

## **4.           Untersuchte Tiere, Material und Methoden**

Die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen gliedern sich in drei Teile.

- Der erste, anatomische Teil stellt die Reproduktionstrakte der verschiedenen Bärenarten sowohl morphologisch als auch sonomorphologisch vergleichend dar.
- Im zweiten Teil werden die per Elektroejakulation gewonnenen Ejakulate mittels spermatologischer Kriterien untersucht und ebenso verglichen.
- Im letzten, laboranalytischen Teil wird die Anwendbarkeit bereits etablierter Methoden zum nicht-invasiven Hormonmonitoring an den Weibchen dreier Bärenarten getestet und neue Methoden zum Nachweis zyklusabhängiger, flüchtiger Urinhaltsstoffe (Volatiles) entwickelt. Sofern ein direkter Zugriff auf die Tiere möglich war, erfolgte die Verifizierung des laboranalytisch ermittelten Reproduktionsstandes über eine sonographische Kontrolluntersuchung.

### **4.1.        Untersuchte Tiere**

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen standen insgesamt 66 Individuen aller acht rezenter Bärenarten zur Verfügung. Im Einzelnen handelt es sich um 28 Braunbären, sechs Eisbären, drei Schwarzbären, vier Kragenbären, fünf Lippenbären, sechs Malaienbären, zwölf Brillenbären und zwei Große Pandas. Die Zuchtbuchdaten der aus insgesamt 19 verschiedenen zoologischen Institutionen stammenden Tiere sind mit Namen und Altersangabe in Anhang 1 aufgeführt.

Alle Bären dieser Studie werden bzw. wurden in menschlicher Obhut gehalten. Zum überwiegenden Teil leben sie zu mehreren Tieren auf Bärenanlagen, die aus Einzelkäfigen mit Freigehegeanteil bestehen. In Abhängigkeit von Witterung und biologischen Ansprüchen befinden sich die Bären tagsüber meist im Freigehege. Über Nacht kommen die Tiere in Einzelkäfige, in denen auch die Möglichkeit eines direkten Zugriffs zur Betäubung, gezielter Untersuchung oder Probennahme besteht.

Bei allen in dieser Studie untersuchten Bären handelt es sich um ausgewachsene, geschlechtsreife Tiere, die entweder bereits erfolgreich Nachwuchs gezeugt haben oder zumindest bei der Paarung beobachtet wurden.

Für die morphologischen Untersuchungen in dieser Studie wurden Genitaltrakte von insgesamt neun Bären, dreier männlicher und sechs weiblicher, aus vier verschiedenen Arten (Braunbär, Eisbär, Schwarzbär und Malaienbär) post mortem untersucht. Die Reproduktionsorgane stammten entweder von Bären, die dem Institut für Zoo- und Wildtierforschung zur Sektion übermittelt wurden, oder aus tiefgefrorenem Material, welches von kooperierenden Zoos eingesandt wurde.

Bei der Ende Oktober zur Sektion eingelieferten Schwarzbärin "Berolina" wurde im Rahmen der morphologischen Untersuchung der Uterus von den Uterushornspitzen her mit jeweils 10 ml gepuffertem Zellmedium gespült. Die Spülflüssigkeit wurde unter Phasenkontrast bei 100-facher Vergrößerung untersucht (Kap 5.1.2).

Sonomorphologische Untersuchungen wurden an 62 lebenden Bären aus allen acht Arten durchgeführt. Bei einigen Individuen der Braun-, Eis- und Kragenbären sowie der Großen

Pandas konnten Daten aus unterschiedlichen Reproduktionsphasen und teilweise über mehrere Jahre hinweg gewonnen werden (Anhang 4). Seitens der männlichen Kragenbären stand dieser Studie nur ein Exemplar zur Verfügung, das bereits vor mehreren Jahren kastriert worden war.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden von sieben männlichen Bären aus drei Arten (Braunbär, Brillenbär und Großer Panda) spermatologische Daten erhoben. Von diesen Bärenmännchen hatten alle bis auf den blinden Brillenbär „Balu“ und den Großen Panda „Bao-Bao“ erfolgreich Nachwuchs gezeugt. Der Braunbär „Goschka“ war zum Zeitpunkt der Samenentnahme bereits sehr alt und musste aufgrund gesundheitlicher Probleme eingeschläfert werden.

Im letzten Teil wurden für das Reproduktionsmonitoring laboranalytische Untersuchungen und sonographische Untersuchungen durchgeführt (Tab. 4-1). Hierfür wurden zehn weibliche Bären aus drei Arten (Braunbär, Brillenbär und Großer Panda) ausgewählt. Die notwendigen Angaben über die Zeiträume der jeweiligen Paarungszeit entstammen dem Pflegepersonal der einzelnen Zoos.

**Tab. 4-1: Reproduktionsphysiologische Daten der untersuchten Bären sowie die Zeitpunkte der Laboranalysen (Hormone (Hor.) aus Kot, Urin und/oder Speichel, Volatiles (Vola.) aus Urin) und der Ultraschallschalluntersuchungen (US)**

Art	Name	Paarungszeit	Bemerkung	Hor.	Vola.	US
Braunbär	Bianca	2001 ohne Angabe	Kontrazeption	2001	-	08.08.01
		27.05. – 04.06.02	Kontrazeption	2002	2002	29.11.02
	Dascha	15.02. – 01.05.02	lebt mit Kastrat	2002	2002	-
	Dunkle-S	07.06. – 10.06.02	ohne Männchen	2002	2002	-
	Helle-S	07.06. – 10.06.02	ohne Männchen	2002	2002	-
Brillenbär	Dolores	11.04. – 20.05.02	kein Nachwuchs	2002	-	19.03.02
	Julia	nicht beobachtet	kein Nachwuchs	2002	2002	-
	Lee	04.07. – 09.07.02	Vulvaverwachsung	2002	-	24.06.02
	Peruana	permanent	25.11.2002: Blut im Urin (Geburt)	2002	2002	16.10.02
	Pueblo	10.04. – 17.04.02	kein Nachwuchs	2002	-	19.04.02
Großer Panda	Yan-Yan	14.04. – 23.04.97	außer 2000 jedes Jahr künstlich besamt; bisher kein Nachwuchs	1997	-	1997 – 2003: 16 Unters. siehe Anhang 4
		19.04. – 24.04.98		1998	-	
		18.05. – 19.05.99		1999	-	
		29.04. – 30.04.00		2000	2000	
		04.05. – 06.05.01		2001	2001	
		11.04. – 17.04.02		2002	2002	
		10.04. – 17.04.03		2003	2003	

Auf die Historie zweier trächtiger Individuen soll hier detaillierter eingegangen werden, da an diesen Tieren die umfassendsten Untersuchungen durchgeführt wurden.

