

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik

(Vorstand: Prof. Dr. Dr. habil. R. Stolla)

der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

und dem Zoo Salzburg

(Direktor: Dr. R. Revers; Wissenschaftliche Leitung: Univ.-Doz. Dr. C. Walzer)

**Pharmakologisch unterstützte manuelle Spermagewinnung und
computergestützte Spermienkopfmorphometrie beim Breitmaulnashorn
(*Ceratotherium simum*)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Sandra Silinski

aus

Kassel

München 2003

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. E. Wolf

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Literatur	2
2.1	Das Breitmaulnashorn (<i>Ceratotherium simum</i> - BURCHELL 1817)	2
2.1.1	Phylognese und Taxonomie	3
2.1.2	Unterarten	5
2.1.3	Vorkommen und Verbreitung	6
2.1.4	Status	8
2.1.4.1	2000 IUCN Red List	8
2.1.4.2	CITES	9
2.2	Anatomie der Geschlechtsorgane beim afrikanischen Nashorn	9
2.2.1	Weiblicher Reproduktionstrakt	9
2.2.2	Männlicher Reproduktionstrakt	11
2.3	Reproduktionsphysiologie des Breitmaulnashorns	13
2.3.1	Allgemeine Reproduktionsphysiologie	13
2.3.2	Weibliche Reproduktionsphysiologie	15
2.3.3	Männliche Reproduktionsphysiologie	16
2.4	Reproduktionsprobleme des Breitmaulnashorns - <i>ex-situ</i>	17
2.4.1	Nördliches Breitmaulnashorn (<i>Ceratotherium simum cottoni</i>)	18
2.4.2	Südliches Breitmaulnashorn (<i>Ceratotherium simum simum</i>)	18
2.4.3	Ursachen	19
2.4.4	Lösungsansätze	20
2.4.4.1	Zuchtprogramme	20
2.4.4.2	Hormonelle Behandlung	21
2.4.4.3	Assistierte Reproduktion	21

2.5	Methoden der Spermagewinnung und Qualität der Spermaproben bei verschiedenen Nashornarten	24
2.5.1	Elektrostimulation	25
2.5.2	Manuelle Stimulation	27
2.5.2.1	Pharmakologisch unterstützte Spermagewinnung	30
2.5.2.2	Rektale Stimulation	32
2.5.2.3	„Hot Towel Compression“	33
2.5.3	Künstliche Scheide	33
2.5.4	Epididymale Spermientnahme	34
2.5.5	Postcoitale Spermagewinnung	35
2.5.6	Zusammenfassung	36
2.6	Spermienmorphometrie	37
2.6.1	Spermienkopfmorphometrie beim Nashorn	39
2.6.2	Computergestützte Morphometrie	40
2.6.2.1	Analysegeräte	40
2.6.2.2	Eignung und Grenzen	42
3	Material und Methoden	44
3.1	Pharmakologisch unterstützte Spermagewinnung	45
3.1.1	Voruntersuchung	45
3.1.2	Hauptuntersuchung	47
3.1.3	Implementationsstudie	49
3.1.4	Tiere und Einrichtungen	49
3.1.5	Datenerhebung	50
3.2	Konventionelle Ejakulatanalyse	50
3.2.1	Makroskopische Ejakulatanalyse	50
3.2.2	Mikroskopische Ejakulatanalyse	50

3.2.3	Chemisch-physikalische Ejakulatanalyse	51
3.3	Computergestützte Spermienkopfmorphometrie	51
3.3.1	Analysegerät und Analysen-Setup	51
3.3.2	Computergestützte morphometrische Analyse	52
3.3.2.1	Definition und Berechnung der Spermienkopfklassen	52
3.3.2.2	Computergestützte Klassifikation von Spermienkopfanomalien	53
3.4	Statistische Auswertung	54
4	Ergebnisse	55
4.1	Pharmakologisch unterstützte Spermagewinnung u. konvent. Ejakulatanalyse	55
4.1.1	Voruntersuchung	55
4.1.1.1	Einfluss von Tageszeit und Management	63
4.1.1.2	Einfluss regelmäßiger manueller Stimulation	63
4.1.1.3	Einfluss der Medikation	64
4.1.2	Hauptuntersuchung	66
4.1.2.1	Einfluss von Detomidin und Butorphanol bei manueller Stimulationstechnik	67
4.1.2.2	Einfluss der Künstlichen Scheide bei pharmakologisch induzierter Erektion	73
4.1.3	Implementationsstudie	74
4.2	Computergestützte Spermienkopfmorphometrie	76
4.2.1	Definition und Berechnung der Spermienkopfklassen	76
4.2.2	Computergestützte Klassifikation von Spermienkopfanomalien	82
5	Diskussion	87
6	Zusammenfassung	97
7	Summary	98
8	Literaturverzeichnis	101
9	Anhang	114

1 EINLEITUNG

Das Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*) ist eine bedrohte Wildtierart. Die Reproduktionsrate der in zoologischen Institutionen gehaltenen Breitmaulnashörner ist sehr niedrig. Dies betrifft insbesondere die F1- und F2-Generation. Um stabile Bestände von dieser im Freiland gefährdeten Tierart in zoologischen Einrichtungen garantieren zu können, erscheint ein besseres Verständnis der Reproduktionsbiologie dieser Spezies erforderlich.

Die vorliegende Arbeit fasst den diesbezüglichen Kenntnisstand - unter besonderer Berücksichtigung der männlichen Reproduktionsphysiologie - zusammen. Eine wichtige Voraussetzung für eine umfassende andrologische Untersuchung ist eine zuverlässige Ejakulatgewinnung und dessen Analyse. Beim Breitmaulnashorn ist das Wissen über die physiologische Ejakulatbeschaffenheit gegenwärtig aufgrund der aufwendigen Spermagewinnung unter Anwendung der Elektroejakulation begrenzt.

In dieser Arbeit wurde vorrangig die Eignung bzw. der Einfluss pharmakologisch unterstützter Deseminationsmethoden beim Breitmaulnashornbullen untersucht. Mit der Zielsetzung einer regelmäßigen Spermagewinnung wurde primär die manuelle Stimulationstechnik, aber auch die Gewinnung mit einer Künstlichen Scheide, durch vorherige Applikation einer α -adrenergen Medikation modifiziert. Dabei gewonnene Spermaproben wurden einer konventionellen Ejakulatanalyse unterzogen, um Standardparameter zu ermitteln.

Die erstmalige Beschreibung metrischer Spermienkopfdimensionen beim Breitmaulnashorn bildete einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit und wurde durch eine morphometrische Analyse ergänzt. Die computergestützte Spermienkopfmorphometrie mit einem weitgehend automatisierten Analysegerät ermöglichte dabei die Erfassung und Auswertung einer großen Anzahl metrischer Daten.

2 LITERATUR

2.1 Das Breitmaulnashorn

(*Ceratotherium simum* - BURCHELL 1817)

Das afrikanische Breitmaulnashorn, *Ceratotherium simum* (griechisch: *cerato*: Horn, *therium*: wildes Tier, *simum*: flachnasig), ist nach dem asiatischen und afrikanischen Elefant das dritt-schwerste rezente Landsäugetier. Die Körpermasse adulter Nashornbullen beträgt mehr als zwei Tonnen. Charakteristisch sind die beiden auf dem Nasenrücken ausgebildeten Hörner. Die Struktur dieser Horngebilde gleicht prinzipiell dem Bau von Hufen oder Klauen. Die Hörner sind durch Bindegewebsstränge mit dem an diesen Stellen aufgerauhten Nasenbein verbunden. Es sind keine Knochenzapfen vorhanden. Weitere besondere Merkmale dieses reinen Grasfressers sind die breite, kaum bewegliche Oberlippe sowie der deutlich ausgeprägte Nackenwulst, der aus dem Ligamentum nuchae, Muskulatur und Fett besteht und ein dauerhaftes Senken des Kopfes zum Weiden ermöglicht (KINGDON 1979, KLÖS 1968). Der Digestionsapparat der Nashörner gleicht dem der Equiden: Der Magen ist einhölig, Zäkum und Kolon bilden voluminöse Gärkammern.

Obwohl die weitgehend unbehaarte Haut grau ist, wird das Breitmaulnashorn, insbesondere im angelsächsischen Sprachraum, auch als ‚white rhinoceros‘, ‚weißes Nashorn‘, bezeichnet. Manche Autoren (z.B. GAISLER & ZEJDA 1997, SCHENKEL 1987) führen dies auf eine Fehlübersetzung des burischen Wortes ‚wijde‘ (‚breit‘) - zur Beschreibung der breiten Maulpartie - in das englische Adjektiv ‚white‘ zurück. OWEN-SMITH (1988) sowie SKINNER & SMITHERS (1990) halten dagegen einen Bezug auf das durch helle Lehmsuhlen bedingte, scheinbar ‚weiße‘ Aussehen für wahrscheinlicher.

Das natürliche Habitat bilden halbtrockene Savannengebiete. Breitmaulnashörner leben in individuellen Futterstreifgebieten. Dabei sind temporäre Assoziationen zwischen adulten Kühen und subadulten Individuen zum Weiden oder Ruhen üblich (OWEN-SMITH 1988).

2.1.1 PHYLOGENESE UND TAXONOMIE

Das Breitmaulnashorn gehört zu der Familie der Nashörner, *Rhinocerotidae*. Erste Vorfahren lebten vor etwa 50 Millionen Jahren im mittleren Eozän. Aus der frühesten Gattung *Hyrachyus*, deren hornlose Vertreter sowohl in Europa als auch in Nordamerika vorkamen, entwickelten sich drei Nachfahrenlinien in unterschiedlichen Lebensräumen: Die terrestrischen *Hyracodontidae* und *Rhinocerotidae* sowie die semi-aquatischen *Amyndodontidae* (GROVES 1997, PROTHERO 1991).

Die heute existierenden Nashornarten gehören ausschließlich der Familie der *Rhinocerotidae* an. Sie umfasst neben dem Breitmaulnashorn eine weitere afrikanische Art, das Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis* - LINNAEUS 1758) sowie die drei asiatischen Arten Indisches Panzernashorn (*Rhinoceros unicornis* - LINNAEUS 1758), Javanashorn (*Rhinoceros sondaicus* - DESMAREST 1822) und Sumatranashorn (*Dicerorhinus sumatrensis* - FISCHER 1814). Gemeinsam mit der Familie der Tapire, *Tapiridae*, sowie der Pferde, *Equidae*, bildet sie die Ordnung der Unpaarzeher, *Perissodaktyla* (Abb. 1). Nashörner zählen zu den Huftieren, *Ungulata* (REMANE et al. 1986).

Das Breitmaulnashorn gilt als die jüngste rezente Nashornart (PROTHERO 1991). Fossile Funde der auf den afrikanischen Kontinent beschränkten Gattung *Ceratotherium* sind etwa sieben Millionen Jahre alt. Im Verlauf der Evolution entwickelten sich vier Unterarten, von denen zwei ausgestorben sind (GROVES 1997).

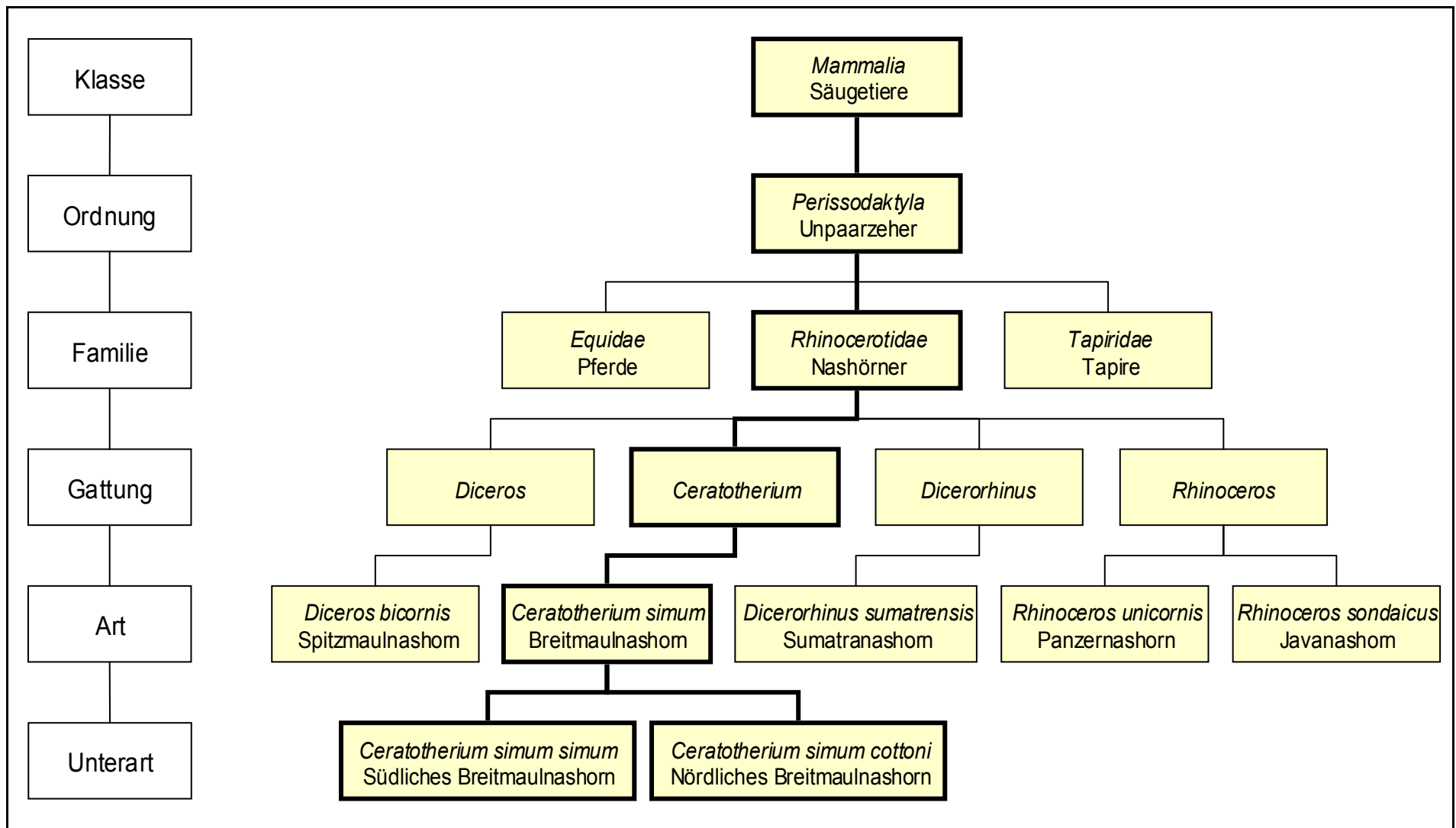


Abb. 1: Taxonomische Zuordnung des Breitmaulnashorns (*Ceratotherium simum*)
 Abbildung von der Autorin erstellt nach Angaben aus REMANE et al. (1986) und SCHMITZ (1987)

2.1.2 UNTERARTEN

Es gibt zwei rezente Unterarten, das Nördliche Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum cottoni*) und das Südliche Breitmaulnashorn (*Ceratotherium s. simum*), die sich morphologisch in ihren Körperproportionen unterscheiden. Dabei erscheint die nördliche Unterart schmaler und hochbeiniger (GROVES 1997) sowie kürzer in der Gesamtkörperlänge (HILLMAN-SMITH 1986). Die Schädeloberseite der südlichen Unterart ist konkaver geformt, zudem sind die Backenzähne des Südlichen Breitmaulnashorns vergleichsweise größer (GROVES 1997).

Neben diesen eher geringfügigen morphologischen Unterschieden bestehen genetische Divergenzen, die eine getrennte Entwicklung der beiden Unterarten belegen. Cytogenetische Untersuchungen durch HOUCK et al. (1994) an 38 Breitmaulnashörnern beider Unterarten ergaben zwar eine identische Chromosomenzahl von 82 im diploiden Chromosomensatz sowie weitgehend identische G- und C-Bandenmuster, jedoch bestehen Variationen in Form von Längenpolymorphismus verschiedener Chromosomen bei mehreren Individuen der nördlichen Unterart. Eine vergleichende Analyse der mitochondrialen DNS, Desoxyribonucleinsäure, belegt Abweichungen in der Nucleotidsequenz von 1,0 bis 1,4% zwischen den beiden Unterarten (GEORGE et al. 1991). Neuere Untersuchungen von KELLNER (2000) bestätigen mit Hilfe der AFLP Reaktion (Amplified Fragment Length Polymorphism) die Führung als getrennte systematische Einheiten. Trotz sehr ähnlicher Bandenmuster erlauben fehlende bzw. zusätzliche Banden eine eindeutige Unterscheidung der nördlichen bzw. südlichen Unterart.

Aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades ist eine Kreuzung der beiden Unterarten möglich. Hybridzuchten werden jedoch vermieden, um die Trennung der Unterarten zu bewahren. Versehentlich kam es im Zoo Dvur Kralove, Tschechische Republik, zu einer Kreuzung. Ein weiblicher Hybrid wurde 1977 geboren und von der weiteren Zucht ausgeschlossen (HILLMAN-SMITH 1986, OCHS 2001).

2.1.3 VORKOMMEN UND VERBREITUNG

Die historischen Verbreitungsgebiete der beiden Unterarten des afrikanischen Breitmaulnashorns sind durch einen 2000 km breiten Korridor voneinander getrennt (OWEN-SMITH 1988). Das Nördliche Breitmaulnashorn kam ursprünglich im Sudan, in Uganda, im Tschad, der Zentralafrikanischen Republik sowie in Zaire (heute Demokratische Republik Kongo) vor (HILLMAN-SMITH 1997, SMITH & SMITH 1991, SIDNEY 1965), während die südliche Unterart in weiten Teilen des südlichen afrikanischen Kontinents verbreitet war (SIDNEY 1965).

Ende des 19. Jahrhunderts galt das Südliche Breitmaulnashorn als beinahe ausgestorben. Die Population wurde vorwiegend durch Großwildjagd auf geschätzte zwanzig Individuen dezimiert (EMSLIE & ADCOCK 1997, KLÖS 1968, SCHENKEL 1987), jedoch 1897 durch die südafrikanische Regierung unter Schutz gestellt (KLÖS 1968). Während des 20. Jahrhunderts wuchs die Population auf mehrere Tausend Individuen an und wurde 2001 auf mehr als 11000 Tiere geschätzt (Tab. 1). Durch gezielte Umsiedlungsmaßnahmen leben Südliche Breitmaulnashörner auch außerhalb ihres ursprünglichen Verbreitungsgebiets in Reservaten in Kenia, Zambia und der Elfenbeinküste (Abb. 2).

Seit 1946 werden Breitmaulnashörner in zoologischen Einrichtungen, also *ex-situ*, gehalten (ROOKMAKER 1998). Die Zoopopulation der südlichen Unterart umfasst heute mehr als 700 Individuen (OCHS 2001). Die Entwicklung der Nördlichen Breitmaulnashornpopulation verlief entgegengesetzt. Die nördliche Unterart ist gegenwärtig von der Ausrottung bedroht (HILLMAN-SMITH 1997). Weltweit existieren nur noch 40 Tiere. Der einzige bestätigte Freilandbestand lebt im Garamba Nationalpark der Republik Kongo (Abb. 2) und umfasst etwa 30 Individuen (HILLMAN-SMITH 1997, MILLER & FOOSE 1996).

Tab. 1: Bestandszahlen der Breitmaulnashornpopulation, Stand 2001

Unterarten	<i>In-situ</i> Population ^a	<i>Ex-situ</i> Population ^b	Summe
Südliche Unterart	11640	761	12401
Nördliche Unterart	30	10	40

^a Daten aus IUCN/SSC Af/AsRSG & FOOSE (2001) u. ^b OCHS (2001)

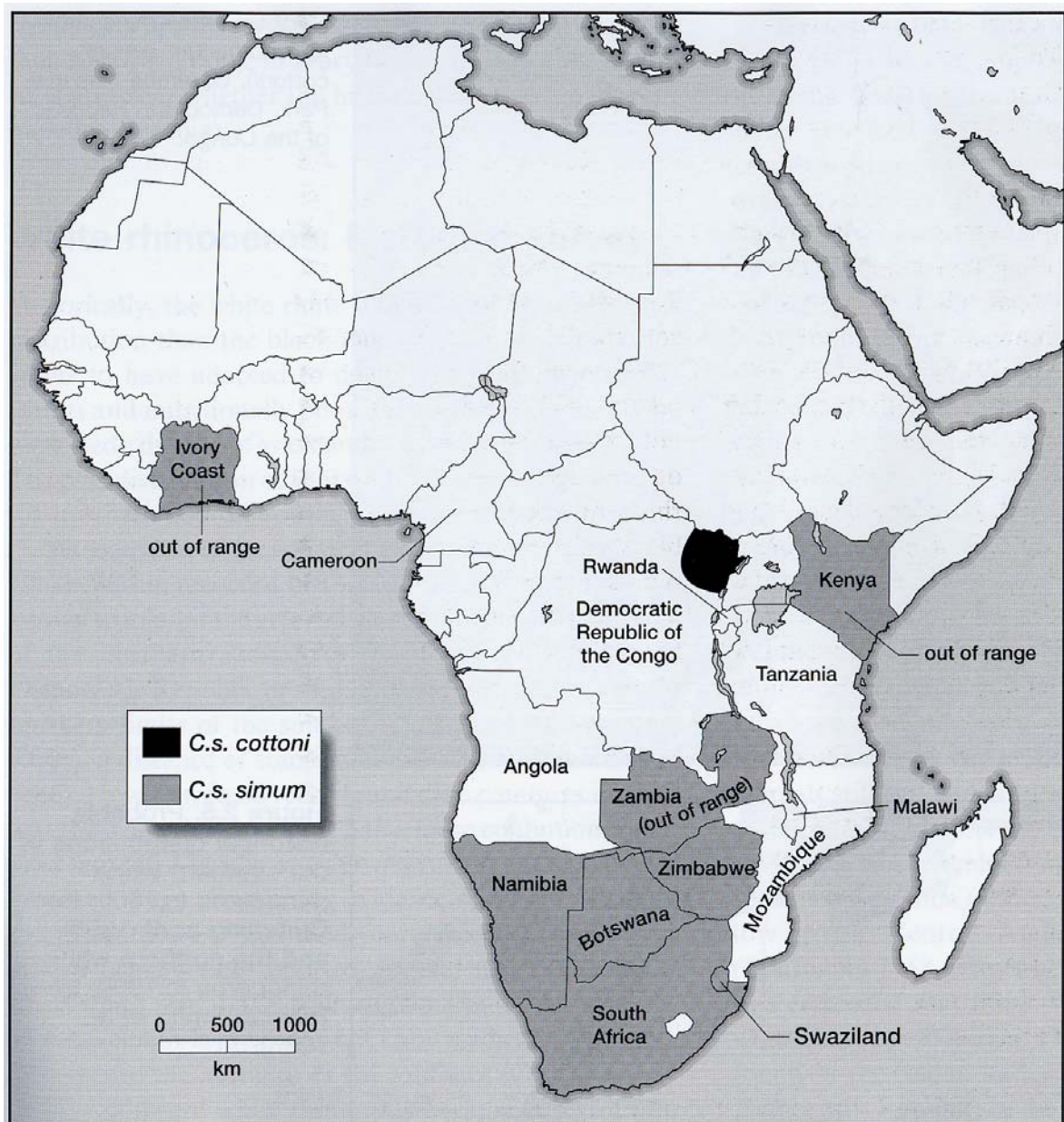


Abb. 2: Heutige Verbreitungsgebiete von Freilandpopulationen des Nördlichen und Südlichen Breitmaulnashorns (*Ceratotherium simum*) Gebiete, in denen ursprünglich keine Breitmaulnashörner vorkamen, sind mit 'out of range' gekennzeichnet (aus EMSLIE & BROOKS 1999).

2.1.4 STATUS

Angesichts des stark bedrohten Zustands der nördlichen Breitmaulnashornpopulation ist deren Schutz von internationalem Interesse. Jedoch stellen die zunehmende Bevölkerungsdichte, Bürgerkriege, Wilderei sowie der illegale Handel mit Horn eine erhebliche Gefahr für die *in-situ* Populationen beider Unterarten dar (MEISTER & OWEN-SMITH 1997, MILLER & FOOSE 1996).

Der Handel mit Nashornprodukten besteht schon seit mehr als 2000 Jahren (MARTIN 1991). Nashornprodukte finden vor allem Anwendung in der traditionellen asiatischen Medizin (PUI-HAY et al. 1990), die fieberhafte Erkrankungen u.a. mit pulverisiertem Nasenhorn behandelt (EMSLIE & ADCOCK 1997, MAINKA & MILLS 1995). PUI-HAY et al. (1990) konnten zwar im Tierversuch mit Ratten eine antipyretische Wirkung von Nasenhornbestandteilen nachweisen, jedoch hatte die Applikation von Gazellenhorn identische Effekte. Nasenhörner werden auch zur Herstellung von Schmuck und Trinkgefäßen verwendet. Im ehemaligen Nordjemen und anderen Golfstaaten wurden Dolchgriffe aus Nasenhorn gefertigt und galten als Statussymbol (EMSLIE & ADCOCK 1997, PUI-HAY et al. 1990). Nach Beobachtungen von MARTIN (1991) ist dieser Markt jedoch seit Ende der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts deutlich rückläufig.

Das Breitmaulnashorn wird in der ‚Roten Liste der bedrohten Arten‘ geführt, der internationale Handel mit Nashörnern sowie mit deren Produkten unterliegt dem Reglement des Washingtoner Artenschutzabkommens.

2.1.4.1 2000 IUCN Red List

In der von der ‚Species Survival Commission‘ (SSC) der Weltnaturschutzunion, ‚International Union for the Conservation of Nature‘ (IUCN) auf Artniveau erstellten ‚Roten Liste der bedrohten Arten 2000‘ ist die Spezies Breitmaulnashorn aufgrund der wachsenden Population der südlichen Unterart der Kategorie „Geringeres Risiko – schutzabhängig“ zugeordnet. Der Status der nördlichen Unterart gilt jedoch als „Kritisch gefährdet“ (EMSLIE & BROOKS 1999).

2.1.4.2 CITES

Alle Nashornarten unterliegen seit 1977 der ‚Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora‘ (CITES), dem so genannten ‚Washingtoner Artenschutzabkommen‘. Mit Ausnahme der südafrikanischen Breitmaulnashornpopulation, werden alle Nashornarten in Anhang I geführt. Dieser Anhang umfasst von der Ausrottung bedrohte Arten, die durch den internationalen Handel in ihrer Existenz zusätzlich gefährdet werden könnten. Mit 156 Mitgliedstaaten (Stand 01.01.2002) gilt das Übereinkommen praktisch weltweit. Die Rückstufung der südafrikanischen Breitmaulnashornpopulation 1994 in Anhang II ist beschränkt auf einen kontrollierten Handel mit lebenden Tieren an „genehmigte und akzeptable“ Empfänger sowie den Export legaler Horntrophäen (EMSLIE & ADCOCK 1997).

2.2 Anatomie der Geschlechtsorgane beim afrikanischen Nashorn

Die Abschnitte des Reproduktionstrakts weiblicher und männlicher Nashörner entsprechen grundsätzlich den anatomischen Verhältnissen bei Haussäugetieren. Im Folgenden wird eine kurze Beschreibung der inneren und äußeren Geschlechtsorgane unter Berücksichtigung anatomischer Besonderheiten gegeben.

2.2.1 WEIBLICHER REPRODUKTIONSTRAKT

Die Ovarien haben sowohl makro- als auch mikroskopisch hohe strukturelle Ähnlichkeit mit den Eierstöcken des Rindes (SCHAFFER et al. 2001a). Sie sind oval geformt, Funktionsgebilde befinden sich an der Oberfläche. Es ist ein *Uterus bicornis* ausgebildet (GODFREY et al. 1991, RADCLIFFE et al. 1997, SCHAFFER et al. 2001a). Der Körper, *Corpus uteri*, ist mit einer durchschnittlichen Länge von 5 cm (gemessen vom *Orificium cervicale internum* bis zur *Bifurcatio uteri*) relativ kurz gegenüber den Uterushörnern, *Cornua uteri* (ca. 40 cm lang – gemessen von der Bifurkation bis zur uterotuberalen Verbindung; GODFREY et al. 1991; vgl. Abb. 3). Das Endometrium besitzt zahlreiche Längsfalten (SCHAFFER et al. 2001a).

Die Untersuchung von sechs Placenten von Breitmaulnashörnern durch BENIRSCHKE & LOWENSTINE (1995) ergab eine Zuordnung zum epithelio-chorialen Typ.

Die *Cervix simplex* ist derb-fibrös, der Zervikalkanal ist bedingt durch drei bis fünf kräftige Falten, *Plicae cervicales*, stark gewunden (Abb. 3).

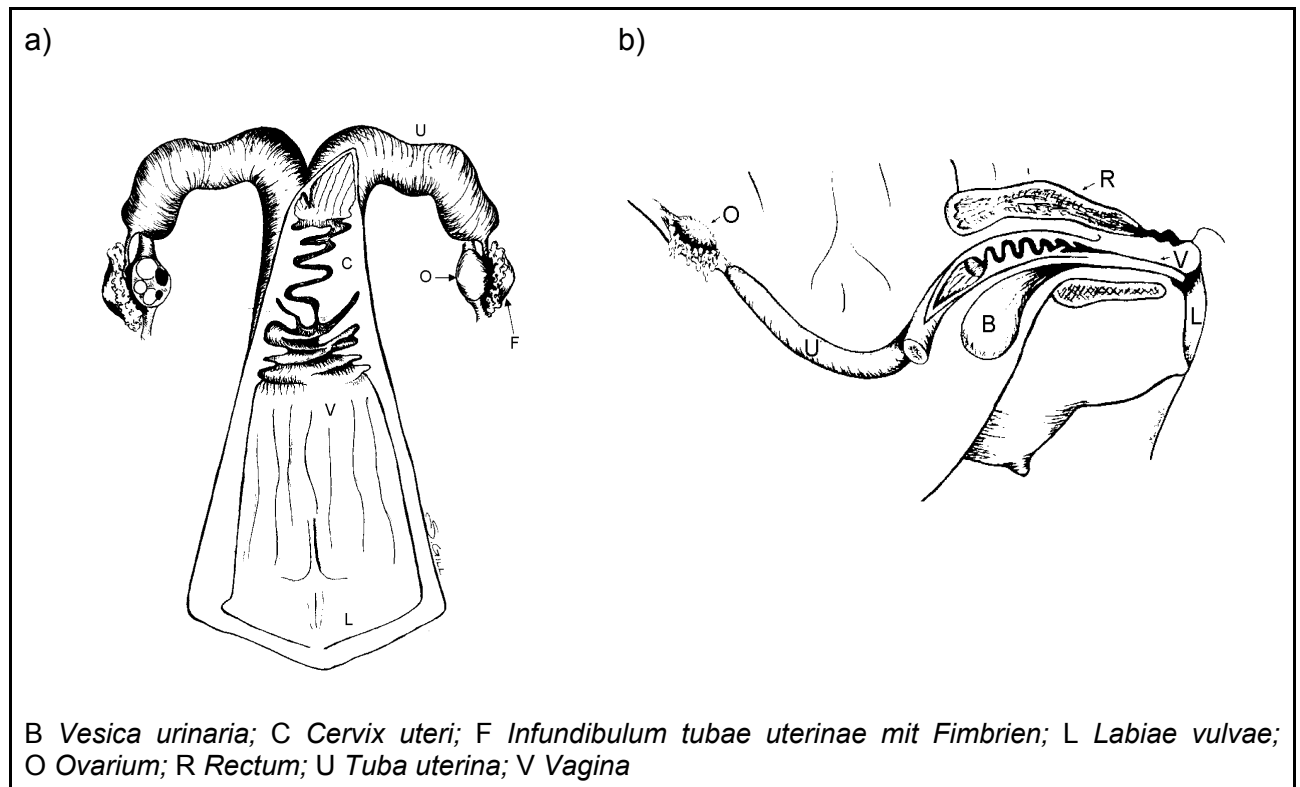


Abb. 3: Schematische Darstellung der weiblichen Geschlechtsorgane des Nashorns: a) Aufsicht b) Topographie (aus SCHAFFER et al. 2001a)

In der Scheide nulliparer Individuen ist dorso-kränial vom *Diverticulum urethrale* ein Hymen ausgebildet. Bei primi- sowie multiparen Tieren sind Überreste vorhanden (GODFREY et al. 1991, HERMES et al. 2000, SCHAFFER et al. 2001a). Die Labien sind im ventralen Abschnitt etwas dicker, die Klitoris befindet sich in der ventralen Kommissur in der *Fossa clitoridis* (SCHAFFER et al. 2001a). Es ist ein inguinales Zitzenpaar ausgebildet (SKINNER & SMITHERS 1990).

2.2.2 MÄNNLICHER REPRODUKTIONSTRAKT

Die Hoden liegen bei Nashornbullen extra-abdominal im Bereich der *Regio pubica* in einer Skrotalfalte (DE VOS & BRAACK 1980). Vergleichbar mit den anatomischen Verhältnissen beim Hengst (SCHUMMER & VOLLMERHAUS 1987) ist die Längsachse der als ovoid beschriebenen Hoden horizontal orientiert, so dass die *Extremitas capitata* nach kranial weist und der Nebenhoden, *Epididymis*, dem Hoden dorso-lateral aufgelagert ist. Das Hodenparenchym wird außen von einer straffen Bindegewebskapsel, der *Tunica albuginea testis*, umgeben und von deutlich ausgebildeten Bindegewebssepten, *Septula testis*, in kleine Läppchen, *Lobuli testis*, unterteilt. Der Gehalt an Bindegewebe zwischen den gewundenen Hodenkanälchen, den *Tubuli seminiferi contorti*, ist mäßig, die intertubulären Räume werden von Aggregaten von Zwischenzellen, *Leydig-Zellen*, ausgefüllt. Der Durchmesser der *Tubuli seminiferi contorti* beträgt 180 bis 200 µm (SCHAFFER et al. 2001a).

Als akzessorische Geschlechtsdrüsen sind die Samenblasendrüsen, *Glandulae vesiculares*, die Vorsteherdrüse, *Glandula prostatica* sowie die Harnröhrenzwiebeldrüse, *Glandula bulbourethralis*, ausgebildet (HERMES et al. 2001a, SCHAFFER et al. 2001a). Während die *Glandulae vesiculares* bei Breitmaulnashörnern, aber auch bei anderen Nashornarten von SCHAFFER et al. (1994, 1998a, 2001a) als ca. 15,5 x 4,0 cm große, stark gelappte, höckerige Drüsen beschrieben werden, sind sie nach Angaben von HATT & ISENBÜGEL (2001) beim Nashornbullen nicht vorhanden. Der Drüsenkörper der Prostata gliedert sich in zwei dreieckige Drüsenlappen, *Lobuli prostatae*, mit einer jeweiligen Größe von 12,0 x 4,0 cm, die über den *Isthmus prostatae* miteinander verbunden sind. Die paarige Bulbourethraldrüse (Größe jeweils ca. 10,0 x 6,5 cm) liegt der Harnröhre kurz vor deren Austritt aus der Beckenhöhle auf und besitzt beim Breitmaulnashorn eine längliche, unregelmäßige Form. Die Drüsenkapsel enthält viel Muskulatur. Die beim Hengst deutlich aufgetriebenen Samenleiterampullen, *Ampullae ductus deferentis* (SCHUMMER & VOLLMERHAUS 1987), sind beim Nashornbullen makroskopisch nicht erkennbar. Im histologischen Schnittpräparat können jedoch

drüsenähnliche Strukturen in muskelreichem Stroma nachgewiesen werden. In Abb. 4 sind Form und Lage der akzessorischen Geschlechtsdrüsen beim Spitzmaulnashorn dargestellt.

Zwischen den Geschlechtsorganen der beiden afrikanischen Nashornarten bestehen keine wesentlichen anatomischen Unterschiede (SCHAFFER et al. 2001a).

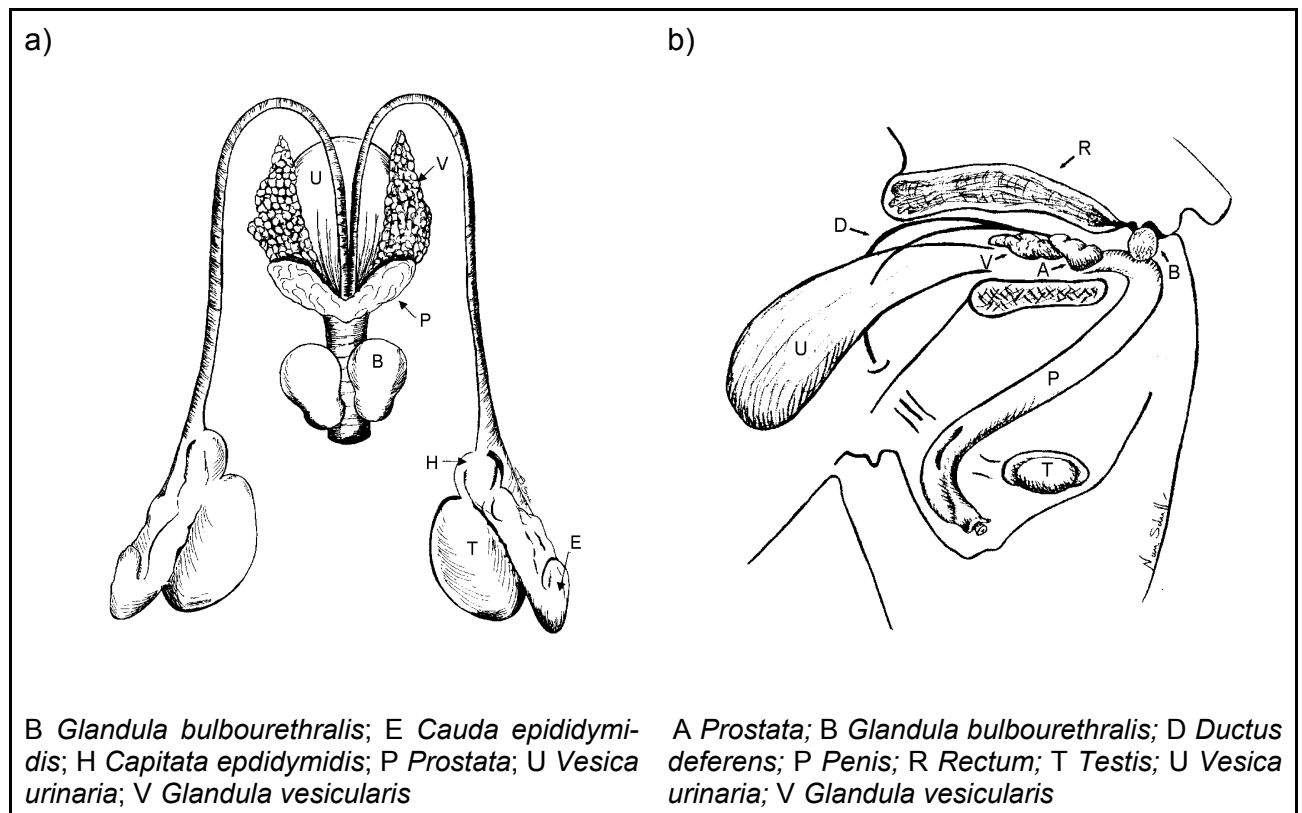


Abb. 4: Schematische Darstellung der männlichen Geschlechtsorgane des afrikanischen Nashorns: a) Aufsicht b) Topographie (aus SCHAFFER et al. 2001a)

Der Penis des Nashornbullens entspricht dem muskulo-kavernösen Typ. Das Präputium öffnet sich nach kaudal, die *Glans penis* ist im nicht erigierten Zustand nach hinten gerichtet (Abb. 4b). Der erigierte Penis ist etwa einen Meter lang, weist nach kranial und liegt bei maximaler Erektion der ventralen Bauchwand unmittelbar an. Seitlich am distalen *Corpus penis* sind zwei Schwellkissen ausgebildet, die im erigierten Zustand flügelähnliche Gestalt annehmen (SCHAFFER et al. 2001a; Abb. 5a). Die Penisspitze besitzt mit der pilzförmig ausgebildeten *Glans penis* eine charakteristische Form (HATT & ISENBÜGEL 2001; Abb. 5b).

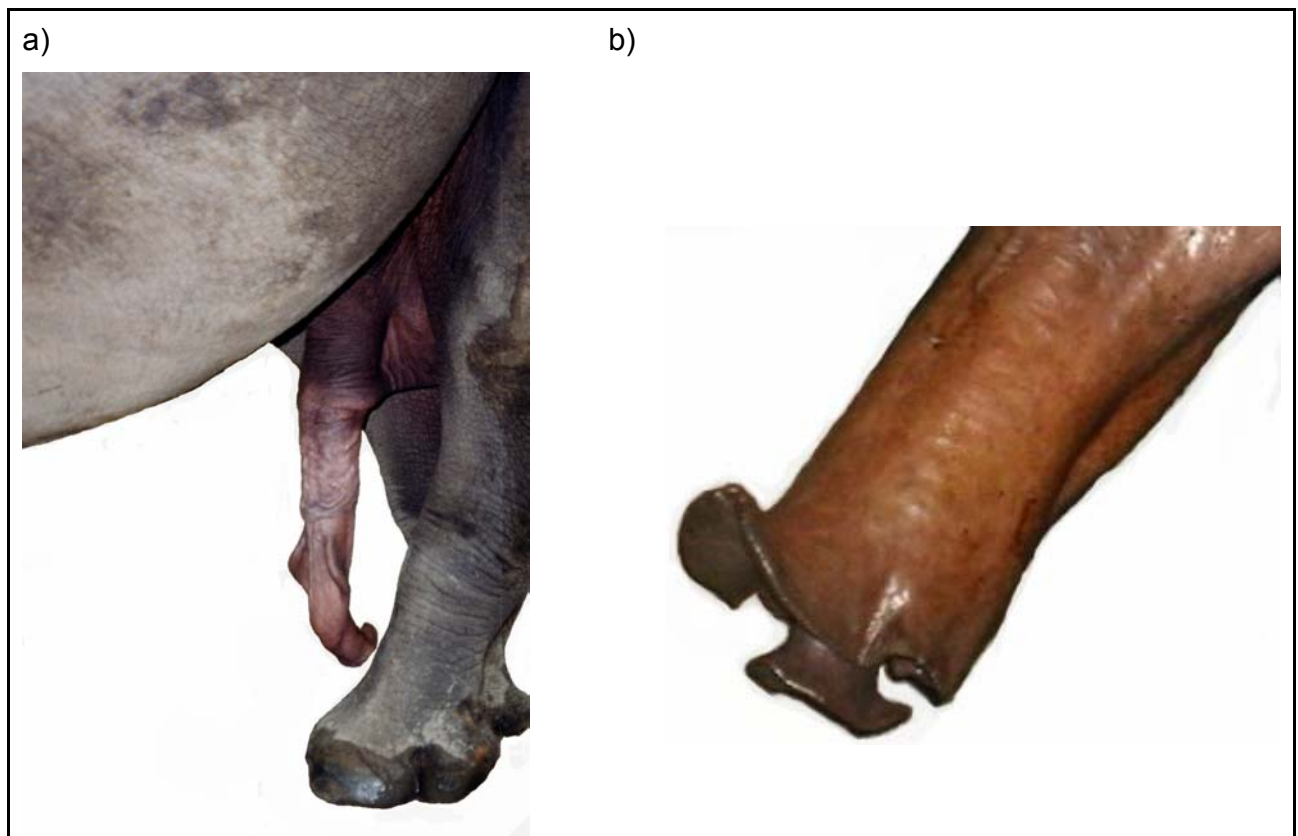


Abb. 5: Unvollständig erigierter Penis eines Breitmaulnashorns
a) Gesamtansicht b) Penisspitze (Quelle Fotos: Autorin)

2.3 Reproduktionsphysiologie des Breitmaulnashorns

Der Kenntnisstand über die Reproduktionsphysiologie der Nashörner stellt sich gegenwärtig als uneinheitlich und unvollständig dar. Für ein profundes Verständnis der speziellen weiblichen und männlichen Reproduktionsbiologie besteht ein deutlicher Forschungsbedarf (z.B. PATTON et al. 1999, ROTH et al. 1998). Dagegen ist das allgemeine Fortpflanzungsverhalten basierend auf Freilandbeobachtungen hinreichend beschrieben (z.B. OWEN-SMITH 1988).

