

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München  
Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. U. Matis  
Angefertigt unter Anleitung von Prof. Dr. R. Stolla

Einfluss von Stickstoffmonoxid-Donoren und humanem Choriongonadotropin  
auf den testikulären Blutfluss des Hengstes  
– Dopplersonographische Untersuchungen –

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig - Maximilians - Universität München

von  
Johann Joachim Schulze  
aus  
Lübeck

München 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	1
<b>2</b>	<b>LITERATUR</b>	2
<b>2.1</b>	<b>Anatomie und Physiologie der Blutversorgung des Hodens beim Hengst</b>	2
2.1.1	Anatomie	2
2.1.1.1	Arterielle Gefäße	2
2.1.1.2	Venöse Gefäße	3
2.1.1.3	Arteriovenöse Anastomosen	4
2.1.2	Physiologie	4
2.1.2.1	Makrozirkulation	5
2.1.2.2	Mikrozirkulation	6
2.1.2.3	Lokale Durchblutung	6
<b>2.2</b>	<b>Grundlagen der dopplersonographischen Blutflussmessung</b>	7
2.2.1	Physikalische Grundlagen	7
2.2.2	Auswertung von Dopplerkurven	8
2.2.2.1	Qualitative Auswertung	8
2.2.2.2	Quantitative Auswertung mit Hilfe der Blutflussgeschwindigkeit	9
2.2.2.3	Semiquantitative Auswertung mit Hilfe der Widerstandsindices	10
<b>2.3</b>	<b>Dopplersonographische Untersuchung des testikulären Blutflusses</b>	11
2.3.1	Humanmedizin	12
2.3.2	Veterinärmedizin	13
<b>2.4</b>	<b>Zusammenhang zwischen testikulärem Blutfluss und Spermaqualität</b>	14
<b>2.5</b>	<b>Einfluss von exogenen Hormonen auf den testikulären Blutfluss und den Plasmatestosteronspiegel</b>	16
2.5.1	Luteinisierendes Hormon (LH) bzw. humanes Choriongonadotropin (hCG)	16
2.5.2	Östrogene	18

2.5.3	Einfluss von humanem Choriongonadotropin (hCG) auf die testikuläre Steroidsynthese beim Pferd	18
<b>2.6</b>	<b>Stickstoffmonoxid (NO)</b>	<b>20</b>
2.6.1	Vorkommen im Hodengewebe	20
2.6.2	Bedeutung von Stickstoffmonoxid bei der Regulation des testikulären Blutflusses	21
2.6.3	Vorkommen in den Spermien	22
2.6.4	Bedeutung von Stickstoffmonoxid für die Funktion der Spermien	22
2.6.5	Der Stickstoffmonoxid-Donor Molsidomin: Eigenschaften und Pharmakokinetik	24
2.6.6	FertilAid-for-Stallions™	25
2.6.6.1	L-Carnitin	25
2.6.6.2	Spurenelemente	26
2.6.6.3	Vitamine	26
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Tiere</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Versuchsdurchführung</b>	<b>27</b>
3.2.1	Überprüfung des Einflusses von FertilAid-for-Stallions™ und des Stickstoffmonoxid-Donors Molsidomin auf den testikulären Blutfluss und die Spermaqualität	27
3.2.2	Überprüfung des Einflusses von humanem Choriongonadotropin (hCG) auf den testikulären Blutfluss und die Steroidhormonkonzentrationen im Blutplasma	29
<b>3.3</b>	<b>Sonographische Untersuchungen</b>	<b>30</b>
3.3.1	Geräte und Sonden	30
3.3.2	Farbdopplersonographische Darstellung der A. testicularis	30
3.3.3	Auswertung der Pulswellen	31
<b>3.4</b>	<b>Samenbeurteilung</b>	<b>33</b>
3.4.1	Spermabeurteilung mittels konventioneller Methoden	33
3.4.2	Spermabeurteilung mittels Durchflußzytometrie	33

3.4.2.1	Geräte und Geräteeinstellungen	34
3.4.2.2	SYTO <sup>®</sup> 17/FITC-PNA/PI-Assay	34
3.4.2.3	Spermachromatinstruktur-Assay (SCSA <sup>™</sup> )	36
<b>3.5</b>	<b>Blutprobenentnahme und –untersuchung</b>	<b>38</b>
3.5.1	Plasmagewinnung	38
3.5.2	Testosteronbestimmung	39
3.5.3	Gesamtöstrogenbestimmung	39
<b>3.6</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Klinisch-andrologische und anamnestische Befunde</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Testikulärer Blutfluss</b>	<b>42</b>
4.2.1	Korrelation zwischen den Blutflussparametern	42
<b>4.3</b>	<b>Einfluss von FertilAid-for-Stallions<sup>™</sup> und dem Stickstoffmonoxid-Donor Molsidomin auf den testikulären Blutfluss und die Spermaqualität</b>	<b>44</b>
4.3.1	Testikulärer Blutfluss	44
4.3.2	Spermaqualität	47
4.3.2.1	Ejakulatvolumen, Spermiengesamtzahl und Motilität	47
4.3.2.2	Vitale Spermien	50
4.3.2.3	Akrosomgeschädigte bzw. –reagierte Spermien	51
4.3.2.4	Chromatinstruktur der Spermien	52
<b>4.4</b>	<b>Zusammenhang zwischen testikulärem Blutfluss und Spermaqualität</b>	<b>53</b>
<b>4.5</b>	<b>Einfluss von humanem Choriongonadotropin (hCG) auf den testikulären Blutfluss und die Steroidhormonkonzentrationen im Blutplasma</b>	<b>55</b>
4.5.1	Testikulärer Blutfluss	55
4.5.2	Steroidhormonkonzentrationen im Blutplasma	57
4.5.2.1	Testosteron	57
4.5.2.2	Östrogene	58
<b>4.6</b>	<b>Zusammenhang zwischen testikulärem Blutfluss und Steroidhormonkonzentrationen</b>	<b>59</b>

<b>4.7</b>	<b>Zusammenhang zwischen testikulärem Blutfluss und Fertilitätsdaten</b>	<b>63</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>68</b>
<b>5.1</b>	<b>Zusammenhänge zwischen den Blutflussparametern</b>	<b>69</b>
<b>5.2</b>	<b>Auswirkungen von FertilAid-for-Stallions<sup>TM</sup> und Molsidomin auf die Hodendurchblutung bzw. die Spermaqualität</b>	<b>71</b>
<b>5.3</b>	<b>Zusammenhang zwischen dem testikulären Blutfluss und der Spermaqualität</b>	<b>74</b>
<b>5.4</b>	<b>Auswirkungen der Applikation von humanem Choriongonadotropin (hCG) auf die Hodendurchblutung bzw. die Steroidhormonkonzentrationen</b>	<b>75</b>
<b>5.5</b>	<b>Zusammenhang zwischen dem testikulären Blutfluss und den Fertilitätsdaten</b>	<b>77</b>
<b>5.6</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>102</b>

# 1 EINLEITUNG

Sowohl beim Menschen (Battaglia *et al.*, 2000; Battaglia *et al.*, 2001; Biagiotti *et al.*, 2002; Tarhan *et al.*, 2003) als auch bei verschiedenen Tierarten (Bergh *et al.*, 1988; Bergh *et al.*, 2001) konnten positive Zusammenhänge zwischen dem testikulären Blutfluss und der Spermaqualität festgestellt werden.

Die Durchblutung der Hoden wird unter anderem durch verschiedene Vasokonstriktoren und -dilatoren gesteuert. Stickstoffmonoxid ist ein bedeutender endogener Vasodilatator (Moncada *et al.*, 1991; Inagami *et al.*, 1995), dessen Aktivität über den Nachweis der Stickstoffmonoxid-Synthase in unterschiedlichen Zellen des Hodengewebes, unter anderem in den Endothelzellen der Blutgefäße nachgewiesen wurde (Middendorff *et al.*, 1997).

Neben lokal wirkenden Substanzen spielen bei der Regulation der testikulären Durchblutung auch Hormone eine wichtige Rolle. So bewirkte die Applikation von humanem Choriongonadotropin (hCG) bei Studien an Labortieren neben einem Anstieg der Testosteronkonzentrationen im Blutplasma auch eine Erhöhung der Blutversorgung des Hodens (Wang *et al.*, 1984; Damber *et al.*, 1985; Bergh and Damber, 1993). Auch beim Hengst wurde nach Injektion von hCG ein Anstieg der Testosteron- und Östrogenkonzentrationen im Blutplasma beobachtet (Setchell and Cox, 1982; Zwain *et al.*, 1989; Roser, 1995). Roser (1995) stellte außerdem fest, dass der Anstieg der Sexualsteroidhormone bei subfertilen Hengsten post applicationem weniger stark ausgeprägt ist als bei fertilen Hengsten. Untersuchungen über den Einfluss von hCG auf den testikulären Blutfluss liegen bei Pferden bisher nicht vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der Dopplersonographie zu überprüfen, ob auch beim Hengst Zusammenhänge zwischen dem testikulärem Blutfluss und der Spermaquantität bzw. -qualität sowie der Fertilität bestehen. Zum anderen sollte der Einfluss durchblutungsfördernder Pharmaka, welche die Freisetzung von Stickstoffmonoxid fördern, auf die testikuläre Durchblutung und die Zahl und Qualität der Spermien untersucht werden. Darüber hinaus wurde der Effekt von hCG auf die testikuläre Durchblutung im Zusammenhang mit den Änderungen der Testosteron- und Östrogenkonzentrationen im Blutplasma analysiert und die Blutflussreaktion von fertilen und weniger fertilen Hengsten verglichen, um auf diese Weise zu überprüfen, ob durch eventuell zu beobachtende Änderungen im Blutfluss Hinweise auf die Fertilität der Hengste zu erhalten sind.

## 2 LITERATUR

### 2.1 Anatomie und Physiologie der Blutversorgung des Hodens beim Hengst

#### 2.1.1 Anatomie

##### 2.1.1.1 Arterielle Gefäße

Die Arteria testicularis ist für die Blutversorgung des Hodens verantwortlich. Sie entspringt als paariges Visceralgefäß seitlich aus der Aorta abdominalis in Höhe des 4. Lendenwirbels (Waibl und Wilkens, 1996), besteht aus einem geraden (im Abdomen), einem gewundenen (im Samenstrang) und einem marginalen Abschnitt (an der Hodenoberfläche) (Setchell and Maddocks, 1994) und verläuft zunächst ventral über die innere Lendenmuskulatur und weiter entlang der seitlichen Bauchwand in der Plica vasculosa in gestrecktem Verlauf zum tiefen Leistenring. Zusammen mit der Vena testicularis, Lymphgefäßen, den Nerven des Plexus testicularis und dem Samenleiter bildet sie den Samenstrang (Abb. 2.1). Da der Hoden beim Hengst in enger nachbarlicher Beziehung zum äußeren Leistenring steht, ist der Samenstrang relativ kurz.

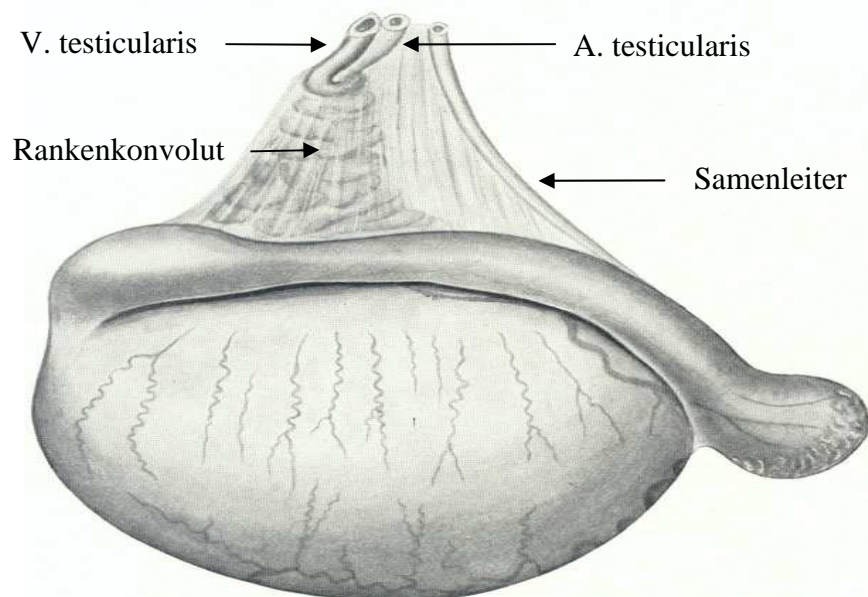


Abb. 2.1: Linker Hoden, Nebenhoden und Samenstrang des Hengstes (modifiziert nach Koch 1963).



Im Samenstrang bildet die A. testicularis ein aus dicht beieinander liegenden Schlingen bestehendes konisches Rankenkonvolut. Nach Heinze und Ptak (1976) zeigt sie einen im Uhrzeigersinn gerichteten spiralförmigen Verlauf, wobei jede einzelne Spiralwindung wiederum 3 kleinere, nahezu in einer Ebene gelegene Spiralwindungen aufweist. Dieser aus etwa 10 großen (Grundspiralen) und 50 kleineren (Sekundärspiralen) bestehende Arterienabschnitt ist durchschnittlich 70 cm lang und besitzt im proximalen Plexusabschnitt einen Gefäßdurchmesser von 2 mm, im mittleren Abschnitt von 2,5 mm und im hodenseitigen einen von 3 mm (Heinze and Ptak, 1976). Der auffällige Gefäßverlauf der Pars convoluta der A. testicularis bewirkt eine Verringerung der Fließgeschwindigkeit des Blutes, verbunden mit einem starken Abfall des mittleren Blutdruckes, der sich nur graduell vom venösen Blutdruck unterscheidet (Hofmann, 1960).

Entlang des Margo epididymalis zieht die A. testicularis als Marginalarterie zum kaudalen Hodenpol. Von dort verläuft sie zum Margo liber und wieder in Richtung des kranialen Hodenpols. Während ihres Verlaufs teilt sich die Marginalarterie in mehrere große Äste auf, gibt aber auch mehrere kleine Äste an die Umgebung ab (Pozor and Kolonko, 2000). Aus den Ästen der A. testicularis gehen im Parenchym die Zentripetalarterien hervor, die in den Hodensepten zur Hodenachse, dem Mediastinum testis ziehen. Dort bilden sie knäuelartige Windungen und verlaufen dann als Zentrifugararterien zur Hodenkapsel zurück. Diese entlassen in allen Lagen des Parenchyms Arteriolen und dann Kapillaren, welche die Tubuli seminiferi contorti umhüllen (Waibl and Wilkens, 1996). Es existieren zwei kapilläre Netzwerke. Das intertubuläre Netzwerk verläuft parallel zu den Samenkanälchen im interstitiellen Raum zwischen drei benachbarten Tubuli und versorgt die Leydig-Zellen, während das peritubuläre Netzwerk zwischen verschiedenen interstitiellen Abschnitten gelegen ist und ein Netzwerk bildet, das sich dicht an den einzelnen Tubuli befindet. Es scheint der Versorgung der Tubuli zu dienen (Setchell, 1978; Murakami *et al.*, 1989).

### **2.1.1.2 Venöse Gefäße**

Der venöse Abfluss erfolgt zum einen über Venen, die über die Extremitas capitata gemeinsam mit den Ductuli efferentes den Hoden verlassen (Waibl and Wilkens, 1996). Zum überwiegenden Teil verlaufen die Parenchymvenen aber radiär und intertubulär zur Organkapsel. An der Hodenoberfläche formieren sich alle Venen zu einer Gefäßtapete, um sich dann an der Basis des Samenstranges in ein dichtes Geflecht kleinerer Zweige

aufzulösen, welche die groben Schlingen der Arterie allseitig umspinnen und als Rankengeflecht, Plexus pampiniformis, bezeichnet werden (Amselgruber, 1988). Nach Heinze und Ptak (1976) ist der Plexus pampiniformis walzen- bis spitzkegelförmig gestaltet und 5 cm lang und 2,5 cm dick. Zusammen mit dem Rankenkonvolut hat es die Aufgabe, die Hodentemperatur um zwei bis sechs Grad Celsius unter der Körperinnentemperatur zu halten und den Übergang von Substanzen vom arteriellen in den venösen Teil zu ermöglichen (Setchell and Maddocks, 1994). Am Anulus vaginalis vereinigen sich die kleinen Gefäße des Plexus pampiniformis zur V. testicularis, welche parallel zur A. testicularis verlaufend in der V. cava caudalis mündet.

### **2.1.1.3 Arteriovenöse Anastomosen**

Im Samenstrang scheint es arteriovenöse Anastomosen zu geben, welche bisher zwar nicht bei Pferden, jedoch bei verschiedenen Tierarten wie z.B. Rindern, Schafen und Schweinen nachgewiesen wurden (Setchell and Maddocks, 1994). So wurde bei Schafböcken und Ebern festgestellt, dass 40% des durch die A. testicularis fließenden Blutes direkt in das venöse System gelangt, ohne den Hoden zu passieren (Maddocks and Sharpe, 1989; Maddocks *et al.*, 1993). Die Bedeutung dieser Anastomosen ist bisher aber unbekannt.

### **2.1.2 Physiologie**

Der Hoden hat inkretorische und sekretorische Aufgaben, wie die Synthese und Sekretion der Sexualsteroid Testosteron und Östrogen, die Vermittlung von Rückkopplungssignalen an Hypothalamus und Hypophyse über die testikulären Hormone Aktivin und Inhibin und die Spermatogenese (Bader, 2000). All diese Funktionen werden von der Hodendurchblutung beeinflusst (Sharpe, 1984; Damber *et al.*, 1985; Setchell, 1986; Bergh and Damber, 1987; Setchell, 1990; Bergh and Damber, 1993).

Obwohl sich mehrere Studien an Labortieren mit der physiologischen Regulation des testikulären Gefäßsystems beschäftigt haben, sind die dafür verantwortlichen Mechanismen bisher weitgehend unbekannt (Bergh and Damber, 1993). Einige Autoren gehen davon aus, dass die autoregulatorischen Fähigkeiten nur begrenzt sind (Setchell, 1970; Damber and Janson, 1978b; Bergh and Damber, 1993;). So beobachteten Lissbrant *et al.* (1997) eine positive Korrelation zwischen Blutdruck und testikulärem Blutfluss.

Damber und Bergh (1993) unterscheiden am Hoden grundsätzlich drei verschiedene Arten der Regulation: die Steuerung der Makrozirkulation, d.h. des Blutflusses in den größeren Gefäßen außerhalb des Hodens, die Regulation der Mikrozirkulation in den kleineren Gefäße innerhalb des Hodens und die auto- und parakrine Kontrolle des Blutflusses.

### **2.1.2.1 Makrozirkulation**

Es sind mehrere Faktoren bekannt, die einen Einfluss auf die testikuläre Makrozirkulation haben (Bergh and Damber, 1993). So konnte in verschiedenen Studien festgestellt werden, dass sowohl die Verabreichung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin (Free, 1977; Damber and Janson, 1978a) als auch die verschiedener Prostaglandine (Free, 1977) eine Abnahme des testikulären Blutflusses bewirken. Dazu waren aber unphysiologisch hohe Dosen der oben genannten Substanzen nötig. Dagegen senkten die im Hoden produzierten Mediatoren Arginin-Vasopressin, Serotonin und Endothelin-1 bereits in physiologischen Konzentrationen den testikulären Blutfluss (Collin *et al.*, 1996a; Collin *et al.*, 1996b). Deshalb sind Collin *et al.* (1996) der Ansicht, dass Serotonin und Endothelin-1 wichtige physiologische Regulatoren des testikulären Blutflusses sein könnten. Auch luteinisierendes Hormon (LH) (s. Kapitel 2.5.1) und der Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonist Buserelin scheinen einen Einfluss auf den testikulären Blutfluss zu haben (Bergh and Damber, 1993). Widmark *et al.* (1986) beobachteten nach intratestikulärer Verabreichung einer niedrigen Dosis Buserelin eine Abnahme des testikulären Blutfluss, wo hingegen eine höhere Dosis zu einem Anstieg führte. Die Autoren erklärten sich diesen Unterschied mit der erst bei höheren Dosen auftretenden LH-Stimulation, während sie den Effekt der niedrigen Dosis Buserelin einer Stimulation bisher unbekannter Leydig-Zell-Produkte zuschreiben.

Einen Anstieg der Hodendurchblutung bewirkten in hohen Dosierungen die Protease Kallikrein (Saito and Kumamoto, 1988) und Adenosin (Fleet *et al.*, 1982). In physiologischen Konzentrationen hatten aber nur verschiedene natriuretische Peptide wie Artriales- (ANP), Brain- (BNP) und C-Typ- natriuretisches Peptid (CNP) eine Wirkung auf die Hodendurchblutung (Collin *et al.*, 1997).

### 2.1.2.2 Mikrozirkulation

Ähnlich wie im Endstromgebiet anderer Organe, kommt es auch im Hoden zur Vasomotion (Collin *et al.*, 2000). Darunter versteht man die rhythmischen Schwankungen der Muskelaktivität der präkapillären Sphinkter (Bergh and Damber, 1993). Nach Damber *et al.* (1986) weist die Vasomotion bei Labortieren eine Frequenz von 7 bis 11 pro Minute auf. Die physiologische Bedeutung und Regulation der Vasomotion ist bisher weitestgehend unbekannt, Bergh und Damber (1993) nehmen aber an, dass sie eine wichtige Rolle bei der Filtration und Resorption von Gewebeflüssigkeit spielt. Intaglietta (1988) vermutet, dass die Vasomotion durch spontane Schrittmacheraktivität der glatten Muskulatur der Arteriolenwand hervorgerufen und durch humorale und neuronale Faktoren reguliert wird.

In mehreren Studien wurde beobachtet, dass sowohl die Hormone LH und GnRH (Damber *et al.*, 1986; Widmark *et al.*, 1986; Damber *et al.*, 1987a) als auch die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin (Damber *et al.*, 1982) die vasomotorische Aktivität hemmen, wodurch ein kontinuierlicher testikulärer Blutfluss entsteht. Im Gegensatz dazu führt Testosteron nach Hemmung der Vasomotion durch Hypophysektomie oder Leydig-Zell-Zerstörung zur Induktion der vasomotorischen Aktivität (Widmark, 1987; Damber *et al.*, 1992).

Nach Bergh und Damber (1993) besteht kein direkter Zusammenhang zwischen der vasomotorischen Aktivität und der totalen testikulären Durchblutung. Die Blutversorgung des Hodens könne sowohl bei geringer als auch bei starker vasomotorischer Amplitude niedrig, normal oder hoch sein (Widmark, 1987; Bergh and Damber, 1993). Ein Grund hierfür liegt nach Auffassung der Autoren darin, dass der Blutfluss von vielen Faktoren und nicht nur der Vasomotion abhängt. So steht zwar der Gefäßwiderstand im umgekehrten Verhältnis zur vasomotorischen Amplitude, aber auch andere Faktoren wie der Durchmesser der Gefäße spielen eine wichtige Rolle (Bergh and Damber, 1993).

### 2.1.2.3 Lokale Durchblutung

Neben der Steuerung der Hodendurchblutung durch eine Makro- und Mikrozirkulation hängt die lokale Durchblutung des Hodengewebes auch von komplizierten para- und autokrinen Mechanismen ab (Sharpe, 1984; Sharpe, 1990; Sharpe *et al.*, 1990). So stellten Damber *et al.* (1992) bei Ratten fest, dass Testosteron, welches von den Leydig-Zellen gebildet wird, eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Hodendurchblutung

spielt. Nach Zerstörung der Leydig-Zellen durch Ethan Dimethyl Sulfonat kam es zu einer deutlichen Reduzierung des testikulären Blutflusses, welche aber durch Testosteronbehandlung wieder normalisiert werden konnte (Damber *et al.*, 1992). Aber auch die Tubuli seminiferi scheinen eine wichtige Rolle bei der Regulation der testikulären Durchblutung zu spielen. So kam es nach ihrer Zerstörung, trotz normaler Testosteron-Werte, zu einer Senkung des testikulären Blutflusses, welcher analog zum Grad der Schädigung war (Setchell and Galil, 1983; Wang *et al.*, 1983). Die Mediatoren und Zellen, welche diese Gefäßwirkung vermitteln, sind bisher aber nicht bekannt (Bergh and Damber, 1993).

## **2.2 Grundlagen der dopplersonographischen Blutflussmessung**

Nachfolgend sind nur die wichtigsten für das Verständnis dieser Arbeit erforderlichen Grundlagen der Dopplersonographie beschrieben. Ausführlichere Angaben hierzu sind in den Dissertationen von Baumgartner (1998), Bühlmeier (1999) und Mayer (1999) nachzulesen.

### **2.2.1 Physikalische Grundlagen**

Die Grundlage für die Blutflussmessung bildet die so genannte Dopplerfrequenzverschiebung oder „Dopplershift“. Damit wird die Frequenzverschiebung zwischen den vom Schallkopf ausgesendeten und den vom Körpergewebe bzw. den Blutkörperchen reflektierten hochfrequenten Schallwellen bezeichnet. Die Höhe des Dopplershifts ist abhängig von der Sendefrequenz des Schallkopfes, dem Winkel zwischen dem Ultraschallstrahl und der Blutflussrichtung, der Schallgeschwindigkeit im Weichteilgewebe (ca. 1540 m/s) und der Blutflussgeschwindigkeit (Dudwiesus *et al.*, 1993; Marsal, 1993).

Diese Beziehung kommt in der folgenden Gleichung zum Ausdruck:

$$f(d) = \frac{2f * v * \cos \alpha}{c}$$

$f(d)$  = Dopplershift [Hz] =Frequenzverschiebung

$f$  = Sendefrequenz des Schallkopfes [Hz]

$v$  = Blutflussgeschwindigkeit [m/s]

$c$  = Ausbreitungsgeschwindigkeit des Ultraschalls im Körpergewebe [m/s]

$\alpha$  = Winkel zwischen Ultraschallstrahl und der Richtung des Blutflusses

Die akustisch wahrnehmbaren Frequenzverschiebungen können in Abhängigkeit von der Zeit auch in einem Koordinatensystem optisch sichtbar gemacht werden, wobei sich bei arteriellen Gefäßen Wellenformen mit deutlicher Unterteilung in Systole und Diastole ergeben (Dickey, 1997).

Zusätzlich werden bei Farbdopplergeräten Blutströme unterschiedlicher Flussrichtung verschiedenfarbig dargestellt. Üblicherweise werden auf den Schallkopf zufließende Ströme rot und vom Schallkopf sich entfernende Blutflüsse blau dargestellt (Dudwiesus, 1995).

Bei so genannten Duplexsystemen wird das B-Bild und die Dopplerfrequenzverschiebung zeitgleich dargestellt. Da hierbei in Echtzeit der Ultraschall des Dopplergerätes auf das B-Bild übertragen wird, kann mit diesem System das zu untersuchende Gefäß genau lokalisiert werden, so dass somit im gepulsten Dopplermodus eine selektive Blutflussmessung möglich ist. Der Bereich, aus dem die Dopplerfrequenzverschiebungen gemessen werden, ist dabei im Messbild durch ein, in der Größe variables, Dopplerfenster gekennzeichnet (Ruland and Borkenhagen, 1988; Fendel and Sohn, 1989; Pensel and Warnking, 1993).

## **2.2.2 Auswertung von Dopplerkurven**

Bei der Auswertung von Dopplerwellen stehen prinzipiell qualitative, quantitative und semiquantitative Methoden zur Auswahl.

### **2.2.2.1 Qualitative Auswertung**

Bei der qualitativen Auswertung werden die Pulswellen hinsichtlich der Flussrichtung, des Vorhandenseins eines diastolischen Blutflusses und dessen Kontinuität während einer

Herzaktion deskriptiv beurteilt und klassifiziert (Goswamy and Steptoe, 1988; Tekay *et al.*, 1996).

Eine detailliertes Beurteilungsschema dieser Blutflussmuster ist in der Dissertation von Mayer (1999) aufgelistet.

### 2.2.2.2 Quantitative Auswertung mit Hilfe der Blutflussgeschwindigkeit

Die quantitative Auswertung der Dopplerkurven dient der Feststellung des tatsächlichen Blutflussvolumens, das pro Zeiteinheit eine bestimmte Gefäßlokalisierung passiert. Zu diesem Zweck müssen sowohl der Winkel zwischen der Blutflussrichtung und dem Dopplerstrahl als auch der Querschnitt des betreffenden Gefäßes an der Messlokalisierung bekannt sein. Die Blutflussgeschwindigkeit ergibt sich dann durch Umstellung der Dopplergleichung:

$$v = \frac{f(d) * c}{2 f * \cos \alpha}$$

$f(d)$  = Frequenzverschiebung = Dopplershift [Hz]

$f$  = Sendefrequenz des Ultraschallkopfes [Hz]

$v$  = Blutflussgeschwindigkeit [m/s]

$c$  = Schallgeschwindigkeit im Körper (ca. 1540 m/s)

$\alpha$  = Winkel zwischen der Blutflussrichtung und der Richtung des Ultraschallstrahls

Aus der Querschnittsfläche des Gefäßes an der Messlokalisierung und der berechneten Blutflussgeschwindigkeit lässt sich nach folgender Formel das Blutflussvolumen (BFV) berechnen:

$$BFV = v * 60 * A$$

BFV = Blutflussvolumen [ml/min]

$v$  = Blutflussgeschwindigkeit [m/s]

$A$  = Fläche des Gefäßquerschnittes als kreisrund angenommen [cm<sup>2</sup>]

### 2.2.2.3 Semiquantitative Auswertung mit Hilfe der Widerstandsindices

In der Dopplersonographie wird der Blutfluss vorwiegend semiquantitativ beurteilt. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, dass Gefäßquerschnitt und Winkel zwischen Blutflussrichtung und Dopplerstrahl nicht in die Berechnung einfließen und somit als mögliche Fehlerquelle wegfallen.

Bei dieser Methode werden verschiedene Dopplerindices gebildet, die zur Charakterisierung der Widerstandsverhältnisse in der Peripherie des untersuchten Gefäßes dienen. Am gebräuchlichsten sind der Resistance Index (RI) nach Pourcelot (1974) und der Pulsatility Index (PI) nach Gosling und King (1975).

Zur Berechnung dieser Indices werden die maximale systolische (S), die enddiastolische (D) und die minimale Frequenzverschiebung (Min) sowie die mittlere Frequenzverschiebung (Mean) während eines Herzzyklus verwandt (Abb. 2.2):

$$\text{Resistance Index:} \quad \text{RI} = \frac{(S - D)}{S}$$

$$\text{Pulsatility Index:} \quad \text{PI} = \frac{(S - \text{Min})}{\text{Mean}}$$

S = maximale systolische Frequenzverschiebung (PSV)

D = enddiastolische Frequenzverschiebung (EDV)

Min = minimale Frequenzverschiebung

Mean = mittlere Frequenzverschiebung



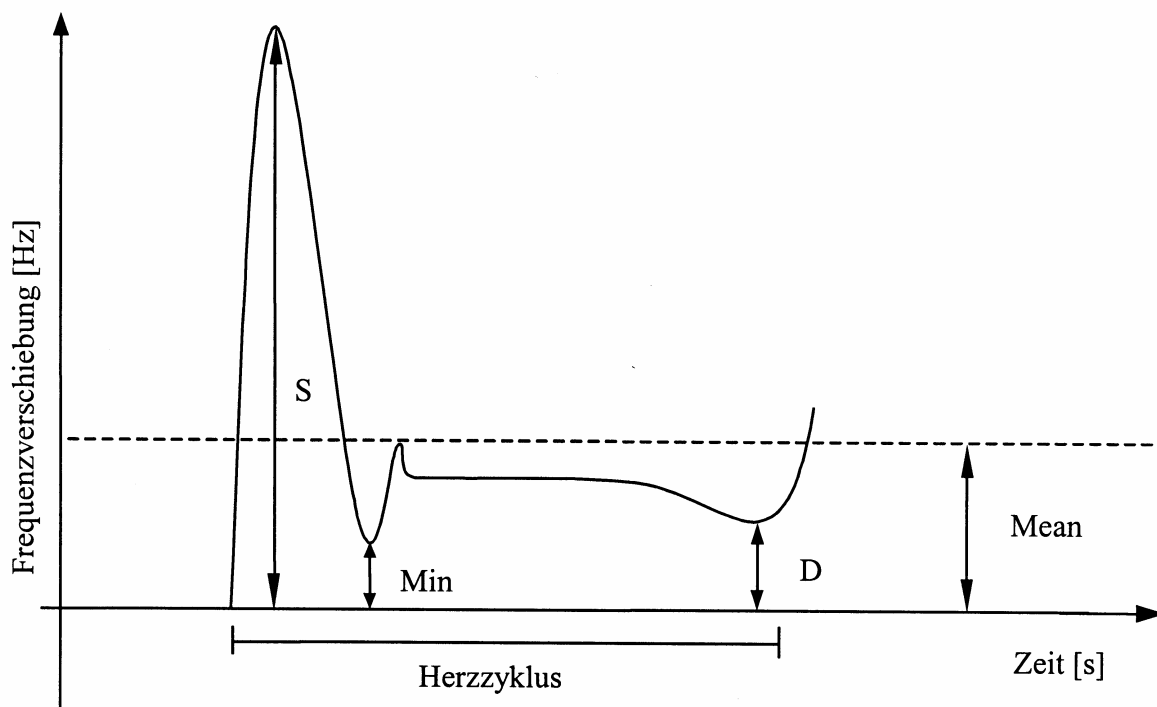


Abb. 2.2: Schematische Darstellung einer Dopplerwelle mit der maximalen systolischen (S), enddiastolischen (D), minimalen (Min) und der mittleren (Mean) Frequenzverschiebung während eines Herzzyklus.

Bezüglich der Wertigkeit dieser Dopplerindices zur Beurteilung der Widerstandsverhältnisse in der Peripherie des untersuchten Gefäßes wurden von Hecher et al. (1988) und Thompson et al. (1988) bei arteriellen Gefäßen mit kontinuierlichem diastolischen Blutfluss keine Unterschiede festgestellt. Allerdings ist der RI nach Fendel und Sohn (1989) zur Beurteilung bei Gefäßen mit diskontinuierlichem Blutfluss nicht geeignet.

### 2.3 Dopplersonographische Untersuchungen des testikulären Blutflusses

Bereits seit 1989 wird die Dopplersonographie bei der Untersuchung des testikulären Blutflusses in der Humanmedizin eingesetzt (Middleton *et al.*, 1989). In den letzten Jahren wurde diese Technik auch in der veterinärmedizinischen Andrologie verwendet (Günzel-Apel *et al.*, 2001; Pozor and McDonnell, 2004).

### 2.3.1 Humanmedizin

Middleton et al. (1989) waren die Ersten, die mit Hilfe der Dopplersonographie den arteriellen Blutfluss des Hodens bei gesunden Männern untersuchten. Sie bestimmten die maximale systolische (PSV) und enddiastolische Frequenzverschiebung (EDV), sowie den Resistance Index (RI) und Pulsatility Index (PI) bei intratestikulären, kapsulären und supratestikulären Arterien. Dabei waren die Werte der intratestikulären und kapsulären Arterien über den ganzen Hoden vergleichbar, während die Ergebnisse der supratestikulären Arterien regional sehr unterschiedlich waren. Die Autoren erklären dies mit der vermutlich bei einigen Patienten fälschlicherweise durchgeführten Untersuchung der den Nebenhoden versorgenden Arterien.

Bei präpubertären Kindern ermittelten Paltiel et al. (1994) in den Parenchymarterien höhere RI-Werte als bei Jungen in der Pubertät. Die Autoren gehen davon aus, dass dieses Phänomen die beim reifen Hoden einsetzende Vasodilatation und Blutflusssteigerung widerspiegelt. Zudem war die RI-Abnahme mit dem Anstieg des testikulären Volumens assoziiert, so dass die Autoren eine negative Korrelation zwischen Hodenvolumen und RI postulieren.

Den Einfluss des Alters auf die Parameter RI und PI überprüften Wielgos und Mitarbeiter (1998). Dabei konnten sie bei 51 bis 80 Jahre alten Männern signifikant höhere RI und PI-Werte feststellen als bei unter 40jährigen. Als Ursache dafür vermuten die Autoren degenerative Veränderungen des Hodengewebes.

Mehrere Autoren beobachteten, dass bestimmte Erkrankungen des Hodens mit Änderungen des Resistance Index einhergehen (Atilla *et al.*, 1997; Jee *et al.*, 1997; Dubinsky *et al.*, 1998; Pavlica and Barozzi, 2001). So kam es bei Männern mit Torsionen des Samenstrangs zu einem Anstieg der RI-Werte der Arterien des Hodenparenchyms (Dubinsky *et al.*, 1998; Pavlica and Barozzi, 2001). Bei Patienten mit unilateralem Kryptorchismus konnten Attila et al. (1997) auf der nicht abgestiegenen Hodenseite niedrigere RI-Werte ermitteln als auf der abgestiegenen. Je größer die histologisch feststellbaren Hodenschädigungen in Form einer Verminderung des Durchmessers der Tubuli seminiferi, der Anzahl der Spermatogonien und der Zunahme des peritubulären Gewebes an den kryptorchen Hoden waren, um so größere RI-Werte konnten die Autoren ermitteln. Sie weisen darauf hin, dass die Hodenschädigung sowohl Ursache als auch Folge der veränderten Blutversorgung des Hodens sein kann.

Auch bei verschiedenen entzündlichen Hodenerkrankungen wurden mittels Dopplersonographie Veränderungen des testikulären Blutflusses festgestellt. So untersuchten Jee et al. (1997) den Einfluss von entzündlichen Hodenerkrankungen auf den Widerstandindex RI. Bei Patienten mit Epididymoorchitis war der RI der intratestikulären Arterien erniedrigt. Dagegen veränderte sich RI bei Patienten mit einer isolierten Epididymitis nicht.

### **2.3.2 Veterinärmedizin**

Pozor und McDonnel (2004) haben den Blutfluss der A. testicularis im Samenstrang und in der Pars marginalis der A. testicularis bei gesunden Hengsten unterschiedlichen Alters beurteilt. Dabei verwendeten sie wie bei der Studie von Middleton et al. (1989) die Blutflussgeschwindigkeitswerte Peak Systolic Velocity (PSV) und End Diastolic Velocity (EDV), sowie die Widerstandsindices PI und RI. Die Werte des rechten und linken Hodens differierten etwas, die Unterschiede waren aber nicht signifikant. In der Pars marginalis konnten gegenüber der Pars convoluta niedrigere PSV-, PI- und RI-Werte festgestellt werden, wohingegen EDV höher lag. Die Autoren erklären diese Unterschiede im Vergleich zum Menschen mit den abweichenden anatomischen Gegebenheiten. So liegen die Hoden beim Hengst in horizontaler Lage nahe der Bauchdecke und die Pars convoluta ist dadurch kurz und stärker gewunden.

