

3. Material und Methode

3.1 Postmortale Untersuchungen

Im Rahmen dieser Dissertation wurden *postmortale* Untersuchungen zur Anatomie und Topographie der Harn- und Geschlechtsorgane an weiblichen und männlichen EFh durchgeführt. Hierbei handelte es sich um Tiere, die der Autorin von der FJW zur Verfügung gestellt worden waren. Die Sektionen wurden an vier frischen EFh vorgenommen.

3.2 Tiermaterial

Alle Untersuchungen erfolgten an freilebenden Tieren. Insgesamt wurden 375 EFh (178 weibliche und 197 männliche Tiere) aus 15 verschiedenen Gebieten im Bundesland Nordrhein-Westfalen untersucht. Es wurden sieben Fang- und Untersuchungsaktionen, die jeweils 4 - 5 Wochentage umfassten, durchgeführt. Pro Tag wurden die Tiere nur aus einem Revier gefangen und untersucht. Die durchschnittliche Zahl der Tiere je Fangaktion betrug für die Häsinnen $25,4 \pm 2,5$ und für die Rammler $28,1 \pm 2,5$ (MW \pm SEM). Die Untersuchungen erfolgten in vier aufeinander folgenden Jahren (1998 – 2001) in den Monaten Februar, April und Juli. Die gynäkologischen und andrologischen Untersuchungen erfolgten in Laborräumen der FJW. Der Zeitraum einer jeweiligen Fangaktion und die Anzahl der untersuchten EFh ist in der nachfolgenden Tabelle ausgewiesen (Tab. 3).

	weibliche Tiere n	männliche Tiere n	Summe
30.03. - 03.04.1998	18	26	44
27.04. - 30.04.1998	23	27	50
06.04. - 09.04.1999	30	23	53
26.04. - 30.04.1999	25	36	61
26.07. - 30.07.1999	18	19	37
03.04. - 07.04.2000	28	29	57
24.02. - 27.02.2001	36	37	73

Tab. 3: Datum der Fang- und Untersuchungsaktionen sowie Anzahl männlicher und weiblicher Tiere

3.3 Fanggebiete

Primäres Kriterium für die Auswahl der Fanggebiete war die Feldhasen-Besatzdichte. Deren Kategorisierung erfolgte an Hand der Jagdstrecke aus den Vorjahren durch die FJW (Tab. 4).

	BK	Anzahl Tiere / 100 ha
(I)	sehr gut	80 - 100
(II)	gut	40 - 80
(III)	gering	15 - 40
(IV)	sehr gering	< 15

Tab. 4: Besatzdichte-Kategorien (BK)

Die Fanggebiete wurden namentlich, in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet, bezeichnet als: (1) Anholt, (2) Boisheim, (3) Buldern, (4) Burgsteingfurt, (5) Dormagen, (6) Drensteinfurt, (7) Heimerzheim, (8) Heinsberg, (9) Kleinenbroich, (10) Marienbaum, (11) Meckenheim, (12) Müddersheim, (13) Rheinberg / Orsoy, (14) Stommeln und (15) Walbeck.

Es wurde darauf geachtet, die Fangreviere über den gesamten Niederwildbereich des Landes Nordrhein-Westfalen zu verteilen. Die Auswahl von Standorten im nördlichen Ostwestfalen unterblieb, da dies sehr lange Transportzeiten für die Tiere bedeutet hätte (Abb. 4).

