

Forschungsprobleme auf dem Gebiete der Physiologie und Biochemie der Fortpflanzung der Tiere

Autor(en): **Mann, Thaddeus**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **103 (1961)**

Heft 7

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-591381>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Aus der Forschungsgemeinschaft Physiologie und Biochemie der Fortpflanzung der Tiere.
Universität zu Cambridge (England)
(Vorstand: Univ.-Doz. Dr. med. et phil. T. Mann, F.R.S.)

Forschungsprobleme auf dem Gebiete der Physiologie und Biochemie der Fortpflanzung der Tiere¹

Von Thaddeus Mann

Das auf der ganzen Welt wachsende Interesse an Problemen der Fruchtbarkeit und Unfruchtbarkeit manifestiert sich in der intensiven wissenschaftlichen Tätigkeit und der stets wachsenden Zahl der Forscher auf diesem Gebiet. Während sich die ersten Untersuchungen hauptsächlich mit den soziologischen und medizinischen Belangen befaßten, beschlagen die neueren Forschungen mehr das Gebiet der Physiologie und Biochemie. Die ersten physiologischen und biochemischen Studien begannen um die Mitte des letzten Jahrhunderts. Zwei Namen sind auf immer mit den grundlegenden Entdeckungen jener Epoche verbunden, nämlich die von Albert Koelliker und Friedrich Miescher.

Koelliker, 1817 in Zürich geboren und Absolvent der dortigen Universität, war einer der hervorragendsten Forscher des letzten Jahrhunderts. Auf Grund seiner embryologischen Studien vertrat er, im Gegensatz zu der damaligen Meinung, erstmals mit aller Klarheit die Auffassung, daß die Befruchtung des Eies vielmehr eine Angelegenheit des Zellkernes als des Zellplasmas darstelle. Am Ende seines Lebens konnte er in seiner Selbstbiographie «Erinnerungen aus meinem Leben» die gesicherte Feststellung machen: «Wie wir oben sahen, führen alle neuen embryologischen Untersuchungen zu der Annahme, daß die Befruchtung von den Zellkernen ausgehe und somit auch die Vererbung an die Nuclei gebunden sei.» Von fundamentaler Bedeutung sind auch die in 3 Publikationen niedergelegten Beiträge über die Spermiogenese und Physiologie der Spermien. Die erste Arbeit mit dem Titel: «Beiträge zur Kenntnis der Geschlechtsverhältnisse und der Samenflüssigkeit wirbelloser Tiere, nebst einem Versuch über Wesen und Bedeutung der sog. Samentiere» wurde 1841 in Berlin publiziert. Die zweite «Die Bildung der Samenfädchen in Bläschen als allgemeines Entwicklungsgesetz» erschien 1847 in der «Neuen Denkschrift der schweizerischen Gesellschaft für die Naturwissenschaften», und die dritte wurde 1856 unter der Überschrift «Physiologische Studien über die Samenflüssigkeit» in der «Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie» veröffentlicht. Diese letzte Arbeit enthält außerordentlich wichtige Beobachtungen über die Spermaphysiologie, insbesondere die Entdeckung, daß der Immobilisierung der Spermien durch Wasser, d. h. dem sog. «Verdünnungseffekt» durch Zugabe von gewissen Salzen und organischen Substanzen, z. B. Proteine, Zucker und Glycerin, entgegengewirkt werden kann. In der gleichen Mitteilung weist Koelliker auch darauf hin, daß Cyanid, bekanntlich ein starkes Hemmungsmittel der Zellatmung, die Motilität der Spermien nicht immer aufhebt. Heute wissen wir, daß dieser Effekt des Cyanids darauf zurückzuführen ist, daß es in geeigneten Konzentrationen die Zellatmung hemmt, ohne die Glykolyse zu beeinträchtigen. Spermatozoen haben aber die

¹Gastvorlesung gehalten an der Veterinär-Medizinischen Fakultät der Universität Zürich, am 22. Februar 1961.

Fähigkeit, die Energie für die Bewegung entweder aus der Zellatmung oder der Glykolyse zu gewinnen. Es ist deshalb verständlich, daß die Unterdrückung nur des einen dieser beiden Metabolismen nicht unbedingt eine völlige Immobilisierung der Spermien herbeiführt.

Historisch ist es recht interessant, daß Friedrich Miescher, der andere Pionier auf dem Gebiete der Physiologie und Biochemie der Fortpflanzung in der Schweiz, sich wie Koelliker hauptsächlich mit der Funktion der Zellkerne, insbesondere derjenigen der Spermatozoen, befaßte. Mieschers Arbeit wurde 1870 veröffentlicht und posthum erschien sie in dem monumentalen Werk «Histochemische und physiologische Arbeiten». Er führte als erster ausgedehnte Experimente über die Chemie der Kernsubstanz der Spermien aus und schuf damit die Grundlagen für die moderne Physiologie und Biochemie der Nukleinsäuren. Weniger bekannt, aber nicht weniger wichtig, sind seine anderen Untersuchungen an den Spermatozoen. Den Fußstapfen Koellikers folgend, der erstmals Lipidanalysen an Spermien ausführte, bewies Miescher, daß die Spermienlipide hauptsächlich im Schwanz der Samenfäden konzentriert sind und zum großen Teil aus Phospholipiden und Cholesterin bestehen. Es entging Miescher auch nicht, daß Spermien im Gegensatz zu anderen tierischen Zellen nur in sehr geringem Maße Wasserstoffsperoxyd zerlegen können. Heute wissen wir, daß dies auf dem Katalasemangel der Spermien beruht. Der Katalasemangel im normalen und reinlich entnommenen Stiersamen ist so charakteristisch, daß in Dänemark darauf eine Testmethode zur Beurteilung der «hygienischen Qualität» des Stiersamens entwickelt wurde. Dieser Katalase-Test wird in der Weise ausgeführt, daß dem Samen etwas Wasserstoffperoxyd zugeführt und die gebildete O_2 -Menge gemessen wird. Entwickelt sich dabei in größerer Menge O_2 , so spricht dies für einen erhöhten Fremdzellgehalt des Samens (Leukozyten, Epithelzellen, Bakterien).

Nun wollen wir unser Augenmerk auf die neueren Fortschritte der Fortpflanzungsphysiologie richten. Wer immer in den letzten Jahren versuchte, sich auf diesem Gebiet auf dem laufenden zu halten, der mußte feststellen, daß die Forscher zwei ganz entgegengesetzte Ziele verfolgen. Die einen suchen Methoden zur Verminderung der menschlichen Fruchtbarkeit bzw. Mittel zur freiwilligen Sterilität, die andern hingegen bemühen sich, die Fruchtbarkeit zu erhöhen, nämlich bei den Haustieren, um die Produktion an Fleisch und Milch zu erhöhen, damit die rasch wachsende Menschheit ernährt werden kann. Diese entgegengesetzten Interessen spiegeln sich naturgemäß auch in den unterschiedlichen Forschungsmethoden und -resultaten wider. Einerseits wurden in den letzten Jahren wichtige spermicide bzw. ovizide Substanzen entdeckt und Mittel gefunden, welche bei oraler Medikation die Konzeption verhindern.

Über diese mannigfaltigen Probleme liegen viele neue Publikationen vor; z. B. über spermienimmobilisierende Agentien (Gamble, 1957; Mann, 1958; Jackson, 1959), über abortiv wirkende Antimetaboliten (Thiersch, 1956), über ausgedehnte chemische und klinische Versuche mit verschiedenen peroral wirksamen Progestogenen zur Unterdrückung der Ovulation (Pincus, 1958; Rock, Garcia und Pincus, 1957; Jackson, 1958). Andererseits führten die ununterbrochenen Bemühungen auf dem Gebiete der Fortpflanzungsphysiologie der Haustiere zum Resultat, daß jetzt Stiersamen mehr als 7 Jahre aufbewahrt werden kann, ohne seine Befruchtungsfähigkeit einzubüßen (Rowson, 1956; Polge, 1957).

Bei dieser Gelegenheit möchte ich nur über einige ausgewählte Forschungsprobleme sprechen, welche mich und meine Kollegen in Cambridge beschäftigen. Das erste betrifft:

Die Bewertung des Samens von Haustieren mittels chemischer Methoden

Der ejakulierte Samen besteht aus zwei Teilen: den Spermatozoen und dem Samenplasma. Von vielen Standpunkten aus müssen diese beiden Komponenten des Samens separat betrachtet werden, im gleichen Sinne wie zum Beispiel die beiden Teile des Blutes, nämlich Blutzellen und Blutplasma. Ebenso wie die beiden Teile des Blutes unterscheiden sich jene, welche den Samen zusammensetzen, in ihrem Ursprung, ihrer Zusammensetzung und Funktion. Die Spermatozoen werden im Hoden entwickelt und im Nebenhoden gespeichert. Während der Ejakulation kommen sie in Kontakt mit den ergänzenden Sekreten der verschiedenen akzessorischen Drüsen, wie Prostata, Samenblasen und den Bulbourethral-Drüsen; diese Sekrete bilden zusammen das Samenplasma, das heißt die flüssige Phase, die den Träger für die Spermien bildet.

Bis vor kurzem basierte die Beurteilung des Samens vor allem auf morphologischen Kriterien, zum Beispiel der Bestimmung der Spermiedichte, der Lebensdauer, der Differentialfärbung der lebenden und toten Zellen, der Zählung der normalen und abnormen Spermienformen, dem Verhalten gegenüber Verdünnern und Zervikalschleim, bakteriologischen Untersuchungen usw. Die morphologischen Kriterien geben jedoch keine Auskunft über die Beschaffenheit des Spermaplasmas und nur relativ wenig über die Funktion der Samenzellen. Vor nicht zu langer Zeit waren die Verhältnisse noch ganz ähnlich auf einem andern Gebiet, nämlich bei der Blutanalyse. Die raschen technischen Fortschritte am Ende des letzten Jahrhunderts führten aber hier zu einer Revolution der Untersuchungsmethoden, und heute bilden neben der rein morphologischen Blutuntersuchung auch die chemischen Bestimmungen, zum Beispiel von Glukose, Chlorid, Kalzium, Protein, Reststickstoff, Harnstoff, Harnsäure, Gallenfarbstoffe usw. einen wesentlichen Teil der Blutanalyse. Heute nimmt kein Laboratorium für Blutanalyse mehr die Haltung ein, wie dies bei vielen Sperma-Analytikern noch der Fall ist, indem sie sich fast ausschließlich auf die mikroskopische Samenuntersuchung beschränken.

