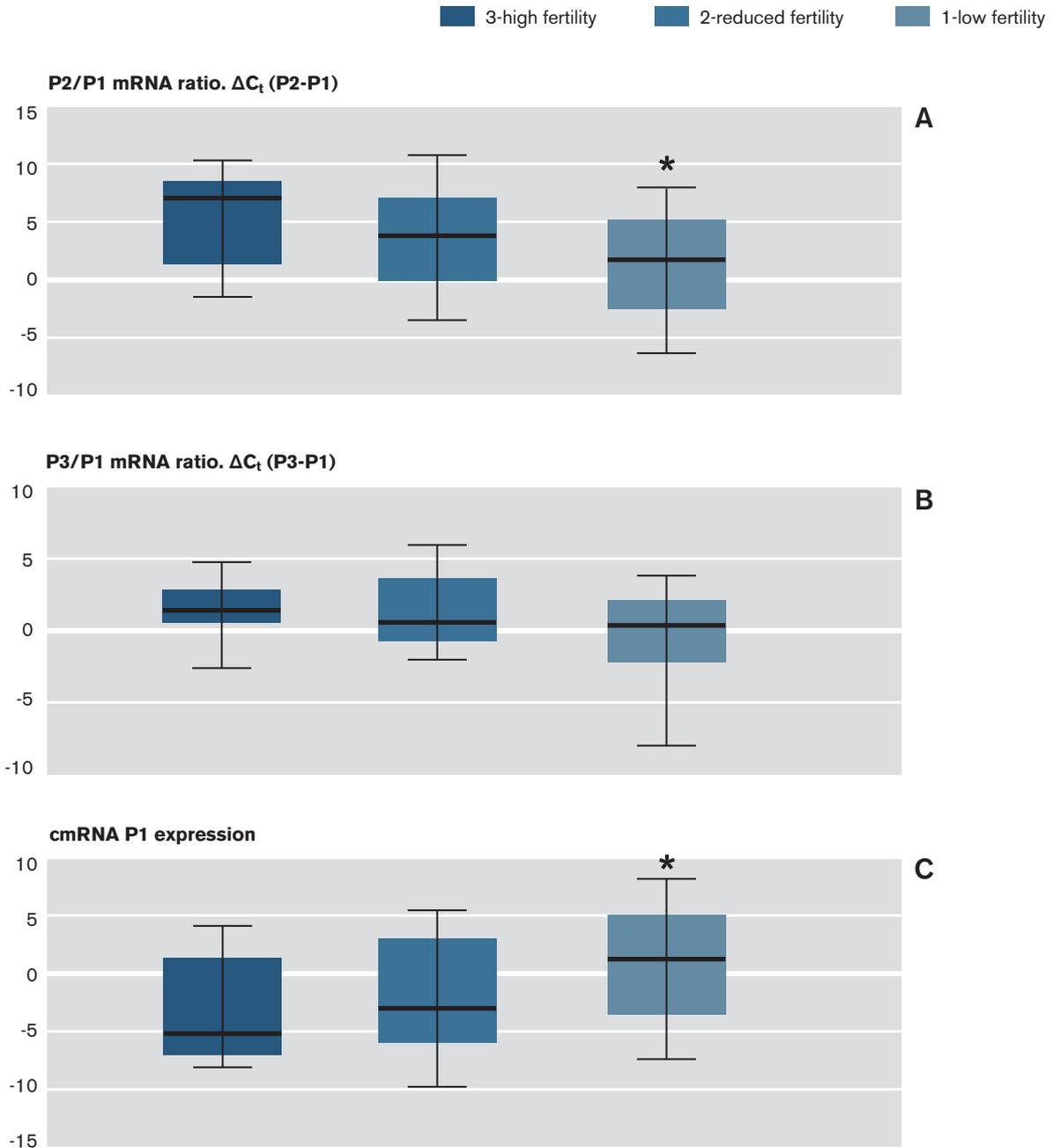
Die Untersuchungen zeigten eine deutliche Korrelation zwischen Fertilität (NRR 28%) und der relativen Expression von Protamin-1 (correlation co-efficiency  $p=0,019$ ), sowie eine positive Korrelation zwischen Fertilität und P1/P2 Ratio (correlation co-efficiency  $p=0,017$ ).

Im Gegensatz zu der Expressionsrate von beiden P2-Varianten, die bei allen Gruppen ähnlich waren, zeigte die Expression von P1 statistisch signifikante Unterschiede ( $p=0,019$ ) zwischen den Hengsten mit hoher und niedriger Fertilität. Wie zu erwarten, spiegelten sich diese Parameter invers in der P2/P1 Ratio wider. Hengste mit einer niedrigen Fertilität zeigten auch die niedrigste P2/P1 Ratio ( $1,5 \pm 4,5$ ). Die Gruppe mit mittlerer Fertilität zeigte eine erhöhte Ratio ( $3,7 \pm 4$ ), die mit hoher Fertilität wies eine signifikant höhere ( $p=0,016$ ) Ratio ( $5,5 \pm 3,8$ ) im Vergleich mit denen der niedrigen Fertilität auf (Abb. 24).

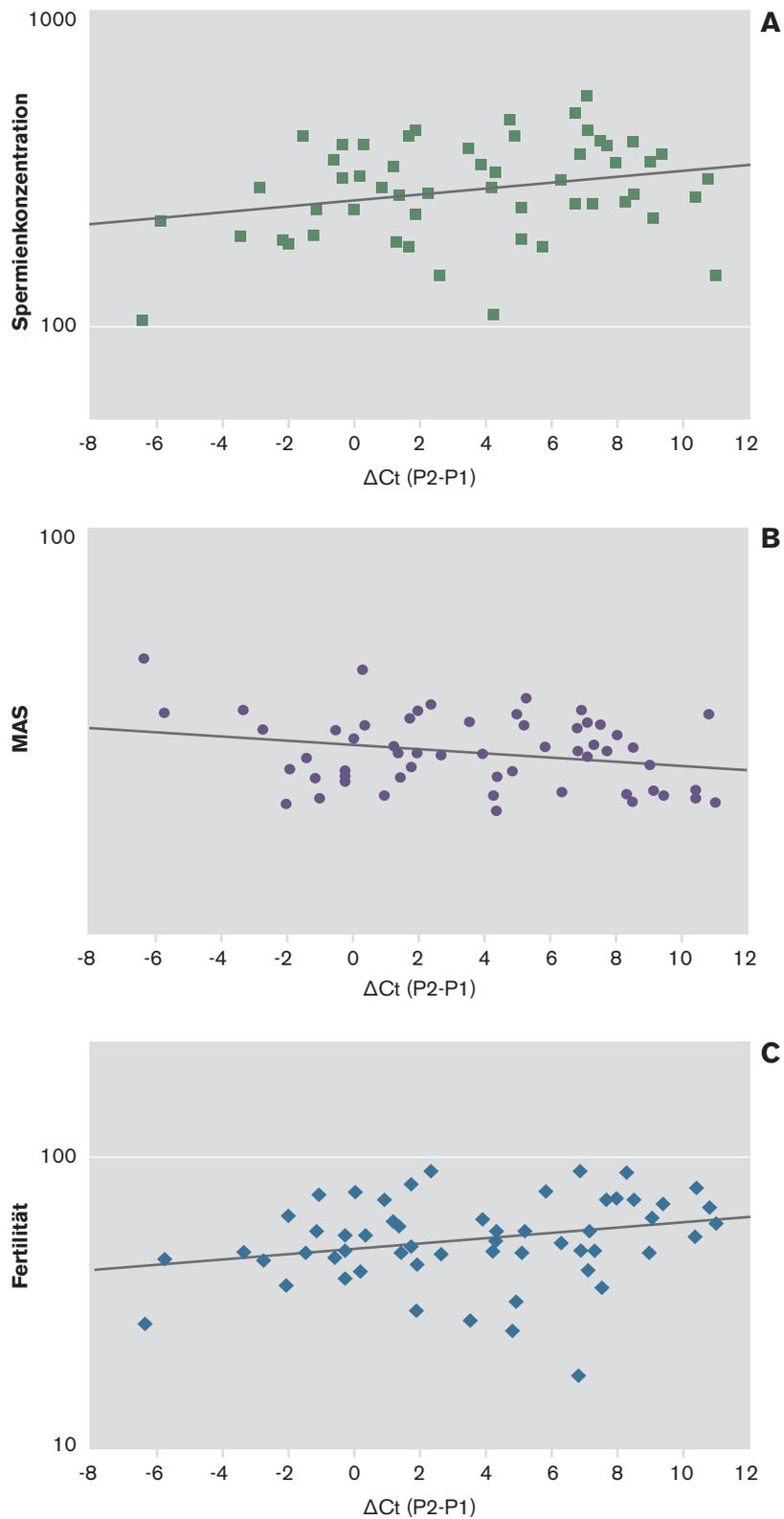
Weitere Untersuchungen zeigten eine positive Korrelation zwischen der P2/P1 Ratio, der Fertilitätsrate (NRR 28%  $r=0,274$ ;  $p<0,05$ ) und der Spermienkonzentration ( $r=0,263$ ;  $p<0,05$ ). Eine signifikante negative Korrelation konnte zwischen der Fertilitätsrate und den morphologisch aberranten Spermienköpfen dargestellt werden ( $r=-0,348$ ;  $p<0,05$ ) (Abb. 25).

Eine positive Korrelation zwischen dem Anteil morphologisch anormalen Spermien und der P1 Expression konnte nachgewiesen werden ( $r=0,314$ ;  $p<0,05$ ).

Die Fruchtbarkeit stand mit anderen untersuchten Spermienparametern in keinem Zusammenhang.



**Abb. 24: Verhältnis der Protamin-mRNA in Hengstejakulaten, eingeteilt entsprechend der NRR 28% (none return rate).** A: P2/P1 mRNA Verhältnis wird als logarithmiertes Verhältnis von P2 und P1 ( $\Delta C_t = C_{tP2} - C_{tP1}$ ) dargestellt. Sternchen zeigt den signifikanten Unterschied zwischen Gruppe 1 und 3  $p=0,019$ ; non-parametric Mann-Whitney U-test; B: P3 (P2-Variante)/P1 mRNA Verhältnis wird als logarithmiertes Verhältnis von P3 und P1 ( $\Delta C_t = C_{tP3} - C_{tP1}$ ) dargestellt. C: Relative Protamin1-mRNA-Expression in Spermatozoen von Hengsten (1 vs. 3  $p=0,05$ ; non-parametric Whitney U-test).



**Abb. 25: Korrelation des P2/P1-mRNA-Verhältnis ( $\Delta Ct = C_{tP2} - C_{tP1}$ ) mit:**  
 A. Spermienkonzentration ( $r = 2,263$ ); B. morphologisch anomalen Spermien ( $r = 0,348$ );  
 C. Fertilität (NNR 28%) ( $r = 0,274$ ).