Die Braunbärin „Bianca“ wurde am 8. August 2001 sonographisch untersucht und befand sich zu diesem Zeitpunkt in der Diapause. Am 16. November wurde das Tier mit Antigestagenen behandelt, um eine Trächtigkeit abubrechen. Im darauf folgenden Jahr

wurde sie vom 27. Mai bis 4. Juni mehrfach gedeckt. Eine Ultraschalluntersuchung am 29. November 2002 erbrachte zwei frisch implantierte Blastozysten, aufgrund welcher das Implantationsdatum auf den 27. oder 28. November 2002 zurückdatiert werden konnte. Am Tag der Ultraschalluntersuchung wurde sie wieder kontrazepiert.

Die Brillenbärin „Peruana“ wurde 2002 permanent gedeckt. Die Eingrenzung eines Östrus war somit nicht möglich. Bei einer Ultraschalluntersuchung am 16. Oktober 2002 wurden zwei Föten mit einer Scheitel-Steiß-Länge (SSL) von 21,9 cm diagnostiziert. Nach Quest (2001) lässt sich die Implantation auf den 25. September 2002 zurückdatieren. Nach Michel (1984) wird der Geburtszeitraum auf die Zeit vom 20. November bis 4. Dezember 2002 eingegrenzt. Am 25. November 2002 wurden bei diesem Tier Blut im Urin beobachtet, jedoch keine Jungtiere gefunden. Somit wird dieses Datum als vermutliche Geburt angesehen, bei der es wahrscheinlich zur Fötophagie kam.

Das Große Pandaweibchen im Zoologischen Garten Berlin war bis 2003 das einzige seiner Art in Europa. Im Rahmen eines Leihgabeabkommens zwischen dem Halter und der Volksrepublik China wurden an ihr die intensivsten Anstrengungen zur assistierten Reproduktion unternommen (Tab. 4-1). „Yan-Yan“ lebt seit dem Jahr 1995 im Zoologischen Garten Berlin. Nach ihrer Ankunft wurde festgestellt, dass die 10 Jahre alte Bärin azyklisch war; die Östrogen- und Progesteronkonzentrationen im Urin sowie das Verhalten ließen keinerlei Sexualaktivität erkennen (Meyer *et al.* 1997). Aufgrund dieser Azyklie wurde „Yan-Yan“ in den Jahren 1997, 1998, 1999 und 2001 hormonell stimuliert (Hildebrandt *et al.* 2000a) sowie in den Jahren 1997, 1998, 1999, 2001, 2002 und 2003 künstlich besamt. Jedoch blieben die Besamungen bislang ohne Erfolg.

## 4.2. Material und Methoden

Die verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien sind tabellarisch in Anhang 2 aufgelistet.

### 4.2.1. Morphologische und somomorphologische Untersuchungen des Geschlechtstraktes

#### 4.2.1.1. Morphologische Untersuchungen

Bei insgesamt sechs Tieren, je drei männlichen und drei weiblichen, wurde vor der Sektion zusätzlich eine somomorphologische Untersuchung durchgeführt (siehe 4.2.1.2.2.). Um die korrekte Vermessung des Reproduktionstraktes mittels Ultraschall zu überprüfen, wurden die sonographisch ermittelten Daten von drei männlichen Tieren (ein Malaienbär und zwei Braunbären) mit den während der nachfolgenden Sektion erhobenen Messergebnissen verglichen.

Während der Sektion wurden, nach Eröffnung der Bauchhöhle und Durchtrennung der *Symphysis pelvina*, die Reproduktionsorgane zunächst *in toto* entnommen (Abb. 4-1). Zur Ermittlung der exakten Maße einzelner Organe und Organanteile wurden diese frei präpariert und mit Hilfe eines Maßbandes oder einer Schiebelehre vermessen. (Protokoll s. Anhang 3). Im Rahmen dieser Studie wurden bei männlichen Vertretern folgende Organe berücksichtigt: Länge und Durchmesser der paarig angelegten akzessorischen Geschlechtsdrüse *Ampulla ductus deferentis* (im Folgenden als *Ampulla* bezeichnet), sowie Länge und Durchmesser der unpaaren *Glandula prostatica* (im Folgenden als *Prostata* bezeichnet) und die Durchmesser beider Hoden. Bei weiblichen Tieren wurden die Längen des Uteruskörpers und beider Uterushörner ermittelt.

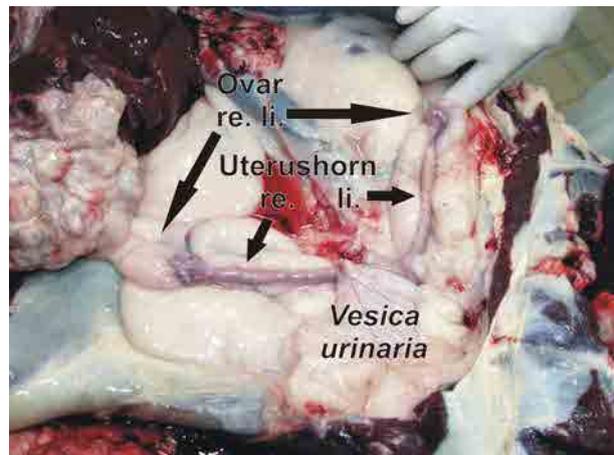


Abb. 4-1: Sektion eines weiblichen Braunbären. Darstellung der Geschlechtsorgane *in situ*.

Der Uterus einer Schwarzbärin in der Diapause wurde von den Uterushornspitzen mit jeweils 10 ml gepuffertem Zellmedium gespült. Die Spülflüssigkeit wurde unter Phasenkontrast bei 100-facher Vergrößerung untersucht (siehe 5.1.2).