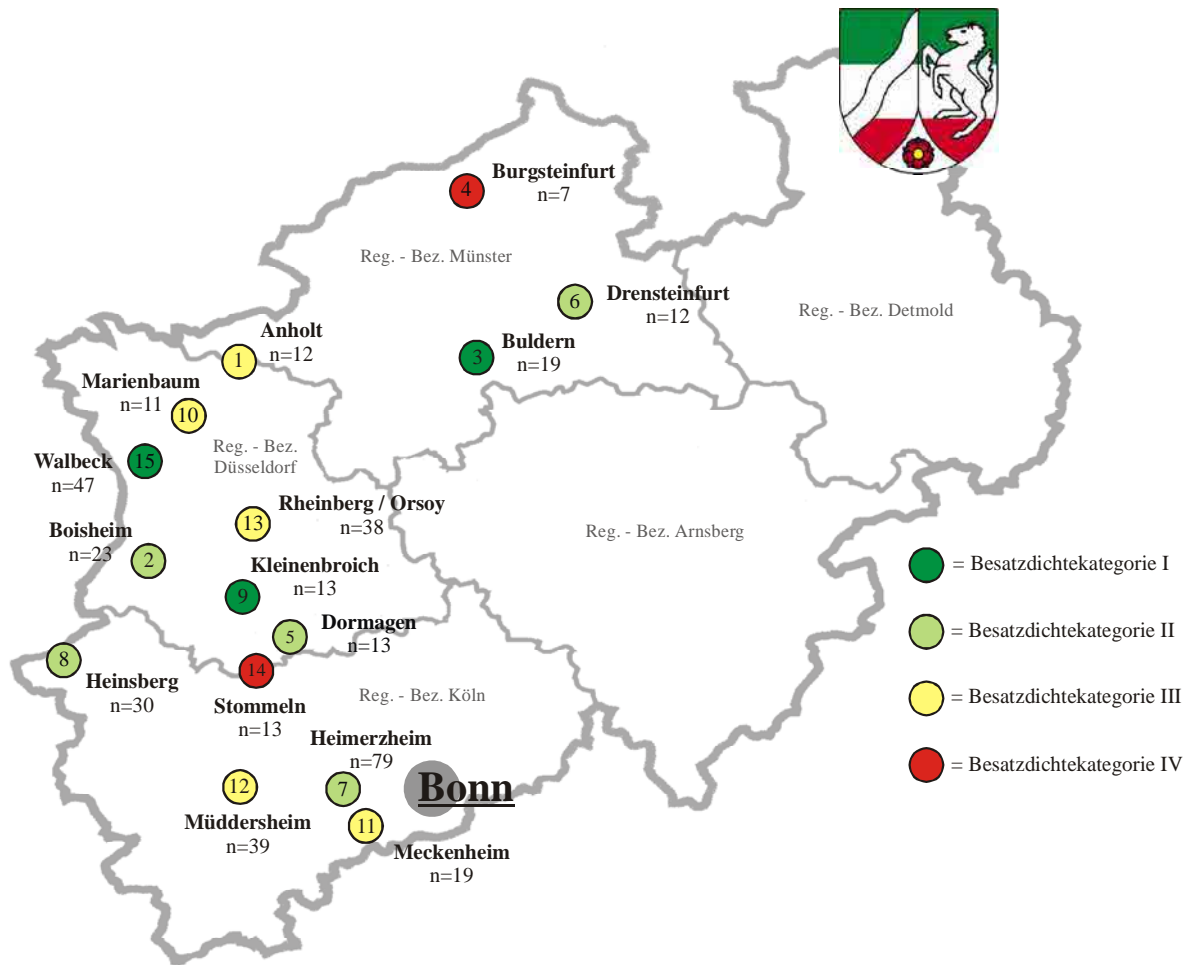


Abb. 4: Geographische und Besatzdichte - Verteilung der Fanggebiete (n = 15) im Bundesland Nordrhein-Westfalen.

Die Fangaktionen wurden unter Verantwortung der FJW organisiert und durchgeführt. Die Auflistung der Parameter Besatzdichte, Tag der Fangaktion, gefangene Hasen, Größe der Fangfläche und Treibfläche der 15 Fanggebiete ist in Tab. 5 erfolgt.

Nr.	FG	BK	Datum	Anzahl der Tiere		Fangfläche (ha)	Treibfläche (ha)
				1.0	0.1		
1	Anholt	III	29.04.1999	9	3	7,5	41,0
2	Boisheim	II	29./30.04.1998	5	4	26,0	13
			07.04.2000	7	7	7,0	25,8
			Summe	12	11	33,0	38,8
3	Buldern	I	27.07.1999	3	5	2,3	7,0
			06.04.2000	7	4	4,9	44,1
			Summe	10	9	7,1	51,2
4	Burgsteinfurt	IV	29.07.1999	2	5	7,3	11,5
5	Dormagen	II	30.04.1999	8	5	12,30	12,7
6	Drensteinfurt	II	02./03.04.1998	5	7	8,2	32,8
7	Heimerzheim	II	30./31.03.1998	10	3	11,5	15,6
			26.04.1998	6	4	11,3	10,6
			06.04.1999	7	7	5,7	18,6
			28.04.1999	6	6	9,9	16,6
			27.02.2001	15	15	9,0	52,0
			Summe	44	35	47,5	113,3
8	Heinsberg	II	31.03./01.04.1998	4	6	13,7	23,8
			25.02.2001	9	11	12	54,0
			Summe	13	17	25,7	77,8
9	Kleinenbroich	I	28.07.1999	7	6	6,3	3,9
10	Marienbaum	III	28.04.1998	7	4	11,3	29,1
11	Meckenheim	III	07.04.1999	4	6	8,2	32,0
			03.04.2000	5	4	7,4	58,4
			Summe	9	10	15,6	90,7
12	Müddersheim	III	08.04.1999	7	6	11,7	105,3
			04.04.2000	3	8	14,8	57,6
			24.02.2001	10	5	13,0	147,0
			Summe	20	19	39,55	309,9
13	Rheinberg/ Orsoy	III	01./02.04.1998	7	6	15,64	41,8
			27.04.1998	5	1	16,62	55,5
			27.04.1999	9	6	13,29	37,1
			30.07.1999	3	1	16,0	46,7
			Summe	24	14	61,6	181,2
14	Stommeln	IV	26.07.1999	4	1	17,4	28,9
			27.02.2001	3	5	15,0	51,0
			Summe	7	6	32,4	79,9
15	Walbeck	I	29.04.1998	4	6	11,5	3,2
			09.04.1999	4	11	10,5	6,3
			26.04.1999	5	5	12,6	17,6
			05.04.2000	7	5	12,0	8,8
			Summe	20	27	46,7	35,9

Tab. 5: Detaillierte Angaben zu den 15 Fanggebieten (FG)

3.4 Fangtechnik

Der Fang der EFh erfolgte mit Hilfe von Spiegelnetzen. Die Netze bestehen aus ca. einem Meter hohen, dreiwandigen und fünfzig Meter langen Einzelnetzen. Die mittlere Netzlammelle weist eine Maschenweite von 5 x 5 cm auf. Die beiden äußeren Netzwände besitzen eine Maschenweite von 20 x 20 cm und sind jeweils am Ober- und Unterseil mit dem mittleren Netz verbunden. Sie liegen der mittleren Netzlammelle locker an. Die ausgewählten Fangflächen wurden mit Hilfe der Netze allseitig und lückenlos umspannt. Die Grenzen der Fangflächen orientierten sich dabei an bereits vorhandenen Geländegegebenheiten, z.B. Wechsel der landwirtschaftlichen Nutzung, Wirtschaftswege, Bahndämme oder Feldraine. Mit dem Aufstellen der Netze wurde am frühen Morgen eines Fangtages begonnen. Hierfür wurden Eisenpfähle (1 cm Durchmesser) im Abstand von 5 m ca. 30 cm tief in den Boden verbracht. Nach der Installation des Netzkrals erfolgte ein langsames Auf- und Abgehen innerhalb der umnetzen Flächen mit 5 - 10 Personen. Der Abstand zwischen zwei Personen betrug durchschnittlich 10 m. Unterstützt durch lautes Rufen wurden die Tiere aus ihrer Deckung in die Netze getrieben. Durch die grobmaschige Außenlammelle konnten die Tiere hindurchgelangen, wurden jedoch an der feinmaschigen Mittellammelle aufgehalten und verfangen sich. Die EFh wurden anschließend vorsichtig aus den Netzen herausgegriffen (Abb. 5) und in Transportkisten (Abb. 6) überführt. Jede dieser aus Holzbrettern gefertigten Kisten war unterteilt in drei ca. 60 cm lange und ca. 25 cm breite Abteilungen, in die jeweils ein Tier gesetzt wurde. Die recht geringe Größe der Abteilungen verhinderte eine zu große Bewegungsfreiheit und reduzierte somit die Gefahr der Verletzungen. Die Hasen wurden unmittelbar nach dem Fang zu den Untersuchungsräumen der FJW gefahren.