Unser Interesse galt in der letzten Zeit speziell folgenden 7 Samenbestandteilen: Fruktose, Zitronensäure, Ergothionein, Inosit, Phosphorylcholin, Glycerinphosphorylcholin und Sorbit. Von diesen 7 Verbindungen wurden 4, nämlich Fruktose, Ergothionein, Inosit und Sorbit in unserem eigenen Laboratorium entdeckt (Mann, 1954*a*, 1956*a*; King und Mann, 1958).

Alle diese Substanzen lassen sich bei den meisten Tierarten in kleinen Ejakulatmengen von weniger als 1 ml nachweisen. Die Analysenwerte geben Auskunft über die Sekretion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen und den Beitrag, den die verschiedenen Drüsen für das Gesamtejakulat leisten.

Alle sieben Substanzen werden von den männlichen, akzessorischen Geschlechtsdrüsen sezerniert. Das weitverbreitete Vorkommen von Fruktose als hauptsächlichstem Samenzucker, über dessen Vorkommen im Stier-

samen ich erstmals im Jahre 1946 berichtete, wurde jetzt auch bei einer Reihe von anderen Tierarten festgestellt. Fruktose kommt im Ebersamen in einer Konzentration von wenigen mg%, im Stiersamen hingegen bis zu 1% vor. Sie ist von uns auch in der Samenflüssigkeit von Mann, Widder, Ziegenbock, Kaninchen, Ratte, Maus, Meerschweinchen, Maulwurf, Igel und anderen Tierarten nachgewiesen worden. Bei den meisten Tieren entspricht die Menge der Fruktose in der Samenflüssigkeit beinahe der Gesamtmenge des vergärbaren Zuckers. Es gibt also im Samen nur ganz kleine Mengen von anderen vergärbaren Zuckern. In dieser Beziehung unterscheidet sich der Samen vom Blut des Foetus sowie den embryonalen Flüssigkeiten, wo man regelmäßig ein Gemisch von Fruktose und Glukose findet. Im Gegensatz zur Fruktose des Samens, welche in den männlichen Nebendrüsen produziert wird, ist an der Bildung der in den embryonalen Flüssigkeiten vorhandenen Fruktose die Plazenta beteiligt. Gelegentlich findet man auch Fruktose in anderen Körperflüssigkeiten des Tieres. Die biochemische und klinische Literatur der letzten Jahre enthält zahlreiche Arbeiten über das Vorkommen der Fruktose in diesen Flüssigkeiten sowie auch über den normalen und pathologischen Stoffwechsel dieses Zuckers. Eine Reihe dieser Arbeiten haben wir Herrn Professor Leuthardt und seinen Mitarbeitern vom Biochemischen Institut der Universität Zürich zu verdanken, und ich möchte besonders auf die von Herrn Leuthardt kürzlich erschienene Übersicht verweisen, nämlich den Artikel «Der Stoffwechsel der Fruktose» in der Schweizerischen Medizinischen Wochenschrift, von April 1960.

An ihrem Ursprungsort, im Hoden und Nebenhoden, haben die Spermatozoen, die hier noch unbeweglich sind, keine Fruktose zur Verfügung. Sie werden erst beweglich und kommen zum ersten Male während ihres Durchgangs durch den männlichen Zeugungstrakt mit Fruktose in Kontakt. Bei den meisten Tierarten, einschließlich Mensch, Stier, Eber und Widder, sind die Samenbläschen die hauptsächlichsten Fruktose-Erzeuger. Von dieser Regel gibt es aber Abweichungen. So wird zum Beispiel bei der Ratte die Fruktose in den Koagulationsdrüsen und in der dorsolateralen Prostata gebildet, während die eigentlichen Samenbläschen keine Fruktose enthalten. Sobald die Spermatozoen in Kontakt mit Fruktose gekommen sind, beginnen sie die Fruktose zu Milchsäure abzubauen. Bei Mangel an Sauerstoff ist der glykolytische Abbau der Fruktose zu Milchsäure, das heißt die Fruktolyse, die wichtigste metabolische Energiequelle. Normale Spermatozoen des Menschen, Stieres und Widders verwandeln Fruktose zu Milchsäure in einem Maße von ungefähr $2 \text{ mg}/10^9$ bewegliche Zellen/Stunde bei 37°C . Die Spermatozoen des Ebers haben hingegen eine viel geringere fruktolytische Fähigkeit, und verwandeln Fruktose zu Milchsäure in einem Maße von ungefähr $0,2 \text{ mg}/10^9$ bewegliche Zellen/Stunde bei 37°C (Aalbers, Mann und Polge, 1961). Jedenfalls wird Fruktose nur von beweglichen Spermatozoen verwertet. Weder azospermische Samen, das heißt Ejakulate, die keine Samenfäden enthalten, noch nekrospermische Samen, das heißt Ejaku-

late, die nur tote beziehungsweise unbewegliche Spermatozoen enthalten, können diesen Zucker abbauen oder höchstens in sehr geringem Maße. In der Tat ist die Korrelation zwischen Fruktolyse und Beweglichkeit so auffallend, daß man die chemische Bestimmung der verschwindenden Fruktose oder der neuproduzierten Milchsäure als ein rasches und quantitatives Maß für die Spermbeweglichkeit verwenden kann.

Gewaschene Spermazellen, also solche, von welchen die ganze Fruktose durch Zentrifugation und Waschen mit Ringerlösung entfernt wurde, sind ganz unfähig, sich anaerobisch zu bewegen. In der Gegenwart von Sauerstoff dagegen sind die gewaschenen Spermazellen gut beweglich. Die Quelle der aerob-metabolischen Energie ist die sogenannte endogene Atmung der Spermazellen. Lardy und Phillips (1941) waren der Meinung, daß gewaschene Spermatozoen das intrazelluläre Lezithin verbrennen und auf diesem Wege ihre aerobe Energie erhalten. Diese Annahme konnte aber nicht bestätigt werden.

Während der letzten 2 Jahre führten Dr. Hartree und ich (Hartree und Mann, 1959, 1960) ausgedehnte Untersuchungen über die innere Atmung von Widderspermatozoen aus. Dabei fanden wir, daß die intrazellulären Lipide der Spermatozoen zum großen Teil aus einem Cholin-Plasmalogen bestehen, welches ein Molekül Fettsäure, ein Molekül Fettaldehyd und ein Molekül Glyzerylphosphorylcholin enthält. Kürzlich gelang uns der Nachweis, daß nicht das Lezithin (wie Lardy und Phillips glaubten), sondern das Plasmalogen das Substrat für die innere Atmung darstellt. Wir zeigten, daß gewaschene Spermatozoen von ihrem eigenen, intrazellulären Plasmalogen Fettsäuren abspalten und diese oxydieren, um auf aerobem Wege Energie zu gewinnen. Nach unseren Analysen werden bei diesem Prozeß hauptsächlich Fettsäuren mit 14 und 16 C-Atomen vom Plasmalogen abgetrennt.

Der Nachweis, daß Spermatozoen als Energiequelle intrazelluläres Plasmalogen verwenden können, führt zur Frage, welche physiologische Bedeutung diesem Lipid hinsichtlich Spermienmotilität und -überlebensdauer im Vergleich zur extrazellulären Fruktose und Milchsäure des Samenplasmas zukommt. Gegenüber Milchsäure und Plasmalogen hat die Fruktose den Vorteil, sowohl im aeroben als auch anaeroben Stoffwechsel als Substrat dienen zu können. Ihr Wert dürfte deshalb bei sehr hoher Spermienkonzentration am größten sein, also zum Beispiel im frisch ejakulierten Sperma am Deponierungsort im weiblichen Genitaltrakt.

In einem Widderejakulat von 1,2 ml mit 4×10^9 Spermatozoen, 4 mg Fruktose und einem Fruktolyseindex von 2 mg Fruktose/ 10^9 Spermien/ 1^h bei 37°C (Mann, 1948) würde die gesamte Fruktose innert 15 Min. in Milchsäure abgebaut werden; ein Weiterleben der Spermien wäre alsdann ohne eine andere Energiequelle nicht mehr möglich. Zu dieser Zeit hat die Spermienpassage durch den weiblichen Genitaltrakt bereits begonnen; wahrscheinlich wird während dieser Phase die Fähigkeit, extrazelluläre Milchsäure und intrazelluläres Plasmalogen zu oxydieren, von größter Bedeutung sein. Sofern der Sauerstoffpartialdruck im Uterus nicht tiefer liegt als in den

übrigen Geweben, dürfte der Verwertung dieser oxydablen Substanzen nichts im Wege stehen. Bei dieser Gelegenheit sei auf die interessante Tatsache hingewiesen, daß die Geschwindigkeit der O₂-Aufnahme von Widderspermatozoen sich praktisch nicht ändert, wenn die O₂-Spannung von 100% auf 4% abfällt (Humphrey und Mann, 1949). Im weiteren wollen wir uns erinnern, daß die Energie, welche eine Zelle beim aeroben Abbau eines Kohlehydrat- oder Fettsäuremoleküls gewinnen kann, viel größer ist als diejenige aus der Glykolyse. Die vollständige Oxydation eines Fruktosemoleküls (*via* Milchsäure) liefert der Spermienzelle 25mal mehr Energie als die anaerobe Fructolyse. Diese sowie die längst bekannte Tatsache, daß viele Spermien, welche den Eileiter erreichen, noch voll beweglich sind, lassen vermuten, daß Spermien *in vivo* so lange keine Schwierigkeiten zur Deckung ihres Energiebedarfes haben, als ihnen oxydierbare extrazelluläre Substrate zur Verfügung stehen, z. B. Milchsäure, welche sowohl im Samenplasma als auch in den Sekreten des weiblichen Genitaltraktes reichlich vorhanden ist oder intrazelluläres Plasmalogen, welches als Quelle oxydierbarer Fettsäuren fungieren kann.