## 5. Diskussion

Wie bei anderen Säugetieren wird die Reproduktionsleistung des Pferdes durch verschiedene innere und äußere Faktoren beeinflusst. Einflussfaktoren wie Alter, Heritabilität, Management und Allgemeinerkrankungen können Fruchtbarkeitsstörungen beim Hengst zur Sub- oder Infertilität mit entsprechenden wirtschaftlichen Konsequenzen führen (Klewitz 2009).

Zur Beurteilung der Zuchttauglichkeit eines Hengstes und der Ejakulatqualität werden seit Jahrzehnten unterschiedliche spermatologische Untersuchungen durchgeführt. Dabei basiert die traditionelle Samenanalyse auf den spermatologischen Standardparametern: Volumen, Farbe und Konsistenz des Ejakulats, Motilität, Vitalität und Morphologie der Samenzellen (Heilkenbrinker et al. 2011). Die Aussagekraft der Fertilitätsbestimmung kann durch Kombination verschiedener Spermienfunktionstests, z. B. zum Kapazitations- und Akrosomstatus der Samenzellen, gesteigert werden.

Anhand der spermatologischen Standarduntersuchung frisch gewonnener Ejakulate oder von Frischspermaeinsendungen werden zwar Spermienanomalien erkannt und eindeutig unfruchtbare Hengste ermittelt, die Erkennung subfertiler Hengste oder eine genaue Fertilitätsprognose gestaltet sich jedoch bisher schwierig (Colenbrander et al. 2003). Abgesehen von extrem abweichenden Parametern ist die Aussagekraft der standardmikroskopischen Untersuchung auch beim Mann in Bezug auf das Fertilitätspotential fraglich (Jequier 2005). Als direkte Konsequenz werden häufig subfertile Männer und Hengste als normal fertil eingestuft. In der Veterinärmedizin ist die Situation aufgrund der limitierten Untersuchungsmöglichkeiten erschwert.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass zur detaillierten Differenzierung der Fertilität des Hengstes die spermatologische Standarduntersuchung nicht ausreichend ist.

Einige in der Humanmedizin übliche Untersuchungsmethoden werden auf Grund ihres Aufwandes, fehlender Erfahrung in ihrer Durchführung und mangelnder Basisdaten in der Veterinärmedizin nur begrenzt eingesetzt. Invasive Untersuchungstechniken wie die Hodenbiopsie, die in der Humanmedizin zur Untersuchung der schweren Fertilitätsstörung angewendet werden können, werden auf Grund des Risikos von Blutungen, Entzündungen und Schwellungen nur nach strenger Indikation durchgeführt (Kliesch und Bergmann 2011).

Aktuelle Erkenntnisse über die molekulare, genetische und epigenetische Regulation der Spermatogenese sowie der Spermienfunktion können zu einer Verbesserung der Fertilitätsprognose im Rahmen der Zuchttauglichkeitsuntersuchung des Hengstes führen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse der spermatologischen Standarduntersuchung, der Morphometrie, der Chromatinintegrität sowie des Protamingehaltes der Spermatozoen untersucht und die Korrelation zwischen den Untersuchungsparametern sowie die Korrelation zwischen den Untersuchungsparametern und der Fertilität des Hengstes ermittelt. Im Folgenden werden die Untersuchungsergebnisse separat diskutiert.

## **5.1 Non-Return-Rate 28 Tage (NRR 28%)**

Um den Zusammenhang zwischen den Untersuchungsparametern und der Fruchtbarkeit des Hengstes zu bestimmen, wurde die Korrelation zwischen den Untersuchungsergebnissen der Ejakulate der untersuchten Hengstpopulation (n=55) und der Non-Return-Rate 28 ermittelt.

Die Non-Return-Rate ist ein wertvoller Fertilitätsparameter, da sie im Vergleich zur Abfohlrate weitgehend unabhängig vom intensivierten Management bei unbefriedigenden Trächtigkeitsergebnissen im Verlauf der Decksaison ist. Im Gegensatz zur Trächtigkeitsrate pro Zyklus (Dowsett und Pattie 1982) eignet sich die Non-Return-Rate auch zur Fertilitätsbeurteilung von Hengsten auf Besamungsstationen, auf denen nach Besamung, Frischspermaabholung oder -versand die Stuten nicht

zur Trächtigkeitsuntersuchung vorgestellt werden. Begrenzt wird die Aussagekraft der Non-Return-Rate allerdings durch Stuten, die trotz ausbleibender Trächtigkeit nicht wieder zur Besamung vorgestellt werden.

Bei der statistischen Auswertung der Untersuchungsergebnisse wurden signifikante Korrelationen zwischen der Non-Return-Rate 28 und dem P2/P1-mRNA-Verhältnis sowie der Morphologie der Spermien festgestellt. Des Weiteren wurde eine schwache Korrelation zwischen der Fertilität und Spermatozoen mit kleineren Spermienkopfflächen und eine negative Korrelation mit dem P3/P1-mRNA-Verhältnis ermittelt. Der von Phetudomsinsuk et al. 2008 und Gravance et al. 1996 beobachtete Zusammenhang zwischen der Subfertilität und den Kopfdefekten in Form von morphometrischen Anomalien konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden.

## 5.2 Spermatologische Standarduntersuchungsparameter

Im Hinblick auf die spermatologischen Standarduntersuchungsparameter wurde in der vorliegenden Studie eine positive Korrelation zwischen der Fertilität und der Morphologie dargestellt. Nach Bielanski (1975) korreliert der Anteil an Spermien mit primären Anomalien negativ ( $r=-0,5$ ) mit der Fertilität (definiert durch die Trächtigkeitsrate pro Rosse). Jasko et al. (1990) ermittelten eine positive Korrelation zwischen dem Prozentsatz morphologisch normaler Spermien in Ejakulaten von 66 Hengsten und ihrem Befruchtungsvermögen ( $r=0,34$ ,  $p<0,01$ ). Der Anteil morphologisch abweichender Spermien korrelierte negativ mit der Fertilität ( $r=-0,36$ ). Love et al. (2000) beobachteten in einer Studie mit 17 Hengsten ebenfalls eine Beziehung von morphologisch normal ausgebildeten Spermien zur ejakulatbezogenen Trächtigkeitsrate sowie signifikante negative Korrelationen zwischen Spermienanomalien und der Trächtigkeitsrate.

Morrell et al. (2008) stellten bei 8 Hengsten (41 Ejakulate) einen Zusammenhang zwischen Morphologie und Spermienchromatinintegrität fest und sahen beide Parameter als sinnvolle Indikatoren zur Vorhersage der Subfertilität von Hengsten an.

Diskutiert wird eine Spermatogenesestörung und damit verbundene Veränderung in den Spermienqualitätsparametern. Obwohl die Mechanismen nicht klar definiert wurden, werden eine gestörte Transkription und Translation sowie abnormale Apoptoseraten in den Tubuli seminiferi angenommen (Steger et al. 2001, 2003; Carrel et al. 2007).

In verschiedenen Mausmodellen wurde die Haploinsuffizienz der Protamine mit einer abnormalen Spermatogenese und dem verstärkten Auftreten von DNS-Schäden assoziiert (Cho et al. 2001, 2003). Mit diesen Beobachtungen stimmen die Ergebnisse der vorliegenden Studie überein, bei der eine positive Korrelation zwischen dem P2/P1-Verhältnis und der Prozentzahl an morphologisch veränderten Spermien ermittelt wurde.

In der Gruppe der Hengste mit der höchsten durchschnittlichen Befruchtungsleistung wurde eine signifikant niedrigere Spermienkonzentration festgestellt. Unterschiede in der Gesamtspermienzahl pro Ejakulat waren jedoch nicht signifikant. Bei der Herstellung der Besamungsdosis im Labor des Landgestüts werden diese Parameter berücksichtigt und durch das Hinzufügen eines Samenverdünners eine Standardbesamungsdosis entsprechend den Empfehlungen der World Breeding Association for Sport Horses (WBFSH) hergestellt.

Die Aussagen verschiedener Autoren zum Zusammenhang zwischen der Motilität und der Fertilität variieren von keiner Korrelation (Dowsett und Pattie 1982; Magistrini et al. 1992; Voss et al. 1981) bis zu hohen Korrelationen (Samper et al. 1991). In einer umfangreichen Fertilitätsstudie (n=96 Hengste) beobachteten Jasko et al. (1992) Korrelationen zwischen dem Anteil motiler ( $r=0,40$ ) sowie vorwärtsbeweglicher Spermien ( $r=0,46$ ) und der Trächtigkeitsrate pro Rosse. Die Variationen in diesen Parametern erklärten jedoch nur 20% der Gesamtvariation in der Fertilität. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die progressive Motilität der Gruppe der niedrigen Fertilität bei 33,11% (SD. 7,31%), die der Gruppe mit der reduzierten Fertilität bei 56,64% (SD. 12,98%) und die der Gruppe mit der höheren Fertilität bei 26,73% (SD. 4,72%) lag. Die erhobenen Daten ermöglichen keine Aussage zur Fruchtbarkeit in der untersuchten Population.

In Übereinstimmung mit Standardwerken (McKinnon et al. 2011; Ginther 1992) konnte bei den weiteren untersuchten spermatologischen Standardparametern keine Korrelation zur Fertilität ermittelt werden.

### 5.3 Morphometrie

In der vorliegenden Arbeit wurde keine signifikante Korrelation zwischen den untersuchten morphometrischen Parametern und der Fertilität der Hengste festgestellt.

Es wurde tendenziell eine höhere Fertilität bei Hengsten mit kleineren Spermienkopfflächen im Vergleich zu Hengsten mit größeren Spermienkopfflächen beobachtet. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen bei verschiedenen Spezies, zum Beispiel beim Schwein (Hirai et al. 2001; Peña et al. 2005). Die kleinere Spermienkopffläche wird auf ein kompakteres Chromatin durch den Austausch von Histonen durch Protamine zurückgeführt (Oliva et al. 2006).

### 5.4 DNS-Integrität

In der untersuchten Population konnten hinsichtlich des DFI-Wertes keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Fertilitätsgruppen ermittelt werden.

