HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN

MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHE FAKULTÄT I
INSTITUT FÜR BIOLOGIE

Diplomarbeit

ZUM ERWERB DES AKADEMISCHEN GRADES
DIPLOM-BIOLOGIN

Nicht-invasives Reproduktionsmonitoring bei weiblichen Sand- und Schwarzfußkatzen (*Felis margarita*, *Felis nigripes*) durch die Analyse fäkaler Östrogen- und Gestagenmetaboliten

vorgelegt von
Anne Hanschke
geb. am 27.12.1984 in Dresden

angefertigt in der Arbeitsgruppe Reproduktionsbiologie
am Institut für Zoo- und Wildtierforschung Berlin

Berlin, im Dezember 2009

„Was Laien an Zoologen in hohem Maße eigenartig finden, ist ihre unersättliche Begeisterung für Tierexkremente. Ich verstehe ja, daß man aus diesen Exkrementen eine Menge Informationen über die Gewohnheiten und die Ernährungsweise der betreffenden Tiere herauslesen kann, aber nichts erklärt in meinen Augen die ungetrübte Verzückung, die diese Objekte auszulösen vermögen."

Douglas Adams & Mark Carwardine

„DIE LETZTEN IHRER ART"
Eine Reise zu den aussterbenden Tieren unserer Erde (2004)
Rogner & Bernhard GmbH & Co. Verlags KG, Hamburg, S. 95

Inhaltsverzeichnis

Seite

1 Einleitung 1

2 Literaturübersicht 2

2.1 Überblick über die Katzenfamilie 2

2.1.1 Die Sandkatze (*Felis margarita*) 5

2.1.2 Die Schwarzfußkatze (*Felis nigripes*) 6

2.2 Zoopopulationen und Zuchtprogramme 7

2.3 Gonadale Steroidhormone 9

2.4 Reproduktionsbiologie der Kleinkatzen 10

2.4.1 Saisonalität 11

2.4.2 Induzierte und spontane Ovulation 11

2.4.3 Trächtigkeit und Scheinträchtigkeit 12

2.5 Hormonmonitoring 13

3 Zielsetzung 16

4 Untersuchte Tiere, Material und Methoden 17

4.1 Untersuchte Tiere 17

4.2 Material und Methoden 18

4.2.1 Probengewinnung 19

4.2.2 Probenextraktion und weitere Aufbereitung 19

4.2.2.1 Ätherextraktion 20

4.2.2.2 Enzymatische Hydrolyse 20

4.2.2.3 Festphasenextraktion in RP-C18-Kartuschen 21

4.2.3 Quantitative Bestimmung der Hormone 21

4.2.3.1 Beschichtung der Platten 24

4.2.3.2 Durchführung des Enzymimmunoassays 24

4.2.3.3 Kreuzreaktionen 25

4.2.3.4 Validierung der Enzymimmunoassays 27

4.3 Statistik 29

5 Ergebnisse 32

5.1 Beurteilung der Methoden zur Extraktaufbereitung 32

5.2 Beurteilung der verschiedenen Enzymimmunoassays 35

5.2.1 Gestagentests zum Monitoring der Lutealfunktion 35

5.2.2 Östrogen- und Androgentests zum Monitoring der Follikelfunktion 37

5.3 Reproduktionsmonitoring bei Sandkatzen 38

5.3.1 Gestagene 38

5.3.2 Östrogene 48

5.4 Reproduktionsmonitoring bei Schwarzfußkatzen 54

6 Diskussion 57

6.1 Validierung der Enzymimmunoassays 57

6.2 Follikelfunktion und Östrus 59

6.3 Besonderheiten im Zusammenhang mit Östrogenen 63

6.4 Lutealfunktion 65

6.5 Ursprung der Steroidhormone und ihre Abhängigkeit von der Anzahl der Jungtiere 68

6.6 Die Schwarzfußkatze und das Problem der nicht-identifizierbaren Kotproben 69

6.7 Anwendung der Ergebnisse und Ausblick 71

7 Zusammenfassung 72

Literaturverzeichnis 74

Danksagung 79

Anhang 1: Verwendete Materialien 80

Abkürzungsverzeichnis

5α-P	5α-Pregnan-3β-ol-20-on
5a-P-EIA	Gestagenenzymimmunoassay für 20-Oxo-Pregnane
ART	Assistierte Reproduktionstechnologien
BSA / RSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovines serum albumin)
C	Kohlenstoff-Atom
CITES	Washingtoner Artenschutzübereinkommen (engl.: Convention on the International Trade in Endangered Species)
E2	Estradiol, 1,3,5 (10)-Estratrien-3,17β-diol
E2-EIA	Gesamtöstrogen-Enzymimmunoassay
EEP	European Endangered Species Programm
EIA	Enzymimmunoassay
Epi-A	Epi-Androsteron, 5α-Androstan-3β-ol-17-on
GnRH	Gonadoliberin (engl.: Gonadotropin Releasing Hormone)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: high performance liquid chromatography)
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: Horseradishperoxidase)
IgG	Immunglobulin G
IUCN	International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources
IZW	Institut für Zoo- und Wildtierforschung
Konz.	Konzentration
LH	Luteinisierendes Hormon
MW	arithmetisches Mittel
p	p-Wert bei statistischen Tests
P4	Progesteron, 4-Pregnen-3,20-dion
PD	Pregnandiol, 5β-Pregnan-3α,20α-diol
SEM	Standardfehler (engl.: Standard Error of the Mean) SEM = SD / Wurzel (Anzahl der Untersuchungen)
SD	Standardabweichung (engl.: Standard Deviation)
v / v	Volumenverhältnis

1 Einleitung

Die Katzenfamilie ist eine der meist bedrohten Säugetiergruppen, der von der International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) für 29 ihrer 37 Arten ein abnehmender Populationstrend bescheinigt wird. Hauptgrund dafür ist vor allem die voranschreitende Ausbreitung des Menschen und die damit verbundene Einschränkung der Lebensräume und Nahrungsgrundlage der Tiere. Bisherige Arterhaltungsprogramme zielten zumeist auf Großkatzenarten ab, während der Schutz von Kleinkatzen erst in neuerer Zeit an Bedeutung gewann. Zoologische Institutionen etablierten speziell hierfür kooperative Zuchtprogramme. Der Zuchterfolg ist jedoch unbeständig.

Diese Studie hat sich daher das Ziel gesetzt die Reproduktion zweier Kleinkatzenarten, der Sandkatze (*Felis margarita*) und der Schwarzfußkatze (*Felis nigripes*), genauer zu erforschen und Lösungsansätze sowie neue Erkenntnisse über die Reproduktion dieser Kleinkatzenarten bereitzustellen. Für diesen Zweck wurde ein Verfahren zum nicht-invasiven Reproduktionsmonitoring gewählt, das auf der Analyse von Östrogen- und Gestagenmetaboliten im Kot von Weibchen basiert. Einmal etabliert, könnten durch die nicht-invasive Analyse der Reproduktionshormone grundlegende Informationen zur Fortpflanzung dieser bedrohten Arten erzielt werden, die zur Steigerung des Reproduktionserfolges beitragen könnten.

Mittlerweile befindet sich ein Artikel im Druck, der ebenfalls die Endokrinologie der Weibchen dieser beiden Arten untersucht (Herrick et al. 2010).

2 Literaturübersicht

2.1 Überblick über die Katzenfamilie

Die Katzenfamilie setzt sich aus 37 Arten zusammen, die sich, in der Größe stark variabel, in ihrem Erscheinungsbild und ihren Verhaltensweisen sehr ähneln. Die Verbreitung ihrer Vertreter reicht von Wüsten, über Wälder zu Gebirgen, von der kaltgemäßigten Klimazone hin zu den Tropen. Ausgenommen sind nur Australien und die Polarregionen (Wilson & Mittermeier 2009). Trotz dieses ausgedehnten Vorkommens sind viele Arten in unterschiedlichem Maße vom Aussterben bedroht. Die International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) stuft auf ihrer Roten Liste von 2009 eine Art als vom Aussterben bedroht, sechs als stark gefährdet, zehn als gefährdet, sowie weitere neun Arten als gering gefährdet ein. Lediglich elf Arten werden als nicht gefährdet angesehen.

Die Familie der Katzen (Felidae) gehört zur Überfamilie der Katzenartigen (Feloidea) innerhalb der Ordnung der Raubtiere (Carnivora). Traditionell wird sie in zwei Unterfamilien eingeteilt, die der Großkatzen (Pantherinae) und die der Kleinkatzen (Felinae). In früheren Taxonomien wurde meist noch eine dritte Unterfamilie unterschieden, Acinonychinae, mit dem Geparden als einziger Art, die heute mit in die Felinae eingegliedert ist. Die innere Systematik der Katzen wird jedoch seit langem von Taxonomen heftig diskutiert, wobei vor allem die Anzahl der Gattungen umstritten ist, während die Anzahl der Arten mit 36 bis 41 relativ konstant bleibt. Die Schwierigkeiten ergeben sich aus der – abgesehen von der Größe – wenig variablen Morphologie, die mit der ähnlichen Lebens- und Jagdweise einhergeht (Wilson & Mittermeier 2009). Um dieses Problem zu lösen, gewann die Molekulargenetik in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. Allerdings sind die Unterschiede bezüglich ihrer DNA oft gering und schwer zu erfassen, da die Katzenfamilie sich im evolutionären Maßstab erst kürzlich entwickelte (vor weniger als elf Millionen Jahren) und sich viele Arten innerhalb kurzer Zeit voneinander abspalteten (Sunquist & Sunquist 2002). Die aktuellste Studie zur Phylogenie der Katzen ist die von Johnson et al. 2006. Die folgende Übersicht über die Katzenfamilie folgt dieser phylogenetischen Einteilung, enthält allerdings – weitestgehend der klassischen Taxonomie von Wilson & Reeder 2005 entsprechend – mehr Gattungen. Für weitere Informationen siehe Wilson & Mittermeier 2009.