Abb. 5: Herausgreifen des EFh aus dem Fangnetz.



Abb. 6: Bereitgestellte Transportkisten sowie als Vorbereitung für ein erneutes Fangen ein noch aufgerolltes und ein bereits ausgebreitetes Fangnetz.

Sofern in der abgegrenzten Fläche nicht ausreichend Tiere gefangen werden konnten, wurde eine Seite der Fläche wieder geöffnet und Tiere von benachbarten Flächen in das umspannte Gebiet getrieben. Anschließend wurde der Netzkral wieder geschlossen und es folgte ein erneutes Abgehen. Zum Teil erfolgte auch die Neuinstallation der Netze auf benachbarten Flächen.

3.5 Immobilisation

Die Tiere wurden für die Dauer der klinischen Untersuchung narkotisiert. Dies war bei den sehr wehrhaften EFh zum Schutz vor Verletzungen bei Mensch und Tier zwingend erforderlich. Die Narkose wurde mit einem transportablen Inhalationsnarkosegerät mit kontinuierlichem Durchflussverdampfer (VMC Anesthesia Machine, Matrx Medical Inc.; Tec3 Continuous Flow Vaporizer, Ohmeda, A BOC Health Care Company) durchgeführt. Als Inhalationsnarkotikum wurde Isofluran (Forene™, Abbott GmbH, 65205 Wiesbaden) verwendet. Trägergas für das Isofluran war medizinischer Sauerstoff (Linde AG). Es wurde ein Atembeutel (Rüsch AG) mit 0,5 l Volumen gewählt. Zur Durchführung der Narkose wurde jedes Tier vorsichtig aus der Transportbox herausgegriffen. Dazu wurden mit der einen Hand beide Ohren sowie mit der anderen Hand beide Hinterläufe fest gegriffen. Die Vorderläufe wurden nach dem Herausnehmen durch eine zweite Person manuell fixiert. In den Untersuchungen der ersten beiden Jahre wurden die Tiere, nachdem sie aus der Transportbox herausgegriffen worden waren, in einen Sack aus Jute überführt und anschließend in eine spezielle Narkosebox (25 x 30 x 40 cm) mit Sichtfenster

verbracht. Wenn das Tier eine seitlich liegende Position eingenommen hatte, wurde es aus der Kiste herausgegriffen und die Narkose über eine Maske, die Maulspalte und Nasenöffnung umschloss (Abb. 7.), fortgesetzt. Während der folgenden Untersuchungsaktionen wurde auf den Gebrauch der Narkosebox verzichtet und das Inhalationsnarkotikum unmittelbar nach dem Herausnehmen aus der Transportkiste über die Maske verabreicht.



Abb. 7: EFh während der Verabreichung der Isofluran-Inhalationsnarkose über eine durchsichtige Maske. Dies erlaubte die Kontrolle der Kreislaufsituation anhand der Schleimhautfarbe der Lippen ohne Unterbrechung der Zufuhr des Narkosemittels.

Die Einleitung der Narkose erfolgte mit einer Dosierung von 5 Vol % Isofluran und einer Sauerstoffflussrate von 2 l/min. Sobald das Tier keine Abwehr mehr zeigte und die Muskulatur spürbar relaxierte, erfolgte die Überführung auf den Untersuchungstisch und es wurde mit den Vorbereitungen für die Untersuchung begonnen. Die weitere Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte in einer Dosierung von 2 Vol % Isofluran und einer Flussrate von 1 - 1,5 l O₂/min. Während der Untersuchung wurde die regelmäßige Atemtätigkeit und die Farbe der Maulschleimhaut kontrolliert.

Um eine Austrocknung der Hornhaut zu verhindern, wurde beidseitig Augensalbe (Vitamin A Dispersa; CIBA Vision Ophthalmics GmbH) in den Lidbindehautsack eingebracht.

3.6 Vorbereitung der Untersuchung

Zur Vorbereitung auf die transkutane Ultraschalluntersuchung wurden bei den weiblichen Tieren die Haare im Bereich der Bauchregion entfernt. Bei den männlichen Tieren erfolgte die Entfernung des Haarkleides lediglich zwischen den beiden Hinterläufen sowie im

Bereich des Skrotums. Die Haarentfernung erfolgte mit einer elektrischen Schermaschine (Aesculap Elektra II GH 204, Scheraufsatz GH 703, 1/10 mm Schnitthöhe). Die Feinrasur wurde nass mittels Seifenlösung und einem Einmalrasierer durchgeführt.

Anschließend wurde eine Spülung des Enddarmes mit körperwarmen Wasser ausgeführt. Die Entfernung des Kotes gewährleistete eine verbesserte Ankopplung des Schallkopfes bei der transrektalen Ultraschalluntersuchung sowie eine bessere Leitfähigkeit für die Elektrostimulationssonde.

3.7 Kennzeichnung

Zur Identifikation der EFh für Folgeuntersuchungen wurde jedem Individuum zur Kennzeichnung ein Mikrochiptransponder (Fa. Indexcel) in der linken Schulterblattregion subkutan implantiert. Bei den Fang- und Untersuchungsaktionen in den folgenden Jahren wurde zu Beginn jeder Untersuchung zunächst ein Mikrochip-Lesegerät (Riley Identification Systems 1-800-552-6216 Pocket Reader - Model HS5700L1, 10800 Towne Road, Carmel, IN 46032) langsam über die linke seitliche Körperhälfte geführt, um Wiederfänge zu identifizieren.