Damit kommen wir zur wichtigen und oft aufgeworfenen Frage: Wieviel Zeit brauchen die Spermatozoen, um von der Stelle der Samendeponierung im weiblichen Zeugungstrakt bis an den Befruchtungsort im Eileiter zu gelangen? Diese Frage wurde schon oft und bei verschiedenen Gelegenheiten diskutiert, u. a. auch von Professor Spörri in seinem Übersichtsreferat über die «Physiologischen Grundlagen der künstlichen Besamung» (1957). Neuere Untersuchungen zeigen, daß die Spermienpassage im weiblichen Genitalapparat viel mehr passiv durch Uteruskontraktionen als aktiv durch die eigene Beweglichkeit erfolgt. Rowson (1955) zeigte beispielsweise, daß die Röntgenkontrastflüssigkeit «Neohydriol» schon 30 Minuten nach ihrer Deponierung im Uterus einer brünstigen Kuh im Eileiter zu finden ist und daß die Injektion von Oxytocin (30 Einheiten Pitocin) den Spermienaufstieg noch beschleunigt. In Zusammenarbeit mit Rowson und Polge habe ich das Problem des Spermienaufstiegs im weiblichen Genitalapparat des Schweines untersucht (Mann, Polge und Rowson, 1956). Dabei zeigte sich, daß die Eberspermatozoen das uterine Ende der Tube schon kurze Zeit nach dem Decken erreichen. Bei Verwendung von Fruktose und anderer Bestandteile des Samenplasmas, nämlich Zitronensäure und Ergothionein als «chemische Indikatoren» für die Anwesenheit von Samenplasma, konnten wir zeigen, daß das Samenplasma die Spermien bei ihrem Aufstieg durch den Uterus begleitet und gleichzeitig mit den Spermien den Eileiter erreicht. Ähnliche Resultate erhielten wir bei analogen Versuchen bei der Stute. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob bei anderen Tierarten gleiche Verhältnisse vorliegen. Im Gegensatz zu vielen anderen Tierarten wird der Samen beim Decken des Schweines und der Stute entweder im Uterus oder im uterinen Ende der Zervix deponiert. Eber- und Hengstsamen sind übrigens in mancher Hinsicht von dem anderer Tierarten verschieden.

Eberejakulate sind sehr voluminös und messen gelegentlich mehr als ½ Liter. Ihre Spermiedichte ist ziemlich gering, manchmal kleiner als 3000 Zellen pro μ l. Sie enthalten viel Gel. Ebersamen wird nicht in einer einzigen Phase, sondern in mehreren Fraktionen ausgeschleudert. Ebersamen unterscheidet sich auch in der chemischen

Zusammensetzung von dem anderer Tierarten und des Menschen. Er ist außerordentlich reich an Zitronensäure, aber relativ arm an Fruktose; er zeichnet sich durch den Gehalt einer reduzierenden Sulphydryl-Verbindung, Ergothionein (Leone und Mann, 1951; Mann und Leone, 1953) sowie von dem Hexit *meso*-Inosit aus (Mann, 1954b). Während Fruktose und Zitronensäure im Samen sehr vieler Tierarten zu finden sind, z. B. Stier, Eber, Widder, Ziegenbock, verschiedene Nagetiere sowie beim Menschen, scheinen Ergothionein und Inosit auf wenige Tierarten beschränkt zu sein; zu diesen gehören u. a. Eber und Hengst. Kürzlich fand ich jedoch 2 weitere Tierarten, deren akzessorische Geschlechtsdrüsen Ergothionein enthalten, nämlich Maulwurf und Igel (Mann, 1956b).

Hengstsamen weist viele Eigenarten des Ebersamens auf, z. B. ein großes Ejakulatvolumen, geringe Spermiedichte und die protrahierte Ejakulation. Er enthält viel Zitronensäure und Ergothionein, ist hingegen eher arm an Fruktose (Leone, 1954; Mann, Leone und Polge, 1956). Trotz dieser Ähnlichkeit unterscheiden sich aber Eber und Hengst wesentlich in der Funktion der verschiedenen akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Eine ganz auffällige Eigenschaft des Geschlechtsapparates des Hengstes bilden die sehr großen Samenleiterampullen, welche beim Eber völlig fehlen. Ältere Anatomen- und Histologen-Arbeiten schenken diesen Organen große Aufmerksamkeit. Die Funktionen der Ampullen blieben jedoch dunkel, bis 1954 der italienische Forscher Leone den hohen Ergothionein-Gehalt des Ampullensekretes beim Pferde- und Eselhengst entdeckte. In nächster Nähe der Ampullen liegen beim Hengst die ovoiden Samenblasen, welche sich mit den Ampullen vereinigen und in zwei Ejakulationsgängen enden. Zum Unterschied von den Ampullen enthält das Samenblasensekret jedoch weniger Ergothionein, hingegen viel Zitronensäure, welche im Ampullensekret fast oder vollständig fehlt (Mann, Leone und Polge, 1956). Im Gegensatz zum Hengst enthält das Samenblasensekret des Ebers sowohl Ergothionein und Zitronensäure, auch stellt es die Hauptquelle des Inosits dar (Mann, 1954b).

Die chemische Samenuntersuchung liefert in dreierlei Hinsicht wichtige Beiträge zur Abklärung der Fortpflanzungsphysiologie; sie gibt Auskunft über:

1. das normale Maß und abnorme Abweichungen in der Zusammensetzung des Samens verschiedener Individuen der gleichen Spezies oder des gleichen Individuums zu verschiedenen Zeiten;
2. die charakteristische Reihenfolge der Entleerung der verschiedenen akzessorischen Geschlechtsdrüsen während der Ejakulation;
3. den Beitrag der verschiedenen Geschlechtsdrüsen am Gesamtejakulat.

Beweise hiefür geben die Untersuchungsergebnisse beim Eber (Glover und Mann, 1954; Mann und Glover, 1954) und Hengst (Mann, Leone und Polge, 1956).

Die Analysen von 20 Ejakulaten, welche in wöchentlichen Intervallen während einer Periode von 5 Monaten entnommen wurden, ergaben folgende Resultate: Das Volumen der Gesamtejakulate variierte zwischen 240 bis 500 ml, die Spermienzahl von 50 000 bis 177 000/ μ l, der Fruktosegehalt von 2,4 bis 12,6 mg/100 ml, das Ergothionein von 5,9 bis 23,1 mg/100 ml, die Zitronensäure von 21 bis 156 mg/100 ml. Die Reihenfolge, in welcher die verschiedenen Fraktionen des Ebersamens ejakuliert werden, wurde mittels der sogenannten fraktionierten Samenentnahme oder der «Spalt-Ejakulat-Methode» untersucht. Zuerst wird die «Präpermien-Fraktion» ejakuliert, welche zur Hauptsache aus dem wässrigen Urethraldrüsensekret besteht und weder Spermatozoen noch Samenblasensekret enthält. Dann erscheint die «Spermienreiche

Fraktion» mit einer charakteristisch hohen Spermienkonzentration (bis zu 4 000 000 Spermien/ μ l), welcher aber zugleich Samenblasensekret beigemischt ist, erkenntlich am Gehalt an Fruktose, Zitronensäure und Ergothionein. Zuletzt wird die «Post-Spermien-Fraktion» ausgestoßen, welche hauptsächlich aus Samenblasensekret besteht, was der hohe Gehalt an Fruktose (über 6 mg/100 ml), Ergothionein (über 20 mg/100 ml) und Zitronensäure (fast 100 mg/100 ml) beweist. Der Beitrag der Samenblasen und des Nebenhodens zum Gesamtejakulat wurde in 4 Ejakulaten vom gleichen Tier, welche in wöchentlichen Intervallen entnommen wurden, bestimmt. Diese Ejakulate wurden hinsichtlich Fruktose, Zitronensäure, Ergothionein und Spermiedichte analysiert. Dann wurde der Eber getötet und sowohl der Nebenhodeninhalt als auch das Samenblasensekret separat untersucht. Der Samen aus dem Nebenhoden wies eine 33mal höhere Spermienkonzentration auf als ejakulierter Samen. Daraus folgt, daß der Anteil des Nebenhodens am Gesamtsamen etwa 3% ausmacht. Das Samenblasensekret enthielt 5mal mehr Fruktose, Ergothionein und Zitronensäure als der ejakulierte Samen, somit beträgt der Anteil der Samenblasen am Gesamtejakulat etwa 20%.