Die Autoren ermittelten bei den 11 bis 15 Jahre alten Hengsten höhere EDV-Werte und niedrigere RI-Werte als bei der Gruppe der 16 bis 22 Jahre alten Hengste. Die Werte der 3 bis 10 jährigen Hengste unterschieden sich nicht von den beiden Gruppen. Die Autoren haben keine Erklärung für diese Ergebnisse.

Lee et al. (1996) stellten bei 5 Hunden artifiziell eine Torsion des Samenstranges in fünf Schritten von 180 bis 540° her, bis der testikuläre Blutfluss im Hodenparenchym nicht mehr bestimmt werden konnte. In vier Fällen war der Blutfluss ab einer Drehung von 450° und in einem Fall von 540° nicht mehr feststellbar. Erstaunlich war, dass die gemessenen RI-Werte sich nicht mit dem Grad der Torsion änderten.

In der Studie von Pozor und McDonnel (2004) war ebenfalls ein Hengst mit einer Torsion des Samenstrangs um 180° untersucht worden. Auch hier waren zwischen den Dopplerparametern des betroffenen Tieres und der gesunden Hengste keine Unterschiede zu verzeichnen.

Zudem bestimmten letztgenannte Autorinnen den Blutfluss bei weiteren neun Hengsten mit pathologischen Hodenveränderungen, vier davon hatten eine unilaterale Hydrozele, drei eine Varikozele und zwei einen atrophischen Hoden. Aber auch hier lagen RI und PI sowie PSV und EDV im Bereich der Werte der gesunden Hengste, wobei jedoch bei Vorliegen einer Varikozele tendenziell höhere PSV-, RI- und PI-Werten feststellbar waren. Einer der atrophischen Hoden hatte im Parenchym ein vergrößertes arterielles Gefäß. Die Blutflusswerte zeigten aber auch hier keine Auffälligkeiten.

Günzel-Apel et al. (2001) untersuchten den Unterschied des testikulären Blutflusses bei Hunden mit Hodentumoren im Vergleich zu gesunden Hunden. Dabei waren bei den tumorös veränderten Hoden PSV und die amplitudengewichtete mittlere Geschwindigkeit (TAMAX) signifikant höher als bei gesunden Hunden, während sich die Widerstandsindices nicht unterschieden. Die Autorinnen erklären dies mit dem, wie von Horstman et al. (1992) beim Menschen beschriebenen Anstieg des Blutflusses bei zunehmender Tumorgröße.

#### **2.4 Zusammenhang zwischen testikulärem Blutfluss und Spermaqualität**

Die Hoden, in denen täglich mehrere Millionen Spermien produziert werden, sind sehr anfällig gegenüber Störungen der Durchblutung (Damber and Bergh, 1992; Bergh and Damber, 1993; Bergh *et al.*, 2001). So stellten verschiedene Autoren (Battaglia *et al.*, 2000; Battaglia *et al.*, 2001; Biagiotti *et al.*, 2002; Tarhan *et al.*, 2003) bei Männern mit Störungen der Hodenfunktion eine verminderte testikuläre Durchblutung fest. Nach Battaglia et al. (2000) ist bei Patienten mit einer Azoospermie der Pulsatility Index (PI) der transmediastinalen Arterie höher als bei Männern mit einer Oligozoospermie und auch die PI-Werte von Männern mit Oligozoospermie waren signifikant höher als bei solchen mit Normospermie. Biagiotti et al. (2002) untersuchten Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen des Genitaltrakts, die mit einer Azoospermie, einer Oligoasthenospermie bzw. einer Normospermie vergesellschaftet waren und fertile Männer mit einer Normospermie. Sie stellten eine positive Korrelationen zwischen Spermaproduktionsrate und PSV fest. Überraschenderweise war bei den Patienten auch ein positiver Zusammenhang zwischen Spermatogeneserate und dem Widerstandsindex RI zu beobachten. Eine Erklärung für dieses Phänomen haben die Autoren nicht, nehmen aber an, dass Pathologien in der Gefäßarchitektur die Ursache dafür sein könnten.

Tarhan et al. (2003) stellten mittels farbdopplersonographischer Untersuchungen der A.testicularis im Samenstrang fest, dass bei gesunden Männern das testikuläre

Blutflussvolumen höher ist als bei Patienten mit Varikozelen. Dabei fanden sie eine positive Korrelation zwischen dem arteriellen Blutflussvolumen und der Spermakonzentration der Ejakulate. Die Autoren erklären sich dies mit einem gestörten Energiemetabolismus im mikrozirkulatorischen Gefäßsystem bei mangelhafter Blutversorgung des Hodens. So herrscht im Hodengewebe bereits unter physiologischen Bedingungen ein geringer Sauerstoffpartialdruck vor (Setchell and Maddocks, 1994; Zheng and Olive, 1997). Dies resultiert nach Sweeney et al. (1991) daraus, dass die A. testicularis im Rankenkonvolut stark geschlängelt ist und so ein hoher Gefäßwiderstand vorherrscht. Folglich sei der Blutdruck in den testikulären Kapillaren stark herabgesetzt. Ein Vorteil dieser sauerstoffarmen Umgebung könnte darin liegen, dass Schädigungen der Spermien durch Sauerstoffradikale vorgebeugt wird (Max, 1992; Setchell and Maddocks, 1994; Aitken, 1999). Lissbrant et al. (1997) sind der Ansicht, dass es jedoch bei einer weiteren Verringerung des Sauerstoffgehalts schnell zur Schädigung des Hodens kommt.

Eine weitere mögliche Ursache für testikuläre Fehlfunktionen sehen Collin et al. (1996 a, b) in der Überproduktion potenter Vasokonstriktoren wie Vasopressin, Serotonin und Endothelin-1.

In mehreren tierexperimentellen Studien wurde mittels kurzzeitig angelegter Ligaturen die Auswirkung einer verminderten testikulären Blutversorgung und anschließender Reperfusion auf das funktionelle Hodengewebe untersucht. Eine bis zu 60 minütige komplette Ligatur der A. testicularis bei Ratten führte zu keiner oder nur einer limitierten Schädigung des zur Spermatogenese befähigten Epithels (Oettle and Harrison, 1952; Steinberger and Tjioe, 1969; Tjioe and Steinberger, 1970). Eine 90 bis 120 minütige Ligatur bewirkte hingegen eine selektive Schädigung der Spermatogonien und der sich noch nicht in der Prophase der Meiose befindlichen Spermatozyten (Steinberger and Tjioe, 1969; Tjioe and Steinberger, 1970). Studien haben gezeigt, dass diese Zellschädigungen durch Apoptose hervorgerufen werden (Turner *et al.*, 1997), vorwiegend bedingt durch freie Radikale während der Reperfusions-Phase (Prillaman and Turner, 1997). Auch ein direkter Effekt der Hypoxie ist nach Bergh et al. (1988) in Betracht zu ziehen.

Markey et al. (1994/1995) untersuchten den Effekt einer moderaten ununterbrochenen Reduktion des testikulären Blutflusses bei Schafböcken, indem sie den Durchmesser der Samenstrangarterie mittels Ligatur für acht Wochen verkleinerten und dann den Hoden entnahmen und untersuchten. Sie stellten eine fokale Schädigung der Tubuli seminiferi und eine Entzündungsreaktion im Interstitium fest. Da die Autoren aber keine

Blutflussbestimmungen vornahmen, konnte keine Aussage getroffen werden, ab welchem Grad der Blutflussreduktion es zu degenerativen Veränderungen kommt. Dies versuchten Bergh et al. (2001) in ihren Studien an Ratten nachzuholen. Eine fünfständige Reduktion des Blutflusses um etwa 30 % des Ausgangswertes war ausreichend, um den Tod von Spermatogonien und frühen Spermatozyten-Stadien zu induzieren und zu einer Entzündungsreaktion in den intratestikulären Gefäßen zu führen. Die Autoren schließen daraus, dass bereits eine relativ geringe Reduktion des testikulären Blutflusses einen großen Einfluss auf die Spermienproduktion haben kann.

### **2.5 Einfluss von exogenen Hormonen auf den testikulären Blutfluss und den Plasmatestosteronspiegel**

Während es bisher keine Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen dem Einfluss von exogen zugeführten Hormonen und der Hodendurchblutung bei Pferden gibt, wurden zu dieser Fragestellung zahlreiche Studien an Labortieren und Schafen durchgeführt. Hierbei wurden vor allem die Effekte von luteinisierendem Hormon (LH), humanem Choriongonadotropin (hCG) und Östrogenen auf die testikuläre Durchblutung überprüft.

#### **2.5.1 Luteinisierendes Hormon (LH) bzw. humanes Choriongonadotropin (hCG)**

Widmark und Mitarbeiter (1989) untersuchten die Wirkung von exogen zugeführtem LH auf die testikuläre Durchblutung mittels Injektion radioaktiver Mikrosphären bei Ratten. Die Messungen erfolgten 2, 4, 6, bzw. 12 Stunden nach der subkutanen Verabreichung von 25 µg LH. Die Hodendurchblutung fiel zunächst deutlich ab und lag 6 Stunden nach der LH-Injektion nur noch bei 40 % derjenigen der Kontrollgruppe. Nach weiteren 6 Stunden war sie jedoch wieder deutlich angestiegen. Die LH behandelten Tiere wiesen zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrollgruppe doppelt so hohe Blutflusswerte auf. Die Autoren vermuten, dass der zunächst auftretende Abfall der Hodendurchblutung mit einem Anstieg des präkapillären Gefäßwiderstands zusammenhängt. Die Reduktion des Blutflusses führen sie auf eine Hemmung der Vasomotion und einen Anstieg in der Permeabilität der Venolen zurück, wodurch es zum Anstieg des prae- und postkapillären Widerstandes komme. Für den anschließend zu beobachtenden Anstieg des testikulären Blutflusses haben die Autoren jedoch keine Erklärung.

In der selben Studie überprüften Widmark et al. (1989) auch den Einfluss einer mit 2,5 µg deutlich niedrigen LH-Dosis auf den testikulären Blutfluss. Hier waren weder 6 noch 12 Stunden nach der LH-Injektion Auswirkungen auf den testikulären Blutfluss festzustellen.

Hinsichtlich des Plasmatestosteronspiegels war nach der Applikation der hohen LH-Dosis ein zweigipfliger Verlauf mit Maxima eine und sechs Stunden post applicationem zu verzeichnen. Zwölf Stunden nach der LH-Injektion konnten die Autoren dann keine Änderung mehr gegenüber dem Basiswert feststellen. Nach Verabreichung der niedrigen LH-Dosis ergab sich nur eine eingipflige Verlaufskurve mit einem Höhepunkt eine Stunde nach der Verabreichung (Widmark *et al.*, 1989). Die Autoren stufen die Testosteronantwort nach der niedrigen LH-Dosis als physiologisch ein, da sie ähnliche Werte wie bei endogenen LH-Anstiegen oder nach der Kopulation erreichte. Einen Zusammenhang zwischen den Testosteronwerten und der testikulären Durchblutung konnten die Autoren nicht herstellen.

Auch humanes Choriongonadotropin (hCG), das vor allem LH-Wirkung besitzt, wurde Ratten in einer Dosierung von 50 bis 200 IE subkutan injiziert, um mittels radioaktiver Mikrosphären dessen Wirkung auf die Hodendurchblutung zu untersuchen (Damber *et al.*, 1981; Setchell and Sharpe, 1981; Wang *et al.*, 1983; Wang *et al.*, 1984; Damber *et al.*, 1985; Damber *et al.*, 1987b; van Vliet *et al.*, 1988;). Es waren hierbei keine einheitlichen Ergebnisse zu verzeichnen. Wang et al. (1983/1984) stellten zwei Stunden post injectionem einen Blutflussabfall fest, der aber nicht signifikant war. Sechs Stunden post applicationem beobachteten van Vliet et al. (1988) einen Blutflussabfall um etwa ein Drittel. Damber et al. (1985) stellten acht Stunden nach der hCG-Injektion einen nicht signifikanten Anstieg gegenüber unbehandelten Kontrolltieren fest, wohingegen Setchell und Sharpe (1981) 12 Stunden post injectionem einen nicht signifikanten Durchblutungsabfall ermittelten. Im Gegensatz dazu konnten mehrere Studien übereinstimmend einen signifikant um das Zwei- bis Dreifache erhöhten Blutfluss 16 (Setchell and Sharpe, 1981) und 20 bis 24 Stunden (Damber *et al.*, 1981; Setchell and Sharpe, 1981; Damber *et al.*, 1985; Damber *et al.*, 1987b) nach der Verabreichung von hCG beobachten.

Der Plasmatestosteronspiegel war 2 (Wang *et al.*, 1983; Wang *et al.*, 1984), 8 (Damber *et al.*, 1985) bzw. 20 bis 24 Stunden (Damber *et al.*, 1981; Damber *et al.*, 1987b) nach der hCG-Applikation gegenüber unbehandelten Tieren um das Zwei- bis Fünffache angestiegen. Hierbei war, ähnlich wie nach der LH-Injektion, das Maximum zwei Stunden post applicationem zu verzeichnen.

Nach der Applikation von hCG konnte zudem eine Reihe weiterer Änderungen am testikulären Gefäßsystem festgestellt werden. So beobachteten Damber et al. (1986) zwei bis sechs Stunden nach der Behandlung eine Hemmung der Vasomotion, die sie auf eine Relaxation der präkapillären Sphinkter zurückführten. Die Autoren beobachteten außerdem eine entzündungsähnliche Reaktion, jedoch nur nach Verabreichung hoher hCG-Dosen.

Auclair et al. (1995 a, b) untersuchten den Einfluss von hCG auf die Hodendurchblutung bei Schafböcken. Sie injizierten eine hohe Dosis hCG intravenös (20 IE pro kg Körpergewicht) und bestimmten in den folgenden zwei Stunden in zehnminütigen Intervallen den testikulären Blutfluss. Sie konnten dabei keine Änderungen des Blutflusses feststellen, während die Testosteronspiegel um das Vierfache anstiegen.

### **2.5.2 Östrogene**

Damber et al. (1981) untersuchten bei Ratten den Einfluss von Östrogenen auf die testikuläre Durchblutung. Sie applizierten fünfmal in täglichen Abständen 50 µg Östradiol-17β und stellten 20 bis 24 Stunden nach der letzten Injektion keine Änderung des Blutflusses fest. Die Testosteron-Konzentration im Plasma fiel in dieser Zeit um etwa 60 % ab. Wurden die Östrogengaben mit einer anschließenden hCG-Injektion kombiniert, dann war die Wirkung von hCG vermindert, d.h. die Blutfluss- und Testosteron-Werte stiegen nicht so stark an, wie bei alleiniger hCG-Behandlung. Daehlin et al. (1985) machten vergleichbare Beobachtungen bei ähnlichen Untersuchungen an hypophysectomierten Ratten. Nach Widmark et al. (1987) beruht dieses Phänomen auf dem inhibitorischen Effekt der Östrogene auf die testikuläre Steroidsynthese. Östrogene verhindern die Entstehung von Testosteron zum einen direkt durch Hemmung der zur Steroidsynthese benötigten Enzyme (Bartke *et al.*, 1977; Moger, 1977; Melner and Abney, 1980; Moger, 1980; Damber *et al.*, 1983; Daehlin *et al.*, 1985) und zum anderen indirekt durch Unterdrückung der LH-Produktion (van Beurden *et al.*, 1977; Alder *et al.*, 1968).

### **2.5.3 Einfluss von humanem Choriongonadotropin (hCG) auf die testikuläre Steroidsynthese beim Pferd**

Humanes Choriongonadotropin (hCG) wird in der Pferdemedizin zur Diagnostik von Fertilitätsstörungen (Roser, 1995) bzw. bei Verdacht auf Kryptorchismus eingesetzt (Cox, 1975).



Die intravenöse Verabreichung von 6000 bzw. 10000 IE hCG führt primär zur Sekretion von Testosteron (Zwain *et al.*, 1989; Cox and Redhead, 1990). Nach hCG-Injektion erfolgte die Testosteron-Freisetzung biphasisch mit einer ersten Spitze in der ersten Stunde post injectionem (Cox *et al.*, 1973; Amann and Ganjam, 1981; Setchell and Cox, 1982; Roser, 1995) und einem zweiten Maximum nach zwei bis drei Tagen (Silberzahn *et al.*, 1988; Zwain *et al.*, 1989; Cox and Redhead, 1990; Roser, 1995). Danach fielen die Werte erst rapide und dann langsamer ab bis sie etwa am siebten Tag post injectionem wieder die Basiswerte erreicht hatten (Silberzahn *et al.*, 1988; Zwain *et al.*, 1989; Cox and Redhead, 1990; Roser, 1995).

Über einen vergleichbaren biphasischen Östrogen-Verlauf gibt es unterschiedliche Aussagen. Roser (1995) konnte im Gegensatz zu anderen Autoren (Ganjam and Kenney, 1975; Amann and Ganjam, 1981; Setchell and Cox, 1982) einen frühen Anstieg in den ersten Stunden post applicationem beobachten. Dagegen war in allen anderen Studien nur zwei Tage nach der Verabreichung von hCG ein Anstieg der Östrogenwerte auf das etwa Zwei- bis Dreifache der Ausgangswerte festzustellen (Silberzahn *et al.*, 1989; Zwain *et al.*, 1989; Roser, 1995). Die Werte fielen unmittelbar danach wieder ab und erreichten etwa am siebten Tag post injectionem die Ausgangswerte.

Nach Zwain *et al.* (1989) wird das freigesetzte Testosteron in den Leydig-Zellen zum Teil in Östrogen umgewandelt, wobei diese Reaktion durch die Zytochrom P<sub>450</sub> Aromatase katalysiert wird (Eisenhauer *et al.*, 1994). Die Autoren sehen die Ursache für den Östrogenanstieg in den ersten Tagen nach der hCG-Injektion darin, dass, bedingt durch den Testosteronanstieg, reichlich Substrat für die Östrogensynthese vorhanden ist. Weiter folgern sie, dass die Androgene erst nach dem Abfall der Östrogen-Werte ihre Höchstwerte erreichen, da sie nicht mehr durch die Aromatase umgewandelt werden können. Als Ursache für den Abfall des Östrogen-Spiegels diskutieren Zwain *et al.* (1989) eine verminderte Ansprechbarkeit der Aromatase-Rezeptoren.

Roser (1995) untersuchte den Effekt von hCG (10.000 IE) auf den Steroidhormonspiegel bei fertilen, subfertilen und infertilen Hengsten. Sie definierte Hengste als fertil, die eine Konzeptionsrate von mehr als 75 % aufwiesen, als subfertil wurden Tiere mit einer Konzeptionsrate unter 10% eingestuft, während Hengste mit fehlendem Befruchtungsvermögen als infertil bezeichnet wurden.

Nur bei den fertilen und subfertilen Hengsten stiegen die Testosteron- und Östrogen-Spiegel an, während sich die Werte bei infertilen Hengste nicht erhöhten. Der ausbleibende

Testosteronanstieg bei infertilen Hengsten deutet nach Auffassung der Autorin auf eine Störung in der Funktion der Leydig-Zellen hin. Ihrer Meinung nach könnten geschädigte Rezeptoren, abnormale Signalübertragung oder defekte Transskriptions- oder Translations-Prozesse die Ursache dafür sein. Die niedrigen Testosteronwerte sind nach Meinung der Autorin wahrscheinlich auch die Ursache für den fehlenden Anstieg der Östrogen-Werte, aber auch einen Defekt der Aromatase schließt sie nicht aus.

### **2.6 Stickstoffmonoxid (NO)**

Stickstoffmonoxid (NO) ist wegen seiner vielfältigen Wirkungen in verschiedenen Organsystemen das Molekül, welches die meisten biologischen Funktionen im Organismus beeinflusst (Morris *et al.*, 1996).

NO wird durch die NO-Synthase (NOS) mit Hilfe von Co-Faktoren aus der Aminosäure L-Arginin gebildet (Palmer *et al.*, 1988; Rosselli *et al.*, 1998; Dixit and Parvizi, 2001).

Die NO-Synthase (NOS) kommt in verschiedenen Isoformen vor. In Gehirn und Nervenzellen findet man eine neuronale NOS (nNOS), während in Gefäßendothelien eine endotheliale NOS (eNOS) existiert. Diese beiden Formen werden auch zusammengefasst als constitutive NOS (cNOS) bezeichnet, da sie beide für eine kontinuierliche basale NO-Freisetzung sorgen. Ihre Aktivität hängt von der Calciumkonzentration in der Zelle ab (Griffith and Stuehr, 1995; Snyder, 1995). Eine dritte nachgewiesene Isoform ist calciumunabhängig und induzierbar (iNOS), d.h. sie wird als Antwort auf verschiedene Stimuli ausgebildet, wie sie die im Rahmen von Entzündungen synthetisierten Zytokine und bakteriellen Lipopolysaccharide darstellen (Nussler and Billiar, 1993; Morris and Billiar, 1994).

Genauere Ausführungen zur Stickstoffmonoxid-Synthese und -Wirkungsweise finden sich in den Dissertationen von Rohr (2002) und Schmauder (2003). Im Folgenden wird nur auf das Vorkommen und die Effekte von Stickstoffmonoxid am Hoden eingegangen.

#### **2.6.1 Vorkommen im Hodengewebe**

Isoformen der NO-Synthase wurden in den Leydig- und Sertoli-Zellen, der peritubulären Lamina propria, sowie in den Endothel- und glatten Muskelzellen der testikulären Blutgefäße beim Menschen nachgewiesen (Middendorff *et al.*, 1997). Rosselli *et al.* (1998) vermuten,

dass Stickstoffmonoxid sowohl an der Spermatogenese und Steroidbildung, als auch an der Regulation der Hodendurchblutung beteiligt ist.

### **2.6.2 Bedeutung von Stickstoffmonoxid bei der Regulation des testikulären Blutflusses**

Stickstoffmonoxid ist ein bedeutender endogener Vasodilatator, welcher kontinuierlich vom Endothel freigesetzt wird (Moncada *et al.*, 1991; Inagami *et al.*, 1995). So wurde nach Hemmung der NO-Synthase in den meisten Gefäßsystemen eine beachtliche Vasokonstriktion und folglich ein Blutflussabfall beobachtet. Der Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Hodendurchblutung ist hingegen noch nicht vollständig geklärt. Battaglia *et al.* (2000) untersuchten bei fertilen Männern und bei Patienten mit Oligo- bzw. Azoospermie die testikuläre Durchblutung und bestimmten indirekt über die Nitrit- bzw. Nitratkonzentration den NO-Gehalt im Seminalplasma. Dabei zeigte sich, dass Männer mit Fertilitätsstörungen einen höheren testikulären Gefäßwiderstand und geringere Nitrit- und Nitratspiegel im Sperma aufwiesen als fertile Männer. Es bestand ein positiver Zusammenhang zwischen der Hodendurchblutung und den Nitrit-/Nitratspiegeln im Seminalplasma. Die Autoren stellen die Hypothese auf, dass Stickstoffmonoxid die Verteilung von Hormonen und Nährstoffen über die testikulären Hodengefäße reguliert. Weiter folgern sie, dass NO durch die Beeinflussung der Permeabilität der Lamina propria den Hormon- und Nährstofftransport ins tubuläre Lumen fördert und so die Spermienproduktion und -funktion moduliert (Battaglia *et al.*, 2000).

Lissbrant *et al.* (1997) untersuchten den Einfluss von NO-Synthase-Inhibitoren auf den testikulären Blutfluss bei Ratten. Ihre Studie ergab, dass, im Gegensatz zu anderen Organen, Stickstoffmonoxid bei der Regulation des basalen testikulären Blutflusses nur eine untergeordnete Rolle spielte. Die Beobachtungen, dass im Hoden von Menschen und Ratten nur geringe NOS-Aktivitäten ermittelt wurden (Ehren *et al.*, 1994; Burnett *et al.*, 1995), bestätigt die Autoren in ihrer Vermutung. Nach der Verabreichung von hCG stellten Lissbrant *et al.* (1997) hingegen einen Anstieg der NOS-Aktivität fest, so dass Stickstoffmonoxid unter diesen Bedingungen eine Rolle beim Anstieg des testikulären Blutflusses spielen könnte.

Im Gegensatz dazu stellten Huang *et al.* (1994), die an Ratten die Wirkung des NOS-Inhibitors N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin-methyl-ester (L-NAME) auf den Blutfluss in mehreren peripheren Organen, unter anderem auch im Hoden überprüften, mit Hilfe von injizierten Mikrosphären einen Abfall der Hodendurchblutung und zudem einen Anstieg des Blutdruckes

fest. Sie erklären dies mit der durch Unterdrückung der NO-Freisetzung im Endothel verbundenen Vasokonstriktion in der Peripherie, die über den Anstieg des peripheren Gefäßwiderstandes zum Anstieg des Blutdruckes führt.

Den Einfluss von L-NAME auf den testikulären Blutfluss unter pathologischen Umständen erforschten Sharma et al. (1998) an einem Sepsismodel bei Ratten. Vierundzwanzig Stunden nachdem den Ratten operativ eine Peritonitis zugefügt worden war, bekamen sie L-NAME verabreicht. Der testikuläre Blutfluss stieg bis zur L-NAME-Injektion an und fiel danach wieder ab. Daraus schließen die Autoren, dass der Anstieg in der Hodendurchblutung während einer Sepsis zumindest teilweise durch endogenes Stickstoffmonoxid ausgelöst wird.

Barlas und Hatiboglu (2002) untersuchten nach einer dreißigminütigen Hodentorsion bei Ratten den Einfluss des NO-Donors L-Arginin und des NOS-Inhibitors L-NAME auf die Hodendurchblutung. Bei den mit L-Arginin behandelten Tieren kam es zu einer verbesserten Wiederdurchblutung und geringeren Gewebeschädigung als bei den Tieren, denen L-NAME appliziert worden war.

### **2.6.3 Vorkommen in den Spermien**

Isoformen des Enzyms NO-Synthase wurden erstmals 1996 bei Spermien des Menschen (Lewis *et al.*, 1996) und der Maus (Herrero *et al.*, 1996a) nachgewiesen. Während NOS bei der Maus am Akrosom und am Schwanz der Spermien gefunden wurde, war sie beim Mann nur am Kopf der Spermien im Bereich des postakrosomalen und äquatorialen Segments lokalisiert. Lewis et al. (1996) fanden bei Patienten mit Asthenozoospermie weniger NOS als bei fertilen Männern und auch Battaglia et al. (2000) ermittelten im Seminalplasma von Patienten mit einer Oligo- oder Azoospermie geringere NO-Werte als bei Männern mit einer Normospermie.

### **2.6.4 Bedeutung von Stickstoffmonoxid für die Funktion der Spermien**

Um die Befruchtung der weiblichen Eizelle zu ermöglichen, müssen die Spermien verschiedene Funktionen erfüllen. Stickstoffmonoxid spielt nach Herrero und Gagnon (2001) bei den meisten dieser Prozesse eine wichtige Rolle. So zeigte sich in mehreren Studien, dass die Zugabe von NO-Donoren zu Spermien die Motilität der Spermien sowohl fördern (Hellstrom *et al.*, 1994; Creech *et al.*, 1998; Yeoman *et al.*, 1998) als auch hemmen

(McKinney *et al.*, 1995; Weinberg *et al.*, 1995) kann. Nach Herrero und Gagnon (2001) sind diese widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse auf die unterschiedlichen NO-Konzentrationen, die in den verschiedenen Versuchen verwendet wurden, zurückzuführen. Ihrer Ansicht nach stimulieren niedrige NO-Spiegel die Motilität der Spermien, wohingegen sie durch hohe gehemmt wird. Eine Erklärung hierfür sehen die Autoren in dem von Schaad *et al.* (1996) im Seminalplasma des Mannes gefundenen nicht kompetitiven Inhibitor der nNOS. Sie vermuten, dass dieser die NO-Konzentration auf einem niedrigen Niveau hält und so eine toxische Schädigung der Spermien verhindert. Diese Hypothese wurde durch Studien bestätigt, in denen durch Zugabe von NOS-Inhibitoren die Motilität der Spermien von infertilen Männern mit hohen NO-Spiegeln verbessert werden konnte (Rosselli *et al.*, 1995; Nobunaga *et al.*, 1996). Die Infertilität solcher Patienten erklären Herrero und Gagnon (2001) damit, dass erhöhte NO-Konzentrationen zu einer spontanen Hyperaktivität der Spermien führen, welche den Spermientransport durch den weiblichen Genitaltrakt beeinträchtigt oder zu einer unvollständigen Kapazitation führt.

Eine Beteiligung von Stickstoffmonoxid an der Kapazitation stellten mehrere Autoren nach Inkubation von Spermien mit NO freisetzenden Substanzen fest (Zini *et al.*, 1995; Herrero *et al.*, 1999;). Es kam zu einem Anstieg der Zahl der Spermien mit abgelaufener Kapazitation. Zudem beobachteten Herrero *et al.* (2000), dass Stickstoffmonoxid durch Interaktion mit cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) eine wichtige Rolle bei der Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen während der Kapazitation spielt.

Stickstoffmonoxid ist auch bei der Induktion der Akrosomenreaktion beteiligt (Zamir *et al.*, 1995; Herrero *et al.*, 1997; Revelli *et al.*, 1999; Kuo *et al.*, 2000; Revelli *et al.*, 2001). So stellten Kuo *et al.* (2000) an Spermien vom Seeigel fest, dass verschiedene Induktoren der Akrosomenreaktion zu einem Anstieg der NO-Spiegel im Sperma führten. Beim Menschen zeigte sich, dass durch NO-Donoren die Akrosomenreaktion dosisabhängig stimuliert werden konnte, während Hämoglobin, ein NOS-Inhibitor, diese hemmte (Revelli *et al.*, 1999). Auch bei der Maus wurden ähnliche Beobachtungen gemacht, wobei hier auffiel, dass bei höheren Konzentrationen an NO-Donoren die Akrosomenreaktion ausblieb (Herrero *et al.*, 1997). Dieses Ergebnis ist nach Herrero und Gagnon (2001) nicht überraschend und deutet ihrer Ansicht nach darauf hin, dass hohe NO-Konzentrationen aufgrund der dadurch induzierten Bildung von oxidativ wirkenden Substanzen toxisch wirken.

Noch nicht eindeutig geklärt ist die Bedeutung von Stickstoffmonoxid bei der Bindung der Spermien an die Oozyten (Sengoku *et al.*, 1998; Francavilla *et al.*, 2000). Francavilla *et*

al. (2000) konnten durch verschiedene Konzentrationen eines NOS-Inhibitors die Zahl der an die Zona pellucida gebundenen humanen Spermien nicht beeinflussen. Dagegen waren Sengoku et al. (1998) in der Lage, durch Zugabe niedriger Konzentrationen eines NO-Donors zum Kapazitationsmedium die Zahl der an der Hemizona gebundenen humanen Spermien zu erhöhen. Ähnlich Ergebnisse erhielten auch Kodama et al. (1996), nachdem sie ein geringgradig oxidativ wirkendes Milieu im Inkubationsmedium schafften. Aus diesen Beobachtungen folgern Herrero und Gagnon (2001), dass Modifikationen der Spermamembran, induziert durch eine begrenzte Lipidperoxidation bzw. durch niedrige NO-Konzentrationen, die Membranfluidität ändern und dadurch die Zona-Bindung fördern können.

Die Fusion zwischen weiblichen und männlichen Gameten konnten Francavilla et al. (2000) durch die Zugabe eines NO-Inhibitors hemmen. In einer anderen Studie hatte sich gezeigt, dass bei einer Vorbehandlung der Oozyten mit einem NOS-Inhibitor der relative Anteil an Pronuklei um 80% abnahm (Herrero *et al.*, 1996b). Schließlich konnten Kuo et al. (2000) Eizellen von Seeigeln durch die Mikroinjektion von NO-Donoren oder rekombinierten NOS aktivieren. Die Autoren folgern daraus, dass das von den Spermien gebildete Stickstoffmonoxid für die Aktivierung der Eizellen nötig ist.

### **2.6.5 Der Stickstoffmonoxid-Donor Molsidomin: Eigenschaften und Pharmakokinetik**

NO-Donoren sind pharmakologisch aktive Substanzen, welche Stickstoffmonoxid freisetzen (Yamamoto *et al.*, 1997). Die Aminosäure L-Arginin ist die einzige auch physiologischerweise vorkommende Substanz, aus der mit Hilfe von NO-Synthasen Stickstoffmonoxid hergestellt wird (Rosselli *et al.*, 1998). Daneben gibt es auch eine Reihe von Substanzen wie z.B. Molsidomin, die nach ihrer Metabolisierung im Organismus NO freisetzen (Yamamoto *et al.*, 1997). So wird Molsidomin (N-Ethoxycarbonyl-3-morpholino-sydnonimin) in der Leber enzymatisch in seinen aktiven Metaboliten 3-morpholino-sydnonimin (SIN-1) und die N-Ethoxycarbonyl-Gruppe gespalten (Noack and Feelisch, 1989). Im Gegensatz zu ähnlich wirkenden NO-Donoren, wie z.B. organischen Nitraten, wird aus SIN-1 direkt Stickstoffmonoxid abgespalten. Daher ist Molsidomin aktiver als vergleichbare Vasodilatoren. Die organischen Nitrite und Nitrate stimulieren die lösliche Guanylatcyclase erst nach Bildung von S-Nitrosothiolen. Dieser Umweg ist vermutlich auch der Grund für die im Gegensatz zu Molsidomin auftretenden Toleranz. Organische Nitrate können bei Langzeittherapien plötzlich uneffektiv werden. Molsidomin ist somit den

organischen Nitraten durch seine höhere Aktivität, etwas längere Wirkungsdauer und der Tatsache, dass so gut wie keine Toleranzen auftreten, überlegen. Da Molsidomin Stickstoffmonoxid unabhängig von der Anwesenheit eines intakten Endothels freisetzt, wird es bei durch Gefäßschädigungen bedingten NO-Mangelsituationen eingesetzt, um einer Vasokonstriktion vorzubeugen (Karow, 2000). In der Humanmedizin ist dies besonders bei der Behandlung von Zuständen, die mit einer unzureichenden Sauerstoffversorgung des Herzmuskels einhergehen, der Fall (Koronartherapeutikum).

### **2.6.6 FertilAid-for-Stallions™**

Das bereits erwähnte Ergänzungsfuttermittel FertilAid-for-Stallions™ wurde dazu entwickelt, die Fertilität von Hengsten zu unterstützen. Bisher sind keine Studien über die Wirkung von FertilAid-for-Stallions™ bei Hengsten bekannt.

Als wesentlichen Bestandteil enthält es neben dem NO-Donor L-Arginin (siehe vorherige Kapitel) eine Reihe weiterer Stoffe wie L-Carnitin, Spurenelemente und Vitamine, die bei Mangelzuständen einen Einfluss auf die Fertilität von Hengsten haben können.

Weitere Bestandteile sind die Aminosäuren Histidin, Glutaminsäure, N-Acetyl-L-Cysteine und 3-Methyl-Glycin, die Mineralstoffe Bor, Chrom und Magnesium, das Arzneikraut Gokshura, das Tang- u. Algenprodukt Kelp, sowie Ingwer, Zimt und Zucker.

#### **2.6.6.1 L-Carnitin**

Nach Wiesner (2000) ist L-Carnitin ein Co-Faktor, der beim Transport des für die  $\beta$ -Oxidation wichtigen Acyl-CoA in den Matrix-Raum der Mitochondrien eine wichtige Rolle spielt und so dem Schutz von Zellmembranen dient.

Im Nebenhoden des Menschen wurden hohe L-Carnitin-Konzentrationen festgestellt (Hildebrandt, 1994), die nach Auffassung mehrerer Autoren eine wichtige Rolle bei der Reifung und für die Motilität der Spermien spielen, sowie für die Fertilität entscheidend sind (Lenzi *et al.*, 1992; Jeulin and Lewin, 1996; Xuan *et al.*, 2003). Während ihrer Wanderung vom Kopf zum Schwanz des Nebenhodens nehmen die Spermatozoen fortwährend L-Carnitin auf. Nach Zeyner und Harmeyer (1999) scheint exogen zugeführtes L-Carnitin einen positiven Einfluss auf die Vorwärtsbeweglichkeit bei Patienten mit verminderter Spermaqualität zu haben.

Herfen et al. (1997) untersuchten den Einfluss einer sechs monatigen L-Carnitin-Behandlung bei fünf Hengsten mit verminderter Spermaqualität. Sie verabreichten den Hengsten zweimal täglich 6g L-Carnitin mit dem Futter und stellten eine Verbesserung der Motilität der Spermien bei den behandelten Hengsten gegenüber unbehandelten Kontrolltieren fest.

Stradaoli et al. (2000) bestimmten den Gehalt an L-Carnitin und Acetylcarnitin im Sperma von Hengsten mit unterschiedlicher Spermaqualität. Sie fanden eine positive Korrelation zwischen L-Carnitin und Acetylcarnitin und der Spermienkonzentration. Zudem stieg mit zunehmendem Acetylcarnitingehalt der Spermien die Zahl der vorwärtsbeweglichen und morphologisch unauffälligen Spermien an.

### **2.6.6.2 Spurenelemente**

FertilAid-for-Stallions™ enthält zudem die Spurenelemente Zinkoxid, Selen-Methionin, Kupferoxid, Aminosäure-Molybdän-Chelat und Mangansulfat, die bei Mangelsituationen eine Auswirkung auf die Fertilität haben (Leonhard-Marek, 2002).

Der essentielle Charakter vieler Spurenelemente erklärt sich nach Leonhardt-Marek (2002) aus ihrer Bedeutung für die Funktion von Enzymen und anderen Proteinen. Mängel an Spurenelementen manifestieren sich nach Auffassung des Autors zuerst in gestörter Fruchtbarkeit, bevor andere Symptome apparent werden. So scheinen Spurenelemente unter anderem eine wichtige Rolle bei der Spermienreifung (Zn, Se), Kapazitation (Zn) und dem Schutz vor Oxidation (Se, Cu) zu spielen.

### **2.6.6.3 Vitamine**

Bei den in FertilAid-for-Stallions™ enthaltenen Vitaminen gehören Thiamin, Panthothensäure, Pyridoxin, Folsäure, und Nicotinsäureamid der Gruppe der B-Vitamine an. Zudem enthält es Ascorbinsäure,  $\alpha$ -Tocopherol und Biotin. Die meisten Vitamine sind Bestandteile von Koenzymen und somit auch für die Funktionen im männlichen Genitaltrakt entscheidend (Hildebrandt, 1998).



### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Tiere

Die Untersuchungen wurden an 27 Hengsten der Rasse Hannoversches Warmblut und 3 Vollbluthengsten des Niedersächsischen Landgestüts Celle durchgeführt.

Die 18 Hengste des so genannten NO-Donoren-Versuchs waren im Zeitraum von Oktober 2002 bis Februar 2003 in der Hengstprüfungsanstalt Adelheidsdorf aufgestellt.

Die 12 Hengste des hCG-Versuchs befanden sich von Juli bis August 2003 im Niedersächsischen Landgestüt in Celle.

Die Hengste wurden in Einzelboxen auf Stroheinstreu gehalten und erhielten um 7, 12 und 17 Uhr ihre rationierte Futtermischung, welche aus Heu, Hafer und Kraftfutter bestand. Alle Tiere waren im Untersuchungszeitraum klinisch gesund.

#### 3.2 Versuchsdurchführung

##### 3.2.1 Überprüfung des Einflusses von FertilAid-for-Stallions<sup>TM</sup> und des Stickstoffmonoxid-Donors Molsidomin auf den testikulären Blutfluss und die Spermaqualität

Im NO-Donoren-Versuch wurden 18 Hengste unabhängig von der Spermaqualität bzw. Fertilität in drei gleichgroße Gruppen etwa gleichaltriger Hengste eingeteilt. Bei einem Durchschnitt von  $7,7 \pm 1,0$  Jahren ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ) variierte das Alter dieser Tiere zwischen 3,5 und 17,5 Jahren. Alle Hengste waren erfolgreich in der Zucht eingesetzt worden und zeigten keine Fertilitätsstörungen. Die Hengste wurden während des gesamten Untersuchungszeitraums dreimal wöchentlich in Abständen von 2 bis 3 Tagen desaminiert. Im Januar wurden jedoch das Sperma einiger Hengste aufgrund der beginnenden Besamungssaison häufiger, d.h. teilweise täglich gewonnen.

Während der Vorbehandlungsperiode, die vom 28.10.2002 bis 01.12.2002 dauerte, erhielten die Hengste der FertilAid-, Molsidomin- und Kontrollgruppe ihre normale Futtermischung.

Während der vom 02.12.2002 bis 24.01.2003 dauernden Behandlungsperiode bekamen die Hengste der FertilAid-Gruppe um 9 und 15 Uhr FertilAid-for-Stallions<sup>TM</sup> (Fa. Total Health Enhancement Inc., USA) oral verabreicht. FertilAid-for-Stallions<sup>TM</sup> ist ein

Ergänzungsfuttermittel, welches als wesentlichen Bestandteil den Stickstoffmonoxid-Donor L-Arginin enthält. Gemäß der Beschreibung des Herstellers wurde den sechs Hengsten in den ersten zehn Tagen die doppelte Ration, also zweimal 71 g pro Hengst und Tag appliziert. Nach Ablauf der ersten zehn Tage erhielten die Probanden morgens und abends jeweils 35,5 g verabreicht. Vor der Applikation wurde das Pulver abgewogen, in eine 100 ml Spritze verbracht und diese mit Wasser aufgefüllt. Die Spritze wurde in die Bocktasche der Hengste geschoben und der Inhalt langsam ins Maul gespritzt.

Die Hengste der Molsidomin-Gruppe bekamen um 9 und 15 Uhr jeweils 8 g des NO-Donors Molsidomin (Molsidomin retard-ratiopharm® 8) in Tablettenform oral verabreicht. Die Dosis wurde durch Vorversuche, in denen die Pulsfrequenz der *A. facialis* bei ansteigender Dosierung des Medikaments manuell gemessen wurde, ermittelt. Bei der in der vorliegenden Studie angewandten Dosis war ein Abfall der Pulsfrequenz feststellbar. Die Tablette wurde den Hengsten zusammen mit etwas Hafer gegeben.

Die Hengste der Kontrollgruppe wurden keiner Medikation unterzogen, sie bekamen stattdessen nur etwas Hafer.

Um die Spermaqualität der Hengste näher zu bestimmen, wurde das Sperma nach den in Kapitel 3.4 beschriebenen Methoden analysiert.

Bei den mit konventionellen Methoden ermittelten Spermaparametern dienten die Untersuchungen der letzten zwei Wochen vor Behandlungsbeginn (Woche -2 und -1) als Ausgangswerte. Aus organisatorischen Gründen konnten in der darauf folgenden achtwöchigen Behandlungsperiode die Hengste in den Untersuchungswochen 4 und 5 nicht regelmäßig deseminieren werden, weshalb die Spermadaten dieser Wochen nicht ausgewertet wurden. Die Werte der 8 Untersuchungswochen wurden zu den Zeitpunkten 1, 2 und 3 zusammengefasst. Zeitpunkt 1 stellte den Mittelwert der Wochen -2 und -1 dar und spiegelte die Ausgangswerte wider. Der Mittelwert der Spermaparameter der Wochen 1, 2 und 3 wurden als Zeitpunkt 2 definiert. Es wurden somit die Spermien erfasst, welche sich zu Versuchsbeginn in der Spermiogenese befanden. Der Zeitpunkt 3 umfasst die Mittelwerte der Spermaparameter der Wochen 6, 7 und 8 und repräsentiert so die Qualität der Spermien, die sich zu Beginn der Fütterung in der Spermatozytogenese befunden haben.

Bei den mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelten Spermaparametern (s. Kapitel 3.4.2) wurde jeweils eine Probe der Untersuchungswochen -2, 2 und 8 untersucht.

Die Hodendurchblutung der Hengste aller Gruppen wurde mit Hilfe der Farbdopplersonographie zu 4 verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Einmal in der vorletzten und letzten Woche vor Beginn der Behandlung (Woche -2 bzw. -1) und jeweils einmal in der

zweiten und 8. Woche nach Behandlungsbeginn (s. Kapitel 3.3). Aus den beiden Untersuchungen vor Behandlungsbeginn wurde der Mittelwerte gebildet und als Zeitpunkt 1 bezeichnet. Die anderen beiden Untersuchungen wurden als Zeitpunkt 2 und 3 definiert.

### 3.2.2 Überprüfung des Einflusses von humanem Choriongonadotropin (hCG) auf den testikulären Blutfluss und die Steroidhormonkonzentrationen im Blutplasma

In diesem Versuch wurden 12 Hengste so in zwei Gruppen aufgeteilt, dass in jeder Gruppe etwa gleichaltrige Hengste waren. Ihr Durchschnittsalter betrug  $12,6 \pm 1,1$  Jahre ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) und variierte zwischen 7 und 20 Jahren. Aufgrund der endenden Decksaison wurden diese Tiere nur noch vereinzelt in unregelmäßigen Abständen zur Samengewinnung herangezogen. Während der siebentägigen Untersuchungsperiode wurde das Sperma der Versuchshengste nicht oder bis zu drei mal ( $\bar{x} \pm s\bar{x} = 1,17 \pm 0,35$ ) gewonnen. Die Fruchtbarkeit der Hengste wurde anhand des Mittelwerts ihrer Fertilitätsdaten der Jahre 1997 bis 2002 beurteilt. Als Fertilitätsparameter dienten die Frühgraviditätsrate pro Zyklus, das heißt die Trächtigkeitsrate pro Rosse ohne Berücksichtigung der embryonalen Verluste und die Abfohrate pro Zyklus in Prozent. Von den 8 Hengsten, denen humanes Choriongonadotropin (hCG) verabreicht wurde, wurden 4 als fertil und 4 als subfertil klassifiziert. Die 4 Hengste, denen nur das Lösungsmittel als Placebo intravenös verabreicht wurde, gehörten der Kontrollgruppe an. Sie wiesen im Vergleich zu den mit hCG behandelten Hengsten durchschnittliche Fertilitätsdaten auf.

Bei allen 12 Hengsten wurde im Zeitraum vom 19.07.2003 bis 06.08.2003 in regelmäßigen Abständen der Blutfluss der Arteria testicularis mit Hilfe der Farbdopplersonographie ermittelt. Die Untersuchungen erfolgten kurz vor der Injektion (Zeitpunkt 0) sowie 1, 3, 6, 12, 24, 72, 120 und 168 Stunden nachher. Die Studien begannen bei allen Hengsten um 9:00 Uhr. Vor jeder Untersuchung wurde eine Blutprobe aus der V. jugularis entnommen und eingefroren, um später hinsichtlich ihres Gehalts an Gesamtöstrogenen und Testosteron analysiert zu werden (s. Kapitel 3.5). Im Anschluss an die erste Untersuchung wurden den Hengsten der hCG-Gruppe 5000 IE hCG (Ovogest<sup>®</sup> 5000, Fa. Intervet) intravenös verabreicht. Hierfür wurde, wie vom Hersteller vorgesehen, der als Trockensubstanz gekühlt und lichtgeschützt gelagerte Wirkstoff in einem vom Hersteller mitgelieferten wässrigem Lösungsmittel aufgelöst und dann sofort in die Vena jugularis

injiziert. Die Hengste der Kontrollgruppe erhielten nur das Lösungsmittel intravenös verabreicht.

### **3.3 Sonographische Untersuchungen**

Die Ultraschalluntersuchungen fanden in einem ruhigen Teil des Stalls, in dem keine anderen Tiere standen, statt. Ein Zwangsstand wurde nicht verwendet. Auf eine medikamentelle Ruhigstellung wurde ebenso wie auf eine Nasenbremse oder Scheuklappen verzichtet. Die Versuchshengste wurden von einer Hilfsperson mit Hilfe einer Trense gehalten.

#### **3.3.1 Geräte und Sonden**

Alle sonographischen Untersuchungen wurden mit dem Ultraschallsystem Eccocee CX der Firma Toshiba (Tokio, Japan) durchgeführt. Als Sonde diente eine 7,0 MHz Mikrokonvexsonde.

Die farbdopplersonographischen Blutflussmessungen erfolgten hierbei im PW-Modus bei einem Hochpassfilter von 50 Hz. Zur Aufzeichnung der Befunde dienten ein SVHS-Videorekorder (Panasonic<sup>®</sup> AGMD 835 Matsushita Electric, Osaka, Japan) und VHS-Videokassetten (EMTEC<sup>®</sup> EQ 240).

#### **3.3.2 Farbdopplersonographische Darstellung der A. testicularis**

Die dopplersonographischen Blutflussmessungen der A. testicularis dextra und sinistra erfolgten im lateromedialen Strahlengang (Abb. 3.1). Die Sonde wurde zu diesem Zweck auf etwa halber Höhe zwischen Leistenring und Margo epididymalis des Hodens am Samenstrang so positioniert, dass die verschiedenen Anschnitte des Pars convoluta der A. testicularis aufgefunden werden konnten. Die Dopplerfrequenzverschiebungen während des Herzzyklus wurden auf Videoband aufgezeichnet.



Abb. 3.1: Dopplersonographische Blutflussmessung der A. testicularis sinistra im lateromedialen Strahlengang.

### 3.3.3 Auswertung der Pulswellen

Die auf Videokassette aufgezeichneten Dopplerfrequenzverschiebungen wurden mit Hilfe eines Bildanalyseprogramms (NIH-Image, Version 1.60, U.S. National Institute of Health, 1996) an einem Macintosh-Computer nach dem von Bühlmeier (1999) beschriebenen Verfahren ausgewertet.

Von jeder Messung wurden hierzu zwei gleichförmige, konsekutive Dopplerwellen mit maximaler Amplitude ausgewählt, wobei darauf geachtet wurde, dass der Winkel  $\alpha$  zwischen Dopplerstrahl und Blutflussrichtung zwischen 20 und 60 Grad betrug (Abb. 3.2).

Neben dem Winkel  $\alpha$  wurden zudem die maximale systolische Frequenzverschiebung (S), die minimale diastolische Frequenzverschiebung (Min), die enddiastolische Frequenzverschiebung (D) sowie die mittlere Frequenzverschiebung über dem Herzzyklus (Mean) bestimmt (Abb. 3.2). Für letztere Bestimmung wurde eine Hüllkurve um die Dopplerpulswelle gelegt und das Integral unter der Kurve berechnet.

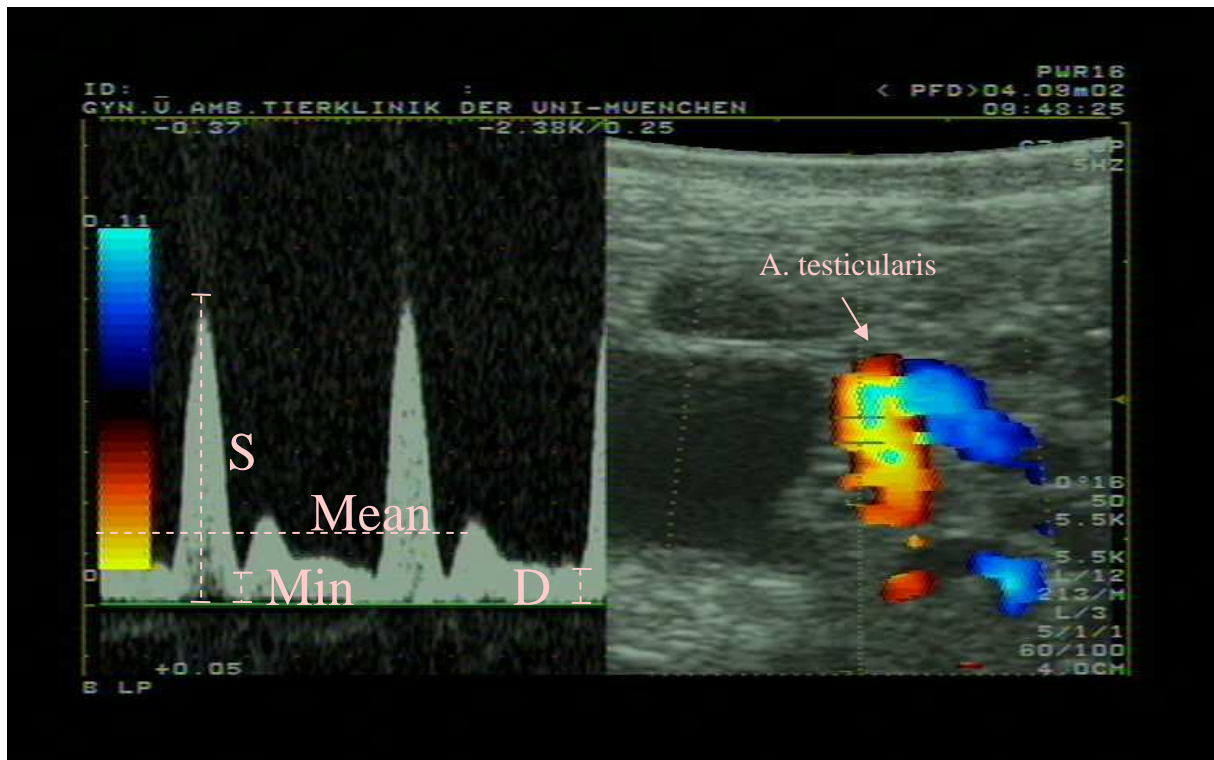


Abb. 3.2: Dopplersonographische Darstellung des Blutflusses der A. testicularis. Linke Bildhälfte: Dopplerwelle mit maximaler systolischer (S), enddiastolischer (D), minimaler (Min) und mittlerer (Mean) Frequenzverschiebung während des Herzzyklus. Rechte Bildhälfte: A. testicularis.

Es wurden ferner im B-Modus Aufnahmen von Querschnitten der A. testicularis angefertigt, um die Gefäßquerschnittsfläche an der Messlokalisation zu bestimmen.

Alle Messwerte wurden zur weiteren Bearbeitung in eine Tabelle des Programms Stat View 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, 1998) übertragen. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Geräteeinstellung ergab die Multiplikation des Kosinus des gemessenen Winkels mit der mittleren Frequenzverschiebungen die mittlere Blutflussgeschwindigkeit über dem Herzzyklus (TAMV = Time Averaged Maximum Velocity).

Zur Betrachtung des Blutflusswiderstandes im Versorgungsgebiet der A. testicularis wurden gemäß den in Kapitel 2.2.2.3 beschriebenen Formeln die Dopplerindices Pulsatility Index (PI) und Resistance Index (RI) für zwei aufeinanderfolgende Blutflusskurven berechnet und daraus der Mittelwert gebildet. Aus der mittleren Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) und der jeweiligen Gefäßquerschnittsfläche wurde zudem das Blutflussvolumen (BFV) pro Zeiteinheit kalkuliert.

### **3.4 Samenbeurteilung**

Die Ejakulate der Hengste des ersten Versuchs wurden nach der von Klug und Sieme (2003) beschriebenen Methode mittels einer künstlichen Scheide (Modell Hannover) gewonnen; anschließend wurden die mit konventionellen Methoden ermittelbaren Spermaparameter bestimmt (s. Kapitel 3.4.2.1). Darauf folgend wurden die Ejakulate nach der bei Krienke (2003) beschriebenen Methode aufbereitet, in Pailletten abgefüllt und nach dem von Klug und Sieme (2003) beschriebenen Verfahren kryokonserviert und in flüssigem Stickstoff (-196°C) bis zur Durchführung der Versuche gelagert.

#### **3.4.1 Spermabeurteilung mittels konventioneller Methoden**

Unmittelbar nach der Gewinnung wurden die Ejakulate der Hengste hinsichtlich des Ejakulatvolumens, der Samenzeldichte (photometrisch mit dem SpermaCue, Fa. Minitüb, Landshut) und mikroskopisch bezüglich der Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien beurteilt (Klug and Sieme, 2003). Die Spermengesamtzahl wurde aus dem Ejakulatvolumen und der Samenzeldichte errechnet. Aus den Daten der drei Untersuchungstage einer Woche wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

#### **3.4.2 Spermabeurteilung mittels Durchflusszytometrie**

Die Durchführung der durchflusszytometrischen Assays erfolgte an aufgetauten Proben kryokonservierten Spermas.

Vor den durchflusszytometrischen Analysen wurden die kryokonservierten Pailletten 30 Sekunden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und mit TALP-Medium auf eine Endkonzentration von  $1 \times 10^6$  Spermien/ml eingestellt.

Zur Bestimmung der Membranintegrität und des akrosomalen Status wurden die Proben mit SYTO<sup>®</sup>17, FITC-PNA und PI gefärbt (s. Kapitel 3.4.2.2 ). Bei allen Analyseverfahren wurden 10.000 Spermien pro Probe analysiert. Die Proben wurden nach Zugabe der Farbstoffe im abgedunkelten Raum 15 Minuten bei 37 °C in einem Thermostat (Typ 5320, Fa. Eppendorf) inkubiert.

Die Integrität der Chromatinstruktur wurde mit dem Spermachromatinstruktur-Assay (SCSA<sup>™</sup>) ermittelt (s. Kapitel 3.4.2.3).

### 3.4.2.1 Geräte und Geräteeinstellungen

Für die Untersuchungen wurde ein Durchflusszytometer FACScan™ (Fa. Becton Dickinson, San Jose, USA), das mit einem luftgekühlten Argonionenlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und einer Leistung von 15 mW ausgestattet war, verwendet. Zur Messung standen drei verschiedene Filter zur Auswahl: FL-1 (530/30 nm) für die grüne Fluoreszenz, FL-2 (585/42 nm) für die orange Fluoreszenz und FL-3 (650LP nm) für die rote Fluoreszenz. Für die Datenanalyse war ein Power Mac G4-Computer (Fa. Apple Computer Inc., Cupertino, Kalifornien, USA) an dieses Gerät angeschlossen. Die Bearbeitung und Auswertung der Daten erfolgte mit dem Software-Programm Cellquest™ (Fa. Becton Dickinson, San Jose, USA). Die Analyse der SCSA™-Daten wurde mit dem Software-Programm DAS Version 4.40 (Beisker, 1994) vorgenommen.

### 3.4.2.2 SYTO®17/FITC-PNA/PI-Assay

Um die Plasmamembranintegrität zu bestimmen, wurden die Spermien mit den DNA-Farbstoffen SYTO®17 und Propidiumjodid (PI) angefärbt. Das rot fluoreszierende PI kann nur bei geschädigter Plasmamembran in den Zellkern diffundieren, während SYTO®17, welches orange leuchtet auch durch intakte Membranen penetriert. Da Propidiumjodid SYTO®17 von der DNA verdrängt, kommt es bei geschädigter Spermienmembran zu einer roten Fluoreszenz. Orange gefärbten Spermien weisen dagegen auf eine intakte Plasmamembran und damit auf vitale Spermien hin (Thomas *et al.*, 1997).

Um simultan auch den akrosomalen Status zu bestimmen, wurden diese Farbstoffe mit Arachis hypogaea Lectin (PNA), ein an Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) gekoppeltes Lektin kombiniert. FITC-PNA bindet sich bei akrosomaler Schädigung bzw. partiell abgelaufener Akrosomenreaktion an dessen Membran und emittiert grünes Licht (Thomas *et al.*, 1997).

Es wurde der von Garner *et al.* (1999) entwickelte Assay eingesetzt, wobei die Farbstoffkonzentrationen geringgradig modifiziert wurden (0,5 nM SYTO®17, 2,99 nM PI und 100 µg/ml FITC-PNA).

Für die Messungen wurden die Filter FL-1 für die grüne Fluoreszenz und FL-3 für die rote Fluoreszenz herangezogen. Bei der Auswertung wurden die Spermienköpfe zum einen hinsichtlich ihrer Plasmamembranintegrität, zum anderen hinsichtlich der Unversehrtheit des Akrosoms in 4 verschiedene Populationen unterteilt (Abb. 3.3). Die Eingrenzungen der einzelnen Spermienpopulationen erfolgte mit Hilfe des Analyseprogramms der Cellquest™.



Software (Fa. Becton Dickinson, San Jose, USA): vitale Spermien mit intaktem Akrosom (orange angefärbte Spermien), membrangeschädigte Spermien mit intaktem Akrosom oder völligem Verlust des Akrosoms (rot angefärbte Spermien), membrangeschädigte Spermien mit angefärbten Akrosom (rot angefärbte Spermien mit grün angefärbtem Akrosom) und vitale Spermien mit angefärbten Akrosom (orange angefärbte Spermien mit grün angefärbtem Akrosom). Anschließend wurden die beiden Populationen, in denen vitale bzw. akrosomangefärbte Spermien vorkamen, addiert.

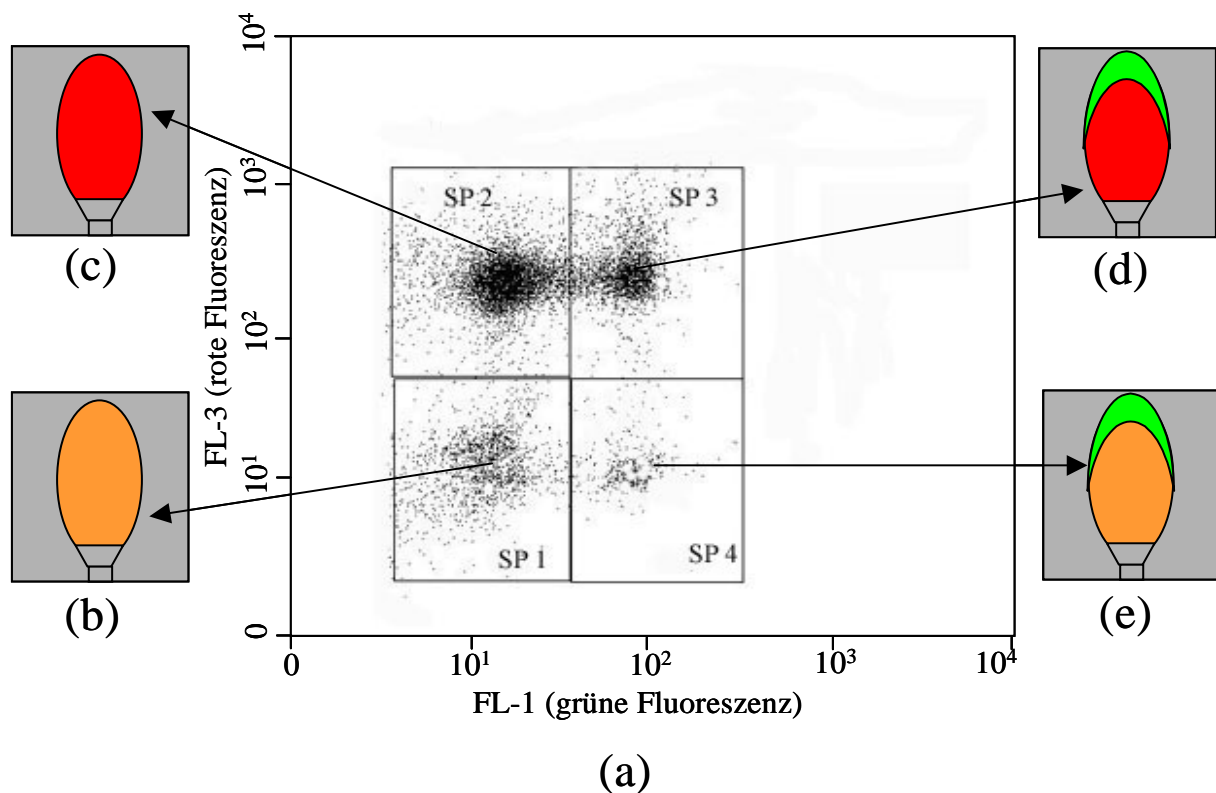


Abb. 3.3: Punktwolkendiagramm (a) der 4 Spermienpopulationen (SP) nach SYTO<sup>®</sup>17/ FITC-PNA / PI-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Auswertung [Ausdruck des Computerbildes; SP 1 = vitale Spermien mit intaktem Akrosom (SYTO positiv, PNA negativ); SP 2 = membrangeschädigte Spermien mit intaktem Akrosom oder völligem Verlust des Akrosoms (PI positiv, PNA negativ); SP 3 = membrangeschädigte Spermien mit angefärbten Akrosom (PI positiv, PNA positiv); SP 4 = vitale Spermien mit angefärbten Akrosom (SYTO positiv, PNA positiv)]. Schematische Darstellung der vitalen Spermien mit intaktem Akrosom (b), der toten Spermien mit intaktem Akrosom (c), der toten und akrosomangefärbten Spermien (d) und der vitalen und akrosomangefärbten Spermien (e) nach SYTO<sup>®</sup>17 / FITC-PNA / PI-Färbung (nach Krienke 2003).

### 3.4.2.3 Spermachromatinstruktur-Assay (SCSA™)

Evenson et al. (2002) beobachteten, dass Veränderungen in der Chromatinstruktur der Spermien häufig trotz erfolgreicher Befruchtung zu einem Absterben des Embryos führen. Die Spermachromatinstrukturanalyse liefert somit einen weiteren Parameter zur Bestimmung der Spermaqualität. Sie beruht auf dem Prinzip, dass abnormal strukturiertes Chromatin eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einer Säuredenaturierung besitzt. Dies führt zu einer teilweisen Trennung der normalerweise doppelsträngig vorliegenden DNA in Einzelstränge. Nach der sich anschließenden Färbung mit dem metachromatischen Farbstoff Akridinorange emittiert doppelsträngige DNA Licht im grünen Bereich (Abb. 3.4). Einzelsträngige DNA zeigt hingegen eine rote Fluoreszenz. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wird bei jedem einzelnen Spermium die Intensität beider Fluoreszenzen bestimmt. Errechnet man den Anteil der Rotfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz, so erhält man den so genannten DNA-Fragmentations-Index (DFI), der ein Maß für die Störung der Integrität der Chromatinstruktur der einzelnen Spermien darstellt (Evenson *et al.*, 2002).

Die Probenaufbereitung und Messung erfolgte nach der bei Evenson und Jost (2000) beschriebenen Methode.

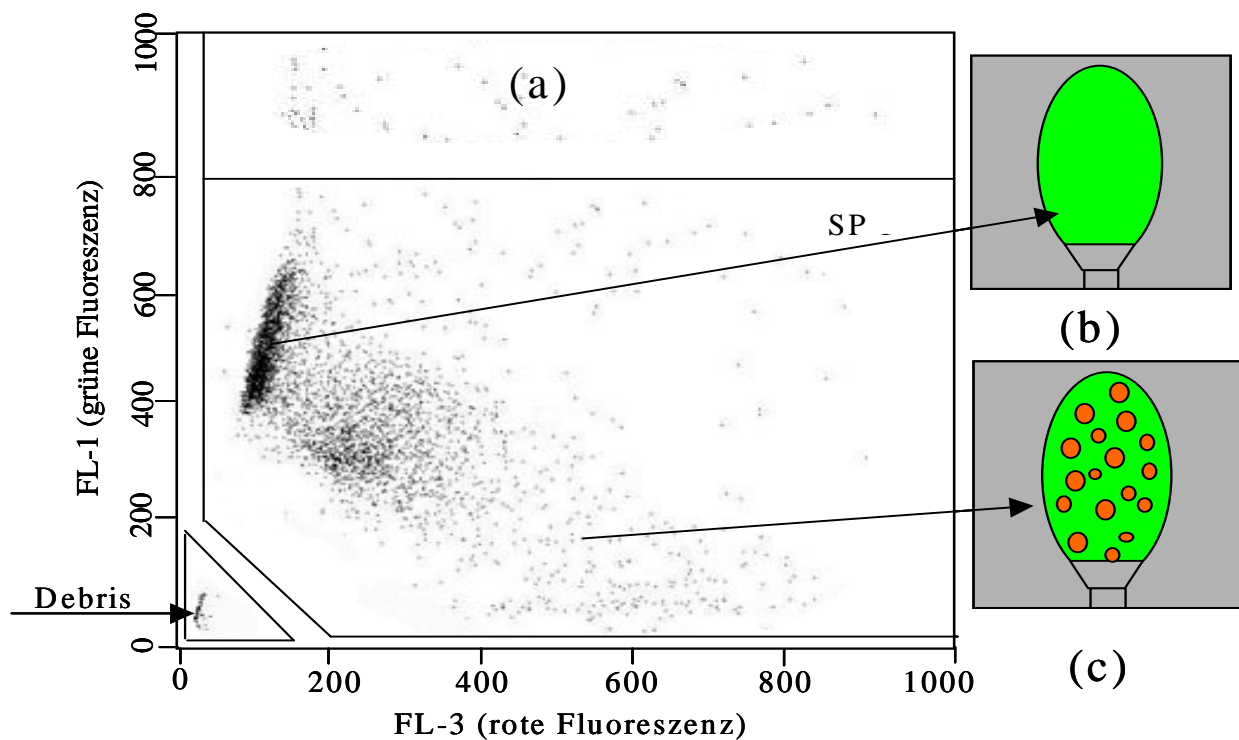


Abb. 3.4: Punktwolkendiagramm (a) bei der durchflusszytometrisch durchgeführten Spermachromatinstrukturanalyse (SP = Spermienpopulation). Schematische Darstellung der Spermien mit grüner Fluoreszenz (b), d.h. doppelsträngiger DNA und Spermien mit erhöhter Rotfluoreszenz (c), d.h. mit vermehrt vorkommender einzelsträngiger DNA nach dem SCSA™ (nach Krienke 2003).

Mittels computergestützter Auswertung der Punktwolkendiagramme wurde für jedes einzelne Spermium der Anteil der Rotfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz (rot + grün) ermittelt (DFI-Wert).

Die DFI-Werte der analysierten Spermien einer Samenprobe wurden in Abhängigkeit ihrer Höhe in einem Verteilungshistogramm dargestellt (Abb. 3.5) und der prozentuale Anteil der Spermien mit erhöhten DFI-Werten an der Gesamtpopulation errechnet. Diese Spermien werden nach Evenson et al. (2002) als DFI-Spermien bezeichnet.

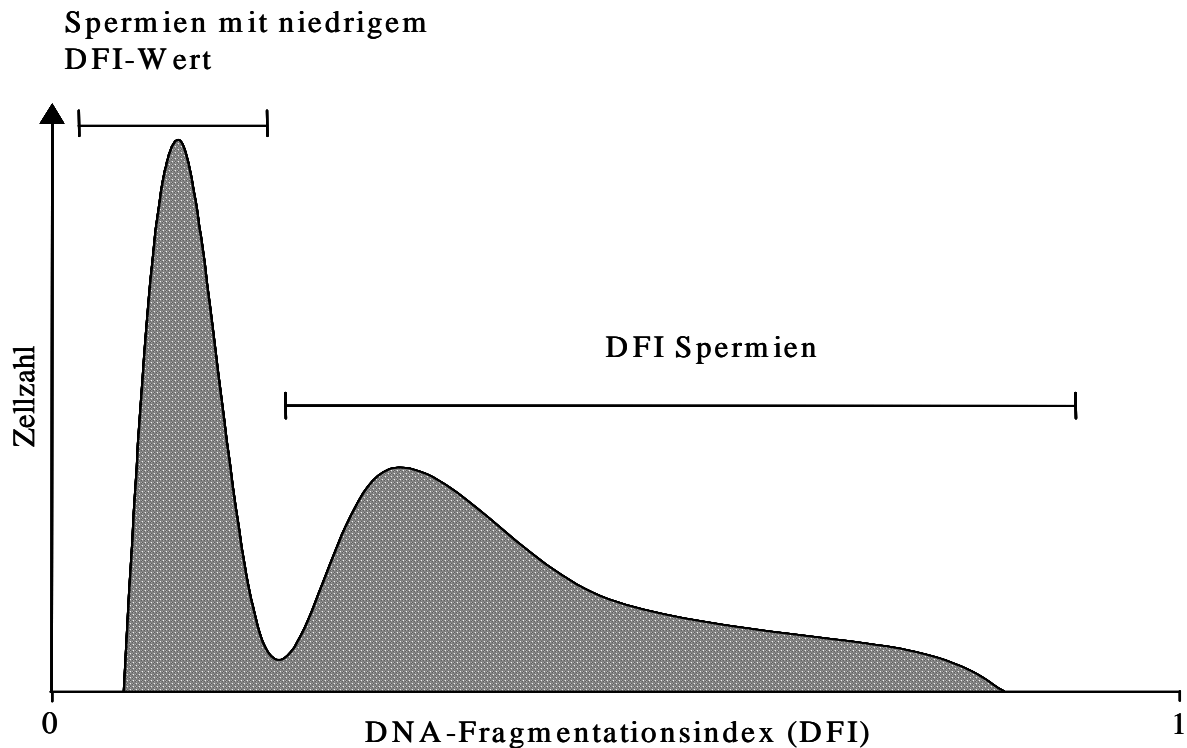


Abb. 3.5 : Häufigkeitsverteilung der DFI-Werte, d.h. des Anteils der Rotfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz (rot + grün) (modifiziert nach EVENSON et al., 2002).

### 3.5 Blutprobenentnahme und -untersuchung

Den 12 Hengsten des zweiten Versuchs wurden nach jeder dopplersonographischen Untersuchung Blutproben aus der V. jugularis entnommen und auf ihren Gehalt an Gesamtöstrogen und Testosteron untersucht.

#### 3.5.1 Plasmagewinnung

Zur Bestimmung des Hormongehaltes im Plasma wurde den Hengsten am Ende jeder Untersuchung mit Hilfe des Venoject-Vakuum-Blutentnahmesystems (Terumo Europe N. V. Leuven, Belgien) eine EDTA-Blutprobe aus der V. jugularis entnommen. Die Probe wurde zunächst auf Eis gelagert und dann 15 min in einer Kühlzentrifuge (Hettich Universal 32 R, Andreas Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen) bei 4°C und 2000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abpipettiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C gelagert.

### 3.5.2 Testosteronbestimmung

Zur Bestimmung des Testosterongehalts im Blutplasma der Hengste wurde ein Enzym-Immuno-Assay (EIA) der Firma DRG Instruments GmbH, Marburg (Testosteron ELISA Kat.-Nr.: EIA-1559) in etwas modifizierter Form eingesetzt:

Als Standard diente Testosteron (Sigma, T5411) im Bereich von 0,25 ng/ml bis 16 ng/ml in 30% Methanol. Zweihundert Mikroliter der Probe wurden nach Etherextraktion (3 ml 30/70 v/v% tertiär-Butyl-Methyl-Ether /Petrolether), Ausfrieren bei -60°C und Abdampfen der Etherphase bei +60°C im Schüttelwasserbad mit 200µl 30% Methanol aufgenommen. In den Test wurden je Well 25µl eingesetzt. Als Kontrollen dienten Plasmaproben eines Wallachs mit und ohne Zusatz von 10,0 ng/ml Testosteron.

Inkubationszeiten, Farbreaktion und Auswertung erfolgten ohne weitere Modifikationen nach Angaben des Herstellers.

### 3.5.3 Gesamtöstrogenbestimmung

Zur Bestimmung des Östrogens wurden Plasmaproben einem EIA (Antikörper: 1,3,5(10)-Östradiol-3,17β-diol-17-HS-BSA Code 2/3Whst; Marker: 1,3,5(10)-Östratrien-3,17β-diol-17HS-HRP), analog wie bei Meyer (1989) und Meyer et al. (1997) beschrieben, unterworfen.

Zu 100 µl Plasma wurden 250 µl Hydrolyselösung (Acetat-Puffer pH 4,8 mit 0,4% β-Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia*) pipettiert und 3 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Extraktion wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben. Die Aufnahme erfolgte in 2 ml 30%igem Methanol, wodurch eine 20-fache Verdünnung des Ausgangswertes entstand. Von diesen vorverdünnten Extrakten wurden 20 µl pro Well in die EIA-Testplatte eingesetzt.

## 3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms Stat View 5.0 (SAS Institute Inc., Cary / North Carolina, 1998). Es wurden Mittelwerte, Standardfehler des Mittelwertes und Spearman Korrelationen errechnet. Weiterhin kam der Wilcoxon-Test zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen innerhalb einzelner Zeitpunkte sowie zwischen den Zeitpunkten innerhalb der einzelnen Gruppen zur

Anwendung. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurden als signifikant definiert, während solche mit  $p < 0,10$  als tendenzielle Unterschiede bezeichnet wurden.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Klinisch-andrologische und anamnestische Befunde

Bei den Hengsten beider Versuche waren während des gesamten Behandlungszeitraums klinisch und ultrasonographisch keine pathologischen Veränderungen am Genitale festzustellen.