3.8 Allgemeine Untersuchung

3.8.1 Bestimmung der Körperkondition

3.8.1.1 Körpermaße

Folgende Körpermaße (Abb. 8) wurden mit einem flexiblen Messband auf 0,5 cm genau erhoben:

1. Nasen-Steisslänge (NSL)
2. Scheitel-Steisslänge (SSL)
3. Ohrlänge
4. Hinterfusslänge (Zehenspitze bis Hinterfusswurzelgelenk)

Dabei wurde das Tier zur Vermessung auf die rechte Körperseite gelegt. Es wurde darauf geachtet, dass der Rücken eine möglichst gerade Linie bildete.

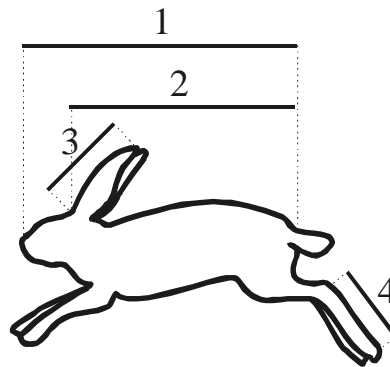


Abb. 8: Erhebung der Körpermaße modifiziert nach ZÖRNER (1981).

3.8.1.2 Körpergewicht

Um die Narkose während der Untersuchung nicht unterbrechen zu müssen, erfolgte die Ermittlung der Körpermasse erst im Anschluss an alle Untersuchungen. Nach Beendigung der Narkose verblieben ca. ein bis zwei Minuten, in denen das Tier Manipulationen ohne heftige Abwehrbewegungen duldete. Zur Bestimmung der Körpermasse wurde der EFh mittels elektronischer Waage (Fa. Sartorius) gewogen. Die Körpermasse wurde auf 0,1 g genau bestimmt.

3.8.2 Blutprobengewinnung

Die Gewinnung von Blutproben erfolgte aus der *V. femoralis* an der Oberschenkeinnenseite. Vor der Entnahme wurden die Haare durch Rasur an der entsprechenden Stelle entfernt sowie die Haut mit medizinischem Alkohol (Äthanol

vergällt mit Petroläther ca. 70 % Vol, Alkohol Handelskontor GmbH, Berlin) und Polyvidon Lösung (Braunol 2000®) gereinigt und desinfiziert. Die Punktion der Vene erfolgte in einem flachen Winkel mit einem feinumigen Perfusionsbesteck (Vasuflo® Perfusionsbesteck 0,8 x 19 mm; Abb.9). Das Blut wurde mittels Serumbestecksystem (Sarstedt®) aufgefangen. Die gewonnenen Proben wurden zunächst für 24 h bei 4°C gekühlt. Die Serumproben wurden in einer Zentrifuge (Tischzentrifuge Hettich EBA 20) mit 3000 Umdrehungen / Minute für 10 min zentrifugiert. Das Serum wurde abgetrennt und bei – 20°C tiefgefroren.

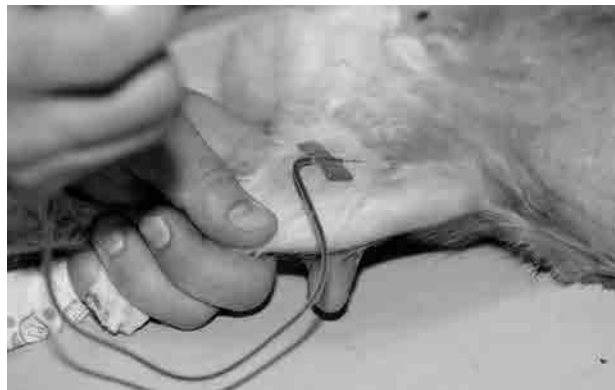


Abb. 9: Punktion der *V. femoralis*.

3.9 Bestimmung der Sexualsteroiden im Blutserum

In den gewonnenen Serumproben wurde der Gehalt an Testosteron, Progesteron (P4) und Östrogen (17β-Östradiol, E₂) bestimmt.

3.9.1 Steroidextraktion

Zunächst wurden 100 µl des gewonnenen Blutserums mit 2 ml einer Mischung aus Tetrabutyl-Methyläther und Petroläther (Verhältnis 40 : 70) versetzt. Nach 40 Minuten gleichmäßigen Schüttelns (Thys 2, VEB MLW Labortechnik, Ilmenau) wurden die Proben bei -70°C tiefgekühlt. Die flüssige Ätherphase mit den dort gelösten Sexualsteroiden wurde abgenommen und es erfolgte die Evaporation (96 well Sample Concentrator, Probenkonzentrator 25 - 200° C, Techne Inc., Burlington, N.J. 08016, Novodirekt, 77694 Kehl / Rhein). Anschließend wurde der Rückstand in 0,4 ml 100 % igem Methanol aufgenommen und nach kurzem Erwärmen mit 0,6 ml *Aqua bidest.* auf Methanol 40 %ig verdünnt. Die Lagerung dieser Extrakte bis zum Enzymimmunoassay erfolgte bei -20°C.

Als Kontrollen dienten steroidfreie Seren, denen eine definierte Menge der Sexualsteroiden zugesetzt worden war.

3.9.2 Prinzip und Durchführung des Enzymimmunoassays

Die Bestimmung der Sexualsteroiden im Blutserum wurde von der Forschungsgruppe Reproduktionsbiologie, IZW (Frau PD Dr. K. Jewgenow, Frau M. Rohleder) durchgeführt. Die Analyse der Testosteronkonzentrationen erfolgte nach der von MEYER und HOFFMANN (1987) beschriebenen Verfahrensweise. Die Progesteron- und Östrogenbestimmung erfolgte nach PRAKASH et al. (1987).