Der Anteil chromatininstabiler Spermien wird in der Literatur häufig als DFI-Wert in der Spermienchromatinstrukturanalyse (SCSA-Test) ermittelt. Love and Kenney (1998) beschrieben höhere DFI-Werte bei subfertilen (32%), im Gegensatz zu fertilen Hengsten (16%). Außerdem wurde bei 84 fertilen Hengsten eine negative Korrelation ( $r=-0,41$ ) zwischen dem Anteil von chromatininstabilen Spermien und der Trächtigkeitsrate pro Rosse beobachtet. Die DFI-Werte in dieser Studie betragen 12% in der Gruppe der hoch fertilen Hengste (>75% Trächtigkeitsrate in der ersten Rosse), 17% in der Gruppe der mäßig fertilen Hengste (45-75% Trächtigkeitsrate in der ersten Rosse) und 25% in der Gruppe der subfertilen Hengste (<45% Trächtigkeitsrate in der ersten Rosse). Im Gegensatz zu der signifikanten

Zunahme des Anteils chromatininstabiler Spermien zwischen den drei Fertilitätsgruppen zeigte der Anteil morphologisch normaler Spermien keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der mäßig bis schlecht befruchtenden Hengste. Morell et al. (2008) ermittelten eine negative Korrelation zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und der Trächtigkeitsrate ( $r=-0,61$ ) sowie zwischen dem DFI-Wert und der Morphologie der Spermien ( $r= -0,34$ ) in 41 Ejakulaten ( $n=11$  Hengste). Die Korrelation zwischen dem DFI-Wert und birnenförmigen Kopfdeformationen ( $r= 0,34$ ) sowie Kernvakuolen ( $r= 0,47$ ) führten die Autoren auf Störungen der Chromatinkondensation während der Spermiogenese zurück. Die zum Teil widersprüchlichen Daten aus verschiedenen Studien resultieren u. a. aus erheblichen methodischen Problemen der Analytik.

In der Literatur wurden sowohl beim Hengst als auch beim Mann unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der DNS-Defragmentierung von Spermatozoen in Abhängigkeit vom Analyseverfahren festgestellt. Es werden die Spermienstrukturanalyse (SCSA), die "TdT-mediated-dUTP" nick end labeling (TUNEL)-Methode, der Spermienchromatindispersionstest (SCD) und die Akridinorange-Färbungsmethode (AOT) angewendet.

Ein weiteres Problem bei der vergleichenden Interpretation der Ergebnisse der DNS-Defragmentierung stellt der Mangel an reproduzierbaren Daten und Referenzbereichen dar.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Methoden (Evenson und Jost 1994; Gaddella et al. 1999; Muriel et al. 2004; Monis et al. 2011), die für die Evaluierung der Chromatinintegrität verwendet werden, weisen der SCSA-Test sowie die TUNEL- und SCD-Methoden die höchste Reproduzierbarkeit als prädiktiver Parameter für die Bestimmung der DNS-Defragmentierung auf (Chohan et al. 2006). Die AOT-Methode zeigte eine starke Variabilität und höhere DNS-Defragmentierungswerte, wodurch die Aussagekraft dieser Untersuchungsmethode fraglich ist.

Unabhängig von divergierenden Resultaten in Abhängigkeit vom Analyseverfahren lassen die Ergebnisse der vorliegenden Studie vermuten, dass komplexe stereochemische Phänomene in der Interaktion zwischen Protaminen und DNS die fehlende Korrelation zwischen DNS-Defragmentierung und Fertilität der Hengste beeinflussen.

Beim Mann scheint das Protaminverhältnis einen wichtigen Einflussfaktor für die Bildung von kompetentem Spermatozoenchromatin darzustellen (Steger et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit lagen die DFI-Werte mit ca. 5% in allen drei Gruppen unter den Werten anderer Studien (Love und Kenney 1998; Morrell et al. 2008). Dies könnte auf die Altersstruktur der Hengstpopulation zurückzuführen sein (Durchschnitt  $8,05 \pm 4,8$  Jahre). Klewitz (2009) beobachtete eine Korrelation zwischen dem DFI-Wert und dem Alter der Hengste, die durch altersbedingte Hodendegeneration verursacht sein könnte.

Eine weitere Erklärung könnte die zeitnahe Samenuntersuchung im Anschluss an die Samengewinnung sein. Love et al. (2002) beobachteten bei Lagerung des Samens über einen Zeitraum von 20 Stunden einen deutlichen Anstieg des DFI-Wertes bei subfertilen Hengsten, während der Wert bei fertilen Hengsten stabil blieb.

## 5.5 Protamine

Nach Kenntnis des Autors handelt es sich bei der vorliegenden Arbeit um die erste Untersuchung der Expression von Protamin-mRNA und Protein in Korrelation mit der Fruchtbarkeit während der Spermatogenese des Hengstes.

Durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern konnten die ersten 6 Aminosäuren des Amnio-terminalen Endes des Protamins-1 des Hengstes nachgewiesen werden. Der Nachweis dieser Aminosäurekette bei einer Vielzahl von Spezies (Homo sapiens, Macaca mulatta, Capra aegagrus, Bos taurus, Canis familiaris, Odocoileus hemionus, Chinchilla chichilla, Rattus norvegicus, Mus musculus, Mesocricetus auratus und Meriones unguiculatus) bestätigt die hohe evolutionäre Konservierung der Protamin-mRNA und Protein-Expression (Oliva 2006). Diese Beobachtung unterstreicht die wichtige Funktion der Protamine für die Fertilität.

Die Sequenz der Protamin-2 wurde in dieser Studie mittels immunhistologischer Untersuchung nicht nachgewiesen. Dies könnte auf die fehlende Expression von vollständigem Protamin-2 in Pferdespermatiden, niedrige Affinität der Antikörper und ihre Erkennung der Epitope für das Protamin-2 der Hengste oder die be-

grenzte Zugänglichkeit der Epitope auf Grund des stark kondensierten Chromatins zurückzuführen sein.

Die Kernkondensierung während der Spermatogenese hängt vom Austausch von Histonen durch Protamine ab.

Es besteht ein Zusammenhang zwischen einer veränderten Protamin-Expression und einer reduzierten Spermatogenese (Steger et al. 2000; Aoki et al. 2005; Carrel und Lui 2001). Die Protamin-Gene werden nur in runden Spermatiden transkribiert (Steger et al. 2000) und in elongierten Spermatiden als „Schläfer“-mRNA gespeichert (Carrel et al. 2007; Steger et al. 2011). Die mRNA-Menge in den Spermatiden korreliert mit dem Proteingehalt in ejakulierten Spermatozoen (Aoki et al. 2006).

Verschiedene Studien bei Männern unterstützen die Hypothese, dass eine reduzierte Protamin-Expression einer der Indikatoren einer aberranten Spermatogenese ist (Lescoat et al. 1988; Bach et al. 1990).

Es ist bekannt, dass das Verhältnis Protamin-1 zu Protamin-2 bei unterschiedlichen Säugetierspezies variiert. Innerhalb einer Spezies jedoch konstant bleibt (Oliva 2006).

Die vorliegende Studie zeigt, dass die Protamine-1-mRNA-Expression ein wertvoller Parameter zur Beurteilung der Chromatin-Kondensation des Spermatozoenkerns beim Hengst darstellt. Das P2/P1-mRNA-Verhältnis korreliert positiv mit der NRR 28. Die besten Fertilitätsraten von 90 bis 100% (NRR 28%) wurden bei Hengsten erzielt, deren Spermien ein P2/P1-mRNA-Verhältnis zwischen 6 bis 10 aufwiesen.

Das P2/P1-mRNA-Verhältnis kann als guter prediktiver Faktor für die Spermienkonzentration verwendet werden. Je höher die P2/P1-mRNA-Ratio desto höher die Spermienkonzentration und die NRR 28%.

Die vorliegende Studie verdeutlicht, dass das P2/P1-mRNA-Verhältnis als sinnvoller prädictiver Fruchtbarkeitsparameter beim Hengst verwendet werden kann.

## 6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob mit Hilfe der computergestützten, morphometrischen Analyse von Spermien und der molekular biologischen Analyse der Kernkondensation die Fertilität eines Hengstes prädiktiv beurteilt werden kann.

Für die Untersuchungen standen am Anfang der Saison 2009 insgesamt 55 Warmbluthengste im Alter zwischen 3 und 19 Jahren zur Verfügung.

Es wurde eine spermatologische Standarduntersuchung der Ejakulate und eine morphometrische Untersuchung mit Hilfe des Computerprogramms ISAS durchgeführt. Darüber hinaus erfolgte die Bestimmung der Spermienchromatinintegrität nach dem „flow cytometric of acridine orange test“ (FCAOT) Verfahren.

Durch die Verwendung von RT-qPCR spezifischen Primern, angepasst an die genomische Sequenz der Pferde, konnte die Expression in Hodengewebe und Ejakulat der 55 Hengste, Protamin-1 und zwei Varianten von Protamin-2 (Protamin-2 und Protamin-3), erfolgreich nachgewiesen werden.

Bei der Verwendung von spezifischen monoklonalen Antikörpern konnte die stadien-spezifische Expression des Protamins-1 während der physiologischen Spermatogenese nachgewiesen werden.

Durch den Einsatz von den generierten Antikörpern gegen humanes Protamin-2 konnte in den Gewebeschnitten der Hengste kein Protamin-2 nachgewiesen werden. Dies beweist jedoch nicht den Mangel an Protamin-2, sondern die niedrige Affinität der Antikörper und ihrer Erkennung der Epitope für das Protamin-2 der Hengste.

Basierend auf den Fertilitätsparametern NRR 28% (non-return-rate in Prozent) Werten wurden die Hengste in drei Quartile unterteilt: Das erste Quartil (n=14) ent-

spricht der Hengstgruppe mit niedriger, das zweite und dritte Quartil ( $n=27$ ) der mit mittlerer und das vierte Quartil ( $n=14$ ) der mit hoher Befruchtungsleistung.

Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede der Fruchtbarkeit in Bezug auf das Lebensalter der Hengste festgestellt werden (Durchschnitt  $8,05 \pm 4,8$  Jahre).

Bei der statistischen Auswertung ergaben sich folgende Ergebnisse: Hengste mit hoher durchschnittlicher Befruchtungsleistung (Quartil 3) ( $272,07 \pm 64,5$  Millionen von Spermien pro Milliliter MioS/ml) wiesen eine niedrigere Spermienkonzentration auf, verglichen mit den Hengsten mit niedriger Befruchtungsleistung (Quartil 1) ( $336,14 \pm 123,2$  MioS/ml) ( $p$ -Wert = 0,076). Die Spermienkonzentration zeigte auch einen Unterschied zwischen den Hengsten der Quartile 1 und 2 ( $p=0,022$ ).

Im Hinblick auf die Untersuchung der anderen spermatologischen Standardparameter wurde in der vorliegenden Studie bei den untersuchten Hengsten eine positive Korrelation zwischen der Fertilität und der Morphologie dargestellt. Die Fruchtbarkeit stand mit den anderen untersuchten Spermienparametern, Volumen und progressiver Motilität, in keinem Zusammenhang.

Die morphometrische Untersuchung der Spermien zeigte Unterschiede in der Länge der Spermienköpfe zwischen den Gruppen (1 vs. 2:  $p=0,036$ ), (1 vs. 3:  $p=0,049$ ). Es wurde keine Signifikanz zwischen den Gruppen 2 und 3 festgestellt ( $p=0,071$ ). Auch zeigte sich kein Unterschied im Perimeter, in der Breite und Area der Spermienköpfe in den verschiedenen Gruppen.