Übersicht 1: Taxonomie der Katzenfamilie in phylogenetischer Reihenfolge (nach Wilson & Mittermeier 2009)

Unterfamilie Felinae
- Gattung *Felis*
  - *Felis silvestris* (Wildcat, Wildkatze) [LC]
  - *Felis bieti* (Chinese Mountain Cat, Graukatze) [VU]
  - *Felis margarita* (Sand Cat, Sandkatze) [NT]
  - *Felis nigripes* (Black-footed Cat, Schwarzfußkatze) [VU]
  - *Felis chaus* (Jungle Cat, Rohrkatze) [LC]
- Gattung *Otocolobus*
  - *Otocolobus manul* (Pallas's Cat, Manul) [NT]
- Gattung *Prionailurus*
  - *Prionailurus rubiginosus* (Rusty-Spotted Cat, Rostkatze) [VU]
  - *Prionailurus bengalensis* (Leopard Cat, Bengalkatze) [LC]
  - *Prionailurus viverrinus* (Fishing Cat, Fischkatze) [EN]
  - *Prionailurus planiceps* (Flat-headed Cat, Flachkopfkatze) [EN]
- Gattung *Puma*
  - *Puma concolor* (Cougar/Puma, Puma) [LC]
  - *Puma yagouaroundi* (Jaguarundi, Jaguarundi) [LC]
- Gattung *Acinonyx*
  - *Acinonyx jubatus* (Cheetah, Gepard) [VU]
- Gattung *Lynx*
  - *Lynx pardinus* (Iberian Lynx, Iberischer Luchs) [CR]
  - *Lynx lynx* (Eurasian Lynx, Eurasischer Luchs) [LC]
  - *Lynx canadensis* (Canadian Lynx, Kanadischer Luchs) [LC]
  - *Lynx rufus* (Bobcat, Rotluchs) [LC]
- Gattung *Leopardus*
  - *Leopardus pardalis* (Ocelot, Ozelot) [LC]
  - *Leopardus wiedii* (Margay, Langschwanzkatze) [NT]
  - *Leopardus jacobitus* (Andean Mountain Cat, Andenkatze) [EN]
  - *Leopardus colocolo* (Colocolo/Pampas Cat, Pampaskatze) [NT]
  - *Leopardus geoffroyi* (Geoffroy's Cat, Kleinfleckkatze) [NT]
  - *Leopardus guigna* (Kodkod/Guiña, Chilenische Waldkatze) [VU]
  - *Leopardus tigrinus* (Oncilla, Tigerkatze) [VU]
- Gattung *Caracal*
  - *Caracal caracal* (Caracal, Karakal) [LC]
- Gattung *Profelis*
  - *Profelis aurata* (African Golden Cat, Afrikanische Goldkatze) [NT]
- Gattung *Leptailurus*
  - *Leptailurus serval* (Serval, Serval) [LC]
- Gattung *Catopuma*
  - *Catopuma badia* (Bay Cat, Borneo Goldkatze) [EN]
  - *Catopuma temminckii* (Asian Golden Cat, Asiatische Goldkatze) [NT]
- Gattung *Pardofelis*
  - *Pardofelis marmorata* (Marbled Cat, Marmorkatze) [VU]

Unterfamilie Pantherinae
- Gattung *Panthera*
  - *Panthera leo* (Lion, Löwe) [VU]
  - *Panthera onca* (Jaguar, Jaguar) [NT]
  - *Panthera pardus* (Leopard, Leopard) [NT]
  - *Panthera tigris* (Tiger, Tiger) [EN]
  - *Panthera uncia* (Snow leopard, Schneeleopard) [EN]
- Gattung *Neofelis*
  - *Neofelis nebulosa* (Clouded Leopard, Nebelparder) [VU]
  - *Neofelis diardi* (Sunda Clouded Leopard, Sunda Nebelparder) [VU]

[Angabe der IUCN-Risikokategorien: CR-critically endangered/vom Aussterben bedroht, EN-endangered/stark gefährdet, VU-vulnerable/gefährdet, NT-near threatened/gering gefährdet, LC-least concern/nicht gefährdet]

Viele Unterarten sind sogar noch bedrohter als es für die gesamte Art in der vorhergehenden Übersicht angegeben ist. Allerdings ist häufig ihre eigenständige Existenz umstritten. In diesem Zusammenhang wird aktuell diskutiert, das phylogenetische Artkonzept neben beispielsweise Vögeln und Primaten auch auf die Feliden anzuwenden. Dieses definiert Arten als die kleinsten bestimmbaren, monophyletischen Gruppen, die durch mindestens eine Apomorphie erkennbar sind. Auf diese Weise würden viele Unterarten zur Art aufsteigen, was tiefgreifende Auswirkungen auf die Arterhaltung der Katzen haben könnte (Wilson & Mittermeier 2009).

Die Katzenfamilie ist eine der meist bedrohten Säugetiergruppen. Die IUCN stuft sieben Arten in die zwei höchsten Risikokategorien ein und gibt für 29 der Arten einen abnehmenden Populationstrend an. Der vermutlich wichtigste Grund für diesen Rückgang ist die voranschreitende Ausbreitung des Menschen mit der damit einhergehenden Einschränkung der Lebensräume und der Nahrungsgrundlage. Aus der resultierenden Nähe zwischen Zivilisation und Wildtieren ergibt sich ein weiteres Problem, nämlich die Verfolgung besonders von Großkatzen als Gefahr für Mensch und Vieh. Weiterhin ist der Populationsrückgang einiger Katzenarten dem massiven Pelzhandel der 1960er und 1970er Jahre geschuldet, sowie der bis heute noch andauernden Sportjagd und dem Trophäenhandel. Abgesehen davon sind einige Arten bereits natürlicherweise selten, da sie nur in wenigen, speziellen Lebensräumen mit geringen Ausdehnungen vorkommen (Wilson & Mittermeier 2009).

Bisherige Arterhaltungsprogramme zielten zumeist auf die Großkatzen ab. Die größten Bemühungen der letzten Jahre galten dem Tiger und dem Schneeleoparden, für die Reservate eingerichtet und Jagd- sowie Handelsverbote ausgesprochen wurden (Wilson & Mittermeier 2009). Der Schutz von Kleinkatzen gewann erst in neuerer Zeit an Bedeutung. Daher ist diese Studie auf die Erforschung der Reproduktion zweier Kleinkatzenarten ausgelegt, der Sandkatze (circa 1,5 kg bis 3,5 kg) und der Schwarzfußkatze (circa 1 bis 2,5 kg).

2.1.1 Die Sandkatze (*Felis margarita*)

Die Sandkatze (*Felis margarita*, Loche 1858) ist die einzige Katzenart, die in Nordafrika und Südwest- und Zentralasien hauptsächlich in richtigen Wüsten anzutreffen ist. Es handelt sich hier wie bei den meisten Feliden um eine einzelgängerische Art, bei der sich Männchen und Weibchen nur zur Paarungszeit zusammenfinden (zur Reproduktionsbiologie siehe Kapitel 2.4). Die Größe der einzelnen Reviere hängt von der Ressourcenverfügbarkeit und dem Vorkommen möglicher Nahrungskonkurrenten wie Rotfuchs und Wildkatze ab.

Abbildung 1: Vorkommen der Sandkatze (*Felis margarita*), basierend auf der Roten Liste der IUCN

Wegen der deswegen häufig geringen Populationsdichte und aufgrund ihrer isolierten Verbreitungsgebiete (vgl. Abbildung 1) wird die Sandkatze mit weniger als 50.000 geschätzten adulten Tieren auf der Roten Liste der IUCN von 2009 als gering gefährdet eingestuft und im Appendix II der Convention on International Trade in Endangered Species (CITES) gelistet. Dem regionalen Vorkommen folgend sind vier Unterarten anerkannt: *F. m. margarita* (Sahara), *F. m. harrisoni* (Ägypten, Israel, Arabische Halbinsel), *F. m. thinobia* (Wüsten östlich des Kaspischen Meers) und *F. m. scheffeli* (Pakistan), wobei letztere von der IUCN sogar als gefährdet geführt wird. Dies resultiert aus dem massiven Export in europäische und nordamerikanische Zoos Mitte der 1960er Jahre, welcher 1972 dazu führte, dass diese Population kurz vor dem Aussterben stand. Heutzutage ist der Export von *F. m. scheffeli* aus Pakistan verboten.

Die Nähe zum Menschen birgt für die Sandkatze neben den schon erwähnten Gefahren durch den Siedlungsbau und landwirtschaftliche Nutzung weiter

Bedrohungen. Verwilderte Haushunde und -katzen sind nämlich nicht nur direkte Nahrungskonkurrenten, sondern übertragen auch tödliche Krankheiten. Weitere Gefährdungen stellen Fallen dar, die für Füchse und Schakale ausgelegt sind, sowie der kommerzielle Handel mit den Tieren. (Wilson & Mittermeier 2009; Sunquist & Sunquist 2002; IUCN 2009; Sausman 1997)

2.1.2 Die Schwarzfußkatze (*Felis nigripes*)

Die Schwarzfußkatze (*Felis nigripes*, Burchell, 1824), als die kleinste wildlebende Katzenart Afrikas, ist nur in den Trockengebieten im Süden des Kontinents, hauptsächlich in Namibia, Südafrika und Botswana, verbreitet (Abbildung 2). Sie bevorzugt offene, baum- und straucharme Savannen und hat sich auf die Jagd in diesen spärlich bewachsenen Gebieten spezialisiert. Die dämmerungs- und nachtaktiven Tiere, die auf ihren nächtlichen Beutezügen 10 bis 30 km zurücklegen, ziehen sich tagsüber meist in verlassene Erdbauten von Springhasen oder hohle, verwitterte Termitenhügel zurück. Die Schwarzfußkatzen leben einzelgängerisch in abgegrenzten Revieren, deren Größe häufig die Abundanz des Nahrungsangebotes widerspiegelt. Nur in der Paarungszeit finden sich die Männchen und Weibchen zur Fortpflanzung zusammen (zur Reproduktionsbiologie siehe Kapitel 2.4).

Abbildung 2: Vorkommen der Schwarzfußkatze (*Felis nigripes*)

Die Schwarzfußkatze ist im Vergleich zu anderen Kleinkatzen des südlichen Afrikas selten. Wegen ihres kleinen Verbreitungsgebietes und ihrer geringen Siedlungsdichte wird sie auf der Roten Liste der IUCN als gefährdet aufgeführt und im Appendix I der Convention on International Trade in Endangered Species (CITES) gelistet. Ihre Population wird auf weniger als 10.000 adulte Tiere geschätzt. Für die

Schwarzfußkatze sind zwei Unterarten beschrieben, von denen die kleinere und hellere *F. n. nigripes* hauptsächlich im trockeneren, nördlichen und westlichen Teil des Verbreitungsgebietes vorkommt, während die etwas größere, mit kräftigen schwarzen Streifen und Punkten gekennzeichnete *F. n. thomasi* im Süden Südafrikas beheimatet ist.