Analoge Experimente beim Hengst ergaben ähnliche Resultate. Bei einem Pony wurden während eines Jahres alle 14 Tage Ejakulate entnommen und deren Volumina, Spermienkonzentration sowie der Ergothionein- und Zitronensäuregehalt bestimmt. Alle 4 Werte zeigten erhebliche saisonmäßige Schwankungen. Vom Februar bis Juni zeigten die Proben eine auffallende sukzessive Abnahme der Spermienkonzentration sowie des Ergothionein- und Zitronensäurespiegels. Während dieser Zeit fiel die Spermienzahl von 150 000/ μ l auf 30 000/ μ l, der Ergothioneingehalt von 12 auf 2 mg/100ml und die Zitronensäure von 30 auf 8 mg/100 ml. In der zweiten Jahreshälfte stiegen die Werte wieder kontinuierlich an. Die verschiedenen Samenfraktionen wurden beim Hengst in der gleichen Reihenfolge wie beim Eber ejakuliert, d. h. zuerst das Spermien-Ergothionein- und Zitronensäurefreie «Prä sperma», dann die an Spermien und Ampullensekreten reiche «Spermareiche Fraktion» und zuletzt die «Post-Sperma-Fraktion», welche zur Hauptsache aus Samenblasensekret besteht und nur wenig Spermien und Ergothionein, aber viel Zitronensäure enthält. Es muß aber betont werden, daß sowohl beim Hengst als auch beim Eber die Fraktionen gegenseitig überlappen und der Grad des Überlappens beim gleichen Individuum von einer Ejakulation zur andern zu variieren scheint. Soweit ein einziges Experiment Schlüsse gestattet, kann gesagt werden, daß beim Hengst das Ampullensekret etwa 20% und das Samenblasensekret nicht mehr als 12% des Gesamtejakulates ausmacht. Auch in dieser Hinsicht dürften aber erhebliche Schwankungen vorkommen.

Der Samenanalyse verdanken wir noch weitere Erkenntnisse. Im zweiten Teil meiner Vorlesung möchte ich nur auf zwei dieser Probleme kurz eingehen, nämlich die «Prüfung der Androgen-Aktivität in lebenden Tieren» und die Erforschung der «Beziehungen zwischen Ernährung und Fortpflanzung beim männlichen Geschlecht».

Prüfung der Androgen-Aktivität bei lebenden Tieren

Die Testes erfüllen zwei weitgehend komplementäre Funktionen:

1. die Spermio genese;
2. die Produktion von männlichem Sexualhormon.

Beim normalen Tier stimmen diese beiden Funktionen bezüglich Eintritt und Dauer nicht unbedingt überein, und bei Hodenerkrankungen kann nur die eine oder andere Funktion beeinträchtigt sein. Unsere grund-

legenden Kenntnisse über die endokrine beziehungsweise androgene Tätigkeit der Testes bei den Säugetieren stammen hauptsächlich von Kastrationsexperimenten und Hodentransplantationen sowie von Untersuchungen über die Wirkungen von Androgeninjektionen auf die akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Diese Untersuchungen, zum größten Teil noch im letzten Jahrhundert und zu Beginn dieses Jahrhunderts ausgeführt, zeigten, daß die akzessorischen Geschlechtsdrüsen, wie Prostata, Samenblasen und Nebenhoden, nach der Entfernung der Testikel der Involution verfallen, und daß dieser regressive Prozeß durch Injektion von Testikelhormon, sei es in der Form von Rohextrakten oder in Form von reinem Testosteron, aufgehalten beziehungsweise rückgängig gemacht werden kann. Diese Experimente an kastrierten Laboratoriumstieren, wie Ratten und Mäusen, ließen auch eine enge Beziehung zwischen der Testosterondosis und der Wachstumsrate der atrophierten Prostata oder Samenblase erkennen. Zur genauen Bestimmung des Wachstums der Prostata oder Samenblase müssen die Versuchstiere jedoch geopfert, ihre Bauchhöhle geöffnet und die Drüsen für die Wägung freipräpariert werden. Dieser Weg ist deshalb beim Menschen oder bei teuren Großtieren, wie zum Beispiel Stier, Widder, Eber und Hengst, nicht gangbar. Diese Schwierigkeiten in der Feststellung der Testosteroneffekte wurden jedoch in den letzten Jahren, wenigstens teilweise, überwunden, und zwar durch die chemische Samenuntersuchung. Die neue Methode, welche bei lebenden Tieren angewendet werden kann, beruht auf der Beobachtung, daß nicht nur das Wachstum und die histologische Differenzierung der Prostata und der Samenblase, sondern auch die sekretorische Funktion dieser Organe durch Kastration gehemmt beziehungsweise durch Testosteron gefördert wird. Die Bildung von Fruktose, Zitronensäure und Ergothionein in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen und deren Übertritt in das Samenplasma hört bald nach der Kastration auf und kehrt nach Testosteronapplikation prompt wieder zurück.

Die ersten Untersuchungen, welche die Möglichkeit der Bestimmung der Androgen-Aktivität mittels der chemischen Samenanalyse darlegten, wurden 1947 an Kaninchen ausgeführt (Mann und Parsons, 1947). Das Prinzip dieser Untersuchungen beruhte auf dem Fruktosenachweis im Samenplasma, welches von Kaninchen mit Hilfe der künstlichen Vagina gewonnen wurde, und zwar vor und nach Kastration bzw. nach Implantation von Testosterontabletten unter die Haut kastrierter Tiere. Bei Kaninchen verschwindet die Fruktose 2–3 Wochen nach der Kastration aus dem Samen und erscheint nach der subkutanen Implantation von Testosterontabletten prompt wieder. Ähnliche Resultate wurden bezüglich der Zitronensäure erhalten.

In der Folge dehnten wir die Untersuchungen auf die Stiere aus. Bei Stierkälbern erscheint sowohl die Fruktose als auch die Zitronensäure im Samenblasensekret etwa im 3. Lebensmonat und im Spermaplasma, welches durch Elektroejakulation gewonnen wurde, mit etwa 4–5 Monaten. Dies besagt offenbar, daß das männliche Sexualhormon beim Stierkalb bereits im Alter von 3–5 Monaten zu wirken beginnt, d. h. mehrere Monate vor dem ersten Erscheinen von Samenfäden im ejakulierten Sperma. An einer anderen Versuchsgruppe von Kälbern, welche im Alter von 2 Wochen kastriert und dann mit Testosteron behandelt wurden, konnten wir im Elektro-Ejakulat Fruktose und Zitronensäure feststellen. Bleiben solche Tiere ohne Hormonbehandlung, so

erlangen sie nie die Fähigkeit zur Bildung von Fruktose oder Zitronensäure in ihren akzessorischen Geschlechtsdrüsen.

Diese und andere Untersuchungen, speziell beim Stier, beweisen die enge Abhängigkeit der chemischen Zusammensetzung des Samens von der Wirkung des männlichen Sexualhormons (Mann, Davies und Humphrey, 1949; Mann und Rowson, 1956; Davies, Mann und Rowson, 1958).

Seit kurzer Zeit beschäftigen uns 2 Fragen (Lindner und Mann, 1960), nämlich:

1. Fällt das Auftreten der Fruktose und Zitronensäure in den Samenblasen junger, wachsender Stierkälber zeitlich mit dem Erscheinen von chemisch nachweisbarem Testosteron in den Hoden zusammen?

2. Besteht zwischen dem Fruktose- und Zitronensäuregehalt der Samenblasen erwachsener Stiere und dem Spiegel des chemisch nachweisbaren Testosterons in den Hoden eine quantitative Beziehung? Unsere Versuche wurden an 32 Stieren der Milch- und Fleischrassen im Alter von 28 Tagen bis 17½ Jahren durchgeführt. Die Hoden und Samenblasen wurden bei der Schlachtung entnommen und sofort in Kohlendioxyd eingefroren. Die Steroidbestimmung wurde auf chromatographisch-spektrophotometrischem Wege ausgeführt, wozu 5–25 g Testikelgewebe verwendet wurden. Die Fruktose- und Zitronensäurebestimmung erfolgte kolorimetrisch, wozu 1 g Samenblasengewebe gebraucht wurde.

Beim Stierkalb fallen nach unseren Befunden die Fruktose- und Zitronensäuresekretion in den Samenblasen mit dem Erscheinen des Testosterons in den Testes zusammen. Schon am 39. Lebenstag konnten Spuren von Testosteron in den Hoden gefunden werden, und gleichzeitig war erstmals auch Fruktose und Zitronensäure in den Samenblasen festzustellen. In diesem frühen Alter enthielt der Hoden neben den ersten Testosteronspuren deutliche Mengen eines andern, nahe verwandten Steroids, nämlich Androstendion. Früher wurde Androstendion häufig als ein Abbauprodukt des Testosterons betrachtet, entstehend durch Oxydation von Testosteron. Unsere Ergebnisse stimmen hingegen mit der Ansicht überein, daß sich in den Testes Androstendion früher als Testosteron anhäuft und daß die enzymatische Reduktion des androgen-inaktiven Androstendions zum androgen-aktiven Testosteron die Testosteronproduktion auslöst, der in der Folge die Bildung der Fruktose und Zitronensäure in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen folgt. Mit dem Älterwerden des Stieres ändert sich das Verhältnis von Androstendion zu Testosteron mehr und mehr zugunsten des Testosterons. Bei Stierkälbern unter 4 Monaten beträgt dieser Quotient mehr als 1, bei Tieren von 4 bis 9 Monaten bewegt er sich zwischen 1 und 0,1, und bei geschlechtsreifen Stieren über 9 Monaten liegt er unter 0,1. Die Abnahme des Androstendion-Testosteron-Verhältnisses und der Übergang des von «Androstendion dominierten» zum «Testosteron dominierten» Testis, welcher im Alter von 4 bis 6 Monaten eintritt, kann am besten festgestellt werden bei der Untersuchung von Papier-Chromatogrammen im Ultraviolett-Licht.

Eine weitere interessante Beziehung wurde beim Vergleich der Fruktose- und Zitronensäurekonzentrationen in den Samenblasen mit den testikulären Androgenmengen der gleichen Tiere beziehungsweise den Samenblasengewichten entdeckt. Trägt man die logarithmischen Werte der Fruktose- und Zitronensäurekonzentrationen oder des Samenblasengewichtes als Funktion des Alters auf, so ergibt sich eine fast völlig lineare Abhängigkeit. Dies beweist, daß in der Zeit der Reifung sowohl das Gewicht als auch die Sekretion der Samenblasen exponentiell zunehmen. Eine solche Korrelation fällt weniger auf, wenn die Fruktose- und Zitronensäurekonzentrationen der verschiedenen Individuen mit dem Testosterongehalt der Testikel verglichen werden. Gleichwohl besteht eine solche Korrelation. Berechnet man den mittleren Testosterongehalt von 2 Tiergruppen, von denen die eine die 39 bis 90 Tage alten Tiere, die andere diejenigen im Alter von $3\frac{1}{2}$ bis $5\frac{1}{2}$ Monaten umfaßt, dann findet man eine eindeutige Korrelation. Der steile Anstieg der Fruktose- und Zitronensäurespiegel mit dem Älterwerden der Tiere wird in gleicher Weise auch von einem steilen Anstieg des Testosteronspiegels begleitet.