2.3.1 ALLGEMEINE REPRODUKTIONSPHYSIOLOGIE

Da Breitmaulnashörner individuelle Futterstreifgebiete besitzen, treffen geschlechtsreife Bullen und Kühe ausschließlich zum Zweck der Reproduktion aufeinander. Während die Territorien adulter, dominanter Bullen streng gegeneinander abgegrenzt sind, überlappen sich die

Streifgebiete der Kühe und können sich zudem über mehrere Bullenreviere erstrecken. Der Fortpflanzungserfolg eines Bullen steht in Zusammenhang mit der Attraktivität seines Reviers, da der Aufenthaltsort der Nashornkühe von Futter- und Wasserressourcen bestimmt wird. Dominante, territoriale Bullen haben somit größere Erfolgsaussichten auf eine Paarung (OWEN-SMITH 1988, RACHLOW et al. 1998). Dennoch wird der Möglichkeit der Partnerwahl durch die Kuh im Freiland, aber auch in zoologischen Einrichtungen große Bedeutung beigegeben, weshalb von einigen Autoren eine *ex-situ* Haltung von Breitmaulnashörnern in Gruppen propagiert wird (KILLMAR 1997, MEISTER & OWEN-SMITH 1997, PATTON et al. 1999).

Im Freiland folgt die Fortpflanzung von Breitmaulnashörnern einer gewissen Saisonalität. Obwohl Paarungen und Geburten während des gesamten Jahres stattfinden, besteht ein zweigipfliges Verteilungsmuster sowohl der Paarungs- als auch der Geburtenfrequenz. Dabei scheinen klimatische Faktoren von Bedeutung zu sein. Während der Regen- und frühen Trockenzeit ist der proportionale Anteil an Kühen, die von einem Bullen begleitet werden, deutlich höher, als während der nachfolgenden Monate der Trockenperiode (OWEN-SMITH 1988, SKINNER & SMITHERS 1990). Dagegen unterliegt die Fortpflanzung der *ex-situ* Population keiner Saisonalität (MEISTER & OWEN-SMITH 1997, PATTON et al. 1999).

Vor der Paarung kommt es während einer ein bis zwei Wochen umfassenden Werbungsphase zu einer Annäherung der Partner (BÖER & HAMZA 1996, OWEN-SMITH 1988). Die Kuh signalisiert ihre Paarungsbereitschaft durch Schwanzheben, Abgabe von Urin und Duldung des Bullen (OWEN-SMITH 1988, RADCLIFFE et al. 1997). Die Dauer der Kopulation kann bis zu 90 Minuten betragen (BÖER & HAMZA 1996).

Um eine weitere Paarung mit einem anderen Bullen zu verhindern, begleiten manche Breitmaulnashornbullen die Kuh nach dem Deckakt noch für einige Tage. Falls die Paarung nicht zu einer Trächtigkeit führte, kann eine erneute Paarungsbereitschaft der Nashornkuh nach etwa 30 Tagen beobachtet werden (OWEN-SMITH 1988).

2.3.2 WEIBLICHE REPRODUKTIONSPHYSIOLOGIE

Im Freiland erreichen Breitmaulnashornkühe die Geschlechtsreife mit frühestens dreieinhalb Jahren (OWEN-SMITH 1988), teilweise aber auch erst mit sechs Jahren (SCHENKEL 1987). Tiere, die in Zoos und Safariparks gehalten werden, können dagegen vergleichsweise früher geschlechtsreif werden. Einzelne Kühe wurden bereits in einem Alter unter drei Jahren gedeckt (BÖER & HAMZA 1996; Tab. 2).

Über die Dauer des Zyklus bestehen divergente Annahmen (vgl. Tab. 2). Nach Erhebungen im Freiland beträgt die Zyklusdauer beim Südlichen Breitmaulnashorn etwa 30 Tage (OWEN-SMITH 1988). Bei im Zoo gehaltenen Breitmaulnashornkühen wurden ebenfalls Zyklen von 30 Tagen, aber auch ein Mehrfaches dieses Zeitraums registriert (LINDEMANN 1982). Auch Beobachtungen von in einem Safaripark gehaltenen Nördlichen Breitmaulnashörnern ergaben eine durchschnittliche Zyklusdauer von $29 \pm 3,4$ Tagen (VAHALA et al. 1993). Neben diesen auf der Basis von ethologischen Untersuchungen gewonnenen Ergebnissen, wurden mit endokrinologischen Analysen weitere Daten zum Zyklusgeschehen bei Nashornkühen erhoben. Die Bestimmung von Steroidhormonen im Urin bei jeweils einem Individuum beider Unterarten (HINDLE et al. 1992) sowie die Kombination sonographischer und hormoneller Untersuchungstechniken bei einer südlichen Breitmaulnashornkuh (RADCLIFFE et al. 1997, RADCLIFFE & OSOFSKY 1996) bestätigten weitgehend die durch Beobachtungen erhobenen Ergebnisse. SCHWARZENBERGER et al. (1994, 1998) stellten dagegen auf der Basis fäkaler Steroidhormonanalysen bei einer größeren Anzahl von Individuen vier Kategorien zyklischer Aktivität fest und fanden bei zwei Kühen regelmäßige Zyklen von ca. 70 Tagen. In Untersuchungen von PATTON et al. (1999) konnten durch fäkale Hormonanalysen bei fünf von dreizehn untersuchten Kühen regelmäßige Zyklen von $35,4 \pm 2,2$ Tagen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) protokolliert werden. Dabei hatten jedoch zwei Individuen neben den kurzen Zyklen auch einzelne Zyklen mit einer Länge von knapp 70 Tagen. Lange und kurze Zyklen unterschieden sich in der Dauer der lutealen Phase, weshalb die Autoren die längeren Zyklen als in- bzw. subfertil einschätzten.

Beobachtungen zufolge beträgt die Trächtigkeitsdauer beim Breitmaulnashorn etwa sechzehn Monate (NELSON & FOWLER 1986, OWEN-SMITH 1988, SCHENKEL 1987, VAHALA et al. 1993; Tab. 2). Dabei handelt es sich jedoch vermutlich um die untere Grenze. Nach neueren Daten zoologischer Institutionen kann die Gravidität einen Zeitraum von 480 bis 548 Tagen umfassen (RIECHES 1998). Durch fäkale Steroidhormonanalysen konnte eine Graviditätsdauer von 525 Tagen bei einer Breitmaulnashornkuh belegt werden (PATTON et al. 1999).

Tab. 2: Fortpflanzungsparameter der Breitmaulnashornkuh im Überblick

Parameter	Alter, Dauer, Gewicht
Eintritt der Geschlechtsreife	2,8 bis 6 Jahre
Erstkalbealter	ab 4 bis 5 Jahren
Zyklusdauer	25 bis 90 Tage
Trächtigkeitsdauer	474 bis 548 Tage
Laktationsdauer	14 bis 24 Monate
Zwischenkalbeintervall	2 bis 4 Jahre
Geburtsgewicht	40 bis 65 kg

Das Erstkalbealter wird in zoologischen Einrichtungen teilweise mit vier bis fünf Jahren (BÖER & HAMZA 1996, LINDEMANN 1982, RIECHES 1998) angegeben, im Freiland dagegen mit etwa sieben Jahren (HILLMAN-SMITH 1997, OWEN-SMITH 1988, RACHLOW & BERGER 1998; Tab. 2). Dabei scheint das Erstkalbealter ebenso wie die Dauer des üblicherweise zwei bis vier Jahre umfassenden Zwischenkalbeintervalls (z.B. OWEN-SMITH 1988, RACHLOW & BERGER 1998) von der jeweiligen Populationsdichte abhängig zu sein. In besonders eng besetzten Gebieten beträgt das durchschnittliche Erstkalbealter zehn Jahre (RACHLOW & BERGER 1998). In diesem Zusammenhang ist auch das Alter der Tiere von Bedeutung. Das Zwischenkalbeintervall beträgt bei jüngeren Kühen meist weniger als zweieinhalb Jahre. Bei älteren Individuen dagegen kann der Zeitraum zwischen zwei Geburten oft mehr als drei Jahre betragen (OWEN-SMITH 1988). Es wird in der Regel ein Kalb mit einem Geburtsgewicht von 40 bis 65 kg geboren (MEISTER & OWEN-SMITH 1997; Tab. 2).

Die Laktationsdauer beträgt zwischen vierzehn und sechzehn Monaten (BÖER & HAMZA 1996), in Ausnahmefällen aber auch bis zu zwei Jahren (OWEN-SMITH 1988; Tab. 2). Das Jungtier begleitet die Breitmaulnashornkuh bis etwa drei Wochen vor der Geburt des nächsten Kalbs (MEISTER & OWEN-SMITH 1997).

2.3.3 MÄNNLICHE REPRODUKTIONSPHYSIOLOGIE

Mit Eintritt der Geschlechtsreife, die mit einem Alter von frühestens fünf bis sieben (NELSON & FOWLER 1986) bzw. acht bis zehn Jahren (MEISTER & OWEN-SMITH 1997) erreicht wird, versuchen die Bullen ein eigenes Territorium zu besetzen. Revierbesitzer sind dominant und werden als α -Bullen bezeichnet. Neben Kühen werden innerhalb eines Reviers nur subdominante β -Bullen geduldet. In der Regel pflanzen sich nur die dominanten Bullen fort.

Während der mit bis zu 90 Minuten ungewöhnlich langen Kopulation scheint es zu mehreren aufeinander folgenden Ejakulationen zu kommen (OWEN-SMITH 1988). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass es sich dabei um den Ablauf einer mehrphasigen Ejakulation handelt. Über die physiologische Beschaffenheit des Ejakulats ist jedoch bei dieser Spezies wegen begrenzter Gewinnungsmethoden nur wenig bekannt. Deseminationsmethoden und Spermaparameter werden im Abschnitt 2.5 näher beschrieben.

2.4 Reproduktionsprobleme des Breitmaulnashorns - *ex-situ*

Die Reproduktionsrate der in zoologischen Institutionen gehaltenen Breitmaulnashörner ist sehr niedrig. Während die Wachstumsrate der Freilandpopulationen beider Unterarten bei entsprechender Kapazität des Lebensraums etwa 10% (HILLMAN-SMITH 1997, OWEN-SMITH 1988, RACHLOW & BERGER 1998) bis 15% (KRETZSCHMAR 2001) beträgt, sind die *ex-situ* Populationen nicht selbst erhaltend (z.B. SCHWARZENBERGER et al. 1999). Nach Angaben des 8. und 9. Internationalen Zuchtbooks (OCHS 1999, 2001) für den Zeitraum 1997 bis 2001 stehen 90 Geburten 104 Todesfälle gegenüber.

2.4.1 NÖRDLICHES BREITMAULNASHORN (*CERATOTHERIUM SIMUM COTTONI*)

Die *ex-situ* Population der nördlichen Unterart umfasst nach Angaben des 9. Internationalen Zuchtbuchs für das afrikanische Breitmaulnashorn (OCHS 2001) zehn Individuen. Die 1,2¹ im San Diego Wild Animal Park, USA, gehaltenen Nördlichen Breitmaulnashörner der F0-Generation züchten nicht und sind zudem zum Stand 2001 fast 30 Jahre alt. Bei der 3,4¹ Tiere umfassenden Population des Safariparks Dvur Kralove, Tschechische Republik, wurde im Jahr 2000 das erste Kalb (0,1¹) nach mehr als zehn Jahren geboren.

2.4.2 SÜDLICHES BREITMAULNASHORN (*CERATOTHERIUM SIMUM SIMUM*)

Von den zum Stand 2001 lebenden geschlechtsreifen Südlichen Breitmaulnashörnern – ausgehend von einer Geschlechtsreife von sechs Jahren bei den Kühen und acht Jahren bei den Bullen – hat eine von der Autorin durchgeführte Auswertung der Daten des 9. Internationalen Zuchtbuchs für das afrikanische Breitmaulnashorn (OCHS 2001) ergeben, dass nur etwa 30% der Tiere bisher erfolgreich gezüchtet haben. Die Hälfte der gehaltenen Nashörner ist dabei jedoch schon älter als zwanzig Jahre.

Ein Vergleich der Zuchterfolge der Nashornbullen der F0-Generation (Wildfänge) sowie der nachgezüchteten F1- und F2-Generation der südlichen Unterart – wiederum von einer Geschlechtsreife von acht Jahren ausgehend – zeigt eine dramatische Entwicklung. Während mehr als 30% der Bullen der F0-Generation erfolgreich gezüchtet haben, betrug der Anteil der züchtenden Bullen der F1-Generation unter 15%, in der F2-Generation weniger als 10%. Dabei sind wenige Individuen überrepräsentiert. Beispielsweise hat ein Breitmaulnashornbulle der F0-Generation 64 Kälber gezeugt.

¹ Zoologische Nomenklatur: Die Ziffer vor dem Komma gibt die Anzahl männlicher Individuen, die Ziffer nach dem Komma die Anzahl weiblicher Tiere einer Gruppe an.

2.4.3 URSACHEN

Die Ursachen der verminderten Fertilität der *ex-situ* Populationen sind noch nicht hinreichend geklärt. Als ein bedeutender Faktor wird von einigen Autoren ein Fehlmanagement der Breitmaulnashornhaltung angeführt (BERTSCHINGER 1994, KOCK & GARNIER 1991). Entgegen ihrer natürlichen Lebensweise im Freiland leben viele Breitmaulnashörner in Paarhaltungen. Es wird vermutet, dass sich zwischen Individuen, die über lange Zeiträume gemeinsam in einem Gehege gehalten werden, ‚Geschwisterähnliche Beziehungen‘ ausbilden können. An anderer Stelle wurde bereits auf die Forderung nach einer Haltung von Breitmaulnashörnern in Gruppen hingewiesen (vgl. 2.3.2). Jedoch erfordert eine Gruppenhaltung dieser Tierart eine differenziertere Betrachtung. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass bei gemischter Gruppenhaltung einzelne Kühe in ihrer Reproduktion durch ein dominantes weibliches Tier unterdrückt werden (HILDEBRANDT 2002, persönliche Kommunikation). Weiterhin scheint auch das soziale Umfeld, insbesondere der Reproduktionsstatus der weiblichen Tiere, deutliche Auswirkungen auf die Fertilität der Nashornbullen zu haben (HERMES 2002, persönliche Kommunikation). Diese Faktoren sollten bei der Zusammenstellung von Gruppen berücksichtigt werden.

Eine weitere Ursache für die niedrige Reproduktionsrate sind pathologische Veränderungen der weiblichen Reproduktionsorgane. Ultraschalluntersuchungen des Reproduktionstrakts von 30 Breitmaulnashornkühen bestätigen die Ausbildung von Uteropathien sowie Veränderungen des Ovars (z.B. uterine und ovarielle Zysten, Tumore etc.) in mehr als 50% der Fälle (HERMES et al. 2001b). Diese Alterationen können Zyklusstörungen, Konzeptionsstörungen sowie Störungen der Gravidität bedingen, jedoch auch ein weiterer Grund für die oben beschriebenen Anpaarungsprobleme sein (ANONYMOUS 1998). Das Auftreten pathologischer Veränderungen steht in direktem Zusammenhang mit der Anzahl nicht-konzeptiver Zyklen, ist dabei jedoch unabhängig von der Ausprägung der zyklischen Aktivität. Ältere Kühe, die regelmäßig trächtig waren, weisen vergleichsweise geringfügige Alterationen des Genitaltrakts auf (HERMES et al. 2001b). Jedoch sind lediglich bei Kühen, die zum Untersuchungszeitpunkt

jünger als zwölf Jahre waren, die Reproduktionsorgane frei von pathologischen Veränderungen (HERMES et al. 2001c). Die Mehrzahl der in zoologischen Einrichtungen gehaltenen Tiere ist jedoch schon deutlich älter (OCHS 2001).

Neben pathologischen Veränderungen bei den Nashornkühen, müssen Ursachen für die verminderte Fertilität auch bei den männlichen Tieren gesucht werden. Die Analyse von Elektroejakulaten von vierzehn Bullen ergab für neun Bullen eine verminderte Spermaqualität. Sonographische Untersuchungen der Hoden und der akzessorischen Geschlechtsdrüsen zeigten jedoch keine wesentlichen Alterationen (HERMES et al. 2001c).

2.4.4 LÖSUNGSANSÄTZE

Zur Überwindung der niedrigen Reproduktionsrate erscheint ein besseres Verständnis der Reproduktionsbiologie dieser Spezies erforderlich. Während die Gynäkologie des Nashorns mit bereits etablierten nicht-invasiven endokrinologischen und sonographischen Methoden untersucht werden kann, erfordert die andrologische Forschung vorrangig zuverlässige Determinationsmethoden, die regelmäßige Ejakulatanalysen erlauben. Eine dadurch mögliche Bestimmung des Reproduktionsstatus einzelner Individuen kann sowohl eine fundierte Basis für Managemententscheidungen im Rahmen von Zuchtprogrammen zur Förderung der natürlichen Fortpflanzung, als auch für die Weiterentwicklung und Anwendung hormoneller Behandlungsschemata sowie assistierter Reproduktionstechniken bei dieser Tierart bilden (z.B. HERMES et al. 2001b, ROTH 2001, SCHWARZENBERGER et al. 1999, 2001).

2.4.4.1 Zuchtprogramme

Seit 1966 wird das ‚Internationale Zuchtbuch für afrikanische Nashörner‘ vom Zoologischen Garten Berlin geführt. Es enthält wesentliche Informationen zu den weltweit in zoologischen Einrichtungen gehaltenen afrikanischen Nashörnern. Jedes Individuum ist über eine Zuchtbuchnummer registriert. Dabei werden auch Aborte, Totgeburten und unmittelbar nach der Geburt gestorbene Tiere erfasst. Daten zu Stammbaum, Alter, Geschlecht, Reproduktions-

status, Todesursache etc. bilden nicht nur die Grundlage für biostatistische Aussagen zur Populationsdynamik, sondern auch für die Entwicklung globaler und regionaler Managementstrategien.

Im Rahmen eines ‚Globalen Gefangenschaftsaktionsplans‘ (GCAP, Global Captive Action Plan) sowie eines ‚Überlebensplans‘ (GASP, Global Animal Survival Plan) werden Richtlinien für die Haltung von Nashörnern von der Erhaltungszuchtgruppe (CBSG, Conservation Breeding Specialist Group) der Weltnaturschutzunion erstellt.

Auf regionaler Ebene bestehen Zuchtprogramme, die von einer ‚Nashornberatungsgruppe‘ (Rhinoceros Taxon Advisory Group) unterstützt werden. Das ‚Europäische Erhaltungszuchtprogramm‘ (EEP) für Breitmaulnashörner wird vom tschechischen Zoo Dvur Kralove koordiniert.

2.4.4.2 Hormonelle Behandlung

Die Erkennung und Behandlung ovarieller sowie uteriner Dysfunktionen beim Breitmaulnashorn ist ein wichtiger Beitrag zur Förderung der natürlichen und künstlichen Fortpflanzung und kann durch endokrinologische und sonographische Methoden überprüft und optimiert werden (HERMES et al. 2001b). Bisher wurde bei Breitmaulnashörnern erfolgreich ein Protokoll zur Zyklusinduktion entwickelt. Durch orale Gabe eines synthetischen Progesteronderivats (Chlormadinon-Acetat) und nachfolgender Injektion von hCG, Human Chorion Gonadotropin, wurden einzelne ovarielle Zyklen bei bislang azyklischen Individuen induziert (SCHWARZENBERGER 1995, 1998).

2.4.4.3 Assistierte Reproduktion

Assistierte Reproduktionstechniken als Alternative zu konventionellen Zuchtprogrammen gewinnen für den Schutz und die Erhaltung der genetischen Diversität von in zoologischen Institutionen gehaltenen Wildtierarten zunehmend an Bedeutung (z.B. BAINBRIDGE & JABBOUR 1998, LASLEY et al. 1994).

Beim Breitmaulnashorn wurde bislang vorrangig die Entwicklung einer effizienten künstlichen Inseminationsmethode verfolgt (HERMES et al. 2000, 2001c, HILDEBRANDT et al. 2000, 2002, SCHWARZENBERGER et al. 1999, 2001). In-vitro Verfahren (Maturation und Fertilisation) dagegen wurden bisher nur ansatzweise bei dieser Spezies versucht (GODFREY et al. 1990).

Künstliche Besamung beim Breitmaulnashorn

Die für eine Künstliche Besamung geeigneten Breitmaulnashornkühe können durch endokrinologische und sonographische Untersuchungen selektiert werden (HERMES et al. 2001b). Fäkale Steroidhormonanalysen sind praktikabel und sensitiv, um zyklische Aktivitätsmuster zu untersuchen (PATTON et al. 1999, SCHWARZENBERGER et al. 1998).

Der Besamungszeitpunkt wird durch Beobachtung von Brunstverhalten und -anzeichen, jedoch maßgeblich aufgrund von sonographischen ovariellen und uterinen Befunden bestimmt. Die Durchführung einer gynäkologischen Ultraschalluntersuchung erfolgt transrektal und ist bei Nashörnern grundsätzlich unter Narkose möglich. Bei konditionierten Nashornkühen kann die Untersuchung auch in einem Zwangsstand – ohne vorherige Sedierung der Tiere – durchgeführt werden (z.B. SCHAFFER et al. 1994, RADCLIFFE et al. 1997, 2001). Wegen der beträchtlichen Länge des weiblichen Genitaltrakts sind für eine vollständige Darstellung der inneren Geschlechtsorgane die Verwendung eines Ultraschalladapters für die Aufnahme des Schallkopfes sowie ein entsprechend verlängertes Kabel hilfreich (HILDEBRANDT et al. 1995, 2000, 2002).

Am Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Berlin, wurde eine atraumatische Technik der Künstlichen Besamung von afrikanischen Nashörnern entwickelt. Die Durchführung einer Besamung erfordert aufgrund der anatomischen Verhältnisse des Genitaltrakts von Nashornkühen ein spezielles Besamungsbesteck. Für eine intra-zervikale bzw. intra-uterine Insemination müssen zunächst das bei nulliparen Tieren meist intakte Hymen sowie das stark gewundene Lumen der Zervix passiert werden (HERMES et al. 2000, HILDEBRANDT et al. 2002; vgl. Abb. 3).

Die Besamung erfolgt am sedierten, meist jedoch am narkotisierten Tier. Es sind mehrere Personen erforderlich, um einerseits die Vitalfunktionen der Kuh zu überwachen und andererseits die Besamung durchzuführen (WALZER et al. 2001). Dabei werden zunächst durch eine transrektale Ultraschalluntersuchung die Topographie, Morphologie sowie die Dimensionen von Vagina, Zervix und Uterus bestimmt. Durch ein im Vestibulum platziertes flexibles Spekulum wird unter endoskopischer Kontrolle ein rigider Katheter in den Genitaltrakt eingeführt. Durch transrektale Sonographie wird die intra-zervikale bzw. intra-uterine Position des Katheters überprüft und ein flexibler Besamungskatheter in dessen Lumen nachgeschoben. Die Insemination erfolgt ebenfalls unter Ultraschallkontrolle (HERMES et al. 2000, HILDEBRANDT et al. 2002).

Zum Zeitpunkt Oktober 2002 wurden elf Künstliche Besamungen bei neun Nashornkühen (darunter ein Spitzmaulnashorn, *Diceros bicornis* sowie acht Breimaulnashörner, *Ceratotherium s. simum*) im Alter von 10 bis 29 Jahren durchgeführt. Die Mehrzahl der Kühe zeigte keine zyklische Aktivität und wurde daher mit Hormonen vorbehandelt. Bei den inseminierten Proben handelte es sich ausschließlich um durch Elektrostimulation am narkotisierten Nashornbullen gewonnene Ejakulate (s. 2.5.1). Es konnte jedoch noch kein Nachwuchs durch eine Künstliche Besamung gezeugt werden (HILDEBRANDT et al. 2002). In einem Fall ließen sonographische und endokrinologische Befunde auf eine Gravidität schließen, die jedoch nicht ausgetragen wurde (HERMES et al. 2001c).

Die Spermaparameter der verwendeten Elektroejakulate sind nicht explizit publiziert. Für eine zusammenfassende Darstellung der Parameter von 17 Elektroejakulaten, die vorwiegend zu Künstlichen Inseminationszwecken gewonnen wurden, s. 2.5.1.

Obwohl Besamungsversuche sich bisher auf afrikanische Nashornarten beschränkten, erscheint eine modellhafte Übertragung der Kenntnisse auch auf andere bedrohte Nashornarten möglich (HERMES et al. 2000, 2001c).

2.5 Methoden der Spermagewinnung und Qualität der Spermaproben bei verschiedenen Nashornarten

Zuverlässige Deseminationsmethoden sind wichtig für andrologische Untersuchungen sowie für die Weiterentwicklung und Anwendung assistierter Reproduktionstechniken. Nachfolgend werden Verfahren der Spermagewinnung bei verschiedenen Nashornarten beschrieben. Aktuell deutet nichts darauf hin, dass einzelne dieser Verfahren artspezifisch sind und sich damit deren Methoden und Erkenntnisse nicht auch auf das Breitmaulnashorn übertragen ließen. Um die zentralen Ergebnisse der einzelnen Methoden zu verstehen und eine abschließende übergreifende Betrachtung zu ermöglichen, werden vorausgehend die wichtigsten Spermparameter und ihre Erhebung kurz erläutert.

Spermaparameter

Zur umfassenden Beurteilung eines Ejakulats ist im Rahmen einer Routineuntersuchung die Erhebung makroskopischer, mikroskopischer und chemisch-physikalischer Parameter erforderlich. Bezüglich der zur erwartenden Fertilität einer Samenprobe bzw. des Samenspenders bestehen Wechselwirkungen zwischen der Qualität und der Quantität des Spermas. Neben konventionellen Analysemethoden steht eine Vielzahl weiterführender Untersuchungsverfahren zur Verfügung (z.B. WEITZE 2001a).

In der Mehrzahl der vorliegenden Arbeiten über Nashornsperma wurden partielle Untersuchungen der Proben mit herkömmlichen Analysemethoden durchgeführt. Als makroskopische Parameter wurden teilweise Volumen, Farbe, Konsistenz sowie Beimengungen durch eine grobsinnliche Prüfung bestimmt (z.B. HERMES et al. 2001a, SCHAFFER et al. 1990,1991).

Im Rahmen der mikroskopischen Analyse wurden vorrangig die Spermienkonzentration, aber auch die Spermienmotilität und –vitalität untersucht (z.B. O'BRIEN & ROTH 2000, WILLIAMS et al. 1995). Über Ergebnisse der Spermienmorphologie, als wesentlichen Qualitätsparameter eines Ejakulats (vgl. z.B. STOLLA 1984), wird nur vereinzelt und ohne genaue

Angaben der verwendeten Klassifizierungsschemata berichtet (z.B. SCHAFFER et al. 1991). Auch das Auftreten eventueller Agglutinationen sowie möglicher Fremdzellen wurde selten untersucht. Als chemisch-physikalischer Parameter wurde in zwei Untersuchungen der pH-Wert mit Indikatorpapier bestimmt (O'BRIEN & ROTH 2000, SCHAFFER et al. 1991).

2.5.1 ELEKTROSTIMULATION

Bei der Elektrostimulation werden die akzessorischen Geschlechtsdrüsen transrektal mit elektrischen Impulsen stimuliert. Eine gleichzeitige intensive Massage des Becken- sowie Penisstücks der Urethra begünstigt die Ejakulatgewinnung. Als Stimulationssonden werden beim Nashorn speziell entwickelte zylinderförmige Rektalsonden eingesetzt (z.B. HILDEBRANDT et al. 2000). Die erforderliche elektrische Spannung und Stärke wird durch einen Generator erzeugt. Dabei ist eine maximale Spannung von 15 Volt bei einer Stromstärke von 800 Milli-Ampere ausreichend (HILDEBRANDT et al. 2002).

Da die Elektroejakulation am liegenden, narkotisierten Nashornbullen durchgeführt wird, besteht neben dem technischen auch ein großer personeller Aufwand. Für die Gewinnung von Elektroejakulaten sind mindestens drei Personen erforderlich, um neben der Durchführung der Stimulation, die Proben fraktioniert auffangen und weiter aufbereiten zu können. Um das bestehende Narkoserisiko zu minimieren, sind für eine optimale Narkoseüberwachung mindestens zwei weitere Personen notwendig (WALZER et al. 2001). In der Regel ist eine Narkose von weniger als einer Stunde für die Desemination ausreichend, da die eigentliche Elektrostimulation durchschnittlich 20 Minuten dauert (HILDEBRANDT et al. 2002).

Eine transrektale Ultraschalluntersuchung mit Darstellung von Topographie und Morphologie der Geschlechtsdrüsen vor sowie während der Elektrostimulation erleichtert die exakte Positionierung der Sonde und vermindert das Risiko einer ungewollten Stimulation der Harnblase. Zudem kann eine sonographische Beurteilung des Funktionszustands der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, aber auch der Hoden, Hinweise auf das zu erwartende

Ejakulatvolumen geben und einer Überstimulation sub- bzw. infertiler Bullen vorbeugen (HERMES et al. 2001a, HILDEBRANDT et al. 2000).

Die rektale Elektrostimulation gilt als zuverlässige Gewinnungsmethode vollständiger Ejakulate (z.B. HERMES et al. 2001a, HILDEBRANDT et al. 2002; Tab. 3), ist jedoch aufgrund der erforderlichen Anästhesie nicht für regelmäßige Deseminationen geeignet (SCHAFFER & BEEHLER 1988, WALZER et al. 2000). Sie wurde bisher erfolgreich beim Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*; GÖLTENBOTH et al. 2000, HERMES et al. 2001a, c, SCHAFFER et al. 2001b), Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis*; GÖLTENBOTH et al. 2000, HILDEBRANDT et al. 2002, SCHAFFER et al. 1998a, 2001b) sowie beim Indischen Panzernashorn (*Rhinoceros unicornis*; SCHAFFER et al. 2001b) durchgeführt.

Tab. 3: Parameter mit rektaler Elektrostimulation von acht Breitmaulnashörnern (*Ceratotherium s. simum*) und mit peniler Elektrostimulation von einem Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis*) gewonnener Ejakulate

Elektroejakulatparameter	Breitmaulnashorn ^a	Spitzmaulnashorn ^b
	(n=17)	(n=2)
Anzahl der Fraktionen (n)	3-12	-
Gesamtvolumen (ml)	124,0 ± 21,1 ^c	18,8 u. 44,6
Spermienkonzentration pro ml (x 10 ⁶)	48,11 ± 12,6 ^c	-
Spermiengesamtzahl pro Ejakulat (x 10 ⁹)	2,37 ± 0,8 ^c	0,14 u. 0,44
Motilität einzelner Fraktionen (%)	10-95	60 u. 40

^a Zusammenfassung der Daten aus HERMES et al. (2001a) bzw. ^b PLATZ et al. (1979)

^c $\bar{x} \pm \text{SEM}$

Durch transrektale Elektrostimulation können in Abhängigkeit von dem Fertilitätsstatus des Nashornbullen voluminöse (meist 20 bis 50 ml), fraktionierte Ejakulate (in der Regel vier bis acht Fraktionen) guter Qualität gewonnen werden (HERMES 2002, persönliche Kommunikation). Dabei war die Spermienkonzentration in einer Studie von HERMES et al. (2001a) mit

acht Breitmaulnashornbullen bei Tieren, die älter als 30 Jahre waren, signifikant höher, als bei jüngeren Bullen.

Bei falscher Positionierung der Sonde kann es durch versehentliche Stimulation der Harnblase oder durch eine Überstimulation der Geschlechtsdrüsen gegen Ende der Manipulation zu Urinkontaminationen und damit verbundener Qualitätsminderung einzelner Fraktionen kommen (HERMES et al. 2001a).

Abweichend von der Methode der transrektalen Stimulation, lösten PLATZ et al. (1979) durch Anlegen manschettenartiger Aluminiumelektroden an den vor gelagerten Penis eines zu euthanasierenden Spitzmaulnashornbullen (*Diceros bicornis*) erfolgreich Ejakulationen aus. Volumen und Konzentration der mit dieser Methode gewonnenen Ejakulate waren jedoch gegenüber den mit rektaler Elektrostimulation genommenen Proben vergleichsweise niedriger (Tab. 3).

Erfolglos dagegen verlief der Versuch, an einem nicht narkotisierten Indischen Panzernashorn (*Rhinoceros unicornis*) mit transrektaler Elektrostimulation eine Erektion und Ejakulation auszulösen. In dieser von SCHAFFER et al. (1990) durchgeführten Untersuchung wurden die akzessorischen Geschlechtsdrüsen mit einer aufblasbaren Rektalsonde mit elektrischen Impulsen stimuliert. Die Sonde, die sich flexibel der Enddarmschleimhaut des Bullen anpassen sollte, war über an der Stalldecke verlaufende Kabel mit einem Generator verbunden, so dass sich der Bulle während des Versuchs frei bewegen konnte.

2.5.2 MANUELLE STIMULATION

Bei der manuellen Stimulation, die beispielsweise beim Rüden als Routinemaßnahme im Rahmen einer andrologischen Untersuchung etabliert ist, wird eine Ejakulation durch Massage und Kompression des Penis ausgelöst (vgl. WEITZE 2001b).

Beim Nashorn wird diese Methode am stehenden, nicht narkotisierten Tier durchgeführt und erfordert einen engen Kontakt mit dem Bullen. Speziell konstruierte Zwangsstände bieten dabei die notwendige Sicherheit für den Untersucher (z.B. SCHAFFER et al. 1998b, WALZER

et al. 2000). Bei den meisten Bullen ist eine Gewöhnung durch regelmäßiges Training über mehrere Monate erforderlich, bis sie sich ruhig im Zwangsstand verhalten und durch die Manipulationen am Genitaltrakt Erektionen und Ejakulationen ausgelöst werden können (z.B. EYRES et al. 2001, SCHAFFER & BEEHLER 1988). Das Instrument der operanten Konditionierung mit positiver Bestärkung, beispielsweise mit Futter, Streicheln oder dem Klang der Stimme, eignet sich als unterstützende Maßnahme (vgl. MICHEL & ILLIG 1995, NICHOLSON 1996, SHAFFSTALL 2000, WATKINS & GREGORY 1997 etc.).

Für die Durchführung einer manuellen Desemination sind mindestens zwei Personen erforderlich. Befindet sich der Nashornbulle in der gewünschten Position, wird zunächst durch Streicheln der Innenseiten der Oberschenkel, des Bauchs und des Präputiums eine Protrusion des Penis bewirkt. Manche Bullen können so erfolgreich konditioniert werden, dass sie den Penis bereits vor Beginn der Manipulation ausschachten (EYRES et al. 2001). Eine Massage des distalen Abschnitts des Penis, gegebenenfalls unter Verwendung von Gleitcreme, kann zu einer maximalen Erektion mit deutlicher Schwellung der flügelähnlichen Fortsätze führen. Durch weitere Stimulation kann eine Ejakulation ausgelöst werden, nach welcher der Penis innerhalb kurzer Zeit wieder vollständig erschlafft. Die Gesamtdauer für das Induzieren einer Erektion mit nachfolgender Ejakulation wird mit 10 bis 20 Minuten angegeben (SCHAFFER et al. 1990).

Die Erfolgsquote der manuellen Stimulationstechnik ist bei Nashornbullen sehr gering. In einer Studie von SCHAFFER et al. (2001b), in die 19 Bullen vier verschiedener Nashornarten einbezogen wurden, konnten lediglich bei zwei Individuen durch Stimulation des Penis wiederholt Spermien enthaltende Proben gewonnen werden, über deren Parameter keine Angaben vorliegen. In anderen Untersuchungen wurde zwar mit manueller Stimulation bei den meisten Nashornbullen eine Erektion induziert, dies führte jedoch bei einigen Individuen selbst nach langen Versuchsreihen entweder nie zu einer Abgabe seminaler Flüssigkeiten (HERMES et al. 2001a, O'BRIEN & ROTH 2000, SCHAFFER 2000) oder lediglich zu einer Gewinnung von Proben, die ausschließlich tote Spermien bei hohem Fremdzellgehalt (YOUNG 1967) bzw. vereinzelte sowie morphologisch abweichende Spermien (SCHAFFER 2000) enthielten.

Durch manuelle Stimulation des äußeren Genitales wurden jedoch bei einem Indischen Panzernashorn (*Rhinoceros unicornis*; SCHAFFER et al. 1990) sowie einem Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis*; SCHAFFER et al. 1991) wiederholt seminale Flüssigkeiten gewonnen (Tab. 4). Auffallend ist die große Spannweite aller untersuchten Parameter. Gegenüber den durch Elektrostimulation gewonnenen Ejakulaten bestehen erhebliche Unterschiede, insbesondere hinsichtlich des Volumens sowie der Spermienkonzentration. So weisen die mit manueller Stimulation gewonnenen Proben bei vergleichsweise kleinem Volumen teilweise deutlich höhere Spermienkonzentrationen auf (vgl. Tab. 3 und Tab. 4).

Tab. 4: Parameter mit manueller Stimulation gewonnener Spermaproben von jeweils einem Breitmaulnashorn (*Ceratotherium s. simum*), Indischen Panzernashorn (*Rhinoceros unicornis*) und Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis*)

Spermaparameter	Breitmaulnashorn ^a		Indisches Panzernashorn ^b		Spitzmaulnashorn ^c
	(n=20)	(n=2)	(n=12)	(n=6) ^d	(n=3)
Volumen (ml)	1,0-2,0	4,0	0,2-50,0	2,0-20,0	0,2-164,5
Farbe	transparent	weiß	transparent	-	weiß
Konsistenz	inhomogen ^e	homogen	viskös	-	viskös
pH-Wert	-	-	-	-	7,0-8,5
Spermienkonzentration pro ml (x 10 ⁶)	217,3 ^f	-	bis 208	0,1-352	0-600
Spermiengesamtzahl pro Ejakulat (x 10 ⁹)	0,262 ^f	-	-	-	-
Motilität (%)	70-80	70-80	0-80	30-80	0-90
Morphologie, Anteil normaler Spermien (%)	-	-	-	-	10-60

^a Zusammenfassung der Daten aus HERMES et al. (2001a) bzw. ^{b, c} SCHAFFER et al. (1990, 1991)

^d Modifikation mit rektaler Stimulation

^e Proben mit weißen, wurmförmigen Filamenten (Spermienaggregate)

^f \bar{x}

Bei der morphologischen Analyse wurden Zytoplasmotropfen als pathologische Formen bewertet und bildeten neben Mittelstück- und Schwanzveränderungen sowie losen Spermienköpfen den Hauptteil der Anomalien (SCHAFFER et al. 1991).

Über eine erfolgreiche Spermagewinnung mit manueller Stimulation beim Breitmaulnashorn (*Ceratotherium s. simum*) berichten HERMES et al. (2001a). Dabei wurden bei einem von zwei in die Studie einbezogenen Breitmaulnashornbullen vergleichsweise kleine Volumina (meist 1 bis 2 ml, maximal 4 ml) gewonnen (Tab. 4). Der relative Anteil erfolgreicher Versuche lag bei diesem Nashornbullen unter 25%. Die Proben wurden makroskopisch als klar und inhomogen (n=20) bzw. weiß und homogen (n=2) beschrieben. Auffallend waren weiße wurmähnliche Filamente in den klaren seminalen Flüssigkeiten, die sich bei einer mikroskopischen Untersuchung als Spermienaggregate mit verminderter Motilität (10 bis 30%) herausstellten. Durch Zugabe von Verdünnermedium konnten die Aggregate aufgelöst und die Motilität um 40 bis 50% gesteigert werden. Die Autoren vermuten, dass es sich um im *Vas deferens* gespeicherte und passiv emittierte Proben handelte. Die weißen, homogenen Ejakulate dagegen wurden im Zusammenhang mit einem der Stimulation vorangehenden Paarungsverhalten und sexueller Erregung gewonnen und hatten ein etwas größeres Volumen (4 ml). Diese Proben enthielten keine Spermienaggregate (Tab. 4).

Manche Autoren halten eine gut ausgeprägte Libido bzw. die Anwesenheit einer östrischen Kuh für eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Spermagewinnung (z.B. YOUNG 1967). Versuche, durch zusätzliche olfaktorische Reize mit Urin und Kot östrischer Kühe eine Ejakulationsauslösung zu erleichtern, verliefen jedoch erfolglos (EYRES et al. 2001).

2.5.2.1 Pharmakologisch unterstützte Spermagewinnung

Der Ablauf der Ejakulation wird neuronal über das vegetative Nervensystem gesteuert. Emission und Ejektion entstehen durch Kontraktionen der glatten Muskulatur des Samenleiters, der Harnröhre sowie der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, die durch Impulse der efferenten

Bahnen des sympathischen Ejakulationszentrums vermittelt werden (BADER 2001). Die Modulation erfolgt vorwiegend durch α -adrenerge Rezeptoren (EPPEL & BERZIN 1984). Aufgrund dieser Zusammenhänge kann der Ejakulationsablauf pharmakologisch mit α -adrenergen Substanzen beeinflusst werden, was zunächst in der Humanmedizin zur Behandlung von Ejakulationsstörungen des Mannes genutzt wurde (z.B. BROOKS et al. 1980, EPPEL & BERZIN 1984, KELLY & NEEDLE 1979).

Auch in der Tiermedizin wurde wiederholt über den Einsatz α -adrenerger Medikamente zur Ejakulationsinduktion bei Hengsten berichtet (CARD et al. 1997, McDONNELL 1999, McDONNELL et al. 1987, McDONNELL & LOVE 1991, McDONNELL & ODIAN 1994, McDONNELL & TURNER 1994, TURNER et al. 1995).