Den drei Gruppen des NO-Donoren-Versuchs wurden unabhängig von der Spermaqualität bzw. Fertilität jeweils gleichaltrige Hengste zugeteilt ( $p > 0,05$ ). Die Mittelwerte für das Alter betragen bei der Kontrollgruppe (K)  $7,7 \pm 1,6$  Jahre ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ; Min.: 4,5 Jahre; Max.: 14,5 Jahre) bei der FertilAid-Gruppe (F)  $8,0 \pm 1,9$  Jahre ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ; Min.: 3,5 Jahre; Max.: 15,5 Jahre) und bei der Molsidomin-Gruppe (M)  $7,3 \pm 2,2$  Jahre ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ; Min.: 3,5 Jahre; Max.: 17,5 Jahre).

Auch die Hengste des hCG-Versuchs wurden so ausgewählt, dass sie im Mittel gleichaltrig waren ( $p > 0,05$ ). Die 4 Hengste der Kontrollgruppe (K) wiesen ein mittleres Alter von  $12,5 \pm 1,3$  Jahren ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ; Min.: 10 Jahre; Max.: 16 Jahre) und die 8 Hengste der hCG-Gruppe (H) eines von  $12,6 \pm 1,6$  Jahren ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ; Min.: 7 Jahre; Max.: 20 Jahre) auf.

Die Fertilitätsdaten der Hengste der beiden Gruppen des zweiten Versuchs (Tab. 4.1) unterschieden sich nicht voneinander ( $p > 0,05$ ).

Tab. 4.1: Fertilitätsparameter ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) der Hengste der Kontroll- (K) und hCG-Gruppe (H). Es wurden die Mittelwerte der Fertilitätsergebnisse der Jahre 1997 bis 2002 verwendet.

Fertilitätsparameter	Versuchsgruppe	
	K (4 Hengste)	H (8 Hengste)
Frühgraviditätsrate pro Zyklus [%]	40,4 ± 3,5	41,4 ± 3,0
Abfohlrate pro Zyklus [%]	35,7 ± 2,9	36,5 ± 2,6

## 4.2 Testikulärer Blutfluss

Der testikuläre Blutfluss wurde bei den 30 Hengsten der beiden Versuche mit Hilfe des mittleren Blutflussvolumens (BFV), des Resistance Index (RI) und des Pulsatility Index (PI) der Aa. testiculares quantifiziert.

### 4.2.1 Korrelation zwischen den Blutflussparametern

Um den testikulären Blutfluss möglichst einfach, jedoch ohne größeren Informationsverlust beschreiben zu können, wurde untersucht, ob zwischen den Blutflussparametern BFV, RI und PI Zusammenhänge bestehen, die eine Beschränkung auf einen dieser Parameter erlauben. Hierfür wurden die Werte der rechten und linken Aa. testiculares der Untersuchungswoche -1 (Versuch 1) bzw. -stunde 0 (Versuch 2), also Werte der Zeitpunkte vor Behandlungsbeginn, verwendet (Tab. 4.2).



Tab. 4.2: Korrelationen zwischen den Blutflussparametern Pulsatility Index (PI), Resistance Index (RI) und Blutflussvolumen (BFV) der A. testicularis. Es wurden von den 30 Hengsten der beiden Versuche jeweils die Werte der linken und rechten A. testicularis der Untersuchungswoche -1 (NO-Donoren-Versuch ) bzw. -stunde 0 (hCG-Versuch) verwendet.

	BFV	RI	PI
BFV	-	-0,03	-0,01
RI	-0,03	-	0,91**
PI	-0,01	0,91**	-

\*\* Korrelation  $p < 0,0001$

Insgesamt betrachtet bestanden hohe Korrelationen zwischen den Dopplerindices RI und PI ( $r = 0,91$ ;  $p < 0,0001$ ). Es fällt jedoch auf, dass der Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern um so geringer wurde, je höher die Werte waren (Abb.4.1). Da in der vorliegenden Studie Dopplerwellen mit enddiastolischem Null- bzw. Rückwärtsfluss auftraten und der RI in diesen Fällen einen Maximalwert von 1 annimmt, wodurch diese Dopplerwellen nicht mit Hilfe des letztgenannten Parameters zu differenzieren sind, wurde zur Beurteilung des Blutflusswiderstandes der PI-Wert herangezogen.

Zwischen den BFV- und PI- Werten existierte kein Zusammenhang ( $r = -0,01$ ;  $p > 0,05$ ), weshalb im Folgenden die Blutflüsse mittels dieser beiden Parameter analysiert werden.

Während sich die BFV-Werte [ml/min] der linken (l) und rechten (r) A. testicularis nicht voneinander unterschieden ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ : l:  $26,9 \pm 1,9$ , r:  $26,4 \pm 2,1$ ;  $p > 0,05$ ), waren die PI-Werte der linken A. testicularis höher als die der rechten ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ : l:  $2,3 \pm 0,2$ ; r:  $2,1 \pm 0,2$ ;  $p < 0,05$ ). Zwischen den PI- ( $r = 0,72$ ;  $p < 0,05$ ) bzw. BFV-Werten ( $r = 0,58$ ;  $p < 0,05$ ) beider Seiten bestanden mittel- bis hochgradige Korrelationen. Daher wurden für die folgenden Auswertungen jeweils die Mittelwerte aus beiden Gefäßen herangezogen.

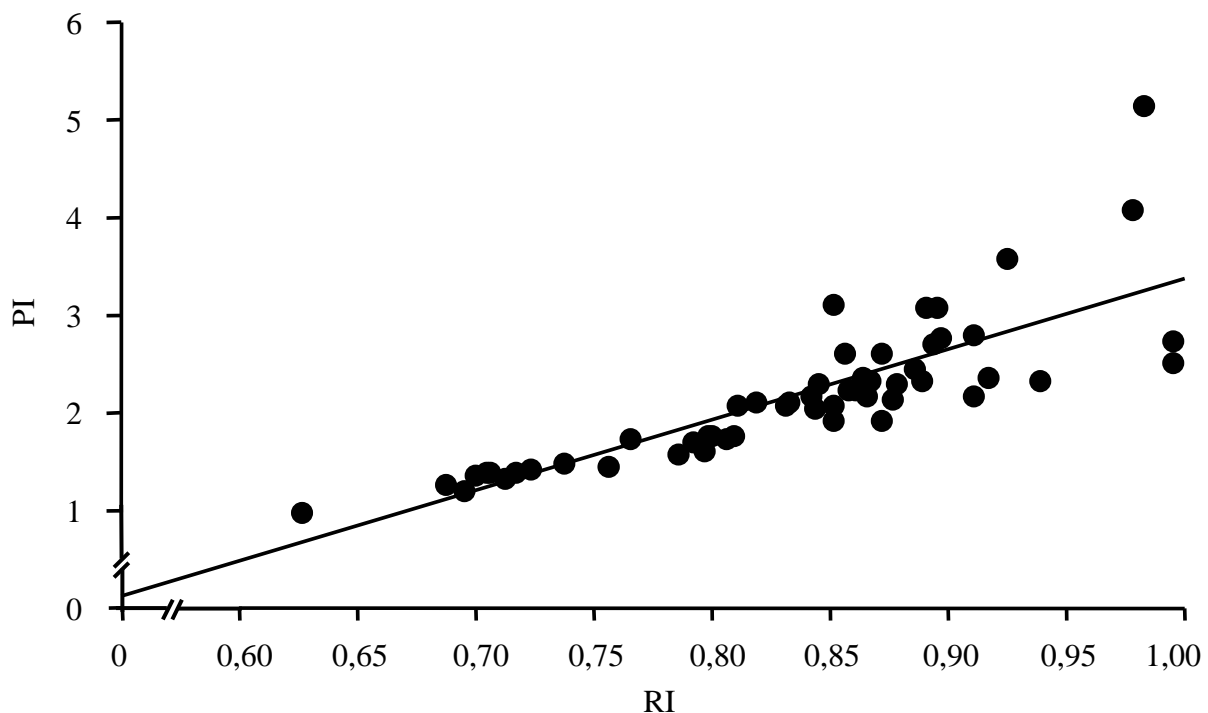


Abb. 4.1: Korrelation zwischen dem Resistance (RI) und Pulsatility Index (PI) der A. testicularis der 30 Hengste der beiden Versuche. Jeder Punkt repräsentiert den Wert der linken oder rechten A. testicularis der Untersuchungswoche -1 (NO-Donoren-Versuch) bzw. -stunde 0 (hCG-Versuch).

### 4.3 Einfluss von FertilAid-for-Stallions™ und dem Stickstoffmonoxid-Donor Molsidomin auf den testikulären Blutfluss und die Spermaqualität

#### 4.3.1 Testikulärer Blutfluss

Vor Behandlungsbeginn unterschied sich das testikuläre Blutflussvolumen (Abb. 4.2; Tab. 4.3, Anhang) der drei Gruppen nicht ( $p > 0,05$ ). Das Blutflussvolumen der Hengste der Molsidomin-Gruppe lag zwar um 22% (K) bzw. 25% (F) unter dem der beiden anderen Gruppen, da die Variabilität aber sehr hoch war, konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Sowohl die Hengste der Kontroll- als auch Molsidomin-Gruppe zeigten zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten keine Änderungen im Blutflussvolumen ( $p > 0,05$ ). Dagegen fiel das Volumen bei der FertilAid-Gruppe zum Zeitpunkt 2, also in der zweiten Woche nach Therapiebeginn, um 19% gegenüber den Ausgangswerten ab ( $p < 0,05$ ). Zu diesem Zeitpunkt war das Blutflussvolumen der Hengste der FertilAid-Gruppe um 12% ( $p < 0,05$ ) bzw. das der Molsidomin-Gruppe um 23% ( $p < 0,05$ ) niedriger als bei der

Kontrollgruppe. Am Ende der Behandlungsperiode waren die Werte der FertilAid-Gruppe wieder bis auf das Niveau der Ausgangswerte angestiegen ( $p < 0,05$ ). Zu diesem Zeitpunkt lagen die Werte der Molsidomin- um 22% niedriger als diejenigen der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ).

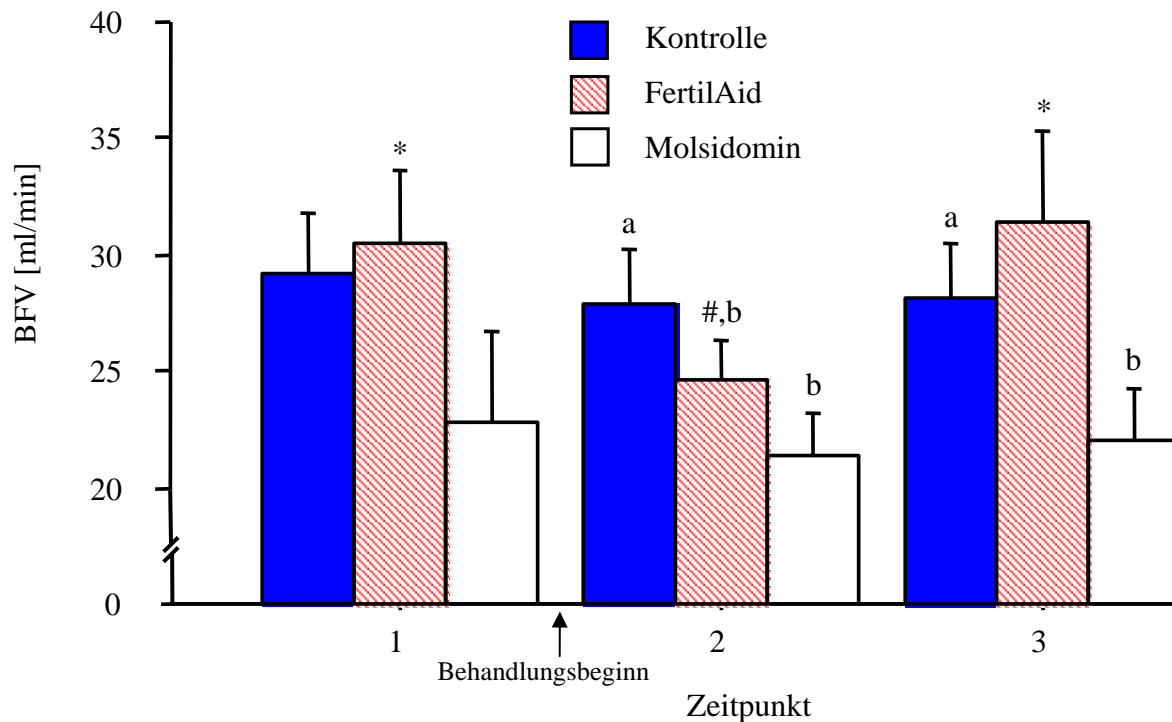


Abb. 4.2: Blutflussvolumen (BFV) der *A. testicularis* der Kontroll-, FertilAid- und Molsidomin-Gruppe zu den Untersuchungszeitpunkten 1, 2 und 3 ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ;  $n =$  jeweils 6 Hengste). Die Werte des Zeitpunktes 1 stellen die Mittelwerte der Wochen -2 und -1 dar. Die Werte der Zeitpunkte 2 und 3 stammen aus den Wochen 2 bzw. 8 nach Behandlungsbeginn.

\*, #: Unterschied zwischen den Werten verschiedener Untersuchungszeitpunkte innerhalb einer Gruppe ( $p < 0,05$ ).

a, b: Unterschied zwischen verschiedenen Gruppen innerhalb eines bestimmten Zeitpunkts ( $p < 0,05$ ).

Die Ausgangswerte des Gefäßwiderstandsindex PI (Abb. 4.3; Tab. 4.3, Anhang) unterschieden sich zwar zwischen beiden NO-Donor-Behandlungsgruppen ( $p < 0,05$ ), das heißt die FertilAid-Gruppe wies höhere PI-Werte auf als die Molsidomin-Gruppe, es bestanden aber keine Differenzen zur Kontrollgruppe ( $p > 0,05$ ). Während der Behandlung waren keine Unterschiede ( $p > 0,05$ ) mehr zwischen den Gruppen festzustellen, da der PI in der FertilAid-Gruppe um 17% abfiel ( $p < 0,05$ ) und sich die PI-Werte der Kontroll- und Molsidomin-Gruppe während des Untersuchungszeitraums nicht änderten ( $p > 0,05$ ).

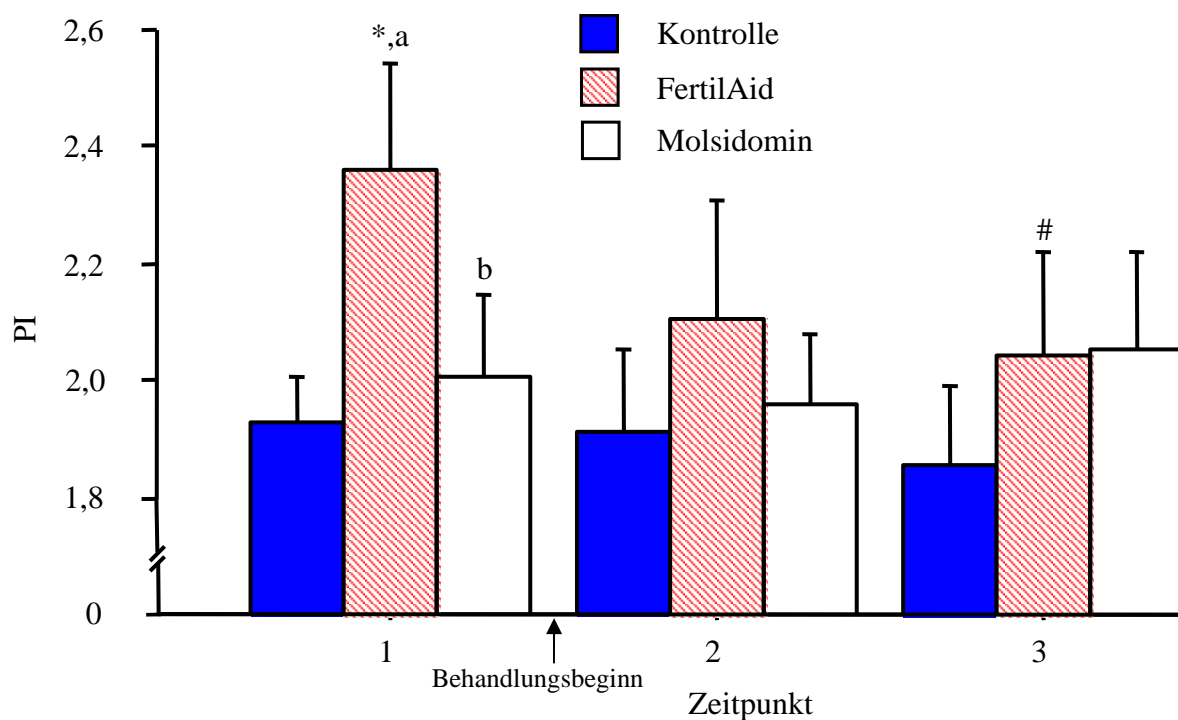


Abb. 4.3: Pulsatility Index (PI) der *A. testicularis* der Kontroll-, FertilAid- und Molsidomin-Gruppe zu den Zeitpunkten 1, 2 und 3 ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ;  $n =$  jeweils 6 Hengste). Der Wert des Zeitpunktes 1 stellt den Mittelwert der Wochen -2 und -1 dar. Die Werte der Zeitpunkte 2 und 3 entsprechen den Wochen 2 bzw. 8 nach Behandlungsbeginn.  
 \*, #: Unterschied zwischen den Werten verschiedener Untersuchungszeitpunkte innerhalb einer Gruppe ( $p < 0,05$ ).  
 a, b: Unterschied zwischen verschiedenen Gruppen innerhalb eines bestimmten Zeitpunkts ( $p < 0,05$ ).

## 4.3.2 Spermaqualität

## 4.3.2.1 Ejakulatvolumen, Spermiengesamtzahl und Motilität

Das Ejakulatvolumen (Abb. 4.4; Tab. 4.4, Anhang; Werte der einzelnen Wochen: Tab. 4.5, Anhang) der Hengste der drei Versuchsgruppen unterschied sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt ( $p > 0,05$ ). Zwar waren die Werte der FertilAid-Gruppe niedriger als diejenigen der anderen beiden Gruppen, die Unterschiede waren aber nicht signifikant. Auch innerhalb der einzelnen Hengstgruppen waren während des Behandlungszeitraums keine Änderungen im Ejakulatvolumen zu verzeichnen ( $p > 0,05$ ).

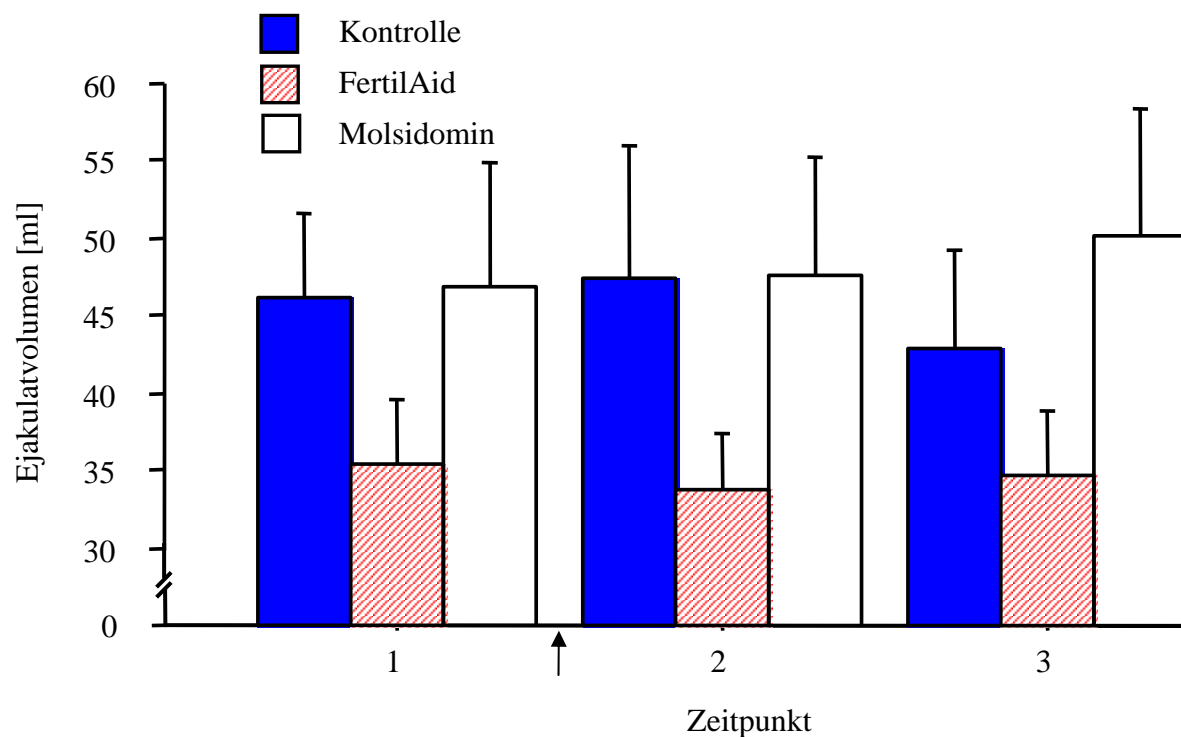


Abb. 4.4: Ejakulatvolumen ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ) der Hengste der Kontroll-, FertilAid- und Molsidomin-Gruppe zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten ( $n =$  jeweils 6 Hengste). Der Wert des Zeitpunktes 1 stellt den Mittelwert zweier Wochen (-2 und -1) dar, während die Werte der Zeitpunkte 2 und 3 die Mittelwerte dreier Wochen (1, 2 und 3 bzw. 6, 7 und 8) repräsentieren. Der Wert einer Woche stellt wiederum den Mittelwert dreier Untersuchungstage dar.

Auch die Spermigesamtzahl (Abb. 4.5; Tab. 4.4, Anhang; Werte der einzelnen Wochen: Tab. 4.5, Anhang) unterschied sich weder zwischen noch innerhalb der Hengstgruppen voneinander ( $p > 0,05$ ).

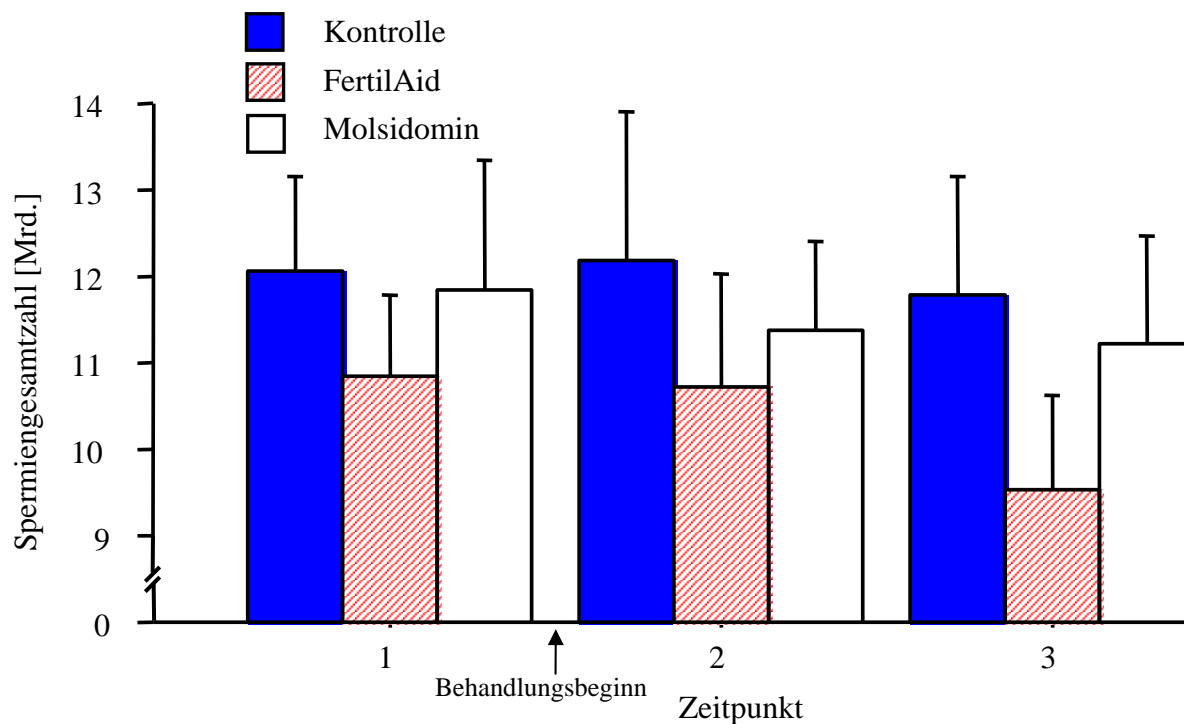


Abb. 4.5: Spermigesamtzahl ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) der Ejakulate der Hengste der Kontroll-, FertilAid- und Molsidomin-Gruppe zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten ( $n =$  jeweils 6 Hengste). Der Wert des Zeitpunktes 1 stellt den Mittelwert zweier Wochen (-2 und -1) dar, während die Werte der Zeitpunkte 2 und 3 die Mittelwerte dreier Wochen (1, 2 und 3 bzw. 6, 7 und 8) repräsentieren. Der Wert einer Woche stellt wiederum den Mittelwert dreier Untersuchungstage dar.

Zwischen dem Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien der drei Versuchsgruppen bestanden zu keinem der drei Untersuchungszeitpunkte signifikante Unterschiede (Abb. 4.6; Tab. 4.4, Anhang; Werte der einzelnen Wochen: Tab. 4.6, Anhang). Innerhalb der Gruppen nahmen nur die Werte der Kontrollgruppe zwischen den Zeitpunkten 1 und 2 ab ( $p < 0,05$ ), wobei dieser Abfall mit 2,9% jedoch nur geringgradig war.

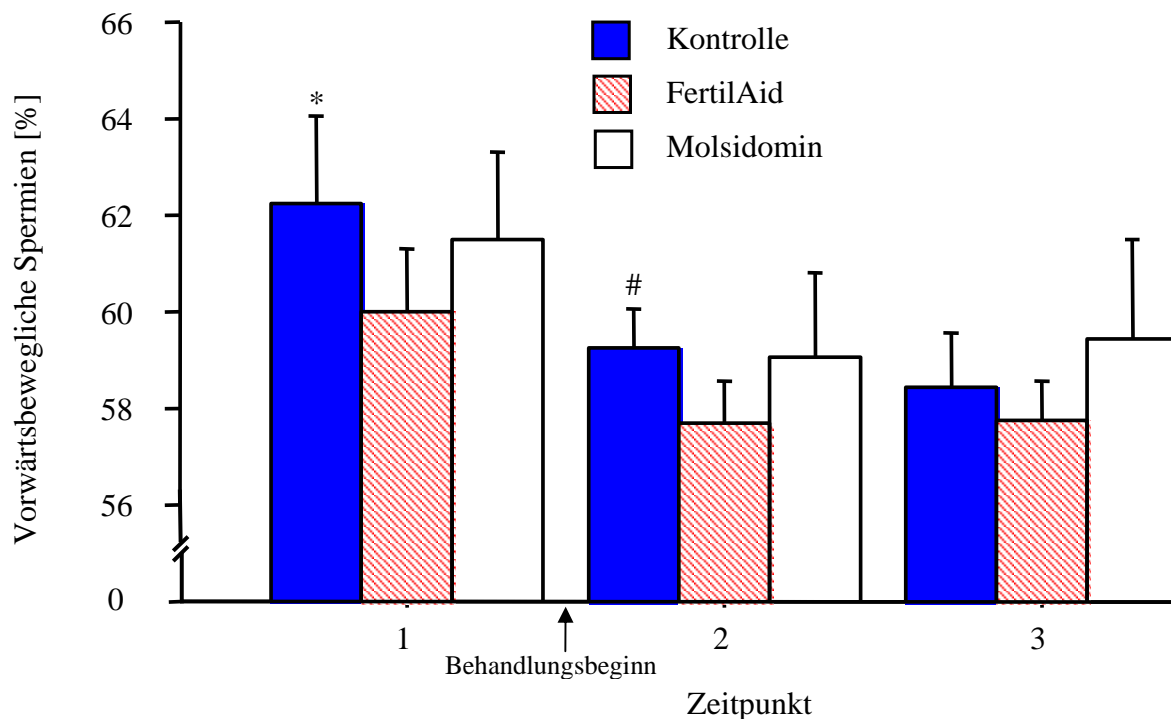


Abb. 4.6: Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) in den Ejakulaten der Hengste der Kontroll-, FertilAid- und Molsidomin-Gruppe zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten ( $n =$  jeweils 6 Hengste). Der Wert des Zeitpunktes 1 stellt den Mittelwert zweier Wochen (-2 und -1) dar, während die Werte der Zeitpunkte 2 und 3 die Mittelwerte dreier Wochen (1, 2 und 3 bzw. 6, 7 und 8) repräsentieren. Der Wert einer Woche stellt wiederum den Mittelwert dreier Untersuchungstage dar.

\*, #: Unterschied zwischen den Werten verschiedener Untersuchungszeitpunkte innerhalb einer Gruppe ( $p < 0,05$ ).

## 4.3.2.2 Vitale Spermien

Der Anteil der vitalen Spermien (Abb. 4.7; Tab. 4.7, Anhang) der drei Versuchsgruppen unterschied sich weder innerhalb noch zwischen den Gruppen ( $p > 0,05$ ). Zwar kam es bei den Hengsten der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 2 kurzzeitig zu einem Abfall des Blutflussvolumens und auch die BFV-Werte der FertilAid-Gruppe fielen mit Beginn der Behandlung ab, die Variationen unter den Hengsten waren aber so groß, dass die Unterschiede nicht signifikant waren.

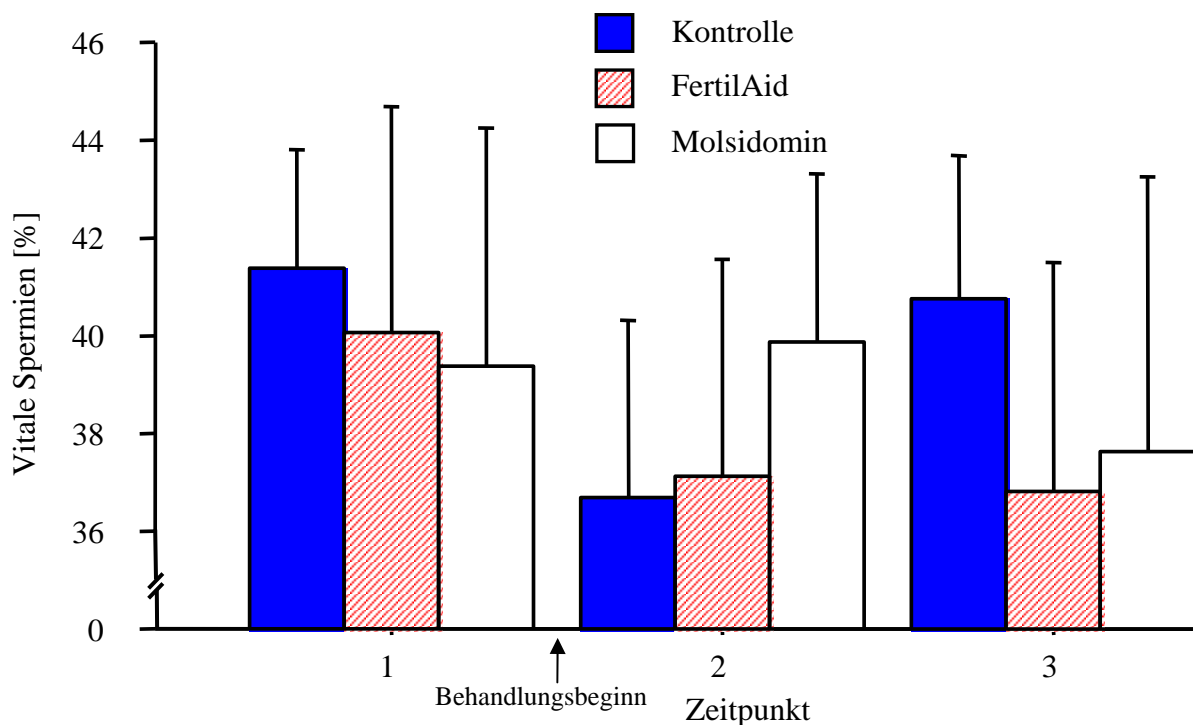


Abb. 4.7: Anteil vitaler Spermien ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) in kryokonservierten Spermaproben der Hengste der Kontroll-, FertilAid- und Molsidomin-Gruppe im SYTO<sup>®</sup>17/FITC-PNA/PI-Assay zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten ( $n =$  jeweils 6 Hengste). Die Werte der Zeitpunkte 1, 2 und 3 entsprechen den Werten der Wochen -2, 2 und 8.



## 4.3.2.3 Akrosomgeschädigte bzw. -reagierte Spermien

Auch hinsichtlich des Anteils der Spermien mit angefärbten Akrosom, d.h. mit Akrosomenreaktion bzw. -schädigung (Abb. 4.8; Tab. 4.7, Anhang) unterschieden sich die Werte weder innerhalb noch zwischen den Gruppen ( $p > 0,05$ ).

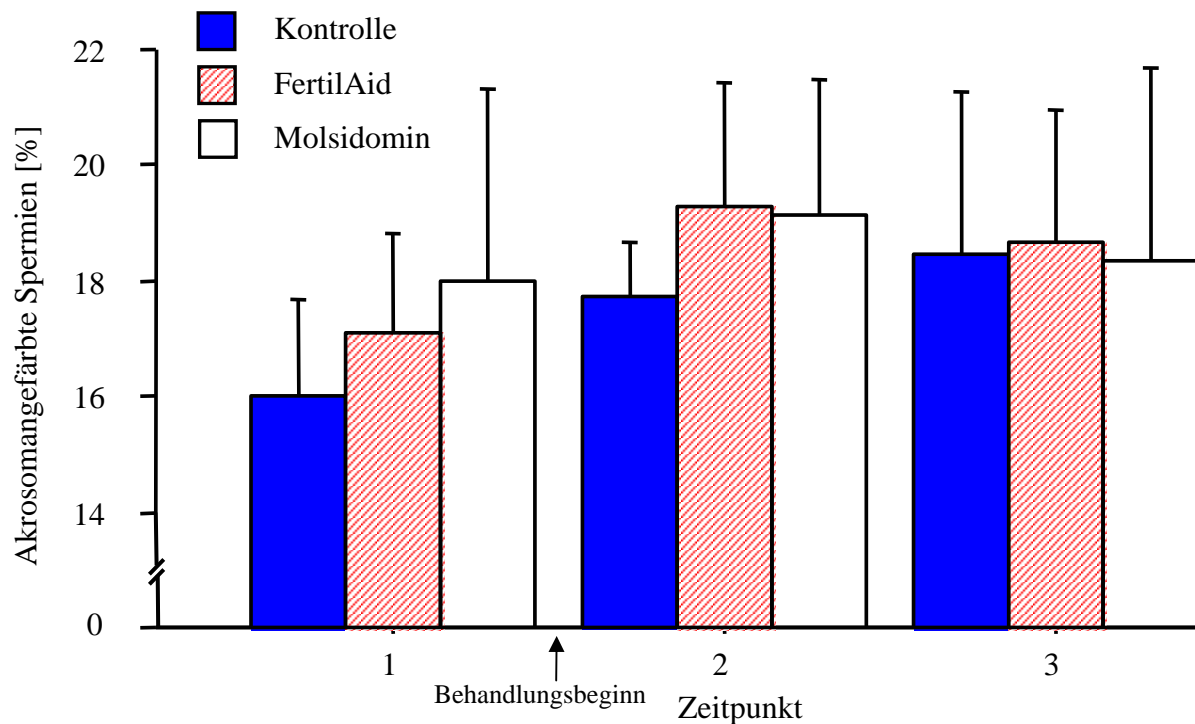


Abb. 4.8: Anteil der Spermien mit angefärbten Akrosom ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ), d.h. mit geschädigtem oder reagiertem Akrosom, in kryokonservierten Spermaproben der Hengste der Kontroll-, FertilAid- und Molsidomin-Gruppe im SYTO<sup>®</sup>17/FITC-PNA/PI-Assay zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten ( $n =$  jeweils 6 Hengste). Die Werte der Zeitpunkte 1, 2 und 3 entsprachen den Werten der Wochen -2, 2 und 8.

## 4.3.2.4 Chromatinstruktur der Spermien

Die DFI-Werte (Abb. 4.9; Tab. 4.7, Anhang), die mittels des Spermachromatinstruktur-Assays ermittelt wurden, unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt zwischen den Gruppen ( $p > 0,05$ ). Die Werte der drei Gruppen änderten sich jedoch im Verlauf der Untersuchungen ( $p < 0,05$ ). Während der Anteil an DFI-Spermien, das heißt der Spermien mit geschädigter Chromatinstruktur der Kontroll- und Molsidomin-Gruppe zwischen den Zeitpunkten 2 und 3 anstieg ( $p < 0,05$ ), fiel er bei der FertilAid-Gruppe zum Zeitpunkt 2 vorübergehend um 30% ab ( $p < 0,05$ ), um anschließend wieder auf das Ausgangsniveau anzusteigen.

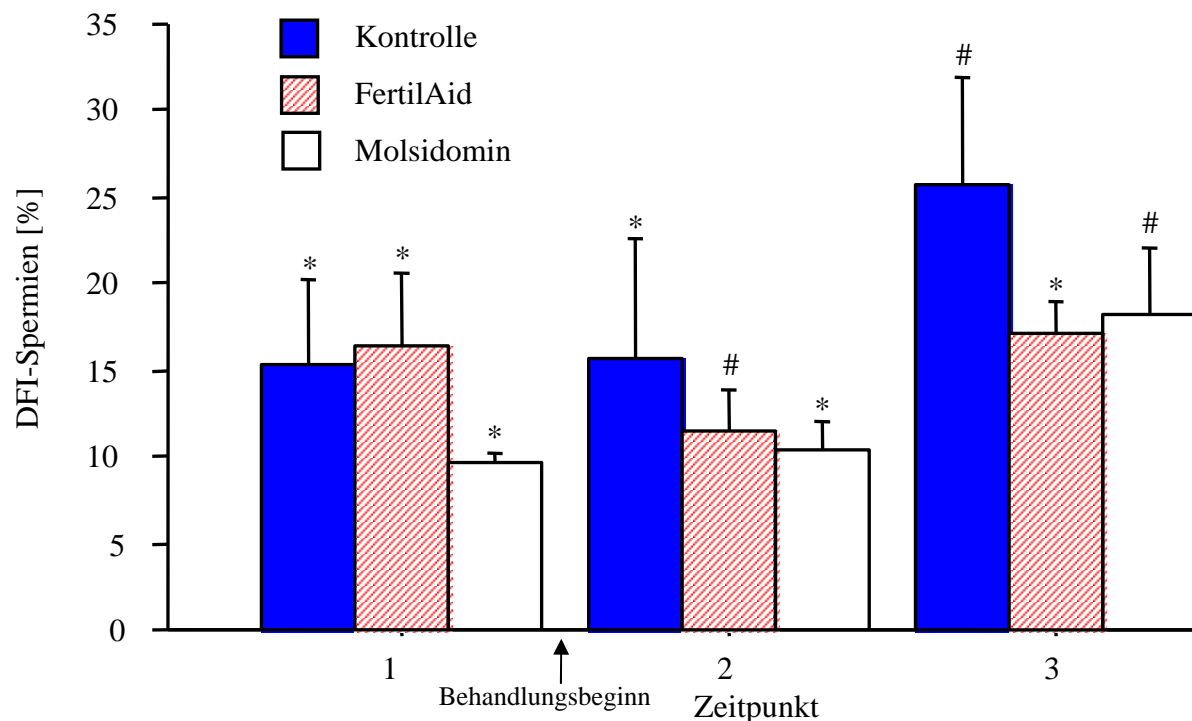


Abb. 4.9: Anteil der DFI-Spermien ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ). Es wurden Tiefgefrierspermaproben der Hengste der Kontroll-, FertilAid- und Molsidomin-Gruppe während der drei Untersuchungszeitpunkte untersucht ( $n =$  jeweils 6 Hengste). Der Wert eines Zeitpunkts setzt sich aus dem Mittelwert dreier Untersuchungswochen zusammen.