Der Mensch ist für die Schwarzfußkatze keine direkte Gefahr, denn aufgrund ihres seltenen Vorkommens und ihres aggressiven Verteidigungsverhaltens ist sie weder als Pelzlieferant noch als Haustier ein lohnendes Ziel. Dennoch ist auch bei ihnen der Populationsrückgang auf die Ausbreitung des Menschen zurückzuführen. Unglücklicherweise fallen ebenfalls immer wieder Tiere dieser Art den Maßnahmen zur Eindämmung von Schakale, durch beispielsweise Jagdhunde oder ausgelegte Giftköder, zum Opfer. Im Gegensatz zu ihren in Gefangenschaft lebenden Artgenossen, die bis zu 16 Jahre alt werden, haben die wildlebenden Tiere eine Lebenserwartung von 4 bis 6 Jahren. Diese kurze Lebensdauer und ihre nur langsame Vermehrung erschwert mutmaßlich die Erholung einmal geschädigter Bestände enorm. (Wilson & Mittermeier 2009; IUCN 2009; Sliwa 2007)

2.2 Zoopopulationen und Zuchtprogramme

Einen entscheidenden Beitrag zur Arterhaltung der Kleinkatzen leisten zoologische Institutionen, die Sand- und Schwarzfußkatzen halten und kooperative Zuchtprogramme etabliert haben. Die wichtigsten in Europa stellen die EEPs (European Endangered Species Programms) dar, welche die Zucht genetisch wertvoller Tiere innerhalb europäischer, russischer und arabischer Zoos koordinieren. Um Inzucht zu vermeiden, soll auf diese Weise ein möglichst hoher Grad genetischer Variabilität erhalten werden. Die diesen Zuchtempfehlungen zugrunde liegenden Daten liefert das jeweilige internationale Zuchtbuch, das den Verwandtschaftsgrad innerhalb der Population verfolgt. Dieses wird für die Sandkatze in Palm Desert (USA) und für die Schwarzfußkatze in Wuppertal geführt.

In Europa halten lediglich drei Zoos Schwarzfußkatzen, die Zoos Wuppertal und Belfast, sowie das „Rare Species Conservation Centre“ in Kent. Die momentane Gesamtpopulation beläuft sich auf 7 Männchen und 6 Weibchen (Stadler,

persönliche Mitteilung), was eine für den Erhalt der genetischen Variabilität viel zu geringe Populationsgröße darstellt.

Doch selbst mit den 36 Männchen und 50 Weibchen aus 21 Institutionen (Stand: 31.12.2008), die sich am EEP der Sandkatze beteiligen, kann das erklärte Ziel, über die nächsten 100 Jahre 90 % der genetischen Variabilität zu erhalten, nicht erreicht werden. Dies begründet sich durch die nahe Verwandtschaft aller Tiere, wie sie in den meisten kleinen Populationen auftritt, sowie dem niedrigen Zuchterfolg (Magiera 2009). Dieser mangelnde Erfolg ist weniger auf eine zu niedrige Anzahl an Trächtigkeiten, als vielmehr auf die hohe Jungtiersterblichkeit zurückzuführen. Die Auswertung aller registrierten Geburten seit 1971 ergab, dass 44,8 % (186 von insgesamt 415 Jungtieren) nicht das reproduktionsfähige Alter (hier mit einem Jahr definiert) erreichen, wobei 63,4 % davon (118 von 186) noch innerhalb des ersten Monats sterben. Genauer gesagt, überleben 24,2 % (45 von 186) der Jungen den ersten Tag nicht und weitere 25,8 % (48 von 186) sterben bis zum 10. Lebenstag. Diese Zahlen stehen im Zusammenhang mit einer enorm hohen Infantizidrate innerhalb der ersten Tage und der Ablehnung der Jungtiere besonders durch erstgebärende Katzen (Sausman 1997). Da Trächtigkeitsanzeichen nicht immer bemerkbar sind, wäre es mit Hilfe einer adäquaten Methode zur Trächtigkeitsdiagnose möglich, die besonders stressempfindlichen Kleinkatzen frühzeitig in eine ruhigere Umgebung zu bringen, Wurfboxen einzurichten und entsprechende Maßnahmen zur Stressvermeidung zu ergreifen. So wird empfohlen, spätestens 14 Tage vor der erwarteten Geburt keine Änderungen in Arbeitsablauf, Gehege und Umgebung vorzunehmen und eine Betreuung durch vertraute Pfleger zu gewährleisten (Puschmann 2007).

Das andere Problem der geringen genetischen Variabilität beruht auf der begrenzten Anzahl an Gründern, aus denen die meisten Zoopopulationen hervorgegangen sind (Swanson 2006). Beispielsweise geht die gesamte europäische Sandkatzenpopulation auf nur 14 Tiere zurück. Mit dem Wissen, dass sich einige genetisch wertvolle Individuen gar nicht fortpflanzen, wird verständlich, dass es assistierter Reproduktion bedarf, damit deren Gene nicht aus dem Genpool verschwinden. Eine Grundvoraussetzung für assistierte Reproduktionstechnologien (ART) wie künstlicher Besamung, In-vitro-Fertilisation und Embryonentransfer ist ein umfassendes Verständnis der Reproduktionsbiologie einer Art, insbesondere der

hormonellen Regulation von Reproduktionszyklus und Trächtigkeit. Diese Informationen lassen sich besonders günstig durch das in dieser Studie angewandte Monitoring fäkaler Östrogen- bzw. Gestagenmetaboliten gewinnen, wie es bereits für verschiedenste Spezies beschrieben wurde.

2.3 Gonadale Steroidhormone

Anhand der im Ovar gebildeten Steroidhormone lassen sich vielfältige Aspekte der Fortpflanzung einschätzen. Östrogene, die in den Theka- und Granulosazellen der Follikel gebildet werden, sind insbesondere für den Ablauf des Sexualzyklus zuständig, indem sie durch Rückkopplungseffekte die Gonadotropin-Ausschüttung regulieren. In dieser Funktion werden sie durch die Gestagene unterstützt, die vom Gelbkörper (Corpus luteum) synthetisiert werden. Sie bereiten ebenfalls die Uterusschleimhaut auf die Einnistung eines befruchteten Eis vor und erhalten eine Trächtigkeit aufrecht.

Durch ihre Abstammung von Cholesterin weisen alle Steroidhormone strukturelle Ähnlichkeiten auf, konkret drei miteinander kondensierte, sechsgliedrige Kohlenstoffatom-Ringe mit einem weiteren fünfgliedrigen, wobei sie sich aber in der Lokalisation der Doppelbindungen und den funktionellen Gruppen unterscheiden. Aufgrund der α-Orientierung des Wasserstoffs am Kohlenstoffatom fünf (C5) und der resultierenden Trans-Verknüpfung der Ringe sind die aktiven Steroide nahezu planar (Müller-Esterl 2009).

Ausgehend vom Cholesterin (27 C-Atome) erfolgt die Synthese aller Steroide über die Gestagene Pregnenolon und Progesteron (21 C-Atome). Als Ausgangsstufe für alle weiteren Hormone wird letzteres über die Zwischenstufe der Androgene Androstendion und Testosteron (19 C-Atome) durch Abspaltung der angulären C19-Methylgruppe und Aromatisierung des A-Rings zu den Östrogenen Östron bzw. Östradiol umgebaut (18 C-Atome).

Für eine exakte hormonelle Regulation ist die schnelle Inaktivierung und Ausscheidung der Steroide unerlässlich. So werden sie in verschiedenen Organen, hauptsächlich aber der Leber, metabolisiert, an Glucuron- oder Schwefelsäure gekoppelt und über die Nieren oder Galle und Darm mit dem Urin bzw. Kot ausgeschieden. Die Inaktivierung und folgende Konjugation mit diesen stark polaren

Substanzen, die zu einer erhöhten Löslichkeit führt, wird durch Hydroxylierungen unter dem Einfluss von Cytochrom-P450-Monooxygenasen ermöglicht.

Verschiedene Studien zum Abbau radioaktiv markierter Steroide bei unterschiedlichen Spezies lieferten einen Einblick in den Metabolismus und die Exkretion der Hormonmetaboliten über Kot und Urin. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse stellen die Grundlage für die Entwicklung nicht-invasiver Steroidassays dar. Für die Hauskatze wurde gezeigt, dass sowohl markiertes Östradiol als auch markiertes Progesteron fast ausschließlich über den Kot ausgeschieden wurde, mit 97 % der detektierten Radioaktivität im Kot und nur 3 % im Urin (Brown et al. 1994). Der Großteil (> 90 %) der Hormone wurde dabei mit der ersten Kotprobe ausgeschieden, die 11-50 Stunden nach der Injektion abgesetzt wurde. In der gleichen Studie wurde durch HPLC-Analysen (Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie) die Östradiol-Ausscheidung zu annähernd gleichen Teilen als unkonjugiertes Östradiol und Östron und als nicht-enzymhydrolysierbare Konjugate beschrieben. Progesteron wurde hingegen überwiegend (78 %) als polare, mutmaßlich nicht-enzymhydrolysierbare konjugierte, Metaboliten ausgeschieden. Darüberhinaus wurden unkonjugierte Pregnenolon-Epimere identifiziert. Natives Progesteron wurde dabei nicht nachgewiesen.

Diese Verhältnisse gelten jedoch nur für die Hauskatze und können in anderen Arten durch einen veränderten Steroidmetabolismus abweichen. Aus diesem Grund ist vor der Anwendung nicht-invasiver Methoden zum Hormonmonitoring einer bisher nicht untersuchten Art eine gründliche Validierung nötig (Schwarzenberger 2007).

2.4 Reproduktionsbiologie der Kleinkatzen

Die Validierung von Methoden zum Reproduktionsmonitoring für jede einzelne Art und ihre gesonderte Untersuchung begründen sich durch die mannigfaltigen Unterschiede bezüglich der Fortpflanzung zwischen verschiedenen Arten, selbst wenn einige Gesichtspunkte davon, wie der Ablauf der Paarungen, innerhalb der Feliden-Familie einheitlich sind. Diese Unterschiede betreffen vor allem die Saisonalität und die Art der Ovulation.

2.4.1 Saisonalität

Langzeitstudien in Gefangenschaft mit Hilfe des fäkalen Reproduktionsmonitorings lieferten Hinweise auf eine große Spanne in Bezug auf saisonale Ovaraktivität, die von fehlender Saisonalität (z. B. Oncilla, Ozelot, Margay, Fischkatze, Leopard, Löwe) über eine mäßige saisonale Abhängigkeit (z. B. Tiger und Nebelparder) hin zu einer ausgeprägten Beschränkung auf bestimmte Monate (Manul) reicht (L. H. Graham 2001; Brown et al. 2002). Während die Sand- und Schwarzfußkatze in der Wildbahn saisonal ist, mit Geburten im Frühjahr und Sommer (Wilson & Mittermeier 2009), entwickelt sie in Gefangenschaft keine solche Saisonalität (Puschmann 2007). Beide Arten bringen in jedem Monat des Jahres Nachwuchs hervor, die Frühlings- und Sommermonate bleiben jedoch die bevorzugte Geburtensaison (Mellen 1993; Mellen 1998).