## 4.2.1.2. Sonomorphologische Untersuchungen

Bereits 1997 wurde von Göritz *et al.* ein Protokoll für die sonomorphologische Untersuchung des Genitaltraktes der Bären beschrieben und etabliert. Seither werden alle Bärenarten gemäß dieser Vorgehensweise untersucht. Die Aufgabe der vorliegenden Studie besteht darin, zusätzlich zu den eigenen Untersuchungen, die vorangehend gesammelten Daten auszuwerten und zu gliedern, saisonale und reproduktionsstatusbedingte Größenveränderungen zu dokumentieren und artspezifische Vergleiche anzustellen.

### 4.2.1.2.1. Immobilisation

Alle Bären wurden zur Untersuchung immobilisiert. Hierzu wurden verschiedene Anästhetika (Tab. 4-2) mittels Injektionspistole oder Blasrohr in die Muskelpartien des Schulter- oder Glutaeusbereiches appliziert (Abb. 4-2). Nach Ende der Untersuchung wurde den Tieren ein Antidot zur Beendigung der Narkose verabreicht (Tab. 4-3).



Abb. 4-2: Immobilisation per Blasrohr

Die Narkosen der beiden Großen Pandas des Berliner Zoologischen Gartens wurden mit 1000 mg Ketamin pro Tier eingeleitet und mittels Inhalationsnarkose mit Isofluran (IsoFlo<sup>®</sup>, Essex Tierarznei, München) über eine Atemmaske aufrechterhalten.

Tab. 4-2: Kombinationsinjektionsanästhesie bei in dieser Studie untersuchten Bären

Tier	Anästhetikum 1	Dosierung	Anästhetikum 2	Dosierung
Brillenbär	Ketamin <sup>1</sup>	2,8 mg/kg KGW	Xylazin <sup>2</sup>	3,6 mg/kg KGW
Lippenbär, Schwarzbär,	Ketamin <sup>1</sup>	4,0 mg/kg KGW	Xylazin <sup>2</sup>	3,0 mg/kg KGW
Kragenbär Braunbär, Eisbär	Etorphin + Acepromazin <sup>3</sup>	17,8 µg/kg KGW + 79 mg/kg KGW	Xylazin <sup>2</sup>	20 mg/Tier
Braunbär	Medetomidin <sup>4</sup>	60 µg/kg KGW	Ketamin <sup>1</sup>	3 mg/kg KGW
Schwarzbär, Malaienbär	Tiletamin + Zolazepam <sup>5</sup>	6 mg/kg KGW + 6 mg/kg KGW		

<sup>1</sup> Ketaminhydrochlorid, Ketamin 10 %<sup>®</sup>, WDT, Garbsen

<sup>2</sup> Xylazin, Rompun<sup>®</sup>, BayerVital GmbH, Leverkusen

<sup>3</sup> Etorphin + Acepromazin, Large Animal Immobilon<sup>®</sup>, C-Vet Ltd, Bury St Edmunds

<sup>4</sup> Medetomidinhydrochlorid, Domitor<sup>®</sup>, Pfizer GmbH, Karlsruhe

<sup>5</sup> Tiletamin + Zolazepam, Zoletil<sup>®</sup>, Parke-Davis, Neuss

**Tab. 4-3: Anästhesieantagonisierung bei in dieser Studie untersuchten Bären**

Anästhetikum	Antidot	Dosierung
Etorphin	Diprenorphin <sup>6</sup>	2,67 mg/1 mg Etorphin
Xylazin	Atipamezol <sup>7</sup>	1 mg/2 mg Xylazin
Medetomidin	Atipamezol <sup>7</sup>	0,45 mg/kg KGW; 0,3 mg i.m. und 0,15 mg s.c.

<sup>6</sup> Diprenorphin, Revivon<sup>®</sup>, C-Vet LTD, Bury St Edmunds

<sup>7</sup> Atipamezolhydrochlorid, Antisedan<sup>®</sup>, Pfizer GmbH, Karlsruhe

#### 4.2.1.2.2. Transrektale Ultraschalldiagnostik

Für den transrektalen Ultraschall wurde ein portables Ultraschallgerät verwendet, welches mit einem intraoperativen 7,5 MHz Mikrokonvex-Schallkopf ausgestattet war. Der Schallkopf wurde in einen speziellen Adapter platziert, um ein atraumatisches Führen im Rektum bis zu einer Tiefe von 50 cm zu ermöglichen (Göritz 1996; Hildebrandt und Göritz 1995) (Abb. 4-3). Alle Ultraschalluntersuchungen wurden zur Archivierung und späteren Auswertung zunächst per Videorekorder auf S-VHS Videokassetten, seit 2001 per Watchman auf Mini DV Kassetten aufgezeichnet.

Zunächst wurde der Enddarm mittels körperwarmen Wassers von Kot gereinigt. Anschließend konnte der Schallkopf unter Verwendung von Ultraschallgel in das Rektum eingeführt werden (Abb. 4-4). Durch vorsichtiges Vorschieben wurden nacheinander die Geschlechtsorgane aufgesucht und ihre maximalen Ausdehnungen vermessen. Hierbei wurden, soweit dies erforderlich war, alle paarig angelegten Organe pro Körperseite einzeln berücksichtigt.

Im Rahmen dieser Studie wurden beim Männchen die akzessorischen Geschlechtsdrüsen Prostata und Ampulla und beim Weibchen der Körper, die Hörner und das Endometrium des Uterus sowie die Ovarien mit ihren Funktionskörpern dargestellt. Zur Beschreibung des Aktivitätszustandes des Uterus wurde die Proliferation des Endometriums beurteilt, indem dessen Mächtigkeit ins Verhältnis zum Uterusdurchmesser gesetzt wird.



**Abb. 4-3: 7,5 MHz Mikrokonvex-Schallkopf mit verschiedenen Führungshilfen. Der üblicherweise verwendete 50 cm Adapter befindet sich im Bild ganz oben.**



**Abb. 4-4: Rektale Insertion des Ultraschall-adapters beim Großen Panda.**

Zur Ermittlung des Hodendurchmessers wurde der Hoden zunächst rasiert, mit einem Orchimeter vermessen und anschließend transkutan mit einem 10 MHz Linearschallkopf gescannt.