Unsere Befunde unterstützen die Ansicht, daß die Fruktose- und Zitronensäurebildung in den Samenblasen nicht nur bei kastrierten und dann mit Testosteron behandelten Tieren, sondern auch bei solchen mit intakten Testes ein zuverlässiges Kriterium der Androgen-Aktivität der Hoden darstellt.

Die enge Korrelation zwischen der Funktion der Hoden und Samenblasen fällt um so mehr auf, als neben dem männlichen Sexualhormon noch andere Faktoren die Sekretion der Samenblasen beeinflussen, zum Beispiel die Durchblutung der Drüse, der Glukosespiegel im Blut, die Häufigkeit der Ejakulationen und vor allem der allgemeine Nährzustand der Tiere.

Dies führt mich zur wichtigen Frage der Beziehung zwischen Ernährung und Fortpflanzung beim männlichen Geschlecht.

Ernährung und Fortpflanzung

Es ist recht schwierig, Angaben über die essentiellen Nährstoffbedürfnisse zu machen, welche eine normale Fortpflanzung beim männlichen Tier gewährleisten. Dieses Problem ist vielschichtig, weil die in Frage stehenden Vorgänge sogar bei ein und derselben Tierart je nach Klima, Milieu, Fütterungsgewohnheiten und Reifealter variieren. Eine weitere Komplizierung rührt von den sogenannten «nervösen» oder «konditionalen» Faktoren her, welche die normalen Bedürfnisse bezüglich eines spezifischen Nährstoffes durch Beeinflussung der Resorption, der Stapelung und Ausnützung der Metaboliten in den Geweben sowie deren Exkretion so sehr verändern können, daß eine «Mangelernährung» resultiert, obwohl die Futterzusammensetzung adäquat ist. Auch dürfen wir nicht vergessen, daß Fortpflanzungsstörungen infolge «falscher Ernährung» durch kongenital-anatomische und

genetische Faktoren verschlimmert werden können. Die weitaus größte Schwierigkeit in der Beurteilung von Fortpflanzungsstörungen wegen falscher Ernährung bietet die Unterscheidung zwischen *primären* Effekten infolge Mangels an einem spezifischen Nahrungsfaktor, zum Beispiel eines Vitamins, Spurenelementes oder einer essentiellen Aminosäure und *sekundären* Effekten zufolge vermindertem Appetit, inadäquater Futteraufnahme und Unterernährung, alles Folgen einer ungenügenden Ernährungsweise. Dies ist einer der Gründe, weshalb die Paar-Fütterung eine derart unumgängliche und wichtige Voraussetzung bei allen experimentellen Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Ernährung und Fortpflanzung darstellt.

Das Schrifttum über die ernährungsbedingten Fortpflanzungsstörungen bei dem männlichen Geschlecht ist sehr umfangreich und betrifft Beobachtungen über Hodenatrophie, Gynäkomastie, verminderte Libido und Impotenz bei Diabetes, Leberzirrhose, atrophische Glossitis, Gingivitis, Seborrhoe, Keratose der Augenlider usw. Hierher gehört auch die wichtige Untersuchung von Evans und Burr (1927), über die degenerativen und atrophischen Veränderungen in den Testes bei der Sterilität der männlichen Tiere. Gesamthaft betrachtet, bilden diese und andere Studien eine imponierende Menge wertvoller Daten, welche mehrmals in Übersichtsreferaten dargestellt wurden, kürzlich auch von Lutwak-Mann (1958).

Frühere Forscher wählten als Objekt ihrer Untersuchungen hauptsächlich den Geschlechtstrieb und die Prüfung der Spermatozoen und berücksichtigten die endokrine Tätigkeit der Testes sowie die Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen kaum. Sogar in den Übersichtsreferaten der Nachkriegszeit über den Einfluß der falschen Ernährung auf die Fortpflanzung des Menschen überwiegt dieser begrenzte Gesichtskreis. Die Endokrinologen gewahrten aber schon seit langem die fundamentale Tatsache, daß die regressiven Veränderungen in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen, welche auf die verminderte endokrine Aktivität der Testikel zurückzuführen sind, der herabgesetzten Spermiogenese oft *vorausgehen* und daß die akzessorischen Geschlechtsorgane häufig leichter auf die Restriktion und Restauration einer adäquaten Ernährung ansprechen als das spermiogene Gewebe. Schon 1931 zeigten Moore und Samuels, daß schon ein Vitamin-B-Mangel von wenigen Wochen bei Ratten rasch zu einer Involution der akzessorischen Geschlechtsdrüsen führt, welche durch die Verabreichung von Testeshormon oder Hypophysenvorderlappen-Extrakt geheilt werden konnte. Sie schlossen daraus, daß die primäre Schädigung der inadäquaten Fütterung die Hypophyse betreffe und erkannten die Ähnlichkeit der Effekte bei der mangelhaften Fütterung und derjenigen nach Hypophysektomie. Über ähnliche «Pseudohypophysektomie»-Erscheinungen wurde von Mulinos und Pomerantz (1941), Pazos und Huggins (1945), u. a. berichtet. Das pathologische Bild des Vitamin-B-Mangels am männlichen Fortpflanzungssystem unterscheidet sich wesentlich von dem bei Vitamin-E-Mangel. Der letztere affiziert in erster Linie die gametogene und nicht die androgene Funktion der männlichen Gonaden. Es muß aber betont werden, daß viele Kenntnisse über die sogenannten «Antisterilitäts»-Eigenschaften des Tokopherols an Rattenexperimenten gewonnen wurden und nicht ohne weiteres auf andere Tierarten übertragen werden dürfen. Nach Blaxter und Brown (1952) dürfte die E-Avitaminose auf die Fortpflanzung der Haustiere keinen großen spezifischen Einfluß haben. Gleiche Vorsicht ist auch angezeigt, wenn andere Befunde über ernährungsbedingte Dysfunktionen am Fortpflanzungsapparat auf den Menschen oder die Haustiere übertragen werden. Sogar hinsichtlich der Bedeutung der Proteine und Aminosäuren für die normale Testikelfunktion sprechen die Untersuchungen für unterschiedliche Bedürfnisse bei den verschiedenen Tierarten. Im ganzen betrachtet, besteht aber wenig Zweifel darüber, daß wenigstens die Proteine von erstrangiger ernährungsphysiolo-

gischer Bedeutung für die Fortpflanzung beim männlichen Geschlecht sind. Lysin, Tryptophan, Tyrosin oder Arginin mögen von unterschiedlicher Bedeutung bei den Laboratoriumsnagern, Haustieren und Menschen sein, ihre allgemeine Nützlichkeit für junge, in der Geschlechtsreife stehende männliche Tiere kann aber kaum bezweifelt werden (Leathem, 1958).

Unser Interesse an der Beziehung zwischen Ernährung und Fortpflanzung konzentrierte sich während der letzten Jahre hauptsächlich auf den Einfluß der Unterernährung, auf den Eintritt der Spermatogenese und die androgene Aktivität bei männlichen Tieren zur Zeit der Geschlechtsreife (Mann und Rowson, 1956); Davies, Mann und Rowson, 1957). Die meisten Experimente wurden mit monozygoten Zwillingskälbern ausgeführt. Je ein Tier des Zwillingspaares wurde während mehreren Monaten auf einer insuffizienten Diät gehalten, während das Kontrolltier normal ernährt wurde. Der Einfluß der Unterernährung wurde an Hand von Analysen von Samenproben, welche in regelmäßigen Intervallen durch Elektroejakulation gewonnen wurden, geprüft. Das Erscheinen von Spermatozoen und ihre Dichte in den Elektro-Ejakulaten diente als Indikator für die gametogene Funktion der Testes, während Fruktose- und Zitronensäurebestimmungen im Samenplasma die Kriterien für die Beurteilung der sekretorischen Tätigkeit der akzessorischen Geschlechtsdrüsen abgaben, welche ihrerseits die androgene Aktivität widerspiegelt.

Um die Samenentnahme schon im Alter von wenigen Monaten möglich zu machen, benützten wir die Elektro-Ejakulationsmethode. Mit dieser Methode konnten wir Samenplasma, das heißt Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, schon im Alter von 4 Monaten gewinnen, also mehrere Monate, bevor das Bullenkalb in die künstliche Vagina ejakulieren kann. Mit dem Elektro-Ejakulator erhielten wir während der ganzen Versuchsperiode von mehreren Monaten in 14tägigen Intervallen Samenplasma.

Kürzung der Futterration hatte einen deutlich verzögernden Effekt auf den Eintritt der Fruktose- und Zitronensäuresekretion und eine etwas weniger starke Verzögerung des ersten Erscheinens der Spermatozoen zur Folge. Während beim Kontrollzwilling (reichliche Fütterung) Fruktose und Zitronensäure schon im Alter von $4\frac{1}{2}$ Monaten gefunden wurden und mit 6 Monaten schon einen hohen Spiegel erreichten, traten diese Substanzen bei den Zwillingen, welche nur $\frac{1}{2}$ bis $\frac{1}{3}$ der Futterration der Kontrolltiere bekamen, erst 3 Monate später auf. Interessanterweise traten Fruktose und Zitronensäure bei beiden Zwillingen ungefähr zu der Zeit auf, da sie das gleiche Körpergewicht erreichten. Beim reichlich gefütterten Kalb trat der plötzliche Anstieg des Fruktose- und Zitronensäuregehaltes ungefähr mit $5\frac{1}{2}$ Monaten auf, das heißt zu einer Zeit, als das Tier ein Gewicht von etwa 230 kg erreichte. Beim Kalb mit der reduzierten Futterration trat eine ähnliche Erhöhung der Fruktose- und Zitronensäuresekretion ein, als es ungefähr $9\frac{1}{2}$ Monate alt war und ebenfalls ein Gewicht von etwa 230 kg erreicht hatte. Spermatozoen erschienen in den Ejakulaten viel später als Fruktose und

Zitronensäure, beim Kalb mit reichlicher Fütterung mit 9–9½ Monaten und beim Zwilling mit dem reduzierten Futter einen Monat später. Mit 10½ Monaten, das heißt kurz bevor das Experiment beendet wurde, enthielten die Ejakulate beider Zwillinge Fruktose, Zitronensäure und Spermatozoen.