2.4.2 Induzierte und spontane Ovulation

Die wie fast alle Katzen einzelgängerischen Sand- und Schwarzfußkatzen finden sich nur zur Paarungszeit zusammen, während der sie sich mehrmals täglich verpaaren. Diese neuronale Stimulation durch die Kopulation löst im Hypothalamus die Freisetzung des Gonadoliberins (GnRH; engl.: gonadotropin releasing hormon) aus, welche wiederum zur Sekretion des Luteinisierenden Hormons (LH) vom Hypophysenvorderlappen führt, das die Ovulation induziert (Brown 2006). Diese sogenannte induzierte Ovulation ist keine Eigenheit der Feliden, sie tritt unter anderem auch bei Wühlmäusen, Kaninchen, Frettchen sowie Lamas, Alpakas und Kamelen auf (Bakker & Baum 2000). Im Gegensatz zu diesen hängt bei der Katze allerdings die Dauer und Höhe der LH-Ausschüttung von der Anzahl der Kopulationen ab (Concannon et al. 1980), weswegen eine kumulative Erhöhung des LH-Niveaus durch wiederholte GnRH-ausschüttende Episoden vermutet wird (Bakker & Baum 2000). Im Normalfall benötigt es daher mehrfacher Verpaarung um eine ausreichende LH-Sekretion zu stimulieren, welche die abschließende Follikelreifung und Ovulation nach sich zieht, die 24-36 Stunden post-coitum erfolgt (Shille et al. 1983). Bisher ist noch unklar, auf welchem Wege die somatosensorischen Stimuli die GnRH-Neurone aktivieren. In den letzten Jahren wurden jedoch, neben dieser klassisch für die Katzen beschriebenen induzierten Ovulation, ebenfalls spontane Ovulationen in Hauskatzen und verschiedenen Wildkatzen wie Löwe, Nebelparder,

Manul, Fischkatze und Margay nachgewiesen (Brown 2006). Auf die Ovulation folgt die Umwandlung in den Gelbkörper, der Progesteron sekretiert, dessen Konzentrationserhöhung während der Lutealphase mittels nicht-invasivem Hormonmonitoring bestimmt werden kann. Erfolgt keine Ovulation, unabhängig davon ob spontan oder durch Verpaarungen induziert, bilden sich die Follikel ohne Umwandlung in einen Gelbkörper und Progesteronfreisetzung zurück. In diesem Fall stellt sich nach einer artabhängigen Zyklusperiode zwischen zwei und vier Wochen ein erneuter Östrogenanstieg ein, der die Follikelreifung anzeigt.

2.4.3 Trächtigkeit und Scheinträchtigkeit

Wie bereits erwähnt sezernieren die nach der Ovulation gebildeten Gelbkörper (Corpora lutea) ab einem Zeitpunkt kurz nach dem Follikelsprung (bei der Hauskatze nach 1-2 Tagen) Progesteron (Tsutsui & Stabenfeldt 1993). Sowohl für die Hauskatze als auch für Wildkatzen bleibt dieses im Falle einer Befruchtung und Einnistung über die gesamte Länge der Trächtigkeit (Gravidität) erhöht und fällt erst zur Geburt wieder ab. Im Gegensatz dazu kehren die Gestagenkonzentrationen in den meisten bisher untersuchten Katzenarten bei einer Scheinträchtigkeit (Pseudogravidität) bereits nach einem Drittel oder der Hälfte der Zeit zum Grundniveau zurück (Brown 2006). Eine Ausnahme stellen die Luchse dar, bei denen die Gestagene ebenso lang erhöht sind wie während einer Trächtigkeit (Dehnhard et al. 2008).

Unterschiede treten ebenfalls bezüglich der Östradiol-Sekretion in der zweiten Trächtigkeitshälfte auf, die für Hauskatze, Fischkatze, Manul und Gepard beschrieben wurden, bei Nebelparder und Tiger jedoch fehlen (Brown 2006). Dieses Östradiol ist vermutlich plazentalen und nicht lutealen Ursprungs, wie das Progesteron.

Daten zur Reproduktion von Sand- und Schwarzfußkatze waren bisher lediglich auf Beobachtungen von Verpaarungen (Mellen 1993) und Zuchtbuchdaten gestützt. So wirft die Sandkatze nach einer Tragzeit von 59-69 Tagen meist zwei bis vier Jungtiere. Ein Wurf mit acht Jungen wurde ebenfalls schon verzeichnet. Die Säugezeit beläuft sich auf 9-11 Wochen. Die Daten der Schwarzfußkatze sind

vergleichbar, mit einer Tragzeit von 63-68 Tagen, ein bis vier Jungtieren und einer Säugezeit von 8-10 Wochen.

Momentan befindet sich ein Artikel im Druck, der ebenfalls Gestagen- und Östrogenmetaboliten im Kot dieser beiden Kleinkatzenarten untersucht.

2.5 Hormonmonitoring

Endokrine Aktivität wurde bereits in den verschiedensten Spezies untersucht – sowohl adrenale wie auch männliche und weibliche gonadale Hormone betreffend. Die weiblichen Sexualfunktionen bei den Feliden wurden zuerst Mitte der 1970er Jahre anhand von Blutproben der Hauskatze erforscht (Wildt et al. 1981). Studien an Wildkatzen blieben aufgrund der invasiven Methodik aber selten und wurden durch die unregelmäßige und zeitlich begrenzte Probennahme limitiert. Dies änderte sich mit der Entwicklung nicht-invasiver Assays, welche die entsprechenden Steroidhormonmetaboliten in Kot oder Urin detektieren. Methoden zur Analyse fäkaler Steroide, wie in dieser Arbeit, wurden bei den verschiedensten Säugetier- und Vogelarten, zu einem geringeren Anteil auch bei Reptilien, Amphibien und Fischen angewandt (für ein Review zum fäkalen Hormonmonitoring bei Säugern siehe Schwarzenberger 2007).

Der große Vorteil des nicht-invasiven gegenüber dem invasiven Hormonmonitoring ist, dass die Tiere nicht mehr anästhesiert oder gefangen werden müssen und ihnen daher unnötiger Stress erspart wird. Dies ermöglicht auch Langzeitstudien, die ein viel umfassenderes Bild zur Reproduktion einer Art ergeben. Ein besonderer Vorteil der Analyse von Kotproben liegt in der verzögerten Ausscheidung unter anderem durch die Reabsorption der Steroide in den enterohepatischen Kreislauf während der Darmpassage. Dadurch werden Proben abgesetzt, welche die sekretierten Hormone der letzten Stunden enthalten und nicht nur eine Momentaufnahme darstellen, wie bei Blutproben. Auf diese Weise ist es möglich tatsächliche physiologische Konzentrationsänderungen von normalen, ultradianen Sekretionsmustern zu unterscheiden (Brown 2006; Schwarzenberger 2007).

Ein Problem, das allerdings mit dem Metabolismus der Steroide und der weiteren mikrobiellen Degradation während der Darmpassage einhergeht, ist die Entstehung einer Vielzahl verschiedener Metabolite, die selbst zwischen nah verwandten Arten

variieren können. Daher sind spezifische Assays, wie sie bei der Analyse von Blutproben verwendet werden, meist nicht sinnvoll. Umgangen wird dieses Problem durch Enzymimmunoassays mit hoher Kreuzreaktivität gegenüber einer ganzen Gruppe von Steroiden, sogenannten gruppenspezifischen Tests. Dabei erkennt beispielsweise der verwendete Antikörper spezifisch die Strukturen am B-, C- und D-Ring, während er sich gegenüber der Substituenten am A-Ring sehr unspezifisch verhält. So eignen sich z. B. Tests mit Kreuzreaktivitäten zu verschiedenen Pregnandionen und hydroxylierten Pregnanen für die Quantifizierung von Metaboliten des Progesterons (Schwarzenberger 2007). Aufgrund der Variabilität bezüglich der Art der ausgeschiedenen Metaboliten sollte die Validierung verschiedener solcher gruppenspezifischer Assays erfolgen, so wie es auch in dieser Arbeit geschah.

Die genaue Struktur der von diesem Antikörper quantifizierten Steroidmetaboliten ist allerdings in den meisten Fällen nicht bekannt. Anhand von HPLC-Immunogrammen kann aber versucht werden, die Metaboliten zu charakterisieren. Die unterschiedliche Spezifität von Antikörpern ist auch ein Grund dafür, dass Ergebnisse endokrinologischer Studien aus verschiedenen Laboren nicht bezüglich der absoluten Konzentrationen verglichen werden können. Dennoch sind unterschiedliche Studien bezüglich ihrer physiologischen Relevanz vergleichbar. Unumgänglich ist dazu aber eine biologische Validierung, mit der gezeigt werden soll, dass die gemessenen Metaboliten, unabhängig von ihrer Struktur, physiologische Ereignisse wie Östren, Trächtigkeiten und Scheinträchtigkeiten widerspiegeln.

Wie in Kapitel „2.4 Reproduktionsbiologie der Kleinkatzen“ beschrieben sind kurzfristige Östrogenanstiege zu erwarten, die mit der Follikelreifung einhergehen und mit Östrusverhalten oder Verpaarungen assoziiert werden können. Des weiteren sollten die Gestagenkonzentrationen nach Verpaarungen ansteigen und über die gesamte Trächtigkeit erhöht bleiben, während sie bei einer Scheinträchtigkeit bereits früher zum Basalniveau zurückkehren. Diese Muster wurden bereits bei verschiedenen Arten der Feliden-Familie beschrieben (z. B. Hauskatze: Wildt et al. 1981; Schmidt et al. 1983; Bengalkatze, Nebelparder, Schneeleopard und Gepard: Brown et al. 1994; Manul: Brown et al. 2002). Auf der anderen Seite wurde für den Eurasischen und Iberischen Luchs gezeigt, dass der mit der Verpaarung assoziierte

Östrogenpeak fehlt, genau wie auch der zeitigere Gestagenabfall während der Scheinträchtigkeit (Dehnhard et al. 2008). Dies ist aber unter den bisher untersuchten Arten die Ausnahme.