Bei der Untersuchung der DNS-Integrität wurde ein Durchschnitt von ca. 5% DFI in der gesamten Hengstpopulation festgestellt. Ein relevanter statistischer Unterschied zwischen den drei Fertilitätsgruppen konnte bei der Auswertung nicht festgestellt werden.

In der gesamten Population der 55 Hengste variierte die relative Expression von Protamin-1 zwischen 10,1-8,6 und Protamin-2 zwischen -2-5,6. Die Analyse der Ratio beider Protamine ergab einen Bereich zwischen -6,4-11,2. In Gruppe 1 (Hengste mit niedriger Fertilität) lag der Durchschnitt der P1/P2-Ratio bei  $1,5 \pm 4,5$ .

Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied im P2/P1-Verhältnis zwischen den Gruppen 1 und 3 ( $p=0,014$ ).

Auffallend ist, dass der signifikante Unterschied nur für die Expression der Protamine-1 ( $p=0,019$ ) nachgewiesen werden konnte, nicht jedoch für die Protamine-2 ( $p=0,049$ ) im Vergleich der Gruppen 1 und 3.

Die Untersuchungen zeigten eine deutliche Korrelation zwischen Fertilität (NRR 28%) und der relativen Expression von Protamin-1 (correlation co-efficiency  $p=0,019$ ), sowie eine positive Korrelation zwischen Fertilität und P1/P2-Ratio (correlation co-efficiency  $p=0,017$ ).

Die vorliegende Studie zeigt, dass die Protamin-1-mRNA-Expression ein wertvoller Parameter zur Beurteilung der Chromatin-Kondensation des Spermatozonenkerns beim Hengst darstellt. Das P2/P1-mRNA-Verhältnis korreliert positiv mit der NRR 28. Die besten Fertilitätsraten von 90 bis 100% (NRR 28%) wurden bei Hengsten erzielt, deren Spermien ein P2/P1-mRNA-Verhältnis zwischen 6 bis 10 aufwiesen.

Die Studie verdeutlicht, dass das P2/P1-mRNA-Verhältnis als sinnvoller prädiktiver Fruchtbarkeitsparameter beim Hengst verwendet werden kann.



## 7. Summary

The objective of the present study was with the help of computer supported morphometrical analysis of semen, and the biomolecular analysis of nuclear condensation, to investigate whether the fertility of a stallion can be accurately predicted.

The investigation was conducted at the beginning of the 2009 breeding season, and incorporated 55 warmblood stallions between 3 and 19 years of age.

A standard spermatological examination of each ejaculate was conducted along with a morphometric assessment with the help of the ISAS computer program and the determination of spermatozoal chromatin integrity using the 'flow cytometric of acridine orange test' (FCAOT).

With the use of RT-qPCR primers adapted to the equine genome sequence, the presence of Protamine-1 and two variations of Protamine-2 (Protamine-2 and Protamine-3) in the testicular tissue and ejaculate of the 55 stallions could be successfully proven.

The utilisation of specific monoclonal antibodies allows the detection of the status specific expression of Protamine-1 during normal spermatogenesis.

Through the use of generated antibodies against human Protamine-2, there was no evidence of Protamine-2 in the tissue samples taken from the stallions. This does not prove a lack of Protamine-2 but rather a reduced affinity between the antibodies and their recognition of the epitopes for the stallion Protamine-2.

According to the mare fertility descriptor (the "non-return-rate 28 percentage" or NRR 28%) the stallions were divided across three quartiles: the first quartile (n=14) includes the stallions with low, the second and third quartiles (n=27) with middle and the fourth quartile (n=14) with high fertility.

There was no statistical significance between the fertility and the age of the stallions (average  $8,05 \pm 4,8$  years old)

By statistical analysis the following results were produced: Stallions with a high average fertility rate (Quartile 3) ( $272,07 \pm 64,5$  million sperm per milliliter MioS/ml) reported a reduced sperm concentration when compared to the stallions with low fertility rates (Quartile 1) ( $336,14 \pm 123,2$  MioS/ml) ( $p=0,076$ ). The sperm concentration also showed a difference between the stallions in Quartile 1 and 2 ( $p=0,022$ ).

Die morphometric examination of the sperm showed differences in the length of the spermatozoal head, between the Quartiles (1 vs. 2:  $p=0,036$ ), (1 vs. 3:  $p=0,049$ ). There was however, no difference in perimeter, width and area of the spermatozoal head between the groups.

The fertility rate did not correlated with any of the other semen parameters examined.

Examination of the DNS integrity demonstrated an average of approximately 5% DFI across the entire sample population. A statistically relevant difference between the three quartile was not discovered after analysis.

The results demonstrate that expression of protamine, in germinal cells throughout their development, is also in stallions highly conserved.

In the entire population of 55 stallions, the expression of Protamine-1 varied between 10,1-8,6 and Protamine-2 between -2-5,6. The analysis of both Protamins gave a range between -6,4-11,2. In group 1 (stallions with reduced fertility) the average of the P1/P2 ratio was  $1,5 \pm 4,5$ .

The statistical analysis produced a significant difference in the P1/P2 relationship between groups 1 and 3 ( $p=0,014$ ).

What became apparent was the demonstration of a significant difference for expression of Protamine-1 ( $p=0,019$ ), and not that of Protamine-2 ( $p=0,049$ ) when comparing groups 1 and 3.

The analysis showed a high correlation between the fertility (NNR 28%) and the relative expression of Protamine-1 (correlation co-efficiency  $p=0,019$ ), as well as a positive correlation between fertility and the P1/P2 ratio (correlation co-efficiency  $p=0,017$ ).

The presented study shows that expression of the Protamine1-mRNA is a useful factor in determining the chromatin-condensation within the spermatozoal nuclei of the stallion. The relationship between P2/P1 mRNA and NRR 28% shows a positive correlation. Stallions with a P2/P1 mRNA ratio between 6 and 10 demonstrated optimal fertilisation rates of between 90-100% (NRR 28%).

The study confirmed that the P2/P1 mRNA ratio is a useful factor in the prediction of stallion fertility.



## 8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AOT	Acridin orange Test
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
CeRA	Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie des
UKM	Universitätsklinikum Münster
COMET	Eizellstrangelektrophorese
dest.	destillata
DNA	Desoxiribonucleic acid
DFI	DNS Fragmentation Index
DFI %	DNS Fragmentation Index in Prozent
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
Fa.	Fabrikat
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCAOT	Flow cytometric of acridine orange Test
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
H1-H5	Histone 1 bis 5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxyd
Ht	Hodenspezifische Histone
HDS	High DNASTainability
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
ISAS	Integratet semen analysis system
IU	Internationale Einheiten

IUI	Intrauterin Insemination
IVF	In-vitro-Fertilisation
M	Molar
Min	Minute
Mio./ml	Millionen pro Milliliter
MioS/ml	Millionen Spermien pro Milliliter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
n	Probandenanzahl
NaCl	Physiologische Kochsalzlösung
NRR	Non Return Rate
NRW	Nordrhein-Westfalen
P1	Protamin-1
P2	Protamin-2
P3	Protamin-3
PRM1	Primer 1
PRM2	Primer 2
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson / Spearman
RNA	ribonucleic Acid
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutionen pro Minute
RT-qPCR	real-time quantitative PCR
SD	Standardabweichung
SCASA	Sperm chromatin structure assay
SCD	Sperm Chromatin dispersion
TNB	Anzahl morphologisch-normaler, beweglicher Samenzellen pro Ejakulat
TUNEL	Tdt-mediated-dUTP nick end labeling
URO GI	Klinik für Urologie, Pädiatrie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
z. B.	zum Beispiel
WSBFSH	World Breeding Federation for Sporthorses

## 9. Literaturverzeichnis

- Alvarez, J.G. (2005). „The predictive value of sperm chromatin structure assay.“ Hum Reprod **20**(8): 2365-2367.
- Amann, R. P. (1989). „Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?“ J Androl **10**(2): 89-98.
- Aoki, V.W., D.T. Carrell (2003). „Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility.“ Asian J Androl **5**(4): 315-324.
- Aoki, V. W., L. Liu, D. T. Carrell (2005). „Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males.“ Hum Reprod **20**: 1298-1306.
- Aoki, V.W., S.I. Moskovtsev (2005). „DNS integrity is compromised in protamine-deficient human sperm.“ J Androl **26**(6): 741-748.
- Aoki, V.W., L. Liu, D.T. Carrell (2006). „A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency.“ (2006). Mol Hum Reprod **12**(1): 41-50.
- Aziz, N., T. Said, U. Paasch, A. Agarwal (2007). „The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index.“ Hum Reprod **22**(5): 1413-1419.
- Bach, O., H.J. Glander, G. Scholz , J. Schwarz (1990). “Electrophoretic patterns of spermatozoal nucleoproteins (NP) in fertile men and infertility patients and comparison with NP of somatic cells.“ Andrologia **22**(3): 217-224.
- Balhorn, R. (2007). „The protamine family of sperm nuclear proteins.“ Genome Biol **8**(9): 227.

- Balhorn, R., S. Reed, N. Tanphaichitr (1988). „Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males.“ Experientia **44**(1): 52-55.
- Ballachey, B.E., D.P. Evenson, R.G. Saacke (1988). „The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls.“ J Androl **9**(2): 109-115.
- Ballachey, B.E., W.D. Hohenboken, D.P. Evenson (1987). „Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility.“ Biol Reprod **36**(4): 915-925.
- Bielanski, W. (1951). „Characteristics of the semen of stallions: macro and microscopic investigation with estimation of fertility.“ Mem Acad Pol Sci Let B:16.
- Bielanski, W. (1975). „The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination.“ J Reprod Fertil Suppl (23): 19-24.
- Bielanski, W., F. Kaczmarek (1979). „Morphology of spermatozoa in semen from stallions of normal fertility.“ J Reprod Fertil Suppl (27): 39-45.
- Blanchard, T.L., D.D. Varner. (1996). „Evaluating breeding soundness in stallions-1: the basic examination.“ Vet Med: 54-63.
- Blom, E. (1973). „The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram (author's transl).“ Nord Vet Med **25**(7): 383-391.
- Blom, E. (1977). „Sperm Morphology with reference to bull infertility.“ First All India Symposium on Animal Reproduction 61-81.
- Boe-Hansen, G.B., J. Fedder, A.K. Ersboll, P. Christensen (2006). „The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic.“ Hum Reprod **21**(6): 1576-1582.
- Boyle, C. A., M.J. Khoury, D.F. Katz, J.L. Annett, M.J. Kresnow, F. De Stefano, S.M. Schrader (1992). „The relation of computer-based measures of sperm morphology and motility to male infertility.“ Epidemiology **3**(3): 239-246.
- Brito, L.F. (2007). „Evaluation of Stallion Sperm Morphology.“ Clinical Techniques in Equine Practice **6**(4) 249–264.