3.10 Bestimmung des Laktationsstatus

An Hand der Ausbildung der Gesäugeleiste wurde eine Einteilung in laktierende und nicht laktierende Tiere vorgenommen. Tiere, bei denen das Drüsengewebe deutlich als subkutane weich elastische Gewebsstränge fühlbar waren und sich Sekret ermelken ließ, wurden als laktierend eingestuft. Die versorgenden Blutgefäße waren in diesem Fall deutlich ausgebildet.

Tiere, bei denen sich das Drüsengewebe lediglich als flacher und schmaler Strang darstellte und bei denen eine Milchgewinnung nicht gelang, wurden als nicht laktierend eingestuft.

3.11 Anwendung der Ultrasonographie

Die Untersuchungen wurden bei allen Tieren in Rückenlage durchgeführt. Die weiblichen Hasen wurden transkutan, die Rammler zusätzlich transrektal sonographisch untersucht. Alle Untersuchungen erfolgten unter Verwendung von Ultraschallgel (Aquasonic 100, Ultrasound Transmission Gel, Parker Laboratories Inc.). Im Verlauf der Untersuchungsaktionen wurde insbesondere unter kalten und feuchten klimatischen Bedingungen auf eine großflächige Entfernung der Haare verzichtet. In Kombination mit medizinischem Alkohol konnte auch mit Minimalrasur eine ausreichende Ankopplung erzielt werden. Während der Untersuchung wurden die in Tab. 6 dargestellten Ultraschallgeräte eingesetzt. Die Organvermessungen und Charakterisierungen markanter Strukturen wurden mittels der in den Ultraschallgeräten integrierten Mess- und Schreibfunktionen am Standbild vorgenommen. Bei allen Messungen wurde darauf geachtet, dass jeweils die maximale Längs- bzw. Querdimension ermittelt wurde.

Name	Hersteller	Schallkopf ID	Schallkopf-spezifikationen	Geräte-spezifikationen
CS 9100 OCULUS	Hitachi, Düsseldorf	CS 1	5,0 - 7,5 MHz Fingertipsonde,	Graustufen 2D-Bildgebung
			Curved array (EUP- F334)	
		CS 2	7,5 - 10 MHz, T-Sonde,	
			Linear array (EUP- L345)	
HDI 1000	ATL Ultrasound, Bothell, USA	HDI	5,0 - 11,0 MHz, T-Sonde Linear array	2D-Bildgebung; 256 Graustufen simultan: 2D / CD* ¹ 2D / PD* ² 2D / CPA* ³ digitales System
Voluson 530 MD	Kretztechnik, Zipf, Österreich	VOL	5,0 - 10,0 MHz Volumenschallkopf, Linear array (S-VNW 5-10)	2D-Bildgebung 3D-Bildgebung

*¹CD = Colour Doppler; *²PD = Pulsed Doppler; *³CPA = Color Power Angio Imaging.

Tab. 6: Übersicht der verwendeten Ultraschallsysteme und ihre Spezifikationen

3.11.1 Weibliche Tiere

Vagina, *Vesica urinaria*, *Ren*, *Cervix* und *Cornua uteri* wurden transkutan aufgesucht und in ihrem Verlauf dargestellt. An den beiden Uterushörnern erfolgte weiterführend die Darstellung der uterinen Wandschichten. Die Ovarien wurden anschließend in Länge und Breite vermessen. Die Funktionskörper (*Folliculi ovarici* und *Corpora lutea*) wurden gezählt sowie der Durchmesser bzw. Länge und Breite bestimmt (CS 1; HDI 3).

In der Gebärmutter vorhandene Fruchtanlagen wurden abgebildet und deren Anzahl bestimmt. Bei frühen Embryonen / Fruchtanlagen wurde die Größe der Fruchtblase und des Embryos ermittelt. Wenn eine Gesamtdarstellung der Fruchtanlagen nicht mehr möglich war, wurden abhängig vom Entwicklungsstadium folgende Parameter erhoben:

Scheitel-Steisslänge (SSL), Größe der knöchernen Augenanlage und Linse, biparietaler Schädel-Abstand, Länge der Extremitätenknochen (*Humerus, Radius, Femur* und *Tibia*) und Brustkorbdurchmesser. Gleichzeitig erfolgte die Darstellung der fetalen Weichteilorgane im Brust- und Bauchraum (CS 1; HDI; VOL).

Der Blutfluss in den Gefäßen des mütterlichen *Ovars*, des *Uterus*, der Nabelschnur sowie in der Plazenta und den fetalen inneren Organen (Herz, Niere, Aorta) wurde mit der Colour-Flow-Doppler-Funktion dargestellt (HDI). Eine Erhebung der Blutflussparameter erfolgte nicht.

Zur Beurteilung der fetalen Oberflächenintegrität wurde die Technik der dreidimensionalen Darstellung eingesetzt (VOL).

3.11.2 Männliche Tiere

Testis sowie *Epididymis* (*Caput, Corpus* und *Cauda epididymidis*) wurden transkutan dargestellt (CS 1; HDI). Vor Beginn der Untersuchung war es notwendig, den Hoden vollständig aus dem Leistenkanal vorzulagern. Während der Untersuchung wurde darauf geachtet, dass das Hodengewebe durch den Schallkopf nicht komprimiert wurde. Die Breite des Hodens, Länge und Breite von Nebenhodenkopf und Nebenhodenschwanz sowie die Dicke des Nebenhodenkörpers wurden ermittelt. Weiterhin wurde die Breite des zentralen Bindegewebszapfens (*Mediastinum testis*) vermessen.

Die außerhalb des knöchernen Beckenringes liegenden Anteile der Urogenitalorgane *Ren*, *Vesica urinaria*, *Urether*, *Glandula vesicularis* und *Glandula prostatica* wurden ebenfalls transkutan abgebildet. Die *Glandula vesicularis* wurde bei drei Individuen dreidimensional dargestellt (VOL).

Der Blutfluss in der *A. und V. testicularis* wurde mittels Colour-Flow-Doppler-Verfahren dargestellt (HDI). Es erfolgte keine quantitative Bestimmung der Blutflussparameter.