Beim Nashorn stellt die pharmakologische Unterstützung eine Modifikation der manuellen Stimulation dar, bei der medikamentös die Auslösung des Ejakulationsreflexes erleichtert wird. Dazu wird eine Kombination aus einem α_2 -Agonisten (z.B. Detomidinhydrochlorid) und einem partiellen Opioid-Agonisten (z.B. Butorphanol) intramuskulär injiziert. Die Medikamentenapplikation kann erleichtert werden, indem zuvor Lokalanästhetika an der Injektionsstelle aufgetragen werden (vgl. WALZER 1998). Der Wirkungseintritt der α -adrenergen Medikation ist häufig durch eine Protrusion des Penis erkennbar. Im Anschluss wird der Penis in der oben beschriebenen Weise manuell stimuliert, um eine Erektion und nachfolgende Ejakulation auszulösen.

In einer Untersuchung von WALZER et al. (2000) wurde bei einer Applikation von 12 bis 15 mg Detomidinhydrochlorid und 8 mg Butorphanol pro Tier bei einem Breitmaulnashornbullen (*Ceratotherium s. simum*) wiederholt Sperma gewonnen. Nach Angaben der Autoren erleichterte dabei die Medikation nicht nur die Protrusion des Penis sowie die Auslösung des Ejakulationsreflexes, sondern auch die Manipulation des Tieres durch den leicht sedierenden Effekt. Angaben über Quantität und Qualität der im Rahmen dieser Studie gewonnenen Proben liegen nicht vor.

Das Imidazolinderivat Detomidinhydrochlorid gehört zu der Gruppe der sedativ-hypnotischen Analgetika. Die adrenerge Wirkung wird vorrangig durch α_2 -Rezeptoren vermittelt, dosisabhängig können auch α_1 -Rezeptoren stimuliert werden (FREY et al. 1996). Detomidinhydrochlorid wird beim Nashorn in der Anästhesie eingesetzt. Es wird sehr gut vertragen und kann antagonisiert werden (ATKINSON et al. 2002, KOCK et al. 1995, WALZER et al. 2001).

Butorphanol ist ein partieller Opioidagonist. Das synthetisch hergestellte Analgetikum kann mit α -adrenergen Substanzen kombiniert werden und dabei deren Wirkung um ein Vielfaches verstärken (FREY et al. 1996). Es wird beim Nashorn ebenfalls für Narkosezwecke eingesetzt und in diesem Zusammenhang als sicher beurteilt (RADCLIFFE et al. 2000a, b, WALZER et al. 2001).

2.5.2.2 Rektale Stimulation

Als eine weitere Abwandlung der manuellen Stimulation beim Nashornbullen kann eine vorangehende rektale Massage der akzessorischen Geschlechtsdrüsen durchgeführt werden. Bei dieser Methode werden am stehenden Tier das Beckenstück der Harnröhre sowie die akzessorischen Geschlechtsdrüsen manuell massiert, um eine Protrusion und Erektion des Penis auszulösen. Dadurch konnte bei einem Nashornbullen die Spermaqualität gegenüber den durch ausschließliche manuelle Stimulation des Penis gewonnenen Proben verbessert werden (SCHAFFER et al. 1990; vgl. Tab. 4).

Im Gegensatz zu Elefantenbullen, bei denen die alleinige rektale Stimulation erfolgreich zu einer Gewinnung qualitativ hochwertiger Ejakulate führt (SCHMITT & HILDEBRANDT 1998), bewirkt diese Technik beim Nashorn zwar ein Ausschachten des Penis, jedoch keine Ejakulation (SCHAFFER et al. 1990). HILDEBRANDT (2001, persönliche Kommunikation) führt die ungleiche Reaktion der beiden Tierarten auf den unterschiedlichen anatomischen Bau der akzessorischen Geschlechtsdrüsen zurück. Während die *Ampullae ductus deferentis* beim Elefantenbullen sehr prominent ausgebildet sind, ein großes Speichervermögen besitzen

und leicht ausmassiert werden können, sind sie beim Nashornbullen makroskopisch kaum darstellbar (vgl. Abb. 4).

2.5.2.3 ‚Hot Towel Compression‘

Die ‚Hot Towel Compression‘, bei der am stehenden Tier die Penisbasis und –spitze mit in heißem Wasser gewärmten Tüchern komprimiert werden, stellt eine Abwandlung der manuellen Stimulation dar. Diese Methode wurde an Hengsten entwickelt, bei denen die manuelle Reizung des Penis alleine nicht zu einer Ejakulationsauslösung führte (CRUMP & CRUMP 1989, 1994, McDONNEL & LOVE 1990). Der Unterschied zu der manuellen Stimulationstechnik besteht darin, dass zusätzlich zu den Druckreizen superoptimale Temperaturen auf den Penis einwirken. Dazu werden Tücher in 45 bis 55 °C warmem Wasser getränkt, ausgedrückt und um die Glans und die Basis des Penis gelegt. Mit jedem einsetzenden Beckenschub, werden diese Bereiche zusätzlich mit den Händen komprimiert, um einerseits die kraniale Begrenzung der Vagina und andererseits die Kontraktionen der Vulva zu imitieren.

Ebenso wie bei den zuvor beschriebenen Manipulationen am nicht narkotisierten Tier, setzt auch dieses Vorgehen beim Nashorn die Kooperation des Bullen voraus. In einer Studie von HERMES et al. (2001a) an zwei Breitmaulnashornbullen (*Ceratotherium s. simum*) konnten mit dieser Technik während eines Versuchszeitraums von einem Jahr wiederholt Erektionen und pulsatile Kontraktionen, jedoch keine Ejakulationen ausgelöst werden.

2.5.3 KÜNSTLICHE SCHEIDE

Bei der Spermagewinnung mit einer Künstlichen Scheide lösen superoptimale Temperatur- und Druckreize eine Ejakulation aus. Während in der Haustierandrologie diese Deseminationsmethode üblicherweise mit einem Sprungpartner (Tier oder Phantom) durchgeführt wird (z.B. BADER 2001), ist beispielsweise beim Hengst auch eine Spermagewinnung am stehenden Tier möglich (vgl. FORNEY & McDONNEL 1999, SCHUMACHER & RIDDELL 1986).

Beim Nashorn sind beide Vorgehensweisen beschrieben und setzen eine entsprechende Gewöhnungsphase sowie die Kooperation des Bullen voraus. Neben handelsüblichen Rinder- oder Hengstscheiden (EYRES et al. 2001, YOUNG 1967), wurden auch spezielle, an die Größenverhältnisse des Nashornpenis angepasste Modelle entwickelt (z.B. GÖLTENBOTH 1986, SCHAFFER et al. 1990, YOUNG 1967). Rigide Hartschalenkonstruktionen mit Innenschlauch sind relativ schwer und können zu mechanischen Schleimhautirritationen der lateralen Schwellkissen des Penis führen. Alternativ können leichtere und flexiblere doppelwandige Latexschläuche verwendet werden (SCHAFFER et al. 1990, YOUNG 1967).

Studien, bei denen ein Aufsprung des Bullen auf eine östrische Nashornkuh erfolgte, wurden mit einem Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis*; YOUNG 1967) sowie einem Indischen Panzernashorn (*Rhinoceros unicornis*; GÖLTENBOTH 1986) durchgeführt. Dabei wurde der erigierte Penis nach dem Aufsprung in die Künstliche Scheide abgelenkt. Obwohl beide Bullen die Scheide akzeptierten, ejakulierten sie nicht.

Versuche am stehenden Bullen werden in Abwesenheit einer Nashornkuh durchgeführt. Um eine Künstliche Scheide einsetzen zu können, ist deshalb zunächst eine manuelle Stimulation des Penis zur Erektionsinduktion erforderlich (SCHAFFER et al. 1990, YOUNG 1967). Auch diese Versuche blieben bei mehreren Nashornbullen wirkungslos (EYRES et al. 2001, HERMES et al. 2001a, YOUNG 1967). Lediglich Proben, die einzelne oder gar keine Spermien enthielten, konnten in Studien von SCHAFFER et al. (1990, 1991) gewonnen werden.

2.5.4 EPIDIDYMALE SPERMIENTNAHME

Die Entnahme von Spermien aus dem Nebenhoden stellt eine weitere Möglichkeit der Spermagewinnung dar. Der Nebenhodenschwanz wird *post mortem* eröffnet und die Spermien enthaltenden Anteile vorsichtig aspiriert. Ein behutsames Vorgehen ist erforderlich, um die Proben möglichst wenig mit anderen organischen Flüssigkeiten (z.B. Blut) zu kontaminieren.

Um die Spermien lebensfähig zu erhalten, werden sie möglichst unmittelbar nach ihrer Entnahme in Nährmedien suspendiert.

Mit dieser Methode wurden epididymale Spermien beim Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*; SCHAFFER et al. 1991, WILLIAMS et al. 1995), Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis*; O'BRIEN & ROTH 2000, SCHAFFER et al. 1991) und Indischen Panzernashorn (*Rhinoceros unicornis*; SCHAFFER et al. 1991) entnommen. Die bei zwei Nashornarten ermittelten Parameter sind in Tab. 5 dargestellt. Der in der Studie von O'BRIEN & ROTH (2000) bestimmte Anomalienanteil von 90% bedarf dabei einer differenzierten Betrachtung, da morphologisch normale Spermien mit zytoplasmatischen Tropfen (82%) von den Autoren als anomal eingestuft wurden. Als weiterer Parameter wurde in der Arbeit von SCHAFFER et al. (1991) die Spermienkonzentration bestimmt, die zwischen $1,3 \times 10^7/\text{ml}$ und $6,5 \times 10^{10}/\text{ml}$ variierte.

Tab. 5: Parameter *post mortem* gewonnener epididymaler Samenproben eines Breitmaulnashorns (*Ceratotherium simum*) und eines Spitzmaulnashorns (*Diceros bicornis*)

Spermaparameter	Breitmaulnashorn ^{a,b}	Spitzmaulnashorn ^{c,d}
	(n=1)	(n=1)
Motilität (%)	90	60
Vitalität (%)	95	93
Morphologie, Anteil normaler Spermien (%)	-	10
Intaktes Akrosom (%)	100	95

^a Zusammenfassung der Daten aus WILLIAMS et al. (1995) u. ^c O'BRIEN & ROTH (2000)

^b Epididymale Spermientnahme 3 Stunden bzw. ^d 30 Stunden *post mortem*

2.5.5 POSTCOITALE SPERMAGEWINNUNG

Bei der postcoitalen Spermagewinnung werden die unmittelbar nach erfolgter Kopulation aus der Scheide heraus tropfenden Flüssigkeiten gesammelt. Auf diese Weise wurden bei einem Sumatranashorn (*Dicerorhinus sumatrensis*) wiederholt Spermien enthaltende Proben bis zu

drei Stunden *post copulationem* aufgefangen und untersucht (O'BRIEN & ROTH 2000). Während das Volumen nur geringfügig variierte, war die Qualität der Proben sehr unterschiedlich und wurde von den Autoren als schlecht bzw. mäßig eingestuft (vgl. Tab. 6). Zwei Proben wiesen mit einem Anteil von mehr als 30% Leukozyten einen hohen Fremdzellgehalt auf. Bei der morphologischen Analyse wurden Zytoplasmotropfen als anomal bewertet und machten $14,2 \pm 5,4\%$ ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) der Anomalien aus. Abnorme Köpfe bildeten mit $33,2 \pm 2,1\%$ ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) den größten Anteil anomaler Spermien.

Tab. 6: Parameter postcoital aufgefangener Spermaproben bei einem Sumatranashorn (*Dicerorhinus sumatrensis*; Daten aus O'BRIEN & ROTH 2000)

Spermaparameter	Ergebnisse ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) (n=5)
Volumen (ml)	104,0 \pm 9,1
pH-Wert	7,9 \pm 0,1
Spermienkonzentration pro ml ($\times 10^6$)	24,6 \pm 8,0
Spermiengesamtzahl pro Ejakulat ($\times 10^9$)	2,5 \pm 0,8
Motilität (%)	60,0 \pm 3,2
Vitalität (%)	72,0 \pm 3,2
Morphologie, Anteil normaler Spermien (%)	40,2 \pm 6,3

2.5.6 ZUSAMMENFASSUNG

Eine zuverlässige Gewinnung qualitativ guter Ejakulate ist beim Nashorn bislang ausschließlich mit rektaler Elektrostimulation möglich (HERMES et al. 2001a). Da diese Methode am narkotisierten Bullen erfolgt und einen hohen technischen und personellen Aufwand erfordert (s. 2.5.1), werden Elektrostimulationen nur bedingt aus rein wissenschaftlichem Interesse, sondern vorrangig zur Spermagewinnung für Künstliche Inseminationen durchgeführt.

Die einzige alternative Methode, mit der wiederholt einzelne Samenproben am nicht narkotisierten Bullen gewonnen wurden, ist die manuelle Stimulation (vgl. 2.5.2). Diese Technik ist jedoch nur in wenigen zoologischen Institutionen durchführbar (Zwangsstand oder

vergleichbare Vorrichtung, Umgänglichkeit und Eingewöhnung des Bullen erforderlich etc.) und nur bei wenigen Individuen erfolgreich (vgl. SCHAFFER et al. 2001b). Zudem sind wiederholte Versuche erforderlich, um eine Probe gewinnen zu können (HERMES et al. 2001a).

Die angeführten Faktoren sind für eine profunde Ejakulatanalyse beim Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*) limitierend. Vergleicht man die mit den beiden genannten Techniken erzielten Spermaparameter, so unterscheiden sich die Ejakulate deutlich in Volumen und Spermienkonzentration (Tab. 7). Während das Volumen manuell gewonnener Proben beim Breitmaulnashorn nur wenige Milliliter beträgt, umfassen Elektroejakulate in der Regel 20 bis 50 ml, in Einzelfällen auch mehr. Die mittlere Spermienkonzentration ist bei den manuell gewonnenen Proben zwar deutlich höher, Elektroejakulate dagegen weisen jedoch eine größere Spermiengesamtzahl auf. Unabhängig von der Deseminationstechnik wurden Spermaproben mit hoher Motilität gewonnen. Daten bezüglich der Spermienmorphologie liegen für das Breitmaulnashorn nicht vor

Als viel versprechender Ansatz für eine alternative Methode, die eine regelmäßige Spermagewinnung und somit weiterführende Ejakulatanalysen ermöglichen könnte, erscheint die erfolgreich bei einem Südlichen Breitmaulnashorn pharmakologisch unterstützte manuelle Stimulation, obgleich Angaben zu den im Rahmen der Studie von WALZER et al. (2000) gewonnenen Ejakulaten fehlen.

Tab. 7: Parameter durch zwei verschiedene Methoden gewonnener Spermaproben beim Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*; Daten aus HERMES et al. 2001a)

Spermaparameter	Elektrostimulation	Manuelle Stimulation	
	(n=17)	(n=20)	(n=2)
Volumen (ml)	124,0 ± 21,1 ^a	1-2	4
Spermienkonzentration pro ml (x 10 ⁶)	48,11 ± 12,6 ^a	217,3 ^b	-
Spermiengesamtzahl pro Ejakulat (x 10 ⁹)	2,37 ± 0,8 ^a	0,262 ^b	-
Motilität (%)	10-95	70-80	70-80

^a $\bar{x} \pm \text{SEM}$

^b \bar{x}

2.6 Spermienmorphometrie

Morphometrische Daten von Nashornspermien beschränken sich bislang auf die Arten Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis*) und Sumatranashorn (*Dicerorhinus sumatrensis*) und wurden mit konventionellen Methoden an einem geringen Probenumfang erhoben. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Spermaproben von Breitmaulnashörnern (*Ceratotherium simum*) morphometrisch untersucht. Dabei wurde ein computergestütztes Analyseverfahren angewendet.

Im Folgenden wird zunächst die Methode der Spermienmorphometrie vorgestellt. In Abschnitt 2.6.1 sind die bislang beim Nashorn vorliegenden Kenntnisse über die Spermienkopfmorphometrie zusammengefasst. Der darauf folgende Abschnitt 2.6.2 befasst sich mit der Methode der computergestützten Spermienmorphometrie - unter besonderer Berücksichtigung des in der vorliegenden Arbeit zur Analyse von Breitmaulnashornspermien verwendeten Systems.

Die Spermienmorphometrie ist eine weiterführende morphologische Analyse, bei der die Dimensionen von Spermatozoen erfasst und beurteilt werden. Die metrischen Daten können sowohl mit herkömmlichen Methoden der direkten Mikrometrie, beispielsweise durch Projektionsmikroskopie nach SAVAGE et al. (1927) oder durch Okularmikrometrie (z.B. ZELNY & FAUST 1915), als auch mit computergestützten Verfahren erhoben werden. Anhand der dabei gewonnenen Daten erscheint eine objektive Beurteilung der Spermienmorphologie möglich.

Zwischen dem Anteil anomaler Spermien in einem Ejakulat und den Konzeptionsergebnissen konnte in verschiedenen Studien ein deutlicher Zusammenhang festgestellt werden. Dabei sind vorrangig Veränderungen des Spermienkopfes hinsichtlich der zu erwartenden Fertilität von Bedeutung (z.B. JASKO et al. 1990, LEIDL et al. 1971, STOLLA et al. 1978, STOLLA 1984).

2.6.1 SPERMIENKOPFMORPHOMETRIE BEIM NASHORN

Metrische Dimensionen von Spermienköpfen beim Nashorn wurden bisher ausschließlich durch die konventionelle Methode der direkten Mikrometrie mit einem skalierten Objektträger erfasst. In einer Untersuchung von PLATZ et al. (1979) wurden in diesem Zusammenhang zehn Spermatozoen eines von einem Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis*) gewonnenen Elektroejakulats vermessen. Die von O'BRIEN & ROTH (2000) ermittelten Daten basieren auf der Analyse von jeweils zehn Spermatozoen von drei *postcoital* aufgefangenen Ejakulaten eines Sumatranashorns (*Dicerorhinus sumatrensis*) bzw. 30 Stunden *post mortem* gewonnener epididymaler Spermien eines Spitzmaulnashorns (*Diceros bicornis*). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen sind in Tab. 8 aufgelistet. Angaben zu metrischen Parametern von Spermienköpfen des Breitmaulnashorns (*Ceratotherium simum*) liegen dagegen nicht vor.

Tab. 8: Morphometrische Daten der Spermienkopflänge und –breite beim Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis*) und beim Sumatranashorn (*Dicerorhinus sumatrensis*)

Nashornart	Länge (µm)	Breite (µm)	Literaturquelle
Spitzmaulnashorn	6,0 ^a	3,5 ^a	PLATZ et al. 1979
Spitzmaulnashorn	6,2 ± 0,06 ^b	3,0 ± 0,02 ^b	O'BRIEN & ROTH 2000
Sumatranashorn	5,2 ± 0,07 ^b	3,0 ± 0,02 ^b	O'BRIEN & ROTH 2000

^a \bar{x} (n= 10 Spermien)

^b $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (Spitzmaulnashorn: n= 10 Spermien; Sumatranashorn: n= 30 Spermien)

Innerhalb der Haussäugetiere entsprechen die ermittelten Spermienkopfdimensionen am ehesten den Größenverhältnissen beim Hengst (vgl. z.B. CASEY et al. 1997, DAVIS et al. 1993, GRAVANCE et al. 1996, UHLENBROCK 1999).

2.6.2 COMPUTERGESTÜTZTE MORPHOMETRIE

Zur Vermessung von Spermiendimensionen werden seit etwa zwanzig Jahren computer-gestützte Analyseverfahren angewandt. Bei dieser Methode wird mit einer Videokamera ein Mikroskopbild eines Spermaausstrichpräparats aufgenommen, dabei nochmals vergrößert und digitalisiert. Am Computer wird software-gestützt eine metrische Analyse des umgewandelten Videobilds durchgeführt.

Die meisten derartigen Programme ermöglichen ausschließlich die Vermessung von Spermienköpfen. Als Parameter werden beispielsweise Fläche, Umfang, Länge und Breite des Spermienkopfes erfasst. Bestimmte Systeme, z.B. der Morphology Analyzer V 1.5 der Mika Medical GmbH oder das Hobson Morphology Paket (Hobson Tracking Systems Ltd., Sheffield), sehen zudem die Vermessung und Bewertung des Spermatozoenschwanzes vor.

2.6.2.1 Analysegeräte

Die Morphometrie-Systeme unterscheiden sich in Art und Zusammenstellung ihrer Komponenten und damit auch in ihrer Funktionsweise. Beispielsweise stellten sich BALL & MOHAMMED (1995) sowie DAVIS et al. (1993) zur morphometrischen Analyse von Hengstspermien eigene Anlagen aus handelsüblichen Komponenten zusammen. Kommerziell erhältliche halb- und vollautomatische Komplettsysteme dagegen integrieren alle für die Untersuchung erforderlichen Einheiten.

Bei halbautomatischen Systemen, wie beispielshalber dem Morphology Analyzer V 1.5 (Mika Medical GmbH, Ismaning, Deutschland) oder dem Cellsoft Morphologizer II (Cryo Resources Ltd., New York, USA) fokussiert der Untersucher die zu analysierenden Spermien am Mikroskop, zeichnet einzelne Bilder mit der Kamera auf und überträgt diese dann an den Personalcomputer zur weiteren Auswertung markierter Samenzellen. Vollautomatische Systeme, wie z.B. der Hamilton Thorne Morphology Analyzer IVOS (Hamilton Thorne Research, Beverly, USA), das CellForm-Human PAP (Motion Analysis, Santa Rosa, CA, USA) oder das Lagomorph (University of Davis, CA, USA) dagegen identifizieren und kategorisieren

nach Ermittlung definierter metrischer Parameter automatisch eine vorgegebene Anzahl von Spermatozoen. Der Untersucher kann dabei trotzdem die Bildauswahl und die morphologische Beurteilung überprüfen und gegebenenfalls korrigieren.

Hamilton Thorne Morphology Analyzer IVOS (HTM IVOS)

Das für die morphometrische Untersuchung von Humanejakulaten entwickelte HTM IVOS (integrated visual optical system) wurde bisher in der veterinärmedizinischen Andrologie für die Analyse von Hengstpermien (CASEY et al. 1997, GRAVANCE et al. 1996, UHLENBROCK 1999) und Bullenspermien (HAKE 2001, RAßHOFER 1999, WU, unveröffentlichte Daten) eingesetzt. Das Gerät kombiniert ein optisches System, bestehend aus einem Phasenkontrastmikroskop und einer CCD-Videokamera, über eine Bildumwandlungskarte mit einem Personalcomputer. Die einzelnen Bestandteile dieses Systems sind in einem Kunststoffgehäuse integriert.

Die grundsätzliche Eignung des HTM IVOS für die automatisierte morphologische Untersuchung von Spermienköpfen bei den genannten Haustierarten wurde von RAßHOFER (1999) und UHLENBROCK (1999) überprüft. Dabei fand der Einfluss verschiedener methodischer Faktoren hinsichtlich der Probenaufbereitung (Waschung der Ejakulate, Spermienkonzentration, Färbung der Ausstrichpräparate) sowie der Gerätekonfiguration (Lichtquelle, Objektiv) besondere Berücksichtigung. HAKE (2001) bestimmte mit dem HTM IVOS Art und Anteil primärer Kopfanomalien von Bullenspermien bei einer durch Röntgenstrahlung induzierten Spermatogenesestörung.

Obwohl es sich bei diesem Analysegerät um ein vollautomatisches System handelt, war in den genannten Untersuchungen keine automatische Ermittlung morphometrischer Kriterien für Spermienkopfanomalien möglich. Vor einer Kategorisierung war es erforderlich, dass die Autorinnen metrische Grenzwerte für verschiedene Anomalienklassen ermittelten und entsprechende Konfigurationen am System vornahmen. Während die Klassifizierung der Kopfanomalien bei RAßHOFER (1999) und UHLENBROCK (1999) auf statistischen

Kenngößen basierte, erfolgte die Auswertung bei HAKE (2001) an Hand einer subjektiv vorgenommenen Einteilung.

CASEY et al. (1997) und GRAVANCE et al. (1996) führten eine vergleichende Quantifizierung metrischer Spermienkopffparameter fertiler und subfertiler Hengste durch. Für diese Untersuchungen wurden die mit dem HTM IVOS an Hematoxylin gefärbten Ausstrichen erhobenen morphometrischen Werte in eine Datenbank übertragen und statistisch ausgewertet. Die Einteilung der Spermienköpfe in normale sowie morphologisch abweichende Formen erfolgte somit ebenfalls nicht durch die HTM-Software, sondern durch eine statistische Analyse der metrischen Daten. Trotz der eingeschränkten Softwarefunktion erscheint dieses Analysegerät - bei standardisiertem Vorgehen - auch für eine objektive morphologische Ejakulatuntersuchung in der Tiermedizin geeignet (RAßHOFER 1999, UHLENBROCK 1999).

2.6.2.2 Eignung und Grenzen

Während die konventionelle lichtmikroskopische Beurteilung der Spermienmorphologie aufgrund ihrer Subjektivität sowie dem Fehlen international standardisierter Untersuchungsmethoden nur einen bedingten Vergleich von Ergebnissen verschiedener UntersucherInnen oder Laboratorien erlaubt (STOLLA 1984), kann der Einsatz computergestützter Untersuchungsverfahren durch die exakte Bestimmung metrischer Parameter die Reproduzierbarkeit und Objektivität der morphologischen Ejakulatanalyse verbessern. Außerdem ist gegenüber herkömmlichen mikrometrischen Methoden die Erfassung umfangreicher metrischer Daten bei einem vertretbaren Zeitaufwand möglich (BOERSMA & BRAUN 1999).

Untersuchungen von RAßHOFER (1999) und UHLENBROCK (1999) dagegen belegen einen vergleichsweise hohen Zeitaufwand bei Verwendung der computergestützten morphologischen Analyse bei schlechterer Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gegenüber der visuell-subjektiven Methode. Zudem weisen die Ergebnisse computerassistierter morphometrischer Untersuchungen deutliche Abhängigkeit zu einer Reihe vorrangig methodischer Faktoren, wie z.B. der Präparation von Ausstrichpräparaten, auf. Dies muss bei einem Vergleich sowie einer

Interpretation von Ergebnissen verschiedener Studien berücksichtigt werden (RAßHOFER 1999, UHLENBROCK 1999, BOERSMA et al. 1999).

Während bei der visuell-subjektiven morphologischen Analyse die Präzision der Auswertung mit steigender Probengröße einen positiven Trend zeigt (STOLLA 1984), ist bei der computerassistierten Morphometrie bereits ein Probenumfang von etwa 60 Spermien für die Bestimmung von Spermienkopfmaßen ausreichend (BOERSMA et al. 1999).

Ein routinemäßiger Einsatz der computergestützten morphologischen Untersuchung in der Veterinärmedizin ist jedoch nicht zuletzt auf Grund der hohen Anschaffungskosten gegenwärtig nicht absehbar (RAßHOFER 1999, UHLENBROCK 1999).

3 MATERIAL UND METHODEN

Im Folgenden werden die drei Forschungsansätze der vorliegenden Arbeit dargestellt: (1) Pharmakologisch unterstützte Spermagewinnung, (2) Konventionelle Ejakulatanalyse sowie (3) Computergestützte Spermienkopfmorphometrie beim Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*). Abb. 6 gibt in Form eines Struktogramms einen Überblick über die durchgeführten Untersuchungen, Methoden sowie über die jeweils erwarteten Ergebnisse.

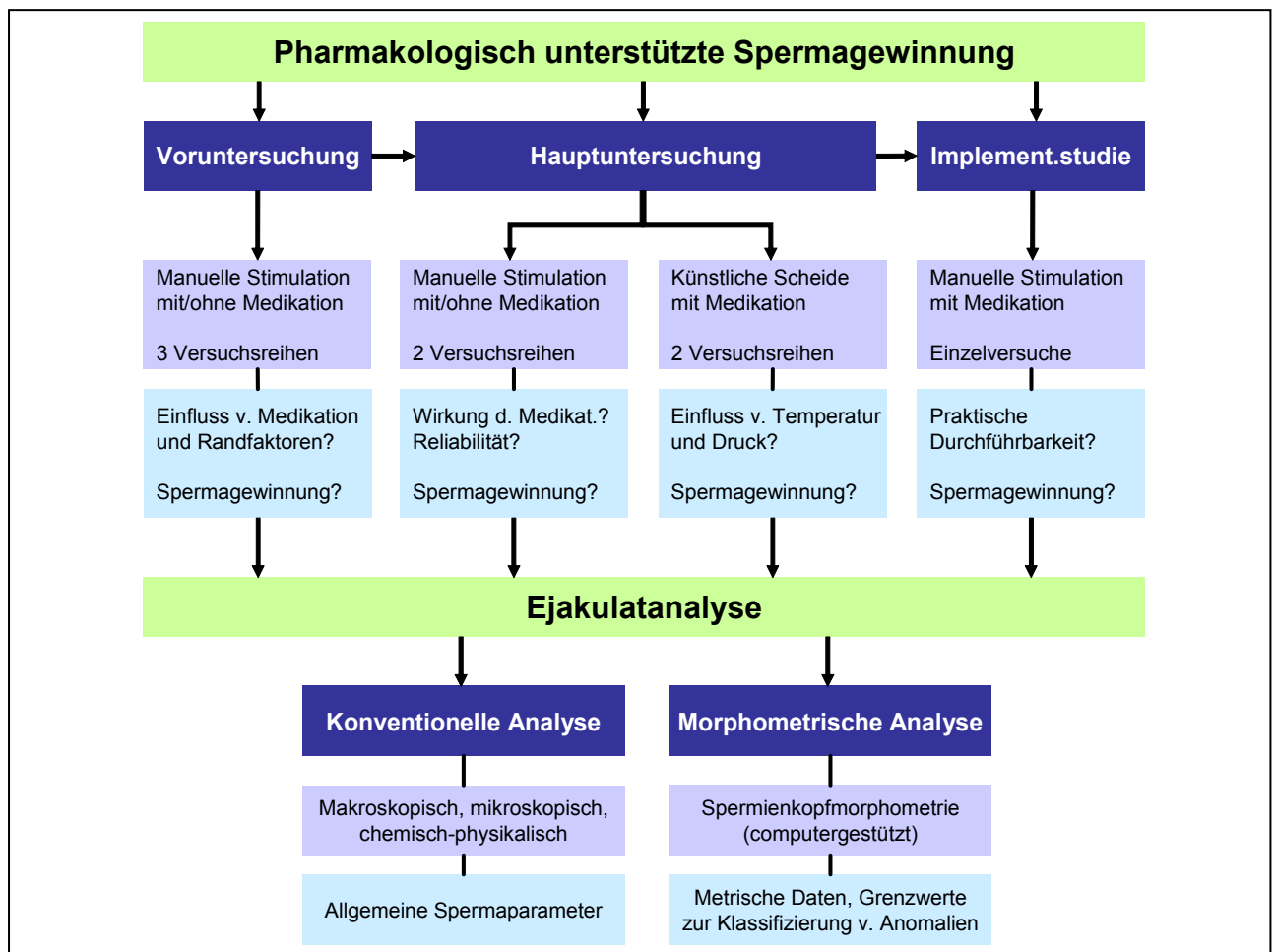


Abb. 6: Struktogramm Übersicht über die Inhalte der vorliegenden Arbeit, gegliedert nach Untersuchung, Methode und erwarteten Ergebnissen

Zu (1): Bei den Untersuchungen zur Spermagewinnung am stehenden Breitmaulnashornbullen wurde der Einfluss α -adrenerger Medikamente bei manueller Stimulation, aufbauend auf den Untersuchungen von WALZER et al. (2000), überprüft (s. 2.5.2.1). Neben der pharmakologisch unterstützten manuellen Stimulation wurden zudem Deseminationsversuche unter Verwendung einer Künstlichen Scheide durchgeführt.

Zu (2): Die im Rahmen des Versuchsabschnitts Desemination gewonnenen Proben wurden einer konventionellen Ejakulatanalyse unterzogen, um Standardparameter für Sperma, das manuell sowie mit einer Künstlichen Scheide gewonnen wurde, zu ermitteln.

Zu (3): Der gegenwärtige Stand der Literatur weist keine metrischen spermatologischen Daten beim Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*) auf (vgl. 2.6.1). Im Versuchsabschnitt computergestützte Spermienkopfmorphometrie wurden zunächst verschiedene morphometrische Parameter bestimmt. Dazu wurden manuell sowie durch Elektrostimulation gewonnene Ejakulate computergestützt untersucht. Für eine morphometrische Analyse war es erforderlich, Grenzwerte zur Klassifizierung verschiedener Spermienkopfanomalien bei dieser Tierart zu bestimmen.

3.1 Pharmakologisch unterstützte Spermagewinnung

Der Versuchsabschnitt gliederte sich in eine Voruntersuchung und eine Hauptuntersuchung. In einer sich anschließenden Implementationsstudie wurde die praktische Durchführbarkeit der untersuchten Methode überprüft.

3.1.1 VORUNTERSUCHUNG

Im Rahmen einer Voruntersuchung wurde der Einfluss des α_2 -Agonisten Detomidinhydrochlorid², nachfolgend als Detomidin bezeichnet, bei alleiniger Applikation sowie in Kombination mit dem partiellen Opioidagonisten Butorphanol² auf die Desemination bei manueller Stimulation überprüft und mit Deseminationsversuchen ohne pharmakologische Unterstützung verglichen.

In diesem Zusammenhang war es erforderlich, eventuelle tageszeitbedingte Einflüsse bzw. Management der Tiere sowie die Möglichkeit eines konditionierenden Effekts wiederholter manueller Stimulationen auf die Desemination zu berücksichtigen.

Die Voruntersuchung wurde mit einem Bullen durchgeführt (s. 3.1.4) und gliederte sich in drei aufeinander folgende Versuchsreihen (Tab. 9).

² Medikamente und Dosierungen s. Anhang S. 3-4

Tab. 9: Aufbau und Inhalt der Voruntersuchung - gegliedert nach Versuchsreihe und Versuchsart

Versuchsreihe	Versuchsart
1	Manuelle Stimulation ohne Medikation
2	Manuelle Stimulation mit bzw. ohne Applikation von Detomidin
3	Manuelle Stimulation mit bzw. ohne Applikation von Detomidin und Butorphanol

Jede Versuchsreihe umfasste zehn Versuchstage. An zwei Versuchstagen pro Woche wurde jeweils ein Versuch am Vormittag sowie am Nachmittag von der Autorin, mit Unterstützung des leitenden Revierpflegers, durchgeführt.

Ein in einer Box eingerichteter Zwangsstand (s. 3.1.4 sowie Anhang S. 2-3) ermöglichte Manipulationen im Bereich der Inguinalregion des Nashornbullens, bei größtmöglicher Sicherheit für die Versuchsdurchführenden. Bei den Versuchen am Vormittag hielt sich der Bulle seit dem Vorabend in einer Innenbox auf, die Sichtkontakt zu weiblichen Nashörnern gewährte. Vor den Versuchen am Nachmittag befand sich der Bulle dagegen in einem Außengehege, mit direktem Kontakt zu mehreren Nashornkühen.

Zu Versuchsbeginn wurde der Bulle vom Pfleger aufgefordert, den Zwangsstand zu betreten. Anschließend wurde in den am Nachmittag durchgeführten Versuchen der Versuchsreihen 2 und 3 die Medikation appliziert³ (vgl. Tab. 9). Die Pharmaka wurden mit Wasser für Injektionszwecke auf ein Volumen von 4 ml verdünnt und intramuskulär, kaudal der Ohrbasis, injiziert. Um die Injektion manuell vornehmen zu können, wurde im Bereich der Injektionsstelle eine Oberflächenanästhesie der Haut durchgeführt. Ein Lokalanästhetikum als Creme-Zubereitung⁴ wurde mindestens 60 Minuten zuvor auf die gereinigte Haut aufgetragen.

Nach erfolgter Injektion wurde der Bulle in Ruhe gelassen und erst nach dem Ausschachten des Penis und einsetzender Erektion mit der manuellen Stimulation (Ablauf der Stimulation, s. 2.5.2) begonnen. In Versuchen, in denen nach der Medikamentengabe keine *Emissio und Erectio penis* eintraten, wurde nach Ablauf einer Zeitspanne von 15 Minuten mit der manuellen Stimulation begonnen. Seminale Proben wurden in vorgewärmten Probenbehältern (s. Anhang S. 5) aufgefangen und einer konventionellen Ejakulatanalyse unterzogen (s. 3.2).

³ Die Medikamente wurden ausschließlich während der Versuche am Nachmittag appliziert, da der Bulle nach Versuchsende in der Innenbox verbleiben konnte. Dadurch waren Risiken durch eine eventuell sedierende Wirkung der Medikation minimiert.

⁴ Lokalanästhetikum, s. Anhang S. 3

Ein Versuch wurde beendet, wenn a) trotz zehn minütiger Stimulation keine Erektion ausgelöst werden konnte, b) nach induzierter Erektion und nachfolgender Erschlaffung trotz weiterer Stimulation keine erneute Erektion induziert werden konnte, c) seminale Proben gewonnen wurden oder d) der Bulle den Zwangsstand verließ.

An Hand verschiedener Parameter, die in Verhaltensparameter (1) und quantitative Parameter (2) unterschieden wurden, sollten Verhalten und Reaktionen des Nashornbullens festgehalten werden.

(1) Verhaltensparameter⁵

Das Verhalten des Bullen wurde während jedes Deseminationsversuchs durch 12 verschiedene Parameter über skalierte Datenerhebungsbögen (s. 3.1.5 und Anhang S. 7-8) eingeschätzt. Beurteilt wurden beispielsweise das Verhalten beim Betreten des Zwangsstands, die Positionierung im Zwangsstand sowie emotionale Äußerungen, wie Angst, Aggressivität und sexuelle Erregung.

(2) Quantitative Parameter

In Form quantitativer Parameter wurde für jeden Versuch festgehalten, ob Proben gewonnen werden konnten, ob die extrapräputiale Verlagerung und Erektion des Penis als Folge der Medikation oder erst durch manuelle Stimulation eintraten und wie schnell die *Emissio penis* nach der Medikamentenapplikation bzw. nach dem Beginn der Stimulation erfolgte. Weiterhin wurde die Stimulations- und Erektionsdauer gemessen.

3.1.2 HAUPTUNTERSUCHUNG

Die Hauptuntersuchung umfasst zwei getrennte Versuchsabschnitte, die auf den Ergebnissen der Voruntersuchung (s. Ergebnisse 4.1.1) aufbauen:

- (1) Einfluss der Applikation des α_2 -Agonisten Detomidin in Kombination mit dem partiellen Opioidagonisten Butorphanol bei manueller Stimulation
- (2) Einfluss der Künstlichen Scheide bei pharmakologisch induzierter Erektion

Zu (1): Um eventuelle Versuchsleitereffekte auszuschließen, wurden die Deseminationsversuche im Doppelblindversuch durchgeführt. Es fanden 48 Versuche (24 Versuche mit

⁵ Ausführliche Darstellung der Verhaltensparameter sowie des verwendeten Bewertungsschemas, s. Anhang S. 7-8, 12-13

Medikation, 24 Versuche ohne Medikation) mit zwei Bullen in zwei verschiedenen Institutionen (s. 3.1.4) statt. Da in einem der beiden Zoos die Versuche in direktem, ungeschütztem Kontakt zu dem Bullen durchgeführt werden mussten, wurde die Versuchsanzahl aus Sicherheitsgründen bei diesem Bullen auf 18 Wiederholungen beschränkt. Placebo und Medikation (Dosierung, s. Anhang S. 4) wurden in einer zufälligen Reihenfolge appliziert, wobei der Pfleger und die Autorin über die Art der Injektionslösung nicht informiert waren. Der Versuchsablauf sowie die Datenerhebung entsprachen generell der in der Voruntersuchung beschriebenen Vorgehensweise (s. 3.1.1).

Um die Reliabilität der subjektiven Verhaltensbeurteilung festzustellen, erfolgte bei einem Bullen die Einschätzung der Verhaltensparameter nicht nur durch die Autorin, sondern auch durch den leitenden Revierpfleger. Seine Beurteilungen stimmten weitgehend mit denen der Autorin überein (s. Anhang S. 14-15).

Zu (2): Mit einer Künstlichen Scheide wurde die Wirkung zusätzlicher Druck- und Temperaturreize auf die Auslösung des Ejakulationsreflexes untersucht. Die Erektion wurde pharmakologisch durch Applikation der unter (1) verwendeten Medikamentenkombination (Dosierung, s. Anhang S. 4) induziert.

Als Künstliche Scheide wurde das für Hengstdeseminationen entwickelte *Hannoversche Modell* modifiziert. Um eine mechanische Irritation der lateralen Penisschwellkissen zu verhindern, wurde das Modell auf beiden Seiten entsprechend der Länge des distalen Penisabschnitts gekürzt und mit einer neuen Andruckplatte versehen (s. Anhang S. 5). Die Künstliche Scheide wurde auf Temperaturbereiche zwischen 42 und 44 °C sowie 48 und 50 °C erwärmt und auf den distalen Abschnitt des erigierten Penis aufgestülpt. Die lateralen Schwellkissen sowie der proximale Abschnitt des Penis wurden manuell unterstützt und komprimiert (s. Anhang S. 5). Für jeden Temperaturbereich wurden zehn Wiederholungen bei zwei Versuchen pro Woche durchgeführt. Im Anschluss an jeden Versuch wurden die unter 3.1.1 genannten Parameter erhoben und zusätzlich notiert, ob der Bulle Friktionsbewegungen ausführte.

Diese Versuchsreihe wurde auf einen Nashornbullen beschränkt, da sich die Methode in Vorversuchen bei einem weiteren Bullen als ungeeignet erwies. Während der bei diesem Bullen vergleichsweise längeren Erektionsdauer (bis zu 1,5 Stunden), kühlte die temperierte Scheide ab, was zu einem Abbruch der Erektion führte. Ein während der Versuche vorgenommener Wechsel der kälteren Scheide gegen eine auf Ausgangstemperatur erwärmte Scheide führte bei diesem Bullen zu Abwehrbewegungen und zum Versuchsabbruch.

3.1.3 IMPLEMENTATIONSSTUDIE

Um die praktische Relevanz der pharmakologisch modifizierten manuellen Stimulation zur kurzfristigen und zuverlässigen Spermagewinnung zu verifizieren, wurde eine weitere Versuchsreihe mit dem im Rahmen der Hauptuntersuchung als geeigneter befundenen Nashornbullen durchgeführt. Der Versuchsablauf sowie die Datenerhebung entsprachen generell der Vorgehensweise der Hauptuntersuchung (s. 3.1.2). Die Versuchsreihe wurde auf zwei Versuchstage beschränkt, an denen jeweils ein Versuch am Vormittag sowie am Nachmittag erfolgte. Zwischen der Hauptuntersuchung und der Implementationsstudie lagen mehrere Wochen, in denen der Bulle nicht manuell stimuliert wurde. Als Medikation wurde eine Kombination aus Detomidin und Butorphanol (Dosierung, s. Anhang S. 4) in der unter 3.1.1 beschriebenen Weise appliziert.