3 Zielsetzung

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, für die besonders stressanfälligen Sand- und Schwarzfußkatzen eine geeignete Methode zum nicht-invasiven Reproduktionsmonitoring zu validieren, mit der Östrogen- und Gestagenmetaboliten im Kot von Weibchen quantifiziert werden können, so wie es bereits für einige andere Feliden gezeigt wurde. Über diesen Ansatz können Informationen zur zyklischen Ovaraktivität, sowie zu Gravidität und Pseudogravidität gewonnen werden. Auf diese Weise könnten Individuen mit einer Dysfunktion der Reproduktion identifiziert werden, für die sich möglicherweise assistierte Reproduktionstechnologien (ART) anbieten würden. Weiterhin wäre es mit Hilfe einer adäquaten Methode zur Trächtigkeitsdiagnose möglich, die besonders stressempfindlichen Kleinkatzen frühzeitig in ein ruhigeres Umfeld umzusetzen um die Infantizidgefahr durch Stress zu reduzieren. Ebenfalls könnte durch das Trächtigkeitsmonitoring der Zeitpunkt der erwarteten Geburt überwacht werden, um bei einem Infantizidversuch direkt eingreifen zu können.

Durch eine einmal etablierte, nicht-invasive Analyse der Reproduktionshormone können demnach grundlegende Informationen zur Fortpflanzung dieser bedrohten Arten erzielt werden, die zur Steigerung des Reproduktionserfolges eingesetzt werden können.

4 Untersuchte Tiere, Material und Methoden

4.1 Untersuchte Tiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf weibliche Sandkatzen sowie eine weibliche Schwarzfußkatze untersucht, die aus vier verschiedenen zoologischen Institutionen stammten. In Ebeltoft wurden die drei Sandkatzenweibchen einzeln gehalten und nur mit einem Kater zusammengesetzt wenn eine Rolligkeit beobachtet wurde. Dagegen lebte das Weibchen in Berlin ständig mit einem Männchen vergesellschaftet zusammen. Im Zoo Poznan war das Sandkatzenweibchen das einzige verbliebene Exemplar dieser Art. Die Schwarzfußkatze des Zoos Wuppertal teilte sich im Untersuchungszeitraum mit ihrem Jungtier bzw. für ein paar Tage zum Zweck der Verpaarung mit einem Kater das Gehege. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Tiere.

Tabelle 1: Übersicht über die untersuchten Katzen unter Angabe der Zuchtbuchnummer (ZB-Nr.) innerhalb der EAZA, des Geburtsdatums und der hier untersuchten Zeiträume

Name	ZB-Nr.	Geb.-Datum	Untersuchter Zeitraum	Halter	Haltungsform
Sandkatze (*Felis margarita harrisoni*)					
Aisha	600	03.09.2005	24.04.-07.09.2008 02.01.-13.06.2009	Ree Park Ebeltoft Safari, Dänemark	Getrennthaltung von Katern
Atiya	561	28.04.2004	10.05.-02.09.2008 14.04.-20.04.2009 29.05.-29.06.2009		
Felicia	512	25.02.2003	24.04.-08.09.2008 27.11.2008-31.05.2009		
Huni	381	05.02.1999	02.07.-13.08.2008	Ogród Zoologiczny Poznan, Polen	Einzelhaltung (ohne Kater)
Wis	558	28.04.2004	28.09.-04.12.2008 12.02.-12.04.2009	Zoologischer Garten Berlin, Deutschland	Paarhaltung mit Kater
Schwarzfußkatze (*Felis nigripes*)					
Herna	F469	30.11.2000	06.11.-04.12.2006 05.01.-29.01.2007	Zoologischer Garten Wuppertal, Deutschl.	Paarhaltung mit Jungtier/Kater

Bei der Handaufzucht Aisha war es möglich fast ihre gesamte Reproduktionsaktivität zu verfolgen. Ihr erster Wurf erfolgte am 06.05.08, bei dem beide Jungtiere starben. Infolge dessen wurde sie innerhalb einer Woche wieder rollig und wurde erneut verpaart, was zur zweiten Geburt am 17.07.08 führte. Vermutlich ausgelöst durch

eine externe Störung durch einen Pfleger fraß sie zwei der vier Jungtiere am zweiten Tag, die beiden verbliebenen wurden für die Handaufzucht abgesetzt. Der nächste Zuchtversuch wurde Mitte Januar 2009 unternommen, blieb aber aufgrund einer schweren Krankheit ohne Erfolg. Nach der dritten Geburt am 11.06.09 zog sie das eine Kätzchen ohne Komplikationen auf.

Aishas Mutter Atiya, die zuvor bereits einmal erfolgreich züchtete, warf im Untersuchungszeitraum ebenfalls ein Jungtier (02.07.08).

Sämtliche Zuchtversuche mit Felicia scheiterten bisher, obwohl sie die letzten Jahre über beständig mit zwei Katern verpaart wurde, die beide schon Nachwuchs gezeugt hatten.

Ebenso schlugen die Versuche fehl das Pärchen in Berlin zu verpaaren, wobei bislang erst eine einzige Verpaarung am 09.07.09 beobachtet wurde. Das Weibchen zeigte bei ständiger Anwesenheit des Männchens keinerlei Östrusanzeichen.

Das fünfte Sandkatzenweibchen, Huni, hat sich in der Vergangenheit mehrfach erfolgreich fortgepflanzt, wird nun aber ohne Männchen gehalten.

Insgesamt wurden Proben von zwei kompletten Trächtigkeiten (bei Aisha und Atiya), sowie dem Großteil einer weiteren bei Aisha, ebenso wie von drei Scheinträchtigkeiten bei Felicia für das sogenannte Reproduktionsmonitoring gesammelt.

Von den Schwarzfußkatzen lagen lediglich ältere Proben eines Weibchens vor, die eine Rolligkeit und einen Verpaarungszeitraum beinhalteten.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Probengewinnung

Die Kotproben wurden, in Ebeltoft meist täglich, in Berlin und Poznan an jedem zweiten Tag, von den Pflegern vormittags vor der Reinigung der Gehege entnommen, in Kotröhrchen überführt und bei -20 °C tiefgefroren. Der Transport ins Labor erfolgte ebenfalls tiefgekühlt.

Bei den in Einzelgehegen gehaltenen Tieren aus Ebeltoft und dem einzelnen Weibchen aus Poznan bereitete die Gewinnung individueller Proben keine Probleme. Dem Berliner Kater, der mit dem Weibchen in einem Gehege gehalten wird, wurde zur Unterscheidung der Proben weiße Lebensmittelfarbe (Titaniumdioxid) gefüttert. Aus demselben Grund bekam Atiyas Sohn blaue Lebensmittelfarbe (Coomassie Brilliant Blau). Eine solche Differenzierung erfolgte bei den Proben der Schwarzfußkatze nicht. Der Zoo Wuppertal stellte Kotproben für die Untersuchung zur Verfügung, die vor zwei Jahren für eine andere Studie gesammelt wurden. Das Schwarzfußkatzenweibchen wurde zu diesem Zeitpunkt mit ihrem weiblichen Jungtier (im Untersuchungszeitraum 4,5-7 Monate alt) bzw. einem Kater zusammen gehalten, von denen gleichermaßen Kot aufgenommen wurde.

4.2.2 Probenextraktion und weitere Aufbereitung

Zur Validierung eines praktikablen Verfahrens für die Extraktion der Kotproben wurden unterschiedliche Methoden zu Anreicherung, Isolierung und Metabolitentrennung geprüft.

Allen ging ein einfacher Extraktionsschritt mit 90%-igem Methanol voran (eine Liste der verwendeten Chemikalien und Geräte befindet sich in Anhang 1). Dafür wurden 0,5 g der gefrorenen Kotprobe in Falcon-Röhrchen eingewogen, wobei darauf geachtet wurde, dass die verwendeten Anteile möglichst wenig Eis, Sand, Steinchen und Haare enthielten, und mit 4,5 ml 90%-igem Methanol versetzt. Die Proben wurden für 30 Minuten geschüttelt und anschließend für 15 Minuten bei 1000 g und 20 °C zentrifugiert.

Für die direkte Messung im Enzymimmuno-Assay (EIA) wurde 1 ml des Überstandes mit 1 ml Aqua bidest verdünnt und bis zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Weiterhin wurden für die im Folgenden beschriebenen Verfahren jeweils 0,5 ml des Überstandes entnommen.

4.2.2.1 Ätherextraktion

Bei der Ätherextraktion werden polare (konjugierte) von unpolaren (freien) Steroiden in einer Lösungsmittelverteilung zwischen polarer, wässriger und unpolarer Ätherphase getrennt.

Dazu wurden 0,5 ml methanolischer Kotextrakt niedergetrocknet, in 0,5 ml Aqua bidest resuspendiert, mit 2 ml TBME/PE (30/70 v/v) (tert-Butylmethyläther/ Petroläther) versetzt und für 30 Minuten geschüttelt. Nach dem Ausfrieren der wässrigen Phase bei -80 °C für 15 Minuten wurde die Ätherphase mit den enthaltenen freien Steroiden in ein neues Reagenzglas überführt und bei 55 °C und übergeleitetem Stickstoff evaporiert. Der Rückstand wurde in 0,4 ml 100%-igem Methanol aufgenommen und mit 0,6 ml Aqua bidest verdünnt. Die konjugierten Steroide verblieben in der wässrigen Phase.

4.2.2.2 Enzymatische Hydrolyse

Um die mit Glucuronsäure oder Schwefelsäure konjugierten Steroide freizusetzen, wurde eine enzymatische Hydrolyse mit einem Enzymgemisch aus β-Glucuronidase und Arylsulfatase aus *Helix pomatia* durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden 0,5 ml des Methanolextraktes niedergetrocknet, der Rückstand in 0,5 ml Acetatpuffer-Enzymgemisch (Enzymlösung 1:250 mit Acetatpuffer [0,05 M, pH 4,8] verdünnt) aufgenommen und anschließend für zwei Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Zur Gewinnung der freigesetzten, nunmehr unpolaren Steroide folgte eine doppelte Ätherextraktion wie im vorhergehenden Kapitel „4.2.2.1 Ätherextraktion“ beschrieben, mit dem Unterschied, dass die Resuspendierung in Wasser entfiel und mit 2,5 ml TBME/PE (30/70 v/v) extrahiert wurde. Die Ätherphasen der beiden Durchläufe wurden ebenfalls evaporiert und direkt in 1 ml 40%-igem Methanol wieder gelöst. Der Ätherextrakt enthielt die nun freien Steroide, während die lyseresistenten, konjugierten in der wässrigen Phase verblieben.

4.2.2.3 Festphasenextraktion in RP-C18-Kartuschen

Zur Aufreinigung der Steroide wurde eine Festphasenextraktion mittels RP-C18-Säulen durchgeführt. Dabei werden die Steroide und ihre Konjugate an den unpolaren C18-Alkanketten adsorbiert, die an eine Silica-Gel-Matrix gebunden sind. Es wurden zwei verschiedene Abläufe mit unterschiedlichen Elutionsmitteln gegeneinander getestet.