Die durch Mangelernährung herbeigeführte Verzögerung im Eintritt von Fruktose und Zitronensäure ist von einer starken Unterdrückung der Sekretionsfähigkeit der Samenblasen begleitet (Abb. 1). Experimente zeigten, daß der Effekt der Unterernährung auf den Ausstoß von Fruktose und Zitronensäure nicht so sehr der Unfähigkeit der Testes zur Testosteronproduktion zuzuschreiben ist (Testosteron ist für die Stimulation der akzessorischen Geschlechtsdrüsen nötig), sondern vielmehr der Unfähigkeit des Hypophysenvorderlappens, gonadotrope Hormone zu bilden. Dies wurde an einem anderen Zwillingpaar gezeigt. Dabei wurde gefunden, daß der verzögernde Effekt der Unterernährung auf die Fruktose- und Zitronensäurebildung (unterernährter Zwilling = 4½ Monate alt) durch 8 Injektionen von je 1000 E Choriongonadotropin innert 2 Wochen aufgehoben werden konnte.

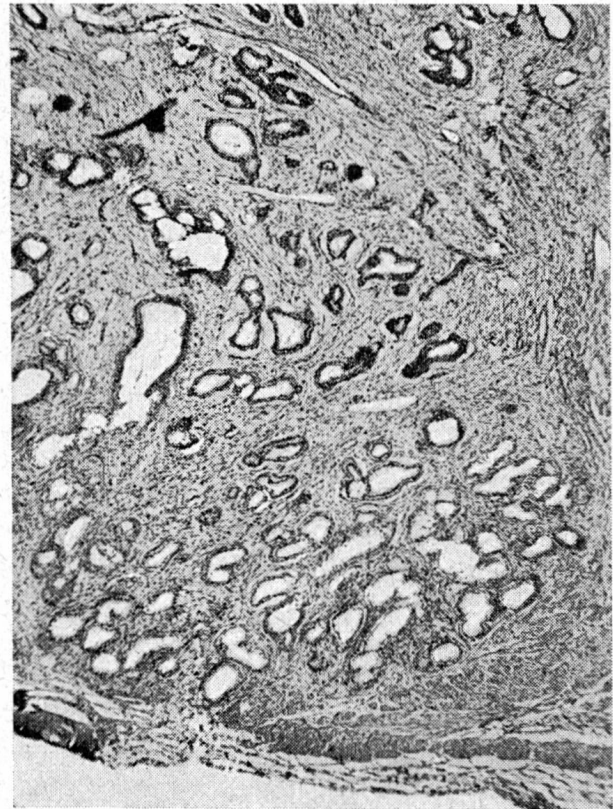
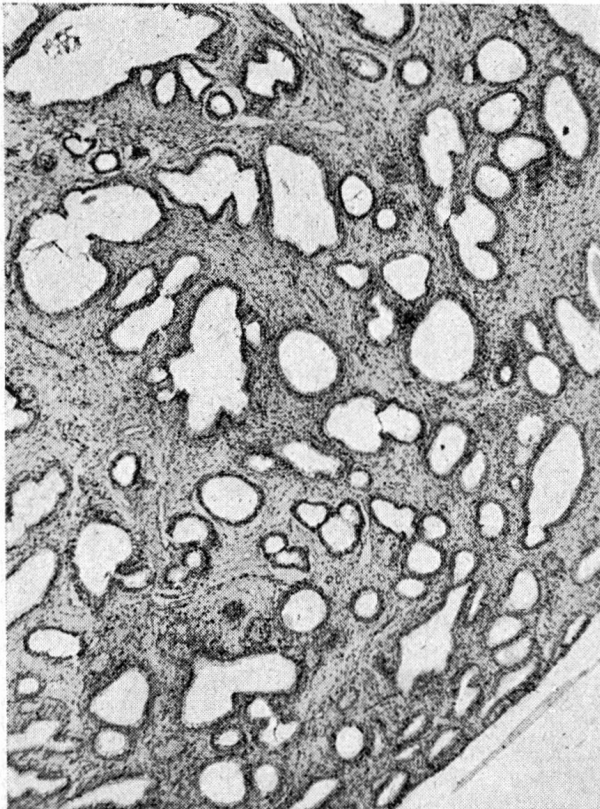
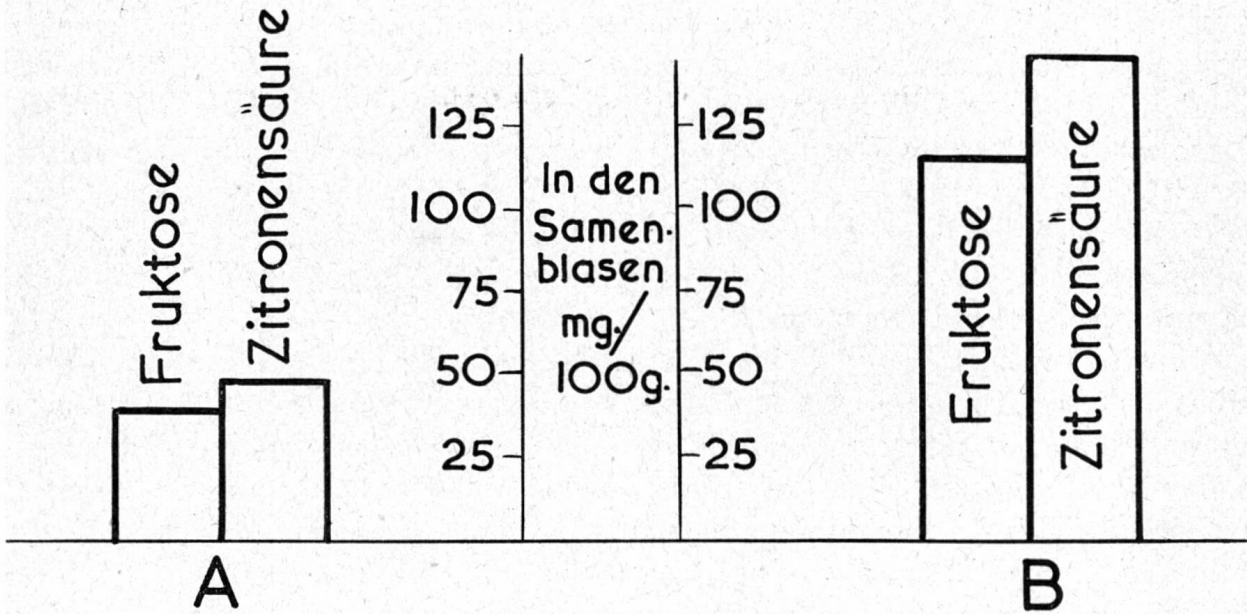
In der letzten Zeit beschäftigt Rowson, Hay und mich die Frage, ob die Reaktionsfähigkeit der akzessorischen Geschlechtsdrüsen auf Gonadotropin und Testosteron bei schlecht- und normalernährten Tieren Unterschiede aufweise. Zur Lösung dieser Frage behandelten wir kastrierte Zwillingenkälber, die einen schlecht und die andern normal gefüttert, mit kleinen Hormondosen. Das Ergebnis war eindeutig. Die Stärke des Hormoneffektes auf die akzessorischen Geschlechtsorgane ist bei insuffizienter Ernährung geringer (Mann, Rowson und Hay, 1960).



A

B

Abb. 1: Einfluß von Unterernährung auf den histologischen Zustand und die sekretorische Funktion der Samenblasen bei 5½ Monate alten Zwillingenkälbern. Versuchszwilling A bekam seit dem Alter von 2½ Monaten nur ein Drittel von der Futtermenge des Kontrollzwillinges B.



An einem Paar von monozygoten Stierkälbern, welche im Alter von 8 Monaten kastriert und bis zu 11 Monaten unter identischen Verhältnissen aufgezogen wurden, studierten wir die Frage, in welchem Ausmaß inadäquate Fütterung die Reaktionsfähigkeit auf eine bestimmte Testosterondosis beeinflusst. Vom 11. Monat an erhielt der Zwilling *A* die reduzierte Futtermenge, während der Zwilling *B* normal weitergefüttert wurde. Die Ration von *A* betrug ein Drittel derjenigen von *B* vor Versuchsbeginn. Infolge der Unterernährung blieb das Körpergewicht von *A* bald hinter dem von *B*

zurück. Im Alter von 16 Monaten wurden beide Zwillinge während 4 Monaten mit gleichen Dosen von Testosteronpropionat behandelt. Dies führte bei beiden Tieren zur Bildung von Fruktose und Zitronensäure. Die monatliche Produktionsquote an diesen beiden Substanzen war aber beim unterernährten Tier viel geringer als beim normalernährten. Der Unterschied im Ansprechen auf das Testosteron war um so bemerkenswerter, weil der Zwilling *A* zufolge seines geringeren Körpergewichtes pro Kilogramm Gewicht mehr Hormon erhielt als der normal gefütterte Zwilling Bruder *B*.