3.1.4 TIERE UND EINRICHTUNGEN

Die Voruntersuchung sowie die beiden Abschnitte der Hauptuntersuchung wurden mit einem im Untersuchungszeitraum 30-jährigen Breitmaulnashornbullen (*Ceratotherium s. simum*) der F0-Generation, Zuchtbuchnummer 0360, durchgeführt. Der Bulle lebt seit 1991 im Zoo Salzburg, Österreich, in gemischter Gruppenhaltung und trägt den Hausnamen ‚Denny‘. Nach Angaben des 9. Internationalen Zuchtbuchs für das Breitmaulnashorn hatte der Bulle bis zum Stand 01.01.2001 nicht reproduziert (OCHS 2001).

Als weiterer Proband sollte der ebenfalls im Zoo Salzburg gehaltene, zehn Jahre jüngere Breitmaulnashornbulle ‚Benno‘, Zuchtbuchnummer 0676, F1-Generation, in die Vor- sowie in die Hauptuntersuchung aufgenommen werden. Aufgrund aggressiven Verhaltens des Tieres und damit verbundenen Risiken für die Versuchsdurchführenden mussten die Untersuchungen jedoch in der Vorversuchsphase abgebrochen werden.

Die Versuche im Zoo Salzburg wurden in einem für die Zoobesucher nicht zugänglichen Gebäude durchgeführt. Es verfügt über eine Innenbox mit integriertem, frei begehbarem Zwangsstand. In einer mehrwöchigen Vorversuchsphase wurde der Bulle ‚Denny‘ an den Aufenthalt im Zwangsstand sowie an die vorgenommenen Manipulationen der Inguinalregion gewöhnt. Die Konstruktion des Zwangsstands ist im Anhang (S. 2-3) dargestellt.

Der erste Versuchsabschnitt der Hauptuntersuchung sowie die Implementationsstudie wurden mit dem während des Untersuchungszeitraums 12-jährigen Breitmaulnashornbullen ‚Harry‘, Zuchtbuchnummer 0974, des Allwetterzoo Münster, Deutschland, durchgeführt. Der Bulle gehört der F2-Generation an und hatte bis zum Untersuchungszeitpunkt einmal erfolgreich gezüchtet sowie regelmäßige Deckaktivität gezeigt.

Die Hauptuntersuchung wurde im Außengehege der Nashornanlage in unmittelbarem Kontakt mit dem Bullen durchgeführt. In den der Versuchsreihe vorausgegangenen Wochen wurde der Bulle durch die Tierpfleger des Allwetterzoo Münster an die Manipulationen des äußeren Genitales gewöhnt. Für die Implementationsstudie wurde ein provisorischer Zwangsstand im Innengehege eingerichtet.

Die Nashornbullen waren während des Untersuchungszeitraums klinisch gesund.

3.1.5 DATENERHEBUNG

Quantitative Daten sowie Einschätzparameter des Verhaltens wurden auf separaten Erhebungsbögen (s. Anhang S. 6-13) festgehalten. In der Voruntersuchung wurde das Verhalten des Bullen an Hand einer 5-stufigen, unidirektionalen Rating-Skala eingeschätzt. Um eine höhere Auflösung und Transparenz der subjektiven Beurteilung zu ermöglichen, erfolgte die Bewertung des Verhaltens in der Hauptuntersuchung über eine kontinuierliche Minimum-Maximum-Skala von 100 mm Länge.

3.2 Konventionelle Ejakulatanalyse

Um Standardparameter manuell sowie mit einer Künstlichen Scheide gewonnenen Spermien zu ermitteln, wurden die im Rahmen des Versuchsabschnitts Desemination gewonnenen Proben einer konventionellen makroskopischen, mikroskopischen sowie chemisch-physikalischen Analyse unterzogen.

3.2.1 MAKROSKOPISCHE EJAKULATANALYSE

Neben einer Volumenbestimmung wurden die Proben grobsinnlich auf Farbe, Konsistenz und Geruch sowie eventuelle Beimengungen untersucht.

3.2.2 MIKROSKOPISCHE EJAKULATANALYSE

Die mikroskopische Analyse wurde mit den in der Praxis üblichen Untersuchungsmethoden durchgeführt (vgl. WEITZE 2001a). Sie umfasste die Schätzung der Motilität (%), die Bestimmung des prozentualen Anteils vitaler Spermien (Supravitalfärbung: Bromphenolblau-Nigrosin, 300 analysierte Spermien pro Ejakulat), die Berechnung der Spermienkonzentration (Zählkammer nach Bürker-Türk) sowie die subjektive Beurteilung der Spermienmorphologie

(300 analysierte Spermien pro Ejakulat). Dabei erfolgte die Klassifizierung der Spermienanomalien in Anlehnung an LEIDL et al. (1971) sowie MOSS et al. (1979).

3.2.3 CHEMISCH-PHYSIKALISCHE EJAKULATANALYSE

Als chemisch-physikalischer Parameter wurde der pH-Wert der Proben mit Indikatorpapierstreifen bestimmt.

3.3 Computergestützte Spermienkopfmorphometrie

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten metrische Spermienkopffparameter beim Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*) erfasst werden. Dazu wurden Ausstrichpräparate von jeweils 17 mit manueller Stimulation sowie durch Elektrostimulation gewonnener Ejakulate⁶ computergestützt analysiert. Pro Ejakulat wurden unmittelbar nach deren Gewinnung mindestens sechs Ausstriche angefertigt, luftgetrocknet, nach frühestens 12 Stunden gefärbt (Farely mit modifizierter Färbezeit; BOERSMA et al. 1999; Färbeprotokoll s. Anhang S. 16) und nach weiteren 12 Stunden eingedeckt.

In die Untersuchung wurden Spermaproben von 14 Südlichen Breitmaulnashörnern (*Ceratotherium s. simum*) und einem Nördlichen Breitmaulnashornbullen (*Ceratotherium s. cottoni*) aufgenommen. Die Nashornbullen stammten aus 11 verschiedenen Zoos (Nordamerika und Europa), waren zum Untersuchungszeitpunkt zwischen 12 und 32 Jahre alt und klinisch gesund.

3.3.1 ANALYSEGERÄT UND ANALYSEN-SETUP

Die morphometrische Untersuchung wurde mit dem weitgehend automatisierten System Hamilton Thorne Morphology Analyser IVOS (integrated visual optical system) der Firma Hamilton Thorne Research, Beverly, USA, durchgeführt (s. 2.6.2.1). Das Analysegerät wird nachfolgend als HTM IVOS bezeichnet. Als Software wurde das auf Microsoft Windows 3.11 basierende Programm Metrix (Version 10.7B) verwendet.

Als Objektiv wurde ein 100x-Objektiv (Olympus) mit Ölimmersion eingesetzt. Durch den 55x-Faktor der Videokamera ergab sich auf dem Monitor eine 5500-fache Gesamtvergrößerung.

⁶ Die Elektroejakulate wurden von Dres. T. B. Hildebrandt, F. Göritz und R. Hermes, Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Berlin, gewonnen.

Mit Hilfe eines Objektmikrometers wurde für das verwendete Objektiv der Vergrößerungsfaktor 47,26 ermittelt und das HTM IVOS entsprechend geeicht. Basierend auf den Ergebnissen von UHLENBROCK (1999) wurde für die Analyse eine monochromatische Lichtquelle der Wellenlänge $\lambda = 510 \pm 20$ nm eingesetzt.

Das Analysegerät verfügt über einen serienmäßig produzierten Objektträgertisch mit einer Halterung für Standardobjektträger. Diese Konstruktion hätte jedoch nur eine Analyse im Bereich der zentralen Längsachse eines Ausstrichpräparats erlaubt. Um auch Spermienköpfe anderer Areale in die Untersuchung mit einbeziehen zu können, wurde von der Autorin ein spezieller Tischaufsatz entwickelt und in das Gerät eingebaut (s. Anhang S. 17).

Das HTM IVOS wurde mit Setup-Parametern konfiguriert (s. Anhang S. 18), die in Vorversuchen ermittelt wurden. Jeweils vor Beginn der Untersuchung eines neuen Präparates wurden die optimalen Beleuchtungseinstellungen bestimmt. Die Werte für die Beleuchtungsparameter Bildschirmhelligkeit variierten zwischen 1900-1970, für den Kontrast zwischen 37-42 und für die Stärke der Lampe zwischen 2139-2147.

3.3.2 COMPUTERGESTÜTZTE MORPHOMETRISCHE ANALYSE

Vor der Durchführung der morphometrischen Analyse zur Bestimmung des prozentualen Anteils anomaler Spermienköpfe war es erforderlich, morphologische Klassen zu definieren und deren Grenzwerte für die Spezies Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*) zu berechnen. Mit den ermittelten Grenzwerten wurde das Kategorien-Setup der HTM IVOS-Software konfiguriert.

3.3.2.1 Definition und Berechnung der Spermienkopfklassen

Für die Berechnung der Grenzwerte verschiedener Anomalienklassen wurden zunächst von jeweils einem Ejakulat der 15 Nashornbullen mindestens 400 Spermienköpfe - unabhängig von ihrer morphologischen Beschaffenheit - mit dem HTM IVOS analysiert. Dabei wurden sechs metrische Spermienkopffparameter erfasst (Tab. 10).

Vorraussetzung war eine exakte Digitalisierung der Spermienköpfe durch das Analysegerät, die für jeden einzelnen Wert von der Autorin überprüft und gegebenenfalls korrigiert wurde.

Tab. 10: Computergestützt berechnete Spermienkopffparameter

Spermienkopffparameter	Einheit
Länge	μm
Breite	μm
Elongation (Verhältnis Länge/Breite)	%
Fläche	μm ²
Umfang	μm
Symmetrie	%

Als Grenzwerte wurden das 5. und 95. Perzentil jedes Spermienkopffparameters berechnet und die Werte innerhalb dieses Bereichs als ‚normal‘ definiert. Dies erfolgte für manuell bzw. durch Elektrostimulation gewonnene Ejakulate getrennt. Basierend auf den Ergebnissen einer konventionellen morphologischen Analyse, wurden jedoch die Elektroejakulate von sechs Nashornbullen, die einen Anteil von mehr als 30% Spermienanomalien bzw. weniger als 1/3 intakte apikale Akrosomenränder aufwiesen, von der Berechnung dieses ‚Normbereichs‘ ausgeschlossen.

Es wurden fünf morphologische Klassen unterschieden (normaler Spermienkopf, kleiner bzw. großer Spermienkopf sowie schmaler bzw. breiter Spermienkopf). Die Anomalienklassen wurden durch charakteristische metrische Parameter definiert, deren obere bzw. untere Grenzwerte jeweils unmittelbar unterhalb des 5. Perzentils bzw. oberhalb des 95. Perzentils lagen. Dadurch schlossen sich die Anomalienklassen direkt an den durch statistische Kenngrößen begrenzten Normalbereich an.

3.3.2.2 Computergestützte Klassifikation von Spermienkopfanomalien

Nach Definition, Berechnung und Konfiguration der morphologischen Spermienkopffklassen erfolgte die eigentliche computergestützte morphometrische Analyse mit einer Klassifikation von Spermienkopfanomalien durch das HTM IVOS. Pro Ejakulat wurden mindestens 200 Spermien computergestützt analysiert. Dabei wurde der prozentuale Anteil der fünf morphologischen Klassen (s. 3.3.2.1) bestimmt. Die Digitalisierung sowie Klassifizierung der Spermienköpfe wurde subjektiv von der Autorin überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Dabei wurde der prozentuale Anteil falsch digitalisierter sowie kategorisierter Spermienköpfe⁷ erfasst.

⁷ Definition, s. UHLENBROCK (1999), S. 32

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen Microsoft® Excel 2002 und SPSS 10.0.7 für Windows. Der Vergleich von Verteilungen wurde mit dem Chi²-Test durchgeführt. Als Streuungsparameter wurde der Variationskoeffizient berechnet. Der Unterschied von Mittelwerten wurde an Hand parameterfreier Verfahren getestet (Varianzanalyse - Kruskal-Wallis-Test; Vergleich von zwei Mittelwerten - Mann-Whitney-U-Test).

4 ERGEBNISSE

4.1 Pharmakologisch unterstützte Spermagewinnung und konventionelle Ejakulatanalyse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Vor- und Hauptuntersuchung sowie die der Implementationsstudie vorgestellt. Die während dieser Untersuchungen gewonnenen Spermproben wurden einer konventionellen Ejakulatanalyse unterzogen. Die dabei ermittelten Parameter werden im Kontext der jeweiligen Untersuchung dargestellt.

4.1.1 VORUNTERSUCHUNG

Der Einfluss des α_2 -Agonisten Detomidin bei alleiniger Applikation sowie in Kombination mit dem partiellen Opioidagonisten Butorphanol auf die Desemination bei manueller Stimulation wurde in Form von Verhaltensparametern (1) und quantitativen Parametern (2) erfasst.

Zunächst wird an Hand dieser Teilaspekte (1, 2) sowie der Ergebnisse der konventionellen Ejakulatanalyse (3) ein Überblick über die Resultate der drei Versuchsreihen gegeben. Anschließend wird die Untersuchung möglicher Einflussfaktoren wie Tageszeit, Management und Regelmäßigkeit der Stimulation sowie der Einfluss der applizierten Medikationen im Einzelnen dargestellt.

(1) Verhaltensparameter

Um einen Überblick über das Verhalten des Bullen während der Versuchsdurchführung zu geben, wurden für alle Versuchsreihen, getrennt nach Vor- und Nachmittagen, die Einschätzung der Verhaltensparameter als Mediane in Tab. 11 dargestellt. Wie sich daraus entnehmen lässt, war das Verhalten des Bullen ‚Denny‘ während der drei Versuchsreihen relativ konstant.

Tab. 11: Einschätzung des Verhaltens des Nashornbullen ‚Denny‘ während der Voruntersuchung
 An Hand einer 5-stufigen Ratingskala^a wurden für jeden Verhaltensparameter pro Versuchsreihe 20 Einzelwerte ermittelt und der Median berechnet; Zu jedem Median ist *kursiv* die nominale Bedeutung des jeweiligen Wertes angeführt.

Verhaltensparameter	Versuchsreihe 1		Versuchsreihe 2		Versuchsreihe 3	
	<u>Vormittag</u> ohne Medikation	<u>Nachmittag</u> ohne Medikation	<u>Vormittag</u> ohne Medikation	<u>Nachmittag</u> mit Medikation ^b	<u>Vormittag</u> ohne Medikation	<u>Nachmittag</u> mit Medikation ^c
Zielstrebigkeit beim Betreten des Zwangsstands	3 <i>gemächlich</i>	3 <i>gemächlich</i>	3 <i>gemächlich</i>	3 <i>gemächlich</i>	3 <i>gemächlich</i>	3 <i>gemächlich</i>
Ruhe beim Betreten des Zwangsstands	4 <i>ruhig</i>	4 <i>ruhig</i>	4 <i>ruhig</i>	4 <i>ruhig</i>	4 <i>ruhig</i>	4 <i>ruhig</i>
Stand vor Beginn der manuellen Stimulation	3 <i>durchschn.</i>	3 <i>durchschn.</i>	3 <i>durchschn.</i>	3 <i>durchschn.</i>	3 <i>durchschn.</i>	3 <i>durchschn.</i>
Stand während der manuellen Stimulation	3 <i>durchschn.</i>	3 <i>durchschn.</i>	3 <i>durchschn.</i>	3 <i>durchschn.</i>	3 <i>durchschn.</i>	4 <i>ruhig</i>
Erreichbarkeit des äußeren Genitales -vor Beginn der manuellen Stimulation-	4 <i>gut</i>	4 <i>gut</i>	4 <i>gut</i>	4 <i>gut</i>	4 <i>gut</i>	4 <i>gut</i>
Erreichbarkeit des äußeren Genitales -während der manuellen Stimulation-	4 <i>gut</i>	4 <i>gut</i>	4 <i>gut</i>	4 <i>gut</i>	4 <i>gut</i>	4 <i>gut</i>
Kooperativität des Bullen	2 <i>kaum</i>	3 <i>erkennbar</i>	3 <i>erkennbar</i>	3 <i>erkennbar</i>	3 <i>erkennbar</i>	3 <i>erkennbar</i>
Ängstlichkeit	1 <i>keine</i>	1 <i>keine</i>	1 <i>keine</i>	1 <i>keine</i>	1 <i>keine</i>	1 <i>keine</i>
Aggressivität	1 <i>keine</i>	1 <i>keine</i>	1 <i>keine</i>	1 <i>keine</i>	1 <i>keine</i>	1 <i>keine</i>
Abwehrbewegungen	1 <i>keine</i>	1 <i>keine</i>	1 <i>keine</i>	1 <i>keine</i>	1 <i>keine</i>	1 <i>keine</i>
Sexuelle Erregung	2 <i>kaum</i>	2 <i>kaum</i>	3 <i>erkennbar</i>	3 <i>erkennbar</i>	2 <i>kaum</i>	2 <i>kaum</i>
Erektionsstärke	4 <i>stark</i>	4 <i>stark</i>	4 <i>stark</i>	5 <i>sehr stark</i>	4 <i>stark</i>	5 <i>sehr stark</i>

^a Ausführlicher im Anhang S. 7-8, 12-13

^b Medikation: Detomidin; ^c Medikation: Detomidin in Kombination mit Butorphanol

Der Nashornbulle betrat den Zwangsstand meist gemächlich. Er fand sich nach der Aufforderung des Pflegers dort ohne Zureden ein, wobei er sich dabei noch umsah, herumschnüffelte oder ab und zu markierte. Er zeigte kaum Anzeichen von Nervosität. Vor sowie während der manuellen Stimulation stand der Bulle relativ still, ging kleine Schritte vor und zurück und wich Berührungen geringfügig aus. Er war so positioniert, dass das äußere Genitale von den Versuchsdurchführenden gut erreicht werden konnte. Meist verhielt sich der Nashornbulle erkennbar kooperativ; er ermöglichte in einigen Fällen aktiv einen guten Zugang zum äußeren Genitale.

In der Mehrzahl der Versuche konnten weder Ängstlichkeit, Aggressivität noch Abwehrbewegungen beobachtet werden. Der Bulle erschien in den Versuchsreihen 1 und 3, trotz deutlicher Erektion, vom Gesamtverhalten her eher unbeteiligt. In Versuchsreihe 2 waren äußere Anzeichen sexueller Erregung wahrnehmbar. Ein erkennbarer Unterschied bestand in der Ausprägung der Erektion, die bei pharmakologischer Beeinflussung überwiegend sehr stark, dagegen ohne Medikation nur stark war. Dieser Aspekt wird nachfolgend näher dargestellt und erläutert (s. 4.1.1.3).

(2) Quantitative Parameter

Neben der subjektiven Einschätzung des Verhaltens des Bullen wurden während der Deseminationsversuche auch objektive Daten erhoben (Tab. 12).

In allen Versuchsreihen wurden Proben⁸ gewonnen, unter dem Einfluss der α -adrenergen Medikation am Nachmittag in den Versuchen der Reihen 2 und 3 jedoch vergleichsweise häufiger. Das Verhältnis der Probengewinnung gegenüber der Anzahl der Versuche betrug dabei 2:10 in den Versuchen ohne Medikation, 3:10 bei der alleinigen Applikation von Detomidin und 4:10 bei der Kombination von Detomidin mit Butorphanol.

⁸ Angaben zu Quantität und Qualität der Proben s. nachfolgend (3) Konventionelle Ejakulatanalyse

Tab. 12: Quantitativ während der Voruntersuchung bei Nashornbulle ‚Denny‘ erfasste Parameter (n bzw. $\bar{x} \pm SD$)

Quantitative Parameter	Versuchsreihe 1		Versuchsreihe 2		Versuchsreihe 3	
	<u>Vormittag</u> ohne Medikation (n=10)	<u>Nachmittag</u> ohne Medikation (n=10)	<u>Vormittag</u> ohne Medikation (n=10)	<u>Nachmittag</u> mit Medikation ^a (n=10)	<u>Vormittag</u> ohne Medikation (n=10)	<u>Nachmittag</u> mit Medikation ^b (n=10)
Probengewinnung ^c (n)	2	2	2	3	2	4
<i>Emissio penis</i> ohne manuelle Stimulation (n)	0	0	0	5	0	9
<i>Emissio penis</i> nach manueller Stimulation (n)	10	10	10	5	10	1
Dauer bis zum Eintritt der <i>Emissio penis</i> nach Injektion ohne manuelle Stimulation (min)	-	-	-	9,5 ± 1,0	-	8,5 ± 1,0
Dauer bis zum Eintritt der <i>Emissio penis</i> nach manueller Stimulation (sek)	30 ± 20	25 ± 20	30 ± 20	35 ± 20	30 ± 20	20
Dauer der Stimulation (min)	7,5 ± 2,5	7,5 ± 1,5	8,0 ± 3,0	9,5 ± 3,5	7,5 ± 1,5	9,5 ± 3,0
Dauer der Erektion (min)	5,0 ± 2,0	4,5 ± 1,5	5,0 ± 2,0 ^d	7,0 ± 2,5 ^d	5,0 ± 1,5 ^e	7,5 ± 3,0 ^e

^a Medikation: Detomidin; ^b Medikation: Detomidin in Kombination mit Butorphanol

^c Quantität und Qualität der gewonnenen Proben s. nachfolgend (3) Konventionelle Ejakulatanalyse

^d Werte innerhalb einer Versuchsreihe weisen einen Trend auf ($p < 0,1$; Mann-Whitney-U-Test)

^e Werte innerhalb einer Versuchsreihe unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test)

In allen Versuchen konnte ein Ausschachten des Penis mit nachfolgender Erektion provoziert werden. Dabei bestanden Unterschiede zwischen den Versuchen mit und ohne Medikation. Unter dem Einfluss der Medikation kam es in der Mehrzahl der Versuche zu einer extra-präputialen Verlagerung und Erektion des Penis, bevor mit der manuellen Stimulation begonnen wurde. Ohne pharmakologische Unterstützung dagegen trat die *Emissio penis* ausschließlich als Folge der Stimulation der Inguinalregion ein (Tab. 12).

Deutliche Unterschiede bestanden auch hinsichtlich der Erektionsdauer, die unter dem Einfluss der Medikamente in Versuchsreihe 3 signifikant länger anhielt (s. 4.1.1.3; Tab. 12). Dieser Effekt ist vorwiegend auf die Medikation zurückzuführen, da die eine Erektion unterstützende manuelle Stimulation in den Versuchen mit Medikation nicht signifikant länger durchgeführt wurde.

(3) Konventionelle Ejakulatanalyse

Im Rahmen der Voruntersuchung wurden insgesamt 15 Proben von sehr unterschiedlichem Volumen (0,2 bis 40 ml) und Qualität gewonnen (Tab. 13). Davon wiesen neun Proben keine bzw. nur vereinzelte tote Spermien auf und waren teilweise mit Urin kontaminiert.

Sechs Proben enthielten Spermien in quantifizierbarer Konzentration ($11,7 \pm 11,9 \times 10^6/\text{ml}$, $\bar{x} \pm \text{SD}$) und wurden ausschließlich bei pharmakologischer Unterstützung der manuellen Stimulation gewonnen.

Bei diesen Spermaproben handelte es sich jedoch in Anbetracht der geringen, meist nur wenige Milliliter umfassenden Volumina, um keine vollständigen Ejakulate. Dies belegen auch die geringe Spermienkonzentration pro Milliliter bzw. die geringe Spermiengesamtzahl pro Ejakulat mit maximalen Werten von $31,5 \times 10^6$ Spermien/ml bzw. $0,09 \times 10^9$ Spermien/Ejakulat (Tab. 13). Die Untersuchung der qualitativen Spermaparameter Motilität, Vitalität sowie Spermienmorphologie dagegen führte zu guten Ergebnissen. Die Motilität lag zwischen 70 und 85%, die Vitalität (s. Abb. 7) zwischen 70 und 87%. Der Anteil anomaler Spermien variierte zwischen 10 und 19%, bei annähernd gleichem Verhältnis primärer zu sekundärer

Anomalien (Tab. 13; Abb. 7a, Abb. 8 und Abb. 9). Dabei überwogen akrosomale Defekte (Abb. 8). Auffallend waren ein bei allen untersuchten Spermien beobachteter und als normal bewerteter abaxialer Schwanzansatz (Abb. 7 bis Abb. 9) sowie die weitgehende Abwesenheit von zytoplasmatischen Tropfen (< 1%).

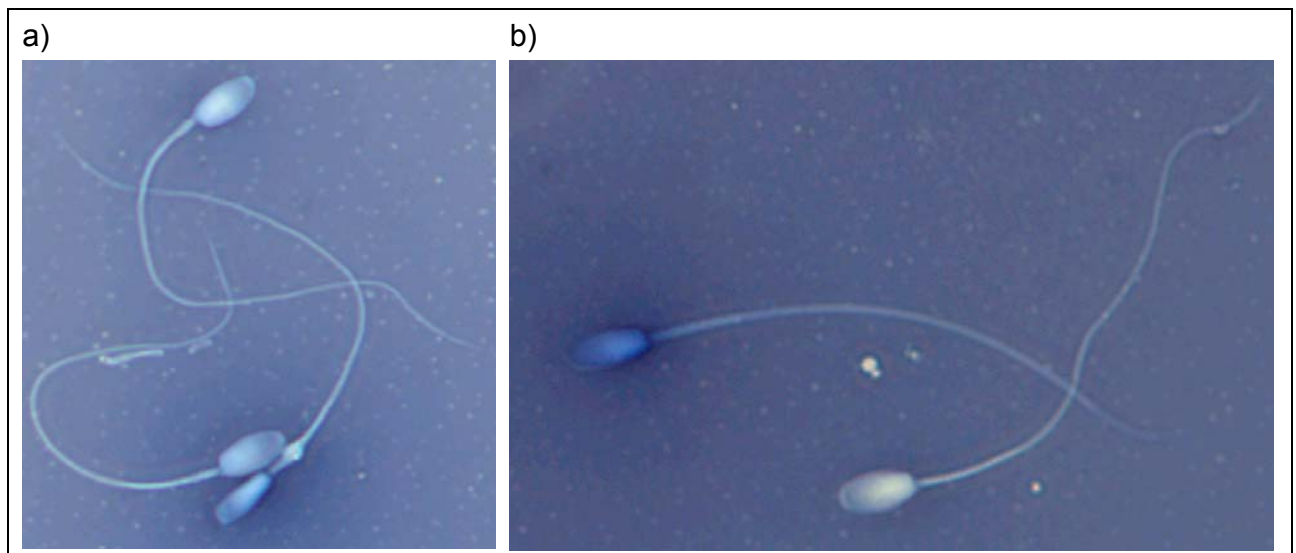


Abb. 7: Breitmaulnashornspermien, Supravitalfärbung: Bromphenolblau-Nigrosin, 100x Objektiv, Ölimmersion:
a) Beispiel für morphologisch normale, vitale Spermien sowie für ein vitales Spermium mit einer unspezifischen Kopfanomalie (schmaler Kopf). Weiterhin ist bei diesem Spermium ein Zytoplasmotropfen vorhanden.
b) Beispiel für die unterschiedliche Anfärbung vitaler (helles Spermium) und geschädigter Spermien (blau gefärbtes Spermium) bei einer Supravitalfärbung. Bei geschädigten Spermien diffundiert der blaue Farbstoff (Bromphenolblau) durch die Spermienmembran.

Makroskopisch erschienen die Spermproben überwiegend homogen, elfenbeinfarben. Die Konsistenz war molke- bis milchähnlich, der Geruch war neutral. Es waren keine Beimengungen erkennbar. Der pH-Wert dieser Proben betrug einheitlich 8,0 (Tab. 13).

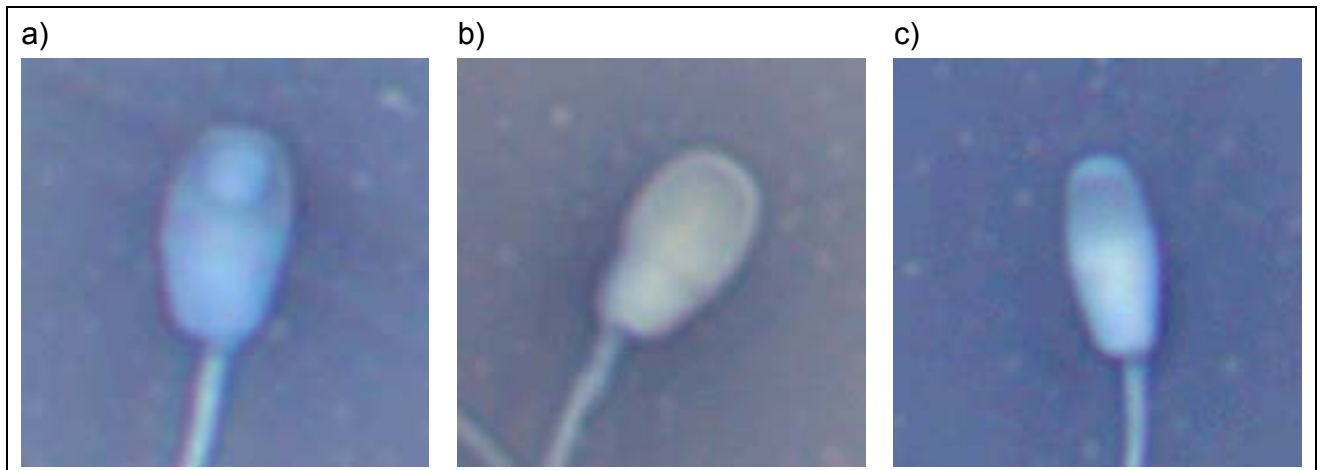


Abb. 8: Beispiele für primäre und sekundäre akrosomale Defekte, Supravitalfärbung: Bromphenolblau-Nigrosin, 100x Objektiv, Ölimmersion:
 a) Primärer Defekt: Vakuolisiertes Akrosom
 b) Sekundärer Defekt: Geschwollene und in Ablösung begriffene Kopfkappe
 c) Sekundärer Defekt: Abgelöste Kopfkappe

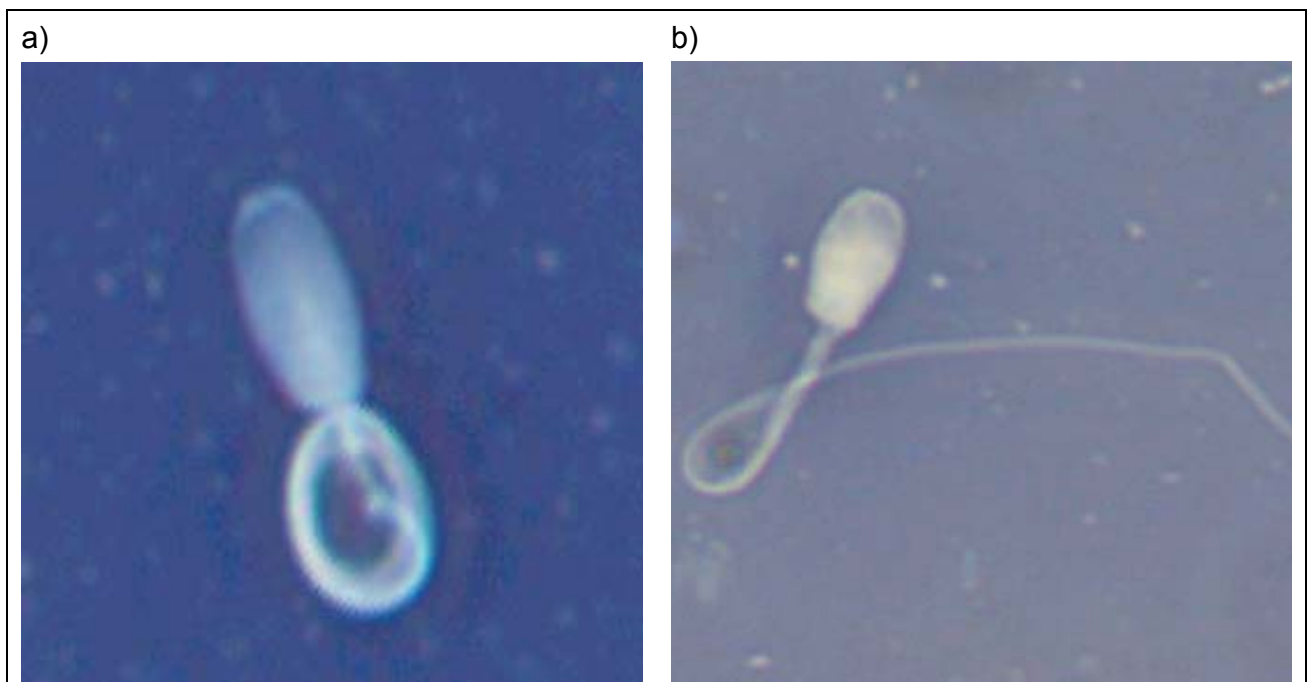


Abb. 9: Beispiele für primäre und sekundäre Schwanzanomalien, Supravitalfärbung: Bromphenolblau-Nigrosin, 100x Objektiv, Ölimmersion:
 a) Primäre Schwanzanomalie: Aufrollung unter Einbeziehung des Mittelstücks
 b) Sekundäre Schwanzanomalie: Krümmeling

Tab. 13: Spermaparameter der während der Voruntersuchung von Nashornbulle ‚Denny‘ gewonnenen Proben (Werte in Klammern als \bar{x})

Spermaparameter	Versuchsreihe 1		Versuchsreihe 2		Versuchsreihe 3	
	<u>Vormittag</u> ohne Medikation (n=10)	<u>Nachmittag</u> ohne Medikation (n=10)	<u>Vormittag</u> ohne Medikation (n=10)	<u>Nachmittag</u> mit Medikation ^a (n=10)	<u>Vormittag</u> ohne Medikation (n=10)	<u>Nachmittag</u> mit Medikation ^b (n=10)
Anzahl der Proben (n)	2	2	2	3	2	4
Volumen (ml)	0,2 ^c u. 1,0	0,5 ^c u. 3,0 ^{c,d}	2,0 ^c u. 40,0 ^d	0,2 ^c ; 1,0 ^e ; 3,0 ^e	0,5 ^c u. 0,5	1,5-5,0 ^e (3,4)
Spermienkonzentration pro ml (x 10 ⁶)	-	-	-	3,1 u. 9,8	-	2,3-31,5 (14,3)
Spermiengesamtzahl pro Ejakulat (x 10 ⁹)	-	-	-	0,003 u. 0,03	-	0,009-0,09 (0,05)
Motilität (%)	-	-	-	75 u. 80	-	70-85 (75)
Vitalität (%)	-	-	-	78 u. 82	-	70-87 (80)
Morphologie, Anteil anomaler Spermien (%)	-	-	-	12 u. 16	-	10-19 (13)
Primäre Anomalien (%)	-	-	-	6 u. 7	-	4-8 (6)
Sekundäre Anomalien (%)	-	-	-	6 u. 8	-	5-9 (7)
Tertiäre Anomalien (%)	-	-	-	0 u. 1	-	0-2 (0,5)
pH-Wert	8,0 u. 7,5	7,7 u. > 8,0	7,7 u. > 8,0	> 8,0; 8,0; 8,0	7,7 u. 7,5	8,0 (8,0)

^a Medikation: Detomidin; ^b Medikation: Detomidin kombiniert mit Butorphanol

^c Vereinzelt tote Spermien nachweisbar; ^d Urinkontaminierte Probe; ^e Spermienkonzentration bestimmbar

4.1.1.1 Einfluss von Tageszeit und Management

Die Medikamentenapplikation sollte aus Sicherheitserwägungen (s. 3.1.1) ausschließlich am Nachmittag erfolgen. Da der Nashornbulle nachts in einer Einzelbox mit Sichtkontakt, tagsüber jedoch in einem Außengehege mit direktem Kontakt zu Nashornkühen gehalten wird, wurde in der Versuchsreihe 1 untersucht, ob Tageszeit und Management einen erkennbaren Einfluss auf die Deseminationsversuche nehmen. Dazu wurde sowohl am Vormittag, als auch am Nachmittag des jeweiligen Versuchstags die manuelle Stimulation ohne pharmakologische Unterstützung durchgeführt und die dabei erhobenen Daten miteinander verglichen.

An Hand der Datenauswertung der Versuchsreihe 1 konnte ein signifikanter Einfluss der Tageszeit sowie des Managements auf die Deseminationsversuche ausgeschlossen werden. Ohne Medikation wurden weder am Vormittag, noch am Nachmittag Spermaproben gewonnen (Tab. 13). Die Analyse der erhobenen Verhaltensparameter zeigte keine signifikanten Unterschiede im Verhalten des Nashornbullens ($p > 0,05$; Chi^2 -Test). Auch für die quantitativen Parameter bestanden keine Signifikanzen ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test; Tab. 12).

4.1.1.2 Einfluss regelmäßiger manueller Stimulation

Um festzustellen, ob ein von der Medikation unabhängiger konditionierender Effekt durch die regelmäßigen Deseminationsversuche bestand, der nur einen bedingten Vergleich der Versuchsreihen miteinander erlauben würde, wurden die Ergebnisse der Vormittagsdaten der drei Versuchsreihen miteinander verglichen.

Für die erhobenen Parameter konnte ein signifikanter konditionierender Einfluss der regelmäßigen Versuchsdurchführung ausgeschlossen werden. Der Nashornbulle zeigte während der Versuche am Vormittag über alle drei Versuchsreihen keine signifikanten Veränderungen des Verhaltens ($p > 0,05$; Chi^2 -Test).

Es wurden in allen Versuchsreihen am Vormittag Proben gewonnen (Tab. 12 und Tab. 13), die sich teilweise deutlich im Volumen unterschieden. Dies war jedoch in einem Extremfall (40 ml) auf eine Kontamination mit Urin zurückzuführen. Keine der Proben enthielt

Spermien in quantifizierbarer Konzentration. Auch der Vergleich der quantitativen Parameter ergab keine Signifikanzen ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test).

4.1.1.3 Einfluss der Medikation

Um den Einfluss der Medikation zu ermitteln, wurden die am Nachmittag (mit Medikation) erhobenen Daten mit den Vormittagsergebnissen (ohne Medikation), getrennt für die Versuchsreihen 2 und 3, miteinander verglichen.

(1) Verhaltensparameter

Die Medikation hatte einen deutlichen Einfluss auf den Parameter ‚Erektionsstärke‘. Während sich bei alleiniger Applikation von Detomidin ein positiver Trend ($p < 0,1$; χ^2 -Test; Versuchsreihe 2; Abb. 10) abzeichnete, führte die Medikamentenkombination mit Butorphanol zu einer signifikant stärkeren Ausprägung der Erektion gegenüber den Versuchen ohne Medikation ($p < 0,001$, χ^2 -Test; Versuchsreihe 3; Abb. 11).

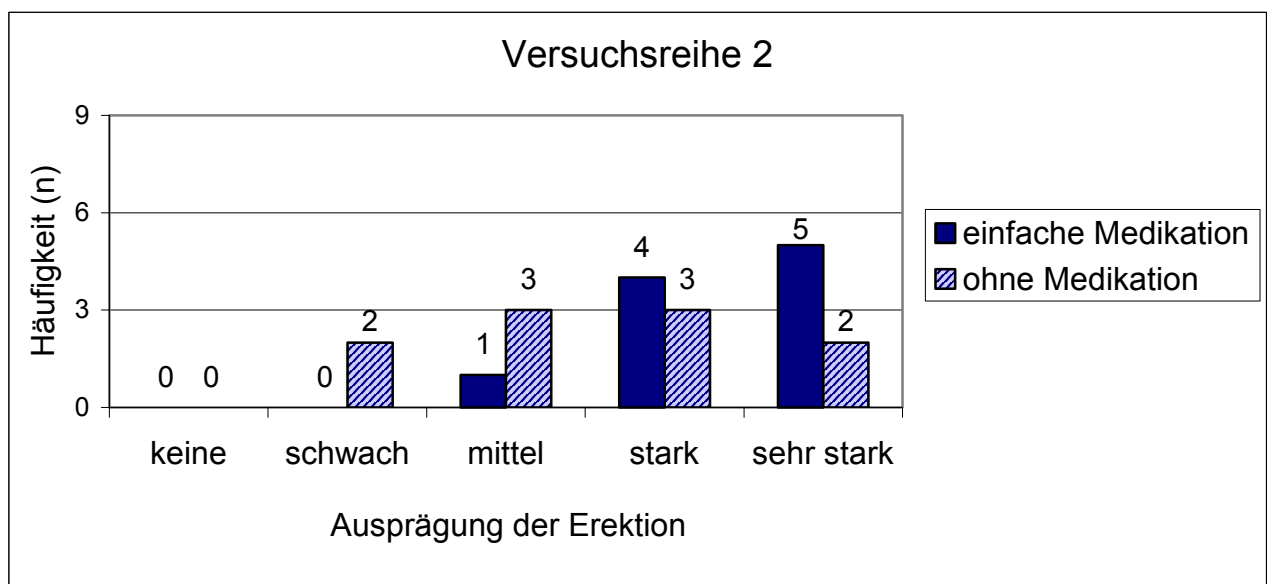


Abb. 10: Einfluss der einfachen Medikation auf die Erektionsstärke
Die alleinige Applikation von Detomidin ($n=10$) bewirkte gegenüber den Versuchen ohne Medikation ($n=10$) einen positiven Trend der Erektionsausprägung ($p < 0,1$; χ^2 -Test).

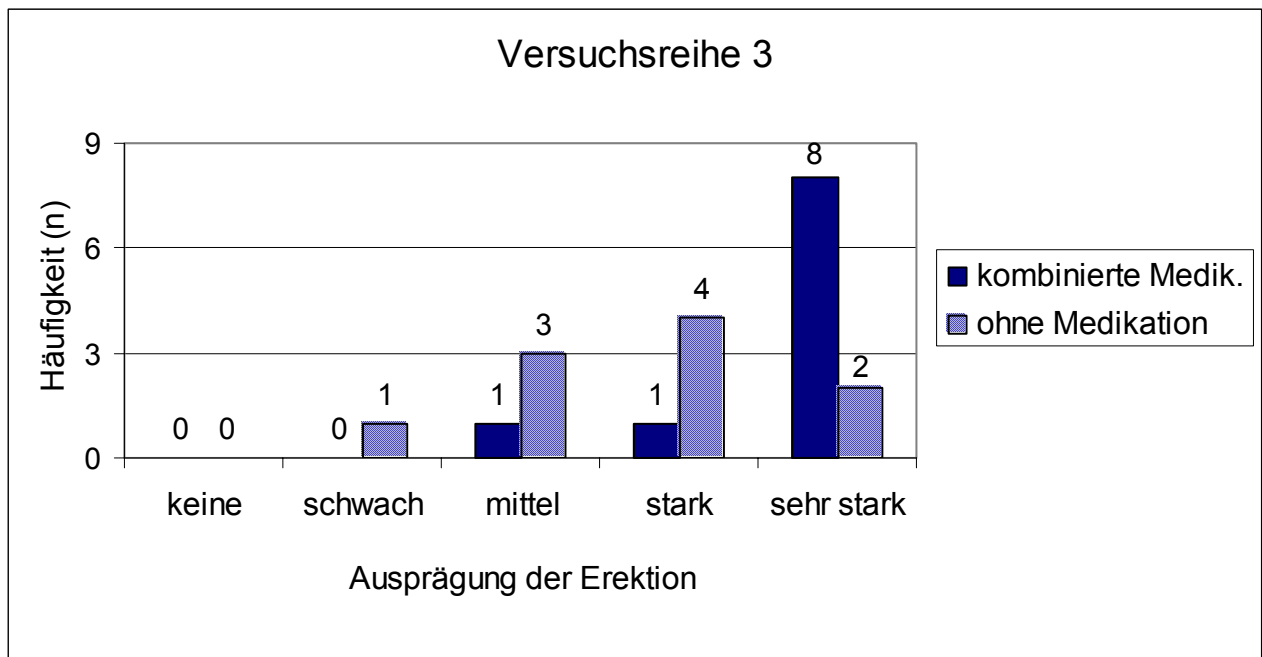


Abb. 11: Einfluss der kombinierten Medikation auf die Erektionsstärke
 Die kombinierte Applikation von Detomidin und Butorphanol (n=10) bewirkte gegenüber den Versuchen ohne Medikation (n=10) signifikant stärkere Erektionen ($p < 0,001$, Chi^2 -Test).