Die Darstellung der im kaudalen Beckenabschnitt gelegenen Organe war transkutan nicht möglich, da das Knochengewebe des Beckengürtels ein Durchdringen der Schallwellen verhinderte. Die Untersuchung der *Urethra* und der *Glandula bulbourethralis* wurde transrektal durchgeführt (CS 2).

3.12 Vermessung der Hoden

Mit einem Orchometer (Seager Inc.) wurden Länge, Breite und Höhe des Hodens und sowie Länge des Nebenhodenschwanzes und die Stärke der doppelten Skrotumwand bestimmt. Die Bestimmung der Maße erfolgte auf 0,1 mm genau.

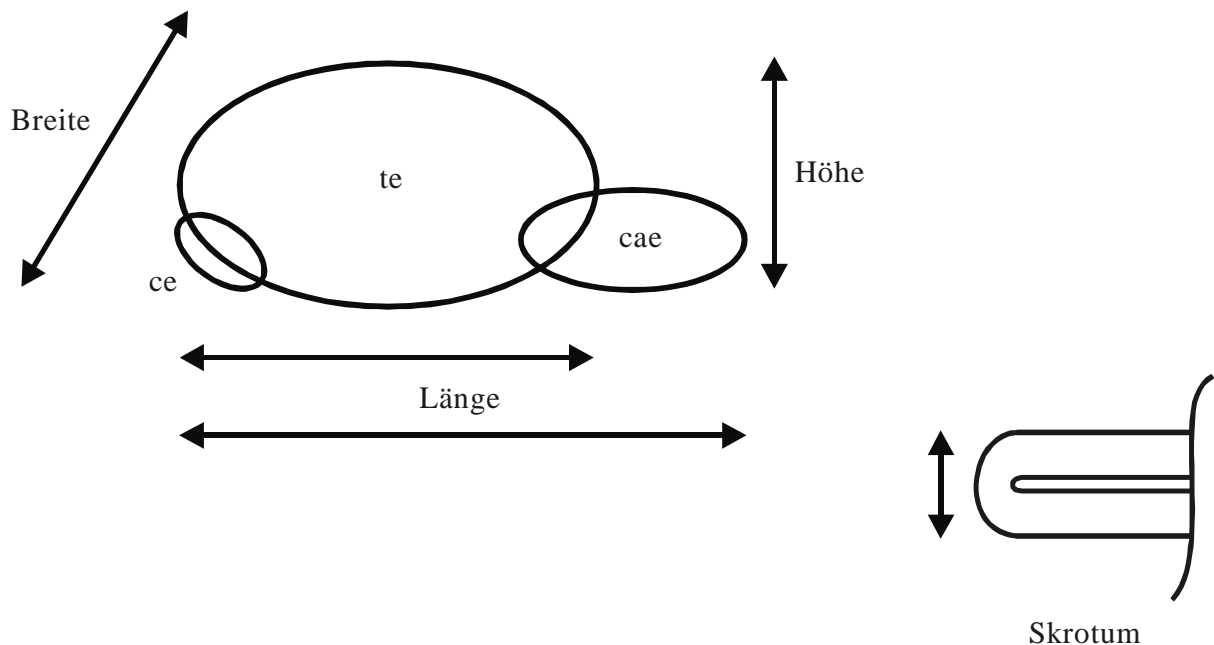


Abb. 10: Schematische Darstellung der Bestimmung der Hodenmaße.

3.13 Elektroejakulation

Die Ejakulate wurden durch Elektrostimulation mittels einer Rektalsonde gewonnen. Das Tier wurde in Rückenlage verbracht. Für die Gewinnung des Ejakulates wurde eine 4,5 cm lange und 1,3 cm breite mit drei longitudinalen Elektroden ausgestattete Sonde eingesetzt. Bisher verfügbare Elektroejakulationssonden stellten sich als ungeeignet für den EFh heraus. Die Sonde war speziell für die anatomischen Verhältnisse beim EFh entwickelt worden. (HILDEBRANDT et al., 2000)

Die Sonde wurde unter der Verwendung von Ultraschallgel ca. 7 cm tief in den Enddarm eingeführt und dorsal der akzessorischen Geschlechtsdrüsen mit ventraler Ausrichtung der Elektroden positioniert. Anschließend wurde der Penis manuell ausgeschachtet, mit Zellkulturmedium (Medium 1999, Sigma - Aldrich Chemie GmbH) gereinigt und eventuelle Sekretrückstände mit einem sterilen Tupfer entfernt. Die Stimulationen wurden mit einem Elektroejakulator Modell 14 (SEAGER ELECTROSTIMULATION POWER UNIT, patented, designed and manufactured by DALZELL USA MEDICAL SYSTEMS) durchgeführt. Die elektrische Stimulation erfolgte im Niedervoltbereich (U max. = 5 Volt; I max. = 100 mA). Die gesamte Stimulationsdauer betrug durchschnittlich 5 (\pm 1) Minuten. Es wurde darauf geachtet, dass die maximale Spannung und der maximale Stromfluss durch langsames, aber kontinuierliches Hochregulieren erzielt wurde. Die Maximalwerte

wurden für 1 - 2 Sekunden gehalten, bevor Spannung und Stromfluss ebenfalls wieder langsam, aber kontinuierlich herunterreguliert wurden. Es wurden im Mittel 5 - 7 Einzelstimulationen je Tier angewendet. Das Ejakulat wurde in einem sterilen, graduierten Gefäß (Fassungsvolumen 15 ml, Greiner Bio-One GmbH) aufgefangen. Zwischen den Stimulationen wurde der Penis von der Basis zur Spitze mit gleichmäßigem Druck massiert. Zwischen den Stimulationen wurde das Auffanggefäß gewechselt. Der Elektroejakulation schloss sich eine Prüfung der Stimulationssonde auf etwaige Anzeichen von Schleimhautblutungen an. Die Anwendung und der Verlauf der Elektrostimulation wurde protokollarisch dokumentiert (Protokoll s. Anhang).