Verwendung fanden 0,1 g C-18-Kartuschen, die mit 2 ml Methanol und 2 ml Tris-Puffer (20 mM, pH 8,5; 20 % Methanol) konditioniert wurden. Nach dem Probenauftrag (0,5 ml Methanolextrakt mit 2,5 ml Aqua bidest verdünnt) folgte ein Waschschritt mit 2 ml Tris-Puffer (20 mM, pH 8,5; 20 % Methanol) bevor einerseits direkt mit 1 ml Methanol (RP18 Testverfahren) und andererseits erst mit 1 ml 80 % Methanol/20 % Wasser und dann wiederum mit 1 ml Methanol (RP18 Standardverfahren) eluiert wurde. Alle drei Eluate wurden jeweils mit 1 ml Aqua bidest verdünnt.

4.2.3 Quantitative Bestimmung der Hormone

Die quantitative Bestimmung der entsprechenden Hormonmetaboliten in den Kotextrakten erfolgte mittels Enzymimmunoassay (EIA) unter Verwendung der Doppelantikörpertechnik. Dabei wird das im Extrakt enthaltene Hormon bzw. ein mit diesem konkurrierendes, zu diesem analoges, enzymmarkiertes Hormon (Konjugat) von einem spezifischen Antikörper gebunden, welcher wiederum durch einen für dieses IgG spezifischen, zweiten Antikörper an den Vertiefungen einer Mikrotitrationsplatte fixiert wird (Abbildung 3). Die in dieser Arbeit eingesetzten Hormonkonjugate (siehe Tabelle 2) waren alle mit Meerrettichperoxidase gekoppelt, welche die Reaktion von Tetramethylbenzidin zu einem blauen Chromophor katalysierte. Dessen Konzentration ist im hier angewandten kompetitiven EIA umgekehrt proportional der zu bestimmenden Hormonkonzentration der Proben.

Im Zuge dieser Arbeit wurden Tests mit Antikörpern gegen verschiedene Gestagene (Progesteron, Pregnandiol und 5α-Pregnan-3β-ol-20-on), einen Antikörper, der gleichermaßen Östradiol und Östron bindet (Gesamtöstrogene) und einen gegen den Östrogenvorläufer Epi-Androsteron generierten durchgeführt (siehe Tabelle 2).

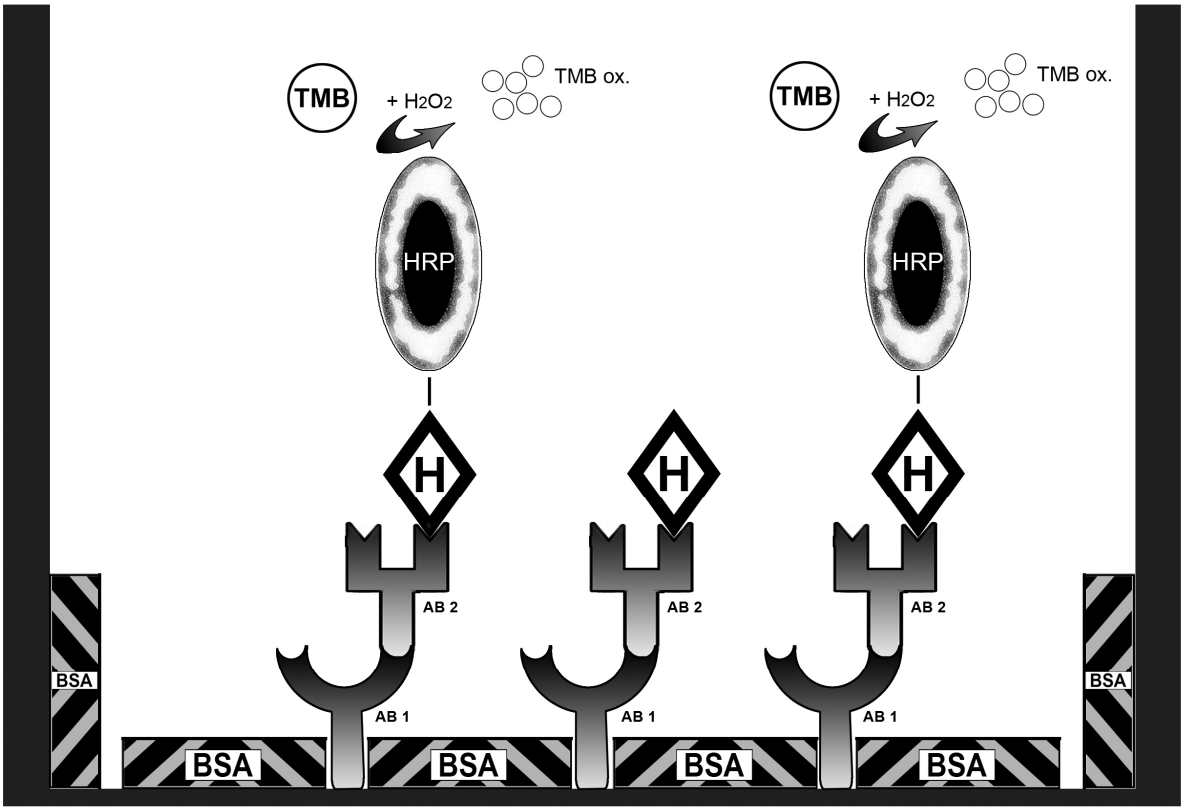
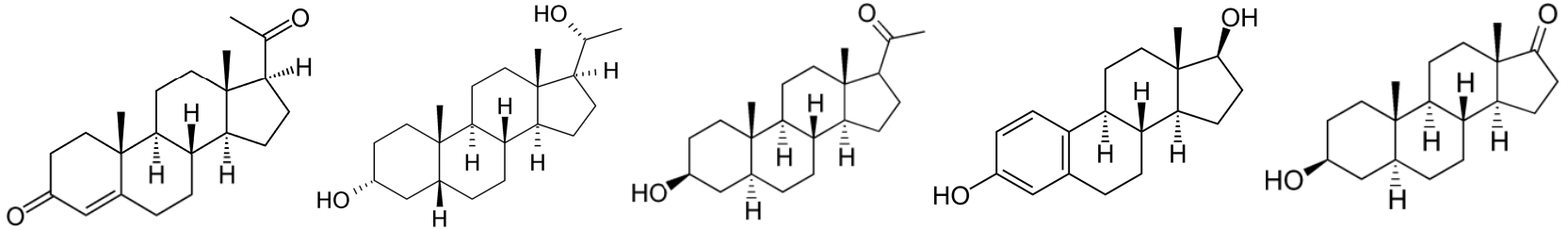


Abbildung 3: Prinzip des Enzymimmuno-Assays – Der IgG-spezifische Beschichtungs-Antikörper (AB 1; z. B. Anti-Ratten-IgG aus Ziegen) bindet den hormonspezifischen Antikörper (AB 2; z. B. Anti-Progesteron-IgG aus Ratten) an der Mikrotiterplatte. Dieser wiederum bindet sowohl das freie Hormon (H) aus der Probe als auch den zugesetzten, mit Meerrettichperoxidase markierten Label (H+HRP). Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Chromophor. Zur Verhinderung der unspezifischen Bindung wird die Platte mit Rinderserumalbumin (BSA) geblockt.

Tabelle 2: Übersicht über die durchgeführten Enzymimmunoassays (AK: Antikörper, Verd.: Verdünnung; HS: Hemisuccinat, gluc: Glucuronid, CMO: Carboxymethyloxim; BSA: Rinderserumalbumin; HRP: Meerrettichperoxidase)

	Gestagene			**Östrogene**	**Androgene**
	Progesteron	**Pregnandiol**	**5α-Pregnanolon**	**Gesamtöstrogene**	**Epi-Androsteron**
Antikörper generiert gegen	Progesteron (4-Pregnen-3,20-dion) (monoklonal) (Ratten-AK)	5β-Pregnan-3α,20α-diol-3-gluc-BSA (Kaninchen-AK)	5α-Pregnan-3β-ol-20-on-3-HS-BSA (Kaninchen-AK)	1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol-17-HS-RSA, (Kaninchen-AK)	5α-Androstan-3β-ol-17-on-3-HS-BSA (Kaninchen-AK)
Bezugsquelle	Sigma-Aldrich, Steinheim, D	IZW, Berlin, D	IZW, Berlin, D	Dr. Meyer, Weihenstephan, D	IZW, Berlin, D
Vor-Verd. in 75% $(NH_4)_2SO_4$	1:20	1:100	1:25	1:200	1:10
Verd. in Testpuffer	1:400 (P4 XIII)	1:1000 (1125 P3)	1:800 (1123 P8) 1:500 (1123 P9)	1:400 (E2/3 P2 VI) 1:250 (E2/3 P2 VII)	1:1500 (1/3)
Label	Progesteron-3-CMO-HRP	5β-Pregnan-3α,20α-diol-3α-gluc-HRP	5α-Pregnan-3β-ol-20-on-3-HS-HRP	1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol-17-HS-HRP	5α-Androstan-3β-ol-17-on-3-HS-HRP
Bezugsquelle	Sigma-Aldrich, Steinheim, D; IZW, Berlin, D	Sigma-Aldrich, Steinheim, D; IZW, Berlin, D	Steraloids Inc., Wilton, NH, USA; IZW, Berlin, D	Sigma-Aldrich, Steinheim, D; IZW, Berlin, D	Steraloids Inc., Wilton, NH, USA; IZW, Berlin, D
Vor-Verd. in 75% $(NH_4)_2SO_4$	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40
Verd. in Testpuffer	1:2000 (E XXIIIa)	1:2500 (E XIIa)	1:2000 (E IXa)	1:2857 (E XIIa)	1:1000 (E XXXIa)
Standard	Progesteron	5β-Pregnan-3α,20α-diol	5α-Pregnan-3β-ol-20-on	1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol	5α-Androstan-3β-ol-17-on
Bezugsquelle	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, D	Sigma Chemical, St. Louis, USA	Sigma Chemical, St. Louis, USA	Serva, Heidelberg, D	Steraloids, Newport, RI, USA
Konzentrationsbereich	0,2-100 pg/20 µl	1,56-1000 pg/10 µl	0,4-200 pg/20 µl	0,2-100 pg/20 µl	0,4-200 pg/20 µl
Eingesetztes Proben-/ Standardvolumen	20 µl	10 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Probenverdünnung	1:500	1:50	1:3000 (bzw. 1:500)	1:50 (bzw. 1:10)	1:50



4.2.3.1 Beschichtung der Platten

Die Mikrotitrationsplatten wurden mit affinitätsgereinigtem Anti-Ratte-IgG im Fall von Progesteron und Anti-Kaninchen-IgG im Fall aller anderen Hormonmetaboliten beschichtet (beide generiert in Ziegen). Jede Vertiefung wurde mit 1 µg IgG in 100 µl Coating-Puffer (15 mM Na_2CO_3 x 10 H_2O, 28 mM $NaHCO_3$; mit 5 N HCl auf pH 9,6 eingestellt) bestückt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Platten durch 300 µl Testpuffer (40 mM Na_2HPO_4 x 2 H_2O, 145 mM NaCl, 1 g/l BSA; mit 5 N HCl auf pH 7,2 eingestellt) pro Vertiefung bei 20 °C für 30 Minuten abgesättigt um eine unspezifische Bindung von Hormon und Label an den freien Bindungsstellen in der Vertiefung zu verhindern. Nach Entleerung wurden die Platten bei -20 °C gelagert. Vor der Verwendung im Enzymimmunoassay wurden die Platten mit Hilfe eines automatischen Washers einmal mit je 300 µl 0,05%-igem Tween 80 pro Loch gewaschen.