- Brito, L.F., L.M. Greene, A. Kelleman, M. Knobbe, R. Turner (2011). „Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation.“ Theriogenology **76**(4): 745-750.
- Carrell, D.T., L. Liu (2001). „Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis.“ J Androl **22**(4): 604-610.
- Carrell, D.T., B.R. Emery, S. Hammoud (2007). „Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link?“ Hum Reprod Update **13**(3): 313-327.
- Casey, P.J., C.G. Gravance, R.O. Davis, D.D. Chabot, I. K. Liu (1997). „Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions.“ Theriogenology **47**(2): 575-582.
- Cavalcanti, M. C., M. Rizgalla, J. Geyer, K. Failing, L.F. Litzke, M. Bergmann (2009). „Expression of histone 1 (H1) and testis-specific histone 1 (H1t) genes during stallion spermatogenesis.“ Anim Reprod Sci **111**(2-4): 220-234.
- Chan, P.J., J.U. Corselli, W.C. Patton, J. D. Jacobson, S.R. Chan, A. King (2001). „A simple comet assay for archived sperm correlates DNA fragmentation to reduced hyperactivation and penetration of zona-free hamster oocytes.“ Fertil Steril **75**(1): 186-192.
- Chan, S.Y., C. Wang, S.T. Chan, P.C. Ho, W.W. So, Y.F. Chan, H.K. Ma (1989). „Predictive value of sperm morphology and movement characteristics in the outcome of in vitro fertilization of human oocytes.“ J In Vitro Fert Embryo Transf **6**(3): 142-148.
- Chandler, J.E., C.L. Painter, R. W. Adkison, M.A. Memon, P.G. Hoyt (1988). „Semen quality characteristics of dairy goats.“ J Dairy Sci **71**(6): 1638-1646.
- Check, J. H., A. Bollendorf, M. Press, T. Blue (1992). „Standard sperm morphology as a predictor of male fertility potential.“ Arch Androl **28**(1): 39-41.
- Chevallier, P., N. Mauro, D. Feneux, P. Jouannet, G. David (1987). „Anomalous protein complement of sperm nuclei in some infertile men.“ Lancet **2**(8562): 806-807.
- Cho C., W.D. Willis, E. H. Goulding, H. Jung-Ha, Y.C. Choi, N.B. Hecht, E.M. Eddy (2001). „Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice“. Nat Genet **28**, 82-86.

- Cho, C., H. Jung-Ha, W.D. Willis, E. H. Goulding, P. Stein, Z. Xu, R. M. Schultz, N. B. Hecht, E.M. Eddy (2003). „Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice“. Biol Reprod **69**, 211-217.
- Chohan, K.R., J.T. Griffin, M. Lafromboise, C. J. De Jonge, D. T. Carrell (2006). „Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm.“ J Androl **27**(1): 53-59.
- Colenbrander, B., B.M. Gadellaund, T. A. Stout (2003). „The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility.“ Reprod Domest Anim **38**(4): 305-311.
- Clermont Y. (1963). „The cycle of the seminiferous epithelium in man.“ Am J Anat **112**: 35-51.
- Dadoune, J.P., M.J. Mayaux, M.L. Guihard-Moscato (1988). „Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics.“ Andrologia **20**(3): 211-217.
- Darzynkiewicz, Z., F. Traganos, T. Sharpless, M.R. Melamed (1976). „Lymphocyte stimulation: a rapid multiparameter analysis.“ Proc Natl Acad Sci U S A **73**(8): 2881-2884.
- Davis, R.O., D.E. Bain, R.J. Siemers, D. M. Thal, J.B. Andrew, C.G. Gravance (1992). „Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry instrument.“ Fertil Steril **58**(4): 763-769.
- Doenecke, D., W. Albig, H. Bouterfa, B. Drabent (1994). „Organization and expression of H1 histone and H1 replacement histone genes.“ J Cell Biochem **54**(4): 423-431.
- Dowsett, K.F., W.A. Pattie (1982). „Characteristics and fertility of stallion semen.“ J Reprod Fertil Suppl **32**: 1-8.
- Drabent, B., C. Bode, B. Bramlage, D. Doenecke (1996). „Expression of the mouse testicular histone gene H1t during spermatogenesis.“ Histochem Cell Biol **106**(2): 247-251.
- Drabent, B., C. Bode, N. Miosge, R. Herken und D. Doenecke (1998). „Expression of the mouse histone gene H1t begins at premeiotic stages of spermatogenesis.“ Cell Tissue Res **291**(1): 127-132.

- Eddy E.M., D.A. O'Brien, B.A. Fenderson, J. E. Welch (1991). „Intermediate filament-like proteins in the fibrous sheath of the mouse sperm flagellum.“ Ann N Y Acad Sci **637**: 224-239.
- Evenson, D., Z. Darzynkiewicz (1990). „Acridine orange-induced precipitation of mouse testicular sperm cell DNA reveals new patterns of chromatin structure.“ Exp Cell Res **187**(2): 328-334.
- Evenson, D., Z. Darzynkiewicz, L. Jost, F. Janca, B. Ballachey (1986). „Changes in accessibility of DNA to various fluorochromes during spermatogenesis.“ Cytometry **7**(1): 45-53.
- Evenson, D.P., L. Jost (1994). „Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability.“ Methods Cell Biol **42** Pt B: 159-176.
- Evenson, D.P., L. Jost (2000). „Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment.“ Methods Cell Sci **22**(2-3): 169-189.
- Evenson, D.P., Z. Darzynkiewicz, M. R. Melamed (1980). „Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility.“ Science **210**(4474): 1131-1133.
- Evenson, D.P., L.K. Jost, D. Marshall, M.J. Zinaman, E. Clegg, K. Purvis, P. de Angelis, O.P. Claussen (1999). „Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic.“ Hum Reprod **14**(4): 1039-1049.
- Evenson, D.P., K.L. Larson, L.K. Jost (2002). „Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques.“ J Androl **23**(1): 25-43.
- Evenson, D.P., L. Thompson, L. Jost (1994). „Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility.“ Theriogenology **41**(3): 637-651.
- Finch, J.T., A. Klug (1976). „Solenoidal model for superstructure in chromatin.“ Proc Natl Acad Sci U S A **73**(6): 1897-1901.
- Franke, K., B. Drabent, D. Doenecke (1998). „Testicular expression of the mouse histone H1.1 gene.“ Histochem Cell Biol **109**(4): 383-390.
- Fritz, G., A.E. Czeizel (1996). „Abnormal sperm morphology and function in the fathers of hypospadiacs.“ J Reprod Fertil **106**(1): 63-66.

- Fuentes-Mascorro, G., H. Serrano, A. Rosado (2000). „Sperm chromatin.“ Arch Androl **45**(3): 215-225.
- Gadella, B.M., N.G. Miller, B. Colenbrander, L.M. van Golde, R.A. Harrison (1999). „Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts.“ Mol Reprod Dev **53**(1): 108-125.
- Garcia-Macias, V., P. de Paz, F. Martinez-Pastor, M. Alvarez, S. Gomes Alves, J. Bernardo, E. Anel, L. Anel (2007). „DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm.“ Int J Androl **30**(2): 88-98.
- Gatewood, J.M., G.R. Cook, R. Balhorn, C.W. Schmid, E.M. Bradbury (1990). „Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones.“ J Biol Chem **265**(33): 20662-20666.
- Ginther, O.J. (1992). „Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects.“ Edition: 2nd. ISBN 13: 978-0964007215. ISBN 10: 0964007215
- Gravance, C.G., I. K. Liu, R.O. Davis, J.P. Hughes, P.J. Casey (1996). „Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa.“ J Reprod Fertil **108**: 41-46.
- Gravance, C.G., Z. Champion, I.K. Liu, P.J. Casey (1997). „Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples.“ Anim Reprod Sci **47**(1-2): 149-155.
- Hammadeh, M.E., A. Bernardi, T. Zeginiadou, A. Amer, W. Schmidt (2005). „Relationship between nuclear chromatin decondensation (NCD) in vitro and other sperm parameters and their predictive value on fertilization rate in IVF program.“ J Assist Reprod Genet **22**(7-8): 301-305.
- Heilkenbrinker, T., L. Ahlswede, K. Zech, S. Kurlbaum, H. Botterm, M. Heilemann, P. Scholten, A. Lütje, HG. Brunken, E. Wiemer, W. Lüpping, A. Miebach, A. Witte, H. Sieme, J. Klewitz (2011). „Biologische Samenbeschaffenheit - Sorgfaltspflichten.“ Handbuch Pferdebesamungsstationen. Leitlinien für die Zulassung, Überwachung und den Betrieb von Pferdebesamungsstationen Samendepots Embryo-Entnahmeeinheiten. Anl. 10.2: 136-139. ISBN: beantragt.

- Henkel, R., M. Hajimohammad, T. Stalf, C. Hoogendijk, C. Mehnert, R. Menkveld, H. Gips, W.B. Schill, T.F. Kruger (2004). „Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy.“ Fertil Steril **81**(4): 965-972.
- Held, J.P., P. Prater, M. Stettler (1991).“ Spermatozoal head defect as a cause of infertility in a stallion.“ J Am Vet Med Assoc **199**(12): 1760-1761.
- Hingst, O., S. Blottner, C. Franz (1995). „Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining.“ Andrologia **27**(5): 275-279.
- Hirai, M., A. Boersma, A. Hoeflich, E. Wolf, J. Foll, R. Aumuller, J. Braun. (2001). „Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (sus scrofa): Relation to fertility and seminal plasma growth factors.“ J Androl **22**:104-110
- Iguchi, N., H. Tanaka, K. Yomogida, Y. Nishimune (2003). „Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a DNA-binding protein (Hils1) specifically expressed in testicular haploid germ cells.“ Int J Androl **26**(6): 354-365.
- Jagoe, J.R., N.P. Washbrook, E.A. Hudson (1986). „Morphometry of spermatozoa using semiautomatic image analysis.“ J Clin Pathol **39**(12): 1347-1352.
- Jasko, D.J., D.H. Lein, R.H. Foote (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.
- Jasko, D.J., T.V. Little, D.H. Lein, R.H. Foote (1992). „Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988).“ J Am Vet Med Assoc **200**(7): 979-985.
- Jequier, A.M. (2005) „Is quality assurance in semen analysis still really necessary? A clinician's viewpoint.“ Hum Reprod **20**, 2039-2042.
- Johnson, L.V. B. Hardy, M.T. Martin (1990). „Staging equine seminiferous tubules by Nomarski optics in unstained histologic sections and in tubules mounted in toto to reveal the spermatogenic wave.“ Anat Rec **227**,167-174.
- Katz, D.F., J.W. Overstreet, S.J. Samuels, P.W. Niswander, T.D. Bloom, E.L. Lewis (1986). „Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility.“ J Androl **7**(4): 203-210.