Auf die anderen Verhaltensparameter hatte die einfache Medikation bei Nashornbulle ‚Denny‘ keinen erkennbaren Einfluss ($p > 0,05$; Chi^2 -Test; Tab. 11). Dagegen verhielt sich der Bulle bei kombinierter Medikation im Zwangsstand während der manuellen Stimulation ruhiger gegenüber den Versuchen ohne pharmakologische Unterstützung ($p < 0,1$; Chi^2 -Test; Tab. 11). Dies wird auf die sedierende Wirkung der Medikation zurückgeführt.

(2) Quantitative Parameter

Die Medikation förderte deutlich den Eintritt und die Dauer der Erektion. Bei alleiniger Applikation von Detomidin kam es in 5 der 10 Versuche durchschnittlich $9,5 \pm 1,0$ Minuten ($\bar{x} \pm \text{SD}$) nach der Injektion zu einer *Emissio penis* mit nachfolgender Erektion, ohne dass manuell stimuliert wurde (Tab. 12). Die Erektionsdauer bei einfacher Medikation zeigte dabei einen positiven Trend gegenüber den Versuchen, die ohne pharmakologische Unterstützung durchgeführt wurden ($p < 0,1$; Mann-Whitney-U-Test).

Bei Applikation der Medikamentenkombination war der Einfluss auf die Erektionsauslösung und –dauer noch deutlicher. Bei 9 der 10 Versuche mit kombinierter Medikation wurde durchschnittlich $8,5 \pm 1,0$ Minuten ($\bar{x} \pm SD$) *post injectionem* eine extrapräputiale Verlagerung des Penis mit nachfolgender Erektion beobachtet. Dabei war die Dauer der Erektion mit durchschnittlich $7,5 \text{ Minuten} \pm 3,0 \text{ Minuten}$ ($\bar{x} \pm SD$) signifikant länger, als bei den Versuchen ohne Medikation ($5,0 \pm 1,0$ Minuten; $p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test; Tab. 12).

In den insgesamt 40 Deseminationsversuchen der Versuchsreihen 2 und 3, die ohne pharmakologische Unterstützung durchgeführt wurden, kam es dagegen erst nach Beginn der manuellen Stimulation der Inguinalregion zum Ausschachten und Erigieren des Penis.

(3) Konventionelle Ejakulatanalyse

Spermproben wurden ausschließlich bei manueller Stimulation mit Medikation gewonnen (Tab. 13). Seminale Flüssigkeiten, die dagegen in den Versuchen ohne Medikation aufgefangen wurden, enthielten keine bzw. nur vereinzelte tote Spermien.

Die Art der Medikation hatte einen Einfluss auf die Häufigkeit der Spermagewinnung, jedoch nicht auf die Qualität der Ejakulate. Während bei alleiniger Applikation des α_2 -Agonisten in zehn Deseminationsversuchen nur zwei Spermproben gewonnen wurden, konnten bei kombinierter Medikation - bei identischer Versuchsanzahl - vier Ejakulationen ausgelöst werden (Tab. 13). Bei den Spermproben handelte es sich jedoch um keine vollständigen Ejakulate. Während das Volumen und die Spermienkonzentration der Proben relativ gering waren, waren die Motilität und Vitalität der Spermien hoch (s.o.).

4.1.2 HAUPTUNTERSUCHUNG

Aufgrund der Teilerfolge bei kombinierter Applikation von Detomidin und Butorphanol auf die Spermagewinnung bei manueller Stimulation in der Voruntersuchung (s. 4.1.1.3), sollten diese Ergebnisse im Rahmen der Hauptuntersuchung überprüft und ergänzt werden. Dazu wurde im ersten Versuchsabschnitt der Einfluss der Medikation bei zwei verschiedenen Nashornbullen

bei manueller Deseminationstechnik in einer Doppelblindstudie untersucht. Im zweiten Versuchsabschnitt wurde die Stimulationsmethode mit einer Künstlichen Scheide variiert.

4.1.2.1 Einfluss von Detomidin und Butorphanol bei manueller Stimulationstechnik

(1) Verhaltensparameter

Das während der Hauptuntersuchung eingeschätzte Verhalten des Bullen ‚Denny‘ entsprach für die meisten Parameter den in der Voruntersuchung beobachteten Verhaltensweisen (s. 4.1.1). Beim Vergleich der beiden Nashornbullen bestanden zwar einige Verhaltensparallelen, es wurden aber auch Unterschiede offen gelegt (Tab. 14). Die Datenauswertung erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests.

Bei beiden Individuen erleichterte die Medikation die Versuchsdurchführung. Unter dem Einfluss der Medikation wirkten die Nashornbullen entspannter und verhielten sich während der manuellen Stimulation signifikant ruhiger, als in den Versuchen, in denen ein Placebo injiziert wurde ($p < 0,05$, ‚Denny‘ bzw. $p < 0,01$, ‚Harry‘). Interessant dabei war, dass Nashornbulle ‚Harry‘ beim Betreten des Untersuchungsbereichs gegenüber ‚Denny‘ zunächst signifikant weniger zielstrebig ($p < 0,01$) und signifikant unruhiger ($p < 0,01$) wirkte. Jedoch bestand für die Versuchsdurchführung mit Bulle ‚Harry‘ keine einem Zwangsstand vergleichbare Vorrichtung (vgl. 3.1.4), sodass diese Parameter nur bedingt miteinander vergleichbar sind.

In den Versuchen mit Medikation verhielten sich beide Bullen signifikant kooperativer, als bei Placebogabe ($p < 0,05$). Dabei ermöglichte der jüngere Nashornbulle ‚Harry‘ - im Vergleich zu ‚Denny‘ - wesentlich aktiver einen Zugang zum äußeren Genitale, indem er während der Stimulation das Bein nach hinten wegstreckte. Dieser Unterschied zwischen den Nashornbullen war signifikant ($p < 0,01$). Auch führte ‚Harry‘ bei allen Versuchen weniger Abwehrbewegungen durch. In den Versuchen mit Medikation bestanden zwischen den Nashornbullen für diesen Parameter signifikante Unterschiede ($p < 0,001$).

Tab. 14: Einschätzung des Verhaltens der Nashornbullen ‚Denny‘ und ‚Harry‘ im Doppelblindversuch der Hauptuntersuchung an Hand einer kontinuierlichen Minimum-Maximum-Skala ($\bar{x} \pm SD$)

Verhaltensparameter (minimale – maximale Ausprägung) ^a	Nashornbulle ‚Denny‘		Nashornbulle ‚Harry‘	
	Placebo (n=15)	Medikat. (n=15)	Placebo (n=9)	Medikat. (n=9)
Zielstrebigkeit beim Betreten des Stands ^b (sehr zögernd - sehr zügig)	80 ± 13	73 ± 20	50 ± 26	52 ± 28
Ruhe beim Betreten des Stands ^b (sehr unruhig - sehr ruhig)	85 ± 17	70 ± 26	51 ± 29	53 ± 29
Stand vor Beginn der manuellen Stimulation (sehr unruhig - sehr ruhig)	76 ± 18	78 ± 12	49 ± 23	51 ± 28
Stand während der manuellen Stimulation (sehr unruhig - sehr ruhig)	64 ± 20 ^d	79 ± 7 ^d	51 ± 16 ^d	76 ± 14 ^d
Erreichbarkeit des äußeren Genitales vor Beginn der manuellen Stimulation (nicht erreichbar – optimal erreichbar)	79 ± 19	74 ± 9	42 ± 21	49 ± 21
Erreichbarkeit des äußeren Genitales während der manuellen Stimulation (nicht erreichbar – optimal erreichbar)	57 ± 23 ^d	76 ± 11 ^d	50 ± 14 ^d	79 ± 13 ^d
Kooperativität des Bullen (nicht kooperativ - sehr kooperativ)	35 ± 23 ^d	53 ± 15 ^d	50 ± 16 ^d	69 ± 11 ^d
Ängstlichkeit (nicht ängstlich - sehr ängstlich)	8 ± 9	4 ± 5	20 ± 25 ^c	1 ± 3 ^c
Aggressivität (nicht aggressiv - sehr aggressiv)	8 ± 17	10 ± 12	6 ± 12	1 ± 2
Abwehrbewegungen (nicht abwehrend - sehr abwehrend)	24 ± 27	23 ± 9	14 ± 16 ^c	3 ± 4 ^c
Sexuelle Erregung (nicht sexuell erregt - sehr sexuell erregt)	33 ± 31	49 ± 28	23 ± 16 ^d	87 ± 12 ^d
Erektionsstärke (keine - sehr stark)	47 ± 25 ^d	81 ± 11 ^d	54 ± 19 ^d	93 ± 13 ^d

^a Auf der kontinuierlichen Bewertungsskala von 0 bis 100 bezieht sich die in Klammern links stehende Beurteilung auf den Beginn, die rechts stehende Beurteilung auf das Ende der Skala (ausführlicher s. Anhang S. 9-13)

^b Die Versuche mit ‚Denny‘ wurden in einem Zwangsstand (Zoo Salzburg), die Versuche mit ‚Harry‘ im Außengehege (Allwetterzoo Münster) durchgeführt

^c Werte weisen beim jeweiligen Bullen einen Trend auf ($p < 0,1$; Mann-Whitney-U-Test)

^d Werte unterscheiden sich beim jeweiligen Bullen signifikant ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test)

Der bereits in der Voruntersuchung festgestellte Einfluss der Medikation auf die Erektionsstärke (s. 4.1.1.3) wurde in der Hauptuntersuchung bei beiden Nashornbullen bestätigt. Während durch die manuelle Stimulation in den Versuchen ohne Medikation nur mittelstarke Erektionen

ausgelöst wurden, kam es bei Medikamentenapplikation zu starken bis sehr starken Erektionen ($p < 0,001$). Dennoch wirkte der ältere, libidoschwächere Nashornbulle in allen Versuchen nur mäßig sexuell erregt. Dagegen zeigte der regelmäßig deckende Bulle ‚Harry‘ in den pharmakologisch unterstützten Versuchen Anzeichen starker sexueller Erregung. Gegenüber den Versuchen, in denen ein Placebo appliziert wurde, war die Erregungsausprägung dabei signifikant stärker ($p < 0,001$; Tab. 14).

(2) Quantitative Parameter

Die Ergebnisse der Hauptuntersuchung bestätigten den in der Voruntersuchung bei Nashornbulle ‚Denny‘ festgestellten signifikanten Einfluss der Medikation auf die Parameter ‚*Emissio penis*‘ und ‚Erektionsdauer‘ (vgl. Tab. 12 und Tab. 15) bei beiden Individuen.

Bei dem regelmäßig deckenden Nashornbulle ‚Harry‘ hatte die Medikation dabei jedoch einen vergleichsweise stärkeren Einfluss. So bedingten die α -adrenergen Medikamente bei ‚Harry‘ relativ häufiger, nämlich in 7 von 9 Versuchen gegenüber 8 von 15 Versuchen bei Bulle ‚Denny‘, eine extrapräputiale Verlagerung des Penis mit nachfolgender Erektion, bevor mit der manuellen Stimulation begonnen wurde. Dabei kam es bei Nashornbulle ‚Harry‘ durchschnittlich $11,5 \pm 1,5$ Minuten ($\bar{x} \pm SD$) nach der Medikamentenapplikation zum Ausschachten und Erigieren des Penis, ohne dass manuell stimuliert wurde (Tab. 15). In den Versuchen mit Placebogabe kam es bei beiden Bullen dagegen erst durch die manuelle Stimulation des äußeren Genitales zur Erektionsinduktion. Dabei konnte in einem Versuch (Placebo, Nashornbulle ‚Denny‘) trotz längerer manueller Stimulation kein Ausschachten des Penis provoziert werden (Tab. 15).

Signifikante Unterschiede zwischen den Nashornbullen wurden auch für den Parameter ‚Erektionsdauer‘ festgestellt ($p < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test). Während bei Placebogabe bei beiden Bullen durch manuelle Stimulation eine durchschnittliche Erektionsdauer von 3,5 Minuten (\bar{X}) ausgelöst wurde, verhielt sich dies in den Versuchen mit Medikation sehr unterschiedlich. Bei pharmakologischer Unterstützung hielt die Erektion bei Nashornbulle ‚Harry‘ durchschnittlich länger als 30 Minuten ($32,5 \pm 24,0$ Minuten; $\bar{x} \pm SD$) an - bei einer Mindestdauer

von 7 Minuten und einer maximalen Dauer von 70 Minuten. Der Unterschied zu den Versuchen mit Placebo war signifikant ($p < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test). Bei Nashornbulle ‚Denny‘ wurde die Erektionsdauer durch die Medikation zwar auch signifikant gegenüber den Versuchen mit Placebo verlängert ($p < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test), hielt jedoch mit durchschnittlich $6,5 \pm 1,5$ Minuten ($\bar{x} \pm SD$) im Vergleich zu dem jüngeren Nashornbulle wesentlich kürzer an (Tab. 15).

Tab. 15: Quantitativ während der Hauptuntersuchung bei den Nashornbulle ‚Denny‘ und ‚Harry‘ erfasste Parameter bei manueller Stimulation (n bzw. $\bar{x} \pm SD$)

Quantitative Parameter	Nashornbulle ‚Denny‘		Nashornbulle ‚Harry‘	
	Placebo (n=15)	Medikation (n=15)	Placebo (n=9)	Medikation (n=9)
Probengewinnung ^a (n)	5	5	2	4
<i>Emissio penis</i> ohne manuelle Stimulation (n)	0	8	0	7
<i>Emissio penis</i> nach manueller Stimulation (n)	14	7	9	2
Dauer bis zum Eintritt der <i>Emissio penis</i> nach Injektion ohne man. Stimulation (min)	-	$8,5 \pm 0,5$	-	$11,5 \pm 1,5$
Dauer bis zum Eintritt der <i>Emissio penis</i> nach man. Stimulation (sek)	35 ± 10^b	30 ± 25^b	40 ± 10	$30 \pm 0,0$
Dauer der Stimulation (min)	$7,5 \pm 1,5$	$8,0 \pm 2,5$	$12,0 \pm 8,5^c$	$44,0 \pm 31,0^c$
Dauer der Erektion (min)	$3,5 \pm 2,0^c$	$6,5 \pm 1,5^c$	$3,5 \pm 2,5^c$	$32,5 \pm 24,0^c$

^a Quantität und Qualität der gewonnenen Proben s. nachfolgend (3) Konventionelle Ejakulatanalyse

^b Werte weisen beim jeweiligen Bullen einen Trend auf ($p < 0,1$; Mann-Whitney-U-Test)

^c Werte unterscheiden sich beim jeweiligen Bullen signifikant ($p < 0,01$; Mann-Whitney-U-Test)

(3) Konventionelle Ejakulatanalyse

Die Medikation förderte die Spermagewinnung bei beiden Nashornbulle. Mit einer Ausnahme wurden Spermaproben ausschließlich in den pharmakologisch unterstützten Versuchen

gewonnen. Hinsichtlich der relativen Häufigkeit der Probengewinnung und der Qualität, insbesondere aber der Spermienkonzentration, bestanden zwischen den Nashornbullen sehr große Unterschiede (Tab. 16). Während bei Nashornbulle ‚Denny‘ in 15 Versuchen mit Medikation durchschnittlich jeder 3. Versuch zu einer Ejakulation führte, war das Verhältnis Versuchsanzahl: Ejakulationsinduktion bei Bulle ‚Harry‘ mit 4: 9 vergleichsweise günstiger (Tab. 16).

Tab. 16: Spermparameter der während der Hauptuntersuchung zur pharmakologisch unterstützten manuellen Stimulation bei den Nashornbullen ‚Denny‘ und ‚Harry‘ gewonnenen Proben (Werte in Klammern als \bar{x})

Spermparameter	Nashornbulle ‚Denny‘		Nashornbulle ‚Harry‘	
	Placebo (n=15)	Medikation (n=15)	Placebo (n=9)	Medikation (n=9)
Anzahl der Proben (n)	5	5	2	4
Volumen (ml)	0,5-2,0 ^a ; 3,0 ^b	1,0-4,5 ^{b,c} (2,3) 23,0 ^{b,d,e}	0,3 ^a u. 0,5 ^a	3,0-9,0 ^{b,d} (6,0) 0,5 ^{b,e}
Spermienkonzentration pro ml ($\times 10^6$)	8,3	3,4-14,2 (7,9) 59,7 ^{d,e}	-	180-539 (341) 117 ^{b,e}
Spermiengesamtzahl pro Ejakulat ($\times 10^9$)	0,02	0,008-0,06 (0,02) 1,26 ^{d,e}	-	0,8-2,2 (1,3) 0,06 ^{b,e}
Motilität (%)	75	15-75 (60)	-	65-75 ^f (70)
Vitalität (%)	78	18-83 (63)	-	73-81 ^f (78)
Morphologie, Anteil anomaler Spermien (%)	21	17-28 (20)	-	15-28 (21)
Primäre Anomalien (%)	10	7-20 (12)		8-13 (11)
Sek. Anomalien (%)	11	2-11 (8)		5-14 (8)
Tertiäre Anomalien (%)	-	0-1 (0,5)		1-2 (1)
pH-Wert	7,5- > 8,0; 7,7	7,6- > 8,0	7,7 u. 8,0	7,2-8,0 (7,7)

^a Vereinzelt tote Spermien nachweisbar; ^b Spermienkonzentration bestimmbar

^c Geringfügige Urinkontamination bei einer Probe; ^d Probe besteht aus mehreren Fraktionen

^e Von den übrigen Proben in Volumen und Konzentration abweichende Einzelprobe

^f Werte der jeweils zuletzt gewonnenen Fraktion; Motilität und Vitalität der zuvor gewonnenen Fraktionen wegen längerer Aufbewahrung bis zur Analyse sind bis zu 45% geringer

Abgesehen von einem aus drei Fraktionen bestehendem Ejakulat und einem den physiologischen Verhältnissen am ehesten entsprechenden Gesamtvolumen von 23 ml (Nashornbulle ‚Denny‘), umfasste das Volumen der Spermaproben beider Nashornbullen in der Regel nur wenige Milliliter. Obwohl sich auch die kleinvolumigen Ejakulate bei Nashornbulle ‚Harry‘ meist aus 3 bis 4 Fraktionen zusammensetzten und zwischen der Ejektion der einzelner Fraktionen bis zu 35 Minuten vergingen, handelte es sich angesichts der geringen Volumina um keine vollständigen Ejakulate. Dennoch unterschieden sich die Fraktionen deutlich in Aussehen, Spermienkonzentration und pH-Wert.

Die Fraktionen 1 bzw. 2 erschienen transparent hellbraun, enthielten nur vereinzelte, tote Spermien und hatten einen vergleichsweise niedrigen pH-Wert von 7,2 bis 7,5. Die Fraktionen 2 bzw. 3 bis 4 dagegen waren molkeähnlich, enthielten in drei Fällen ein weißes, filamentöses Gel und hatten einen pH-Wert von 7,7 bis 8,0. In der mikroskopischen Untersuchung erwiesen sich die gelartigen Filamente als Spermienaggregate mit verminderter Motilität, in welchen Kopf- an Kopffagglutinationen überwogen.

Auf die deutlichen Unterschiede bezüglich der Spermienkonzentration zwischen den beiden Nashornbullen wurde bereits hingewiesen. Während bei dem nicht züchtenden Bullen ‚Denny‘ die mittlere Konzentration bei der Mehrzahl der Proben nicht mehr als 15×10^6 Spermien/ml ausmachte und auch die Spermiengesamtzahl pro Ejakulat bis auf eine Ausnahme ($1,26 \times 10^9$ Spermien/Ejakulat) mit durchschnittlich $0,02 \times 10^9$ Spermien/Ejakulat (\bar{x}) sehr gering war, waren die Ejakulate des regelmäßig deckenden Bullen ‚Harry‘ vergleichsweise stark konzentriert ($117-539 \times 10^6$ Spermien/ml; $0,06-2,2 \times 10^9$ Spermien/Ejakulat; Tab. 16).

Für die Spermienparameter Motilität und Vitalität dagegen bestanden meist weder zwischen den Ejakulaten, noch zwischen den Nashornbullen Unterschiede (Tab. 16). Der Anteil anomaler Spermien betrug bei beiden Nashornbullen 15-28%. Dabei lag der Anteil primärer Anomalien meist etwas höher, als der Anteil sekundärer Anomalien. Unter den primären Anomalien überwogen unspezifische Kopfveränderungen, bei den sekundären Anomalien abgelöste Kopfkappen. Während in keiner Spermaprobe des Bullen ‚Denny‘ Zytoplasmotropfen auftraten, wurden in den Proben des Nashornbullen ‚Harry‘ bei 2 bis 6% der Spermien

zytoplasmatische Tropfen sowohl in proximaler (Abb. 12a), als auch in distaler Position (Abb. 12b) festgestellt.

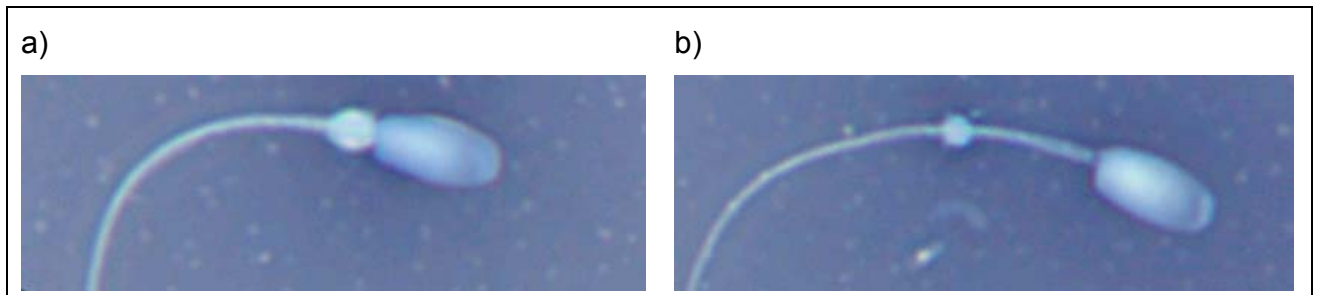


Abb. 12: Zytoplasmatische Tropfen Breimaulnashornspermien, Färbung: Bromphenolblau-Nigrosin, 100x-Objektiv, Ölimmersion
a) Proximale Position
b) Distale Position

4.1.2.2 Einfluss der Künstlichen Scheide bei pharmakologisch induzierter Erektion

Durch zusätzliche Druck- und Temperaturreize mit Hilfe einer Künstlichen Scheide wurde bei pharmakologisch unterstützten Deseminationsversuchen keine Verbesserung der Ejakulationsauslösung erzielt. Die auf zwei verschiedene Temperaturbereiche erwärmte Künstliche Scheide wurde zwar bei allen Versuchen von Nashornbulle ‚Denny‘ gut angenommen (in der Mehrzahl der Versuche erfolgten Friktionsbewegungen; Tab. 17), gegenüber der manuellen Stimulationstechnik wurden jedoch mit dieser Methode in 20 Versuchen nur drei Spermaproben mit vergleichsweise deutlich verminderter Qualität gewonnen. Zwei dieser Proben enthielten für eine exakte Konzentrationsbestimmung zu wenige Spermien und hatten nur eine Motilität von 20% (Tab. 17).

Bei allen drei Proben war unabhängig vom Temperaturbereich der Künstlichen Scheide der Anteil morphologisch anomaler Spermien mit mehr als 60% sehr hoch und umfasste vorwiegend Spermien mit in Ablösung begriffenen Kopfkappen. Zudem enthielten die drei Proben zahlreiche Partikel und Zellaggregate.

Tab. 17: Spermaparameter und quantitative Parameter bei Deseminationsversuchen mit einer Künstlichen Scheide bei Nashornbulle ‚Denny‘ (n bzw. $\bar{x} \pm SD$)

Sperma- und quantitative Parameter	Künstliche Scheide	
	42 bis 44 °C (n=10)	48 bis 50 °C (n=10)
Probennahme (n)	2	1
Volumen (ml)	1,5 ^a u. 4,5	2,0 ^a
Spermienkonzentration pro ml ($\times 10^6$)	- / 14,3	-
Motilität (%)	20 u. 65	20
Vitalität (%)	- / 69	-
Anteil anomaler Spermien (%)	> 60 u. 69	> 60
pH-Wert	8,0 u. 7,7	8,0
Friktionsbewegungen (in n Versuchen)	7	8
Dauer der Stimulation (min)	6,0 \pm 1,5	7,0 \pm 1,5
Dauer der Erektion (min)	6,0 \pm 1,5	7,0 \pm 1,5

^a Spermienzahl für exakte Bestimmung der Konzentration zu gering

Die Wirkung der applizierten Medikation auf das Verhalten bei Nashornbulle ‚Denny‘ wurde bereits ausführlich unter 4.1.2.1 beschrieben und veränderte sich nicht signifikant bei dem Gebrauch der Künstlichen Scheide. Auch für die weiteren quantitativ erhobenen Parameter bestanden bei Verwendung der Künstlichen Scheide keine signifikanten Unterschiede (Tab. 17).

4.1.3 IMPLEMENTATIONSSTUDIE

In der Hauptuntersuchung (s. 4.1.2.1) konnten von Nashornbulle ‚Harry‘ wiederholt klein-volumige, jedoch stark konzentrierte Spermaproben guter Qualität gewonnen werden. Dabei stand jedoch ein zeitlicher Rahmen zur Verfügung, der für eine spätere Anwendung der Methode in der Praxis zu aufwendig erscheint. Es bestanden aber auch Zweifel, dass die

erprobte Methode ohne vorausgehende Eingewöhnungsphase bzw. ohne mehrtägige Anwesenheit der Versuchsdurchführenden zu Erfolgen führen würde.

Zur Verifikation der praktischen Relevanz der pharmakologisch modifizierten manuellen Stimulation wurde daher eine auf zwei Tage begrenzte Implementationsstudie mit dem Ziel der Ejakulatgewinnung für eine geplante Künstliche Besamung durchgeführt⁹.

Die Studie verlief erfolgreich. Es wurden zwei Spermaproben gewonnen, von denen eine Probe eine sehr hohe Spermienkonzentration ($6,6 \times 10^9$) bei zufrieden stellender Motilität aufwies (Tab. 18). Der hohe Anteil morphologisch anomaler Spermien war vorwiegend durch beginnende Veränderungen des apikalen Akrosomenrands (44,5% bei Spermaprobe 1) bedingt.

Tab. 18: Spermaparameter^a in der Implementationsstudie durch pharmakologisch unterstützte manuelle Stimulation von Nashornbulle ‚Harry‘ gewonnener Proben

Spermaparameter	Spermaprobe 1	Spermaprobe 2
Gesamtvolumen (ml)	7,4	0,7
Anzahl der Fraktionen (n)	4	2
Spermienkonzentration pro ml ($\times 10^6$)	1520 ^b	12,5 u. 30
Spermienkonzentration pro Ejakulat ($\times 10^9$)	6,6	0,002 u. 0,01
Motilität (%)	65	70
Vitalität (%)	-	71
Anteil anomaler Spermien (%)	64	46

^a Mit Ausnahme der Vitalitätsbestimmung sowie der morphologischen Analyse der Spermaprobe 2, wurden alle Spermaparameter von Dr. S. Blottner, Institut für Zoo- und Wildtierforschung, IZW, Berlin, bestimmt

^b Wert der spermienreichsten Fraktion

Der Nashornbulle wirkte im Vergleich zur Hauptuntersuchung auch nach Medikamentenapplikation unruhig und ängstlich, jedoch muss berücksichtigt werden, dass sich der Bulle während

⁹ Das in der Implementationsstudie gewonnene Sperma, wurde von Dres. S. Blottner und R. Hermes, Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Berlin, kryokonserviert und für die Künstliche Besamung der Breitmaulnashornkuh ‚Noelle‘, Zuchtbuchnummer 0767, Zoo La Palmyre, Frankreich, verwendet.

der Versuche in einem provisorisch eingerichteten Zwangsstand befand, der erst wenige Tage vor Beginn der Studie aufgebaut wurde. Trotz geringer sexueller Erregung war die Erektion in allen Versuchen maximal ausgeprägt. Durch erhöhte Schreckhaftigkeit und Unruhe des Nashornbullen kam es wiederholt zu einem kurzzeitigen Abbruch der Erektion. Die Stimulation erfolgte mit den durch die Nervosität des Bullen bedingten Unterbrechungen für 40 bis 130 Minuten bei entsprechender Erektionsdauer.

4.2 Computergestützte Spermienkopfmorphometrie

4.2.1 DEFINITION UND BERECHNUNG DER SPERMIENKOPFKLASSEN

Die Konfiguration des Kategorien-Setups der HTM IVOS-Software erforderte die Definition und Berechnung von Spermienkopfklassen. Dazu wurden Spermienkopfabmessungen von 15 verschiedenen Breitmaulnashornbullen unabhängig von der Spermienmorphologie mit dem HTM IVOS bestimmt. Voraussetzung war eine exakte Fokussierung sowie Digitalisierung der Spermienköpfe durch das Analysegerät (Abb. 13).



Abb. 13: Fokussieren, Digitalisieren und Aufzeichnen der zu analysierenden Spermien mit dem HTM IVOS
Breitmaulnashornspermium, Färbung Farelly, mod., 100x-Objekt., Ölimmersion

Die vom HTM IVOS für die Messung der Spermienkopfparameter gezogenen Grenzlinien wurden für jeden Spermienkopf von der Autorin überprüft und gegebenenfalls korrigiert (Abb. 14).

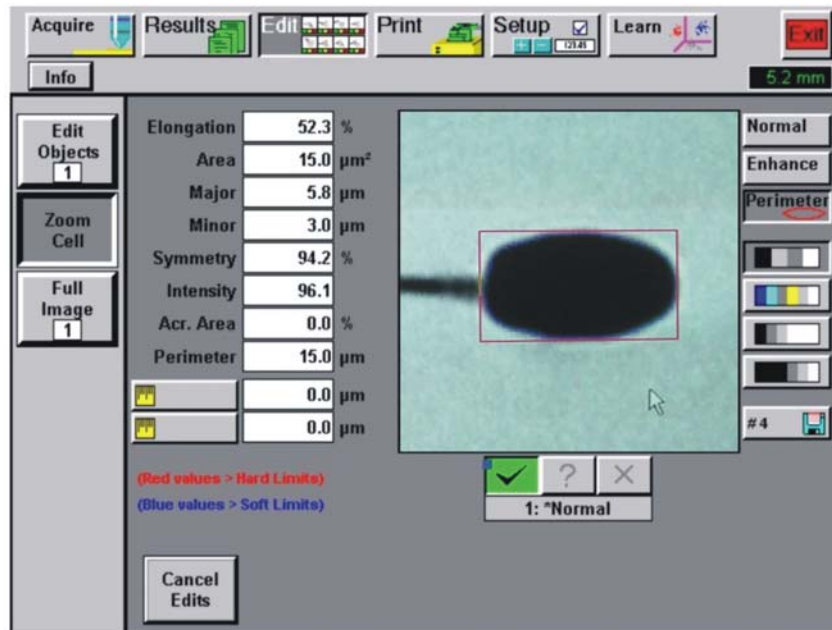


Abb. 14: Überprüfen der exakten Digitalisierung sowie der durch das HTM IVOS für die Messung der Spermienkopfparameter gezogenen Grenzlinien Breitmaulnashornspermium, Färbung Farelly, mod., 100x-Objekt., Ölimmersion

Entsprechend der Gewinnungsmethode wurde getrennt zwischen Spermaproben, die durch manuelle Stimulation (Tab. 19) bzw. durch Elektroejakulation (Tab. 20) gewonnen wurden. Die Nashornbullen wurden mit den Buchstaben A bis O bezeichnet.

Tab. 19: Metrische Spermienkopfparameter mit manueller Stimulation gewonnener Spermaproben von drei Südlichen Breitmaulnashornbullen (*Ceratotherium s. simum*; $\bar{x} \pm SD$; n= Anzahl der analysierten Spermien)

Nashorn-bulle	Länge (µm)	Breite (µm)	Elongat. (%)	Fläche (µm ²)	Umfang (µm)	Symmetrie (%)
A (n=456)	5,3 ± 0,3	2,9 ± 0,2	55,5 ± 4,0	12,7 ± 1,0	14,5 ± 0,6	90,9 ± 4,0
B (n=434)	5,3 ± 0,3	2,7 ± 0,2	52,2 ± 4,5	12,1 ± 1,0	14,2 ± 0,6	90,5 ± 4,1
C (n=450)	5,3 ± 0,3	2,8 ± 0,2	54,1 ± 4,1	12,5 ± 1,1	14,4 ± 0,6	90,2 ± 4,3
Gesamt (n=1340)	5,3 ± 0,3 ^b	2,8 ± 0,2 ^{a,b}	54,0 ± 4,4 ^{a,b}	12,4 ± 1,1 ^{a,b}	14,4 ± 0,6 ^{a,b}	90,5 ± 4,1 ^b

^a Spermienkopfparameter unterscheiden sich zwischen den Nashornbullen signifikant (p < 0,05; Kruskal-Wallis-Test)

^b Variationskoeffizient < 10%

Tab. 20: Metrische Spermienkopffparameter von Elektroejakulaten von 15 Südlichen Breitmaulnashörnern (*Ceratotherium s. simum*; Nashornbullen A-N) und einem Nördlichen Breitmaulnashorn (*Ceratotherium s. cottoni*; Nashornbulle O; $\bar{x} \pm SD$; n= Anzahl der analysierten Spermien)

Nashornbulle	Länge (μm)	Breite (μm)	Elongation (%)	Fläche (μm^2)	Umfang (μm)	Symmetrie (%)
A (n=426)	5,2 \pm 0,2	2,9 \pm 0,1	55,4 \pm 3,6	12,6 \pm 0,9	14,4 \pm 0,5	91,4 \pm 3,6
B (n=445)	5,3 \pm 0,3	2,8 \pm 0,2	52,4 \pm 4,6	12,1 \pm 1,1	14,3 \pm 0,6	90,4 \pm 4,0
C (n=499)	5,2 \pm 0,3	2,8 \pm 0,2	54,9 \pm 4,3	12,1 \pm 0,9	14,2 \pm 0,5	90,2 \pm 4,6
D (n=432)	5,4 \pm 0,4	2,8 \pm 0,2	53,0 \pm 4,6	12,6 \pm 1,4	14,5 \pm 0,7	90,5 \pm 4,4
E (n=422)	5,4 \pm 0,3	2,9 \pm 0,2	53,3 \pm 3,8	12,9 \pm 1,3	14,7 \pm 0,7	89,8 \pm 5,2
F (n=431)	5,3 \pm 0,3	2,7 \pm 0,2	50,4 \pm 3,4	11,8 \pm 1,0	14,1 \pm 0,6	90,3 \pm 3,9
G (n=403)	5,3 \pm 0,3	2,9 \pm 0,2	55,1 \pm 4,3	12,9 \pm 1,2	14,6 \pm 0,7	90,9 \pm 4,1
H (n=438)	5,6 \pm 0,3	2,9 \pm 0,2	52,3 \pm 3,6	13,7 \pm 1,2	15,1 \pm 0,6	90,3 \pm 4,1
I (n=418)	5,3 \pm 0,3	2,8 \pm 0,2	53,0 \pm 4,3	12,3 \pm 1,1	14,3 \pm 0,6	90,9 \pm 3,9
J (n=415)	5,7 \pm 0,3	2,9 \pm 0,2	51,5 \pm 2,9	14,0 \pm 1,2	15,2 \pm 0,6	91,2 \pm 4,0
K (n=418)	5,4 \pm 0,4	2,9 \pm 0,2	53,5 \pm 3,9	13,0 \pm 1,4	14,7 \pm 0,7	90,2 \pm 4,2
L (n=420)	5,2 \pm 0,3	2,8 \pm 0,2	53,7 \pm 4,1	12,1 \pm 0,9	14,2 \pm 0,5	91,3 \pm 3,9
M (n=420)	5,3 \pm 0,3	2,9 \pm 0,2	54,7 \pm 3,8	12,6 \pm 1,1	14,5 \pm 0,6	90,6 \pm 4,2
N (n=421)	5,5 \pm 0,2	2,9 \pm 0,2	52,4 \pm 3,3	13,4 \pm 1,0	14,9 \pm 0,5	90,4 \pm 3,9
O (n=433)	5,6 \pm 0,3	2,9 \pm 0,2	51,9 \pm 3,5	13,7 \pm 1,1	15,1 \pm 0,6	90,5 \pm 3,8
Gesamt (n=6393)	5,4 \pm 0,3 ^{a,b}	2,8 \pm 0,2 ^{a,b}	53,2 \pm 4,1 ^{a,b}	12,8 \pm 1,3 ^a	14,6 \pm 0,7 ^{a,b}	90,6 \pm 4,2 ^{a,b}

^a Spermienkopffparameter unterscheiden sich zwischen den Nashornbullen signifikant ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis-Test)

^b Variationskoeffizient $< 10\%$

Die gemessenen Spermienkopffparameter der verschiedenen Nashornbullen zeigten nur eine relativ kleine Streuung (Variationskoeffizient $< 10\%$). Wie der hohe Stichprobenumfang ($n > 400$ analysierte Spermien pro Breitmaulnashornbulle) erwarten ließ, bestanden teilweise zwischen den Nashornbullen signifikante Unterschiede hinsichtlich der gemessenen Spermienkopffparameter ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis-Test). Dabei unterschieden sich jedoch die Spermienkopfabmessungen einzelner Nashornbullen nur bei bestimmten metrischen Parametern um mehr als den Wert der Standardabweichung (Tab. 19 und Tab. 20).

Für die nachfolgende computergestützte Klassifikation von Spermienkopfanomalien (4.2.2) wurden fünf morphologische Klassen definiert (normaler Spermienkopf, kleiner bzw. großer Spermienkopf sowie schmaler bzw. breiter Spermienkopf; Abb. 15). Die Berechnung der Grenzwerte dieser Klassen erfolgte an Hand der morphometrischen Daten der analysierten Spermienköpfe (Tab. 19 und Tab. 20) - getrennt nach der Gewinnungsmethode.

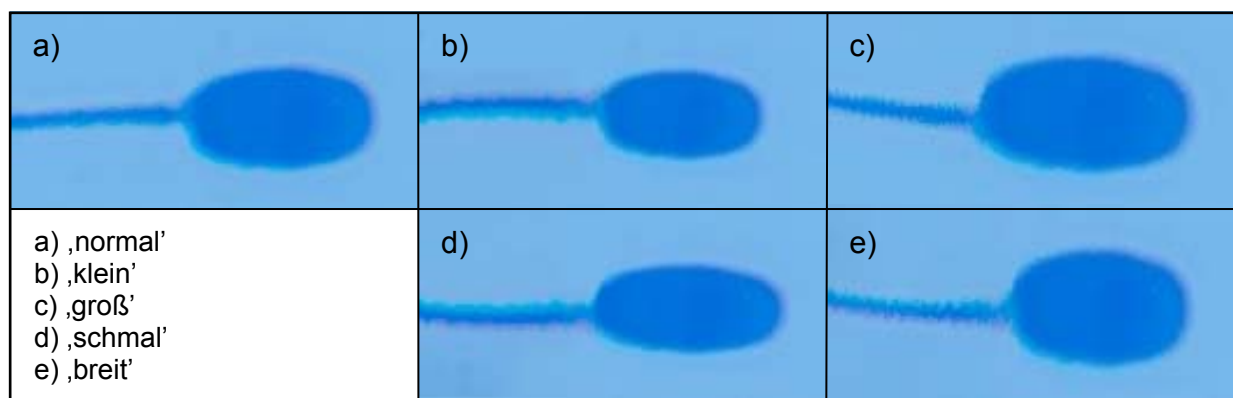


Abb. 15: Spermienkopfklassen
Breitmaulnashornspermien, Färbung Farelly, mod., 100x-Objekt., Ölimmersion

Als statistische Kenngrößen wurden das 5. und 95. Perzentil sowie der Minimum- und Maximumwert der einzelnen Spermienkopffparameter bestimmt (Tab. 21 und Tab. 22). Die Werte innerhalb des 5. und 95. Perzentils wurden als ‚normale‘ Spermienkopfabmessungen definiert. Das 5. und 95. Perzentil bildeten somit die Grenzwerte für den ‚Normbereich‘. Minimum- und Maximumwert begrenzten dagegen die Gesamtheit möglicher morphologischer Variationen. Aufgrund von Qualitätsunterschieden wurden daher die Elektroejakulate von sechs

Nashornbullen (D, F, G, I, L und M) von der Berechnung der Perzentile ausgeschlossen. Bei diesen sechs Elektroejakulaten ergab eine konventionelle morphologische Analyse einen erhöhten Anteil an Spermienanomalien (> 30%) bzw. ein gehäuftes Auftreten defekter apikaler Akrosomenränder (> 2/3 der analysierten Spermien). Bei der Bestimmung der Extrema (Minimum und Maximum) der morphologischen Klassen wurden dagegen alle Elektroejakulate berücksichtigt (vgl. Tab. 22).