\*, #: Unterschied zwischen den Werten verschiedener Untersuchungszeitpunkte einer Gruppe ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4 Zusammenhang zwischen testikulärem Blutfluss und Spermaqualität

Vor Beginn der Behandlung bestand ein positiver Zusammenhang zwischen dem mittleren Blutflussvolumen und der Spermien Gesamtzahl ( $r = 0,65$ ;  $p < 0,05$ ; Tab. 4.8). Zwischen den anderen Blutfluss- und Spermaparametern waren dagegen keine signifikanten Korrelationen nachzuweisen.

Tab. 4.8: Korrelationen zwischen den Blutflussparametern BFV und PI der A. testicularis und verschiedenen Spermaparametern vor Behandlungsbeginn. Es wurden die Mittelwerte aus den Wochen -2 und -1 der Hengste der Kontroll-, FertilAid- und Molsidomin-Gruppe gebildet.

	BFV	PI
Ejakulatvolumen	0,13	0,02
Spermien Gesamtzahl	0,65*	-0,17
Vorwärtsbewegliche Spermien	0,17	-0,09
Vitale Spermien	-0,14	-0,07
Akrosomangefärbte Spermien	-0,06	-0,02
DFI-Spermien	0,05	0,12

\* Korrelation  $p < 0,05$

Die FertilAid-Gruppe war die einzige Gruppe, bei der es während des Untersuchungszeitraums zu signifikanten Veränderungen der Blutfluss- und Spermaparameter kam. Um zu veranschaulichen, wie sich die Parameter zueinander verhielten, wurden die relativen Änderungen der Blutflussparameter mit den Variationen der DFI-Spermien, also dem Spermaparameter, der sich am deutlichsten änderte, verglichen. Dazu wurde der aus allen Untersuchungszeitpunkten gebildete Mittelwert der einzelnen Parameter gleich 100% gesetzt und die prozentuellen Abweichungen davon berechnet (Abb. 4.10). Kein Zusammenhang war zwischen den Änderungen der PI- und BFV-Werte zu erkennen. Das Blutflussvolumen fiel

zunächst um 19% ab und stieg dann wieder auf das Niveau der Ausgangswerte an, während der PI kontinuierlich zum Zeitpunkt 3 hin um 17% abfiel.

Die Änderungen in den DFI-Werten ähnelten den Schwankungen in den BFV-Werten. Zuerst nahm DFI um 30% ab und stieg dann wieder bis auf das Niveau der Ausgangswerte an.

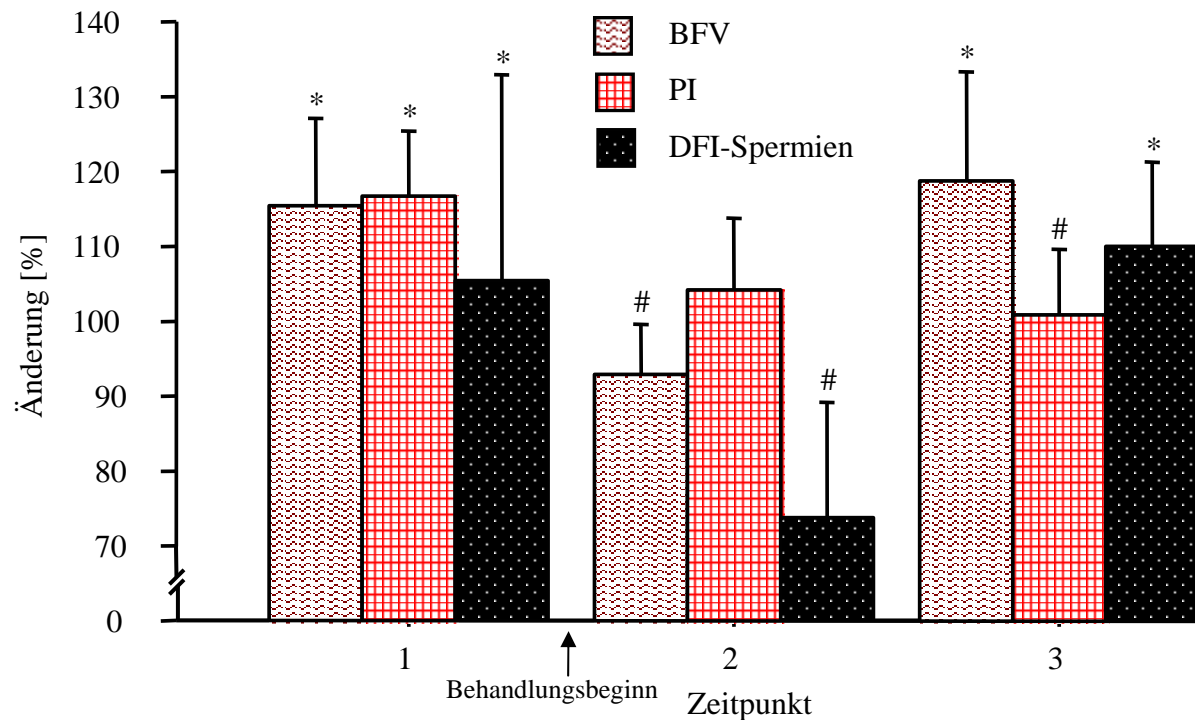


Abb. 4.10: Relative Änderung der Blutflussparameter der *A. testicularis* und des Anteils an DFI-Spermien der Hengste der FertilAid-Gruppe ( $n = 6$ ) während des Untersuchungszeitraums ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ). Die Mittelwerte der Zeitpunkte 1 bis 3 entsprechen 100%.

\*, #: Unterschied zwischen den Werten verschiedener Untersuchungszeitpunkte einer Gruppe ( $p < 0,05$ ).

## 4.5 Einfluss von humanem Choriongonadotropin (hCG) auf den testikulären Blutfluss und die Steroidhormonkonzentrationen im Blutplasma

### 4.5.1 Testikulärer Blutfluss

Während sich das mittlere Blutflussvolumen (Abb. 4.11; Tab. 4.9, Anhang) innerhalb der Kontrollgruppe während des gesamten Untersuchungszeitraums nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) änderte, stieg es bei den Hengsten der hCG-Gruppe innerhalb der ersten Stunde nach der Behandlung kurzfristig um 21% an ( $p < 0,05$ ). In der dritten Stunde waren die Werte wieder auf das Ausgangsniveau abgefallen. Danach nahm das Blutflussvolumen wieder kontinuierlich bis Stunde 24 post applicationem zu. Zu diesem Zeitpunkt war BFV um 35% gegenüber dem Ausgangswert erhöht ( $p < 0,05$ ). In den folgenden Tagen fielen die BFV-Werte stetig ab und waren 168 Stunden nach der hCG-Applikation um 31% niedriger als die Ausgangswerte ( $p < 0,05$ ).

Das mittlere Blutflussvolumen der acht Hengste der hCG-Gruppe unterschied sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt von dem der 4 Hengste der Kontrollgruppe ( $p > 0,05$ ).

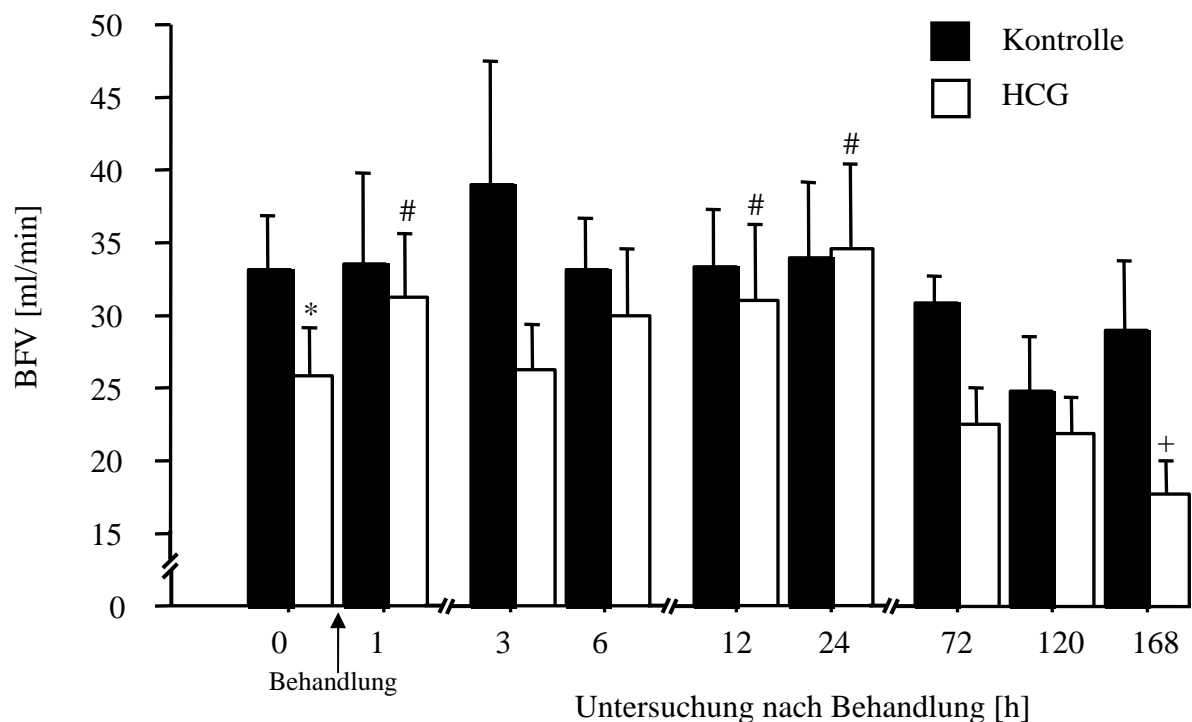


Abb. 4.11: Änderungen im Blutflussvolumen (BFV) ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) der Hengste der Kontroll- ( $n = 4$ ) bzw. hCG-Gruppe ( $n = 8$ ), während des Untersuchungszeitraums. Es wurden jeweils die Mittelwerte der linken und rechten A. testicularis gebildet.

\*, #, +: Unterschied zwischen den Werten verschiedener Untersuchungszeitpunkte einer Gruppe ( $p < 0,05$ ).

Auch die PI-Werte (Abb. 4.12; Tab. 4.9, Anhang) der Kontrollgruppe änderten sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Im Gegensatz dazu war der PI der hCG-Gruppe eine Stunde post injectionem um 22% des Ausgangswertes abgefallen ( $p < 0,05$ ), um dann bis zur Stunde 12 post injectionem wieder anzusteigen. Vierundzwanzig Stunden nach der hCG-Applikation hatten die PI-Werte dann erneut vorübergehend abgenommen ( $p < 0,05$ ), um in der 72. Stunde post applicationem wieder das Niveau der Ausgangswerte zu erreichen. In der Folgezeit blieben die PI-Werte auf konstantem Niveau.

Der Gefäßwiderstandsindex PI der Hengste der hCG-Gruppe war zwar etwas höher als derjenige der Kontrollgruppe, diese Unterschiede waren aber nicht signifikant.

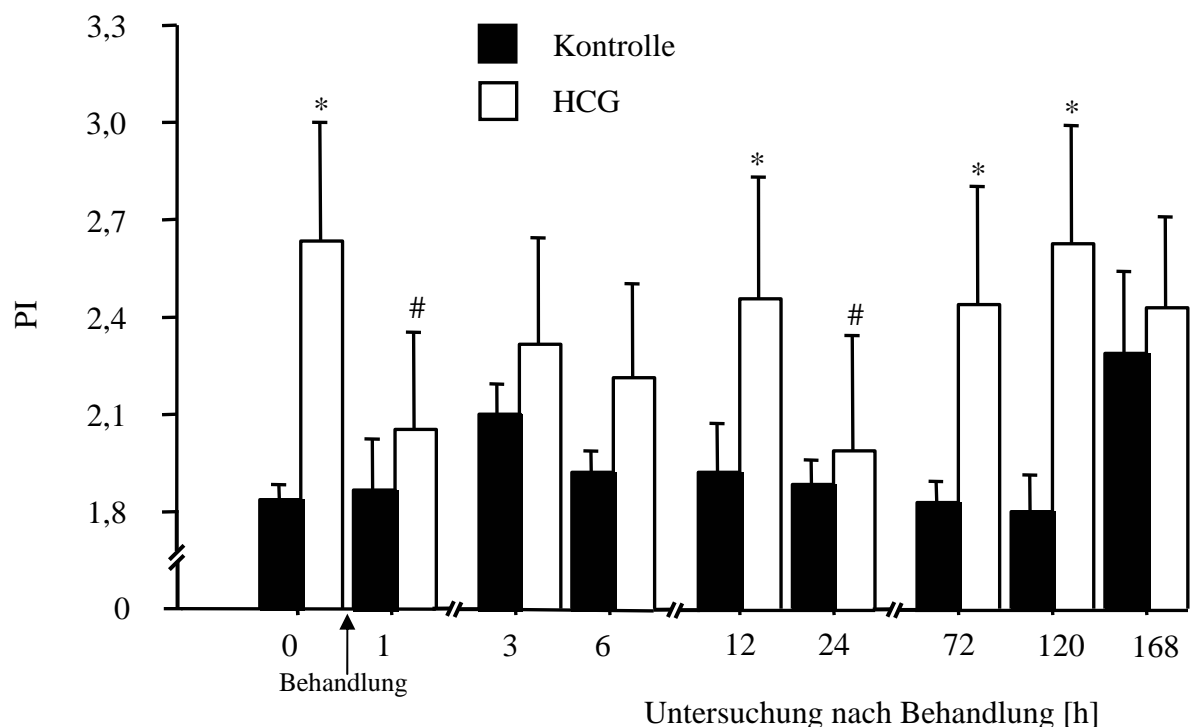


Abb. 4.12: Änderungen im Pulsatility Index (PI) ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) der Hengste der Kontroll- ( $n = 4$ ) bzw. hCG-Gruppe ( $n = 8$ ), während des Untersuchungszeitraums. Bei jeder Untersuchung wurde der Mittelwert aus dem Wert der linken und rechten A. testicularis gebildet.

\*, #: Unterschied zwischen den Werten verschiedener Untersuchungszeitpunkte einer Gruppe ( $p < 0,05$ ).

## 4.5.2 Steroidhormonkonzentrationen im Blutplasma

### 4.5.2.1 Testosteron

Die Testosteronspiegel (Abb. 4.13; Tab. 4.10, Anhang) bei den Hengsten der Kontrollgruppe unterlagen keinen signifikanten Veränderungen während des Untersuchungszeitraums ( $p > 0,05$ ).

Dagegen stiegen sie bei der hCG-Gruppe innerhalb der ersten 3 Stunden nach der Behandlung steil um das 5,2-fache gegenüber den Werten der Stunde 0 an ( $p < 0,05$ ). Daraufhin fielen die Testosteronspiegel vorübergehend ab ( $p < 0,05$ ), um anschließend wieder bis zur 72. Stunde nach der Behandlung kontinuierlich bis auf das 6,5-fache des Ausgangswertes zuzunehmen ( $p < 0,05$ ). Im Anschluss an dieses zweite Maximum nahm der Testosteronspiegel wieder ab und lag in Stunde 168 nun mehr bei etwa dem Doppelten des Ausgangswertes ( $p < 0,05$ ). Alle nach der Behandlung gemessenen Werte waren gegenüber der Ausgangskonzentration erhöht ( $p < 0,05$ ).

Vor der Behandlung unterschieden sich die Testosteronwerte der Kontroll- und hCG-Gruppe nicht signifikant. Zwischen der ersten und 72. Stunde nach der Behandlung war jedoch ein tendenziell höherer Testosteronspiegel bei der hCG-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollhengsten festzustellen ( $p = 0,07$ ).

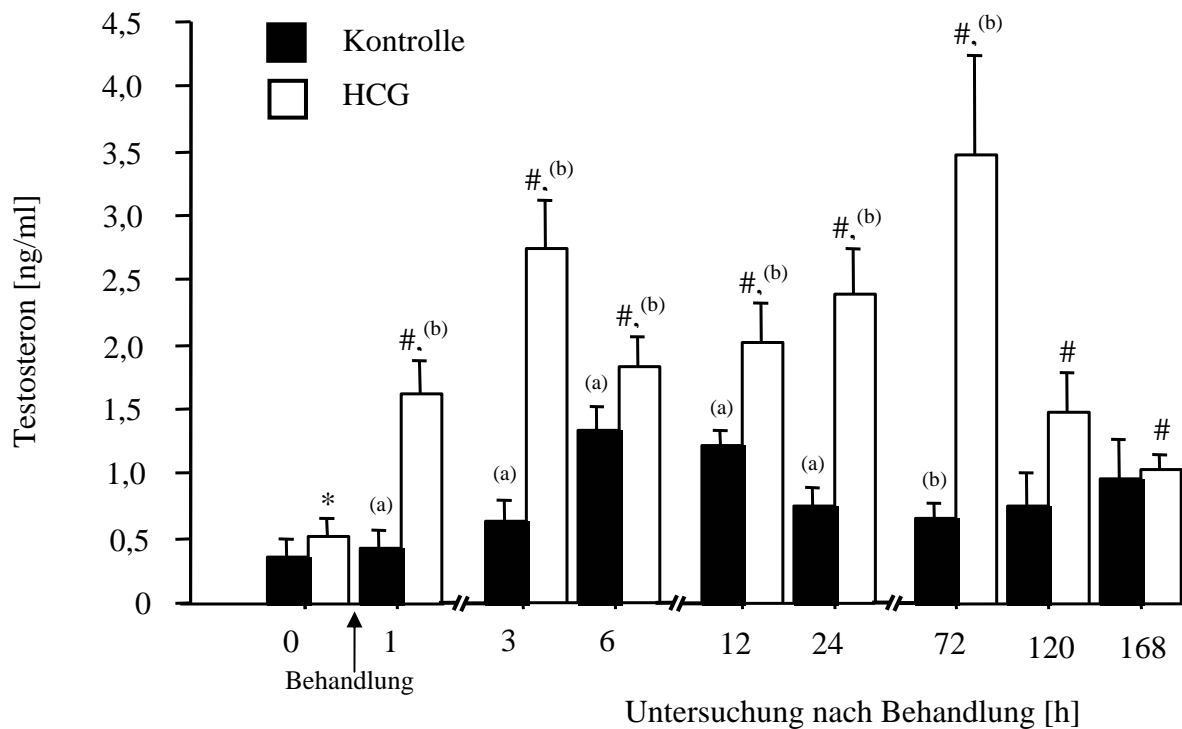


Abb. 4.13: Änderungen der Testosteronkonzentrationen im Blutplasma ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) der Hengste der Kontroll- (n = 4) bzw. hCG-Gruppe (n = 8), während des Untersuchungszeitraums.

\*, #: Unterschied zwischen den Werten verschiedener Untersuchungszeitpunkte einer Gruppe ( $p < 0,05$ ).

(a), (b): tendenzieller Unterschied zwischen verschiedenen Gruppen innerhalb eines bestimmten Zeitpunkts ( $p < 0,10$ ).

#### 4.5.2.2 Östrogene

Innerhalb der Kontrollgruppe kam es zwar zu Schwankungen der Gesamtöstrogenkonzentration (Abb. 4.14; Tab. 4.10, Anhang) und zu einem Anstieg der Werte um 28% der Ausgangswerte in Stunde 12, diese waren aber nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

Bei den Hengsten der hCG-Gruppe blieben die Östrogenwerte zunächst bis zur dritten Stunde nach der Behandlung auf dem Niveau des Ausgangswertes und stiegen 6 Stunden nach der hCG-Injektion auf das 1,6-fache gegenüber dem Wert vor der Behandlung an ( $p < 0,05$ ). Zwischen der 6. und 24. Stunde post applicationem blieben die Werte auf einem konstantem Plateau, um dann kontinuierlich bis auf 54% des Ausgangswertes in Stunde 168 abzufallen ( $p < 0,05$ ).



Die Östrogenwerte der Kontrollgruppe waren zwar etwas höher als die der hCG-Gruppe, es bestanden aber zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

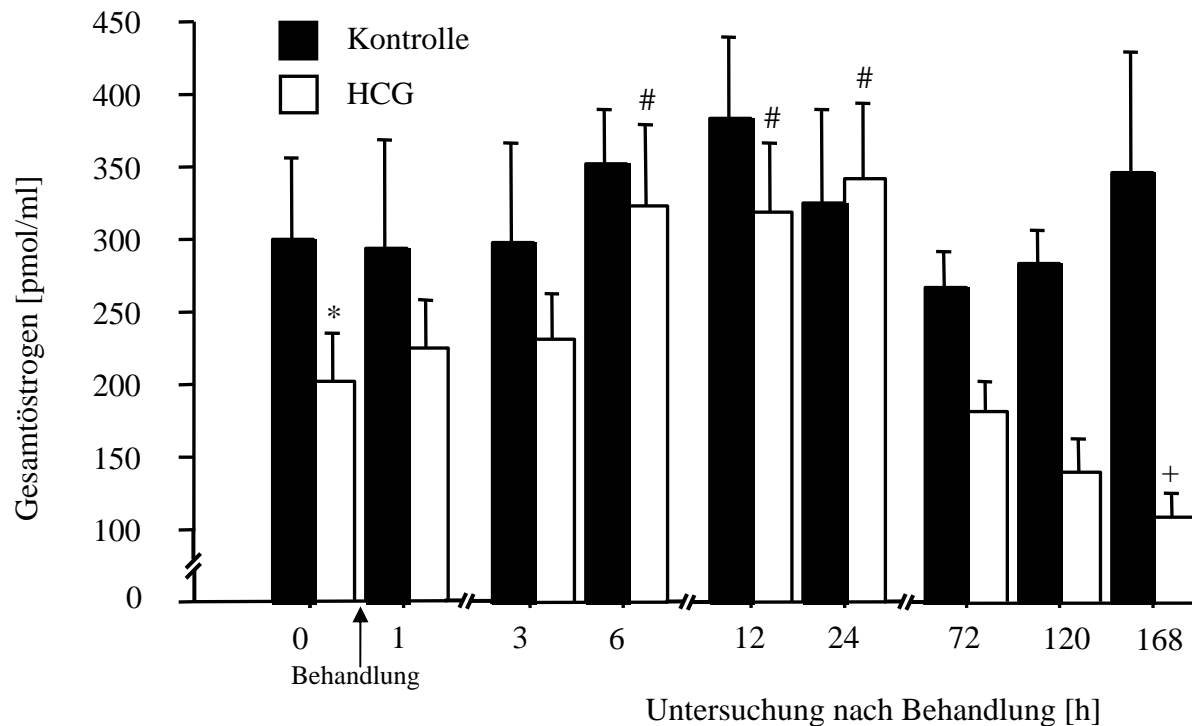


Abb. 4.14: Änderungen der Gesamtöstrogenkonzentrationen im Blutplasma ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) der Hengste der Kontroll- (n = 4) bzw. hCG-Gruppe (n = 8), während des Untersuchungszeitraums.

\*, #, +: Unterschied zwischen den Werten verschiedener Untersuchungszeitpunkte innerhalb einer Gruppe ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6 Zusammenhang zwischen testikulärem Blutfluss und Steroidhormonkonzentrationen

Es wurden zunächst die Korrelationen zwischen den Blutflussparametern BFV und PI der A. testicularis und den Steroidhormonkonzentration im Blutplasma vor Behandlungsbeginn bestimmt (Tab. 4.11). Bei den 12 Hengsten, die in diese Studie einbezogen wurden, war zu diesem Zeitpunkt kein Zusammenhang zwischen BFV und dem Testosteronspiegel festzustellen ( $p > 0,05$ ). Im Gegensatz dazu war das Blutflussvolumen hoch positiv mit der Gesamtöstrogenkonzentration korreliert (Abb. 4.15). Zwischen PI und den Steroidhormonspiegeln waren dagegen keine Zusammenhänge zu verzeichnen ( $p > 0,05$ ).

Tab. 4.11: Korrelationen zwischen den Blutflussparametern BFV und PI der A. testicularis und den Steroidhormonkonzentrationen vor Behandlungsbeginn. Es wurden die Mittelwerte der rechten und linken A. testicularis der 12 Hengste der hCG- und Kontroll-Gruppe verwendet.

	Testosteron	Gesamtöstrogen
BFV	0,37	0,90*
PI	0,18	0,01

\* Korrelation  $p < 0,05$

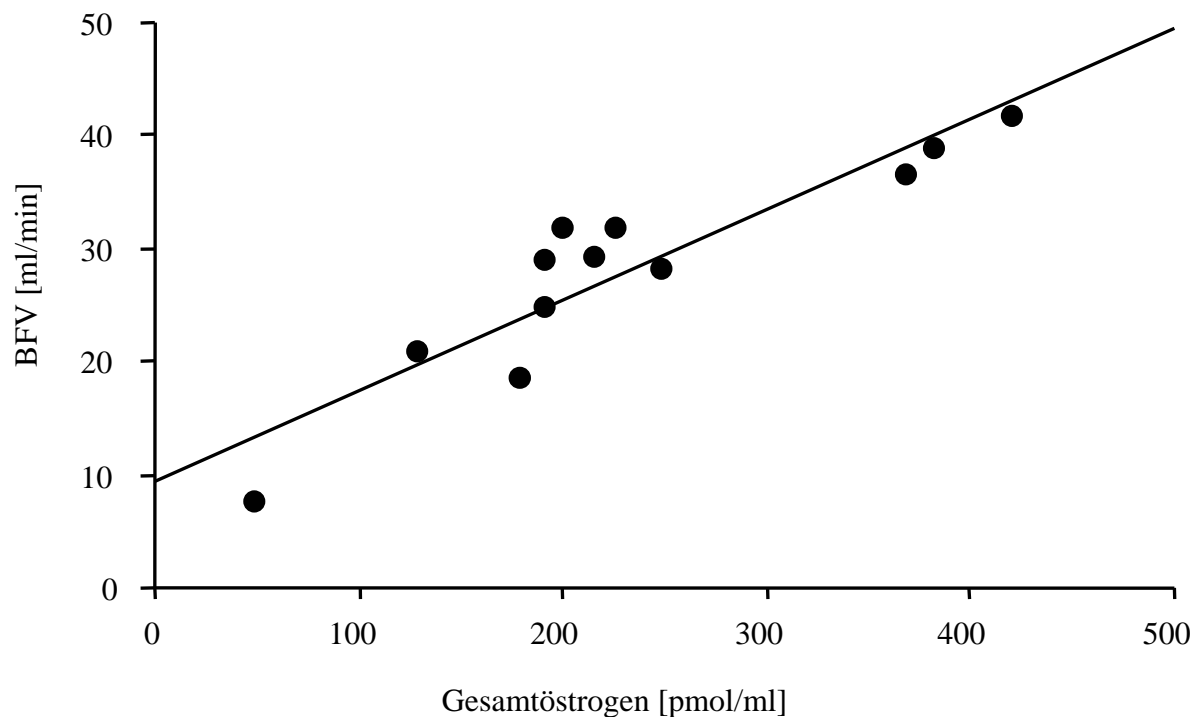


Abb. 4.15: Korrelation zwischen dem Blutflussvolumen (BFV) der A. testicularis und der Gesamtöstrogenkonzentration im Blutplasma der 12 Hengste des hCG-Versuchs. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus den BFV-Werten der linken und rechten A. testicularis mit dem dazugehörigen Östrogenwert zur Untersuchungsstunde 0.

Um die Änderungen der Blutflussparameter und Steroidhormonkonzentrationen der mit hCG behandelten Hengste unter- und miteinander vergleichen zu können, wurden für die einzelnen Parameter die Mittelwerte aus den verschiedenen Zeitpunkten gebildet und gleich 100% gesetzt und die relativen Abweichungen davon berechnet (Abb. 4.16, Abb. 4.17).

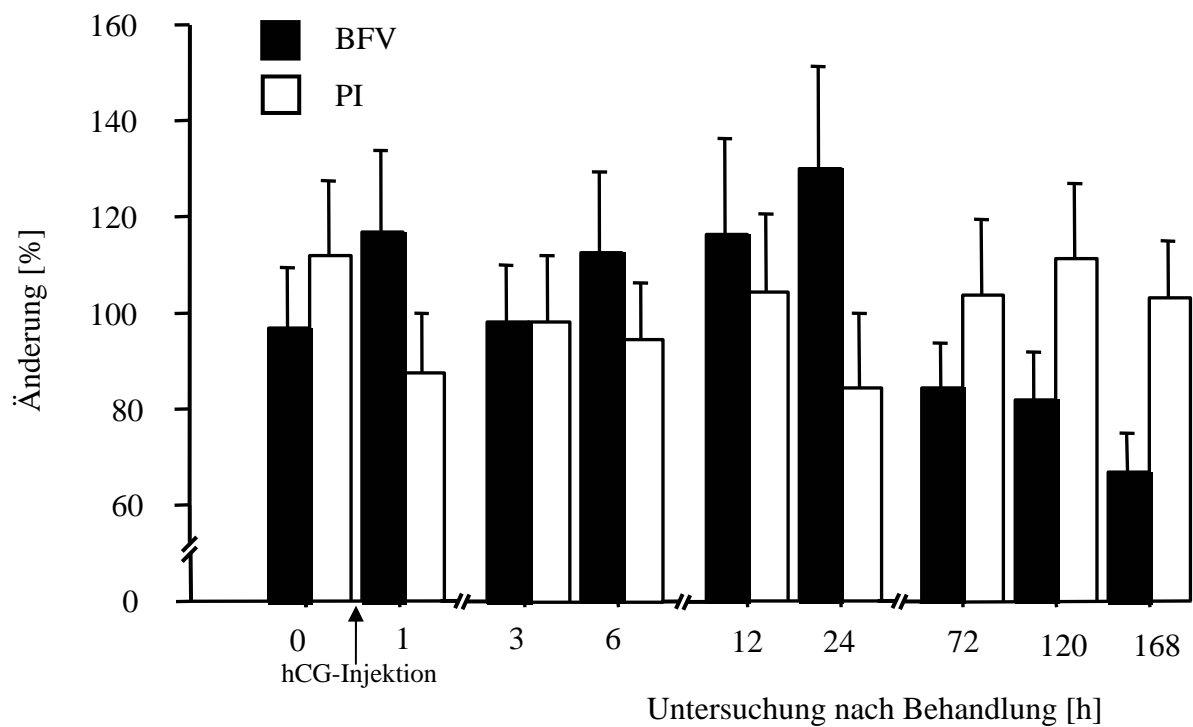


Abb. 4.16: Relative Änderung des BFV und PI der A. testicularis der Hengste der hCG-Gruppe (n = 8) während des Untersuchungszeitraums ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ). Die Mittelwerte aus allen Untersuchungszeitpunkten jeder Gruppe entsprechen jeweils 100%.

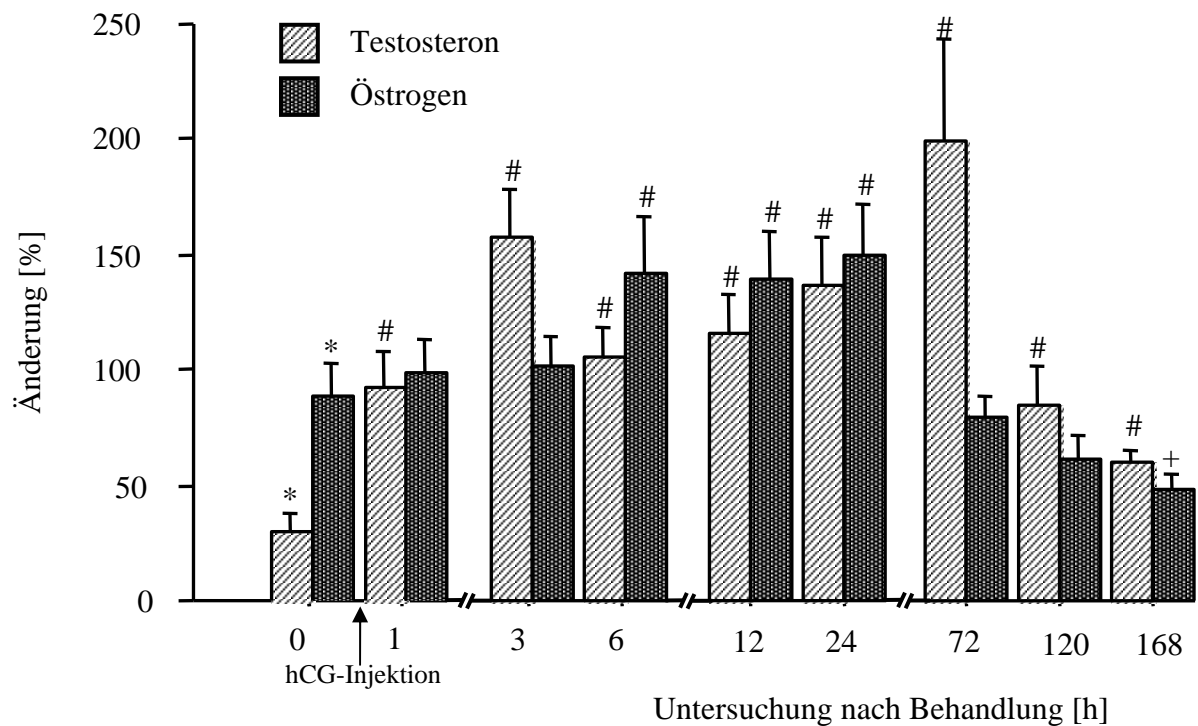


Abb. 4.17: Relative Änderung der Steroidhormonkonzentrationen der Hengste der hCG-Gruppe (n = 8) während des Untersuchungszeitraums ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ). Die Mittelwerte aus allen Untersuchungszeitpunkten jeder Gruppe entsprechen jeweils 100%.

Vergleicht man die relativen Schwankungen der Blutflussparameter miteinander, so erkennt man, dass die BFV-Werte (Min.: 67%; Max.: 130%) deutlicher variierten als die PI-Werte (Min.: 84%; Max.: 112%). Die BFV- und PI-Werte zeigten einen in etwa gegensätzlichen Verlauf. So wurden die beiden BFV-Maxima und PI-Minima zeitgleich, das heißt 1 und 24 Stunden post injectionem, gemessen.

Beim Vergleich der relativen Schwankungen der beiden Steroidhormonkonzentrationen nach der hCG-Injektion fiel auf, dass sich die Testosteronkonzentrationen (Min.: 30%; Max.: 199%) zum einen deutlicher und zum anderen nicht zeitgleich im Vergleich zu den Östrogenspiegeln (Min.: 48%; Max.: 150%) änderten. Die Testosteronkonzentrationen waren bereits unmittelbar, das heißt 1 Stunde nach der hCG-Injektion angestiegen und bis zum Ende des Untersuchungszeitraums gegenüber den Ausgangswerten erhöht. Die Östrogenspiegel stiegen dagegen erst 6 Stunden nach der Verabreichung von hCG an, blieben anschließend bis 24 Stunden post applicationem auf erhöhtem Niveau, um dann unter das Niveau der Ausgangswerte abzufallen.

Vergleicht man das Ausmaß der Schwankungen im testikulären Blutflussvolumen mit denen der Steroidhormonkonzentrationen, so fällt auf, dass nur die BFV-Werte ähnlich ausgeprägte Änderungen aufwiesen wie die Sexualsteroiden, während sich die PI-Werte nur geringfügig veränderten.

Bei der Gegenüberstellung der Veränderungen in den BFV- und Testosteronwerten zeigte sich, dass eine Stunde nach der hCG-Applikation zeitgleich die BFV-Werte und Testosteronspiegel angestiegen waren. Während das Blutflussvolumen aber 3 Stunden post injectionem bereits wieder geringgradig abnahm, erhöhten sich die Testosteronwerte bis zu 3. Stunde post injectionem, um danach wieder kurzfristig abzufallen. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen kam es zu einem erneuten Anstieg der BFV- und Testosteronwerte, wobei auch hier die BFV-Maxima früher erreicht wurden, als die höchsten Testosteronwerte. Die BFV-Werte waren 24 Stunden post injectionem am höchsten, während die Testosteronkonzentrationen ihr Maximum erst 72 Stunden nach der hCG-Applikation erreichten. Nach diesen Zeitpunkten kam es sowohl im Blutflussvolumen als auch in den Testosteronspiegeln zu einem Rückgang, wobei die Blutflussvolumina bis weit unter die Ausgangswerte absanken, während die Testosteronkonzentrationen auch zum Abschluss der Untersuchungen noch über dem Niveau vor der hCG-Applikation lagen.

Die Östrogenspiegel stiegen zwar nicht wie BFV in der ersten Stunde nach hCG-Injektion an, ab der 3. Stunde ähnelten jedoch die Blutflussveränderungen sehr den Schwankungen in

den Östrogenspiegeln. Beide Parameter stiegen bis zur Stunde 24 post injectionem an und fielen anschließend parallel zueinander bis zum Ende der Untersuchungen ab.

#### 4.7 Zusammenhang zwischen testikulärem Blutfluss und Fertilitätsdaten

Zwischen dem mittleren Blutflussvolumen der A. testicularis der Hengste des hCG-Versuchs vor Behandlungsbeginn und dem Mittelwert der Fertilitätsdaten der Jahre 1997 bis 2002 bestanden keine Korrelationen ( $p > 0,05$ ) (Tab. 4.12).