Die Untersuchungsergebnisse der Reproduktionsorgane wurden in Reproduktionsstadien unterteilt. Bei den Männchen waren dies „Ruhezeit“ und „Paarungszeit“. Die Ergebnisse der weiblichen Bären wurden in fünf Reproduktionsstadien aufgliedert:

1. Anöstrus: Geburt bis Brunstbeginn, Reproduktion inaktiv
2. Östrus: Beginn der Brunst bis zur Ovulation des Follikels
3. Diapause: nach der Ovulation bis zum Zeitpunkt der Implantation
4. Trächtig: vom Nachweis einer Fruchtanlage bis zur Geburt
5. Nicht trächtig: wie trächtig, jedoch ohne nachweisbare Fruchtanlage nach dem Zeitpunkt der Implantation, also pseudogravide und nicht bedeckte Tiere

#### 4.2.2. Elektroejakulation

Nach der sonographischen Beurteilung der Geschlechtsorgane wurde bei sieben männlichen Bären dreier verschiedener Arten Sperma mittels Elektroejakulation gewonnen (Tab. 4-4).

**Tab. 4-4: Überblick über eventuelle Ultraschalluntersuchungen (US) und anschließende Elektroejakulationen (EE) der untersuchten Bären mit Angaben der Reproduktionssaison und des Reproduktionserfolges. +++ nachgewiesener Zuchterfolg, --- kein nachgewiesener Zuchterfolg**

Art	Name	US.	Saison	EE	Nachwuchs
Braunbär	Boris	+	Paarungszeit	20.07.1998	+++
	Goschka	+	Euthanasie	18.07.2001	+++
Brillenbär	Balu	+	Ruhezeit	19.03.2002	---
		+	Paarungszeit	19.06.2000	
	Miquel	+	Paarungszeit	25.06.2002	+++
	Monkey	+	Ruhezeit	01.02.2001	+++
		+	Paarungszeit	19.06.2000	
	Taison	+	Paarungszeit	25.06.2002	+++
Großer Panda	Bao-Bao	-	Paarungszeit	24.04.2003	---
		+	Paarungszeit	17.04.2003	
		+	Paarungszeit	19.04.2001	
		-	Paarungszeit	31.03.2000	
		-	Paarungszeit	19.05.1999	
		+	Paarungszeit	09.05.1999	
		-	Paarungszeit	08.04.1999	
		+	Paarungszeit	09.04.1998	
		+	Ruhezeit	22.09.1997	
		+	Paarungszeit	21.05.1997	
		+	Paarungszeit	21.03.1997	

#### 4.2.2.1. Durchführung

Zunächst wurden die akzessorischen Geschlechtsdrüsen mittels transrektalen Ultraschalls lokalisiert und vermessen (siehe 4.2.1.2.). Danach wurde der Füllungszustand der Harnblase ermittelt. Eine stark gefüllte Blase wurde zur Vermeidung einer Urinkontamination des Ejakulates über einen Katheter entleert und anschließend mit gepuffertem Zellmedium gespült.

Für die Elektroejakulation wurde ein für die Humanmedizin entwickelter Elektroejakulator verwendet. Die für die Bären verwendeten Elektroejakulationssonden hatten eine Größe von fünf bzw. sechs Zentimetern im Durchmesser; die Auswahl richtete sich nach der Größe des Tieres. Die Elektroden befanden sich in paralleler Anordnung leicht erhoben longitudinal an der Unterseite der Sonde (Abb. 4-5 links). Die Sonde wurde mit Ultraschallgel gleitfähig gemacht und in das Rektum eingeführt (Abb. 4-5 Mitte). Stimuliert wurde das Tier zum einen rektal durch Hin- und Herschieben der Sonde über den akzessorischen Geschlechtsdrüsen, zum anderen manuell durch Manipulation am Penis. Zur Ejakulation wurden Elektrostimuli mit langsam ansteigenden Strömen von maximal acht Volt und 400 mA angelegt die bis zu 20-mal wiederholt wurden (Abb. 4-5 rechts). Die Stimuli führten zum Auswurf mehrerer Ejakulatfraktionen. Die Fraktionen wurden jeweils einzeln in sterilen, auf Körpertemperatur erwärmten Plastikgefäßen aufgefangen und in temperierte Glasmantelgefäße überführt.



**Abb. 4-5:** links: Verschiedene Elektroejakulationssonden. Für Bären wurden die zweite und dritte Sonde von hinten verwendet (Ø 6 bzw. 5 cm); Mitte: Einführen der Sonde in das Rektum eines Brillenbären; rechts: Samenentnahme während der Stimulation beim Brillenbären.

#### 4.2.2.2. Spermabewertung

Die Volumina der aufgefangenen einzelnen Ejakulatfraktionen wurden vermerkt und zum Gesamtvolumen aufaddiert. Die Spermabewertung erfolgte unter den Gesichtspunkten Volumen, Konzentration, Motilität sowie Morphologie. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Zählkammer nach Neubauer benutzt. Die Konzentration ergab sich nach Umrechnung des Zählwertes auf das definierte Volumen, die absolute Anzahl der Spermien nach Multiplikation mit dem Gesamtvolumen. Zur Beurteilung der Motilität wurde das Sperma mit gepuffertem Zellmedium verdünnt, 20 µl der Verdünnung auf einen Objektträger aufgetragen und unter einem Deckglas (24 x 24 mm) bei 400-facher Vergrößerung mit einem Mikroskop mit Wärmetisch bei 37°C mittels Phasenkontrast oder Dunkelfeld bewertet. Die Morphologie der Spermien wurde nach Kongorot-/ Brilliantkresylblau-Färbung (Blotner *et al.* 1989) bei 400-facher Vergrößerung bestimmt. Diese Färbung liefert bei verschiedenen Wildtierarten

gute Übersichtspräparate und erlaubt auch bei Bären die klare Differenzierung der einzelnen Zellkompartimente (Akrosom, postakrosomale Region, Geißel mit Endstück, s. Abb. 4-6). Die Spermien wurden unterteilt in intakte und nicht intakte Spermien. Zu den nicht intakten gehörten Spermien mit abgelöstem Akrosom und solche, bei denen sich das Akrosom in Ablösung befand, weiterhin Spermien ohne Schwanz, mit Kopf- oder Schwanzdeformationen und Spermien mit Plasmotropfen.

Nach der Untersuchung wurde das Sperma entweder zur Frischspermaversammlung benutzt (Großer Panda, Brillenbär) oder kryokonserviert (Großer Panda) (Göltenboth *et al.* 1998).