4.2.3.2 Durchführung des Enzymimmunoassays

In jede Vertiefung der gewaschenen Mikrotiterplatte wurden mit Hilfe eines Diluters gleichzeitig 10 µl/20 µl (je nach Test, siehe Tabelle 2) Hormon-Standard oder Probe und 100 µl enzymgekoppeltes, mit Testpuffer verdünntes Hormon (Konjugat) pipettiert (siehe Tabelle 2). Sowohl die Standards als auch die Proben wurden in 40 % Methanol angesetzt. Für alle Proben und Standards, die zur Erstellung einer Eichkurve mitgeführt wurden, wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Anschließend wurden 100 µl der entsprechenden hormonspezifischen Kaninchen- bzw. Ratten-Antikörperverdünnung zugefügt (siehe Tabelle 2), deren Antikörper (AB2, Abbildung 3) einerseits vom ersten Antikörper (AB1) fixiert wurde und andererseits das Hormon bzw. das Konjugat band. Die Fixierung dieses Antikörpers und die kompetitive Immunreaktion fanden unter leichtem Schütteln während der Inkubation über Nacht bei 6-8 °C statt.

Am folgenden Tag wurde die Platte viermal mit je 300 µl 0,05%-iger gekühlter Tween 80-Lösung gewaschen um ungebundene Antikörper und Steroide zu entfernen. In jede Vertiefung wurden 150 µl kalte Substratlösung (1,2 mM H_2O_2, 0,4 mM 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 10 mM Natrium-Azetat-Lösung; mit Zitronensäure auf pH 5,5 eingestellt) pipettiert, die unter der katalysierenden Wirkung

der Peroxidase zu einem blauen Chromophor oxidiert wurde. Diese Substratumwandlungsreaktion wurde nach 40-minütiger, lichtgeschützter Inkubation bei 6-8 °C (unter leichtem Schütteln) durch die Zugabe von 50 µl 4 N Schwefelsäure abgestoppt, wobei ein Farbumschlag zu Gelb erfolgte. Die Konzentration dieses gelben Chromophors, welche durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm im automatischen Mikrotitrationsplattenmessgerät (Infinite M 200, Tecan, Crailsheim, Deutschland) bestimmt wurde, war umgekehrt proportional zur in der Probe enthaltenen Hormonmenge. Anhand der mitgeführten Standards mit bekannten Hormonkonzentrationen und der daraus abgeleiteten Eichkurve wurden die Hormonkonzentrationen in den Proben berechnet (Magellan Software, Tecan). Lagen die ermittelten Konzentrationen nicht im linearen Bereich der Standardkurve, so wurden die entsprechenden Proben in einer höheren bzw. niedrigeren Verdünnung erneut getestet.

4.2.3.3 Kreuzreaktionen

Die Kreuzreaktivitäten der unterschiedlichen hormonspezifischen Antikörper mit verschiedenen anderen Steroiden wurden vorab im Labor bestimmt und sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 3: Kreuzreaktivitäten der Gestagen-Antikörper (5α-P: Antikörper generiert gegen 5α-Pregnan-3β-ol-20-on-3-HS-BSA; P4: monoklonaler Progesteron-Antikörper von Sigma; PD (Pregnandiol): Antikörper generiert gegen 5β-Pregnan-3α,20α-diol-3-gluc-BSA; n.d.: nicht definiert)

	Kreuzreaktivität (%)		
Substanz	**5α-P**	**P4**	**PD**
5α-Pregnan-3α-ol-20-on	650	n.d.	< 0,1
5α-Pregnan-3β-ol-20-on	100	18	n.d.
4-Pregnen-3,20-dion (P4)	72	100	n.d.
5α-Pregnan-3,20-dion	22	31	< 0,1
5β-Pregnan-3α,20α-diol	< 0,1	<0,1	100
4-Pregnen-20α-ol-3-on	< 0,1	<0,1	n.d.
5β-Pregnan-3α-ol-20-on	< 0,1	<0,1	n.d.
5α-Pregnan-20α-ol-3-on	< 0,1	<0,1	60
5α-Pregnan-3β,20α-diol	< 0,1	<0,1	36
5α-Pregnan-3α,20α-diol	< 0,1	<0,1	34
5-Pregnen-3β-ol-20-on	n.d.	12	n.d.
4-Pregnen-3α-ol-20-on	n.d.	4.2	n.d.
Testosteron (4-Androsten-17β-ol-3-on)	n.d.	<0,1	n.d.
Östradiol (E2)	n.d.	<0,1	n.d.
Cortisol	n.d.	<0,1	n.d.
20α-Dihydroprogesteron	n.d.	n.d.	211
5α-Pregnen-3,20-dion	n.d.	n.d.	< 0,1
5α-Pregnan-20-on	n.d.	n.d.	< 0,1
5β-Pregnan-20-on	n.d.	n.d.	< 0,1

Tabelle 4: Kreuzreaktivitäten des Östrogen- und Androgen-Antikörpers (E2: Antikörper gegen 1,3,5(10)-estratrien-3,17β-diol-17-HS-BSA; Epi-A (Epi-Androsteron: 3β-Hydroxy-5α-androstan-17-on): Antikörper generiert gegen 5α-Androstan-3,17-dion-3-CMO-BSA; n.d.: nicht definiert)

	Kreuzreaktivität (%)	
Substanz	**E2**	**Epi-A**
1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol (17β-Östradiol)	100	<0,1
1,3,5(10)-Estratrien-3,17-on (Östron)	100	<0,1
1,3,5(10)-Estratrien-3,17α-diol (17α-Östradiol)	66	<0,1
1,3,5(10)-Estratrien-3,16α,17β-triol (Östriol)	1.5	n.d.
19-Nortestosteron (4-Estren-17β-ol-3-on)	< 0,1	<0,1
Progesteron	< 0,1	<0,1
Testosteron (4-Androsten-17β-ol-3-on)	< 0,1	<0,1
Epi-Androsteron (5α-Androstan-3β-hydroxy-17-on)	n.d.	100
Androsteron (5α-Androstan-3α-hydroxy-17-on)	n.d.	?
Androstenedion (4-Androsten-3,17-dion)	n.d.	100
DHEA (5-Androsten-3β-ol-17-on; Dehydroepiandrosteron)	n.d.	37
Dehydrotestosteron (5α-Androstan-17β-ol-3-on)	n.d.	<0,1
5α-Androstan	n.d.	<0,1
Andrenosteron (4-Androsten-3,11,17-trion)	n.d.	<0,1
Cortisol	n.d.	<0,1
Corticosteron	n.d.	<0,1
5α-Pregnan-3β-ol-20-on (5α-P)	n.d.	<0,1

4.2.3.4 Validierung der Enzymimmunoassays

Zur Validierung des 5α-Pregnanolon-EIAs (5α-P) und des Gesamtöstrogen-EIAs (E2), mit denen die longitudinalen Profile erstellt wurden, wurden zwei Qualitätskriterien beurteilt.

I. Intra- und Interassay-Variationskoeffizient (VK)

Zur Abschätzung des Interassays wurden bei jedem durchgeführten EIA zwei Proben bekannter Konzentration mitgeführt, während diese für den Intraassay jeweils neunmal auf derselben Platte bestimmt wurden. Die Variationskoeffizienten lassen Aussagen über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Mikrotiterplatten bzw. innerhalb derselben Platte zu.

Tabelle 5: Intraassay- und Interassay-Variationskoeffizient (VK) und Mittelwert ± Standardabweichung (MW ± SD) der Poolproben für den 5α-Pregnanolon- (5α-P) und den Gesamtöstrogen-EIA (E2)

Test	**Intraassay**		**Interassay**	
	MW ± SD (pg/20 µl)	VK (%)	MW ± SD (pg/20 µl)	VK (%)
5α-P	2,78 ± 0,28	10,0	3,65 ± 0,63	17,3
	12,16 ± 1,26	10,3	10,40 ± 0,95	9,1
E2	1,93 ± 0,15	7,9	2,02 ± 0,21	10,4
	5,05 ± 0,39	7,7	5,18 ± 0,28	5,3

II. Parallelitätstest

Weiterhin sind die berechneten Konzentrationen nur verlässlich, wenn sie aus dem linearen Bereich der Standardkurve abgelesen werden, was durch passende Verdünnungen der Extrakte erreicht wurde (siehe Tabelle 2). Um einen Einfluss unterschiedlicher Verdünnungen auf die Ergebnisse (Matrixeffekt) auszuschließen, wurde ein Parallelitätstest mit mehreren Proben in Verdünnungsreihen durchgeführt (1:500-1:4000 für 5α-P-EIA, 1:10-1:80 für E2-EIA).

Die Graphen der Proben im 5α-P-EIA (Abbildung 4) verliefen parallel zur Standardkurve, was die Vergleichbarkeit der Werte zwischen diesen Verdünnungen erlaubt. Im E2-EIA (Abbildung 5) waren die Graphen zwischen 1:20 und 1:80 parallel zur Standardkurve, während die Gesamtkonzentrationen für die 1:10-Verdünnung meist zu hoch lagen. Dies begründet sich allerdings durch den Fakt, dass diese

Verdünnungen zu niedrig waren und die bestimmten Werte bereits außerhalb des linearen Bereichs der Standardkurve lagen.