- Kenney, R.M., R. Hurtgen, R. Pierson, D. Witherspoon, J. Simons(1983). „Clinical fertility evaluation of the stallion.“ J Soc Theriogenol IX Part I.
- Khochbin, S. (2001). „Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function.“ Gene **271**(1): 1-12.
- Klewitz, J. (2009). „Durchflusszytometrische und computervideomikrographische Untersuchungen zur Kapazitation, Akrosomreaktion und Chromatinintegrität equiner Spermatozoen“. Diss. Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Kliesch, S., M. Bergmann (2011). Hodenbiopsie. In: Krause W., Weidner W., Sperling H., Diemer T. (Hrsg.) Andrologie, Georg Thieme Verlag, 150-160.
- Koppel, D.A., S.A. Wolfe, L.A. Fogelfeld, P.S. Merchant, L. Prouty, S.R. Grimes (1994). „Primate testicular histone H1t genes are highly conserved and the human H1t gene is located on chromosome 6.“ J Cell Biochem **54**(2): 219-230.
- Kruger, T.F., A.A. Acosta, K.F. Simmons, R.J. Swanson, J.F. Matta, S. Oehninger (1988). „Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization.“ Fertil Steril **49**(1): 112-117.
- Kruger, T.F., T.C. DuToit, D.R. Franken, A.A. Acosta, S.C. Oehninger, R. Menkveld, C.J. Lombard (1993). „A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading.“ Fertil Steril **59**(1): 202-209.
- Larson-Cook, K.L., J.D. Brannian, K.A. Hansen, K.M. Kasperson, E.T. Aamold, D.P. Evenson (2003). „Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay.“ Fertil Steril **80**(4): 895-902.
- Le Lannic, G., A. Arkhis, E. Vendrely, P. Chevaillier, J.P. Dadoune (1993). „Production, characterization, and immunocytochemical applications of monoclonal antibodies to human sperm protamines.“ Mol Reprod Dev **36**(1): 106-112.
- Lennox, R.W., L.H. Cohen (1983). „The histone H1 complements of dividing and non-dividing cells of the mouse.“ J Biol Chem **258**(1): 262-268.
- Lescoat, D., Y. Blanchard, M. T. Lavault, D. Quernee, D. Le Lannou (1993). „Ultrastructural and immunocytochemical study of P1 protamine localization in human testis.“ Andrologia **25**(2): 93-99.

- Lescoat D, D. Colleu, D. Boujard , D. Le Lannou (1988). „Electrophoretic characteristics of nuclear proteins from human spermatozoa.“ Arch Androl **20**(1):35-40.
- Linfor, J.J., S.A. Meyers (2002). „Detection of DNS damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis.“ J Androl **23**(1): 107-113.
- Loir, M., M. Lanneau (1984). „Structural function of the basic nuclear proteins in ram spermatids.“ J Ultrastruct Res **86**(3): 262-272.
- Love, C.C., R.M. Kenney (1998). „The relationship of increased susceptibility of sperm DNS to denaturation and fertility in the stallion.“ Theriogenology **50**(6): 955-972.
- Love, C.C., D.D. Varner, J.A. Thompson (2000). „Intra- and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility.“ J Reprod Fertil Suppl (56): 93-100.
- Love, C.C., J.A. Thompson, V.K. Lowry und D.D. Varner (2002):  
Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility.“ Theriogenology **57** (3), 1135-1142
- Madrid-Bury, N., J.F. Perez-Gutierrez, S. Perez-Garnelo, P. Moreira, B. Pintado Sanjuanbenito, A. Gutierrez-Adan, J. de la Fuente Martinez (2005). „Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa.“ Theriogenology **64**(2): 232-241.
- Magistrini, M., I. Couty, E. Palmer (1992). „Interactions between sperm packaging, gas environment, temperature and diluent on fresh stallion sperm survival.“ Acta Vet Scand Suppl **88**: 97-110.
- Mansour, R.T., M.A. Aboulghar, G.I. Serour, Y.M. Amin, A.M. Ramzi (1995). „The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection.“ Fertil Steril **64**(5): 982-986.
- McKinnon, A., E.L. Squires, W.E. Vaala , D.D. Varner (2011). „Equine Reproduction“ Wiley-Blackwell; 2. ASIN: B005D7EOUM.
- Meistrich, M.L., L.R. Bucci, P.K. Trostle-Weige, W.A. Brock (1985). „Histone variants in rat spermatogonia and primary spermatocytes.“ Dev Biol **112**(1): 230-240.
- Miller, D., G.C. Ostermeier (2006). „Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do?.“ Gynecol Obstet Fertil **34**(9): 840-846.

- Monis B.S., I.M. Syed Nazar, D. Rima (2011). „Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility.“ J Assist Reprod Genet **28**(11): 1073–1085.
- Morgentaler, A., M.Y. Fung, D.H. Harris, R.D. Powers, M.M. Alper (1995). „Sperm morphology and in vitro fertilization outcome: a direct comparison of World Health Organization and strict criteria methodologies.“ Fertil Steril **64**(6): 1177-1182.
- Morrell, J.M., A. Johannisson, A.M. Dalin, L. Hammar, T. Sandebert und H. Rodriguez-Martinez (2008). „Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates.“ Acta Vet Scand **50**: 2.
- Moruzzi, J.F., A.J. Wyrobek, B.H. Mayall, B.L. Gledhill (1988). „Quantification and classification of human sperm morphology by computer-assisted image analysis.“ Fertil Steril **50**(1): 142-152.
- Muriel, L., E. Segrelles, V. Goyanes, J. Gosalvez, J. L. Fernandez (2004). „Structure of human sperm DNA and background damage, analysed by in situ enzymatic treatment and digital image analysis.“ Mol Hum Reprod **10**(3): 203-209.
- Nagvenkar, P., K. Zaveri und I. Hinduja (2005). „Comparison of the sperm aneuploidy rate in severe oligozoospermic and oligozoospermic men and its relation to intracytoplasmic sperm injection outcome.“ Fertil Steril **84**(4): 925-931.
- Oliva, R. (2006). „Protamines and male infertility.“ Hum Reprod Update **12** (4): 417-435.
- Oliva, R., G.H. Dixon (1991). „Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction.“ Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **40**: 25-94.
- Parlevliet, J.M., B. Colenbrander (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.
- Phetudomsinsuk K. , K. Sirinarumitr, A. Laikul, A. Pinyopummin (2008). „Morphology and head morphometric characters of sperm in Thai native crossbred stallions.“ Acta Vet Scand **50**(1): 41
- Peña, F.J., F. Saravia, M. García-Herreros, I. Núñez-martínez, J.A. Tapia, A. Johannisson, M. Wallgren, H. Rodríguez-Martínez (2005). „Identification of sperm morphometric

- subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality." J Androl **26**: 716-723.
- Pienta, K.J., D.S. Coffey (1984). „A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNSloops in the organization of the nucleus and chromosome." J Cell Sci Suppl **1**: 123-135.
- Poccia, D. (1986). „Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development." Int Rev Cytol **105**: 1-65.
- Prigent, Y., S. Muller, J.P. Dadoune (1996). „Immunoelectron microscopical distribution of histones H2B and H3 and protamines during human spermiogenesis." Mol Hum Reprod **2**(12): 929-935.
- Saacke, R.G., J.C. Dalton, S. Nadir, R.L. Nebel, J.H. Bame (2000). „Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality." Anim Reprod Sci **60-61**: 663-677.
- Saacke, R.G., J.O. Almquist (1964a). „Ultrastructure of Bovine Spermatozoa. I. The Head of Normal, Ejaculated Sperm 1,2,3." Am J Anat **115** 143-161
- Saacke, R.G., J.O. Almquist (1964b). „Ultrastructure of Bovine Spermatozoa. II. The Neck and Tail of Normal, Ejaculated Sperm 1,2,3." Am J Anat **115**: 163-183
- Sakkas, D., F. Urner, P.G. Bianchi, D. Bizzaro, I. Wagner, N. Jaquenoud, G. Manicardi, A. Campana (1996). „Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection." Hum Reprod **11**(4): 837-843.
- Samper, J.C., J.C. Hellander, B. G. Crabo (1991). „Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality." J Reprod Fertil Suppl **44**: 107-114.
- Schiekbeek, A. (1951): Antoni van Leeuwenhoek zijn leven en zijn werken (2 delen). De Tijdstroom, Lochem, The Netherlands.
- Schlegel, P. N., D. A. Paduch (2005). „Yet another test of sperm chromatin structure." Fertil Steril **84**(4): 854-859.
- Seyedin, S.M., W.S. Kistler (1980). „Isolation and characterization of rat testis H1t. An H1 histone variant associated with spermatogenesis." J Biol Chem **255**(12): 5949-5954.

- Smit, M., G.R. Dohle, W.C. Hop, M.F. Wildhagen, R. F. Weber, J. C. Romijn (2007). „Clinical correlates of the biological variation of sperm DNA fragmentation in infertile men attending an andrology outpatient clinic.“ Int J Androl **30**(1): 48-55.
- Spano, M., J.P. Bonde, H.I. Hjollund, H.A. Kolstad, E. Cordelli, G. Leter (2000). „Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team.“ Fertil Steril **73**(1): 43-50.
- Stahl, O., J. Eberhard, K. Jepson, M. Spano, M. Cwikiel, E. Cavallin-Stahl, A. Givercman (2006). „Sperm DNA integrity in testicular cancer patients.“ Hum Reprod **21**(12): 3199-3205.
- Steger, K., K. Failing, T. Klonisch, H.M. Behre, M. Manning, W. Weidner, L. Hertle, M. Bergmann, S. Kliesch (2001). „Round spermatids from infertile men exhibit decreased protamine-1 and -2 mRNA.“ Hum Reprod **16**(4): 709-716.
- Steger, K., L. Fink, K. Failing, R. M. Bohle, S. Kliesch, W. Weidner and M. Bergmann (2003). „Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men.“ Mol Hum Reprod **9**(6): 331-336.
- Steger, K., T. Klonisch, K. Gavenis, R. Behr, V. Schaller, B. Drabent, D. Doenecke, E. Nieschlag, M. Bergmann, G.F. Weinbauer (1999). „Round spermatids show normal testis-specific H1t but reduced cAMP responsive element modulator and transition protein 1 expression in men with round-spermatid maturation arrest.“ J Androl **20**(6): 747-754.
- Steger, K., T. Klonisch, K. Gavenis, B. Drabent, D. Doenecke, M. Bergmann (1998). „Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis.“ Mol Hum Reprod **4**(10): 939-945.
- Steger, K., K. Pauls, T. Klonisch, F.E. Franke, M. Bergmann (2000). „Expression of protamine-1 and 2 mRNA during spermiogenesis.“ Mol Hum Reprod **6**: 219-225.
- Steger, K., M.C. Cavalcanti, H. C. Schuppe (2011). „Prognostic markers for competent human spermatozoa: fertilizing capacity and contribution to the embryo.“ Int J Androl **34**(6): 513-527.
- Sun, J.G., A. Jurisicova, R.F. Casper (1997). „Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro.“ Biol Reprod **56**(3): 602-607.