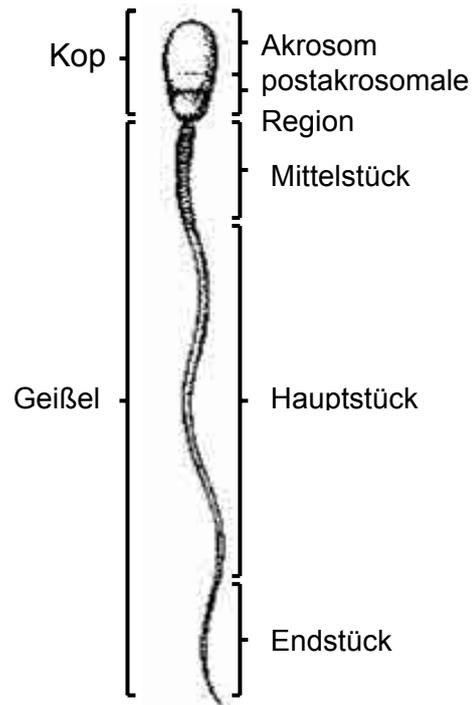


Abb. 4-6: Schematische Darstellung eines Spermatozoon

#### 4.2.2.3. Urinkontamination

Trotz der oben beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen kam es bei beiden

Braunbären und bei dem Brillenbären „Balu“ zu Urinkontaminationen der Ejakulate, welche sich in einer drastischen Zunahme des Volumens äußerten. Die Farbe der Ejakulatsfraktionen war urinähnlich gelblich und klar, der Geruch war urinspezifisch. Die spermatologischen Werte dieser Bären wurden nicht in die Berechnung des Volumens, der Konzentration und der Motilität mit einbezogen, jedoch wurde von „Goschka“ und „Balu“ eine morphologische Spermauntersuchung durchgeführt.

#### 4.2.3. Laboranalytische Untersuchungen

Da die Entnahme von Blutproben bei Zootieren im Allgemeinen nur unter Narkose gelingt, wurden zur Erstellung von Reproduktionsprofilen über einen längeren Zeitraum nicht-invasive Verfahren entwickelt. Diese Verfahren gewährleisten eine kontinuierliche Probensammlung von Urin, Kot und Speichel anhand derer Steroidhormonprofile (Östrogene und Gestagene) und Profile leicht flüchtiger Urinhaltsstoffe (Volatiles) erstellt werden können, ohne die Tiere zu belasten. So konnten zehn Bärenweibchen dreier Arten über ein Jahr, im Falle des Großen Panda über sieben Jahre, beprobt werden (Tab. 4-5).

Tab. 4-5: Übersicht zu den an zehn Bärenweibchen durchgeführten Laboruntersuchungen; E2: Estradiol, P4: Progesteron, PD: Pregndiol, GCMS: Gaschromatograph und Massenspektrometer, CEA: colorimetrischer Enzymassay, G.P.: Großer Panda

Art	Name	E2		P4			PD	Epiandrosteron		GCMS		CEA	pH
		Urin	Speichel	Kot	Urin	Speichel	Urin	Kot	Urin	pH 5	pH 7		
Braunbär	Bianca	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Dascha				+					+		+	+
	Dunkle-S				+					+			
	Helle-S				+					+			
Brillenbär	Peruana	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+
	Dolores		+			+							
	Pueblo			+									
	Lee			+									
	Julia				+					+		+	+
G.P.	Yan-Yan	+	+			+	+			+	+	+	+

#### 4.2.3.1. Probengewinnung

##### 4.2.3.1.1. Kotproben

Das Sammeln von Kotproben war für die meisten Zoos die praktikabelste Methode, da das Material von den Pflegern mit einem minimalen Aufwand vor der täglichen Reinigung der Gehege gesammelt werden konnte. Die Proben wurden in Kotröhrchen überführt und unverzüglich auf -20°C tief gefroren. Ihr Transport ins Labor erfolgte tiefgekühlt.

Gruppenhaltungen ohne separate Aufstallung der Tiere während der Nacht verhinderte in vielen Zoos die Sammlung individueller Kotproben, da die Kotproben nicht zugeordnet werden konnten. Einige Tiere wurden zwecks Probensammlung über Nacht von der Gruppe getrennt. Die Tiere akzeptierten dies nicht und versuchten, zurück zur Gruppe zu gelangen. Blieben sie weiterhin separiert, zeigten besonders Brillenbären innerhalb weniger Wochen stressbedingte Hautveränderungen. Aus Rücksicht auf den Allgemeinzustand der Tiere war es daher nur möglich, von insgesamt vier Bären langfristig individuelle Kotproben zu nehmen und entsprechende Hormonprofile zu erstellen.

##### 4.2.3.1.2. Urinproben

Beim Großen Panda wird bereits seit 1995 Urin zur Erstellung von Steroidhormonprofilen verwendet (Meyer *et al.* 1997). Um die Aspekte der vergleichenden Reproduktionsendokrinologie zu bearbeiten und einen artübergreifenden Vergleich zur Funktionalität dieser Methoden auch bei anderen Bärenarten überprüfen zu können, wurden sechs Bären aus zwei weiteren Arten beprobt.

Die Voraussetzung war auch hier die getrennte Aufstallung der Probanden. Der Urin wurde mit Hilfe einer Spritze direkt aus Pfützen vom Boden aufgesaugt. War dies nicht möglich, so wurde er mittels eines definierten Lämpchens (8 cm Kantenlänge, Abb. 4-7) aufgesaugt, indem dieses über Nacht an einer für die Bären unzugänglichen Stelle platziert wurde, an welcher der Urin abfloss. Das so voll gesaugte Lämpchen wurde in eine Spritze verbracht, durch Druck auf den Stempel ausgedrückt, der Urin in einem Glasfläschchen aufgefangen und unverzüglich bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Insgesamt sieben Bären sind auf diese Art kontinuierlich beprobt worden.



Abb. 4-7: Urin-Sammelset bestehend aus Handschuhen, Lämpchen, Spritze und Glasfläschchen.