Tab. 21: Statistische Kenngrößen der metrischen Spermienkopfparameter von mit manueller Stimulation gewonnenen Proben von drei Breitmaulnashornbullen (n=1340 Spermien)

Spermienkopfparameter		Minimum	5. Perzentil	95. Perzentil	Maximum
Länge	(μm)	4,4	4,8	5,8	6,5
Breite	(μm)	2,2	2,6	3,2	3,5
Elongation	(%)	38,7	46,8	61,0	70,5
Fläche	(μm^2)	9,0	10,7	14,3	17,0
Umfang	(μm)	12,4	13,4	15,4	16,5
Symmetrie	(%)	73,5	83,2	96,6	98,7

Tab. 22: Statistische Kenngrößen der metrischen Spermienkopfparameter von Elektroejakulaten von 15 Breitmaulnashornbullen (Minimum und Maximum: n=6393 Spermien; Perzentile: n=3876 Spermien)

Spermienkopfparameter		Minimum	5. Perzentil	95. Perzentil	Maximum
Länge	(μm)	4,2	4,9	5,9	6,5
Breite	(μm)	2,1	2,6	3,2	3,5
Elongation	(%)	38,8	46,8	60,0	77,3
Fläche	(μm^2)	8,4	10,9	15,1	17,2
Umfang	(μm)	11,9	13,5	15,7	16,7
Symmetrie	(%)	65,7	83,2	96,6	99,3

Für die nachfolgende morphometrische Analyse wurden die so berechneten Grenzwerte im Kategorien-Setup der HTM IVOS-Software als ‚Idealwert \pm erlaubte Abweichung‘ für die fünf morphologischen Klassen eingegeben. Als Idealwert wurde der Mittelwert der jeweiligen Grenzwerte berechnet, die Abweichung entsprach der Differenz aus dem Mittelwert und den Grenzwerten. Während die Grenzwerte der Spermienkopfkategorie ‚normal‘ durch das 5. und 95. Perzentil für alle sechs morphometrischen Parameter berechnet wurden, wurden die Grenzwerte der vier Anomalienklassen durch zwei bzw. drei Spermienkopfparameter festgelegt. Diese für eine Spermienkopfkategorie charakteristischen Parameter erstreckten sich vom ‚Normbereich‘ bis zu dem für den jeweiligen Parameter gemessenen Minimal- bzw. Maximalwert (vgl. UHLENBROCK 1999 und RAßHOFER 1999; Tab. 23 und Tab. 24).

Tab. 23: Berechnete Grenzwerte der metrischen Parameter definierter Spermienkopfklassen zur Analyse von manuell gewonnenen Spermeproben beim Breitmaulnashorn (n=1340 Spermien)

Spermienkopfkategorie	Parameter (Einheit)	Grenzwerte	Idealwert \pm Abweichung ^a
‚normal‘	Länge (μm)	4,8 - 5,8	5,3 \pm 0,5
	Breite (μm)	2,6 - 3,2	2,9 \pm 0,3
	Elongation (%)	46,8 - 61,0	53,9 \pm 7,1
	Fläche (μm^2)	10,7 - 14,3	12,5 \pm 2,8
	Umfang (μm)	13,4 - 15,4	14,4 \pm 1,0
	Symmetrie (%)	83,2 - 96,6	89,9 \pm 6,7
‚klein‘	Elongation (%)	46,8 - 61,0	53,9 \pm 7,1
	Fläche (μm^2)	9,0 - 10,6	9,8 \pm 0,8
	Symmetrie (%)	83,2 - 96,6	89,9 \pm 6,7
‚groß‘	Elongation (%)	46,8 - 61,0	53,9 \pm 7,1
	Fläche (μm^2)	14,4 - 17,0	15,7 \pm 1,3
	Symmetrie (%)	83,2 - 96,6	89,9 \pm 6,7
‚schmal‘	Elongation (%)	38,7 - 46,7	42,7 \pm 4,0
	Symmetrie (%)	83,2 - 96,6	89,9 \pm 6,7
‚breit‘	Elongation (%)	61,1 - 70,5	65,8 \pm 4,7
	Symmetrie (%)	83,2 - 96,6	89,9 \pm 6,7

^a Werte zur Konfiguration des Kategorien-Setups der HTM IVOS-Software zur Klassifizierung von Spermienkopfanomalien

Tab. 24: Berechnete Grenzwerte der metrischen Parameter definierter Spermienkopfklassen zur Analyse von Elektroejakulaten beim Breitmaulnashorn (n=6393 Spermien)

Spermienkopfkategorie	Parameter (Einheit)	Grenzwerte	Idealwert ± Abweichung ^a
,normal'	Länge (µm)	4,9 - 5,9	5,4 ± 0,5
	Breite (µm)	2,6 - 3,2	2,9 ± 0,3
	Elongation (%)	46,8 - 60,0	53,4 ± 6,6
	Fläche (µm ²)	10,9 - 15,1	13,0 ± 2,1
	Umfang (µm)	13,5 - 15,7	14,6 ± 1,1
	Symmetrie (%)	83,2 - 96,6	89,9 ± 6,7
,klein'	Elongation (%)	46,8 - 60,0	53,4 ± 6,6
	Fläche (µm ²)	8,4 - 10,8	9,6 ± 1,2
	Symmetrie (%)	83,2 - 96,6	89,9 ± 6,7
,groß'	Elongation (%)	46,8 - 60,0	53,4 ± 6,6
	Fläche (µm ²)	15,2 - 17,2	16,2 ± 1,2
	Symmetrie (%)	83,2 - 96,6	89,9 ± 6,7
,schmal'	Elongation (%)	38,7 - 46,7	42,7 ± 4,0
	Symmetrie (%)	83,2 - 96,6	89,9 ± 6,7
,breit'	Elongation (%)	60,1 - 77,3	68,7 ± 8,6
	Symmetrie (%)	83,2 - 96,6	89,9 ± 6,7

^a Werte zur Konfiguration des Kategorien-Setups der HTM IVOS-Software zur Klassifizierung von Spermienkopfanomalien

4.2.2 COMPUTERGESTÜTZTE KLASSIFIKATION VON SPERMIENKOPFANOMALIEN

Nach Definition und Berechnung der Spermienkopfklassen sowie der Konfiguration des Kategorien-Setups der HTM IVOS-Software (s. 4.2.1) wurde eine morphometrische Analyse mit computergestützter Klassifikation von Spermienkopfanomalien beim Breitmaulnashorn (*Ceratottherium simum*) durchgeführt.

Die computergestützte morphometrische Analyse erforderte bei $61 \pm 17\%$ ($\bar{x} \pm SD$) der Spermien eine Korrektur der Digitalisierung, da die vom HTM IVOS gezogenen Grenzlinien nach subjektivem Eindruck der Autorin nicht mit den tatsächlichen Spermienkopfgrenzen übereinstimmten (vgl. Abb. 13 und Abb. 14). Wichen trotz manueller Bearbeitung die Konturen

voneinander ab, so wurden die Spermien nicht klassifiziert und vom HTM IVOS als zurückgewiesen („rejected“) registriert. Fremdzellen sowie Schmutzpartikel wurden ebenfalls vom Analysegerät zurückgewiesen (vgl. Abb. 16). Weiterhin wurde die Richtigkeit der Klassifizierung der Spermienköpfe subjektiv von der Autorin überprüft (Abb. 16).

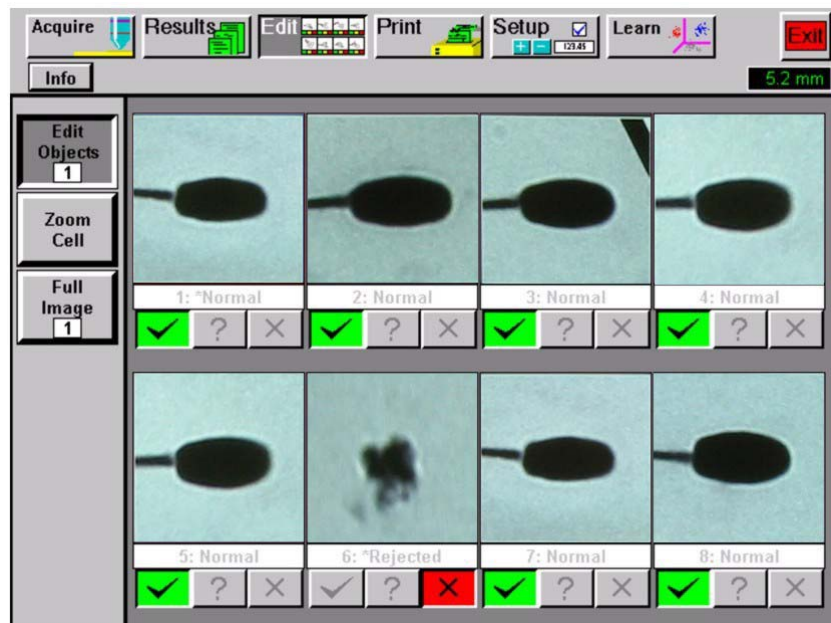


Abb. 16: Überprüfen der durch das HTM IVOS klassifizierten Spermienköpfe; Schmutzpartikel wurden vom System zurückgewiesen („rejected“) Breitmaulnashornspermien, Färbung Farelly, mod., 100x-Objekt., Ölimmersion

Die Klassifizierung bei exakter Digitalisierung wurde nur bei 1 bis 6% der Spermien korrigiert – mit Ausnahme von einem Ejakulat (Nashornbulle F), das eine Fehlerquote von 70% aufgrund eines hohen Anteils geschwollener und in Ablösung begriffener Akrosome hatte. Der aber ansonsten von der Autorin subjektiv als falsch klassifizierte geringe Anteil an Spermien, war in der Mehrzahl der Fälle (91%) auf eine schräge Ausrichtung oder auf Überlappungen der Spermienköpfe zurückzuführen. Geschwollene Kopfkappen führten mit Ausnahme des Elektroejakulats des Nashornbullens F nur zu einem vergleichsweise geringen Teil (9%) zu einer abweichenden Klassifizierung der Kopfform. Die genannten Faktoren ergaben vor allem für die Parameter Elongation und Fläche fehlerhafte Werte, die somit zu einer falschen

Kategorisierung einzelner Spermienköpfe führten. Diese Spermien wurden bei der Klassifizierung nicht berücksichtigt und zurückgewiesen.

Die computergestützte Spermienkopfanalyse ergab für die mit manueller Stimulation gewonnenen Ejakulate (n=17) der Nashornbullen A, B und C einen Anteil ‚normaler‘ Spermienköpfe von 92 bis 96% (Tab. 25). Die abnormen Kopfformen waren mit prozentualen Anteilen von durchschnittlich 1 ± 1 (‚breiter‘ Spermienkopf) bzw. 2 ± 1 (‚kleiner‘, ‚großer‘ sowie ‚schmaler‘ Spermienkopf; $\bar{x} \pm SD$) in einem annähernd gleichen Verhältnis über die vier definierten Anomalienklassen (vgl. Abb. 15) verteilt.

Bei den Elektroejakulaten (n=17) der 15 Breitmaulnashornbullen (A bis O) schwankte der Anteil der ‚normal‘ klassifizierten Spermienköpfe in Abhängigkeit vom Bullen zwischen 84 und 96% (Tab. 26). Der durchschnittliche prozentuale Anteil primärer Spermienkopfanomalien betrug weniger als 10% (9 ± 4 ; $\bar{x} \pm SD$), bei in etwa gleichmäßiger Verteilung über die vier definierten Anomalienklassen (Tab. 26).

Tab. 25: Ergebnisse der morphometrischen Spermienkopfanalyse mit dem HTM IVOS beim Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*) 17 mit manueller Stimulation gewonnene Ejakulate von drei Nashornbullen (A: n=10; B: n=6; C: n=1; $\bar{x} \pm SD$)

Bulle	Analysierte Spermien n	Nicht klassif. Spermien ^a %	Klassifizierte Spermienkopfformen %					Σ Anomalien
			„normal“	„klein“	„groß“	„schmal“	„breit“	
A	2060	33 ± 5	92 ± 3	2 ± 1	2 ± 1	3 ± 1	1 ± 1	8 ± 3
B	1029	36 ± 4	94 ± 2	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	6 ± 2
C	204	27	96	2	1	2	0	4
Gesamt (n=3293)		33 ± 5	93 ± 3	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	7 ± 3

^a Spermien, deren Grenzlinien trotz Korrektur der Digitalisierung nicht mit dem Spermienkopf übereinstimmten, wurden bei der Klassifizierung der Spermienkopfformen nicht berücksichtigt und vom HTM IVOS als zurückgewiesen („rejected“) registriert.

Tab. 26: Ergebnisse der morphometrischen Spermienkopfanalyse mit dem HTM IVOS beim Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*)
17 Elektroejakulate von 15 Nashornbullen

Bulle	Analysierte Spermien n	Nicht klassif. Spermien ^a % (n)	Klassifizierte Spermienkopfformen % (n)					Σ Anomalien
			‚normal‘	‚klein‘	‚groß‘	‚schmal‘	‚breit‘	
A	203	32 (65)	91 (126)	3 (4)	2 (3)	3 (4)	1 (1)	9 (12)
B	207	35 (72)	94 (127)	0 (0)	2 (3)	2 (3)	2 (2)	6 (8)
C	406 ^b	30 (122)	94 (267)	2 (6)	1 (3)	3 (8)	0 (0)	6 (17)
D	206	32 (66)	84 (118)	4 (6)	6 (8)	3 (4)	3 (4)	16 (22)
E	205	12 (25)	91 (164)	2 (3)	1 (2)	4 (8)	2 (3)	9 (16)
F	212	70 (148)	86 (55)	0 (0)	1 (1)	8 (5)	5 (3)	14 (9)
G	202	31 (63)	88 (122)	2 (3)	2 (3)	3 (4)	5 (7)	12 (17)
H	200	19 (38)	91 (147)	1 (2)	0 (0)	4 (7)	4 (6)	9 (15)
I	207	54 (112)	91 (86)	1 (1)	2 (2)	5 (5)	1 (1)	9 (9)
J	206	23 (47)	86 (137)	0 (0)	1 (2)	7 (11)	6 (9)	14 (22)
K	203	26 (53)	96 (144)	1 (2)	1 (1)	1 (1)	1 (2)	4 (6)
L	409 ^b	37 (151)	92 (237)	1 (2)	0 (0)	3 (7)	4 (10)	8 (21)
M	205	17 (35)	96 (163)	1 (2)	0 (0)	2 (3)	1 (1)	4 (7)
N	202	68 (137)	89 (58)	3 (2)	3 (2)	0 (0)	5 (3)	11 (7)
O	207	12 (25)	93 (169)	1 (2)	2 (4)	1 (2)	3 (5)	7 (13)
Gesamt (n=3480)		33 ± 18 ^c	91 ± 4 ^c	1 ± 1 ^c	2 ± 2 ^c	3 ± 2 ^c	3 ± 2 ^c	9 ± 4 ^c

^a Spermien, deren Grenzlinien trotz Korrektur der Digitalisierung nicht mit dem Spermienkopf übereinstimmten, wurden bei der Klassifizierung der Spermienkopfformen nicht berücksichtigt und vom HTM IVOS als zurückgewiesen („rejected“) registriert.

^b 2 Elektroejakulate

^c $\bar{x} \pm SD$

5 DISKUSSION

Das Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*) wird in der ‚Roten Liste der bedrohten Arten‘ geführt. Der internationale Handel mit Nashörnern sowie mit deren Produkten unterliegt dem Reglement des Washingtoner Artenschutzabkommens (vgl. <http://www.cites.org>). Während jedoch die Population der südlichen Unterart (*Ceratotherium s. simum*) mehr als 12000 Individuen umfasst, beschränkt sich der Bestand der nördlichen Unterart (*Ceratotherium s. cottoni*) auf gegenwärtig 40 Tiere und wird als „kritisch gefährdet“ eingestuft (EMSLIE & BROOKS 1999, IUCN/SSC Af/AsRSG & FOOSE 2001).

Die Reproduktionsrate der in zoologischen Institutionen gehaltenen Breitmaulnashörner ist sehr niedrig. Dies betrifft insbesondere die F1- und F2-Generation. Die *ex-situ* Populationen sind nicht selbst erhaltend (OCHS 2001). Um stabile Bestände von dieser im Freiland gefährdeten Tierart in zoologischen Einrichtungen garantieren zu können, erscheint ein besseres Verständnis der Reproduktionsbiologie dieser Spezies erforderlich.

Während bei weiblichen Nashörnern eine gynäkologische Untersuchung mit nicht-invasiven endokrinologischen und sonographischen Methoden bereits etabliert ist, erfordert die andrologische Forschung vorrangig zuverlässige Deseminationsmethoden, die regelmäßige Ejakulatanalysen erlauben. Eine dadurch mögliche Beurteilung des Reproduktionsstatus einzelner Individuen könnte sowohl eine fundierte Basis für Managemententscheidungen zur Förderung der natürlichen Fortpflanzung, als auch für die Weiterentwicklung assistierter Reproduktionstechniken bei dieser Tierart bilden (z.B. HERMES et al. 2001b, ROTH 2001, SCHWARZENBERGER et al. 1999, 2001).

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Eignung bzw. des Einflusses pharmakologisch unterstützter Deseminationsmethoden beim Breitmaulnashorn. Dazu wurden die beim Nashorn nur bedingt erfolgreichen Techniken der manuellen Stimulation (z.B. HERMES et al. 2001a, O'BRIEN & ROTH 2000, SCHAFFER et al. 1990, 2001b) und der Spermagewinnung mit einer Künstlichen Scheide (vgl. EYRES et al. 2001, HERMES et al.

2001a, SCHAFFER et al. 1990, YOUNG 1967) durch eine vorherige Medikamentenapplikation modifiziert.

Als Medikation wurde der α_2 -Agonist Detomidinhydrochlorid, nachfolgend als Detomidin bezeichnet, intramuskulär injiziert. Durch die Kombination mit dem partiellen Opioidagonisten Butorphanol ließ sich dessen α -adrenerge Wirkung verstärken (vgl. FREY et al. 1996). Beide Medikamente werden beim Nashorn in der Anästhesie eingesetzt und als sicher beurteilt (z.B. ATKINSON et al. 2002, KOCK et al. 1995, RADCLIFFE et al. 2000a, b, WALZER et al. 2001).

Die Möglichkeit, den Ejakulationsablauf pharmakologisch mit α -adrenergen Substanzen zu beeinflussen, ist vielfach beschrieben (z.B. EPPEL & BERZIN 1984) und wurde zunächst in der Humanmedizin zur Behandlung von Ejakulationsstörungen des Mannes genutzt (z.B. BROOKS et al. 1980, EPPEL & BERZIN 1984, KELLY & NEEDLE 1979). Auch in der Tiermedizin wurde wiederholt über eine pharmakologische Ejakulationsinduktion bei Hengsten berichtet (CARD et al. 1997, McDONNELL et al. 1987, McDONNELL 1999, McDONNELL & LOVE 1991, McDONNELL & ODIAN 1994, McDONNELL & TURNER 1994, TURNER et al. 1995).

Innerhalb der Taxonomie der Säugetiere stehen sich Nashorn und Pferd vergleichsweise nahe (REMANE et al. 1986). Auch der anatomische Bau der männlichen Geschlechtsorgane weist Ähnlichkeiten bei beiden Familien auf (s. 1.2.2). Insofern bietet es sich an, die bei Hengsten eingesetzte Methode der pharmakologischen Ejakulationsinduktion auch beim Nashornbullen auf ihre Eignung zu überprüfen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer Doppelblindstudie, die mit zwei Nashornbullen unterschiedlichen Alters und Zuchtstatus durchgeführt wurde, ein deutlicher positiver Einfluss von Detomidin und Butorphanol auf Verlauf bzw. Erfolg von Deseminationsversuchen bei manueller Stimulation des äußeren Genitales nachgewiesen. Gegenüber einer Placebogabe führte die Medikation bei den Nashornbullen nicht nur häufiger zu einer Gewinnung von Sperma guter Qualität, sondern erleichterte zudem den Versuchsablauf. Dabei kam es in der Mehrzahl der Versuche zu einem Ausschachten des Penis mit nachfolgender Erektion, noch

bevor mit der manuellen Stimulation begonnen wurde. Auch die Erektionsdauer und –stärke wurden durch die α -adrenerge Medikation signifikant beeinflusst ($p < 0,001$). Die Nashornbul-
len verhielten sich zudem bei pharmakologischer Unterstützung signifikant ruhiger und koope-
rativer ($p < 0,05$).

Bei einem Nashornbul-
len wurden Ejakulationen ausschließlich bei manueller Stimula-
tion mit α -adrenerger Medikation ausgelöst. Allerdings waren mehrere Versuche für die
Gewinnung von einem Ejakulat erforderlich. Dieses Problem bestand auch bei mehreren Nas-
hornbul-
len in Untersuchungen von HERMES et al. (2001a), O'BRIEN & ROTH (2000) sowie
SCHAFFER et al. (2001b), die bei alleiniger manueller Stimulation nicht regelmäßig bzw. teil-
weise gar nicht ejakulierten.

Keine Verbesserung der Ejakulationsauslösung wurde mit einer Künstlichen Scheide
bei pharmakologisch induzierter Erektion erzielt. Das Modell, das an die anatomischen
Besonderheiten des Nashornpenis angepasst war, wurde zwar von den Nashornbul-
len gut
angenommen, führte aber nur vereinzelt zu einer Spermagewinnung. Bei einem der beiden
Nashornbul-
len kühlte die temperierte Scheide während der lang anhaltenden Erektionen deut-
lich ab.

Alle Deseminationsversuche wurden in engen Kontakt mit den Nashornbul-
len durchge-
führt. Eine wichtige Voraussetzung für einen sicheren, risikoarmen Versuchsablauf war die
Installation eines Zwangsstands. Im Allwetterzoo Münster, wo zunächst Versuche in direktem
Kontakt mit dem Nashornbul-
len durchgeführt wurden, ließ sich mit einer einfachen Konstruk-
tion das Risiko für die Versuchsdurchführenden deutlich senken. In Anlehnung an einen im
Zoo Salzburg entwickelten Zwangsstandtyp (s. Anhang S. 2-3), der bei Bedarf in einer Box
eingerichtet werden kann, wurde mit vertikalen Stahlsäulen die seitliche Bewegungsfreiheit
des Nashornbul-
len eingeschränkt. Die Halbierung der Säulen im hinteren Bereich des Stands
ermöglichte einen ungehinderten Zugang zu der Inguinalregion des Nashorns. Abweichend
von der Forderung amerikanischer Autoren nach Zwangsständen, deren Höhe die Körper-
größe des Tieres deutlich überschreiten soll (SCHAFFER et al. 1998b), war die niedrige

Konstruktion des Stands durch den weniger eingeschränkten Zugang zum Tier zweckmäßig, dabei sicher und durch die Materialersparnis vergleichsweise kostengünstig.

Bei den meisten Nashornbullen erscheint eine Gewöhnung durch regelmäßiges Training über einen längeren Zeitraum erforderlich, bis sie sich ruhig im Zwangsstand verhalten und Manipulationen am Genitaltrakt zuverlässig durchgeführt werden können. Dies kann durch operante Konditionierung mit positiver Bestärkung unterstützt werden (vgl. MICHEL & ILLIG 1995, NICHOLSON 1996, SHAFFSTALL 2000 etc.). Ein entschiedener Vorteil pharmakologisch unterstützter Deseminationsversuche besteht in diesem Zusammenhang in der leicht sedierenden Wirkung der α -adrenergen Medikation. Dennoch ist die Methode nicht für jedes Individuum geeignet. Bei einem Nashornbullen mussten, wegen aggressiven Verhaltens des Tieres und damit verbundenen Risiken für die Versuchsdurchführenden, die Untersuchungen in der Vorversuchsphase abgebrochen werden. Dieses Problem besteht nicht bei einer Spermagewinnung mit rektaler Elektrostimulation, die eine zuverlässige Gewinnung vollständiger Ejakulate bei beliebigen Nashornbullen ohne Eingewöhnungsphase der Tiere ermöglicht (HERMES et al. 2001a, HILDEBRANDT et al. 2002). Allerdings ist diese Methode wegen der erforderlichen Anästhesie nicht für regelmäßige Deseminationen geeignet (SCHAFFER & BEEHLER 1988, WALZER et al. 2000).

Über die physiologische Beschaffenheit des Ejakulats beim Nashorn ist aufgrund der aufwendigen Spermagewinnung nur wenig bekannt. Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bestand daher in einer konventionellen Analyse der gewonnenen Spermaproben.

Dabei wurden deutliche Unterschiede hinsichtlich der Spermaquantität und –qualität zwischen den angewandten Methoden sowie zwischen den Nashornbullen offen gelegt. Während mit der Künstlichen Scheide auch bei Medikamentenapplikation nur wenige Spermaproben von verminderter Qualität und einem hohen Fremdzellgehalt gewonnen wurden, führte die manuelle Stimulation unter dem Einfluss der α -adrenergen Medikation zu einer Gewinnung von Ejakulaten guter Qualität.

Mit Ausnahme eines aus drei Fraktionen bestehenden Ejakulats mit einem Volumen von 23 ml, umfassten die Spermaproben jedoch nur wenige Milliliter. Zu ähnlichen Ergebnissen führten manuelle Stimulationsversuche ohne Medikation von HERMES et al. (2001a) bei zwei Breitmaulnashornbullen. Über die Gewinnung großvolumiger (bis zu 164 ml) Ejakulate bei manueller Stimulation dagegen berichten SCHAFFER et al. (1990, 1991) beim Indischen Panzernashorn (*Rhinoceros unicornis*) und Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis*). Derart großvolumige Ejakulate sind jedoch in der Regel auf eine Kontamination mit Urin zurückzuführen und werden in Einzelfällen auch bei Elektroejakulaten durch eine versehentliche Stimulation der Harnblase oder durch eine Überstimulation der Geschlechtsdrüsen verursacht (HERMES et al. 2001a). Angesichts der beträchtlichen Länge des weiblichen Genitaltrakts (z.B. GODFREY et al. 1991, SCHAFFER et al. 2001a) und den Beobachtungen von OWEN-SMITH (1988), die auf eine mehrphasige Ejakulation während der sehr langen Kopulationsdauer bei dieser Tierart schließen lassen, würden Volumina in der Größenordnung der beim Hengst gewonnenen Ejakulate (z.B. WEITZE 2001c) von 20 bis 120 ml erwartet.

Eine mögliche Ursache für die Gewinnung unvollständiger Ejakulate bei den pharmakologisch unterstützten Deseminationsversuchen könnte das Fehlen eines Sprungpartners sein. Jedoch ist beispielsweise beim Hengst eine erfolgreiche Spermagewinnung am stehenden Tier beschrieben (z.B. FORNEY & McDONNELL 1999, SCHUMACHER & RIDDELL 1986). Zudem führten selbst riskante Studien mit Nashörnern, bei denen ein Aufsprung des Bullen auf eine Kuh erfolgte und der erigierte Penis z.B. in eine Künstliche Scheide abgelenkt wurde, zu keiner Spermagewinnung (GÖLTENBOTH 1986, YOUNG 1967).

Eine weiterführende biochemische Analyse des Seminalplasmas (z.B. MANN 1964, MORTIMER 1994) unvollständiger Ejakulate könnte Aufschluss über Art und Umfang der Beteiligung der akzessorischen Geschlechtsdrüsen geben.

Die mit pharmakologischer Unterstützung gewonnenen Ejakulate enthielten Spermien in sehr unterschiedlicher Konzentration ($2,3 - 1520 \times 10^6/\text{ml}$ sowie $0,002 - 6,6 \times 10^9/\text{Ejakulat}$). In diesem Zusammenhang wurden große individuelle Unterschiede zwischen den Nashornbullen deutlich. Gegenüber den Spermaproben des älteren, libidoschwachen Bullen waren die

Ejakulate des jüngeren, regelmäßig deckenden Nashornbullen um ein Vielfaches höher konzentriert. Dies steht in Gegensatz zu den Ergebnissen einer Studie von HERMES et al. (2001a), wonach bei älteren Tieren signifikant höhere Spermakonzentrationen bestimmt wurden. Diese Ejakulate wurden jedoch mit Elektrostimulation gewonnen.

Detaillierte Angaben über die Spermienkonzentration von mit manueller Stimulation ohne Medikation gewonnener Ejakulate beim Breitmaulnashorn gibt eine Untersuchung von HERMES et al. (2001a). Dabei wurde eine durchschnittliche Spermiengesamtzahl von $0,26 \times 10^9$ /Ejakulat (\bar{x} ; n=20) ermittelt. Im Vergleich dazu, wiesen die vorwiegend mit pharmakologischer Unterstützung gewonnenen Proben des älteren Bullen eine um den Faktor 10 geringere Spermiengesamtzahl auf ($0,03 \times 10^9$ /Ejakulat; \bar{x} ; n=11). Eine Ausnahme bildete ein aus drei Fraktionen bestehendes Ejakulat mit $1,26 \times 10^9$ Spermien. Die Ejakulate des jüngeren Bullen waren im Vergleich zu den Ergebnissen von HERMES et al. (2001a) wesentlich stärker konzentriert ($1,7 \pm 2,5 \times 10^9$ /Ejakulat; $\bar{x} \pm SD$; n=6) und ähnelten der Spermiengesamtzahl von Elektroejakulaten ($2,37 \pm 0,8 \times 10^9$ /Ejakulat; $\bar{x} \pm SEM$; n=17; HERMES et al. 2001a). Eine Probe enthielt sogar $6,6 \times 10^9$ Spermien und eignete sich zur Kryokonservierung¹⁰ und für künstliche Besamungszwecke.

Als weiterer Parameter wurde die Spermienmotilität geschätzt und der Anteil vitaler sowie anomaler Spermien bestimmt. Die Motilität betrug für die meisten Spermaproben zwischen 65 und 75%, der prozentuale Anteil vitaler Spermien lag in der Regel geringfügig höher.

Die Mehrzahl der Ejakulate enthielt weniger als 30% anomale Spermien und entsprach damit den an Hengstejakulaten gestellten Mindestanforderungen (WEITZE 2001c). In zwei Proben wurde jedoch ein hoher Prozentsatz geschwollener sowie in Ablösung begriffener Kopfkappen festgestellt. Derartige Veränderungen des apikalen Akrosomenrands entstehen im Verlauf von Alterungsprozessen (WEITZE 2001a) und könnten durch eine suboptimale Temperatur des Auffangtrichters bedingt sein. Zwar wurden die Auffanggefäße auf 37 °C

¹⁰ Die Kryokonservierung erfolgte durch Dres. S. Blottner und R. Hermes, Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Berlin.

temperiert und isoliert, jedoch ist bei niedrigen Umgebungstemperaturen ein Abkühlen möglich. Der Austausch des Trichters gegen eine Auffangvorrichtung mit geringerer Wärmeleitfähigkeit könnte diese Problematik vermindern (KRAUSE & HERMES 2003, unveröffentlichte Daten).

Um weitere Informationen über die Spermienmorphologie beim Breitmaulnashorn zu erhalten, wurden die in der vorgestellten Untersuchung manuell gewonnenen Spermaproben sowie Elektroejakulate¹¹ von 15 Breitmaulnashornbullen, darunter auch ein Bulle der nördlichen Unterart, morphometrisch analysiert. In verschiedenen Studien an anderen Tierarten konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Anteil anomaler Spermien eines Ejakulats und den Konzeptionsergebnissen festgestellt werden. Hinsichtlich der zu erwartenden Fertilität sind dabei vorrangig Veränderungen des Spermienkopfes von Bedeutung (z.B. JASKO et al. 1990, LEIDL et al. 1971, STOLLA et al. 1978, STOLLA 1984).

Metrische Daten von Nashornspermien beschränken sich bislang auf die Arten Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis*; O'BRIEN & ROTH 2000, PLATZ et al. 1979) und Sumatranashorn (*Dicerorhinus sumatrensis*; O'BRIEN & ROTH 2000) und wurden durch die Vermessung von jeweils zehn Spermien pro Probe mit direkter Mikrometrie mit einem skalierten Objektträger erfasst.

In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen eine computergestützte Analyse mit dem Hamilton Thorne Morphology Analyzer IVOS (integrated visual optical system), nachfolgend als HTM IVOS bezeichnet, durchgeführt. Das für die Untersuchung von Humanejakulaten entwickelte System wurde bisher in der Veterinärmedizin für die Analyse von Hengstspermien (CASEY et al. 1997, GRAVANCE et al. 1996, UHLENBROCK 1999) und Bullenspermien (HAKE 2001, RAßHOFER 1999, WU, unveröffentlichte Daten) eingesetzt. Während das HTM IVOS ausschließlich die Vermessung von Spermienköpfen erlaubt, sehen andere Systeme auch eine Beurteilung des Spermatozoenschwanzes vor. Die Genauigkeit dieser Zusatz-

¹¹ Die Elektroejakulate wurden von Dres. T. B. Hildebrandt, F. Göritz und R. Hermes, Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Berlin, gewonnen.

funktion wird jedoch in Abhängigkeit des verwendeten Systems sehr unterschiedlich beurteilt. So war in einer Studie von THURSTON et al. (1999) eine präzise Bestimmung der Schwanzlänge möglich, Untersuchungen mit einem anderen Gerätetypus dagegen führten zu keinen zufrieden stellenden Ergebnissen (z.B. STEIGERWALD & KRAUSE 1998).

Das HTM IVOS ist serienmäßig mit einem Objektträgertischsystem ausgestattet, das nur die Betrachtung eines geringen Teilausschnitts des Ausstrichpräparats entlang der zentralen Längsachse erlaubt. Um auch Spermienköpfe anderer Areale des Objektträgers in die Untersuchung mit einbeziehen zu können, war eine technische Modifikation des Systems erforderlich. Ein von der Autorin entwickelter spezieller Tischaufsatz ermöglichte die Untersuchung aller Areale des Ausstrichpräparats.

Die mit dem HTM IVOS für das Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*) gemessenen Spermienköpfe waren durchschnittlich $5,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$ lang und $2,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$ breit ($\bar{x} \pm \text{SD}$; $n = 7733$ analysierte Spermien). Zwischen den einzelnen Nashornbullen bestanden für die gemessenen Spermienkopfparameter teilweise signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Allerdings ist ungewiss, ob die prozentual gesehen eher kleinen Differenzen (Variationskoeffizient $< 10\%$) biologisch relevant sind. Es ist anzunehmen, dass sich diese relativ kleine Streuung der Spermienkopfdimensionen auf Grund des hohen Stichprobenumfangs ($n > 400$ analysierte Spermien pro Breitmaulnashornbulle) als signifikant herausstellt. Als eine mögliche andere Ursache sind eventuelle methodische Faktoren in Betracht zu ziehen (vgl. BOERSMA et al. 1999, RAßHOFER 1999 und UHLENBROCK 1999).

Innerhalb der Familie der *Rhinocerotidae* entsprechen die für das Breitmaulnashorn gemessenen Spermienkopfdimensionen in etwa den beim Sumatranashorn ermittelten Werten (O'BRIEN & ROTH 2000). Die beim Spitzmaulnashorn bestimmten Spermienköpfe waren vergleichsweise größer (O'BRIEN & ROTH 2000, PLATZ et al. 1979). Jedoch basieren die metrischen Daten der beiden anderen Nashornarten auf einem sehr geringen Probenumfang ($n=10$ Spermien pro Ejakulat) und wurden mit konventionellen Methoden erhoben.

Die Spermienkopfmorphometrie des Breitmaulnashorns ähnelte innerhalb der Hausäugetiere den Größenverhältnissen beim Hengst (vgl. z.B. CASEY et al. 1997, DAVIS et al.

1993, GRAVANCE et al. 1996, UHLENBROCK 1999). Zudem zeigten die analysierten Breitmaulnashornpermien eine abaxiale Position des Schwanzes – ein Charakteristikum, das auch für Hengstpermien beschrieben wurde (z.B. HANCOCK 1957).

Die Durchführung einer computergestützten Klassifizierung von Spermienkopfanomalien mit dem HTM IVOS erforderte die Definition und Konfiguration verschiedener morphologischer Klassen innerhalb der Computer-Software. An Hand von statistischen Kenngrößen der metrischen Spermienkopfparameter (5. und 95. Perzentil sowie Minimal- und Maximalwert) wurden - in Anlehnung an die Methode von RAßHOFER (1999) und UHLENBROCK (1999) - Grenzwerte für fünf morphologische Spermienkopfklassen berechnet.

Die Klassifizierung der Spermienköpfe durch das HTM IVOS wurde von der Autorin überprüft und erfolgte bei richtiger Digitalisierung zuverlässig. Der Anteil subjektiv als falsch klassifizierter Spermien lag zwischen 1 und 6% und war in der Mehrzahl der Fälle auf eine schräge Ausrichtung oder auf Überlappungen der Spermienköpfe sowie zu einem geringeren Teil auf Veränderungen des apikalen Akrosomenrands zurückzuführen. Jedoch war bei $61 \pm 17\%$ ($\bar{x} \pm SD$) der Spermien eine zeitaufwändige Korrektur der Digitalisierung erforderlich, da die vom HTM IVOS gezogenen Grenzlinien nach subjektivem Eindruck der Autorin nicht mit den tatsächlichen Spermienkopfgrenzen übereinstimmten. Gegenüber einer mit dem HTM IVOS durchgeführten Analyse von Hengstpermien, bei der maximal $25,6 \pm 9,9\%$ Digitalisierungsfehler auftraten (UHLENBROCK 1999), war dieser Anteil sehr hoch und könnte eventuell durch eine Waschung der Spermien sowie einer Verringerung der Spermienkonzentration vor der Anfertigung der Ausstrichpräparate gesenkt werden (vgl. RAßHOFER 1999, UHLENBROCK 1999).

Zwischen den Ejakulaten der 15 Breitmaulnashornbullen bestanden relativ große Unterschiede hinsichtlich des Anteils anomaler Kopfformen, der zwischen 4 und 16% schwankte. Bei anderen Tierarten wird der maximal vertretbare Anteil an Kopfveränderungen mit etwa 5% angegeben (WEITZE 2001a). Im Gegensatz zu Nutztieren, bei denen umfassende Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Spermienmorphometrie und der Fertilität durchgeführt werden können (z.B. HIRAI 2000), ist dies beim Breitmaulnashorn aufgrund der

geschilderten Problematik nicht möglich. Daher ist gegenwärtig eine Interpretation morphometrischer Ergebnisse bei dieser Tierart nur im Kontext weiterer Spermaparameter zulässig.

Schlussfolgerung:

Durch eine pharmakologische Unterstützung der manuellen Stimulationstechnik mit Detomidin und Butorphanol ist beim Breitmaulnashorn die Gewinnung kleinvolumiger, jedoch hoch konzentrierter Spermaproben möglich. Bezüglich der Häufigkeit der Spermagewinnung und der Spermaqualität bestehen deutliche individuelle Unterschiede. Untersuchungen, die über den Rahmen dieser Dissertation hinausgehen, deuten darauf hin, dass in diesem Zusammenhang das soziale Umfeld einen entscheidenden Faktor hinsichtlich der Fertilität eines Nashornbullens darstellt (HERMES 2003, persönliche Mitteilung).

Die α -adrenerge Medikation eignet sich für eine regelmäßige Spermagewinnung bei dieser Tierart, jedoch sind mehrere Versuche erforderlich, um ein Ejakulat zu gewinnen. Wichtige Voraussetzungen für eine sichere, risikoarme Versuchsdurchführung sind die Einrichtung eines Zwangsstands sowie die Gewöhnung der Nashornbullen an die Manipulationen.

Pharmakologisch unterstützte Deseminationsversuche bei der Verwendung einer Künstlichen Scheide führten dagegen nur selten zu einer Spermagewinnung. Nicht zuletzt aufgrund der bei Nashornbullen mitunter langen Erektionsdauer, erscheint diese Methode für eine Spermagewinnung bei dieser Tierart ungeeignet.

Die computergestützte Spermienkopfmorphometrie mit dem HTM IVOS ermöglichte die Erfassung einer großen Anzahl metrischer Daten und die Beschreibung von Spermienkopfdimensionen beim Breitmaulnashorn. Eine Klassifizierung von Spermienkopfanomalien durch das Analysegerät erfolgte nach Definition und Konfiguration verschiedener morphologischer Kategorien. Da Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Morphometrie und Fertilität bei dieser Tierart zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht durchführbar sind, besitzen die Analyseergebnisse bezüglich der Befruchtungsfähigkeit lediglich hinweisenden Charakter.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Pharmakologisch unterstützte manuelle Spermagewinnung und computergestützte Spermienkopfmorphometrie beim Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*)

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung bzw. der Einfluss pharmakologisch unterstützter Deseminationsmethoden beim Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*) untersucht. Die so gewonnenen Spermaproben wurden einer konventionellen Ejakulatanalyse unterzogen. Darüber hinaus wurden computergestützt metrische Spermienkopfdimensionen bei 15 Breitmaulnashornbullen bestimmt und eine morphometrische Ejakulatanalyse durchgeführt.

Als Medikation wurden der α_2 -Agonist Detomidinhydrochlorid (*Domosedan*®) und der partielle Opioidagonist Butorphanol (*Butomidor*®) intramuskulär appliziert. Wichtige Voraussetzungen für eine sichere, risikoarme Versuchsdurchführung waren die Einrichtung eines Zwangsstands sowie die Gewöhnung der Nashornbullen an die Manipulationen.

In einer Doppelblindstudie, die mit zwei Breitmaulnashornbullen unterschiedlichen Alters und Zuchtstatus durchgeführt wurde, konnte ein deutlicher positiver Einfluss der α -adrenergen Medikation auf den Verlauf bzw. den Erfolg von manuellen Deseminationsversuchen nachgewiesen werden. Die Medikation erleichterte die manuelle Stimulation des äußeren Genitales und förderte die Ejakulationsauslösung bei beiden Nashornbullen. Dennoch erwies sich die pharmakologisch unterstützte manuelle Desemination als relativ zeitaufwendig. Die Gewinnung einer Spermaprobe erforderte meist mehrere Versuche. Pharmakologisch unterstützte Deseminationsversuche mit einer Künstlichen Scheide führten dagegen nur selten zu einer Ejakulationsauslösung.

Zwischen den angewandten Deseminationsmethoden bestanden jedoch nicht nur Unterschiede in der Häufigkeit der Spermagewinnung, sondern auch in der Spermaqualität. Zudem wurden individuelle Unterschiede zwischen den Nashornbullen beobachtet. Die mit pharmakologisch unterstützter manueller Stimulationstechnik gewonnenen Ejakulate waren unvollständig, umfassten meist nur wenige Milliliter (0,5 bis 9,0 ml, in einem Fall 23 ml), waren dabei jedoch teilweise hoch konzentriert (Gesamtspermienzahl bis zu $6,6 \times 10^9$ /Ejakulat) und

von guter Qualität. Spermaproben, die dagegen nur in Einzelfällen mit einer künstlichen Scheide gewonnen wurden, hatten eine deutlich verminderte Qualität und enthielten zudem zahlreiche Partikel und Zellaggregate. Die Verwendung einer künstlichen Scheide erscheint daher nicht zuletzt aufgrund der bei Nashornbullen mitunter langen Erektionsdauer für die Ejakulationsauslösung bei dieser Tierart ungeeignet.

Die Bestimmung metrischer Spermienkopfdimensionen beim Breitmaulnashorn basierte auf der computergestützten Untersuchung von Ejakulaten von 15 Nashornbullen, die mit pharmakologisch unterstützter manueller Stimulation sowie durch Elektrostimulation gewonnen wurden. Mit dem Hamilton Thorne Morphology Analyser IVOS wurden sechs metrische Spermienkopffparameter erfasst. Innerhalb der Haussäugetiere ähnelten die für das Breitmaulnashorn ermittelten Spermienkopfdimensionen, mit einer durchschnittlichen Länge von $5,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$ und Breite von $2,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$; $n=7733$ analysierte Spermien), den mit dem gleichen Analysegerät bestimmten Größenverhältnissen beim Hengst (z.B. UHLENBROCK 1999).