- Tejada, R.I., J.C. Mitchell, A. Norman, J.J. Marik, S. Friedman (1984). „A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence.“ Fertil Steril **42**(1): 87-91.
- Tesarik, J. (2005). „Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo.“ Reprod Biomed Online **10**(3): 370-375.
- van Buiten, A.v.d.B., J., Y.H. Schukkena, B. Colenbrandera (1999). „Validation of non-return rate as a parameter for stallion fertility.“ Livestock Production Science **60**(60): 13-19.
- van Holde, K., J. Zlatanova (1996). „What determines the folding of the chromatin fiber?“ Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10548-10555.
- Varner, D. D. (2008). „Developments in stallion semen evaluation.“ Theriogenology **70**(3): 448-462.
- Vidament, M., M. Magistrini, E. Palmer, F. Clement (1999). „Equine Artificial Insemination in French National Studs.“ Reprod Dom Anim Suppl **6**: 61-66.
- Voss, J. L., B. W. Pickett, E. L. Squires (1981). „Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationships to fertility.“ J Am Vet Med Assoc **178**(3): 287-289.
- Van der Heijden, G.W. , H. Derijck, L. Ramos, M. Giele, J. van der Vlag, P. de Boer (2006). „Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin.“ Dev Biol **298**, 458-469.
- Waberski, D., A. Petrounkina, K. F. Weitze, E. Töpfer-Petersen (1999). „In vitro assessment of semen for the prediction of fertility.“ Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere **27**(1): 1-7.
- Ward, W.S., D.S. Coffey (1991). „DNS packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells.“ Biol Reprod **44**(4): 569-574.
- Yanagimachi, R. (1994). „Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity.“ Zygote **2**(4): 371-372.
- Zhang, X., M. San Gabriel, A. Zini (2006). „Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate.“ J Androl **27**(3): 414-420.



## 10. Publikation

Paradowska-Dogan A., Fernández A., M. Bergmann, K. Kretzer, C. Mallidis, M. Vieweg, P. Waliszewski, M. Zitzmann, W. Weidner, K. Steger, S. Kliesch (2014). „Protamine mRNA ratio in stallion spermatozoa correlates with mare fecundity“. Andrology **2**(4): 521-30.



# 11. Danksagung

An erster Stelle danke ich meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. S. Kliesch und meinem Betreuer Prof. Dr. Martin Bergmann für das entgegengebrachte Vertrauen sowie die uneingeschränkte fachliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Studie.

Prof. Dr. Klaus Steger und Frau Dr. Agnieszka Paradowska-Dogan danke ich für wertvolle Hilfe bei der Bestimmung der Protamine beim Pferd.

Dem Nordrhein-Westfälischen Landgestüt in Warendorf, insbesondere der Landstallmeisterin Frau Susanne Schmidt-Rimkus und allen Mitarbeitern danke ich für die freundliche Kooperation.

Des Weiteren möchte ich mich für die Unterstützung bei Sebastian, Yvonne, Eugenia, Hilke und Dirk bedanken

Bei meiner Frau und meiner Tochter möchte ich mich für das Verständnis und die Zeit, die sie mit dieser Arbeit geteilt haben, besonders bedanken.



## 12. Anhang

**Tabelle 8: Darstellung der NNR-28%-Werte und des Alters der Hengste**

Hengst	Alter (Jahre)	Fertilität (NRR 28%)
1	3	30,303
2	12	52,7
3	5	70,491
4	10	42,857
5	4	30,952
6	10	50
7	6	40,993
8	6	53,623
9	14	53,529
10	3	55,252
11	3	50,602
12	8	45,762
13	3	62,25
14	10	60
15	3	52,173
16	3	80
17	13	50
18	12	62,5
19	3	83,333
20	4	90,9
21	4	60
22	8	62,5
23	3	53,333
24	7	85,714
25	4	80
26	7	76,923
27	14	54,545

Hengst	Alter (Jahre)	Fertilität (NRR 28%)
28	12	28,571
29	16	20
30	8	100
31	8	88
32	19	80
33	19	35,714
34	6	81,25
35	14	100
36	12	66,666
37	9	68,75
38	13	53,333
39	15	52,941
40	14	100
41	3	40
42	3	48,181
43	3	53,6
44	8	58,461
45	4	52,631
46	8	66,666
47	3	33,333
48	5	65
49	3	46
50	16	85
51	6	62,5
52	19	57,142
53	3	60
54	5	69,23
55	7	80

**Tabelle 9: Darstellung der DFI(%) -Werte und des Alters der Hengste**

Hengst	Alter (Jahre)	DNS-Integrität (DFI%)
1	3	5,6
2	12	0,93
3	5	6,755
4	10	1,185
5	4	3,265
6	10	3,245
7	6	6,365
8	6	3,815
9	14	1,725
10	3	0,57
11	3	6,515
12	8	4,17
13	3	2,86
14	10	0,705
15	3	6,35
16	3	6,165
17	13	1,91
18	12	8,46
19	3	4,81
20	4	7,215
21	4	11,17
22	8	1,52
23	3	13,03
24	7	6,96
25	4	1,42
26	7	2,92
27	14	5,63

Hengst	Alter (Jahre)	DNS-Integrität (DFI%)
28	12	10,275
29	16	2,35
30	8	6,045
31	8	2,91
32	19	1,78
33	19	15,27
34	6	5,42
35	14	7,515
36	12	4,52
37	9	10,245
38	13	4,395
39	15	6,645
40	14	12,93
41	3	3,3
42	3	0,63
43	3	1,19
44	8	12,855
45	4	4,9
46	8	4,23
47	3	3,38
48	5	2,97
49	3	2,31
50	16	2,99
51	6	0,98
52	19	11,59
53	3	1,405
54	5	6,735
55	7	3,305

**Tabelle 10: Spermatologische Standarduntersuchung**

Hengst	Jahrgang	Alter (Jahre)	Volumen (ml)	Dichte (MioS/ml)	VBGS (%)	MAS (%)
1	2006	3	30,000	103,000	55,000	48,200
2	1997	12	26,000	394,000	71,000	27,600
3	2004	5	38,000	183,000	44,000	25,900
4	1999	10	12,000	373,000	66,000	24,100
5	2005	4	16,000	367,000	35,000	33,600
6	1999	10	80,000	214,000	52,000	35,600
7	2003	6	24,000	187,000	46,000	21,200
8	2003	6	28,000	291,000	48,000	24,800
9	1995	14	20,000	274,000	48,000	22,300
10	2006	3	13,000	400,000	41,000	34,300
11	2006	3	10,000	338,000	45,000	32,100
12	2001	8	44,000	300,000	66,000	45,200
13	2006	3	120,000	109,000	72,000	20,500
14	1999	10	33,000	125,000	56,000	25,600
15	2006	3	42,000	145,000	45,000	27,800
16	2006	3	42,000	274,000	65,000	22,300
17	1996	13	20,000	272,000	60,000	32,100
18	1997	12	72,000	189,000	68,000	38,300
19	2006	3	42,000	233,000	70,000	21,900
20	2005	4	50,000	177,000	55,000	26,300
21	2005	4	46,000	376,000	65,000	33,120
22	2001	8	42,000	195,000	70,000	24,600
23	2006	3	86,000	191,000	68,000	36,100
24	2002	7	88,000	180,000	55,000	29,300
25	2005	4	24,000	377,000	70,000	28,500
26	2002	7	22,000	351,000	50,000	22,400
27	1995	14	48,000	352,000	65,000	35,900
28	1997	12	40,000	448,000	72,000	25,400
29	1993	16	43,000	477,000	64,000	32,500
30	2001	8	36,000	263,000	38,000	37,230
31	2001	8	42,000	259,000	58,000	22,900
32	1990	19	36,000	379,000	70,000	21,450
33	1990	19	28,000	405,000	75,000	35,220
34	2003	6	8,000	329,000	68,000	31,300
35	1995	14	83,000	249,000	40,000	22,300
36	1997	12	40,000	144,000	69,000	21,500

Hengst	Jahrgang	Alter (Jahre)	Volumen (ml)	Dichte (MioS/ml)	VBGS (%)	MAS (%)
37	2000	9	38,000	321,000	55,000	28,300
38	1996	13	51,000	334,000	68,000	26,300
39	1994	15	92,000	260,000	58,000	24,700
40	1995	14	52,000	243,000	48,000	28,600
41	2006	3	16,000	385,000	70,000	33,100
42	2006	3	22,000	413,000	80,000	35,700
43	2006	3	17,000	247,000	70,000	29,500
44	2001	8	58,000	306,000	75,000	24,600
45	2005	4	27,000	239,000	40,000	33,100
46	2001	8	34,000	322,000	85,000	29,300
47	2006	3	90,000	225,000	58,000	28,100
48	2004	5	43,000	184,000	62,000	28,400
49	2006	3	10,000	537,000	80,000	33,500
50	1993	16	63,000	234,000	70,000	30,600
51	2003	6	31,000	421,000	80,000	27,600
52	1990	19	50,000	290,000	40,000	22,600
53	2006	3	45,000	260,000	45,000	21,900
54	2004	5	47,000	220,000	52,000	22,800
55	2002	7	64,000	261,000	70,000	29,100

VBGS %= Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien [%]

MAS = Anteil morphologisch abweichender Spermien [%]

**Tabelle 11: Morphometrische Untersuchung**

Hengst	Jahrgang	Alter (Jahre)	Morphometrie							
			Länge (μ)		Breite (μ)		Area (μ <sup>2</sup> )		Perimeter (μ)	
1	2006	3	6,087	±0,381	2,836	±0,168	14,777	±1,211	18,922	±2,235
2	1997	12	5,818	±0,443	2,904	±0,214	13,838	±1,255	18,164	±2,093
3	2004	5	5,775	±0,443	3,220	±0,201	15,010	±1,325	18,709	±2,63
4	1999	10	5,575	±0,563	3,106	±0,210	13,640	±1,667	18,591	±3,131
5	2005	4	5,901	±0,388	3,134	±0,259	14,961	±1,168	18,283	±2,187
6	1999	10	5,526	±0,387	2,894	±0,170	13,073	±1,095	17,309	±1,823
7	2003	6	5,535	±0,306	3,071	±0,176	13,970	±1,176	17,281	±1,300
8	2003	6	5,454	±0,290	2,985	±0,166	13,120	±1,095	17,099	±1,595
9	1995	14	5,334	±0,543	2,757	±0,171	11,815	±1,205	18,763	±2,303
10	2006	3	5,447	±0,266	2,973	±0,170	13,272	±0,855	16,599	±1,168
11	2006	3	5,741	±0,509	3,134	±0,193	14,844	±1,168	18,129	±1,747
12	2001	8	5,882	±0,396	2,899	±0,191	14,059	±1,155	18,594	±2,819