Im Gegensatz dazu konnte aber eine tendenziell negative Korrelation zwischen den PI-Werten und den Fertilitätsparametern festgestellt werden ( $p < 0,10$ ).

Tab. 4.12: Korrelationen zwischen BFV und PI der A. testicularis und dem Mittelwert der Fertilitätsdaten der Jahre 1997 bis 2002. Es wurden die Mittelwerte der rechten und linken A. testicularis vor Beginn der Behandlung verwendet ( $n = 12$ ).

	Frühgraviditätsrate pro Zyklus [%]	Abfohrate pro Zyklus [%]
BFV	0,11	-0,16
PI	-0,55 <sup>(*)</sup>	-0,56 <sup>(*)</sup>

(\*) Korrelation  $p < 0,10$

Um zu überprüfen, ob anhand der Änderungen im Blutflussvolumen nach hCG-Applikation Hinweise auf die Fertilität zu erhalten sind, wurden die mit hCG behandelten Hengste in eine Gruppe ( $n = 4$ ) fertiler und eine Gruppe ( $n = 4$ ) subfertiler Hengste unterteilt. Die fertilen Hengste hatten eine durchschnittliche Trächtigkeitsrate pro Zyklus von 46,2% und eine Abfohrate pro Zyklus von 43,1%. Bei den subfertilen Hengsten hatten zwei Hengste eine Frühgraviditätsrate pro Zyklus von 29,0 bzw. 30,4% und eine Abfohrate pro Zyklus von 24,8 bzw. 26,3%, einer zeigte zur Zeit der Untersuchung eine hochgradige Oligo- und Teratozoospermie und das Sperma des vierten Hengstes war aufgrund einer schnellen Verminderung der Spermienmotilität für das Einfrieren und den Frischspermaversand ungeeignet.

Bei der Gegenüberstellung der Schwankungen im Blutflussvolumen (Abb. 4.18; Tab. 4.13, Anhang) der fertilen und subfertilen Hengste zeigten sich keine großen Unterschiede ( $p > 0,05$ ). Auch das absolute Blutflussvolumen der beiden Gruppen unterschied sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt voneinander ( $p > 0,10$ ).

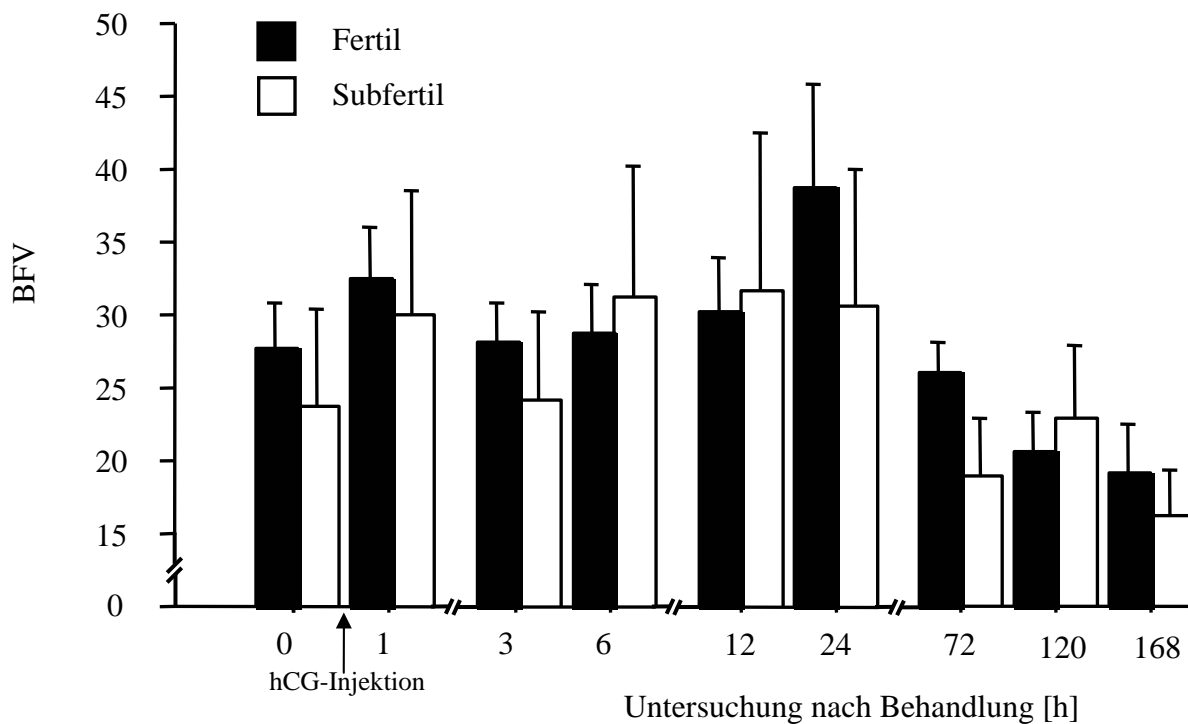


Abb. 4.18: Blutflussvolumen (BFV) der *A. testicularis* fertiler ( $n = 4$ ) und subfertiler Hengste ( $n = 4$ ) vor und nach der Behandlung mit hCG ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ).

Die Schwankungen des Widerstandsindex PI (Abb. 4.19; Tab. 4.13, Anhang) nach hCG-Injektion unterschieden sich ebenfalls nicht zwischen fertilen und subfertilen Hengsten ( $p > 0,05$ ). Die PI-Werte der subfertilen Hengste waren aber höher als die der fertilen, wobei sich diese Abweichungen aufgrund der Variationen zwischen den Hengsten nur in den Stunden 6, 24 und 72 tendenziell unterschieden ( $p < 0,10$ ).

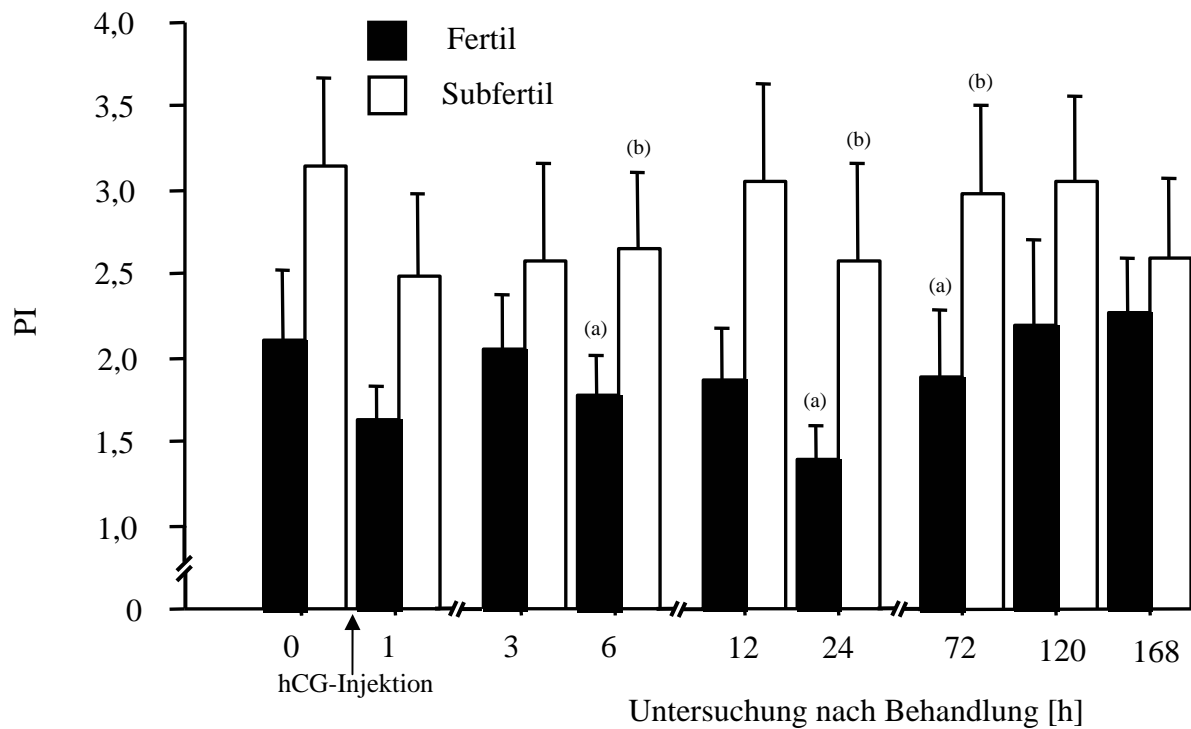


Abb. 4.19: Pulsatility Index (PI) der *A. testicularis* fertiler ( $n = 4$ ) und subfertiler Hengste ( $n = 4$ ) vor und nach der Behandlung mit hCG ( $\bar{X} \pm s\bar{x}$ ).  
<sup>(a)</sup>, <sup>(b)</sup>: tendenzieller Unterschied zwischen verschiedenen Gruppen innerhalb eines bestimmten Zeitpunkts ( $p < 0,10$ ).

Die Testosteronspiegel der fertilen und subfertilen Hengste stiegen nach der Verabreichung von hCG ähnlich stark an (Abb. 4.20; Tab. 4.14, Anhang). Die Werte der subfertilen Hengste waren aber in der Stunde 3 und 6 tendenziell niedriger als diejenigen der fertilen Hengste ( $p = 0,07$ ).

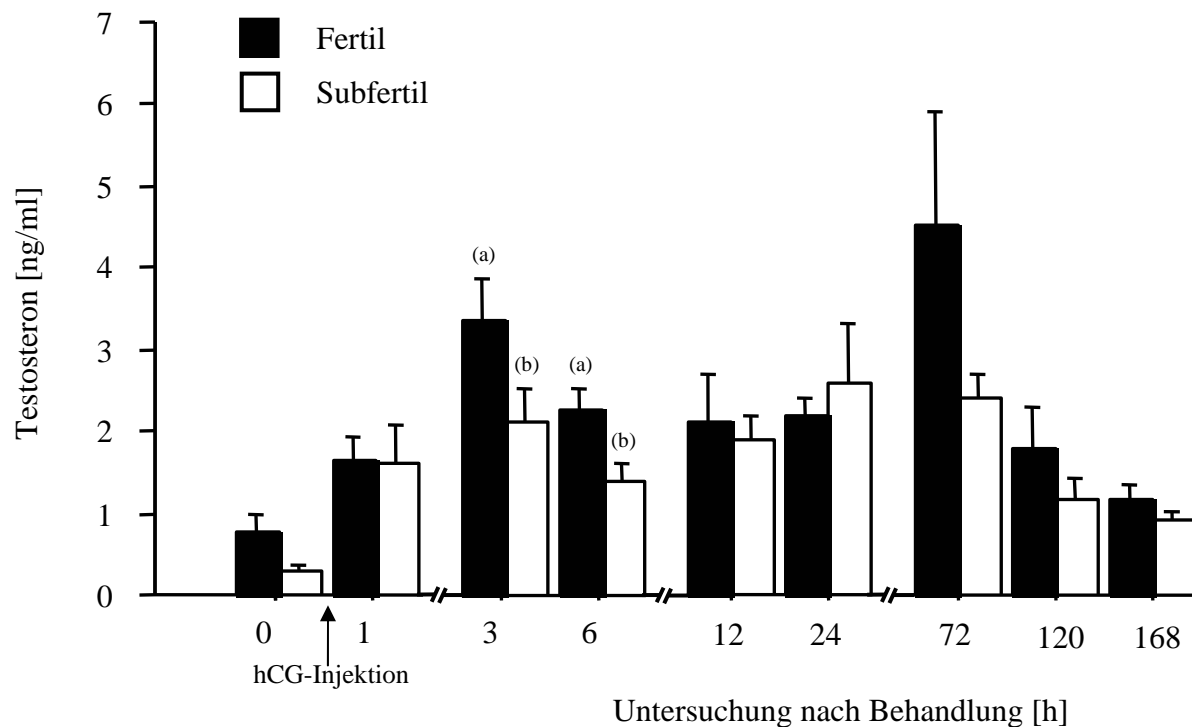


Abb. 4.20: Die Testosteronkonzentration im Blutplasma fertiler ( $n = 4$ ) und subfertiler Hengste ( $n = 4$ ) vor und nach der Behandlung mit hCG ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ).  
<sup>(a)</sup>, <sup>(b)</sup>: tendenzieller Unterschied zwischen verschiedenen Gruppen innerhalb eines bestimmten Zeitpunkts ( $p < 0,10$ ).



Auch die Schwankungen der Östrogenspiegel (Abb. 4.21; Tab. 4.14, Anhang) der beiden Gruppen zeigten keine deutlichen Unterschiede ( $p > 0,05$ ). Die Östrogenspiegel der subfertilen Hengste lagen aber bis zur Stunde 3 auf dem Niveau der Ausgangswerte, während die der fertilen Hengste bereits angestiegen waren ( $p = 0,07$ ).

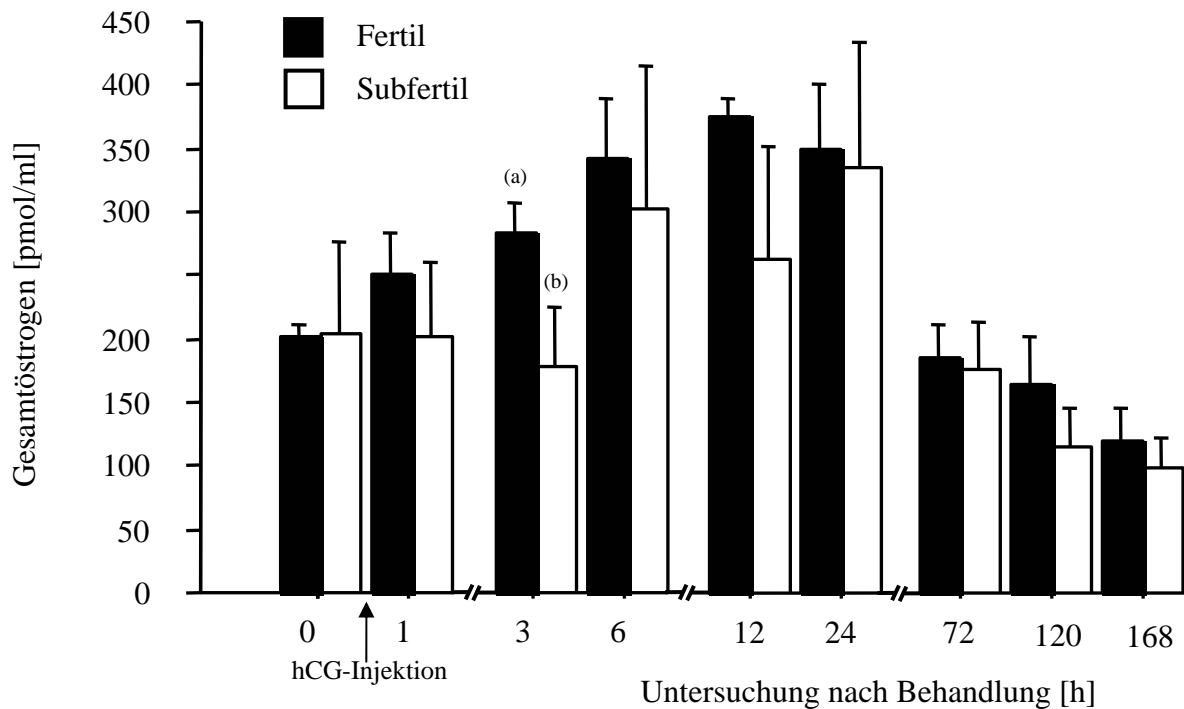


Abb. 4.21: Die Gesamtöstrogenkonzentration im Blutplasma fertiler ( $n = 4$ ) und subfertiler Hengste ( $n = 4$ ) vor und nach der Behandlung mit hCG ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ).

<sup>(a)</sup>, <sup>(b)</sup>: tendenzieller Unterschied zwischen verschiedenen Gruppen innerhalb eines bestimmten Zeitpunkts ( $p < 0,10$ ).

## 5 Diskussion

Die Hoden sind hochaktive Gewebe und produzieren täglich mehrere Milliarden Spermien. Daher sind sie sehr empfindlich gegenüber Störungen in der Versorgung mit Nährstoffen, welche vorwiegend über das Blut herantransportiert werden (Damber and Bergh, 1992; Bergh and Damber, 1993; Bergh *et al.*, 2001). So wurde in einer Reihe von Untersuchungen am Menschen (Battaglia *et al.*, 2000; Battaglia *et al.*, 2001; Biagiotti *et al.*, 2002; Tarhan *et al.*, 2003) und an verschiedenen Tierarten (Bergh *et al.*, 1988; Bergh *et al.*, 2001) nachgewiesen, dass Zusammenhänge zwischen der testikulären Durchblutung und der Spermaqualität bestehen.

Die Durchblutung der Hoden wird durch verschiedene Vasokonstriktoren und -dilatoren gesteuert. Eine bedeutende, endogen vorkommende und vasodilatatorisch wirkende Substanz stellt Stickstoffmonoxid (NO) dar (Moncada *et al.*, 1991; Inagami *et al.*, 1995). Diese Substanz wird auch im Hoden synthetisiert. Das Enzym, welches NO produziert, wurde in den Leydig- und Sertoli-Zellen, der peritubulären Lamina propria sowie den testikulären Blutgefäßen nachgewiesen (Middendorff *et al.*, 1997). Battaglia und Mitarbeiter (2000) stellten fest, dass bei Menschen ein positiver Zusammenhang zwischen den im Seminalplasma gemessenen Stickstoffmonoxidkonzentrationen, der testikulären Durchblutung und der Zahl und Qualität der Spermien besteht.

Die Freisetzung von Stickstoffmonoxid kann auch durch die exogene Applikation der Aminosäure L-Arginin bzw. von Stickstoffmonoxid-Donoren stimuliert werden. So werden entsprechende Pharmaka appliziert, um bei Herz-Kreislaufkrankungen die Durchblutung zu verbessern. In einer experimentellen Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass die Verabreichung solcher Medikamente den uterinen und ovariellen Blutfluss beim Pferd erhöhen kann (Steffen, 2000).

Neben lokal im Hoden synthetisierten Mediatoren scheinen bei der Regulation der testikulären Durchblutung auch Hormone eine wichtige Rolle zu spielen. So ist aus Untersuchungen an Labortieren bekannt, dass nach der Verabreichung von hCG, das einen Anstieg der Testosteron- und Östrogenkonzentrationen im Blutplasma bewirkt, die Blutversorgung des Hodens ansteigt (Wang *et al.*, 1984; Damber *et al.*, 1985; van Vliet *et al.*, 1988).

Auch beim Hengst induziert die exogene Applikation von hCG einen Anstieg der Testosteron- und Östrogenspiegel im Blut (Setchell and Cox, 1982; Zwain *et al.*, 1989; Roser,

1995). Roser (1995) stellte außerdem fest, dass Zusammenhänge zwischen der Zunahme der Sexualsteroidkonzentrationen und der Fertilität der Hengste bestehen. So stiegen die Östrogenspiegel bei infertilen Hengsten weit weniger deutlich an als bei subfertilen und fertilen Hengsten. Beim Hengst gibt es bisher jedoch keine Informationen über die Auswirkungen einer exogenen Verabreichung von hCG auf den testikulären Blutfluss.

Das Ziel dieser Arbeit lag zum einen darin, zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der Hodendurchblutung und der Spermienquantität bzw. -qualität sowie der Fertilität besteht. Zum anderen wurde untersucht, welchen Effekt durchblutungsfördernde Pharmaka, welche die NO-Synthese stimulieren, auf den testikulären Blutfluss und die Zahl und Qualität der Spermien haben. Außerdem wurde darauf geachtet, welchen Einfluss hCG auf die Hodendurchblutung hat und inwieweit evtl. zu beobachtende Änderungen im testikulären Blutfluss auf Schwankungen in den Testosteron- und Östrogenkonzentrationen zurückzuführen sind. Um zu überprüfen, ob möglicherweise zu beobachtende Änderungen im testikulären Blutfluss Hinweise auf die Fertilität der Hengste geben könnten und damit die Farbdopplersonographie der A. testicularis nach der Injektion von hCG als diagnostisches Hilfsmittel zur Beurteilung der Fertilität von Hengsten eingesetzt werden könnte, wurden sowohl fertile als auch subfertile Tiere untersucht.

## 5.1 Zusammenhänge zwischen den Blutflussparametern

Im Rahmen von dopplersonographischen Studien wird der Blutfluss meist anhand von Dopplerindizes, welche ein Maß für den Blutflusswiderstand in der Peripherie des untersuchten Organs darstellen, semiquantitativ erfasst (Dubinsky *et al.*, 1998; Middleton *et al.*, 1989). Am häufigsten werden hierbei die Parameter Resistance Index (RI) oder Pulsatility Index (PI) verwendet, wobei in der Regel, ohne Angabe von Gründen, nur jeweils einer dieser beiden Parameter herangezogen wird. In der vorliegenden Studie wurde daher darauf geachtet, inwieweit die Ergebnisse, welche bei Anwendung des PI bzw. RI erhalten werden, miteinander vergleichbar sind.

Es zeigte sich, dass RI zwar bei niedrigen, nicht jedoch bei hohen Werten hoch positiv mit den PI-Werten korrelierte (Abb. 4.1). Die Ursache dafür liegt in den unterschiedlichen Wertebereichen für diese beiden Dopplerindizes. Der PI kann Werte von 0 bis unendlich annehmen, während der RI nur für das Intervall von 0 bis 1 definiert ist. Bei kontinuierlicher Erhöhung des Blutflusswiderstandes nehmen zunächst beide Parameter linear zu; während

sich aber dieser Anstieg beim PI weiter linear fortsetzt, nähert sich der RI asymptotisch seinem Maximalwert von 1. Dies bedeutet, dass Blutflüsse mit hohem Widerstand mit dem PI besser zu differenzieren sind als mit dem RI. Außerdem ist anhand des RI keine Unterscheidung von Dopplerkurven ohne enddiastolischen Blutfluss, die bei manchen Hengsten in der A. testicularis zu beobachten sind, möglich, da in all diesen Fällen dieser Parameter seinen Maximalwert von 1 annimmt. Daher ist dem PI bei der Quantifizierung des testikulären Blutflusswiderstand der Vorrang gegenüber dem RI zu geben.

Die Dopplerindizes werden aber nicht nur herangezogen, um den Blutflusswiderstand zu beurteilen; häufig werden anhand dieser Parameter auch Rückschlüsse auf das Blutflussvolumen (BFV) gezogen (Maulik *et al.*, 1989; Scholtes *et al.*, 1989). So geht man davon aus, dass niedrige Dopplerindex-Werte auf eine hohe Blutversorgung des Organs hinweisen und umgekehrt. Bisher finden sich in der Literatur aber keine Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen den Dopplerindizes und dem testikulären Blutfluss. In der vorliegenden Studie wurde daher überprüft, inwieweit Korrelationen zwischen den Dopplerindizes und dem Blutflussvolumen in der A. testicularis bestehen. Hierzu wurden die beiden Blutflussparameter miteinander verglichen: zum einen bei einmaliger Untersuchung verschiedener Hengste und zum anderen bei mehrmaliger Untersuchung derselben Hengste im Laufe verschiedener Behandlungen mit Pharmaka bzw. Ergänzungsfuttermitteln sowie Hormonen.

Es zeigte sich dabei, dass die Dopplerindizes keine Rückschlüsse auf das absolute Blutflussvolumen zulassen. Die RI- und PI-Werte, die bei den verschiedenen Hengsten vor der Behandlung bestimmt wurden, korrelierten nicht mit den Blutflussvolumina in der A. testicularis (Tab. 4.2). Dieses Ergebnis entspricht der Beobachtung, welche bei der farbdopplersonographischen Untersuchung der uterinen Durchblutung der Stute (Diaz-Peinado, 2003; Ratjen, 2003) gemacht wurde. Hierbei konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen BFV und PI festgestellt werden. Es scheint aber im Widerspruch zu stehen mit den Resultaten experimenteller Untersuchungen der Durchblutung der Nabelschnurarterie von Schaffeten (Maulik *et al.*, 1989). Hierbei wurde mit Hilfe einer Klemme der Blutfluss vermindert und dabei eine hohe negative Korrelation ( $r = -0,84$ ;  $p < 0,05$ ) zwischen den Änderungen des Blutflussvolumens und denen des PI-Wertes festgestellt. Bei einer kritischen Bewertung der Resultate dieser Studien ist jedoch zu beachten, dass nach Scholtes *et al.* (1989) und Maulik *et al.* (1989) dieser Zusammenhang zwischen BFV und PI nur bei konstanten hämodynamischen Bedingungen wie Blutdruck, Herzleistung, Viskosität des Blutes und Gefäßwandelastizität gilt. Es ist aber nicht davon auszugehen, dass solche

identischen Verhältnisse bei verschiedenen Hengsten vorliegen. So ist zum Beispiel bekannt, dass in der Aufzweigung und im Durchmesser der A. testicularis ausgeprägte individuelle Variationen bestehen (Heinze and Ptak, 1976; Jantosovicova and Jantosovic, 1983; Pozor and Kolonko, 2000).

Betrachtet man die Änderungen der Blutflussparameter BFV und PI nach der Injektion von hCG, dann zeigt sich, dass unter diesen Bedingungen negative Zusammenhänge zwischen den beiden Parametern bestehen. So waren zu den Zeitpunkten, in denen die höchsten BFV-Werte gemessen wurden, die PI-Werte am niedrigsten (Abb. 4.16). Dies weist darauf hin, dass nach einer hCG-Injektion die hämodynamischen Verhältnisse weitgehend konstant bleiben. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit FertilAid-for-Stallions™, das unter anderem L-Arginin enthält, welches ein wichtiges Substrat für die NO-Synthese darstellt, sowohl zu einem Abfall der BFV- als auch der PI-Werte (Abb. 4.2, Abb. 4.3). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass durch dieses Ergänzungsfuttermittel auch die Hämodynamik beeinflusst wird. Es ist beispielsweise bekannt, dass NO vasodilatatorisch wirkt und so die hämodynamischen Verhältnisse verändert werden (Moncada *et al.*, 1991; Inagami *et al.*, 1995).

## **5.2            Auswirkungen von FertilAid-for-Stallions™ und Molsidomin auf die Hodendurchblutung bzw. die Spermaqualität**

Es wurde das Ergänzungsfuttermittel FertilAid-for-Stallions™ und das bislang nur in der Humanmedizin eingesetzte Medikament Molsidomin daraufhin überprüft, ob sie Auswirkungen auf den testikulären Blutfluss und die Spermaqualität haben. FertilAid-for-Stallions™ enthält neben anderen Substanzen auch L-Arginin, das als Substrat für die NO-Synthese dient und bei Molsidomin handelt es sich um ein Medikament, aus dem nach Metabolisierung in der Leber NO freigesetzt wird.

FertilAid-for-Stallions™ führte vorübergehend in der zweiten Woche nach Behandlungsbeginn zum Abfall des Blutflussvolumens, während am Ende der Untersuchungsperiode wieder die Ausgangswerte zu verzeichnen waren (Abb. 4.2). Dieses Ergebnis erscheint etwas überraschend, da die ursprüngliche Hypothese war, dass das in diesem Ergänzungsfuttermittel enthaltene L-Arginin zu einer Vasodilatation und dadurch zu einem Anstieg in der testikulären Durchblutung führt. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass, wie bereits erwähnt, das Enzym, welches NO aus L-Arginin synthetisiert nicht nur im Hoden,

sondern in verschiedensten Organsystemen vorkommt, und es damit durch die Verabreichung von L-Arginin nicht nur zu einem Anstieg des NO-Spiegels im Hoden, sondern auch in anderen Organen kommen kann. Hinckley et al. (1996) stellten bei ihren Untersuchungen zur Durchblutung der Extremitäten bei Pferden eine Vasodilatation und damit eine Blutflussverbesserung nach der Verabreichung von NO-Donoren fest. So könnte das Blut vorwiegend in ein anderes Organ, das mehr NO-Synthase (NOS) als der Hoden enthält, umgeleitet worden sein und dies zum Abfall in der testikulären Blutversorgung geführt haben. Für diese These spricht auch die Tatsache, dass im Hoden die Mechanismen zur Regulation der Durchblutung nur vergleichsweise schwach ausgeprägt sind (Setchell, 1970; Damber and Janson, 1978; Bergh and Damber, 1993) und sich daher NO vermutlich stärker auf die Durchblutung anderer Organe auswirkt.

Für die Beobachtung, dass BFV nur vorübergehend in den ersten beiden Behandlungswochen abfiel und zum Ende der Untersuchungsperiode wieder angestiegen war, kommen unterschiedliche Ursachen in Frage: zum einen könnte es daran liegen, dass in den ersten beiden Wochen die doppelte Menge FertilAid-for-Stallions<sup>TM</sup> im Vergleich zu den übrigen Wochen verabreicht wurde, zum anderen wäre auch eine „Down-Regulation“ der NOS durch die Applikation von L-Arginin denkbar, d.h. es könnte zu einer reduzierten Expression oder auch zu einer herabgesetzten Aktivität dieses Enzyms kommen. Ein negativer Effekt auf die Expression der mRNA von NOS wurde nach der exogenen Gabe von NO-Donoren auch von Rohr (2003) nachgewiesen.

Der kontinuierliche Abfall der PI-Werte während des Behandlungszeitraums bekräftigt die Vermutung, dass FertilAid-for-Stallions<sup>TM</sup> eine vasodilatatorische Wirkung ausübt (Abb. 4.3). Obwohl auch andere Stoffe in diesem Ergänzungsfuttermittel enthalten sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass L-Arginin für die Gefäßerweiterung verantwortlich ist, da von den anderen Substanzen bisher keine solchen Effekte beschrieben wurden.

Nach der Behandlung mit Molsidomin änderte sich weder das Blutflussvolumen noch der Gefäßwiderstand (Abb. 4.2, Abb. 4.3). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die bereits erwähnte „Down-Regulation“ der NOS sein (Rogers and Ignarro, 1992; Assreuy *et al.*, 1993; Buga *et al.*, 1993; Rosselli *et al.*, 1994; Rosselli *et al.*, 1998). Auch ist eine Unterdosierung von Molsidomin nicht auszuschließen, da dieses Medikament bisher noch nicht beim Pferd eingesetzt wurde und somit noch keine Informationen über dessen Dosierung vorliegen. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Molsidomin-Dosis nach Vorversuchen, bei denen der Blutdruckabfall am Pferd bei ansteigender Dosierung des Medikamentes gemessen wurde, ermittelt.

Betrachtet man die Spermaqualität während der Versuchsphase, dann fällt auf, dass sich sowohl bei der FertilAid- als auch bei der Molsidomin-Gruppe die Parameter Ejakulatvolumen, Spermiengesamtzahl, Vorwärtsbeweglichkeit sowie Prozentsatz vitaler und akrosomaler Status nicht oder nur geringfügig änderten (Abb. 4.4 bis Abb. 4.8). Diese Ergebnisse stehen scheinbar im Widerspruch zu den Beobachtungen anderer Autoren, die positive Effekte von NO auf diese Spermaeigenschaften fanden (Hellstrom *et al.*, 1994; Lewis *et al.*, 1996; Creech *et al.*, 1998; Yeoman *et al.*, 1998; Battaglia *et al.*, 2000). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass diese Resultate auf Untersuchungen beruhen, bei denen lediglich überprüft wurde, inwieweit Zusammenhänge zwischen endogenen NO-Spiegeln und der Spermaqualität bestehen bzw. in wieweit die Verabreichung von NO-Donoren in-vitro sich auf die Spermaparameter auswirkt. Es ist keine Untersuchung bekannt, bei der die Effekte von Substanzen, welche in vivo den NO-Spiegel erhöhen, in ihrer Wirkung auf das Sperma überprüft wurden. Außerdem ist anzumerken, dass bei den in der Literatur beschriebenen Studien, bei denen der Zusammenhang zwischen endogenen NO-Spiegeln und Spermaqualität überprüft wurde, fertile und infertile Männer verglichen wurden. In der eigenen Studie wurden jedoch nur Hengste ohne Fertilitätsstörungen untersucht.

Die Chromatinstruktur der Spermien war der einzige Parameter, der deutlichere Schwankungen während des Versuchszeitraums aufwies. Die DFI-Spermien, d.h. der Anteil der Spermien mit Veränderungen in der Chromatinstruktur, nahm in der Kontrollgruppe zwischen den Zeitpunkten 2 und 3, also zwischen Mitte Dezember und Ende Januar deutlich zu und auch die Werte der Hengste der Molsidomin-Gruppe stiegen an (Abb. 4.9). Die Ursache für diesen Anstieg ist nicht bekannt. Sie könnte dadurch bedingt sein, dass im Januar aufgrund der bereits beginnenden Besamungssaison die Hengste häufiger, d.h. teilweise täglich deseminiert wurden und sich diese erhöhte Belastung negativ auf die Chromatinstruktur der Spermien auswirkte. Es sind jedoch bisher keine Studien über solche Zusammenhänge bekannt. Im Gegensatz zu den Hengsten der Kontroll- und Molsidomin-Gruppe waren bei den Tieren, denen FertilAid-for-Stallions<sup>TM</sup> gefüttert wurde, keine Unterschiede in der Chromatinstruktur zwischen den Zeitpunkten vor und am Ende der Behandlungsperiode festzustellen. Es kam sogar in der zweiten Woche nach Versuchsbeginn vorübergehend zu einem Abfall der DFI-Spermien um 30%. FertilAid-for-Stallions<sup>TM</sup> scheint also einen positiven Effekt auf die DNA-Integrität der Spermien zu haben. Es wurden zwar bisher keine Untersuchungen über den Effekt von NO auf die Chromatinstruktur der Spermien durchgeführt, man weiß jedoch, dass, abhängig vom Redoxstatus in der Zelle, NO

entweder Radikale abfangen oder aber deren Freisetzung stimulieren kann (Herrero *et al.*, 2001). Außerdem gibt es Studien darüber, dass erhöhte Konzentrationen an Sauerstoffradikalen die DNA-Integrität negativ beeinflussen (Wang *et al.*, 2003; Moustafa *et al.*, 2004). So könnte in der vorliegenden Untersuchung der durch L-Arginin induzierte Anstieg der NO-Spiegel bei entsprechendem Redoxstatus der Spermien die Bildung von Sauerstoffradikalen gehemmt und damit die Chromatinstruktur der Spermien positiv beeinflusst haben.

Interessant ist, dass die bei der FertilAid-Gruppe beobachteten Änderungen des Anteils an DFI-Spermien den Schwankungen im testikulären Blutflussvolumen glichen. In der zweiten Woche nach Behandlungsbeginn nahmen sowohl die testikuläre Blutversorgung als auch der prozentuale Anteil der DFI-Spermien ab, um beide am Ende des Behandlungszeitraums wieder ihr Ausgangsniveau zu erreichen (Abb. 4.10). Dagegen wurde vor Beginn der Behandlung kein positiver Zusammenhang zwischen der testikulären Blutversorgung und dem Ausmaß an Störungen der DNA-Integrität festgestellt (Tab. 4.8). Bagiotti *et al.* (2002) sowie Tarhan *et al.* (2003) stellten positive Korrelationen zwischen Blutversorgung und Spermiengesamtzahl fest. Es ist aus der Literatur aber keine Untersuchung bekannt, bei der der Einfluss der testikulären Durchblutung auf den Parameter DNA-Integrität der Spermien überprüft wurde. Nach Setchell und Maddocks (1994) und Zheng and Olive (1997) ist das Hodengewebe relativ schlecht mit Blut versorgt und damit der Sauerstoffpartialdruck relativ niedrig. Dies sei nach Ansicht mehrerer Autoren wichtig, damit möglichst wenig Sauerstoffradikale, welche die Spermien schädigen könnten, gebildet werden (Max, 1992; Setchell and Maddocks, 1994; Aitken, 1999). So könnte sich die durch die Applikation von FertilAid-for-Stallions<sup>TM</sup> abgefallene Blutversorgung über eine Reduzierung der Sauerstoffradikalbildung positiv auf die Chromatinstruktur ausgewirkt haben. Diese Interpretation widerspricht jedoch der Ansicht verschiedener Autoren, dass es bereits bei einer geringen Reduktion des Sauerstoffgehalts zu Schädigungen im Hoden kommt (Lissbrant *et al.*, 1997; Bergh *et al.*, 2001).

### **5.3 Zusammenhang zwischen dem testikulären Blutfluss und der Spermaqualität**

Vergleicht man statt der relativen Änderungen des Blutflusses und der Spermaqualität die absoluten Werte, in dem man die BFV- und PI-Werte der einzelnen Hengste vor Behandlungsbeginn nimmt und mit den Spermaparametern in Beziehung setzt, so stellt man



fest, dass zwischen dem testikulären Blutflussvolumen und der Spermiengesamtzahl positive Zusammenhänge bestehen (Tab. 4.8). Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da einerseits eine positive Korrelation zwischen dem Hodenvolumen und der Spermiengesamtzahl besteht (Pickett, 1993) und andererseits auch davon ausgegangen werden kann, dass mit zunehmendem Hodengewebe der Nährstoffbedarf und damit die testikuläre Durchblutung ansteigt. Auch Tarhan et al. (2003) fanden bei Männern mit Varikozelen eine positive Korrelation zwischen den BFV-Werten der A. testicularis und dem Hodenvolumen. Dagegen waren Zusammenhänge zwischen der Höhe des Blutflusswiderstandes und dem Hodenvolumen bei den Hengsten nicht festzustellen. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da, wie bereits erwähnt, keine Korrelation zwischen den Dopplerindizes und dem Blutflussvolumen bestand.

Die fehlende Beziehung zwischen den testikulären Blutflusswerten und der Mehrzahl der untersuchten Spermaparameter steht im Widerspruch zu den Ergebnissen dopplersonographischer Untersuchungen am Menschen, bei denen infertile Patienten mit einer Asthenozoospermie höhere Dopplerindex-Werte aufwiesen als fertile Männer mit einem physiologischen Spermogramm (Battaglia *et al.*, 2000). Hierbei ist jedoch darauf hinzuweisen, dass in der eigenen Studie keine infertilen, sondern nur fertile Zuchthengste untersucht wurden. Es ist nicht auszuschließen, dass infertile Hengste mit einem deutlich veränderten Spermogramm andere Blutflusswerte aufweisen als zuchttaugliche Tiere und sich dadurch, entsprechend zu den humanmedizinischen Studien, ein solcher Zusammenhang ergeben würde.