Sowohl ein unausgeglichenes Futterregime in der einen oder andern Hinsicht als auch Über- und Unterernährung können zu schweren Störungen der männlichen Fortpflanzungsfunktionen führen. Werden Ratten von der 4. Lebenswoche an auf eine sehr fettreiche Diät gesetzt, so kommt es zu einer Unterentwicklung der akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Bei Haustieren führt zu starke Mästung zu einer Reduktion der Fruchtbarkeit, eine Gefahr, welche den Tierzüchtern wohlbekannt ist. Beim Menschen sind gewisse Formen der Fettsucht sehr häufig mit Sterilität verbunden. Beim Menschen führt eine normale, aber sehr reichliche Ernährung nach einer Periode der Unterernährung recht häufig zur Gynäkomastie. Diese Beobachtung wurde nach dem Kriege beim männlichen Geschlecht der befreiten Länder häufig gemacht, ebenso bei Kriegsgefangenen einige Zeit nach ihrer Entlassung.

Der genaue Mechanismus dieser Erscheinung ist nicht klar, man glaubt, daß dabei ernährungsbedingte Änderungen in der Intensität der enzymatischen Inaktivierung der Östrogene und Androgene in der Leber eine Rolle spielen. Es verbleibt noch viel Arbeit zur Abklärung der Wirkungs-Mechanismen bei den Beziehungen zwischen Endokrinsystem, Ernährung und Fortpflanzung. Die vielleicht dringlichste Aufgabe besteht darin, das Ineinandergreifen von spezifischen Nahrungsbestandteilen, besonders der Vitamine, und der Hormone der Hypophyse und der Keimdrüse aufzuklären; damit man im Einzelfall einer Insuffizienz folgende Punkte beurteilen kann:

1. Mangelhafte Hormonbildung oder -abgabe der betreffenden endokrinen Drüse;
2. Verlust der Ansprechbarkeit eines Erfolgsorganes;
3. erhöhter oder verminderter Hormonmetabolismus und Hormonabbau in den Geweben.

Schlußbemerkungen

Ich hoffe, daß diese gedrängte Übersicht über einige wenige ausgewählte Forschungsprobleme auf dem Gebiete der tierischen Fortpflanzung nicht den Eindruck erweckte, ich hätte das gesamte Gebiet behandelt. Mein Freund, Professor Spörri, der mir bei der Vorbereitung dieser Vorlesung so sehr behilflich war und der kürzlich unsere Laboratorien in Cambridge auch besuchte, weiß, daß meine Kollegen die Bearbeitung noch ganz verschiedener Probleme in Angriff genommen haben; z. B. die Biochemie des Fötus, insbesondere während der Frühphasen der Gravidität (Lutwak-Mann, 1960; Lutwak-Mann, Bournsnel und Bennett, 1960); die Eitransplantation (Moore, Rowson und Short, 1960; Adams, 1960), die Funktion der Östrogene und des Progesterons (Short, 1960*a, b*), die artifizielle Insemination,

speziell bei Schweinen (Polge, 1959). Mein Referat befaßte sich ausschließlich mit den Fragen, die ich selber experimentell bearbeitete. Keines dieser Probleme ist völlig gelöst. Viel Forschungsarbeit muß noch geleistet werden, bis wir die Mechanismen verstehen können, welche der Spermien-Motilität und -Fertilität, der Wirkungsweise des Testosterons auf die akzessorischen Geschlechtsdrüsen oder Störung der Fortpflanzung bei mangelhafter Ernährung bei Mensch und Tier zu Grunde liegen. Das wenige, welches ich selber beitragen konnte, schulde ich zum großen Teil der Mitarbeit verschiedener Kollegen. Nach meiner Meinung ist die Aussicht auf weitere Fortschritte auf dem Gebiet der Fortpflanzung dann am größten, wenn die verschiedenen Disziplinen wie Anatomie, Histologie, Genetik sowie Veterinär-Physiologie und Biochemie immer enger zusammenarbeiten.

Zusammenfassung

Es werden drei ausgewählte Forschungsprobleme auf dem Gebiete der Physiologie und Biochemie der Fortpflanzung der Tiere besprochen.

Das erste Problem betrifft die Bedeutung der Samenanalyse von Bullen, Widdern, Ebern und Hengsten in der Beurteilung der normalen und abnormen Schwankungen in der männlichen Geschlechtsfähigkeit. Die chemische Samenuntersuchung gibt wichtige Auskunft über die charakteristische Reihenfolge der Entleerungsprozesse von verschiedenen Samenfraktionen während der Ejakulation und über den Beitrag der Nebenhoden, Ampullen, Prostata und Samenblasen am Gesamtejakulat.

Das zweite Problem betrifft die Prüfung der Androgen-Aktivität bei lebenden Tieren. Ausgedehnte Untersuchungen an mehreren Tierarten, speziell beim Stier, beweisen eine enge Abhängigkeit der chemischen Zusammensetzung des Samenplasmas von der Wirkung des männlichen Sexualhormons. Das Auftreten der Fruktose und Zitronensäure in den Samenblasen junger Stierkälber fällt zeitlich mit dem Erscheinen von chemisch nachweisbarem Testosteron in den Hoden zusammen. Der Fruktose- und Zitronensäuregehalt der Samenblasen erwachsener Stiere steht in Beziehung zu dem Spiegel des Testosterons in den Hoden.

Das dritte Problem betrifft die Beziehung zwischen Fortpflanzung und Ernährung. Die meisten Experimente wurden mit monozygoten Zwillingskälbern ausgeführt. Unterernährung hat einen viel stärkeren verzögernden Effekt auf die Erscheinung der Androgen-Aktivität als auf die Spermaproduktion bei Stierkälbern. Der verzögernde Einfluß der Unterernährung auf die Androgenbildung muß hauptsächlich der Unfähigkeit des Hypophysenvorderlappens, gonadotrope Hormone zu bilden, zugeschrieben werden. Durch Injektion von Choriongonadotropin wird dieser Einfluß aufgehoben. Unterernährung verschlechtert auch die Reaktionsfähigkeit der akzessorischen Geschlechtsdrüsen auf injiziertes Testosteron.

Résumé

Discussion portant sur trois problèmes choisis dans le domaine de la physiologie et de la biochimie de la reproduction des animaux. Le premier problème a trait à la signification et à l'analyse du sperme de taureaux, béliers, verrats et étalons dans

l'appréciation des variations normales et anormales de la capacité sexuelle mâle. L'examen chimique du sperme donne de précieux renseignements sur les échelons caractéristiques des processus d'évacuation de différentes fractions de sperme au cours de l'éjaculation et sur la contribution des glandes sexuelles accessoires, ampoules, prostate et vésicule séminale dans l'éjaculation complète.

Le second problème concerne l'examen de l'activité androgénique d'animaux vivants. Des recherches étendues portant sur plusieurs espèces animales et spécialement sur le taureau, démontrent l'existence d'une dépendance étroite de la composition du plasma spermatique de l'action des hormones sexuelles masculines. La présence de fructose et d'acide citrique dans les vésicules séminales de veaux mâles concorde avec l'apparition de testostérone dans le testicule. La teneur en fructose et acide citrique dans les vésicules séminales de taureaux adultes est en relation avec la présence de testostérone dans les testicules.

Le troisième problème concerne la relation existant entre la reproduction et l'alimentation. La plupart des expériences ont été exécutées avec des veaux jumeaux monozygotes. La sous-alimentation a un effet retardataire beaucoup plus grand sur l'apparition de l'activité androgénique que sur la production de sperme chez les veaux mâles.

L'influence retardatrice de la sous-alimentation sur la formation androgénique doit avant tout être mise sur le compte du lobe antérieur hypophysaire qui est incapable de former des hormones gonadotropes. Cette influence est supprimée au moyen d'une injection de choriongonadotropine. La sous-alimentation compromet également le pouvoir réactionnel des glandes sexuelles accessoires à l'injection de testostérone.

Riassunto

Si parla di tre problemi scelti nei campi fisiologico e biochimico della riproduzione degli animali.

Il primo problema concerne l'importanza dell'esame del seme di tori, montoni, cinghiali e stalloni per valutare le fluttuazioni normali e anormali nella capacità sessuale dei maschi. L'esame chimico del seme dà un'informazione importante sulla serie caratteristica dei processi di svuotamento di diverse frazioni del seme durante l'eiaculazione e sul contributo degli epididimi, delle ampolle, della prostata e delle vescicole seminali in tutto l'eiaculato.

Il secondo problema concerne l'esame dell'attività androgena negli animali viventi. Vaste indagini in parecchie specie di animali, soprattutto nel toro, dimostrano una stretta relazione di dipendenza fra la composizione chimica del plasma seminale e l'azione dell'ormone sessuale maschile. La presenza del fruttosio e dell'acido citrico nelle vescicole seminali di torelli da latte è contemporanea alla comparsa di testostosterone chimicamente dimostrabile nei testicoli. Il contenuto di fruttosio e di acido citrico nelle vescicole seminali di tori adulti è in rapporto con il quadro del testostosterone nei testicoli.

Il terzo problema concerne la relazione fra la riproduzione e l'alimentazione. La maggior parte degli esperimenti fu eseguita con vitelli gemelli monozigoti. La sotto-alimentazione ha un effetto ritardante molto più elevato sulla comparsa dell'attività androgena che sulla produzione di sperma nei torelli da latte. L'influenza ritardante della sottoalimentazione sulla formazione androgena va attribuita soprattutto all'incapacità del lobo anteriore dell'ipofisi nel produrre ormoni gonadotropi. Mediante iniezione di gonadotropina del chorion, questa influenza viene sospesa. La sotto-alimentazione peggiora anche la capacità di reazione delle ghiandole genitali su testostosterone iniettato.

Summary

Three problems in physiology and biochemistry of animal reproduction have been selected for discussion.

The first problem concerns the use of results obtained by analysis of semen in bulls, rams, boars, and stallions, for the evaluation of male reproductive functions. Chemical analysis of semen provides valuable information about the characteristic sequence with which the various seminal fractions are voided during ejaculation, and also about the quantitative contribution made by the epididymides, ampullae, prostate, and seminal vesicles, towards the make-up of the whole ejaculate.