ANHANG

Hengst	Jahrgang	Alter (Jahre)	Morphometrie							
			Länge (μ)		Breite (μ)		Area (μ²)		Perimeter (μ)	
13	2006	3	5,824	±0,430	3,013	±0,280	14,379	±1,229	19,053	±2,212
14	1999	10	5,460	±0,292	2,978	±0,191	13,263	±0,965	17,176	±2,120
15	2006	3	5,676	±0,316	3,035	±0,187	14,302	±1,105	17,896	±1,621
16	2006	3	5,570	±0,224	3,110	±0,143	14,126	±0,826	17,883	±1,651
17	1996	13	5,367	±0,505	2,896	±0,328	12,722	±1,379	17,760	±3,098
18	1997	12	5,698	±0,338	3,030	±0,204	14,036	±0,937	18,675	±2,422
19	2006	3	5,456	±0,539	2,902	±0,221	12,945	±1,117	17,200	±2,999
20	2005	4	5,354	±0,130	3,053	±0,189	13,149	±1,091	16,950	±2,012
21	2005	4	5,816	±0,347	2,916	±0,190	14,102	±1,092	18,227	±2,086
22	2001	8	5,871	±0,380	3,104	±0,240	14,876	±1,477	18,522	±2,250
23	2006	3	5,546	±0,309	2,862	±0,211	13,186	±1,014	17,059	±1,523
24	2002	7	5,466	±0,319	3,150	±0,163	14,097	±1,068	17,684	±1,437
25	2005	4	5,856	±0,360	2,936	±0,136	14,109	±0,939	18,158	±1,648
26	2002	7	5,810	±0,360	2,892	±0,156	13,599	±1,230	18,216	±2,520
27	1995	14	5,422	±0,379	2,735	±0,146	12,065	±1,041	16,836	±1,794
28	1997	12	5,904	±0,283	3,059	±0,163	14,779	±0,925	17,726	±1,681
29	1993	16	5,419	±0,392	2,942	±0,171	13,175	±0,941	17,023	±1,794
30	2001	8	5,722	±0,255	3,066	±0,154	14,450	±0,926	17,825	±1,555
31	2001	8	5,559	±0,334	3,062	±0,192	13,927	±1,174	17,730	±1,940
32	1990	19	5,663	±0,364	3,092	±0,139	14,479	±1,011	17,635	±1,717
33	1990	19	6,097	±0,325	2,841	±0,198	14,738	±1,201	19,195	±2,936
34	2003	6	5,333	±0,273	2,860	±0,177	12,571	±0,928	17,250	±2,429
35	1995	14	5,654	±0,368	3,151	±0,190	14,470	±1,259	18,419	±2,251
36	1997	12	5,783	±0,328	2,828	±0,207	13,352	±1,040	17,566	±2,141
37	2000	9	5,789	±0,474	2,789	±0,164	13,396	±1,210	17,849	±1,850
38	1996	13	5,536	±0,350	2,768	±0,165	12,825	±1,131	16,506	±1,642
39	1994	15	5,690	±0,308	2,842	±0,177	13,607	±1,017	17,510	±1,964
40	1995	14	6,034	±0,336	3,093	±0,220	15,258	±1,273	19,143	±2,931
41	2006	3	5,842	±0,331	3,003	±0,171	14,768	±1,009	18,848	±1,360
42	2006	3	5,648	±0,420	3,070	±0,177	14,263	±1,066	17,447	±1,951
43	2006	3	5,650	±0,436	2,949	±0,189	13,553	±1,211	18,573	±2,441
44	2001	8	5,401	±0,281	2,915	±0,166	12,858	±0,961	17,125	±1,678
45	2005	4	5,444	±0,292	2,902	±0,201	13,176	±0,965	16,693	±2,418
46	2001	8	5,693	±0,446	2,883	±0,191	13,609	±1,082	18,050	±2,034
47	2006	3	6,043	±0,590	2,836	±0,168	14,107	±1,241	19,022	±2,284
48	2004	5	5,414	±0,280	2,830	±0,175	12,616	±1,075	17,132	±1,946
49	2006	3	5,698	±0,365	2,872	±0,165	13,416	±1,011	17,293	±1,786
50	1993	16	5,128	±0,322	2,996	±0,156	12,631	±0,847	16,357	±1,723
51	2003	6	5,788	±0,400	2,863	±0,180	13,480	±1,270	18,515	±2,276
52	1990	19	5,576	±0,383	3,048	±0,161	13,651	±1,180	18,814	±2,044
53	2006	3	5,320	±0,360	2,685	±0,162	11,638	±1,121	18,590	±2,671
54	2004	5	4,839	±0,498	2,747	±0,210	10,636	±1,230	17,998	±2,551
55	2002	7	5,414	±0,478	2,700	±0,154	12,035	±0,977	17,782	±2,494

**Tabelle 12: Untersuchung der DNS-Integrität**

Hengst	DNS-Integrität		
	mean DFI	DFI SD	% high DFI
1	219,685	48,540	5,600
2	181,255	25,175	0,930
3	226,065	58,395	6,755
4	184,955	31,010	1,185
5	212,445	39,500	3,265
6	217,410	37,495	3,245
7	222,685	60,870	6,365
8	211,955	33,855	3,815
9	186,720	41,375	1,725
10	182,700	16,860	0,570
11	229,550	60,030	6,515
12	222,325	36,265	4,170
13	206,205	38,790	2,860
14	184,180	15,675	0,705
15	180,510	28,685	6,350
16	189,925	44,815	6,165
17	191,270	24,625	1,910
18	185,850	34,675	8,460
19	190,515	49,380	4,810
20	197,655	60,120	7,215
21	188,695	41,430	11,170
22	186,035	26,605	1,520
23	234,630	56,415	13,030
24	214,280	44,575	6,960
25	193,140	27,605	1,420
26	220,470	51,700	2,920
27	208,790	34,875	5,630
28	222,340	38,370	10,275

Hengst	DNS-Integrität		
	mean DFI	DFI SD	% high DFI
29	201,210	35,645	2,350
30	217,930	46,745	6,045
31	207,065	41,045	2,910
32	189,415	28,840	1,780
33	189,715	41,835	15,270
34	182,400	41,175	5,420
35	182,960	40,455	7,515
36	216,940	56,340	4,520
37	194,745	47,785	10,245
38	209,265	49,195	4,395
39	194,375	35,390	6,645
40	202,345	60,680	12,930
41	213,565	44,840	3,300
42	180,975	14,955	0,630
43	177,335	24,670	1,190
44	228,415	40,495	12,855
45	216,735	62,140	4,900
46	202,825	32,900	4,230
47	219,105	44,810	3,380
48	204,425	39,895	2,970
49	198,700	41,155	2,310
50	187,805	34,245	2,990
51	176,545	20,875	0,980
52	212,935	60,315	11,590
53	196,125	29,375	1,405
54	224,755	64,730	6,735
55	201,970	42,900	3,305

**Tabelle 13 : Untersuchung der Kernproteine**

Hengst	Nukleoproteine					
	Protamin-1	Protamin-2	Protamin-3	18 S	$\beta$ -Actin	GAPDH
1	36,2	29,8	28,1	27,7	31	27,6
2	31,7	30,2	30,1	24,7	28,1	27
3	29,8	27,8	28,2	20,5	26,5	24,2
4	29,9	29,6	30,3	24	28	26,5
5	29,5	33	31,9	29	30,7	30,6
6	34,1	28,3	30,1	23,7	27,4	26,5
7	28,4	26,3	27,1	18,4	25,6	26,8
8	33,4	33,1	32,6	25,8	30,7	29,6
9	24,6	28,8	30	26,5	33,6	30,8
10	28,7	30,4	32,4	24,7	31,8	29,6
11	27,6	27	26,5	23,5	25,7	22,3
12	27	27,2	27,1	21,3	25,5	22,5
13	26,6	30,9	32,7	30,2	33,7	30,8
14	29,7	29,4	29,6	24	28,8	27,1
15	27,5	30,1	31	25,6	32	28,5
16	25,7	26,6	26,7	19,7	24,6	22,9
17	33,4	30,6	29,3	28,6	30,9	26,3
18	28,3	33,5	33,5	27,1	31,9	30,4
19	27	25,9	26,8	18,7	26,6	25
20	30,7	32,4	33,4	28,3	30,7	29,6
21	29,1	29,4	28,7	21,8	28,3	26,2
22	29,9	28,7	29,5	22,2	28,9	26,6
23	31,5	28,1	29,5	22,7	27,8	26,3
24	29,1	34,9	29,4	31,6	34,5	32,2
25	22,1	29,8	25,8	24,7	31,3	30,5
26	23,9	33,3	28,7	28,6	31,9	31,2
27	23	29,9	27,6	28,9	32,1	31,2
28	27,8	32,6	31,6	28,5	31,5	30,1
29	26,5	33,3	27,8	31,7	32,7	33,1
30	28,6	30,9	30,5	31	27,3	32,7
31	20,7	31,1	22,1	24,4	28,9	27,3
32	22,5	31	25	23,5	30	27,2
33	22,2	27,1	25,6	17,7	23,4	21,7
34	24,4	32,4	25,5	27,7	29,6	30,6
35	22,7	31	23,8	25	30,1	29

## ANHANG

Hengst	Nukleoproteine					
	Protamin-1	Protamin-2	Protamin-3	18 S	$\beta$ -Actin	GAPDH
36	21,1	32,1	22,8	25,7	30,4	28
37	28,6	32,5	28,1	30,3	32,6	33,4
38	24,8	33,8	26	28,7	33,7	31,4
39	27	28,4	27,3	20,9	26,4	23,1
40	24,8	31,6	26,7	28,6	33,1	32,6
41	22,4	29,9	24,3	28,7	29,9	29,6
42	28,7	30,6	28,6	27,8	28,4	27,7
43	26,1	33,4	28,3	27,3	32,6	29,7
44	27,2	31,5	27,6	32,4	31,1	32,1
45	25,2	30,3	28,6	26,6	30,6	30,1
46	30,3	31,5	28,7	30,7	30,1	32,9
47	31,7	33,6	32,3	26,9	32,3	29,9
48	32,2	33,5	32,8	26,2	30,4	29,8
49	24	31,1	25	32,7	28,7	31,8
50	32	32	29,3	24,8	30,6	27,9
51	26	33,1	29,6	26,9	32,3	31
52	26,2	32,5	26,7	28,3	32,2	30,2
53	22,8	33,2	25,1	29,7	30,7	32,9
54	22,5	31,6	26	32,1	33,7	32,1
55	22,1	30,6	25,5	27,8	33,1	29,7



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6391-7