#### 4.2.3.1.3. Speichelproben

Da es in einigen Zoos nicht möglich war, Kot zu sammeln und auch die Urinbeprobung auf größere Schwierigkeiten stieß, wurde nach einem alternativen Beprobungsverfahren gesucht, welches eine individuelle Entnahme in regelmäßigen, einheitlichen Abständen auch in Großanlagen gewährleisten konnte. Die Entnahme von Speichel mittels eines Baumwolltupfers an der Spitze eines Pinzettengreifers (Abb. 4-8) war in zwei Zoos die einzig mögliche Art und Weise, individuelle Proben zu erhalten.

Der Tupfer wurde in die Bäckentaschen des Bären bzw. unter seine Zunge verbracht oder den Tieren zum darauf herumkauen offeriert. Nach einer kurzen Weile wurde der Tupfer mit Hilfe des Pinzettengreifers wieder aus dem Maul geholt oder, sofern der Bär ihn selbst bereits ausgespuckt hatte, vom Boden aufgesammelt. Ein gut bespeichelter Tupfer fühlte sich schwerer an und war feucht. Er wurde in ein Plastiktütchen überführt und unverzüglich bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren gelagert.



Abb. 4-8: links: Anlocken der Bären ans Gitter; rechts: Entnahme des ausgespuckten Tupfers aus dem Käfig mittels Pinzettengreifer

## 4.2.3.2. Endokrinologische Untersuchungen

### 4.2.3.2.1. Aufbereitung der Proben

#### 4.2.3.2.1.1. Kot

Die tiefgefrorenen Kotproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. 0,5 g Kot wurden mit 4,5 ml 90 %-igem Methanol versetzt und 30 Minuten geschüttelt. Danach wurden die Proben 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde abgenommen, mit 1 ml Aqua bidest verdünnt und bis zur Hormonbestimmung bei -20°C gelagert.

#### 4.2.3.2.1.2. Urin

Steroide liegen im Urin in der Regel verestert in Form von Sulfaten oder Glukuroniden vor. Um sie für die Messung als freie Steroide verfügbar zu machen, müssen sie vor der Extraktion hydrolysiert werden. Hierzu wurden 100 µl Urin mit 0,5 ml Lysepuffer (0,05 M Azetatpuffer pH 4,8/β-Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia*: v./v. = 250/1) versetzt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Das Hydrolysat wurde mit 2,5 ml Tetrabutylmethylether/Petrolether (TBME/PE: v./v. = 30/70) versetzt, 20 Minuten geschüttelt und dann bei -70°C ausgefroren. Die flüssige Etherphase mit den darin gelösten Steroiden wurde in ein neues Röhrchen überführt und evaporiert. Der gefrorene Rückstand wurde aufgetaut und erneut wie beschrieben extrahiert, ausgefroren und evaporiert. Das Evaporat wurde in 1,0 ml 40 %-igem Methanol aufgenommen. Die Extrakte wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 4.2.3.2.1.3. Speichel

Die Tupfer wurden bei 6°C aufgetaut und bei 4000 U/min für 30 Minuten bei 6°C auszentrifugiert. Der gewonnene Speichel wurde wie in Kapitel 4.2.3.2.1.2. extrahiert, die Hydrolyse wurde übersprungen, und der Extrakt der Hormonbestimmung zugeführt (siehe 4.2.3.2.2.). Selbst nach zehnfacher Aufkonzentration während des Extraktionsschrittes konnten keine Hormone nachgewiesen werden, was die Vermutung einer Absorption der Steroidmetaboliten an den verwendeten Baumwolltupfern nahe legte. Ein Zwischenversuch ergab die Bestätigung, dass 83,8 – 100 % des eingesetzten Substrates in den Tupfern verblieb. Es wurde versucht, die am Tupfer absorbierten Steroide mittels 1 ml 90 %-igem Methanol per wiederholter Zentrifugation bei 3000 U/min für 10 min bei 25°C zu lösen. Nach Verdünnung des Zentrifugates mit Aqua bidest im Verhältnis 50:50 konnte eine 56,4 – 141,8 %-ige Zurückgewinnung bestätigt werden.

#### 4.2.3.2.2. Hormonbestimmung

Die Bestimmung der Hormonmetaboliten in den Extrakten erfolgte mittels Enzymimmunoassay (EIA) unter Anwendung der Doppelantikörpertechnik, wie sie von Prakash *et al.* (1987) beschrieben worden ist:

Das mit Meerrettichperoxidase (HRP) oder Biotin markierte Hormon konkurriert mit dem in den Proben enthaltenen Hormon um die Bindung an den Anti-Hormon-Antikörper (AK). Dieser wird durch einen Antikörper gegen das Immunglobulin G (IgG) des Spendertieres an die Mikrotitrationsplatte fixiert.

Angaben zur Spezifität der Antikörper finden sich in Tabelle 4-6.

**Tab. 4-6: Auflistung der in dieser Studie verwendeten EIAs unter Angabe der Spezifität und Herkunft**

Test	Enzym	Antikörper (AK)
Progesteron (P4)	Progesteron-3CMO-HRP, IZW	Progesteron-7-BSA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pregnan diol (PD)	5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ , 20 $\alpha$ diol-3 $\alpha$ Glucuronid-HRP, IZW	5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ , 20 $\alpha$ diol-3 $\alpha$ Glucuronid-BSA, IZW
Estradiol (E2)	1,3,5 (10) Estratrien-3,17 $\beta$ diol-17 Hemisuccinat-HRP, IZW	1,3,5 (10) Estratrien-3,17 $\beta$ diol-17 Hemisuccinat-BSA, IZW
Epiandrosteron 1	5 $\alpha$ -Androst-3 $\beta$ -ol-17one 3 Hemisuccinat-HRP, IZW	5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ -ol-17one 3 Hemisuccinat-BSA, IZW
Epiandrosteron 2	5 $\alpha$ -Androstane-3, 17 dione thioether-Biotin, VU Wien	5 $\alpha$ -Androstane-3, 17 dione thioether-Biotin, VU Wien

##### 4.2.3.2.2.1. Beschichtung der Platten

Die Mikrotitrationsplatten wurden mit affinitätsgereinigtem Anti-IgG (Ratte für P4, Kaninchen für PD, E2 und Epiandrosteron) beschichtet. In jede Vertiefung der Platte wurden 1  $\mu$ g IgG, in 100  $\mu$ l Coating Puffer (4,29 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> x 10 H<sub>2</sub>O, 2,39 % NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6), gegeben; die Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Platten mit 300  $\mu$ l Testpuffer (0,04M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O + 0,15M NaCl + 1 % BSA mit 5N HCl auf pH 7,2) für 15 – 45 Minuten bei ca. 20°C geblockt. Nach Entleerung wurden die Platten bei -20°C gelagert. Vor ihrer Verwendung im Enzymimmunoassay wurden sie einmal mit 300  $\mu$ l 0,05 % Tween 80-Lösung im automatischen Washer gewaschen.