The second problem concerns the appraisal of androgenic activity in the living animal. Extensive studies of various animal species, and in particular the bull, have revealed the existence of a close relationship between the chemical composition of seminal plasma and androgenic activity in the animal. The onset of fructose and citric acid formation in the seminal vesicles of young bull-calves coincides with the appearance of chemically determined testosterone in the testes. The content of fructose and citric acid in the seminal vesicles of adult bulls is correlated with the level of testosterone in the testes.

The third problem concerns the relationship between reproduction and nutrition. Most of the experiments have been performed with monozygous twin-calves. Underfeeding exerts a much stronger delaying effect on the onset of androgenic activity in the bull-calf, than on sperm production. The delaying influence of inadequate nutrition on the formation of androgen is due mainly to the inability of the anterior pituitary gland to produce gonadotrophic hormone. It can be counteracted by injections of chorionic gonadotrophin. Inadequate feeding also lowers the ability of male accessory organs of reproduction to respond to injected testosterone.

Literaturverzeichnis

- Aalbers J. G., Mann T. und Polge C. (1961): Metabolism of boar semen in relation to sperm motility and survival. *J. Reprod. Fert.* 2, S. 42. – Adams C. E. (1960): Studies on prenatal mortality in the rabbit: the amount and distribution of the loss before and after implantation. *J. Endocrin.* 19, S. 325. – Blaxter K. L. und Brown F. (1952): Vitamin E in the nutrition of farm animals. *Nutr. Abstr. Rev.* 22, S. 1. – Davies D. V., Mann T. und Rowson L. E. A. (1958): Effect of nutrition on the onset of male sex hormone activity and sperm formation in monozygous bull-calves. *Proc. Roy. Soc. B* 147, S. 332. – Evans H. M. und Burr G. O. (1927): The antisterility vitamine fat soluble E. *Mem. Univ. Calif.* 8, S. 1. – Gamble C. J. (1957): Spermicidal times as aids to the clinician's choice of contraceptive materials. *Fertility and Sterility*, 8, S. 174. – Glover T. und Mann T. (1954): On the composition of boar semen. *J. Agric. Sc.* 44, S. 355. – Hartree E. F. und Mann T. (1959): Phospholipids in ram semen, and its in sperm metabolism. *Biochem. J.* 71, S. 423. – id. (1960): Phospholipids in mammalian semen. *J. Reprod. Fert.* 1, S. 23. – Humphrey G. F. und Mann T. (1948): Studies on the metabolism of semen. 5. Citric acid in semen. *Biochem. J.* 44, S. 97. – Jackson H. (1959): Antifertility substances. *Pharmacol. Reviews*, 11, S. 135. – Jackson M. C. N. (1958): New oral progestogens in cases of infertility. *Studies on Fertility*. Blackwell Publishers: Oxford, 10, S. 3, 123. – King T. S. und Mann T. (1958): Sorbitol metabolism in spermatozoa. *Proc. Roy. Soc. B*, 151, S. 226. – Koelliker A. (1841): Beiträge zur Kenntnis der Geschlechtsverhältnisse und der Samenflüssigkeit wirbelloser Tiere, nebst einem Versuche über Wesen und Bedeutung der sogenannten Samentiere, Berlin. – id. (1847): Die Bildung der Samenfäden in Bläschen als allgemeines Entwicklungsgesetz. *Neue Denkschrift der Schweiz. Ges. f. Naturwissenschaften*, 8, S. 83. – id. (1856): Physiologische Studien über die Samenflüssigkeit. *Zeitschr. f. wiss. Zool.* 7, S. 201. – id. (1899): *Erinnerungen aus meinem Leben*. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, S. 328. – Lardy H. A. und Phillips P. H. (1941): Phospholipids as a source of energy for motility of bull spermatozoa. *Amer. J. Physiol.* 134, S. 542. – Leatham J. H. (1958): Hormones and protein nutrition. *Rec. Progr. Hormone Res.* 14, S. 141. – Leone T. (1954): Ergothioneine in the equine ampullar secretion. *Nature, Lond.*, 174, S. 404. – Leone E. und Mann T. (1951): Ergothioneine in the seminal vesicle secretion. *Nature, Lond.*, 168, S. 205. – Leuthardt F. (1960): Der Stoffwechsel der Fruktose. *Schweiz. Mediz. Wochenschr.*, April. – Lindner H. R. und Mann T. (1960): Relationship between the content of androgenic steroids in the testes and the secretory activity of the

seminal vesicles in the bull. *J. Endocrin.* 21, S. 341. – Lutwak-Mann C. (1958): The dependence of gonadal function upon vitamins and other nutritional factors. *Vitamins and Hormones*, 16, S. 35. – id. (1960): Aspects biochimiques de l'implantation de l'œuf. Les fonctions de nidation utérine et leurs troubles (Colloque), Masson et Cie, Editeurs, Paris, S. 125. – id., Bournsnell J. C. und Bennett J. P. (1960): Blastocyst-uterine relationships: uptake of radioactive ions by the early rabbit embryo and its environment. *J. Reprod. Fert.* 1, S. 169. – Mann T. (1946): Studies on the metabolism of semen. 3. Fructose as a normal constituent of seminal plasma. Site of formation and function of fructose in semen. *Biochem. J.* 40, S. 481. – id. (1948): Fructose content and fructolysis in semen. Practical application in the evaluation of semen quality. *J. Agric. Sc.* 38, S. 323. – id. (1954a): The Biochemistry of Semen. Methuen & Co., London, and John Wiley & Sons, New York. – id. (1954b): On the presence and role of inositol and certain other substances in the seminal vesicle secretion of the boar. *Proc. Roy. Soc. B*, 142, S. 21. – id. (1956a): Biochimie du sperme. Presses Universitaires de France, Paris. – id. (1956b): Male sex hormone and its role in reproduction. *Rec. Progr. Hormone Res.* 12, S. 353. – id. (1958): Biochemical basis of spermicidal activity. *Studies on Fertility*, Blackwell Publishers: Oxford, 9, S. 3. – Mann T., Davies D. V. und Humphrey G. F. (1949): Fructose and citric acid assay in the secretions of the accessory glands of reproduction as indicator tests of male sex hormone activity. *J. Endocrin.* 6, S. 75. – Mann T. und Glover T. (1954): Contribution of the seminal vesicles towards the composition of whole semen. *J. Endocrin.* 10, s. iv. – Mann T. und Leone E. (1953): Studies on the metabolism of semen. 8. Ergothioneine as a normal constituent of boar seminal plasma. Purification and crystallization. Site of formation and function. *Biochem. J.* 53, S. 140. – Mann T., Leone E. und Polge C. (1956): The composition of the stallion's semen. *J. Endocrin.* 13, S. 279. – Mann T. und Parsons U. (1947): Effect of testicular hormone on the formation of seminal fructose. *Nature, Lond.*, 160, S. 294. – Mann T., Polge C. und Rowson L. E. A. (1956): Participation of seminal plasma during the passage of spermatozoa in the female reproductive tract of the pig and horse. *J. Endocr.* 13, S. 133. – Mann T. und Rowson L. E. A. (1956): Effect of different planes of nutrition on the composition of bull semen. 3rd Intern. Congress on Animal Reproduction, Cambridge. Papers for Section I (Physiol.), S. 21. – Mann T., Rowson L. E. A. und Hay M. F. (1960): Evaluation of androgenic and gonadotrophic activity in male twin calves by analysis of seminal vesicles and semen. *J. Endocrin.* 21, S. 361. – Moore C. R. und Samuels L. T. (1931): The action of testis hormone in correcting changes induced in the rat prostate and seminal vesicles by vitamine B deficiency or partial inanition. *Amer. J. Physiol.* 96, S. 278. – Moore N. W., Rowson L. E. A. und Short R. V. (1960): Egg transfer in sheep. Factors affecting the survival and development of transferred eggs. *J. Reprod. Fert.* 1, S. 332. – Mulinos M. G. und Pomerantz L. (1941): The reproductive organs in malnutrition. Effects of chorionic gonadotrophin upon atrophic genitalia of underfed male rats. *Endocrinology*, 29, S. 267. Pazos R. Jr. und Huggins C. (1945): Effect of androgen on the prostate in starvation. *Endocrinology*, 36, S. 416. – Pincus G. (1958): Fertility control with oral medication. *Studies on Fertility*, Blackwell Publishers: Oxford, 10, S. 3. – Polge C. (1957): Low-temperature storage of mammalian spermatozoa. *Proc. Roy. Soc. B*, 147, S. 498. – id. (1959): Some experiments on the preservation of boar semen. Colloque sur la reproduction et l'insemination artificielle du porc, Institut Nat. Rech. Agronomique, Paris, S. 113. – Rock J., Garcia C. R. und Pincus G. (1957): Synthetic progestins in the human menstrual cycle. *Rec. Progr. Hormone Res.* 13, S. 323. – Rowson L. E. A. (1955): The movement of radio opaque material in the bovine uterine tract. *Brit. Vet. J.* 111, S. 334. – id. (1956): The low-temperature preservation of germinal cells. 3rd Intern. Congress on Animal Reproduction, Cambridge. Plenary papers, S. 75. – Short R. V. (1960a): Blood progesterone levels in relation to parturition. *J. Reprod. Fert.* 1, S. 61. – id. (1960b): The simultaneous determination of oestrogens and progesterone in plasma. *Mem. no. 8 of Soc. Endocr.*, S. 86. – Spörri H. (1957): Physiologische Grundlagen der künstlichen Besamung. *Schweiz. Arch. Tierheilkunde*, 99, S. 113. – Thiersch J. B. (1956): The control of reproduction in rats with the aid of antimetabolites. *Acta endocr.*, Copenhagen, Suppl. 28, S. 37.