Eine morphometrische Analyse der Ejakulate war nach einer Definition morphologischer Klassen möglich. An Hand statistischer Kenngrößen (5. und 95. Perzentil, Minimum und Maximum) wurden metrische Grenzwerte für fünf morphologische Klassen berechnet. Zwischen den Ejakulaten der 15 Nashornbullen bestanden relativ große Unterschiede hinsichtlich des Anteils anomaler Kopfformen, der zwischen 4 und 16% schwankte. Da Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Morphometrie und Fertilität bei dieser Tierart zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht durchführbar sind, besitzen die Analyseergebnisse bezüglich der Befruchtungsfähigkeit lediglich hinweisenden Charakter und sollten nur im Kontext weiterer Spermaparameter interpretiert werden.

Trotz der genannten Einschränkungen ist die pharmakologisch unterstützte manuelle Stimulation grundsätzlich für eine regelmäßige Spermagewinnung beim Breitmaulnashorn geeignet. Während Volumen und Konzentration der Proben zwischen verschiedenen Nashornbullen deutlich variierten, stellte sich die Spermienmorphologie bzw. –morphometrie relativ einheitlich dar.

7 SUMMARY

Pharmacologically enhanced manual semen collection and computer assisted sperm head morphometry in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*)

In this study the influence and applicability of pharmacologically enhanced semen collection in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) was investigated. Obtained semen samples were assessed by routine methods. Additionally, computer assisted sperm head dimensions were determined for 15 individuals and a morphometric analysis was performed.

A combination of the α_2 -agonist Detomidine-Hydrochloride (*Domosedan*®) and the partial opioid agonist Butorphanol (*Butomidor*®) was administered intramuscular. In order to provide adequate safety margins for the operating persons, important requirements consist in a restraint chute and conditioning of the rhinoceros to tolerate manipulations.

In a double blind trial, conducted on two bulls of various age and breeding status, a strong positive influence of the α -adrenergic medication was noted on both, performance and the outcome of the manual desemination trials. The medication facilitated manual stimulation of the genital region and semen collection in both males, but was time consuming as repeated collection trials had to be performed in order to obtain a single ejaculate. Pharmacologically enhanced desemination trials with an artificial vagina could not induce ejaculations efficiently.

The frequency of semen collection and semen quality varied considerably between the applied desemination techniques, but also between the rhinoceros bulls. Ejaculates collected by the pharmacologically enhanced manual stimulation technique were incomplete, consisted of small volumes (0,5 to 9,0 ml, with one exception of 23 ml), but were highly concentrated in some cases (total number of sperms up to $6,6 \times 10^9$ per ejaculate) and of good quality. Semen samples collected with an artificial vagina however, were of low quality and were contaminated by debris. Amongst other factors, the extensive duration of the penile erection in rhinoceroses, appears to limit the suitability of the artificial vagina for semen collection.

The determination of sperm head dimensions in the white rhinoceros was based on a computer assisted morphometric analysis of ejaculates from 15 individuals. The samples consisted of pharmacologically enhanced manually collected semen and electroejaculates. The Hamilton Thorne Morphology Analyser IVOS (integrated visual optical system; Hamilton Thorne Research, Beverly, USA) allowed the measurement of six metric sperm head parameters. The sperm head dimensions found for the white rhinoceros with a mean length of $5,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$ and width of $2,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$; $n=7733$ analysed sperms) resemble those of the horse as determined by the same analysis system (e.g. UHLENBROCK 1999).

A definition of morphometric criteria was required prior to the morphometric analysis. Limit values for five morphologic categories were calculated based on statistic parameters (5th and 95th percentiles, minimum and maximum). The analysis revealed a comparatively broad variation in the number of sperm head anomalies for the 15 rhinoceroses, ranging from 4 to 16%. As to date, investigations on the relationship between morphometry and fertility cannot be conducted in this species, these morphometric results should be interpreted species-specific and in conjunction with further semen parameters.

In conclusion, pharmacologically enhanced manual stimulation with an α -adrenergic medication is a suitable alternative method for repeated semen collection in the white rhinoceros, although problems with this method as described are evident. While a considerable variation in volume and concentration of the samples was noted for individual rhinoceros bulls, the sperm morphology and morphometry generally appeared homogenous.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Anonymous (1998)

Summary.

In: Proceedings, International Rhino Foundation's Workshop on problems associated with the low rate of reproduction among captive-born female southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). 29.-31. Oktober 1998, San Diego, Kalifornien. Zoological Society of San Diego.

Atkinson, M. W., Hull, B., Gandolf, A. R. und Blumer, E. S. (2002)

Repeated chemical immobilization of a captive greater one-horned rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*), using combinations of etorphine, detomidine, and ketamine.

Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 33: 157-162.

Bader, H. (2001)

Physiologie und Pathologie der Kopulation.

In: Busch, W. und Holzmann, A. (Hrsg.), *Veterinärmedizinische Andrologie - Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren*. Schattauer Verlag, Stuttgart, Deutschland: 347-364.

Bainbridge, D. R. und Jabbour, H. N. (1998)

Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: A review.

The Veterinary Record, 143: 159-168.

Ball, B. A. und Mohammed, H. O. (1995)

Morphometry of stallion spermatozoa by computer-assisted image analysis.

Theriogenology, 44: 367-377.

Benirschke, K. und Lowenstine, L. J. (1995)

The placenta of the rhinocerotidae.

In: *Verhandlungsbericht, 37. Internationales Symposium über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere*. 24.-28. Mai 1995, Dresden, Deutschland. Institut für Zoo- und Wildtierforschung.

Verhandlungsbericht Erkrankungen der Zootiere, 37: 15-23.

Bertschinger, H. J. (1994)

Reproduction in black and white rhinos: A review.

In: *Proceedings, Symposium on Rhinos as Game Ranch Animals*. 9.-10. September 1994, Onderstepoort, Republik Südafrika. South African Veterinary Association.

Rhinos as Game Ranch Animals: 155-161.

Boersma, A. und Braun, J. (1999)

Computerassistierte Untersuchung der Spermienmorphologie in der Tiermedizin.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 112: 81-85.

Boersma, A., Braun, J. und Stolla, R. (1999)

Influence of random factors and two different staining procedures on computer-assisted sperm head morphometry in bulls.

Reproduction in Domestic Animals, 34: 77-82.

Brooks, M. E., Meir, B. und Braf, Z. (1980)

Treatment of retrograde ejaculation with imipramine.

Urology, 15: 353-355.

- Böer, M. und Hamza, H. (1996)
Haltung und Zucht des Breitmaulnashorns (*Ceratotherium s. simum*) im Serengeti Safaripark Hodenhagen.
Der Zoologische Garten, 66: 349-364.
- Card, C. E., Manning, S. T., Bowman, P. und Leibel, T. (1997)
Pregnancies from imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in a disabled stallion.
The Canadian Veterinary Journal, 38: 171-174.
- Casey, P. J., Gravance, C. G., Davis, R. O., Chabot, D. D. und Liu, I. K. (1997)
Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions.
Theriogenology, 47: 575-582.
- Crump, J. P. Jr. und Crump, J. W. (1989)
Stallion ejaculation induced by manual stimulation of the penis.
Theriogenology, 31: 341-346.
- Crump, J. P. Jr. und Crump, J. W. (1994)
Manual semen collection from a Grevy's zebra stallion (*Equus grevyi*), onset of sperm production, semen characteristics, and cryopreservation of semen with comparison to the sperm production from a Grant's zebra stallion (*Equus burchelli boehmi*).
Theriogenology, 41: 1011-1021.
- Davis, R. O., Gravance, C. G. und Casey, P. J. (1993)
Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa.
American Journal of Veterinary Research, 54: 1808-1811.
- De Vos, V. und Braack, H. H. (1980)
Castration of a black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*).
Koedoe, 23: 185-187.
- Emslie, R. H. und Adcock, K. (1997)
Bestandszahlen des Breitmaul-Nashorns.
In: Die Nashörner. Filander Verlag, Fürth, Deutschland: 196-203.
- Emslie, R. und Brooks, M. (1999)
African rhino. Status survey and conservation action plan.
IUCN/SSC African Rhino Specialist Group. IUCN, Gland, Schweiz und Cambridge, England.
- Eppel, S. M. und Berzin, M. (1984)
Pregnancy following treatment of retrograde ejaculation with clomipramine hydrochloride.
South African Medical Journal, 66: 889-891.
- Eyres, A. I., Kennedy-Benson, A. M. und Radcliffe, R. W. (2001)
Conditioning a southern black rhino (*Diceros bicornis minor*) for semen collection.
In: Proceedings, Rhino Keepers' Workshop 2001. 7.-10. Mai 2001, San Diego, Kalifornien.
Zoological Society of San Diego.
- Forney, B. D. und McDonnell, S. M. (1999)
How to collect semen from stallions while they are standing on the ground.
In: Proceedings, 45. Annual American Association of Equine Practitioners Convention. 5.-8. Dezember 1999, Albuquerque, New Mexiko.
American Association of Equine Practitioners Convention, 45: 142-144.

Frey, H. H., Schulz, R. und Werner, E. (1996)

Analgetika.

In: Frey, H. H. und Löscher, W. (Hrsg.), Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Deutschland: 184-202.

Gaisler, J. und Zejda (Hrsg.) (1997)

Enzyklopädie der Säugetiere. Verlag Werner Dausien, Hanau, Deutschland.

George, M. Jr., Chemnick, L. G., Cisova, D., Gabrisova, E., Stratil, A. und Ryder, O. A. (1991)
Genetic differentiation of white rhinoceros subspecies: Diagnostic differences in mitochondrial DNA and serum proteins.

In: Proceedings, International Conference on Rhinoceros Biology and Conservation. 9.-11. Mai 1991, San Diego, Kalifornien. Zoological Society of San Diego.

Rhinoceros Biology and Conservation: 105-113.

Godfrey, R. W., Pope, C. E., Dresser, B. L., Bavister, B. D., Andrews, J. C. und Olsen, J. H. (1990)

An attempt to superovulate a southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*).

Theriogenology, 33: 231.

Godfrey, R. W., Pope, C. E., Dresser, B. L. und Olsen, J. H. (1991)

Gross anatomy of the reproductive tract of female black (*Diceros bicornis michaeli*) and white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*).

Zoo Biology, 10: 165-175.

Göltenboth, R. (1986)

Zur tierärztlichen Betreuung der Nashörner im Zoo Berlin.

Der Zoologische Garten, 56: 43-52.

Göltenboth, R., Göritz, F., Blottner, S., Hildebrandt, T. B., Ochs, A., Faßbender, M. und Hermes, R. (2000)

Management tools for the improvement of reproduction in rhinoceroses at Berlin Zoo.

In: Proceedings, 3. Scientific Meeting of the European Association of Zoo- and Wildlife Veterinarians. 31. Mai – 4. Juni 2000, Paris, Frankreich: 133-138.

Gravance, C. G., Liu, I. K., Davis, R. O., Hughes, J. P. und Casey, P. J. (1996)

Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa.

Journal of Reproduction and Fertility, 108: 41-46.

Groves, C. P. (1997)

Die Nashörner - Stammesgeschichte und Verwandtschaft.

In: Die Nashörner. Filander Verlag, Fürth, Deutschland: 14-32.

Hancock, J. L. (1957)

The structure of spermatozoa.

Veterinary Record, 69: 996-997.

Hake, S. (2001)

Computergestützte Untersuchung von Spermienkopfanomalien nach einer induzierten Spermatogenesestörung beim Bullen.

Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland.

- Hatt, J.-M. und Isenbügel, E. (2001)
Unpaarhufer (Perissodactyla).
In: Busch, W. und Holzmann, A. (Hrsg.), Veterinärmedizinische Andrologie - Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Schattauer Verlag, Stuttgart, Deutschland: 444-445.
- Hermes, R., Hildebrandt, T. B., Schwarzenberger, F., Walzer, C., Göltenboth, R., Schneider, M., Schnorrenberg, A. und Göritz, F. (2000)
Development of an artificial insemination technique in the African rhinoceros.
In: Proceedings, 3. Scientific Meeting of the European Association of Zoo- and Wildlife Veterinarians. 31. Mai – 4. Juni 2000, Paris, Frankreich: 139-141.
- Hermes, R., Göritz, F., Blottner, S., Walzer, C., Göltenboth, R., Schwarzenberger, F., Rudolph, M. und Hildebrandt, T. B. (2001a)
Evaluation of fertility in captive male white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) - semen assessment and preservation.
In: Verhandlungsbericht, 40. Internationales Symposium über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere. 23.-26. Mai 2001, Rotterdam, Niederlande. Institut für Zoo- und Wildtierforschung. Verhandlungsbericht Erkrankungen der Zootiere, 40: 173-176.
- Hermes, R., Hildebrandt, T. B., Walzer, C., Göritz, F. und Schwarzenberger, F. (2001b)
Reproductive assessment in the captive white rhinoceros - current standing.
In: Zoologischer Garten Berlin (Hrsg.), Internationales Zuchtbuch für das afrikanische Breitmaulnashorn.
Zoologischer Garten Berlin, 9: IV-VIII.
- Hermes, R., Hildebrandt, T. B., Schwarzenberger, F., Walzer, C., Blottner, S., Göltenboth, R., Jakob, W. und Göritz, F. (2001c)
Reproductive assessment and development of artificial insemination in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*).
In: Proceedings, Rhino Keepers' Workshop 2001. 7.-10. Mai 2001, San Diego, Kalifornien. Zoological Society of San Diego.
- Hildebrandt, T. B., Göritz, F., Quandt, S. und Raath, C. (1995)
Graviditätsdiagnose beim Breitmaulnashorn (BN) mit Hilfe der transrektalen 'Adaptersonographie'.
Ultraschall in der Medizin, 16, Sonderheft 1: 68.
- Hildebrandt, T. B., Hermes, R., Jewgenow, K. und Göritz, F. (2000)
Ultrasonography as an important tool for the development and application of reproductive technologies in non-domestic species.
Theriogenology, 53: 73-84.
- Hildebrandt, T. B., Hermes, R., Schwarzenberger, F., Walzer, C., Silinski, S., Schnorrenberg, A. und Göritz, F. (2002)
A newly developed artificial insemination technique in African rhinoceroses.
In: Proceedings, Annual Conference of the American Association of Zoo Veterinarians. 5.-10. Oktober 2002, Milwaukee, Wisconsin: 213-215.
- Hillman-Smith, A. K. (1986)
Notes on dentition, cranial and body measurements of the northern white rhinoceros (*Ceratotherium simum cottoni*).
Journal of Zoology, 210: 355-379.

- Hillman-Smith, A. K. (1997)
Das Nördliche Breitmaul-Nashorn.
In: Die Nashörner. Filander Verlag, Fürth, Deutschland: 173-183.
- Hindle, J. E., Möstl, E. und Hodges, J. K. (1992)
Measurement of urinary oestrogens and 20 β -dihydroprogesterone during ovarian cycles of black (*Diceros bicornis*) and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceroses.
Journal of Reproduction and Fertility, 94: 237-249.
- Hirai, M. (2000)
Computergestützte Untersuchung der Spermienmorphologie und –motilität bei Bulle und Eber: Beziehungen zur Fertilität.
Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland.
- Houck, M. L., Ryder, O. A., Vahala, J., Kock, R. A. und Oosterhuis, J. E. (1994)
Diploid chromosome number and chromosomal variation in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*).
Journal of Heredity, 85: 30-34.
- <http://www.cites.org>, 20. Februar 2003.
- IUCN/SSC African and Asian Rhino Specialist Groups & Foose, T. J. (2001)
Wild and captive population of rhino.
<http://www.rhinos-irf.org>, 15. Juli 2002.
- Jasko, D. J., Lein, D. H. und Foote, R. H. (1990)
Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988).
Journal of the American Veterinary Medical Association, 197: 389-394.
- Kellner, K. (2000)
Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) bei Nashörnern (*Ceratotherium simum*, *Diceros bicornis*, *Rhinoceros unicornis*): Ein Modell zum genetischen Wildtiermanagement.
Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland.
- Kelly, M. E. und Needle, M. A. (1979)
Imipramine for aspermia after lymphadenectomy.
Urology, 8: 414-415.
- Killmar, L. E. (1997)
Captive rhinoceros reproduction at the Zoological Society of San Diego: A conservation success story.
Der Zoologische Garten, 67: 53-60.
- Kingdon, J. (ed.) (1979)
Perissodactyls.
East African Mammals -an Atlas of Evolution in Africa. Volume 3b: Large Mammals. Reprint 1989, The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Klös, H. G. (1968)
Das Breitmaulnashorn.
In: Grzimeks Tierleben. Band 13: Säugetiere 4. Kindler Verlag, Zürich, Schweiz: 70-76.

- Kock, M. D., Morkel, P., Atkinson, M. und Foggin, C. (1995)
 Chemical immobilization of free-ranging white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) in Hwange and Matobo National Parks, Zimbabwe, using combinations of etorphine (M99), fentanyl, xylazine, and detomidine.
Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 26: 207-219.
- Kock, R. A. und Garnier, J. (1991)
 Veterinary management of three species of rhinoceroses in zoological collections.
 In: Proceedings, International Conference on Rhinoceros Biology and Conservation. 9.-11. Mai 1991, San Diego, Kalifornien. Zoological Society of San Diego.
Rhinoceros Biology and Conservation: 325-345.
- Kretzschmar, P. (2001)
 Population growth, sex ratio and reproduction of white rhinoceros in South Africa.
 In: Schwammer, H. M., Foose, T. J., Fouraker, M. und Olson, D. (eds.), Recent research on elephants and rhinos: Proceedings of the International Elephant and Rhino Research Symposium. Schöling Verlag, Münster, Deutschland: 196-201.
- Lasley, B. L., Loskutoff, N. M. und Anderson, G. B. (1994)
 The limitation of conventional breeding programs and the need and promise of assisted reproduction in nondomestic species.
Theriogenology, 41: 119-132.
- Leidl, W., Schefels, W., Stolla, R. und Metzger, E. (1971)
 Differenzierung und Befruchtungsvermögen pathologischer Spermien.
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 78: 129-134.
- Lindemann, H. (1982)
 African rhinoceros in captivity: The white rhinoceros *Ceratotherium simum* (Burchell 1817), the black rhinoceros *Diceros bicornis* (Linnaeus 1758).
 Master of Science-Thesis, University of Copenhagen, Dänemark.
- Mainka, S. A. und Mills, J. A. (1995)
 Wildlife and traditional Chinese medicine - supply and demand for wildlife species.
Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 26: 193-200.
- Mann, T. (1964)
 The biochemistry of semen and of the male reproductive tract.
 Butler & Tanner Ltd., Frome, United Kingdom.
- Martin, E. B. (1991)
 The present-day trade routes and markets for rhinoceros products.
 In: Proceedings, International Conference on Rhinoceros Biology and Conservation. 9.-11. Mai 1991, San Diego, Kalifornien. Zoological Society of San Diego.
Rhinoceros Biology and Conservation: 1-9.
- McDonnell, S. M., Garcia, M. C. und Kenney, R. M. (1987)
 Imipramine-induced erection, masturbation, and ejaculation in male horses.
Pharmacology Biochemistry & Behavior, 27: 187-191.
- McDonnell, S. M. und Love, C. C. (1990)
 Manual stimulation collection of semen from stallions: Training time, sexual behavior and semen.
Theriogenology, 33: 1201-1210.

- McDonnell, S. M. und Love, C. C. (1991)
Xylazine-induced ex-copula ejaculation in stallions.
Theriogenology, 36: 73-76.
- McDonnell, S. M., Pozor, M. A., Beech, J. und Sweeney, R. W. (1991)
Use of manual stimulation for collection of semen from an atactic stallion unable to mount.
Journal of the American Veterinary Medical Association, 199: 753-754.
- McDonnell, S. M. und Odian, M. J. (1994)
Imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions.
Theriogenology, 41: 1005-1010.
- McDonnell, S. M. und Turner, R. M. (1994)
Post-thaw motility and longevity of motility of imipramine-induced ejaculations of pony stallions.
Theriogenology, 42: 475-481.
- McDonnell, S. M. (1999)
Le comportement sexuel de l'étalon.
Pratique Vétérinaire Equine, 31: 97-104.
- Meister, J. und Owen-Smith, N. (1997)
Das Breitmaul-Nashorn.
In: Die Nashörner. Filander Verlag, Fürth, Deutschland: 163-172.
- Michel, A. und Illig, M. (1995)
Training as a tool for routine collection of blood from a black rhinoceros (*Diceros bicornis*).
Animal Keepers' Forum, 22: 294-300.
- Miller, E. R. und Foose, T. J. (1996)
The population status of rhinoceroses.
In: Proceedings, Annual Conference of the American Association of Zoo Veterinarians. 3.-8. November 1996, Puerto Vallarta, Mexiko: 22-33.
- Mortimer, D. (1994)
Biochemistry of seminal plasma.
In: Mortimer, D., Practical laboratory andrology. Oxford University Press, New York, USA: 95-109.
- Moss, J. A., Melrose, D. R., Reed, H. C. und Vandeplassche M. (1979)
Spermatozoa, semen and artificial insemination.
In: Laing, J. A. (ed.), Fertility and Infertility in Domestic Animals. Bailliere Tindall, London, United Kingdom: 59-91.
- Nelson, L. und Fowler, M. E. (1986)
Rhinocerotidae.
In: Fowler, M. E. (ed.), Zoo & Wild Animal Medicine. 2. edition, W. B Saunders Company, Philadelphia, USA: 934-938.
- Nicholson, D. (1996)
Conditioning unrestrained black rhinoceroses (*Diceros bicornis*) for venipuncture.
Animal Keepers' Forum, 23: 501-507.

- Ochs, A. (1999)
 Zoologischer Garten Berlin (Hrsg.), Internationales Zuchtbuch für afrikanische Nashörner.
 Zoologischer Garten Berlin, Deutschland, 8: 109-330.
- Ochs, A. (2001)
 Zoologischer Garten Berlin (Hrsg.), Internationales Zuchtbuch für das afrikanische Breitmaulnashorn.
 Zoologischer Garten Berlin, Deutschland, 9.
- Owen-Smith, R. N. (1988)
 Megaherbivores - the influence of very large body size on ecology. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- O'Brien, J. K. und Roth, T. L. (2000)
 Post-coital sperm recovery and cryopreservation in the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*) and application to gamete rescue in the African black rhinoceros (*Diceros bicornis*).
 Journal of Reproduction and Fertility, 118: 263-271.
- Patton, M. L., Swaisgood, R. R., Czekala, N. M., White, A. M., Fetter, G. A., Montagne, J. P., Rieches, R. G. und Lance, V. A. (1999)
 Reproductive cycle length and pregnancy in the southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) as determined by fecal pregnane analysis and observations of mating behavior.
 Zoo Biology, 18: 111-127.
- Platz, C. C., Seager, S. W. und Bush, M. (1979)
 Collection and analysis of semen from a black rhinoceros.
 Journal of the American Veterinary Medical Association, 175: 1002-1004.
- Prothero, D. R. (1991)
 Fifty million years of rhinoceros evolution.
 In: Proceedings, International Conference on Rhinoceros Biology and Conservation. 9.-11. Mai 1991, San Diego, Kalifornien. Zoological Society of San Diego.
 Rhinoceros Biology and Conservation: 82-91.
- Pui-Hay, P., Lai-Ching, L. und Yan-Kit, T. (1990)
 Ethnopharmacology of rhinoceros horn. I: Antipyretic effects of rhinoceros horn and other animal horns.
 Journal of Ethnopharmacology, 30: 157-168.
- Rachlow, J. L. und Berger, J. (1998)
 Reproduction and population density: Trade-offs for the conservation of rhinos in situ.
 Animal Conservation, 1: 101-106.
- Rachlow, J. L., Berkeley, E. V. und Berger, J. (1998)
 Correlates of male mating strategies in white rhinoceros (*Ceratotherium simum*).
 Journal of Mammology, 79: 1317-1324.
- Radcliffe, R. W. und Osofsky, S. A. (1996)
 Reproductive applications of transrectal ultrasonography in captive African rhinoceros, and thoughts of in situ use.
 In: Proceedings, Annual Conference of the American Association of Zoo Veterinarians. 3.-8. November 1996, Puerto Vallarta, Mexiko: 42-47.

- Radcliffe, R. W., Czekala, N. M. und Osofsky, S. A. (1997)
 Combined serial ultrasonography and fecal progesterin analysis for reproductive evaluation of the female white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*): Preliminary results.
Zoo Biology, 16: 445-456.
- Radcliffe, R. W., Ferrell, S. T. und Childs, S. E. (2000a)
 Butorphanol and azaperone as a safe alternative for repeated chemical restraint in captive white rhinoceros (*Ceratotherium simum*).
Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 31: 196-200.
- Radcliffe, R. M., Hendrickson, D. A., Richardson, G. L., Zuba, J. R. und Radcliffe, R. W. (2000b)
 Standing laparoscopic-guided uterine biopsy in a southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*).
Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 31: 201-207.
- Radcliffe, R. W., Eyres, A. I., Patton, M. L., Czekala, N. M. und Emslie, R. H. (2001)
 Ultrasonographic characterization of ovarian events and fetal gestational parameters in two southern black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*) and correlation to fecal progesterone.
Theriogenology, 55: 1033-1049.
- Raßhofer, R. (1999)
 Entwicklung von Methoden für die computergestützte morphologische Untersuchung von Bullenspermien mit dem System HTM IVOS.
 Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland.
- Remane, A., Storch, V. und Welsch, U. (Hrsg.) (1986)
 Perissodactyla (Unpaarhufer).
 Systematische Zoologie. 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Deutschland: 633-634.
- Rieches, R. (1998)
 Concerns with breeding F1 rhinoceros in zoological institutions.
 In: Proceedings, International Rhino Foundation's Workshop on problems associated with the low rate of reproduction among captive-born female southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). 29.-31. Oktober 1998, San Diego, Kalifornien. Zoological Society of San Diego: 4-5.
- Rookmaker, L. C. (1998)
 The Rhinoceros in Captivity. SPB Academic Publishing, The Hague, Niederlande.
- Roth, T. L., Patton, M. L., Brown, J. L., Czekala, N. M., Swaisgood, R. R. und Lance, V. A. (1998)
 The North American experience: Female hormonal cycles in southern white rhinoceros.
 In: Proceedings, International Rhino Foundation's Workshop on problems associated with the low rate of reproduction among captive-born female southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). 29.-31. Oktober 1998, San Diego, Kalifornien. Zoological Society of San Diego: 6-9.
- Roth, T. L. (2001)
 The role of reproductive research and technology in facilitating captive breeding programs for the rhinoceros.
 In: Proceedings, Rhino Keepers' Workshop 2001. 7.-10. Mai 2001, San Diego, Kalifornien. Zoological Society of San Diego.

- Savage, A., Williams, W. W. und Fowler, N. M. (1927)
A statistical study of head length variability of bovine spermatozoa and its application to the determination of fertility.
Transactions of the Royal Society of Canada, 21: 425-451.
- Schaffer, N. E. und Beehler, B. A. (1988)
Overview of procedures and results of semen collection from ambulatory rhinoceroses.
In: Proceedings, Annual Conference of the American Association of Zoological Parks and Aquariums. 5.-7. Oktober 1988, San Diego, Kalifornien: 273-279.
- Schaffer, N. E., Beehler, B. A., Jeyendran, R. S. und Balke, B. (1990)
Methods of semen collection in an ambulatory greater one-horned rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*).
Zoo Biology, 9: 211-221.
- Schaffer, N. E., Jeyendran, R. S. und Beehler, B. A. (1991)
Reproductive procedures and restraint for rhinoceroses.
In: Proceedings, International Conference on Rhinoceros Biology and Conservation. 9.-11. Mai 1991, San Diego, Kalifornien. Zoological Society of San Diego.
Rhinoceros Biology and Conservation: 153-159.
- Schaffer, N. E., Zainal-Zahari, Z., Suri, M. S., Jainudeen, M. R. und Jeyendran, R. S. (1994)
Ultrasonography of the reproductive anatomy in the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*).
Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 25: 337-348.
- Schaffer, N. E., Bryant, W., Agnew, D., Meehan, T. und Beehler, B. A. (1998a)
Ultrasonographic monitoring of artificially stimulated ejaculation in three rhinoceros species (*Ceratotherium simum*, *Diceros bicornis*, *Rhinoceros unicornis*).
Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 29: 386-393.
- Schaffer, N. E., Walasek, J. G., Hall, D. C., Bryant, W. M. und Reed, M. C. (1998b)
Cage restraints for rhinoceroses.
Zoo Biology, 17: 343-359.
- Schaffer, N. E. (2000)
Sumatran rhinoceros - reproductive data 1991-1999. Draft 2000. SOS Rhino, Chicago, USA.
- Schaffer, N. E., Foley, G. L., Gill, S. und Pope, C. (2001a)
Clinical implications of rhinoceros reproductive tract anatomy and histology.
Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 32: 31-46.
- Schaffer, N. E., Meehan, T. P. und Jeyendran, R. S. (2001b)
Successful electroejaculation and other semen procurement methods from four species of rhinoceros (*Ceratotherium simum*, *Diceros bicornis*, *Rhinoceros unicornis*, *Dicerorhinus sumatrensis*).
In: Schwammer, H. M., Foose, T. J., Fouraker, M. und Olson, D. (eds.), Recent research on elephants and rhinos: Abstracts, International Elephant and Rhino Research Symposium. Schöling Verlag, Münster, Deutschland: 47.
- Schenkel, R. (1987)
Breitlippennashorn.
In: Grzimeks Enzyklopädie. Band 4: Säugetiere. Kindler Verlag, München, Deutschland: 617-620.

- Schmitt, D. L. und Hildebrandt, T. B. (1998)
Manual collection and characterization of semen from Asian elephants (*Elephas maximus*).
Animal Reproduction Science, 53: 309-314.
- Schmitz, S. (1987)
Unpaarhufer.
In: Grzimeks Enzyklopädie. Band 4: Säugetiere. Kindler Verlag, München, Deutschland: 548-549.
- Schumacher, J. und Riddell, M. G. (1986)
Collection of stallion semen without a mount.
Theriogenology, 26: 245-250.
- Schummer, A. und Vollmerhaus B. (1987)
Harn- und Geschlechtsapparat.
In: Nickel, R., Schummer, A. und Seiferle, E. (Hrsg.), *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Band 2: Eingeweide. 6. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, Deutschland: 300-420.
- Schwarzenberger, F., Tomasova, K., Walzer, C. und Möstl, E. (1994)
Fecal progesterone evaluations in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*): What is the actual length of the oestrous cycle?
In: *Proceedings, European Endangered Species Programme Conference on Research and Captive Propagation*. 15.-17. April 1994, Erlangen, Deutschland: 77.
- Schwarzenberger, F. und Walzer, C. (1995)
Oestrus cycle induction in a white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) monitored by fecal progesterone analysis.
In: *Verhandlungsbericht, 37. Internationales Symposium über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere*. 24.-28. Mai 1995, Dresden, Deutschland: Institut für Zoo- und Wildtierforschung. *Verhandlungsbericht Erkrankungen der Zootiere*, 37: 79-83.
- Schwarzenberger, F., Walzer, C., Tomasova, K., Vahala, J., Meister, J., Goodrowe, K. L., Zima, J., Strauss, G. und Lynch, M. (1998)
Faecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*).
Animal Reproduction Science, 53: 173-190.
- Schwarzenberger, F., Walzer, C., Tomasova, K., Zima, J., Göritz, F., Hermes, R. und Hildebrandt, T. B. (1999)
Can the problems associated with the low reproductive rate in captive white rhinoceroses (*Ceratotherium simum*) be solved within the next 5 years?
In: *Verhandlungsbericht, 39. Internationales Symposium über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere*. 12.-16. Mai 1999, Wien, Österreich. Institut für Zoo- und Wildtierforschung. *Verhandlungsbericht Erkrankungen der Zootiere*, 39: 283-289.
- Schwarzenberger, F., Walzer, C., Silinski, S., Tomasova, K., Göritz, F., Hildebrandt, T. und Hermes, R. (2001)
An integrated approach for the enhancement of reproductive performance of white rhinoceroses (*Ceratotherium simum*) in the EEP.
In: *Newsletter, 5. Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction*. 13.-15. September, Wien, Österreich: 77-78.

- Shaffstall, W. (2000)
An overview of training staff and rhinoceros for ultrasonography procedures.
Animal Keepers' Forum, 27: 396-401.
- Sidney, J. (1965)
Rhinocerotidae.
The past and present distribution of some African ungulates.
Transactions of the Zoological Society of London, United Kingdom, 30: 51-87.
- Skinner, J. D. und Smithers, H. N. (eds.) (1990)
Family Rhinocerotidae.
The Mammals of the Southern African Subregion. University of Pretoria, Pretoria, Republik Südafrika: 567-575.
- Smith, K. und Smith, F. (1991)
Conserving rhinos in Garamba National Park.
In: Proceedings, International Conference on Rhinoceros Biology and Conservation. 9.-11. Mai 1991, San Diego, Kalifornien. Zoological Society of San Diego.
Rhinoceros Biology and Conservation: 166-177.
- Steigerwald, P. und Krause, W. (1998)
Estimation of sperm morphology using a new CASA system.
Andrologia, 30: 23-27.
- Stolla, R., Gropp, A., Leidl, W. und Hofman, N. (1978)
Teratozoospermie aus human- und tiermedizinischer Sicht.
Der Hautarzt, 29: 518-524.
- Stolla, R. (1984)
Ursachen und Bedeutung der Teratozoospermie.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- Thurston, L. M., Watson, P. F. und Holt, W. V. (1999)
Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel automated sperm morphology analysis system.
Journal of Reproduction and Fertility, 117: 271-280.
- Turner, R. M., McDonnell, S. M. und Hawkins J. F. (1995)
Use of pharmacologically induced ejaculation to obtain semen from a stallion with a fractured radius.
Journal of the American Veterinary Medical Association, 206: 1906-1908.
- Uhlenbrock, S. (1999)
Computergestützte Spermienkopfmorphometrie beim Hengst mit dem Hamilton Thorne Morphology Analyzer IVOS.
Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland.
- Vahala, J., Spala, P. und Svitalsky, M. (1993)
Maintaining and breeding the northern white rhinoceros (*Ceratotherium simum cottoni*) at Dvur Kralove Zoo.
International Zoo Yearbook, 32: 16-20.

- Walzer, C. (1998)
 Dermal anesthesia in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) using a eutectic mixture of lidocaine and prilocaine.
Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 29: 300-302.
- Walzer, C., Pucher, H. und Schwarzenberger, F. (2000)
 A restraint chute for semen collection in white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) - preliminary results.
 In: Proceedings, Reprint, 3. Scientific Meeting of the European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians. 31. Mai – 4. Juni 2000, Paris, Frankreich: 7-10.
- Walzer, C., Göritz, F., Silinski, S., Hermes, R., Hildebrandt, T. und Schwarzenberger, F. (2001)
 Anesthesia management in white rhinos for reproductive evaluation, semen collection and AI - a team approach.
 In: Schwammer, H. M., Foose, T. J., Fouraker, M. und Olson, D. (eds.), Recent research on elephants and rhinos: Proceedings of the International Elephant and Rhino Research Symposium. Schöling Verlag, Münster, Deutschland: 237-241.
- Watkins, V. und Gregory, J. (1997)
 Conditioning of a greater one horned rhino (*Rhinoceros unicornis*) to accept foot treatment without anesthetic.
Animal Keepers' Forum, 24: 250-256.
- Weitze, K.-F. (2001a)
 Spermatologische Untersuchung.
 In: Busch, W. und Holzmann, A. (Hrsg.), Veterinärmedizinische Andrologie - Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Schattauer Verlag, Stuttgart, Deutschland: 87-118.
- Weitze, K.-F. (2001b)
 Beurteilung der Begattungspotenz.
 In: Busch, W. und Holzmann, A. (Hrsg.), Veterinärmedizinische Andrologie - Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Schattauer Verlag, Stuttgart, Deutschland: 408-409.
- Weitze, K.-F. (2001c)
 Andrologischer Untersuchungsgang.
 In: Busch, W. und Holzmann, A. (Hrsg.), Veterinärmedizinische Andrologie - Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Schattauer Verlag, Stuttgart, Deutschland: 337-346.
- Williams, K. R., Dyche, W. K., Brinders, J., Molteno, F., van der Lancken, M., Armstrong, D. L. und Simmons, L. G. (1995)
 Longevity in vitro and glycerol toxicity of epididymal sperm recovered from a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*).
Theriogenology, 43: 353.
- Young, E. (1967)
 Semen extraction by manipulative technique in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*).
International Zoo Yearbook, 7: 166-167.
- Zeleny, C. und Faust, E. C. (1915)
 Size dimorphism in the spermatozoa from single testes.
The Journal of Experimental Zoölogy, 18: 187-240.

9 ANHANG

Inhalt

Versuchsabschnitt Spermagewinnung	2
I. Zwangsstand	2
II. Medikamente	3
a) Präparate	3
b) Dosierungen	4
III. Technische Hilfsmittel	5
IV. Datenerhebungsbögen	6
a) Quantitative Parameter	6
b) Verhaltensparameter - 5-stufige, unidirektionale Ratingskala	7
c) Verhaltensparameter - Kontinuierliche Bewertungsskala	9
d) Verhaltensparameter - Bewertungsschlüssel mit ‚Ankerbeispielen‘	12
V. Reliabilität	14
Versuchsabschnitt Spermienkopfmorphometrie	16
I. Färbeprotokoll	16
II. Technische Modifikation des HTM IVOS	17
III. Setup-Einstellungen	18

Versuchsabschnitt Spermagewinnung

I. Zwangsstand

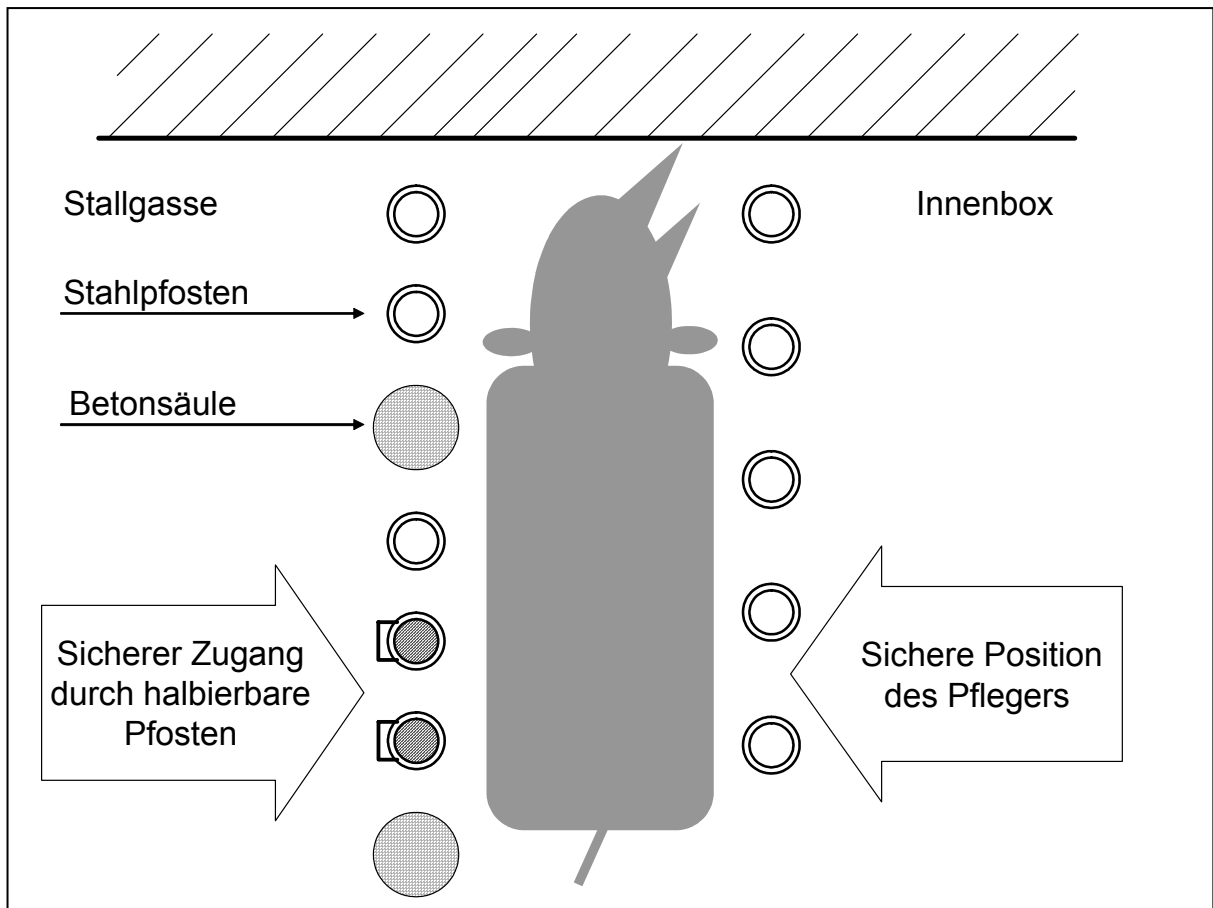


Abb. 1: Zwangsstand, Zoo Salzburg. Skizze Aufsicht:
Der Stand als Bestandteil der Innenbox ist frei begehbar und nach hinten nicht begrenzt. Stahlpfosten auf beiden Seiten des Nashorns gewährleisten eine sichere Positionierung der Versuchsdurchführenden. Die hinteren Pfosten sind in der Höhe halbierbar (vgl. Abb. 2).
(Quelle Skizze: Autorin)

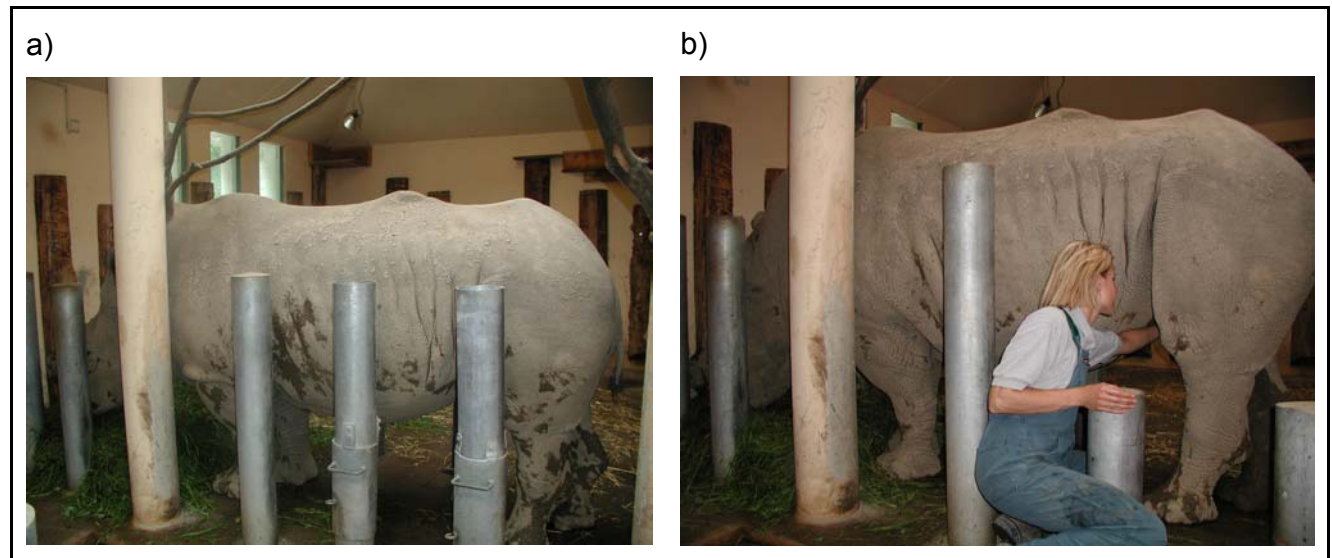


Abb. 2: Zwangsstand, Zoo Salzburg. Ansicht von Stallgasse:
 a) Stahlpfosten in maximaler Höhe
 b) Stahlpfosten halbiert
 (Quelle Fotos: Autorin)

II. Medikamente

a) Präparate

Detomidinhydrochlorid

Domosedan®, gebrauchsfertige, wässrige Injektionslösung (10 mg/ml)
 Z. Nr.: 8-00128, Pfizer Corporation Austria Ges.m.b.H., A-1071 Wien

Butorphanol als Tartrat

Butomidor®, gebrauchsfertige, wässrige Injektionslösung (10 mg/ml)
 Z. Nr.: 8-00427, Richter Pharma AG, A-5600 Wels

Wasser für Injektionszwecke

Aqua bidest. ,Fresenius®
 Z. Nr.: 14.345, Fresenius Kabi Austria GmbH, A-8055 Graz

Lidocain und Prilocain

Emla® 5 %-Creme, Lokalanästhetikum (je 25 mg/g)
 Z. Nr.: 1-21507, AstraZeneca Österreich GmbH, A-1037 Wien

b) Dosierungen

Tab. 1: Dosierungen der während der Voruntersuchung (VU) und Hauptuntersuchung (HU) bei Bulle ‚Denny‘, Zoo Salzburg, intramuskulär applizierten Medikamente (KS: Künstliche Scheide)

Untersuchung (Versuchsreihe)	Detomidinhydrochlorid (mg)	Butorphanol (mg)	Wiederholungen (n)
VU (Versuchsreihe 2)	8	0	2
VU (Versuchsreihe 2)	10	0	2
VU (Versuchsreihe 2)	12	0	2
VU (Versuchsreihe 2)	14	0	2
VU (Versuchsreihe 2)	16	0	2
VU (Versuchsreihe 3)	14	2	2
VU (Versuchsreihe 3)	14	4	2
VU (Versuchsreihe 3)	14	6	2
VU (Versuchsreihe 3)	14	8	2
VU (Versuchsreihe 3)	14	10	2
HU (Doppelblind) ^a	8	4	3
HU (Doppelblind) ^a	8	8	3
HU (Doppelblind) ^a	10	4	3
HU (Doppelblind) ^a	10	8	3
HU (Doppelblind) ^a	14	4	3
HU (KS 42 - 44 °C)	12	6	10
HU (KS 48 - 50 °C)	12	6	10

^a Die Medikamente wurden in den Doppelblindversuchen gegenüber der Versuchsreihe 3 niedriger dosiert, um zu vermeiden, dass durch einen eventuellen sichtbar sedierenden Effekt, die Medikation für die Versuchsdurchführenden erkennbar wird.