##### 4.2.3.2.2.2. Durchführung des Enzymimmunoassays

Mit Hilfe eines automatischen Diluters wurden in einem Arbeitsschritt 20  $\mu$ l Standard (0,2 – 100 pg/20  $\mu$ l Hormon) bzw. Probelösung und 100  $\mu$ l einer Lösung mit markiertem Enzym (jeweils als Doppelbestimmung) in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte dispensiert.

Anschließend wurden 100 µl einer Verdünnung des entsprechenden Antikörpers hinzugefügt.

Diese Platten wurden bei 6 – 8°C über Nacht bei leichtem Schütteln inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Platte viermal mit 300 µl 0,05 %-iger Tween 80-Lösung im automatischen Washer gewaschen, um ungebundene Steroide zu entfernen und 150 µl der Substratlösung (0,01 % Tetramethyl-Benzidin + 0,004 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 100 nM Na-Azetat-Lösung, mit Zitronensäure auf pH 5,5 eingestellt) pro Loch pipetiert. Danach wurden die Platten lichtgeschützt und unter leichtem Schütteln im Kühlschrank inkubiert. Zum Abstoppen der Enzymreaktion wurden nach 40 Minuten 50 µl 4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugegeben.

Die optische Dichte wurde bei 450 nm im Mikrotitrationsplattenleser gemessen und die Hormonkonzentration anhand der Standardkurve bestimmt. Überschritten die ermittelten Werte den Messbereich der eingesetzten Standardkurve, wurde eine weitere Verdünnung der Extrakte erforderlich.

#### 4.2.3.2.2.3. Validierung des Enzymimmunoassays

Zur Validierung der Assays wurden die Variationskoeffizienten für Inter- bzw. Intraassay bestimmt (Tab. 4-7). Hierzu wurden zwei Proben mit bekannten Hormonkonzentrationen bei jedem durchgeführten EIA mitbestimmt und über einen größeren Zeitraum berechnet (Interassay). Für den Intraassay wurden beide Proben jeweils zehnmal auf einer Platte bestimmt. Für Epiandrosteron wurden aufgrund des zu geringen Materials keine Qualitätsparameter durchgeführt.

**Tab. 4-7: Auflistung der in dieser Studie verwendeten EIAs unter Angabe der Werte für den Intraassay, Interassay und des jeweiligen Variationskoeffizienten (Vk)**  
**E2: Estradiol, P4: Progesteron, PD: Pregnandiol**

Test	Intraassay [ng/ml] (± STABW)	Vk %	Interassay [ng/ml] (± STABW)	Vk %
P4	5,60 ± 0,28	5,0	4,50 ± 0,60	13,7
	2,36 ± 0,12	5,1	1,70 ± 0,38	22,8
PD	2,90 ± 0,46	15,9	88,1 ± 9,50	110,8
	13,2 ± 2,30	17,4	31,1 ± 8,10	26,2
E2	0,31 ± 0,03	10,4	1,10 ± 0,19	17,0
	1,70 ± 0,11	6,3	2,50 ± 0,66	26,0

#### 4.2.3.3. Bestimmung flüchtiger Substanzen im Urin (Volatiles) während des Östrus

Es wird vermutet, dass Bären ihren Reproduktionsstatus über den Urin mittels leicht flüchtiger Substanzen (Volatiles) vermitteln können (Swaisgood *et al.* 2002). Um diese Signale zu detektieren, wurde in dieser Studie der Urin von zehn Bären aus drei Arten verschiedenen Analysemethoden unterzogen.

#### 4.2.3.3.1. Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Die Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie hat sich als Referenzverfahren zur Detektion leicht flüchtiger Urinhaltsstoffe bewährt (Jann und Wilke 2003; Lottspeich 1998; Swaisgood *et al.* 1999). In dieser Studie wurde der Urin von sieben Bären aus z.T. mehreren Brunstperioden (Tab. 4-1) diesem Verfahren unterzogen und so insgesamt 13 Profile erstellt.

Die Duftstoffe wurden mittels Solid Phase Mikro Extraktion (SPME) aus dem Urin extrahiert. Das Prinzip der SPME beruht auf der Extraktion organischer Bestandteile aus dem Luftraum über einer flüssigen oder festen Probe mittels einer Kapillare, die mit einem Adsorbans überzogen ist. Die extrahierten Bestandteile wurden nach Einführen der SPME Kapillare in den erhitzten Injektor des Gaschromatographen (GC) desorbiert und getrennt und im Massenspektrometer (MS) im Total Ionen Modus (TIM) detektiert (Abb. 4-9).



Abb. 4-9: Anordnung der SPME mit Probenanreicherung und GCMS

##### 4.2.3.3.1.1. Aufbereitung der Proben

Da die Löslichkeit der Volatiles pH-Wert abhängig ist, erfolgte die Bestimmung unter zwei verschiedenen pH-Regimen, wie sie auch im Urin von Bären vorkommen können: bei pH 7,0 unter Verwendung von 2 M TRIS-Puffer (neutraler Ansatz) und bei pH 4,8 mit 0,5 M Azetatpuffer (saurer Ansatz). In einem Szintillationsgefäß wurden zu 0,5 ml Puffer 2 ml Urin zusammen mit 2,5 ml *Aqua bidest*, 1,839 g Kochsalz und 10 µl einer internen Standardlösung (10 µg/ml Undekansäure + 10 µg/ml cis 7-Dodecenyacetat) gegeben. Das Gefäß wurde luftdicht mit einer Gummikappe verschlossen und direkt in der Analyse eingesetzt.