#### **5.4 Auswirkungen der Applikation von humanem Choriongonadotropin (hCG) auf die Hodendurchblutung bzw. die Steroidhormonkonzentrationen**

Die Verabreichung von hCG führte bei Hengsten zu einem ähnlichen Anstieg im testikulären Blutfluss, wie er im Rahmen experimenteller Studien an der Ratte beobachtet worden war (Damber *et al.*, 1981; Setchell and Sharpe, 1981; Damber *et al.*, 1985; Damber *et al.*, 1987a). So wurde beim Hengst eine wellenförmige Änderung in der testikulären Durchblutung nach der Verabreichung von hCG festgestellt, mit Maximalwerten für BFV und Minimalwerten für PI zu den Zeitpunkten 1 und 24 Stunden post injectionem (Abb. 4.16). Die Erhöhung der testikulären Blutversorgung war bei den Hengsten jedoch nicht so deutlich ausgeprägt wie bei der Ratte. Statt eines Blutflussanstiegs um das Zwei- bis Dreifache,

welcher bei der Ratte beobachtet worden war, kam es bei den Hengsten nur zu einer Zunahme des Blutflussvolumens um 35%. Beim Vergleich dieser Ergebnisse muss aber berücksichtigt werden, dass bei den in der Literatur beschriebenen Studien Ratten verwendet wurden, denen hCG subkutan und in einer relativ zum Körpergewicht deutlich höheren Dosis verabreicht wurde.

Die bei der Ratte beobachtete Zunahme des testikulären Blutflusses nach der Verabreichung von hCG wird von vielen Autoren mit einer Erhöhung der Testosteronspiegel in Verbindung gebracht (Damber *et al.*, 1981; Wang *et al.*, 1983; Wang *et al.*, 1984; Damber *et al.*, 1985; Damber *et al.*, 1987b).

Auch in der vorliegenden Studie konnte nach der Applikation von hCG der bei Pferden geschilderte biphasische Verlauf von Testosteron beobachtet werden. Es kam aber statt in der ersten Stunde (Cox *et al.*, 1973; Amann and Ganjam, 1981; Setchell and Cox, 1982; Roser, 1995) und nach zwei bis drei Tagen (Silberzahn *et al.*, 1988; Zwain *et al.*, 1989, Cox and Redhead, 1990; Roser, 1995) in der dritten Stunde und nach drei Tagen zu den maximalen Testosteronspiegeln (Abb. 4.13). Auch waren die Maxima niedriger als diejenigen anderer Studien (Cox *et al.*, 1973; Setchell and Cox, 1982; Silberzahn *et al.*, 1988; Zwain *et al.*, 1989; Cox and Redhead, 1990; Roser, 1995). Dies liegt vermutlich daran, dass bei den in der Literatur beschriebenen Studien mit 10.000 IE hCG bei Großpferden (Silberzahn *et al.*, 1988; Zwain *et al.*, 1989; Roser, 1995) bzw. 6000 IE bei Ponys (Cox *et al.*, 1973; Setchell and Cox, 1982; Cox and Redhead, 1990) eine deutlich höhere Dosis eingesetzt wurde als in der eigenen Arbeit, bei der den Hengsten 5.000 IE hCG verabreicht wurde.

Vergleicht man die Schwankungen der Testosteronspiegel mit denen der testikulären Durchblutung, dann zeigt sich, dass die Blutflusswerte der A. testicularis früher anstiegen als die der Testosteronspiegel (Abb. 4.16, Abb. 4.17). Diese Beobachtung widerspricht allerdings der Ansicht, dass Testosteron für die Regulation der testikulären Blutversorgung verantwortlich ist (Damber *et al.*, 1992).

Da bekanntlich bei der Metabolisierung von Testosteron Östrogene gebildet werden und diese nachgewiesenermaßen einen starken vasodilatatorischen Effekt haben, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich überprüft, inwieweit sich die Plasmaöstrogenspiegel nach der Applikation von hCG änderten und ob diese mit den Blutflussschwankungen in Zusammenhang stehen.

Es zeigte sich, dass hCG, ähnlich wie in der Literatur beschrieben (Silberzahn *et al.*, 1989; Zwain *et al.*, 1989; Roser, 1995), einen Anstieg der Gesamtöstrogenkonzentrationen induziert (Abb. 4.14). Es kam aber nicht, wie von Roser (1995) beschrieben, bereits in der

ersten Stunde post applicationem zur Erhöhung der Östrogene, sondern erst 6 Stunden danach. Die Hormonspiegel blieben bis zur Stunde 24 auf hohem Niveau, um anschließend wieder deutlich unter das Ausgangsniveau abzufallen.

Vergleicht man die Änderungen der Testosteron- und Östrogenspiegel miteinander, wird deutlich, dass die Östrogenschwankungen zeitlich versetzt zu denjenigen des Testosterons auftraten (Abb. 4.17). Dies spricht für die von einigen Autoren (Zwain *et al.*, 1989; Roser, 1995) postulierte Metabolisierung von Testosteron zu Östrogen. Betrachtet man die Änderungen im testikulären Blutfluss mit denen der Östrogenspiegel, dann stellt man fest, dass diese relativ ähnlich waren. Dies spricht dafür, dass die nach der hCG-Injektion beobachteten Blutflussschwankungen vorwiegend auf die dadurch ausgelösten Änderungen in den Östrogenspiegeln zurückzuführen sind. Östrogene scheinen aber auch physiologischerweise eine wichtige Rolle bei der Regulation der Hodendurchblutung zu spielen, da auch bei den unbehandelten Hengsten eine hohe Korrelation ( $r = 0,90$ ;  $p < 0,05$ ) zwischen dem Blutflussvolumen und den Plasmaöstrogenspiegeln zu verzeichnen war.

Der bereits eine Stunde nach der Applikation von hCG beobachtete Anstieg in der testikulären Durchblutung ist dagegen nicht östrogenbedingt, da zu diesem Zeitpunkt die Konzentration dieses Hormons noch nicht zugenommen hatte. Diese Zunahme in der Hodendurchblutung könnte auf einem direkten Effekt von hCG auf das testikuläre Gefäßsystem, wie er in mehreren Studien (Damber *et al.*, 1986; Bergh and Damber, 1987; Bergh and Damber, 1993) bei der Ratte beobachtet wurde, zurückzuführen sein. Bei dieser Tierart wurden eine Stunde nach der Injektion von hCG entzündungsähnliche Symptome mit einer Hemmung der Vasomotion und einer Relaxation der praekapillären Sphinkter festgestellt.

## **5.5 Zusammenhang zwischen dem testikulären Blutfluss und den Fertilitätsdaten**

Es bestanden zwar keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den testikulären Blutflussparametern und der Fertilität der Hengste, tendenziell waren jedoch negative Korrelationen zwischen den PI-Werten und der Frühgraviditätsrate ( $r = -0,55$ ;  $p < 0,10$ ) bzw. Abfohlrate pro Zyklus ( $r = -0,56$ ;  $p < 0,10$ ) festzustellen (Tab.4.12). Bei der Betrachtung der Fertilitätsdaten muss aber berücksichtigt werden, dass diese nicht die Fertilitätsleistung der Untersuchungsaison widerspiegeln, sondern Mittelwerte vorangegangener Decksaisons darstellen. Es ist aber nicht davon auszugehen, dass diese Fertilitätsdaten stark von einander

abweichen. Wie bereits erwähnt, sind Zusammenhänge zwischen testikulären Blutflussparametern und der Fertilität auch im Rahmen humanmedizinischer Untersuchungen, bei denen der Blutflusswiderstand zwischen fertilen und infertilen Patienten verglichen wurde, nachgewiesen worden. Die Ursachen dafür sind noch nicht eindeutig geklärt. Es ist jedoch anzunehmen, dass es aufgrund pathologischer Veränderungen, wie einer Fibrosierung des Hodengewebes inklusive der Gefäße, ähnlich wie in anderen Geweben (Buturovic-Ponikvar and Visnar-Perovic, 2003; Aube *et al.*, 2004) zur Erhöhung des Blutflusswiderstandes kommt. Da in der eigenen Arbeit keine klinisch nachweisbaren krankhaften Veränderungen an den Hoden der Hengste zu verzeichnen waren, sind die Zusammenhänge zwischen Blutflusswiderstand und Fertilität vermutlich nicht so deutlich ausgeprägt wie bei den Studien am Menschen, bei denen auch Männer mit Pathologien am Hoden in die Studie aufgenommen wurden.

Eine weitere mögliche Ursache für die inverse Beziehung zwischen Blutflusswiderstand und Fertilität könnte eine von Collin *et al.* (1996 a, b) beschriebene testikuläre Fehlfunktion sein, bei der es zur Überproduktion verschiedener Vasokonstriktoren kommt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass eine solche Erkrankung nicht nur mit einer Vasokonstriktion und damit einer Erhöhung des Blutflusswiderstandes verbunden ist, sondern auch mit Fertilitätsstörungen.

Die Änderungen der Blutflussparameter und der Hormonspiegel nach der hCG-Injektion ließen keine Rückschlüsse auf die Fertilität der Hengste zu. Beim Vergleich der Änderungen der Blutflussparameter der *A. testicularis* nach der Verabreichung von hCG zwischen fertilen und subfertilen Hengsten ergaben sich keine deutlichen Unterschiede, d.h. bei den fertilen und subfertilen Hengsten kam es zu ähnlichen Schwankungen im Blutfluss (Abb. 4.18, Abb. 4.19). Auch die Änderungen der Hormonspiegel waren bei beiden Hengstgruppen ähnlich (Abb. 4.20, Abb. 4.21).

Roser (1995) hatte bei infertilen Hengsten im Gegensatz zu fertilen und subfertilen Tieren nach der Verabreichung von hCG keinen Anstieg der Testosteron- und Östrogenspiegel festgestellt. Da in der vorliegenden Studie ein guter Zusammenhang zwischen der Reaktion von Östrogen und derjenigen des testikulären Blutflusses auf die Injektion von hCG nachzuweisen wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass bei infertilen Hengsten nicht nur die Änderungen in den Östrogenkonzentrationen, sondern auch diejenigen des testikulären Blutflusses ausbleiben. In diesem Falle könnte die Farbdopplersonographie in Kombination mit der hCG-Injektion als diagnostische Hilfsmittel zur Bestimmung oder zumindest als Hinweis auf die Fertilität der Hengste zum Einsatz kommen.

## 5.6 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Bestimmung des Blutflusswiderstandes mit Hilfe des Resistance Index bzw. Pulsatility Index in der A. testicularis beim Hengst keine Rückschlüsse auf das testikuläre Blutflussvolumen zulässt.

Die Spermienzahl, nicht aber die anderen Spermaparameter hängt mit dem testikulären Blutflussvolumen zusammen.

Die Applikation des Ergänzungsfuttermittels FertilAid-for-Stallions™, das unter anderem die Aminosäure L-Arginin enthält, welches das Substrat für die Stickstoffmonoxidsynthese darstellt, bewirkte überraschenderweise keinen Anstieg, sondern eine vorübergehende Reduzierung des testikulären Blutflussvolumens. Diese Änderung im testikulären Blutflussvolumen hatte keine Auswirkungen auf die Zahl der Spermien. Hinsichtlich der Spermaqualität war parallel zum Abfall in der Hodendurchblutung eine kurzzeitige Verbesserung der Integrität der DNA der Spermien festzustellen. Die Applikation des Stickstoffmonoxid-Donors Molsidomin wirkte sich weder auf die testikuläre Durchblutung noch die Spermaqualität aus.

Die Blutversorgung hängt in hohem Maße von den Östrogenspiegeln ab. So bestanden positive Zusammenhänge zwischen dem testikulären Blutfluss und den Plasmaöstrogenspiegeln vor und nach der Applikation von hCG.

Die Änderungen der Blutflussparameter und der Hormonspiegel nach der Injektion von hCG lassen aber keine Differenzierung zwischen fertilen und subfertilen Hengsten zu.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu überprüfen, ob sich bei Hengsten durch die medikamentelle Beeinflussung des Stickstoffmonoxid-Systems die testikuläre Durchblutung und die Spermaqualität verbessern lassen. Außerdem sollte untersucht werden, ob sich hCG auf die Durchblutung des Hodens auswirkt und inwieweit dies mit den Änderungen der Sexualsteroidkonzentrationen im Blutplasma in Zusammenhang steht. Hierbei wurde zwischen fertilen und subfertilen Hengsten differenziert.

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 30 Warmbluthengsten durchgeführt. Im ersten Versuchsteil wurde jeweils 6 Hengsten das Ergänzungsfuttermittel FertilAid-for-Stallions™ (Fa. Total Health Enhancement Inc., USA) bzw. der Stickstoffmonoxid-Donor Molsidomin (Molsidomin retard-ratiopharm® 8) über einen Zeitraum von 8 Wochen zweimal täglich oral verabreicht. Dabei bekamen die mit FertilAid-for-Stallions™ behandelten Hengste in den ersten beiden Wochen die doppelte Dosis (71g) und danach die einfache verabreicht. Sechs unbehandelte Hengste dienten als Kontrollgruppe. Molsidomin wurde in einer Dosierung von zweimal täglich 8 g appliziert. Vor und während der Behandlung wurde bei allen 18 Hengsten der Blutfluss der A. testicularis mit Hilfe der Dopplersonographie und die Spermaqualität mittels konventioneller Methoden und verschiedenen durchflusszytometrischen Assays ermittelt.

In der zweiten Versuchsreihe bekamen acht Hengste, von denen 4 als fertil und 4 als subfertil klassifiziert wurden, 5000 IE hCG intravenös verabreicht (Ovogest®5000, Fa. Intervet). Der testikuläre Blutfluss wurde zum Zeitpunkt 0 (= kurz vor hCG-Applikation) und 1, 3, 6, 12, 24, 72, 120 und 168 Stunden danach gemessen. Kurz vor jeder Untersuchung wurde den Hengsten eine Blutprobe aus der V. jugularis entnommen und später die Testosteron- und Östrogenkonzentrationen mit Hilfe eines EIA bestimmt. Den 4 Hengsten der Kontrollgruppe wurde nur das Lösungsmittel als Placebo intravenös appliziert.

Die Durchblutung der A. testicularis wurde anhand des Blutflussvolumens (BFV) und des Pulsatility Index (PI) quantifiziert. Die Beurteilung der Spermaqualität erfolgte anhand des Ejakulatvolumens, der Spermiengesamtzahl, der Spermienmotilität, dem Anteil vitaler und akrosomgeschädigter bzw. -reagerter Spermien im SYTO®17/FITC-PNA/PI-Assay und der Integrität der Chromatinstruktur im Spermachromatinstruktur-Assay (SCSA™).

Beim Vergleich der Blutflussparameter aller 30 Hengste vor Beginn der Behandlungen konnten hohe positive Korrelationen zwischen den Widerstandsindices RI und PI festgestellt

werden ( $r = 0,91$ ;  $p < 0,0001$ ), wohingegen keine Zusammenhänge zwischen den beiden Widerstandsparametern und dem Blutflussvolumen bestanden ( $p > 0,05$ ). Zwischen den Blutflussparametern und den verschiedenen Spermaparametern konnte vor der Behandlung nur eine Korrelation zwischen Blutflussvolumen und Spermiengesamtzahl ( $r = 0,65$ ;  $p < 0,05$ ) festgestellt werden.

Während sich der testikuläre Blutfluss der Hengste der Kontroll- und Molsidomin-Gruppe im Untersuchungszeitraum nicht änderte, nahm das Blutflussvolumen der mit FertilAid-for-Stallions<sup>TM</sup> gefütterten Hengste kurzzeitig ab, während PI kontinuierlich abfiel ( $p < 0,05$ ). Bei der Kontroll- und Molsidomin-Gruppe stieg der Anteil DNA geschädigter Spermien im Untersuchungszeitraum an, während bei der FertilAid-Gruppe ähnlich wie beim Blutflussvolumen ein kurzzeitiger Abfall und Wiederanstieg auf das Ausgangsniveau zu verzeichnen war.

Nach der Applikation von hCG stiegen die Testosteron- und Östrogenspiegel an. Die Testosteronwerte zeigten einen biphasischen Verlauf mit zwei Maxima, während die Östrogenwerte ihre maximalen Werte 6, 12 und 24 Stunden post applicationem hatten. Die Verabreichung von hCG bewirkte bei den Hengsten wellenförmige Veränderungen der Blutflussparameter, wobei BFV und PI gegensätzlich zueinander verliefen. Beim Vergleich der relativen Schwankungen der Blutflussparameter und der Sexualsteroidhormone fiel auf, dass die Schwankungen des Blutflussvolumens denen der Sexualsteroidhormone ähnelten. So glichen besonders die Veränderungen und die Variationsbreite der Östrogenwerte denen des Blutflussvolumens, während die Schwankungen der Testosteronspiegel zeitversetzt waren. Subfertile Hengste unterschieden sich nach der hCG-Applikation von fertilen lediglich durch eine etwas geringere Zunahme des Blutflussvolumens und der Östrogenspiegel.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Behandlung mit dem Ergänzungsfuttermittel FertilAid-for-Stallions<sup>TM</sup> nur einen geringen Einfluss auf die testikuläre Durchblutung hatte und von den verschiedenen Spermaparametern nur die DNA-Integrität der Spermien verbessern konnte. Der NO-Donor Molsidomin hatte dagegen weder einen Einfluss auf die testikuläre Durchblutung noch auf die Spermaqualität. Die Verabreichung von hCG bewirkte einen Anstieg der testikulären Durchblutung, wobei diese Änderungen im Zusammenhang mit den Östrogenspiegeln im peripheren Blut standen. Es bestanden dabei aber nur geringe Unterschiede zwischen fertilen und subfertilen Hengsten.

## 7 Summary

### **”The influence of nitric oxide donors and human chorionic gonadotropin on the testicular blood flow in stallions – Doppler sonographic investigations”**

The objective of this study was to determine whether it was possible to influence the testicular blood flow and sperm quality of stallions by administering drugs affecting the nitric oxide system. In addition, the influence of human chorionic gonadotropin on testicular blood flow was examined in order to see whether it was associated with changes in sex steroid hormones in blood plasma. The effect on fertile and subfertile stallions was differentiated.

The investigations were performed in 30 stallions. In the first experiment six stallions each were orally fed the food supplement FertilAid-for-Stallions™ (Fa. Total Health Enhancement Inc. ,USA) or the nitric oxide donor Molsidomin (Molsidomin retard-ratiopharm® 8) for 8 weeks twice daily. The stallions that were treated with FertilAid-for-Stallions™ got the double dose (71 g) for the first two weeks and afterwards the single. Six untreated stallions served as the Control group. Before and after the treatment the blood flow of the A. testicularis of all 18 stallions was measured by Doppler sonography and sperm quality was assayed by conventional methods and flow cytometry.

In the second experiment eight stallions, 4 classified as fertile and 4 as subfertile, received 5000 IU hCG (Ovogest®5000, Intervet) i.v., and their blood flow was measured at hours 0 (just before hCG injection), 1, 3, 6, 12, 24, 72, 120, 168. Just before every examination a blood sample was taken from the V. jugularis, and testosterone and oestrogen were measured by an enzyme immunoassay. The 4 stallions of the Control group only received the solvent i.v. as a placebo.

The blood flow of the A. testicularis was quantified by the Blood Flow Volume (BFV) and the Pulsatility Index (PI). The sperm quality was evaluated by ejaculate volume, sperm cell number and motility, percentage of alive and acrosome damaged or reacted sperm cells measured in the SYTO®17/FITC-PNA/PI-Assay and integrity of the chromatin structure determined in the Sperm Chromatin Structure Analysis (SCSA™)

Comparing the blood flow parameters of all 30 stallions before treatment there was a high positive correlation between the Doppler indices RI and PI ( $r = 0.91$ ;  $p < 0.0001$ ), whereas there was no correlation between the Doppler indices and BFV ( $p > 0.05$ ).



Between blood flow and various sperm parameters only Blood Flow Volume and sperm number were correlated ( $r = 0.65$ ;  $p < 0.05$ ).

While the testicular blood flow of the stallions of the Control and Molsidomin group remained unchanged during the examination period, the Blood Flow Volume of the stallions that were treated with FertilAid-for-Stallions™ temporarily decreased before reaching its initial values, while PI was falling continuously ( $p < 0.05$ ). Within the Control and Molsidomin group the number of DNS damaged sperm cells was rising during the examinations while within the FertilAid group there was a temporary decrease and then an increase similar to that of the Blood Flow Volume.

After application of hCG both the testosterone and oestrogen levels increased. The testosterone values showed a biphasic course, while the oestrogen levels were maximal at 6, 12 and 24 hours post application. The application of hCG caused wavelike changes of the blood flow parameters of the stallions, whereas BFV and PI were reacting in opposite direction. Comparing the relative changes of the blood flow parameters and the sexual steroid hormone values it was evident that the changes of the Blood Flow Volume were similar to those of the steroid hormone concentrations. Especially the changes and the range of variation of the oestrogen levels were similar to those of the Blood Flow Volume, while the changes of the testosterone values were time-delayed.

Comparing the reactions of the blood flow parameters and steroid hormone concentrations of the fertile and subfertile stallions after application of hCG, only a small rise of BFV and oestrogen was detected in the subfertile stallions.

In conclusion, the results of this study indicate that the treatment with the food supplement FertilAid-for-Stallions™ only influenced the testicular blood flow to a small degree and, of all sperm parameters, only improved the DNS integrity of the sperm cells. In contrast the NO-Donor Molsidomin neither had an effect on testicular blood flow nor semen quality. The application of hCG caused an increase in testicular blood flow; these changes were associated with the variations of the oestrogen levels in the peripheral blood. But there were only small differences between the fertile and subfertile stallions.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

Aitken, R.J. (1999):

The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis?

*J Reprod Fertil*, **115**: 1-7.

Alder, A., H. Burger, J. Davis, A. Dulmanis, B. Hudson, G. Sarfaty and W. Straffon (1968):  
Carcinoma of prostate: response of plasma luteinizing hormone and testosterone to oestrogen  
therapy.

*Br Med J*, **1**: 28-31.

Amann, R.P. and V.K. Ganjam (1981):

Effects of Hemicastration or hCG-treatment on Steroids in Testicular Vein and Jugular Vein  
Blood of Stallions.

*J Androl*, **3**: 132-139.

Amselgruber, W. (1988):

Angioarchitektur des männlichen Geschlechtsapparates beim Rind (*Bos taurus*).

*Habilitationsschrift, Universität München*,

Assreuy, J., F.Q. Cunha, F.Y. Liew and S. Moncada (1993):

Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide.

*Br J Pharmacol*, **108**: 833-837.

Atilla, M.K., H. Sargin, Y. Yilmaz, O. Odabas, A. Keskin and S. Aydin (1997):

Undescended testes in adults: clinical significance of resistive index values of the testicular  
artery measured by Doppler ultrasound as a predictor of testicular histology.

*J Urol*, **158**: 841-843.

Aube, C., B. Winkfield, F. Oberti, E. Vuillemin, M.C. Rousselet, C. Caron and P. Cales  
(2004):

New Doppler ultrasound signs improve the non-invasive diagnosis of cirrhosis or severe liver  
fibrosis.

*Eur J Gastroenterol Hepatol*, **16**: 743-751.

Auclair, D., S.F. Sowerbutts and B.P. Setchell (1995a):

Effect of active immunization against oestradiol in developing ram lambs on plasma  
gonadotrophin and testosterone concentrations, time of onset of puberty and testicular blood  
flow.

*J Reprod Fertil*, **104**: 7-16.

Auclair, D., S.F. Sowerbutts and B.P. Setchell (1995b):

Effect of active immunization against testosterone on plasma gonadotrophin concentrations,  
spermatogenic function, testicular blood flow, epididymis mass and mating behaviour in adult  
rams.

*J Reprod Fertil*, **104**: 17-26.

- Bader, H. (2000):  
Hodenfunktion.  
*In: Busch, Holzmann (Hrsg.) Veterinärmedizinische Andrologie; Schattauer Verlag, 378-379.*
- Barlas, M. and C. Hatiboglu (2002):  
The effect of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury.  
*Int Urol Nephrol, 34:* 81-86.
- Bartke, A., K.I. Williams and S. Dalterio (1977):  
Effects of estrogens on testicular testosterone production in vitro.  
*Biol Reprod, 17:* 645-649.
- Battaglia, C., S. Giulini, G. Regnani, R. Di Girolamo, S. Paganelli, F. Facchinetti and A. Volpe (2000):  
Seminal plasma nitrite/nitrate and intratesticular Doppler flow in fertile and infertile subjects.  
*Hum Reprod, 15:* 2554-2558.
- Battaglia, C., S. Giulini, G. Regnani, I. Madgar, F. Facchinetti and A. Volpe (2001):  
Intratesticular Doppler flow, seminal plasma nitrites/nitrates, and nonobstructive sperm extraction from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia.  
*Fertil Steril, 75:* 1088-1094.
- Baumgartner, U. (1998):  
Farbdopplersonographische Untersuchung der A.uterina und des Corpus luteum beim Rind.  
*Vet. med. Diss., München,*
- Beisker, W. (1994):  
A new combined integral-light and slit-scan data analysis system (DAS) for flow cytometry.  
*Comput Methods Programs Biomed, 42:* 15-26.
- Bergh, A., O. Collin and E. Lissbrant (2001):  
Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat.  
*Biol Reprod, 64:* 13-20.
- Bergh, A. and J.E. Damber (1987):  
HCG/LH-induced changes in testicular blood flow, microcirculation and vascular permeability in adult rats.  
*In: Endocrinology and Physiology of Reproduction (eds Armstrong, D.T., H.G. Friesch). Plenum Publishing Cooperation, New York., 243-259.*
- Bergh, A. and J.E. Damber (1993):  
Vascular controls in testicular physiology.  
*In: de Kretser DM (ed.), Molecular Biology of the Male Reproductive System. New York: Academic Press, 439-468.*
- Bergh, A., J.E. Damber and S.L. Marklund (1988):  
Morphologic changes induced by short-term ischemia in the rat testis are not affected by treatment with superoxide dismutase and catalase.  
*J Androl, 9:* 15-20.

Biagiotti, G., G. Cavallini, F. Modenini, G. Vitali and L. Gianaroli (2002):  
Spermatogenesis and spectral echo-colour Doppler traces from the main testicular artery.  
*BJU Int*, **90**: 903-908.

Buga, G.M., J.M. Griscavage, N.E. Rogers and L.J. Ignarro (1993):  
Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide.  
*Circ Res*, **73**: 808-812.

Bühlmeyer, M. (1999):  
Farbdopplersonographische Untersuchung der A.uterina und der A.ovarica der Stute im  
Verlauf spontaner und hormonell induzierter Ovulationen.  
*Vet. med. Diss., München*,

Burnett, A.L., D.D. Ricker, S.L. Chamness, M.P. Maguire, J.K. Crone, D.S. Bredt, S.H.  
Snyder and T.S. Chang (1995):  
Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat.  
*Biol Reprod*, **52**: 1-7.

Buturovic-Ponikvar, J. and A. Visnar-Perovic (2003):  
Ultrasonography in chronic renal failure.  
*Eur J Radiol*, **46**: 115-122.

Collin, O., J.E. Damber and A. Bergh (1996a):  
5-Hydroxytryptamine--a local regulator of testicular blood flow and vasomotion in rats.  
*J Reprod Fertil*, **106**: 17-22.

Collin, O., J.E. Damber and A. Bergh (1996b):  
Effects of endothelin-1 on the rat testicular vasculature.  
*J Androl*, **17**: 360-366.

Collin, O., E. Lissbrant and A. Bergh (1997):  
Atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and c-type natriuretic peptide: effects on  
testicular microcirculation and immunohistochemical localization.  
*Int J Androl*, **20**: 55-60.

Collin, O., J.L. Zupp and B.P. Setchell (2000):  
Testicular vasomotion in different mammals.  
*Asian J Androl*, **2**: 297-300.

Cox, J. (1975):  
Experiences with a diagnostic test for equine cryptorchidism.  
*Equine Vet J*, **7**: 179-183.

Cox, J.E. and P.H. Redhead (1990):  
Prolonged effect of a single injection of human chorionic gonadotrophin on plasma  
testosterone and oestrone sulphate concentrations in mature stallions.  
*Equine Vet J*, **22**: 36-38.

- Cox, J.E., J.H. Williams, P.H. Rowe and J.A. Smith (1973):  
Testosterone in normal, cryptorchid and castrated male horses.  
*Equine Vet J*, **5**: 85-90.
- Creech, M.M., E.V. Arnold, B. Boyle, M.C. Muzinich, C. Montville, D.S. Bohle and R.W. Atherton (1998):  
Sperm motility enhancement by nitric oxide produced by the oocytes of fathead minnows, *Pimephelas promelas*.  
*J Androl*, **19**: 667-674.
- Daehlin, L., J.E. Damber, G. Selstam and B. Bergman (1985):  
Effects of human chorionic gonadotrophin, oestradiol and estromustine on testicular blood flow in hypophysectomized rats.  
*Int J Androl*, **8**: 58-68.
- Damber, J.E. and A. Bergh (1992):  
Testicular microcirculation--a forgotten essential in andrology?  
*Int J Androl*, **15**: 285-292.
- Damber, J.E., A. Bergh and L. Daehlin (1985):  
Testicular blood flow, vascular permeability, and testosterone production after stimulation of unilaterally cryptorchid adult rats with human chorionic gonadotropin.  
*Endocrinology*, **117**: 1906-1913.
- Damber, J.E., A. Bergh, L. Daehlin, C. Ekholm, G. Selstam and R. Sodergard (1983):  
The acute effect of oestrogens on testosterone production appears not to be mediated by testicular oestrogen receptors.  
*Mol Cell Endocrinol*, **31**: 105-116.
- Damber, J.E., A. Bergh, B. Fagrell, O. Lindahl and P. Rooth (1986):  
Testicular microcirculation in the rat studied by videophotometric capillaroscopy, fluorescence microscopy and laser Doppler flowmetry.  
*Acta Physiol Scand*, **126**: 371-376.
- Damber, J.E., A. Bergh and A. Widmark (1987a):  
Effect of an LHRH-agonist on testicular microcirculation in hypophysectomized rats.  
*Int J Androl*, **10**: 785-791.
- Damber, J.E., A. Bergh and A. Widmark (1987b):  
Testicular blood flow and microcirculation in rats after treatment with ethane dimethyl sulfonate.  
*Biol Reprod*, **37**: 1291-1296.
- Damber, J.E. and P.O. Janson (1978a):  
The effects of LH, adrenaline and noradrenaline on testicular blood flow and plasma testosterone concentrations in anaesthetized rats.  
*Acta Endocrinol (Copenh)*, **88**: 390-396.

- Damber, J.E. and P.O. Janson (1978b):  
The influence of scrotal warming on testicular blood flow and endocrine function in the rat.  
*Acta Physiol Scand*, **104**: 61-67.
- Damber, J.E., O. Lindahl, G. Selstam and T. Tenland (1982):  
Testicular blood flow measured with a laser Doppler flowmeter: acute effects of catecholamines.  
*Acta Physiol Scand*, **115**: 209-215.
- Damber, J.E., S. Maddocks, A. Widmark and A. Bergh (1992):  
Testicular blood flow and vasomotion can be maintained by testosterone in Leydig cell-depleted rats.  
*Int J Androl*, **15**: 385-393.
- Damber, J.E., G. Selstam and J. Wang (1981):  
Inhibitory effect of estradiol-17 beta on human chorionic gonadotropin-induced increment of testicular blood flow and plasma testosterone concentration in rats.  
*Biol Reprod*, **25**: 555-559.
- Diaz-Peinado, L. (2003):  
Untersuchungen über die Zusammenhänge zwischen der uterinen und ovariellen Durchblutung und der Fertilität bei der Stute.  
*Vet. med. Diss., München*,
- Dickey, R.P. (1997):  
Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian blood flow in infertility and early pregnancy.  
*Hum Reprod Update*, **3**: 467-503.
- Dixit, V.D. and N. Parvizi (2001):  
Nitric oxide and the control of reproduction.  
*Anim Reprod Sci*, **65**: 1-16.
- Dubinsky, T.J., P. Chen and N. Maklad (1998):  
Color-flow and power Doppler imaging of the testes.  
*World J Urol*, **16**: 35-40.
- Dudwiesus, H. (1995):  
Physikalische Grundlagen der Dopplersonographie.  
*In: Sohn, C. und H.Holzgreve (Hrsg.): Ultraschall in der Gynäkologie und Geburtshilfe. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 48-51.*
- Dudwiesus, H., R. Krieg and K.J. Schmidt (1993):  
Physikalisch-technische Grundlagen der Dopplersonographie.  
*In: Sohn, C., W.Stolz und G.Bastert (Hrsg.): Dopplersonographie in der Gynäkologie und Geburtshilfe. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1-11.*

- Ehren, I., J. Adolfsson and N.P. Wiklund (1994):  
Nitric oxide synthase activity in the human urogenital tract.  
*Urol Res*, **22**: 287-290.
- Eisenhauer, K.M., P.M. McCue, D.K. Nayden, Y. Osawa and J.F. Roser (1994):  
Localization of aromatase in equine Leydig cells.  
*Domest Anim Endocrinol*, **11**: 291-298.
- Evenson, D. and L. Jost (2000):  
Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment.  
*Methods Cell Sci*, **22**: 169-189.
- Evenson, D.P., K.L. Larson and 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**: 25-43.
- Fendel, H. and C. Sohn (1989):  
Gerätetechnologie.  
*In: Dopplersonographie in der Geburtshilfe*  
*Sptinger Verlag, Berlin-Heidelberg-New York*, 2-11.
- Fleet, I.R., M.S. Laurie, E.N. Noordhuizen-Stassen, B.P. Setchell and C. Wensing (1982):  
The flow of blood from artery to vein in the spermatic cord of the ram, with some observations on reactive hyperaemia in the testis and the effects of adenosine and noradrenaline.  
*J Physiol*, **332**: 44P-45P.
- Francavilla, F., R. Santucci, B. Macerola, G. Ruvolo and R. Romano (2000):  
Nitric oxide synthase inhibition in human sperm affects sperm-oocyte fusion but not zona pellucida binding.  
*Biol Reprod*, **63**: 425-429.
- Free, M. (1977):  
Blood supply to the testis and its role in local exchange and transport of hormones.  
*In: Johansen, A., Gomes, W. (eds.), The testis, vol. 4 New York: Academic Press*, 39-90.
- Ganjam, V.K. and R.M. Kenney (1975):  
Androgens and oestrogens in normal and cryptorchid stallions.  
*J Reprod Fertil Suppl*, 67-73.
- Garner, D.L., C.A. Thomas and C.G. Gravance (1999):  
The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa.  
*Reprod. Dom. Anim.*, 399-404.
- Gosling, R.G. and D.H. King (1975):  
Ultrasound angiology.  
*In: Harcus, A.W. and L. Adamson (Eds.): Arteries and Veins. Churchill Livingstone, Edinburgh-London-New York*, 61-98.

- Goswamy, R.K. and P.C. Steptoe (1988):  
Doppler ultrasound studies of the uterine artery in spontaneous ovarian cycles.  
*Hum Reprod*, **3**: 721-726.
- Griffith, O.W. and D.J. Stuehr (1995):  
Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism.  
*Annu Rev Physiol*, **57**: 707-736.
- Günzel-Apel, A.R., C. Möhrke and C. Poulsen Nautrup (2001):  
Colour-coded and pulsed Doppler sonography of the canine testis, epididymis and prostate gland: physiological and pathological findings.  
*Reprod Domest Anim*, **36**: 236-240.
- Hecher, K., U. Ertl, R. Sperndl, H. Haselbach and S. Szalay (1988):  
[Comparison of the clinical value of 2 frequently used indices of fetal blood flow analysis (pulsatility index PI and resistance index RI)].  
*Geburtshilfe Frauenheilkd*, **48**: 809-813.
- Heinze, W. and W. Ptak (1976):  
[Comparative morphological studies on the vascular systems of testes in cattle, swine, horse and dog under functional conditions].  
*Arch Exp Veterinarmed*, **30**: 669-685.
- Hellstrom, W.J., M. Bell, R. Wang and S.C. Sikka (1994):  
Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability, and lipid peroxidation.  
*Fertil Steril*, **61**: 1117-1122.
- Herfen, K., J. Harmeyer, H. Bostedt and M. Baumgartner (1997):  
The impact of carnitine on sperm motility in stallions (Abstract).  
*Reprod. Domest. Anim. Physiol. Pathol. Biotechnol.*, **32**: 77.
- Herrero, M.B., S. Chatterjee, L. Levievre, E. de Lamirande and C. Gagnon (2000):  
Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa.  
*Free Radic Biol Med*, **29**: 522-536.
- Herrero, M.B., E. de Lamirande and C. Gagnon (1999):  
Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro.  
*Biol Reprod*, **61**: 575-581.
- Herrero, M.B., E. de Lamirande and C. Gagnon (2001):  
Tyrosine nitration in human spermatozoa: a physiological function of peroxynitrite, the reaction product of nitric oxide and superoxide.  
*Mol Hum Reprod*, **7**: 913-921.
- Herrero, M.B. and C. Gagnon (2001):  
Nitric oxide: a novel mediator of sperm function.  
*J Androl*, **22**: 349-356.



- Herrero, M.B., S. Perez Martinez, J.M. Viggiano, J.M. Polak and M.F. de Gimeno (1996a):  
Localization by indirect immunofluorescence of nitric oxide synthase in mouse and human spermatozoa.  
*Reprod Fertil Dev*, **8**: 931-934.
- Herrero, M.B., J.M. Viggiano, S. Perez Martinez and M.F. de Gimeno (1996b):  
Effects of nitric oxide synthase inhibitors on the outcome of in vitro fertilization in the mouse.  
*Reprod Fertil Dev*, **8**: 301-304.
- Herrero, M.B., J.M. Viggiano, S. Perez Martinez and M.F. de Gimeno (1997):  
Evidence that nitric oxide synthase is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa.  
*Reprod Fertil Dev*, **9**: 433-439.
- Hildebrandt, H. (1994):  
Carnitin.  
*In: Pschyrembel; Klinisches Wörterbuch, de Gruyter Verlag Berlin*,
- Hildebrandt, H. (1998):  
Vitamine.  
*In: Pschyrembel; Klinisches Wörterbuch, de Gruyter Verlag Berlin*,
- Hinckley, K.A., S. Fearn, B.R. Howard and I.W. Henderson (1996):  
Nitric oxide donors as treatment for grass induced acute laminitis in ponies.  
*Equine Vet J*, **28**: 17-28.
- Hofmann, R. (1960):  
Die Gefäßarchitektur des Bullenhodens, zugleich ein Versuch ihrer funktionellen Deutung.  
*Zentralbl.Veterinärmed*, **7**: 59-63.
- Horstman, W.G., G.L. Melson, W.D. Middleton and G.L. Andriole (1992):  
Testicular tumors: findings with color Doppler US.  
*Radiology*, **185**: 733-737.
- Huang, M., M.L. Leblanc and R.L. Hester (1994):  
Systemic and regional hemodynamics after nitric oxide synthase inhibition: role of a neurogenic mechanism.  
*Am J Physiol*, **267**: R84-88.
- Inagami, T., M. Naruse and R. Hoover (1995):  
Endothelium as an endocrine organ.  
*Annu Rev Physiol*, **57**: 171-189.
- Intaglietta, M. (1988):  
Arteriolar vasomotion: normal physiological activity or defence mechanism?  
*Diab. Metab.*, **14**: 489-494.