3.14 Spermatologische Untersuchung

Die Beurteilung des Ejakulates gliederte sich in eine makroskopische und mikroskopische Prüfung.

3.14.1 Makroskopische Untersuchung

Die grobsinnliche Beurteilung des Ejakulates umfasste Volumen, Geruch, Farbe und Beimengungen und erfolgte unmittelbar nach der Gewinnung der jeweiligen Fraktion im Auffanggefäß. Die Volumina der Fraktionen wurden mit einer Pipette (Fa. Abimed, Langenfeld) auf 0,1 ml genau bestimmt.

3.14.2 Mikroskopische Untersuchung

Im Rahmen der mikroskopischen Prüfung wurden die Bewegungsaktivität, die Dichte je ml und die Gesamtzahl der Spermien im Ejakulat, sowie der Anteil morphologisch veränderter Spermien ermittelt.

3.14.2.1 Motilität

Die Bestimmung der Motilität erfolgte unmittelbar nach der Samenentnahme. Aliquots der Ejakulate (20 – 30 µl) wurden mit Zellkulturmedium im Verhältnis 1:10 verdünnt. Es wurde ein Tropfen auf einen zuvor auf 37°C erwärmten Objektträger aufgebracht. Dieser wurde lichtmikroskopisch (Mikroskop: Olympus T3) im Hellfeldverfahren mit 100-facher Vergrößerung nach den Prozentsätzen beweglicher Spermien beurteilt.

3.14.2.2 Spermienkonzentration pro Milliliter und Gesamtzahl der Spermien im Ejakulat

Ein Aliquot von 10 µl wurde in 1 ml Leitungswasser verdünnt und die Konzentration in einer NEUBAUER Zählkammer durch Auszählung von fünf Gruppenquadraten bestimmt. Die Konzentration pro Milliliter wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\begin{aligned} & \text{Summe gezählter Spermien} \times \text{Verdünnungsgrad} \\ & 100 \times 50 \times 10^3 = \text{Anzahl der Spermien} / \text{ml} \end{aligned}$$

Der Faktor 50×10^3 berücksichtigt das Volumen der Quadrate der Zählkammer und setzt sich wie folgt zusammen:

$$\begin{aligned} \text{Volumen der 5 Gruppenquadrate} &= 0,02 \text{ mm}^3 \\ \text{Spermienzahl pro } \mu\text{l} &= 0,02 \text{ mm}^3 \times 50 \\ \text{Spermienzahl pro ml} &= 0,02 \text{ mm}^3 \times 50 \times 10^3 \end{aligned}$$

Bei einer sehr hohen Anzahl an Spermien im Ejakulat wurde ein Verdünnungsgrad von 1:200 gewählt und die Formel entsprechend angepasst.

3.14.2.3 Morphologie

Zur Einschätzung der morphologischen Integrität der Spermien wurden von jedem Ejakulat Ausstrichpräparate der zwei spermienreichsten Fraktionen auf Objektträgern angefertigt und nach BLOTTNER et al. (1989) gefärbt. Die Samenzellen wurden nach den Kategorien Spermien mit intaktem, verändertem oder fehlendem Akrosom sowie Spermien mit intaktem oder verändertem Schwanzstück beurteilt. Von jedem Ausstrich wurden 200 Spermien beurteilt und zugeordnet. Die Durchführung dieser Arbeit erfolgte unter der Anleitung und Verantwortung von Herrn Dr. S. Blottner (Spermatologisches Labor, IZW).

3.15 Flow-cytometrische DNA - Analyse

Bei $n = 64$ Tieren wurden unter Ultraschallkontrolle Hodenbiopsien (Fa. Cook, Feinnadelbiopsiebesteck, 19 Gauge) vorgenommen. Der Rammler befand sich dazu in Rückenlage. Die Hautoberfläche des Skrotums wurde vor der Punktion mit medizinischem Alkohol gereinigt und mit Polyvidon Lösung desinfiziert. Für die Punktion wurde der Hoden im Skrotum manuell fixiert. Die Punktionsnadel wurde vom kaudalen Hodenpol waagrecht in das Parenchym vorgeführt und eine Gewebeprobe entnommen.

Die Bioplate wurden in Zellkulturmedium überführt und anschließend auf eine Zellkonzentration $5 - 10 \times 10^4$ Zellen/ml im Durchflusszytometer (Fa. Partec, PAS III) entsprechend ihres Genoms als haploid (Spermatiden), diploid (Spermatogonien, Spermatozyten 2. Ordnung und somatische Zellen) und tetraploid (Zellen der G2/M Phase des Zellzyklus, hauptsächlich Spermatozyten 1. Ordnung) in 1C, 2C und 4C Prozent charakterisiert (BLOTTNER et al. 1996). Die durchflusszytometrischen Analysen wurden von der Forschungsgruppe Reproduktionsbiologie, IZW (Herr Dr. S. Blottner, Frau C. Franz) durchgeführt.

3.16 Abschluss der Untersuchungen

Die Narkosedauer betrug für die weiblichen Tiere ca. 20 und für die männlichen Tiere ca. 30 Minuten.

Die Tiere wurden wieder in die Transportkisten gesetzt und diese in einem gut belüfteten, ruhigen und dunklen Raum gestellt. Der Zustand der Tiere wurde regelmäßig kontrolliert, so lange bis sie aus der Narkose erwacht waren und eine sitzende Position eingenommen hatten. Erst dann wurden sie in ihre Fanggebiete zurückgebracht. Die Gesamtzeit der temporären Entnahme der Hasen aus ihrem jeweiligen Habitat betrug 4 - 8 Stunden.

3.17 Dokumentation

Datum und Uhrzeit der Untersuchung, Fanggebiet, Geschlecht und Kennzeichnungsnummer des Tieres, Art der gewonnenen Proben, Körpermaße und Körpergewicht, Morphometrie der Geschlechtsorgane, Ablauf der Elektrostimulation zur Ejakulatgewinnung, Ergebnisse zur spermatologischen Untersuchung sowie besondere Befunde, z. B. festgestellte pathologische Veränderungen, wurden individuell protokollarisch festgehalten. Die entsprechenden Protokolle für den Untersuchungsgang am männlichen und weiblichen Tier sind im Anhang abgebildet.