##### 4.2.3.3.1.2. Durchführung

Die SPME wurde mittels eines automatischen Probenanreicherungssystems durchgeführt. Durch die Gummikappe des Szintillationsgefäßes wurde die Kapillare in das Gefäß eingeführt und dieses für 60 Minuten auf 70°C erhitzt. In dieser Zeit stellte sich ein Konzentrationsgleichgewicht der sich im Urin befindlichen flüchtigen Stoffe mit dem Luftraum und der Kapillaroberfläche ein. Die Kapillare wurde daraufhin in den Injektor des

Gaschromatographen injiziert und die an der Oberfläche adsorbierten Stoffe in die Trägergasphase (ultrareines Helium) abgegeben (Injektortemperatur: 300°C, Säulenkopfdruck: 41,2 kPa). Während eines definierten Temperaturprogramms (45°C für 2 Minuten, bis 105°C bei 15°C/min, 105 – 165°C bei 10°C/min und 165 – 290°C bei 4°C/min) wurden die Desorbenten in der GC-Säule aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften voneinander getrennt. Das anschließende Massenspektrometer detektierte im ungesplitteten Injektionsmodus die Substanzen (Interface-Temperatur: 300 °C, Ionisationsspannung 1,2 kV, Auslassventileinschaltung 15 Minuten nach Injektion mit einem Auslassstrom von 8 ml/min).

Die Durchführung einer Analyse beanspruchte durchschnittlich etwa zwei Stunden.

Die Massenspektren wurden mit dem Programm GCMS-Solutions (Shimadzu, Duisburg) ausgewertet und mit authentischen Standards verglichen. Anhand der Retentionszeit, der Fragmentierung in Molekülionen (Haupt- und Neben-m/z) und der relativen Intensität der Ionen konnte den einzelnen Peaks des Chromatogramms zu einem hohen Prozentsatz eine Substanz zugeordnet werden. Die Menge der jeweiligen Substanz wurde anhand der Fläche unter dem Peak ermittelt und daraus die saisonalen Profile erstellt.

#### **4.2.3.3.2. Nicht-veresterte freie Fettsäuren im Urin**

Mit dem GCMS-Verfahren wurden freie, unveresterte gesättigte Fettsäuren detektiert, die mit dem Östrogenanstieg in Verbindung gebracht werden konnten. Um diese Substanzen schneller und zudem außerhalb eines Speziallabors aufzeigen zu können, wurden verschiedene Nachweismethoden getestet. Ziel war es, eine Methode zu finden, die in zoologischen Gärten oder in Feldversuchen angewendet werden kann.

##### **4.2.3.3.2.1. pH-Wert Bestimmung**

Da es sich bei Fettsäuren um schwache Säuren handelt, die den pH-Wert beeinflussen, wurde überprüft, ob das Profil des pH-Wertes des Urins mit dem GCMS-Profil übereinstimmte. Hierfür wurde der pH-Wert des unbehandelten Urins bei Zimmertemperatur mit einem pH-Meter gemessen.

##### **4.2.3.3.2.2. Photometrische Bestimmung von Kupferseifen**

In der Literatur werden verschiedene Methoden zur photometrischen Messung freier Fettsäuren im Serum nach deren Umwandlung in Kupferseifen angegeben (Mulder *et al.* 1983; Noma *et al.* 1973). Nach einer Beschreibung von Bergmann *et al.* (1980) wurde das Verfahren im Rahmen dieser Studie am Urin eines Bären getestet. Durch das leichtflüchtige Lösungsmittel Butylether kam es zu einer unkontrollierten Aufkonzentration und teilweise vollständigen Eintrocknung der Extrakte, wodurch eine photometrische Konzentrationsbestimmung unmöglich wurde.

Das in dieser Studie verwendete Verfahren wurde als nicht praktikabel klassifiziert und eingestellt.

#### 4.2.3.3.2.3. Colorimetrischer Enzymassay

Verfahren zur enzymatischen Messung freier Fettsäuren im Serum mittels colorimetrischer Enzymassays (CEA) werden seit langem angewendet (McGowan *et al.* 1983).

In dieser Studie wurden mittels eines kommerziell erhältlichen, colorimetrischen Enzymassays für unveresterte Fettsäuren im Serum acht Profile aus dem Urin von vier Bären während der Paarungszeit erstellt. Zum Einsatz von Urin in den Halbmikro-Tests wurde der Test nach Absprache mit dem Hersteller (Wako, Neuss) modifiziert (Heller, persönliche Mitteilung): 40 µl Probe wurden für 30 Minuten mit 250 µl Farbreagenz A und danach 15 Minuten mit 500 µl Farbreagenz B bei 24°C inkubiert. Die Reagenten wurden manuell in die Vertiefungen von Mikrotitrationsplatten pipetiert und das Reaktionsprodukt mit einem Mikrotitrationsplattenleser bei einer Längenwelle von 540 nm (SpectraFluor) bei Zimmertemperatur gemessen. Die Ergebnisse wurden als Äquivalent der Standardlösung Oleinsäure (*cis*-9-Octadecensäure, C18) angegeben, da eine nachträgliche Differenzierung der verschiedenen Fettsäuren nicht möglich war.

Da bei der photometrischen Impedanz falsch positive Ergebnisse durch Trübungen auftraten, wurde der Test mit extrahierten Urinproben durchgeführt. Hierfür wurden 100 µl Urinproben mit 5,0 ml TBME/PE versetzt, 20 Minuten geschüttelt und dann bei -70°C eingefroren. Die flüssige Etherphase mit den darin gelösten Fettsäuren wurde abgenommen, evaporiert, erneut extrahiert und nochmals evaporiert. Das Evaporat wurde in 100 µl PBS (ein Teil PBS-Stammlösung (29,25 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O + 4,90 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 160 g NaCl) auf neun Teile H<sub>2</sub>O; eingestellt auf pH 7,4) aufgenommen. Danach wurde das Extrakt direkt in den colorimetrischen Enzymassay eingesetzt.

### 4.3. Statistik

Aufgrund der geringen Anzahl der Individuen pro Untersuchungseinheit ( $n \leq 5$ ) ist eine statistische Auswertung der Ergebnisse nicht möglich. Die hier dargestellten Ergebnisse haben das Ziel eine Tendenz aufzuzeigen.

Aus der Summe aller Messdaten wurde, wo es möglich war, das arithmetische Mittel (MW) gebildet und die Standardabweichung (STABW) berechnet. Wenn nicht anders vermerkt, wurde als Abweichung der Standardfehler (SEM) angegeben:

$$SEM = STABW/\sqrt{n}$$

Zur Bearbeitung und Darstellung dieser Daten wurde das Programm Microsoft® Excel 2000 benutzt.