Jantosovicova, J. and J. Jantosovic (1983):

[Topographico-anatomic data on the testicular artery, ductus deferens artery and cremaster artery in the stallion].

*Gegenbaurs Morphol Jahrb*, **129**: 467-482.

Jee, W.H., B.Y. Choe, J.Y. Byun, K.S. Shinn and T.K. Hwang (1997):

Resistive index of the intrascrotal artery in scrotal inflammatory disease.

*Acta Radiol*, **38**: 1026-1030.

Jeulin, C. and L.M. Lewin (1996):

Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa.

*Hum Reprod Update*, **2**: 87-102.

Karow, T. (2000):

Organische Nitrate und Molsidomin.

In: Karow T., R.Lang (Hrsg.), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 151.

Klug, E. and H. Sieme (2003):

Samenübertragung beim Pferd.

*Schaper Verlag, Alsfeld*,

Koch, T.(1963):

Die männlichen Geschlechtsorgane.

In: Koch, T. (Hrsg.): *Lehrbuch der Veterinär-Anatomie*. Gustav Fischer Verlag Jena, 255.

Kodama, H., Y. Kuribayashi and C. Gagnon (1996):

Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization.

*J Androl*, **17**: 151-157.

Kuo, R.C., G.T. Baxter, S.H. Thompson, S.A. Stricker, C. Patton, J. Bonaventura and D. Epel (2000):

NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization.

*Nature*, **406**: 633-636.

Lee, F.T., Jr., D.B. Winter, F.A. Madsen, J.A. Zagzebski, M.A. Pozniak, S.G. Chosy and K.A. Scanlan (1996):

Conventional color Doppler velocity sonography versus color Doppler energy sonography for the diagnosis of acute experimental torsion of the spermatic cord.

*AJR Am J Roentgenol*, **167**: 785-790.

Lenzi, A., F. Lombardo, L. Gandini and F. Dondero (1992):

[Metabolism and action of L-carnitine: its possible role in sperm tail function].

*Arch Ital Urol Nefrol Androl*, **64**: 187-196.

Leonhard-Marek, S. (2002):

Spurenelemente und Fertilität.

In: Busch, Holzmann (Hrsg.) *Veterinärmedizinische Andrologie*; Schattauer Verlag, 474-484.

Lewis, S.E., E.T. Donnelly, E.S. Sterling, M.S. Kennedy, W. Thompson and U. Chakravarthy (1996):

Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility.

*Mol Hum Reprod*, **2**: 873-878.

Lissbrant, E., U. Lofmark, O. Collin and A. Bergh (1997):

Is nitric oxide involved in the regulation of the rat testicular vasculature?

*Biol Reprod*, **56**: 1221-1227.

Maddocks, S., T.B. Hargreave, K. Reddie, H.M. Fraser, J.B. Kerr and R.M. Sharpe (1993):

Intratesticular hormone levels and the route of secretion of hormones from the testis of the rat, guinea pig, monkey and human.

*Int J Androl*, **16**: 272-278.

Maddocks, S. and R.M. Sharpe (1989):

Dynamics of testosterone secretion by the rat testis: implications for measurement of the intratesticular levels of testosterone.

*J Endocrinol*, **122**: 323-329.

Markey, C.M., A.M. Jequier, G.T. Meyer and G.B. Martin (1994):

Testicular morphology and androgen profiles following testicular ischaemia in rams.

*J Reprod Fertil*, **101**: 643-650.

Markey, C.M., A.M. Jequier, G.T. Meyer and G.B. Martin (1995):

Relationship between testicular morphology and sperm production following ischaemia in the ram.

*Reprod Fertil Dev*, **7**: 119-128.

Marsal, K. (1993):

Doppler ultrasonography techniques.

*In: Hanson, A., J.A.D. Spencer and C.H. Rodeck (Eds.): The circulation. Cambridge University Press, 296-322.*

Maulik, D., A.P. Yarlagaadda, J.P. Youngblood and L. Willoughby (1989):

Components of variability of umbilical arterial Doppler velocimetry--a prospective analysis.

*Am J Obstet Gynecol*, **160**: 1406-1409; discussion 1409-1412.

Max, B. (1992):

This and that: hair pigments, the hypoxic basis of life and the Virgilian journey of the spermatozoon.

*Trends Pharmacol Sci*, **13**: 272-276.

Mayer, R.C. (1999):

Farbdopplersonographische Untersuchung der Arteria uterina und des Corpus luteum während des Zyklus und der Frühgravidität der Stute.

*Vet. med. Diss., München,*

- McKinney, K.A., P. Boyle and W. Thompson (1995):  
Effect of glyceryl trinitrate on sperm motility and lipid peroxidation in normozoospermic men.  
*Int J Androl*, **18**: 307-312.
- Melner, M.H. and T.O. Abney (1980):  
The direct effect of 17 beta-estradiol on LH-stimulated testosterone production in hypophysectomized rats.  
*J Steroid Biochem*, **13**: 203-210.
- Meyer, H.H., M. Rohleder, W.J. Streich, R. Goltenboth and A. Ochs (1997):  
[Sex steroid profiles and ovarian activities of the female panda Yan Yan in the Berlin Zoo].  
*Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **110**: 143-147.
- Meyer, H.H.D. (1989):  
Enzymimmunologische Meßverfahren zur Hormonanalytik.  
*Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart*,
- Middendorff, R., D. Muller, S. Wichers, A.F. Holstein and M.S. Davidoff (1997):  
Evidence for production and functional activity of nitric oxide in seminiferous tubules and blood vessels of the human testis.  
*J Clin Endocrinol Metab*, **82**: 4154-4161.
- Middleton, W.D., D.A. Thorne and G.L. Melson (1989):  
Color Doppler ultrasound of the normal testis.  
*AJR Am J Roentgenol*, **152**: 293-297.
- Moger, W.H. (1977):  
Serum 5alpha-androstane-3alpha,17beta-diol, androsterone, and testosterone concentrations in the male rat. Influence of age and gonadotropin stimulation.  
*Endocrinology*, **100**: 1027-1032.
- Moger, W.H. (1980):  
Direct effects of estrogens on the endocrine function of the mammalian testis.  
*Can J Physiol Pharmacol*, **58**: 1011-1022.
- Moncada, S., R.M. Palmer and E.A. Higgs (1991):  
Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.  
*Pharmacol Rev*, **43**: 109-142.
- Morris, N.H., B.M. Eaton and G. Dekker (1996):  
Nitric oxide, the endothelium, pregnancy and pre-eclampsia.  
*Br J Obstet Gynaecol*, **103**: 4-15.
- Morris, S.M., Jr. and T.R. Billiar (1994):  
New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis.  
*Am J Physiol*, **266**: E829-839.

- Moustafa, M.H., R.K. Sharma, J. Thornton, E. Mascha, M.A. Abdel-Hafez, A.J. Thomas, Jr. and A. Agarwal (2004):  
Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility.  
*Hum Reprod*, **19**: 129-138.
- Murakami, T., Y. Uno, A. Ohtsuka and T. Taguchi (1989):  
The blood vascular architecture of the rat testis: a scanning electron microscopic study of corrosion casts followed by light microscopy of tissue sections.  
*Arch Histol Cytol*, **52**: 151-172.
- Noack, E. and M. Feelisch (1989):  
Molecular aspects underlying the vasodilator action of molsidomine.  
*J Cardiovasc Pharmacol*, 14 Suppl 11: S1-5.
- Nobunaga, T., Y. Tokugawa, K. Hashimoto, Y. Kubota, K. Sawai, T. Kimura, K. Shimoya, M. Takemura, N. Matsuzaki, C. Azuma and F. Saji (1996):  
Elevated nitric oxide concentration in the seminal plasma of infertile males: nitric oxide inhibits sperm motility.  
*Am J Reprod Immunol*, **36**: 193-197.
- Nussler, A.K. and T.R. Billiar (1993):  
Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase.  
*J Leukoc Biol*, **54**: 171-178.
- Oettle, A.G. and R.G. Harrison (1952):  
The histological changes produced in the rat testis by temporary and permanent occlusion of the testicular artery.  
*J Pathol Bacteriol*, **64**: 273-297.
- Palmer, R.M., D.S. Ashton and S. Moncada (1988):  
Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine.  
*Nature*, **333**: 664-666.
- Paltiel, H.J., R.C. Rupich and D.S. Babcock (1994):  
Maturation changes in arterial impedance of the normal testis in boys: Doppler sonographic study.  
*AJR Am J Roentgenol*, **163**: 1189-1193.
- Pavlica, P. and L. Barozzi (2001):  
Imaging of the acute scrotum.  
*Eur Radiol*, **11**: 220-228.
- Pensel, J. and R. Warnking (1993):  
Gerätetechnologie.  
*In: Sohn, C., W. Stolz und G. Bastert (Hrsg.): Dopplersonographie in der Gynäkologie und Geburtshilfe. Georg Thieme Verlag Stuttgart*, 11-15.

Pickett, B. (1993):

Factors affecting sperm production and output.

*In: Equine Reproduction; McKinnon AO, Voss JL(eds.) Lea and Febiger, Philadelphia, London, 694.*

Pourcelot, L. (1974):

Applications cliniques de l'examen Doppler.

*Ultrasonor. Doppler, 34: 625-627.*

Pozor, M.A. and D. Kolonko (2000):

The testicular artery of stallions in clinical and morphological studies.

*Med. Wet., 57: 822-826.*

Pozor, M.A. and S.M. McDonnell (2004):

Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions.

*Theriogenology, 61: 799-810.*

Prillaman, H.M. and T.T. Turner (1997):

Rescue of testicular function after acute experimental torsion.

*J Urol, 157: 340-345.*

Ratjen, J. (2003):

Dopplersonographische Untersuchungen zur uterinen Durchblutung bei Zuchtstuten und deren Zusammenhänge mit der Fertilität.

*Vet. med. Diss., München,*

Revelli, A., C. Costamagna, F. Moffa, E. Aldieri, S. Ochetti, A. Bosia, M. Massobrio, B. Lindblom and D. Ghigo (2001):

Signaling pathway of nitric oxide-induced acrosome reaction in human spermatozoa.

*Biol Reprod, 64: 1708-1712.*

Revelli, A., G. Soldati, C. Costamagna, O. Pellerey, E. Aldieri, M. Massobrio, A. Bosia and D. Ghigo (1999):

Follicular fluid proteins stimulate nitric oxide (NO) synthesis in human sperm: a possible role for NO in acrosomal reaction.

*J Cell Physiol, 178: 85-92.*

Rogers, N.E. and L.J. Ignarro (1992):

Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine.

*Biochem Biophys Res Commun, 189: 242-249.*

Rohr, S. (2003):

Untersuchungen zur Regulation der uterinen und ovariellen Durchblutung sowie der Expression von Stickstoffmonoxidsynthasen und Östrogenrezeptoren im Endometrium im Verlauf des Zyklus und der Frühgravidität bei der Stute.

*Vet. med. Diss., München,*

- Roser, J.F. (1995):  
Endocrine Profiles in Fertile, Subfertile, and Infertile Stallions: Testicular Response to Human Chorionic Gonadotropin in Infertile Stallions.  
*Biol Reprod Mono*, **1**: 661-669.
- Rosselli, M., R.K. Dubey, B. Imthurn, E. Macas and P.J. Keller (1995):  
Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity.  
*Hum Reprod*, **10**: 1786-1790.
- Rosselli, M., B. Imthurn, E. Macas, P.J. Keller and R.K. Dubey (1994):  
Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol mediated NO release.  
*Biochem Biophys Res Commun*, **202**: 1543-1552.
- Rosselli, M., P.J. Keller and R.K. Dubey (1998):  
Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction.  
*Hum Reprod Update*, **4**: 3-24.
- Ruland, O. and N. Borkenhagen (1988):  
Technische Grundlagen der Dopplersonographie.  
*In: Ruland, O. und M. Bosiers (Hrsg.): Dopplersonographische Diagnostik. Deutscher Ärzteverlag Köln*, 17-27.
- Saito, S. and Y. Kumamoto (1988):  
Effect of kallikrein on testicular blood circulation.  
*Arch Androl*, **20**: 51-65.
- Schaad, N.C., X.Q. Zhang, A. Campana and S. Schorderet-Slatkine (1996):  
Human seminal plasma inhibits brain nitric oxide synthase activity.  
*Hum Reprod*, **11**: 561-565.
- Scholtes, M.C., J.W. Wladimiroff, H.J. van Rijen and W.C. Hop (1989):  
Uterine and ovarian flow velocity waveforms in the normal menstrual cycle: a transvaginal Doppler study.  
*Fertil Steril*, **52**: 981-985.
- Sengoku, K., K. Tamate, T. Yoshida, Y. Takaoka, T. Miyamoto and M. Ishikawa (1998):  
Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa.  
*Fertil Steril*, **69**: 522-527.
- Setchell, B.P. (1970):  
Testicular blood supply, lymphatic drainage and secretion of fluids.  
*In: Johansen, A., Gomes, W. (eds.), The testis, vol. 1, New York: Academic Press*, 101-239.
- Setchell, B.P. (1978):  
The Mammalian Testis.  
*Elek Books, London*,

Setchell, B.P. (1986):

The movement of fluids and substances in the testis.

*Aust J Biol Sci*, **39**: 193-207.

Setchell, B.P. (1990):

Local control of testicular fluids.

*Reprod Fertil Dev*, **2**: 291-309.

Setchell, B.P. and J.E. Cox (1982):

Secretion of free and conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood.

*J Reprod Fertil Suppl*, **32**: 123-127.

Setchell, B.P. and K.A. Galil (1983):

Limitations imposed by testicular blood flow on the function of Leydig cells in rats in vivo.

*Aust J Biol Sci*, **36**: 285-293.

Setchell, B.P. and R.M. Sharpe (1981):

Effect of injected human chorionic gonadotrophin on capillary permeability, extracellular fluid volume and the flow of lymph and blood in the testes of rats.

*J Endocrinol*, **91**: 245-254.

Setchell, P. and S. Maddocks (1994):

Anatomy, Vasculature, Innervation and Fluids of the Male Reproductive Tract.

In: *Knobil, E. and J.D. Neill (Eds.): The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, 1063-1175.

Sharma, A.C., A.D. Sam, 2nd, L.Y. Lee, D.B. Hales, W.R. Law, J.L. Ferguson and H.B.

Bosmann (1998):

Effect of NG-nitro-L-arginine methyl ester on testicular blood flow and serum steroid hormones during sepsis.

*Shock*, **9**: 416-421.

Sharpe, R.M. (1984):

Intratesticular factors controlling testicular function.

*Biol Reprod*, **30**: 29-49.

Sharpe, R.M. (1990):

Intratesticular control of steroidogenesis.

*Clin Endocrinol (Oxf)*, **33**: 787-807.

Sharpe, R.M., S. Maddocks and J.B. Kerr (1990):

Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied using Leydig cell destruction and testosterone replacement.

*Am J Anat*, **188**: 3-20.

Silberzahn, P., E.J. Pouret and I. Zwain (1989):

Androgen and oestrogen response to a single injection of hCG in cryptorchid horses.

*Equine Vet J*, **21**: 126-129.



- Silberzahn, P., I. Zwain, P. Guerin, E. Benoit, J.M. Jouany and Y. Bonnaire (1988):  
Testosterone response to human chorionic gonadotropin injection in the stallion.  
*Equine Vet J*, **20**: 61-63.
- Snyder, S.H. (1995):  
Nitric oxide. No endothelial NO.  
*Nature*, **377**: 196-197.
- Steffen, S.B. (2000):  
Medikamentelle Beeinflussung der uterinen und ovariellen Durchblutung im Zyklus und in der Frühgravidität der Stute -Farbdopplersonographische Untersuchungen.  
*Vet. med. Diss., München*,
- Steinberger, E. and D.Y. Tjioe (1969):  
Spermatogenesis in rat testes after experimental ischemia.  
*Fertil Steril*, **20**: 639-649.
- Stradaioli, G., L. Sylla, R. Zelli, A. Verini Supplizi, P. Chiodi, A. Arduini and M. Monaci (2000):  
Seminal carnitine and acetylcarnitine content and carnitine acetyltransferase activity in young Maremmano stallions.  
*Anim Reprod Sci*, **64**: 233-245.
- Sweeney, T.E., J.S. Rozum, C. Desjardins and R.W. Gore (1991):  
Microvascular pressure distribution in the hamster testis.  
*Am J Physiol*, **260**: H1581-1589.
- Tarhan, S., B. Gumus, I. Gunduz, V. Ayyildiz and C. Goktan (2003):  
Effect of varicocele on testicular artery blood flow in men--color Doppler investigation.  
*Scand J Urol Nephrol*, **37**: 38-42.
- Tekay, A., H. Martikainen and P. Jouppila (1996):  
Comparison of uterine blood flow characteristics between spontaneous and stimulated cycles before embryo transfer.  
*Hum Reprod*, **11**: 364-368.
- Thomas, C.A., D.L. Garner, J.M. DeJarnette and C.E. Marshall (1997):  
Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa.  
*Biol Reprod*, **56**: 991-998.
- Thompson, R.S., B.J. Trudinger and C.M. Cook (1988):  
Doppler ultrasound waveform indices: A/B ratio, pulsatility index and Pourcelot ratio.  
*Br J Obstet Gynaecol*, **95**: 581-588.
- Tjioe, D.Y. and E. Steinberger (1970):  
A quantitative study of the effect of ischaemia on the germinal epithelium of rat testes.  
*J Reprod Fertil*, **21**: 489-494.

- Turner, T.T., K.S. Tung, H. Tomomasa and L.W. Wilson (1997):  
Acute testicular ischemia results in germ cell-specific apoptosis in the rat.  
*Biol Reprod*, **57**: 1267-1274.
- van Beurden, W.M., E. Mulder, F.H. de Jong and H.J. van der Molen (1977):  
The effect of estrogens on luteinizing hormone plasma levels and on testosterone production  
in intact and hypophysectomized rats.  
*Endocrinology*, **101**: 342-349.
- van Vliet, J., F.F. Rommerts, D.G. de Rooij, G. Buwalda and C.J. Wensing (1988):  
Reduction of testicular blood flow and focal degeneration of tissue in the rat after  
administration of human chorionic gonadotrophin.  
*J Endocrinol*, **117**: 51-57.
- Waibl, H. und H. Wilkens (1996):  
Arterien und Venen.  
*In: Nickel, R., A. Schummer, E. Seiferle (Hrsg): Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band  
3:*
- Wang, J., K.A. Galil and B.P. Setchell (1983):  
Changes in testicular blood flow and testosterone production during aspermatogenesis after  
irradiation.  
*J Endocrinol*, **98**: 35-46.
- Wang, J.M., C.H. Gu, Z.M. Qian and G.W. Jing (1984):  
Effect of gossypol on testicular blood flow and testosterone production in rats.  
*J Reprod Fertil*, **71**: 127-133.
- Wang, X., R.K. Sharma, S.C. Sikka, A.J. Thomas, Jr., T. Falcone and A. Agarwal (2003):  
Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage  
in patients with male factor infertility.  
*Fertil Steril*, **80**: 531-535.
- Weinberg, J.B., E. Doty, J. Bonaventura and A.F. Haney (1995):  
Nitric oxide inhibition of human sperm motility.  
*Fertil Steril*, **64**: 408-413.
- Widmark, A. (1987):  
Testicular microcirculation: An experimental study in the rat.  
*Ph. D.Thesis. University of Umea, Sweden.*
- Widmark, A., J.E. Damber and A. Bergh (1986):  
Testicular vascular resistance in the rat after intratesticular injection of an LRH-agonist.  
*Int J Androl*, **9**: 416-423.
- Widmark, A., J.E. Damber and A. Bergh (1989):  
High and low doses of luteinizing hormone induce different changes in testicular  
microcirculation.  
*Acta Endocrinol (Copenh)*, **121**: 621-627.

- Wielgos, M., L. Bablok, S. Fracki and L. Marianowski (1998):  
[Doppler flowmetry measurements in testicular artery of aging men].  
*Ginekol Pol*, **69**: 537-540.
- Wiesner, E. (2000):  
L-Carnitin.  
*In: Wiesner und Ribbeck (Hrsg), Lexikon der Veterinärmedizin, Enke Verlag Stuttgart, 243.*
- Xuan, W., A.M. Lamhonwah, C. Librach, K. Jarvi and I. Tein (2003):  
Characterization of organic cation/carnitine transporter family in human sperm.  
*Biochem Biophys Res Commun*, **306**: 121-128.
- Yamamoto, S., S. Nishizawa, T. Yokoyama, H. Ryu and K. Uemura (1997):  
Subarachnoid hemorrhage impairs cerebral blood flow response to nitric oxide but not to cyclic GMP in large cerebral arteries.  
*Brain Res*, **757**: 1-9.
- Yeoman, R.R., W.D. Jones and B.M. Rizk (1998):  
Evidence for nitric oxide regulation of hamster sperm hyperactivation.  
*J Androl*, **19**: 58-64.
- Zamir, N., D. Barkan, N. Keynan, Z. Naor and H. Breitbart (1995):  
Atrial natriuretic peptide induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa.  
*Am J Physiol*, **269**: E216-221.
- Zeyner, A. and J. Harmeyer (1999):  
Metabolic functions of L-carnitine and its effects as feed additive in horses. A review.  
*Arch Tierernahr*, **52**: 115-138.
- Zheng, H. and P.L. Olive (1997):  
Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice.  
*Int J Radiat Biol*, **71**: 275-282.
- Zini, A., E. De Lamirande and C. Gagnon (1995):  
Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro.  
*J Androl*, **16**: 424-431.
- Zwain, I., J.L. Gaillard, T. Dintinger and P. Silberzahn (1989):  
Down-regulation of testicular aromatization in the horse.  
*Biol Reprod*, **40**: 503-510.

## 9 ANHANG

Tab. 4.3: Die Blutflussparameter PI und BFV ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) in den Untersuchungswochen -2, -1, 2 und 8. Es wurden von den 18 Hengsten der Kontroll- (K), FertitAid- (F) und Molsidomin-Gruppe (M) jeweils die Mittelwerte der rechten und linken A. testicularis herangezogen. Die Ausgangswerte stellen den Mittelwert der Wochen -2 und -1 dar.

A. testicularis	Gruppe	Untersuchungswoche				
		-2	-1	Ausgangs- werte	2	8
BFV [ml/min]	K	30,0 ± 3,0	28,3 ± 2,5	29,1 ± 2,7	27,9 ± 2,3 <sup>a</sup>	28,2 ± 2,4 <sup>a</sup>
	F	29,5 ± 3,3	31,5 ± 3,4	30,5 ± 3,1 <sup>*</sup>	24,6 ± 1,8 <sup>#,b</sup>	31,4 ± 3,8 <sup>*</sup>
	M	22,4 ± 3,9	23,2 ± 4,0	22,8 ± 3,9	21,4 ± 1,8 <sup>b</sup>	22,0 ± 2,2 <sup>b</sup>
PI	K	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1
	F	2,2 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,4 ± 0,2 <sup>*,a</sup>	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,2 <sup>#</sup>
	M	2,1 ± 0,1	1,9 ± 0,2	2,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,2

<sup>a,b</sup> Werte mit unterschiedlichen Buchstaben zwischen den Gruppen unterscheiden sich ( $p < 0,05$ )

<sup>\*,#</sup> Werte mit unterschiedlichen Asteriks zwischen den Untersuchungszeitpunkten unterscheiden sich ( $p < 0,05$ )

Tab. 4.4: Ejakulatvolumen, Spermien-gesamtzahl und vorwärtsbewegliche Spermien ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) der Hengste der Kontroll- (K), FertilaId- (F) und Molsidomin-Gruppe (M), während der drei Untersuchungszeitpunkte (n = jeweils 6 Hengste). Der Wert des Zeitpunktes 1 stellt den Mittelwert zweier Wochen (-2 und -1) dar, während die Werte der Zeitpunkte 2 und 3 die Mittelwerte dreier Wochen (1, 2 und 3 bzw. 6, 7 und 8) darstellen. Der Wert einer Woche stellt wiederum den Mittelwert dreier Untersuchungstage dar.

Spermaparameter	Gruppe	Untersuchungszeitpunkt		
		1	2	3
Ejakulatvolumen [ml]	K	46,1 ± 5,5	47,5 ± 8,4	42,8 ± 6,5
	F	35,3 ± 4,2	33,7 ± 3,6	34,6 ± 4,3
	M	46,8 ± 8,1	47,7 ± 7,5	50,1 ± 8,3
Spermien- gesamtzahl [Mrd.]	K	12,1 ± 1,1	12,2 ± 1,7	11,8 ± 1,4
	F	10,9 ± 0,9	10,7 ± 1,3	9,5 ± 1,1
	M	11,9 ± 1,5	11,4 ± 1,0	11,2 ± 1,3
Vorwärts- bewegliche Spermien [%]	K	62,2 ± 1,9*	59,3 ± 0,8#	58,4 ± 1,1
	F	60,0 ± 1,3	57,7 ± 0,9	57,8 ± 0,8
	M	61,5 ± 1,8	59,0 ± 1,8	59,4 ± 2,0

\*.# Werte mit unterschiedlichen Asteriks zwischen den Untersuchungszeitpunkten unterscheiden sich (p < 0,05)

Tab. 4.5: Ejakulatvolumen und Spermien Gesamtzahl ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) der Hengste der Kontroll- (K), FertilAid- (F) und Molsidomin-Gruppe (M) während der acht Untersuchungswochen. Es wurde der Mittelwert aus drei Untersuchungen einer Woche gebildet.

Woche	Ejakulatvolumen [ml]			Spermien Gesamtzahl [Mrd.]		
	K	F	M	K	F	M
-2	46,8 ± 7,3	34,6 ± 4,5	45,9 ± 9,8	12,5 ± 1,1	9,5 ± 0,8	12,2 ± 1,4
-1	45,5 ± 4,5	36,1 ± 4,1	47,7 ± 7,4	11,7 ± 1,2	12,2 ± 1,7	11,5 ± 1,9
1	41,6 ± 8,2	28,2 ± 3,8	40,4 ± 7,2	10,8 ± 1,9	10,0 ± 1,6	10,6 ± 1,1
2	44,9 ± 7,3	34,3 ± 4,6	47,9 ± 8,5	12,1 ± 1,4	10,0 ± 1,3	11,7 ± 1,3
3	56,0 ± 10,6	38,6 ± 5,3	54,7 ± 11,3	13,6 ± 2,3	12,2 ± 1,3	11,8 ± 1,3
6	44,9 ± 7,9	36,8 ± 5,7	51,0 ± 8,0	12,7 ± 1,7	10,5 ± 1,5	11,2 ± 1,3
7	45,4 ± 8,6	35,6 ± 4,2	54,7 ± 9,7	12,3 ± 1,7	9,4 ± 0,6	12,6 ± 1,6
8	38,1 ± 4,7	31,6 ± 4,6	44,7 ± 7,9	10,3 ± 1,1	8,6 ± 1,3	9,9 ± 1,0

Tab. 4.6: Vorwärtsbewegliche Spermien ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) der Hengste der Kontroll- (K), FertilAid- (F) und Molsidomin-Gruppe (M) während der acht Untersuchungswochen (n = jeweils 6 Hengste). Es wurde der Mittelwert aus drei Untersuchungen einer Woche gebildet.

Woche	Vorwärtsbewegliche Spermien [%]		
	K	F	M
-2	62,8 ± 1,0	59,4 ± 1,8	63,1 ± 2,0
-1	61,7 ± 2,8	60,6 ± 1,0	60,0 ± 2,1
1	60,3 ± 1,2	59,7 ± 1,5	60,2 ± 2,4
2	62,5 ± 1,7	56,1 ± 1,6	61,4 ± 3,4
3	55,0 ± 1,4	57,2 ± 1,6	55,6 ± 2,2
6	57,5 ± 2,1	61,7 ± 2,1	63,6 ± 2,0
7	60,0 ± 3,0	56,1 ± 1,6	57,2 ± 2,9
8	57,8 ± 1,1	55,6 ± 1,0	57,5 ± 2,1

Tab. 4.7: Anteil vitaler bzw. akrosomangefärbter Spermien im SYTO<sup>®</sup>17/FITC-PNA/PI-Assay und DFI-Spermien im Spermachromatinstruktur-Assay ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ). Es wurden kryokonservierte Spermaproben der Hengste der Kontroll- (K), FertilAid- (F) und Molsidomin-Gruppe (M) in den Untersuchungswochen -2 (Zeitpunkt 1), 2 (Zeitpunkt 2) und 8 (Zeitpunkt 3) untersucht (n = jeweils 6 Hengste).

Spermaparameter	Gruppe	Untersuchungszeitpunkt		
		1	2	3
Vitale Spermien [%]	K	41,3 ± 2,5	36,7 ± 3,6	40,7 ± 2,9
	F	40,1 ± 4,6	37,1 ± 4,4	36,8 ±
	M	39,4 ± 4,9	39,9 ± 3,4	37,6 ± 5,6
Akrosom- angefärbte Spermien [%]	K	16,0 ± 1,7	17,7 ± 0,9	18,5 ± 2,8
	F	17,1 ± 1,7	19,3 ± 2,1	18,7 ± 2,3
	M	18,0 ± 3,3	19,1 ± 2,3	18,3 ± 3,3
DFI-Spermien [%]	K	15,4 ± 5,0*	15,7 ± 6,9	25,8 ± 6,1#
	F	16,4 ± 4,3*	11,5 ± 2,4#	17,1 ± 1,8
	M	9,6 ± 0,7*	10,4 ± 1,6	18,3 ± 3,8#

\*, # Werte mit unterschiedlichen Zeichen innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ )



Tab. 4.9: PI und BFV ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ) der A. testicularis der Hengste der Kontroll- (K) und hCG-Gruppe (H) während der neun Untersuchungszeitpunkte. Bei jeder Untersuchung wurde der Mittelwert aus den Werten der rechten und linken A. testicularis gebildet.

Untersuchungs- zeitpunkt [h]	BFV [ml/min]		PI	
	K (n = 4)	H (n = 8)	K (n = 4)	H (n = 8)
0	33,0 ± 3,8	25,7 ± 3,5*	1,84 ± 0,1	2,63 ± 0,4*
1	33,6 ± 6,2	31,2 ± 4,3#	1,87 ± 0,2	2,06 ± 0,3#
3	38,9 ± 8,6	26,2 ± 3,2	2,10 ± 0,1	2,32 ± 0,3
6	33,1 ± 3,5	30,0 ± 4,5	1,92 ± 0,1	2,22 ± 0,3
12	33,3 ± 4,1	31,0 ± 5,3#	1,92 ± 0,2	2,46 ± 0,4*
24	33,9 ± 5,4	34,7 ± 5,7#	1,88 ± 0,1	1,99 ± 0,4#
72	30,8 ± 1,8	22,5 ± 2,5	1,83 ± 0,1	2,44 ± 0,4*
120	24,7 ± 3,8	21,8 ± 2,7	1,80 ± 0,1	2,62 ± 0,4*
168	28,9 ± 4,8	17,8 ± 2,2+	2,29 ± 0,3	2,43 ± 0,3

\*.# + Werte mit unterschiedlichen Zeichen innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ )

Tab. 4.10: Testosteron- und Gesamtöstrogenkonzentration ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ) im Blutplasma der Hengste der Kontroll- (K) bzw. hCG-Gruppe (H) während der neun Untersuchungszeitpunkte.

Untersuchungs- zeitpunkt [h]	Testosteron [ng/ml]		Gesamtöstrogen [pmol/ml]	
	K (n = 4)	H (n = 8)	K (n = 4)	H (n = 8)
0	0,35 ± 0,15	0,53 ± 0,14*	300 ± 57	202 ± 34*
1	0,42 ± 0,13	1,61 ± 0,27#	295 ± 74	226 ± 33
3	0,63 ± 0,18	2,74 ± 0,38#	298 ± 70	231 ± 32
6	1,33 ± 0,19	1,84 ± 0,23#	353 ± 36	323 ± 57#
12	1,23 ± 0,11	2,01 ± 0,30#	383 ± 57	319 ± 48#
24	0,75 ± 0,13	2,39 ± 0,36#	325 ± 64	342 ± 52#
72	0,65 ± 0,13	3,46 ± 0,77#	267 ± 26	181 ± 21
120	0,75 ± 0,25	1,48 ± 0,30#	284 ± 22	139 ± 25
168	0,95 ± 0,32	1,04 ± 0,11#	345 ± 85	109 ± 17+

\*.# + Werte mit unterschiedlichen Zeichen innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ )

Tab. 4.13: PI und BFV der *A. testicularis* ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) der fertilen und subfertilen Hengste der hCG-Gruppe während der neun Untersuchungszeitpunkte.

Untersuchungs- zeitpunkt [h]	BFV		PI	
	Fertil (n = 4)	Subfertil (n = 4)	Fertil (n = 4)	Subfertil (n = 4)
0	27,7 ± 3,2	23,8 ± 6,6	2,11 ± 0,41	3,15 ± 0,52
1	32,5 ± 3,5	30,0 ± 8,6	1,64 ± 0,19	2,48 ± 0,49
3	28,1 ± 2,7	24,2 ± 6,0	2,05 ± 0,32	2,58 ± 0,58
6	28,8 ± 3,4	31,2 ± 9,1	1,78 ± 0,23 <sup>(a)</sup>	2,66 ± 0,46 <sup>(b)</sup>
12	30,3 ± 3,8	31,8 ± 10,7	1,86 ± 0,32	3,05 ± 0,58
24	38,8 ± 7,0	30,6 ± 9,4	1,39 ± 0,20 <sup>(a)</sup>	2,58 ± 0,58 <sup>(b)</sup>
72	26,1 ± 2,2	18,9 ± 4,1	1,89 ± 0,39 <sup>(a)</sup>	2,99 ± 0,51 <sup>(b)</sup>
120	20,7 ± 2,7	22,9 ± 5,0	2,19 ± 0,51	3,05 ± 0,51
168	19,2 ± 3,3	16,3 ± 3,1	2,27 ± 0,34	2,59 ± 0,48

<sup>(a)</sup>, <sup>(b)</sup>. Werte mit unterschiedlichen Buchstaben zwischen den Gruppen unterscheiden sich tendenziell ( $p < 0,10$ )

Tab. 4.14: Testosteron- und Gesamtöstrogenkonzentrationen ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) der fertilen und subfertilen Hengste der hCG-Gruppe, während der neun Untersuchungszeitpunkte.

Untersuchungszeitpunkt [h]	Testosteron		Gesamtöstrogen	
	Fertil (n = 4)	Subfertil (n = 4)	Fertil (n = 4)	Subfertil (n = 4)
0	0,78 ± 0,20	0,27 ± 0,08	201 ± 10	204 ± 72
1	1,63 ± 0,30	1,60 ± 0,49	250 ± 33	202 ± 59
3	3,35 ± 0,51 <sup>(a)</sup>	2,13 ± 0,39 <sup>(b)</sup>	283 ± 24	179 ± 47
6	2,28 ± 0,26 <sup>(a)</sup>	1,40 ± 0,21 <sup>(b)</sup>	343 ± 45 <sup>(a)</sup>	303 ± 112 <sup>(b)</sup>
12	2,13 ± 0,58	1,90 ± 0,29	376 ± 14	262 ± 90
24	2,20 ± 0,20	2,58 ± 0,73	349 ± 52	335 ± 99
72	4,53 ± 1,39	2,40 ± 0,31	185 ± 27	177 ± 37
120	1,78 ± 0,54	1,18 ± 0,24	164 ± 38	114 ± 31
168	1,18 ± 0,17	0,90 ± 0,11	120 ± 27	98 ± 24

<sup>(a)</sup>, <sup>(b)</sup>. Werte mit unterschiedlichen Buchstaben zwischen den Gruppen unterscheiden sich tendenziell ( $p < 0,10$ )



## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Johann Joachim Schulze  
Geburtsdatum: 27.09.1975  
Geburtsort: Lübeck  
Eltern: Dr. med. Helmut Schulze  
Dr. med. Almuth Schulze  
Bruder: Florian Schulze

### Schulischer und beruflicher Werdegang:

1982 – 1986            Grundschule am Klosterhof, Lübeck  
1986 – 1995            Johanneum zu Lübeck  
17. 06. 1995            Abitur  
1996 – 1998            Studium der Tiermedizin an der Veterinärmedizinischen Universität  
Budapest, Ungarn  
1998 – 2002            Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover  
1999 – 2000            Unterassistent an der Klinik für Rinder der Tierärztlichen  
Hochschule Hannover  
17. 06. 2002            Staatsexamen  
14. 08. 2002            Approbation  
Sept. 2002 – Okt. 2004    Anfertigung der Dissertation über die Gynäkologische und  
Ambulatorische Tierklinik der Universität München  
Okt. 2002 – Juli 2003    Besamungstechniker am Niedersächsischen Landgestüt in Celle

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. R. Stolla möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die jederzeit gewährte Unterstützung und Korrektur meiner Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. H. Bollwein für seine unermüdliche und aufopferungsvolle Unterstützung und freundschaftliche Hilfe.

Danken möchte ich Dr. H. Sieme und den Doktoranden und Mitarbeitern des Landgestüt Celle für ihre Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche.

Besonders die unzähligen gemeinsamen Stunden mit Eva Scheibenzuber beim „Dopplern“ der Hengste werden mir wohl immer in Erinnerung bleiben.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Doktoranten und Mitarbeitern der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München für ihre freundliche Unterstützung und Mithilfe bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Besonders Jenny Wu und Dr. Lorenzo Diaz danke ich für die Unterstützung bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen bzw. den graphischen Darstellungen.

Dr. Frank Weber und Heidi Mayrhofer gilt mein Dank für die hormonanalytische Auswertung meiner Blutproben.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern und Alexandra Berndmeyer, die mit viel Verständnis und positiver Ausstrahlung hinter mir und dieser Arbeit standen.