Tab. 2: Dosierungen der während der Hauptuntersuchung (HU) und der Implementationsstudie (IS) bei Bulle ‚Harry‘, Allwetterzoo Münster, intramuskulär applizierten Medikamente

Untersuchung (Versuchsreihe)	Detomidinhydrochlorid (mg)	Butorphanol (mg)	Wiederholungen (n)
HU (Doppelblind)	13	5	5
HU (Doppelblind)	14	6	4
IS	13	5	4

III. Technische Hilfsmittel

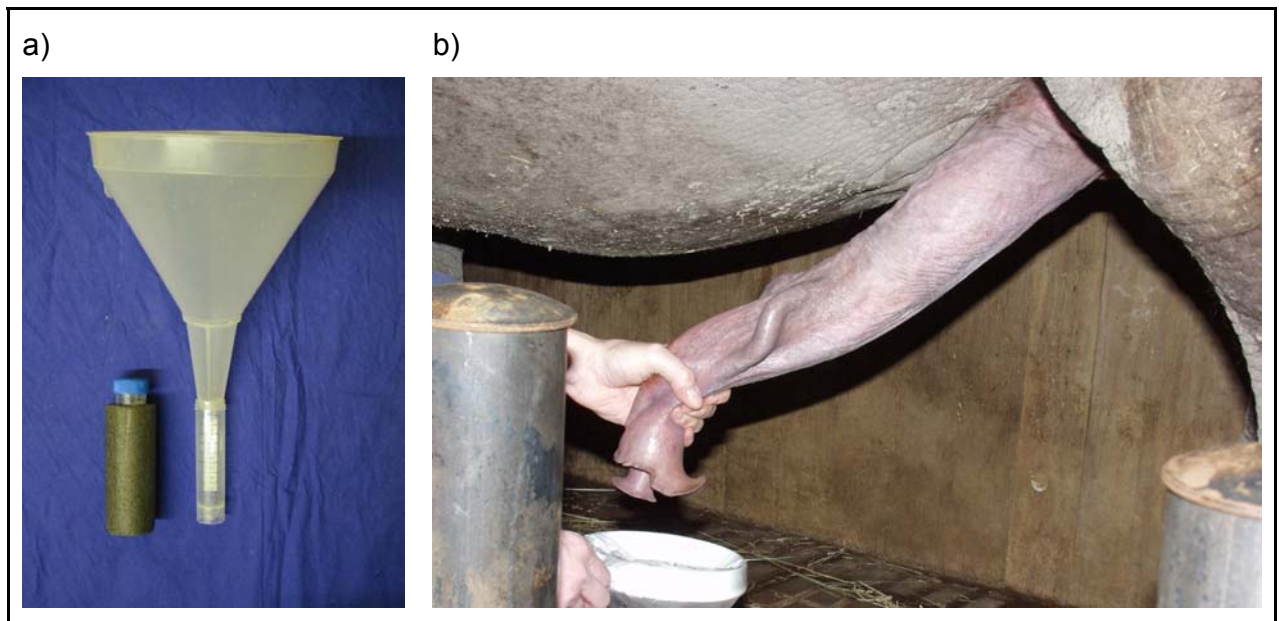


Abb. 3: Polypropylenröhrchen und -trichter zum Auffangen seminaler Proben:
a) Übersicht: Das Röhrchen links im Bild ist zur Wärmedämmung mit einer Schaumstoffisolation ummantelt
b) Demonstration der praktischen Anwendung (Quelle Fotos: Autorin)

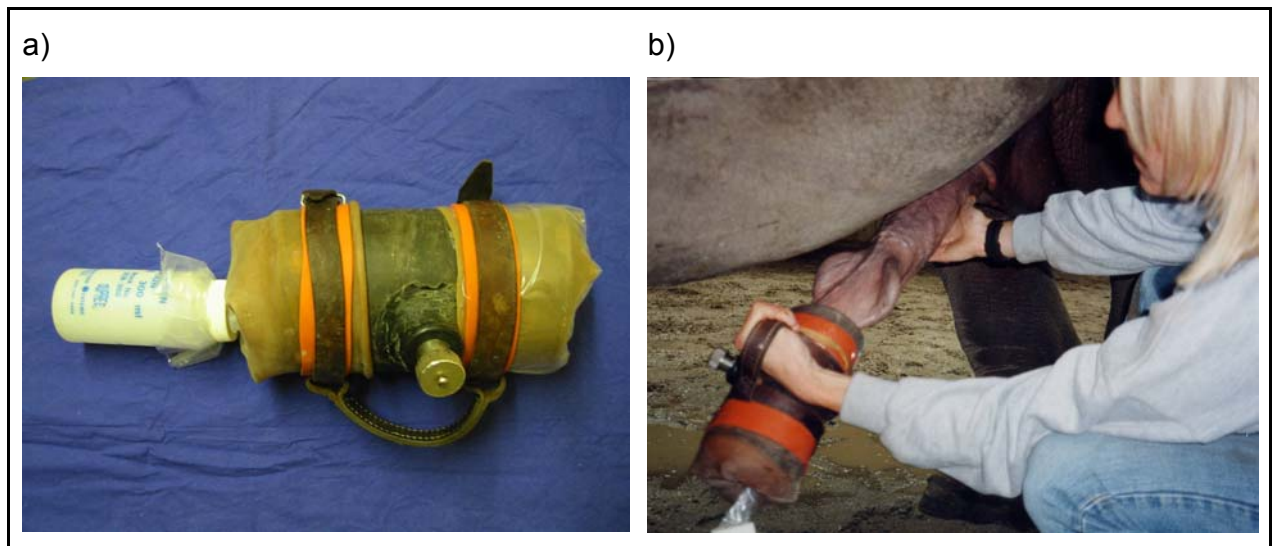


Abb. 4: Künstliche Scheide, modifiziertes *Hannoversches Modell*
Um eine mechanische Irritation der lateralen Peniswellkissen zu verhindern, wurde das Modell auf beiden Seiten entsprechend der Länge des distalen Penisabschnitts gekürzt:
a) Künstliche Scheide, zusammengebaut
b) Demonstration der praktischen Anwendung (Quelle Fotos: Autorin)

IV. Datenerhebungsbögen

a) Quantitative Parameter

Untersuchung	Versuchsreihe	Versuchseinheit
Datum	Uhrzeit	Nashornbulle

Probennahme induziert	Ja	Nein
-----------------------	----	------

<i>Emissio</i> und <i>Erectio penis</i> vor Beginn der manuellen Stimulation	Ja	Nein
--	----	------

Zeit bis zur <i>Emissio penis</i> nach Injektion (min) (Intervall 0,5 min)	
---	--

<i>Emissio</i> und <i>Erectio penis</i> bei manueller Stimulation	Ja	Nein
---	----	------

Zeit bis zur <i>Emissio penis</i> nach Beginn der manuellen Stimulation (sek) (Intervall 5 sek)	
--	--

Stimulationsdauer (min) (Intervall 0,5 min)	
--	--

Erektionsdauer (min) (Intervall 0,5 min)	
---	--

Bemerkungen, Besonderheiten

b) Verhaltensparameter - 5-stufige, unidirektionale Ratingskala

Voruntersuchung	Versuchsreihe	Versuchseinheit
Nashornbulle	Datum	Uhrzeit

	sehr zögernd	zögernd	gemächlich	zügig	sehr zügig
1. Zielstrebigkeit beim Betreten des Zwangsstands. <i>Der Bulle betritt den Zwangsstand</i>	1	2	3	4	5

	sehr unruhig	unruhig	durchschnittlich	ruhig	sehr ruhig
2. Ruhe beim Betreten des Zwangsstands. <i>Der Bulle verhält sich beim Betreten des Zwangsstands</i>	1	2	3	4	5
3. Stand vor Beginn der manuellen Stimulation. <i>Der Bulle verhält sich im Zwangsstand</i>	1	2	3	4	5
4. Stand während der manuellen Stimulation. <i>Der Bulle verhält sich im Zwangsstand</i>	1	2	3	4	5

	nicht	schwer	durchschnittlich	gut	optimal
5. Position vor Beginn der manuellen Stimulation. <i>Das äußere Genitale des Bullen ist ... erreichbar.</i>	1	2	3	4	5
6. Position während der manuellen Stimulation. <i>Das äußere Genitale des Bullen ist ... erreichbar.</i>	1	2	3	4	5

-Rückseite des Bogens-

	<i>nicht</i>	<i>kaum</i>	<i>erkennbar</i>	<i>deutlich erkennbar</i>	<i>sehr</i>
7. Kooperativität <i>Der Bulle erscheint ... kooperativ.</i>	1	2	3	4	5
8. Ängstlichkeit <i>Der Bulle erscheint ... ängstlich.</i>	1	2	3	4	5
9. Aggressivität <i>Der Bulle erscheint ... aggressiv.</i>	1	2	3	4	5
10. Abwehrbewegungen <i>Der Bulle erscheint ... abwehrend.</i>	1	2	3	4	5
11. Sexuelle Erregung <i>Der Bulle erscheint ... sexuell erregt.</i>	1	2	3	4	5

	<i>keine</i>	<i>schwach</i>	<i>mittel</i>	<i>stark</i>	<i>sehr stark</i>
12. Erektionsstärke	1	2	3	4	5

Bemerkungen, Besonderheiten

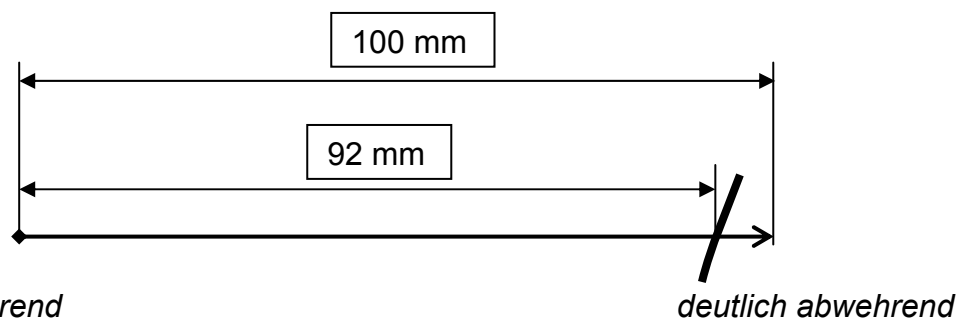
c) Verhaltensparameter - Kontinuierliche Bewertungsskala

Die Einschätzung der Ausprägung einer Verhaltensweise erfolgt durch einen Strich am Querbalken.

Beispiel:

Abwehrbewegungen

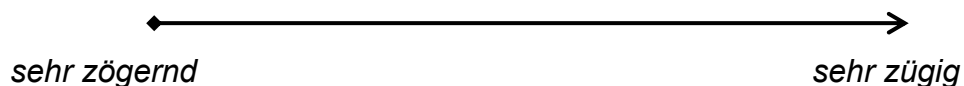
Abwehrbewegungen können während der Versuchsdurchführung in Form von Kopfschlagen (z.B. bei der Injektion) oder Tritten (z.B. bei der Stimulation des äußeren Genitales gegen den Penis oder in Richtung der Versuchsdurchführenden) erfolgen. Während des Versuchs erscheint der Bulle



In dem Beispiel wurde der Strich im äußeren rechten Bereich der 100 mm-Skala platziert. Das Verhalten des Bullen wurde als deutlich abwehrend eingeschätzt. Die Abwehrbewegungen sind sehr stark, jedoch nicht maximal ausgeprägt. Der Abstand vom Minimumsbereich der Skala (im vorliegenden Beispiel ‚nicht abwehrend‘) beträgt 92 mm und entspricht somit in der Datenauswertung dem Wert 92.

1. Zielstrebigkeit beim Betreten des Zwangsstands¹

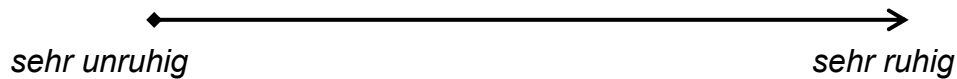
Der Bulle befindet sich außerhalb oder nicht vollständig im Zwangsstand. Nach Zuruf betritt der Bulle den Zwangsstand



¹ Die Doppelblindstudie im Allwetterzoo Münster wurde ohne Zwangsstand, jedoch innerhalb eines begrenzten Untersuchungsbereichs im Gehege in direktem Kontakt zu dem Bullen durchgeführt.

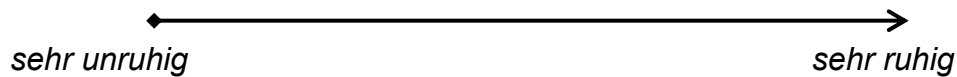
2. Ruhe beim Betreten des Zwangsstands

*Der Bulle befindet sich außerhalb oder nicht vollständig im Zwangsstand.
Beim Betreten des Zwangsstands erscheint der Bulle*



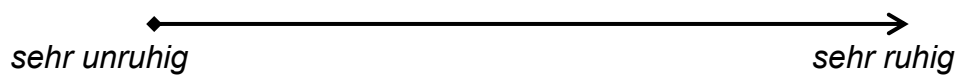
3. Stand vor Beginn der Stimulation

Der Bulle verhält sich im Zwangsstand



4. Stand während der Stimulation

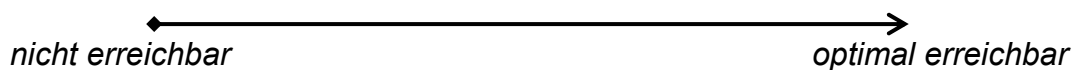
Der Bulle verhält sich im Zwangsstand



5. Position im Zwangsstand vor Beginn der Stimulation

Bei einer optimalen Position befindet sich der Kopf des Bullen maximal weit vorn im Zwangsstand.

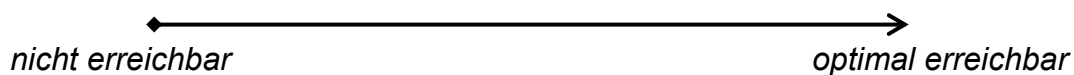
Das äußere Genitale des Bullen ist



6. Position während der manuellen Stimulation

Bei einer optimalen Position befindet sich der Kopf des Bullen maximal weit vorn im Zwangsstand.

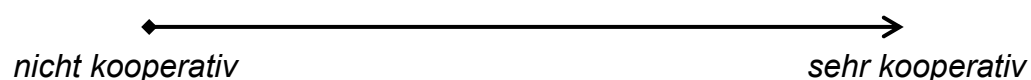
Das äußere Genitale des Bullen ist



7. Kooperativität

Durch Heben und Wegstrecken einer Hintergliedmaße kann der Bulle aktiv einen guten Zugang zum äußeren Genitale ermöglichen.

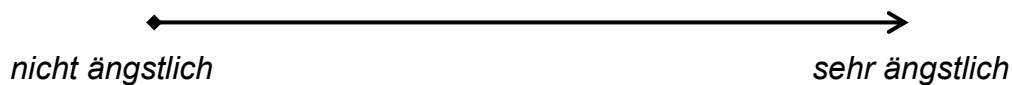
Während des Versuchs verhält sich der Bulle



8. Ängstlichkeit

Der Bulle erscheint ängstlich, wenn er bei unerwarteten, jedoch vertrauten Geräuschen (z.B. hervorgerufen durch andere Tiere) zusammensuckt oder aus dem Zwangsstand zurückweicht.

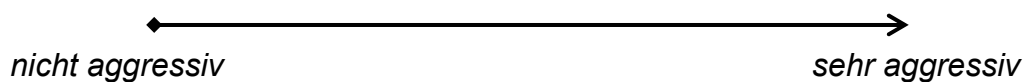
Während des Versuchs erscheint der Bulle



9. Aggressivität

Der Bulle äußert Aggressivität in Form von Schnauben, Grollen oder (Schein)Angriffen.

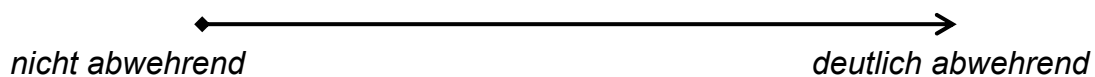
Während des Versuchs erscheint der Bulle



10. Abwehrbewegungen

Abwehrbewegungen können während der Versuchsdurchführung in Form von Kopfschlagen (z.B. bei der Injektion) oder Tritten (z.B. bei der Stimulation des äußeren Genitales) erfolgen.

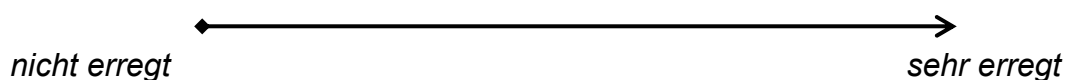
Während des Versuchs erscheint der Bulle



11. Sexuelle Erregung

Der Bulle erscheint sexuell erregt, wenn er während der Stimulation häufig schnaubt, die Futteraufnahme unterbricht, Beckenschübe ausübt.

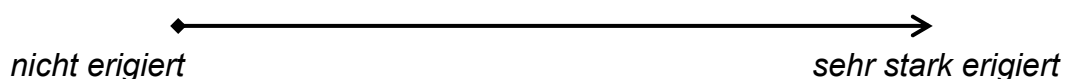
Während des Versuchs erscheint der Bulle



12. Ausprägung der Erektion

Eine maximale Erektion liegt vor, wenn die lateralen Schwellkissen deutlich ausgebildet sind, der Penis nach vorne sowie parallel zur Bauchwand gerichtet ist und pulsatile Kontraktionen der penilen Muskulatur ablaufen.

Während des Versuchs ist der Penis



d) Verhaltensparameter – Bewertungsschlüssel mit ‚Ankerbeispielen‘

1. Zielstrebigkeit beim Betreten des Zwangsstands

Der Bulle betritt den Zwangsstand

- sehr zögernd* Der Bulle wird wiederholt verbal aufgefordert den Stand zu betreten. Erst nach mehrmaligem Anbieten von bevorzugten Futtermitteln und Zureden betritt der Bulle nach mehreren Minuten den Stand sehr langsam.
- sehr zügig* Beim Erblicken der Versuchsdurchführenden betritt der Bulle prompt und zielstrebig innerhalb von wenigen Sekunden den Stand. Es ist dabei maximal eine einmalige verbale Aufforderung erfolgt.

2. Ruhe beim Betreten des Zwangsstands

Der Bulle verhält sich beim Betreten des Zwangsstands

- sehr unruhig* Der Bulle blickt nervös um sich, schnüffelt, markiert und weicht wiederholt aus dem Zwangsstand zurück.
- sehr ruhig* Der Bulle betritt den Zwangsstand ohne Unterbrechungen und ohne Zeichen von Nervosität.

3. Stand vor Beginn der manuellen Stimulation

4. Stand während der manuellen Stimulation

Der Bulle verhält sich im Zwangsstand

- sehr unruhig* Der Bulle steht nicht still, weicht mehrfach mit großen Schritten zurück, lässt sich nicht berühren.
- sehr ruhig* Der Bulle steht sehr still, weicht Berührungen nicht aus.

5. Position vor der manuellen Stimulation

6. Position während der manuellen Stimulation

Das äußere Genitale des Bullen ist ... erreichbar.

- nicht* Der Bulle befindet sich fast außerhalb des Zwangsstands, so dass das äußere Genitale des Bullen für die Versuchsdurchführenden nicht mehr sicher zu erreichen ist.
- optimal* Der Kopf des Bullen befindet sich maximal weit vorn im Stand. Das äußere Genitale ist somit auf Höhe der halbierbaren Säulen und für die Versuchsdurchführenden einfach und sicher zu erreichen.

7. Kooperativität

Der Bulle erscheint ... kooperativ.

<i>nicht</i>	Der Bulle blockiert mit den Hinterbeinen den Zugang zu den äußeren Geschlechtsorganen.
<i>sehr</i>	Durch Heben und Wegstrecken einer Hintergliedmaße ermöglicht der Bulle aktiv einen guten Zugang zum äußeren Genitale.

8. Ängstlichkeit

Der Bulle erscheint ... ängstlich.

<i>nicht</i>	Selbst bei unerwartet auftretenden Geräuschen (z.B. vorbei fliegende Flugzeuge, Baulärm, eintretende Personen) reagiert der Bulle nicht.
<i>sehr</i>	Bei unerwartet auftretenden - auch vertrauten - Geräuschen (z.B. hervorgerufen durch Pfleger, andere Tiere, ...) zuckt der Bulle erheblich zusammen und zeigt Fluchtverhalten aus dem Zwangsstand.

9. Aggressivität

Bulle erscheint ... aggressiv.

<i>sehr</i>	Der Bulle schnaubt, grollt oder führt (Schein)Angriffe aus, wenn sich ihm die Versuchsdurchführenden nähern.
<i>nicht</i>	Der Bulle zeigt keine der genannten Verhaltensweisen.

10. Abwehrbewegungen

Der Bulle erscheint ... abwehrend.

<i>sehr</i>	Die Injektion kann nur unter großen Schwierigkeiten durchgeführt werden, da der Bulle mit dem Kopf schlägt und sich nicht im Bereich der Injektionsstelle hinter dem Ohr berühren lässt. Bei der Stimulation des Penis tritt der Bulle in Richtung der Versuchsdurchführenden oder gegen den Penis.
<i>nicht</i>	Der Bulle zeigt keine der genannten Verhaltensweisen.

11. Sexuelle Erregung

Der Bulle erscheint ... sexuell erregt.

<i>nicht</i>	Der Bulle wirkt unbeteiligt und frisst das im Zwangsstand vorhandene Futter.
<i>sehr</i>	Der Bulle unterbricht die Futteraufnahme, hebt den Kopf und den Schwanz an, führt wiederholt Beckenschübe aus, schnaubt.

12. Erektionsstärke

<i>keine</i>	Die <i>Glans penis</i> befindet sich vollständig im Präputium.
<i>mittel</i>	Die lateralen Schwellkissen sind mäßig gefüllt, der erigierte Penis ist nach kaudal gerichtet.
<i>sehr stark</i>	Der Penis ist nach kranial sowie parallel zur Bauchwand gerichtet. Die lateralen Schwellkissen sind prall gefüllt und maximal entfaltet. Es laufen pulsatile Kontraktionen der penilen Muskulatur ab.

V. Reliabilität

Um die Reliabilität des Instruments der Erhebung der Verhaltensparameter festzustellen, wurde im Rahmen der Hauptuntersuchung das Verhalten des Nashornbullens nicht nur durch die Autorin, sondern auch durch den leitenden Revierpfleger eingeschätzt. Die Auswertung erfolgte durch den Mann-Whitney-U-Test.

Ein Vergleich der Einschätzungen von Autorin und Pfleger zeigte große Übereinstimmungen für die meisten Verhaltensparameter. Nur bei vier Verhaltensparametern bestanden signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Damit war die Reliabilität generell gewährleistet (Tab. 3).

Abweichend von der Beurteilung durch die Autorin wurde die ‚Erreichbarkeit des äußeren Genitales bei der manuellen Stimulation‘ vom Pfleger sowohl in den Versuchen ohne, als auch mit Medikation signifikant besser bewertet ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$; Tab. 3). Diese voneinander abweichenden Einschätzungen lassen sich möglicherweise auf die unterschiedliche Positionierung von Pfleger und Autorin während der Versuchsdurchführung zurückführen. Der Pfleger befindet sich innerhalb der Nashornbox. Steht der Nashornbulle nicht ganz vorn im Stand, wird der Zugang zum äußeren Genitale des Bullen im hinteren Bereich des Stands nur noch durch maximal eine Säule eingeschränkt. Dagegen wird die Autorin, die sich außerhalb der Box befindet, bei identischer Positionierung des Bullen von einer Betonsäule beeinträchtigt (vgl. Abb. 1).

Unterschiede bestanden auch in der Beurteilung des Abwehrverhaltens und der Kooperativität des Bullen. In den Versuchen mit Medikation, wurde der Bulle vom Pfleger signifikant weniger abwehrend eingeschätzt, als es durch die Autorin erfolgte ($p < 0,05$). Für die Kooperativität liegt ein positiver Trend in der Beurteilung durch den Pfleger vor ($p < 0,1$). Die positivere Bewertung dieser Parameter durch den Pfleger könnte ebenfalls auf die unterschiedliche Position, aber vorwiegend auf die unterschiedlichen Aufgaben während der Versuchsdurchführung zurückgeführt werden. Neben der Stimulation erfolgte das Auffangen eventueller Ejakulate in Probenbehältern durch die Autorin. Abhängig von der Position des Bullen, konnte sie dabei durch Säulen des Stands oder durch den Bullen beeinträchtigt werden und Abwehrbewegungen vergleichsweise stärker empfinden.

Die signifikant unterschiedliche Beurteilung der Aggressivität des Bullen bei den Versuchen ohne Medikation ($p < 0,05$), könnte ebenso durch die unterschiedliche Position von Pfleger und Autorin bei der Versuchsdurchführung bedingt sein. Vielmehr ist aber davon auszugehen, dass der Pfleger durch seine langjährige, intensive Erfahrung im Umgang mit Nashörnern früher sowie mit höherer Sensibilität Anzeichen von Aggressivität des Nashornbullens wahrnimmt.

Tab. 3: Einschätzung des Verhaltens des Bullen ‚Denny‘, Zoo Salzburg, während der Hauptuntersuchung durch den Pfleger und durch die Autorin an Hand einer kontinuierlichen Minimum-Maximum-Skala zum Nachweis der Reliabilität ($\bar{x} \pm SD$)

Verhaltensparameter (minimale – maximale Ausprägung) ^a	Einschätzung des Verhaltens			
	Placebo		Medikation	
	Pfleger (n=15)	Autorin (n=15)	Pfleger (n=15)	Autorin (n=15)
Zielstrebigkeit beim Betreten des Zwangsstands (sehr zögernd - sehr zügig)	86 ± 6	80 ± 13	84 ± 12	73 ± 20
Ruhe beim Betreten des Zwangsstands (sehr unruhig - sehr ruhig)	87 ± 6	85 ± 17	84 ± 10	70 ± 26
Stand vor Beginn der manuellen Stimulation (sehr unruhig - sehr ruhig)	78 ± 12	76 ± 18	80 ± 11	78 ± 12
Stand während der manuellen Stimulation (sehr unruhig - sehr ruhig)	69 ± 18	64 ± 20	82 ± 9	79 ± 7
Erreichbarkeit des äußeren Genitales vor Beginn der manuellen Stimulation (nicht erreichbar – optimal erreichbar)	75 ± 12	79 ± 19	79 ± 10	74 ± 9
Erreichbarkeit des äußeren Genitales während der manuellen Stimulation (nicht erreichbar – optimal erreichbar)	76 ± 14 ^c	57 ± 23 ^c	89 ± 5 ^c	76 ± 11 ^c
Kooperativität des Bullen (nicht kooperativ - sehr kooperativ)	44 ± 28	35 ± 23	64 ± 14 ^b	53 ± 15 ^b
Ängstlichkeit (nicht ängstlich - sehr ängstlich)	10 ± 7	8 ± 9	5 ± 2	4 ± 5
Aggressivität (nicht aggressiv - sehr aggressiv)	17 ± 26 ^c	8 ± 17 ^c	9 ± 8	10 ± 12
Abwehrbewegungen (nicht abwehrend - sehr abwehrend)	16 ± 13	24 ± 27	9 ± 8 ^c	23 ± 9 ^c
Sexuelle Erregung (nicht sexuell erregt - sehr sexuell erregt)	41 ± 30	33 ± 31	57 ± 28	49 ± 28
Erektionsstärke (keine - sehr stark)	38 ± 30	47 ± 25	75 ± 17	81 ± 11

^a Auf der kontinuierlichen Bewertungsskala von 0 bis 100 bezieht sich die in Klammern links stehende Beurteilung auf den Beginn, die rechts stehende Beurteilung auf das Ende der Skala (ausführlicher s. Anhang S. 9-13).

^b Trend ($p < 0,1$, Mann-Whitney-U-Test)

^c Signifikant unterschiedliche Einschätzung des jeweiligen Verhaltensparameters ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test)

Versuchsabschnitt Spermienkopfmorphometrie

VI. Färbeprotokoll

Färbung nach Farelly (Färbezeit modifiziert)

10% Formalin in 0,9% NaCl-Lösung	10 sec
5% Anilinblau	5 min
0,5% Kristallviolett	1 min

Nach jedem Schritt spülen mit Aqua dest.

In Vorversuchen ergab die modifizierte Farelly-Färbung für die morphometrische Analyse mit dem HTM IVOS für Nashornspermien die besten Ergebnisse, da sich die Spermienköpfe intensiv und weitgehend homogen anfärbten (Abb 5a).

Trotz hoher morphologischer Ähnlichkeit zu Hengstsperma, erwies sich dagegen die in Untersuchungen von UHLENBROCK (1999) bei dieser Tierart am besten geeignete Hematoxylin-Färbung für Nashornsperma als ungeeignet, da sich die Spermienköpfe vergleichsweise blass und sehr inhomogen anfärbten (Abb 5b). Daraus resultierten bei der morphometrischen Analyse mit dem HTM IVOS zahlreiche Digitalisierungsfehler.

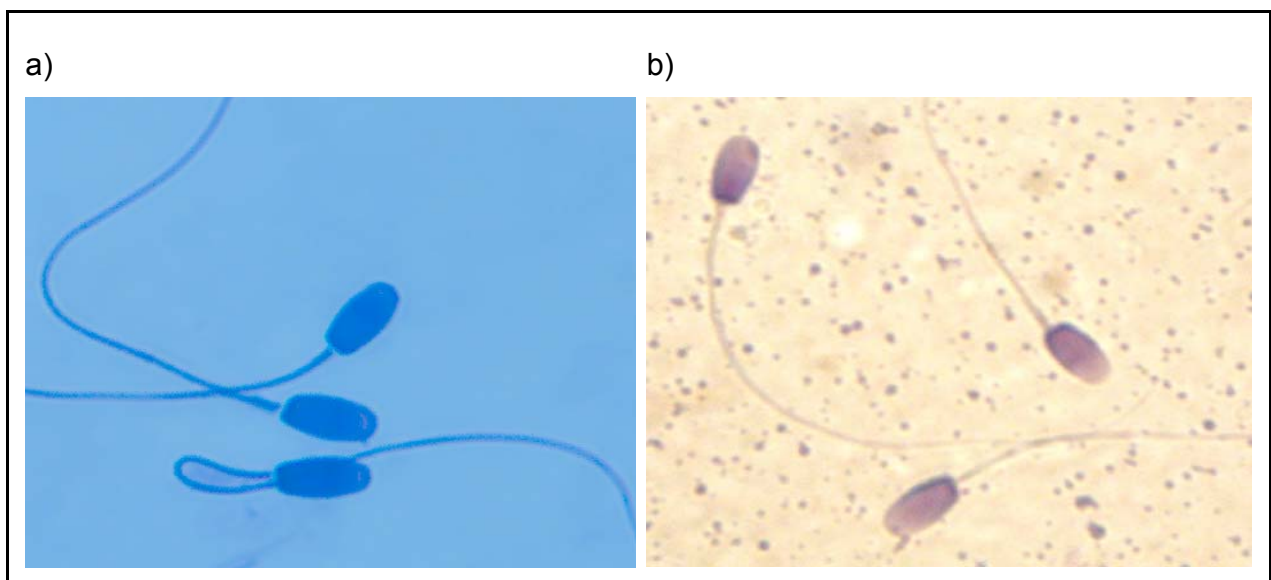


Abb 5: Breitmaulnashornspermien, 100x Objektiv, Ölimmersion:
a) Färbung: Farelly, modifiziert. Intensive, relativ homogene Färbung der Spermienköpfe
b) Färbung: Hematoxylin: Schwache, inhomogene Färbung der Spermienköpfe (Quelle Fotos: Autorin)

VII. Technische Modifikation des HTM IVOS

Das HTM IVOS ist serienmäßig mit einem Objektträgertischsystem ausgestattet, das ein automatisches Ein- und Ausfahren von Objektträgern ermöglicht. Die beiden Hauptteile dieses Systems bestehen in einem elektronisch gesteuerten Tisch und einer darin befindlichen Objektträgerhalterung (Abb. 6a).

Die Form und die seitlichen Vertiefungen der Halterung erlaubten nur die Betrachtung eines geringen Teilausschnitts des Ausstrichpräparats entlang der zentralen Längsachse. Um auch Spermienköpfe anderer Areale des Objektträgers in die Untersuchung mit einbeziehen zu können, wurde von der Autorin ein spezieller Tischaufsatz entwickelt, der aufgrund seiner ebenen Struktur ein beliebiges Verschieben des Objektträgers erlaubte (Abb. 6).

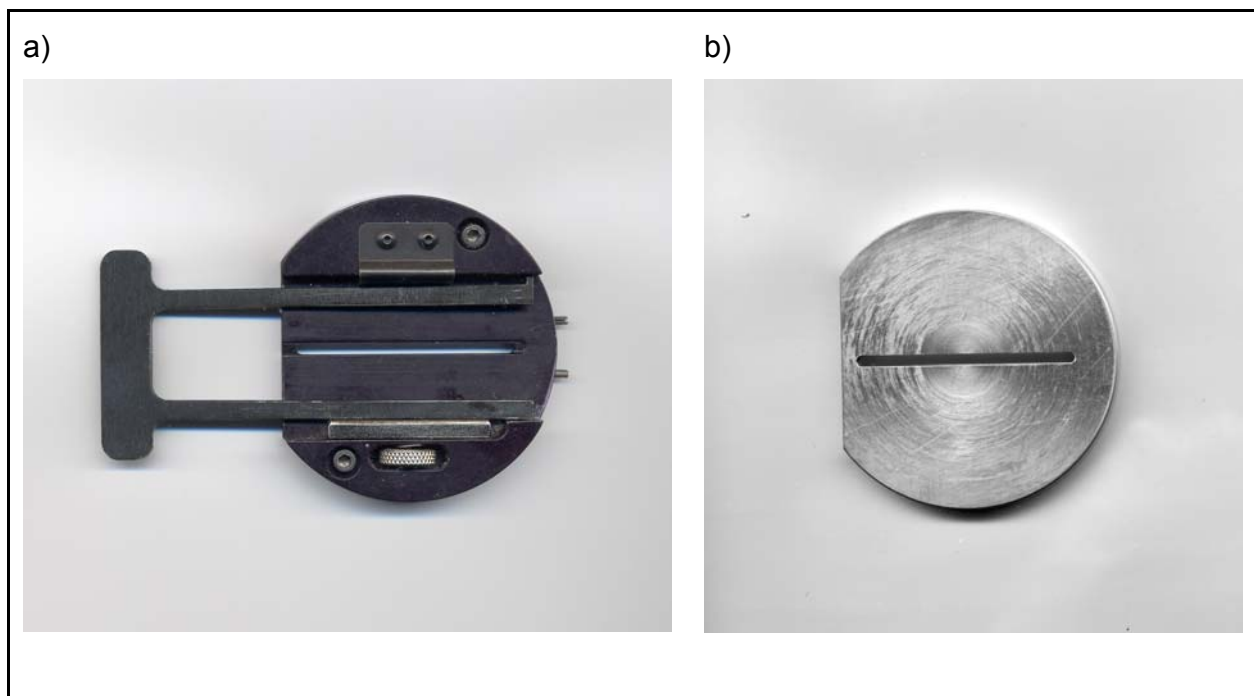


Abb. 6: Objektträgerhalterung des HTM IVOS:

a) Serienmäßig produzierter Tischaufsatz des Analysesystems: Der Objektträger wird fest in die Halterung eingespannt und kann durch die seitlichen Vertiefungen kaum verschoben werden. Dadurch ist nur eine Analyse entlang der zentralen Längsachse des Ausstrichpräparats möglich.

b) Von der Autorin entwickelter Tischaufsatz: Die ebene Fläche ermöglicht ein Verschieben des Objektträgers und die Analyse beliebiger Areale.

(Quelle Fotos: Autorin)

VIII. Setup-Einstellungen

Tab. 4: Konfiguration der Setup-Parameter der HTM IVOS-Software

Setup-Parameter	Konfiguration
Frames to average	2
View Selection Mode	Manual
Minimum Contrast	70
Minimum Cell Size (Pixel)	400
Category Method	Single
Capture Radius	5
Acrosome Gate (%)	0

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Rudolf Stolla danke ich für die Annahme dieses Themas und sein Interesse für eine von der üblichen Klientel der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik abweichenden Tierart. Besonders bedanke ich mich für seine freundliche Unterstützung bei der Durchführung und Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Univ.-Doz. Dr. Chris Walzer, Zoo Salzburg, danke ich herzlich für die Einbindung in das ‚Nashorn-Projekt‘, für die abwechslungsreiche gemeinsame Arbeit im In- und Ausland und seine fachliche und persönliche Unterstützung.

Allen MitarbeiterInnen des Zoo Salzburg, insbesondere den Pflegern des ‚Afrika-Reviere‘, danke ich für die gute Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn Franz Messner für seine Geduld und tatkräftige Unterstützung bei den Deseminationsversuchen, Frau Inge Kiesenhofer (nicht nur) für ihren hervorragenden Kaffee, Herrn Dr. Leopold Slotta-Bachmayr für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung sowie Herrn Direktor Dr. Rainer Revers für seine Zustimmung zu dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Franz Schwarzenberger, Institut für Biochemie der Veterinärmedizinischen Universität, Wien, sowie Herrn Dr. Thomas Hildebrandt und Herrn Dr. Frank Göritz, Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Berlin, danke ich für die Möglichkeit der Mitwirkung bei den Nashornuntersuchungen. Ausdrücklich bedanke ich mich bei Herrn Dr. Steffen Blottner und Herrn Dr. Robert Hermes, IZW, für die Unterstützung bei der Anfertigung der Spermaausstriche und für ihre intensive Mitarbeit bei der Erstellung des dieser Arbeit beiliegenden Videoclips.

Ein großer Dank gebührt allen MitarbeiterInnen und DoktorandInnen der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der LMU, besonders Herrn Dr. Lorenzo Diaz, Herrn Dr. Jan Ehlers, Frau Dr. Sandra Hake und Herrn Dr. Wilhelm Schefels, aber auch Frau Dr. Jutta Fricker, Institut für Tieranatomie.

Für die freundliche Aufnahme im Allwetterzoo Münster sowie für die freundschaftliche Zusammenarbeit danke ich allen Pflegern des Elefantenhauses, insbesondere Herrn Michael Adler und Herrn Uwe Schneider, dem Zootierarzt Herrn Dr. Karl Schaller, dem Kurator Herrn Dr. Dag Enke und nicht zuletzt dem Geschäftsführer Herrn Dr. Jörg Adler.

Schließlich danke ich meinen Eltern und Ralf sehr herzlich für ihre großartige persönliche Unterstützung und ihr Verständnis während der Erstellung dieser Arbeit.

Finanziell wurde die Arbeit durch die Bewilligung des Stipendiums zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses der LMU, des Aufstockungsstipendiums durch den DAAD sowie Geldern der International Rhino Foundation unterstützt.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Silinski
Vorname: Sandra
Geburtsdatum: 2. November 1973
Geburtsort: Kassel
Eltern: Wilhelm Hermann Alfred Silinski; Finanzberater
Brigitte Edith Adelgunde Silinski, geb. Powelske; Kfm. Angestellte

Schulischer und beruflicher Werdegang

1980-1984 Grundschule Alzey-Weinheim
1984-1993 Gymnasium am Römerkastell, Alzey
18.06.1993 Abitur
1994-2000 Studium der Tiermedizin an der LMU München
1996/97 Studentische Hilfskraft im Institut für Tieranatomie der LMU München
1997/98 Auslandsstudium an der Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Frankreich
(gefördert durch ERASMUS / SOKRATES)
09.08.2000 Staatsexamen
27.12.2000 Approbation
2000-2003 Erstellung der Dissertation am Zoo Salzburg, Österreich, und an der
Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der LMU München;
Tätigkeit als Assistenztierärztin, Zoo Salzburg, Österreich
2000-2002 Stipendium zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses der LMU
München
Aufstockungsstipendium des Deutschen Akademischen Austausch-
dienstes, DAAD