Alle Ultraschalluntersuchungen wurden auf S-VHS Videokassetten oder auf digitalen Videokassetten aufgezeichnet.

3.18 Datenkonvertierung und Bildbearbeitung

Die Videostandbilder wurden digitalisiert und die graphische Bearbeitung erfolgte mit Corel Draw® Version 10. Der in die Sonogramme integrierte weiße Balken repräsentiert immer eine Länge von 10 mm.

3.19 Auswertung der Messdaten

In der Auswertung wurden die Daten aus den Untersuchungszeiträumen Ende März und Anfang April bzw. Anfang und Ende April zusammengefasst.

An Hand der während der ultrasonographischen Untersuchung erhobenen Daten erfolgte die Berechnung des Volumens der Eierstöcke näherungsweise unter Annahme der Form eines Rotationsellipsoids nach der Formel:

$$\begin{aligned}V &= 4/3 \text{ Pi } x r^3 \\ &= 1/6 \text{ Pi } x d^3 \\ &= 1/6 \text{ Pi } x \text{ Länge } x \text{ Breite } x \text{ Höhe.}\end{aligned}$$

Da diese Messergebnisse nur die zweidimensionale Ausdehnung berücksichtigen, wurde der Wert der Breite durch die Höhe² ersetzt.

Bei der ultrasonographischen Untersuchung der Hoden werden die im Ergebnisteil dargestellten Angaben für *Testis*, *Mediastinum testis*, *Caput* und *Corpus epididymidis* als maximaler transversaler Querschnitt aufgelistet.

Das Volumen des Nebenhodenschwanzes wurde näherungsweise berechnet nach der Formel für das Volumen eines geraden Kreiskegels:

$$\begin{aligned}V &= 1/3 \text{ Pi } x r^2 x h \\ &= 1/3 \text{ Pi } x (\text{Breite}/2)^2 x \text{ Länge.}\end{aligned}$$

An Hand der während der orchometrischen Vermessung erhobenen dreidimensionalen Daten erfolgte die Berechnung des Volumens der Hoden näherungsweise unter Annahme der Form eines Rotationsellipsoids nach der bereits dargelegten Formel.

3.20 Bestimmung des spezifischen Gewichtes des Hodengewebes

Zur Bestimmung des spezifischen Gewichtes des Hodengewebes wurden die Keimdrüsen von Europäisch-Kurzhaarkatzen verwendet. Diese waren der Autorin von Dr. S. Blotner (Forschungsgruppe Reproduktionsbiologie, IZW) zur Verfügung gestellt worden. Die Tiere waren am selben Tag kastriert worden und die Organe in einem dicht verschließbaren Gefäß aufbewahrt worden. Der Versuch wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.

Zunächst wurden sorgfältig die Hodenhüllen bis zur *Tunica albuginea* sowie der Nebenhoden entfernt. Das Gewicht des Hodens wurde mit einer elektronischen Waage (Fa. Sartorius) auf 0,001 g genau ermittelt. Danach erfolgte die Bestimmung des Volumens. Angewendet wurden je Organ drei verschiedene Bestimmungsmethoden:

(I) Der Hoden wurde in einen schmalen Glaszylinder überführt. Dieser war bis zum Rand mit Wasser gefüllt. Die Oberflächenspannung war zunächst durch wenige Tropfen handelsüblichen Spülmittels herabgesetzt worden, so dass die Wasseroberfläche eine gerade Linie bildete und mit dem Rand des Gefäßes abschloss. Das verdrängte Wasser wurde mit einem Zellstofftuch, dessen Gewicht vorher auf 0,01 g genau bestimmt worden war, aufgefangen. Anschließend wurde das Gewicht des Tuches erneut bestimmt.

(II) Der Hoden wurde in einen Messzylinder (Graduierung 0,2 ml), der zuvor bis zu einer bestimmten Marke mit Wasser gefüllt worden war, überführt. Die Wasserfüllung war so vorgenommen worden, dass bei der Überführung des Hodens kein Wasser über den Rand des Gefäßes laufen konnte. Der Wasserstand wurde vor und nach der Überführung bestimmt.

(III) siehe Vorgehensweise (II). Nach der Überführung des Hodens in den Glaszylinder wurde so lange mit einer Tuberkulin Einmalspritze (Skalenwert 0,01 ml) Wasser abgenommen, bis der ursprüngliche Wasserstand wieder erreicht wurde.

Das spezifische Gewicht des Hodengewebes wurde anschließend durch Division des Organgewichtes und der Differenz des Tuchgewichtes bzw. dem verdrängten Wasservolumen ermittelt.

3.21 Statistische Auswertung

Alle Daten aus der morphometrischen Untersuchung der Geschlechtsorgane wurden mit Hilfe des Software-Programms Excel 2000, Microsoft®, Corp. ausgewertet. Der Mittelwert, die Standardabweichung, der Standardfehler des Mittelwertes, das Minimum und Maximum wurden mit *GraphPad InStat 3,0* bestimmt. Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben wurden nach Prüfung auf Varianzhomogenität und Normalverteilung (Kolmogorov und Smirnov Methode) mit dem t-Test bzw. mit dem t-Test nach Welch-Korrektur oder mit dem Mann-Whitney-Test verglichen.

Der Vergleich von Mittelwerten von drei Wertegruppen wurde ebenfalls nach Prüfung auf Varianzhomogenität (Bartlett's Test) bzw. Normalverteilung (Kolmogorov und Smirnov Methode) mit Hilfe der parametrischen Varianzanalyse ANOVA bzw. mit Hilfe der nicht

parametrischen Analyse (Kruskal-Wallis Test) durchgeführt. Sofern eine Signifikanz ermittelt wurde, erfolgte der Vergleich der Wertegruppen gegeneinander (Dunnscher Vergleichstest).