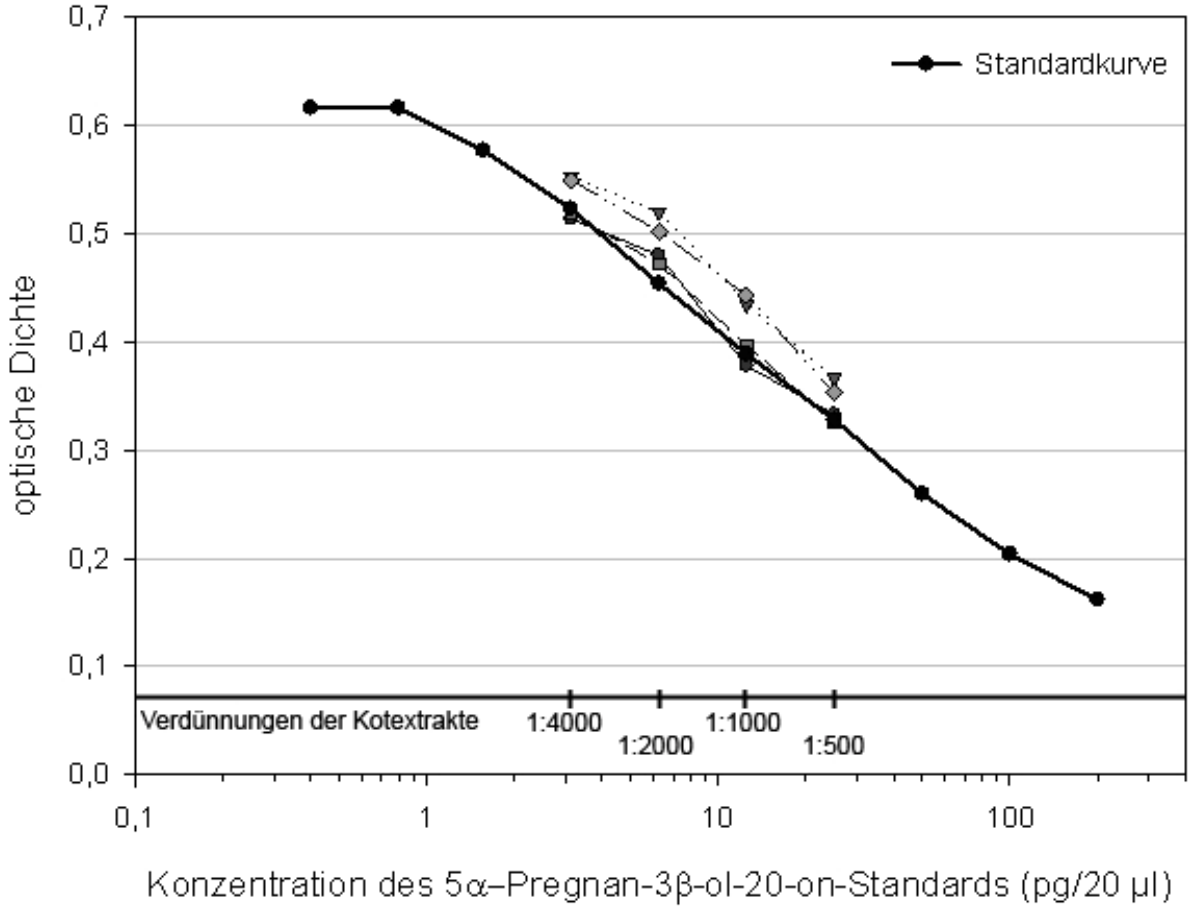


Abbildung 4: Parallelität von vier Proben gegenüber der Standardkurve, getestet mit dem 5α-P-EIA; die Proben wurden in Verdünnungen von 1:4000, 1:2000, 1:1000 und 1:500 eingesetzt.

Abgesehen davon wurde in dieser Studie ohnehin für jeden Test fast ausschließlich nur jeweils eine Verdünnung eingesetzt (1:3000 für 5α-P, 1:50 für E2), für welche die Konzentrationen der biologischen Proben fast alle im linearen Bereich der Eichkurve lagen. Nur in wenigen Ausnahmefällen, bei denen die Konzentrationen zu niedrig waren, wurden die Proben in einer geringeren Verdünnung reanalysiert (1:500 für 5α-P, 1:10 für E2).

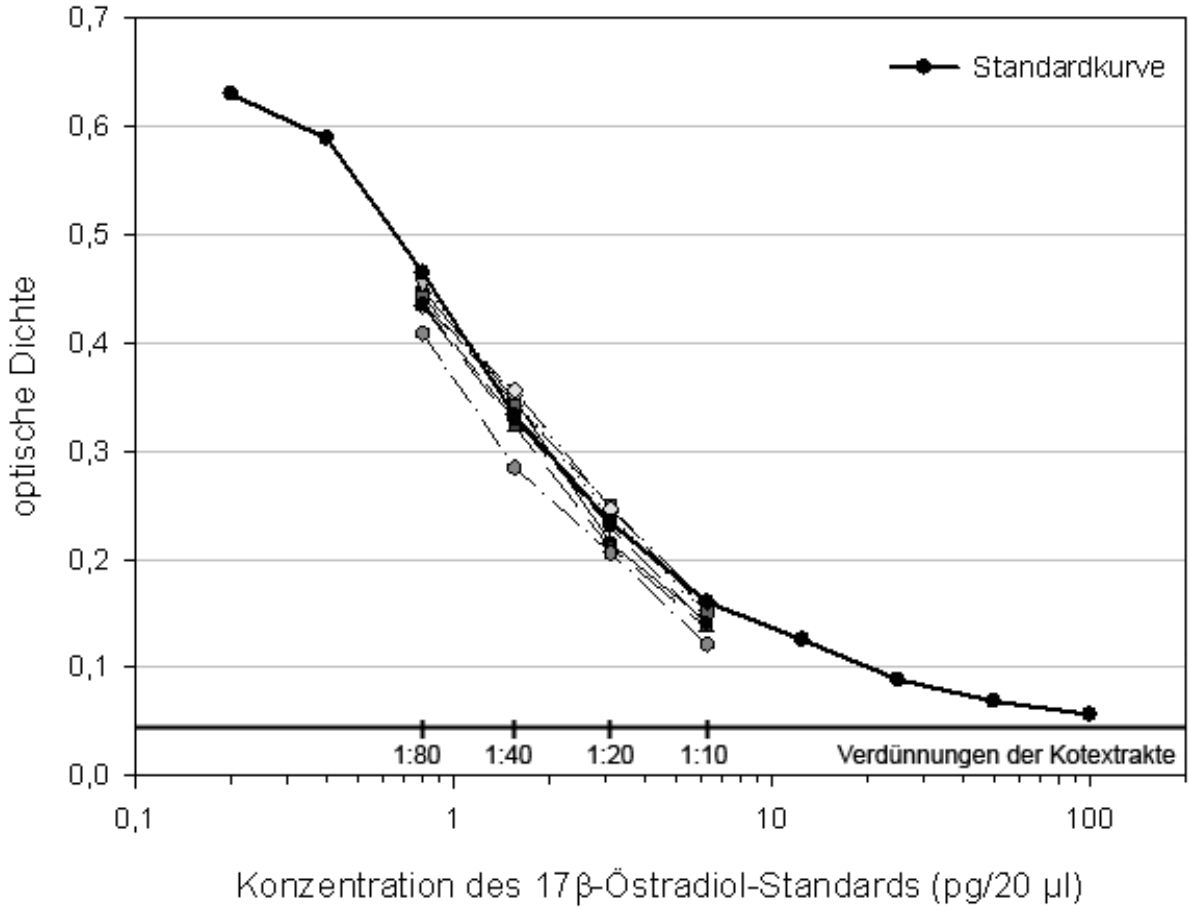


Abbildung 5: Parallelität von sieben Proben gegenüber der Standardkurve, getestet mit dem E2-EIA; die Proben wurden in Verdünnungen von 1:80, 1:40, 1:20 und 1:10 eingesetzt.

4.3 Statistik

Aufgrund der geringen Anzahl der Tiere und der individuellen Unterschiede war eine statistische Auswertung im Sinne einer schließenden Statistik nicht möglich. Stattdessen wurden die erhobenen Daten in Verlaufsgraphiken dargestellt.

Die Konzentration der Steroidhormone wurde jeweils auf 1 g Kot bezogen und berechnet sich aus der Konzentration des Extraktes, das im EIA eingesetzt wurde, mit den entsprechenden Verdünnungsfaktoren und dem Volumen des Methanolextraktes (5 ml), welches aus 0,5 g Kot gewonnen wurde, zu:

$$c\ (ng/g\ Kot) = \frac{c_{EIA}\ (pg/20\ \mu l) * Verd_{EIA} * Verd_{Vor}}{20} * \frac{5\ ml}{0{,}5\ g\ Kot}$$

c_{EIA} … anhand der Standardkurve von Magellan Software berechnete Konzentration (pg/20 µl = ng/20 ml)
$Verd_{EIA}$ … im EIA eingesetzte Verdünnung des Extraktes
$Verd_{Vor}$ … Vorverdünnung des Extraktes bei der Aufarbeitung ($Verd_{Vor}$ = 2 für Methanolextrakt, Ätherextrakt und Hydrolyse $Verd_{Vor}$ = 4 für RP18-Festphasenextraktion)

Im Sinne einer explorativen Statistik wurden die Gestagen- und Östrogenkonzentrationen der zusammengehörigen Hälften von Trächtigkeiten bzw. der entsprechenden Zeiträume bei Scheinträchtigkeiten verglichen. Dafür wurde als Beginn der dritte Tag nach der ersten beobachteten Verpaarung festgelegt, gemäß den Ergebnissen, dass die Ovulation 24-36 h post-coitus erfolgt (Shille et al. 1983) und 1-2 Tage vergehen, bis die Steroide über den Kot ausgeschieden werden (Brown et al. 1994). Dementsprechend wurde der Tag nach der Geburt als Endpunkt der Betrachtung gewählt, da die Kotproben dieses Tages das Hormonniveau des Geburtstages widerspiegelten. Dieser Zeitraum wurde in zwei Hälften geteilt. Die gleiche Skala wurde ebenso auf die Scheinträchtigkeiten angewandt. Aufgrund der fehlenden Normalverteilung der Daten in mindestens einer der beiden Hälften (Shapiro-Wilk-Test, $p<0{,}05$) wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet, um zu testen, ob ein Unterschied bezüglich der Hormonkonzentrationen zwischen erster und zweiter Trächtigkeits- bzw. Scheinträchtigkeitshälfte besteht.

Zur Definition von Bereichen basaler bzw. erhöhter Hormonkonzentrationen führte ein iterativer Prozess (Moreira et al. 2001; Brown et al. 2002; Pelican et al. 2005; Herrick et al. 2010). Dabei wurde der Mittelwert aller Proben eines Weibchens berechnet und die Proben mit Konzentrationen, die höher waren als der Mittelwert + die zweifache Standardabweichung (MW + 2*STABW) aus der Rechnung entfernt. Nun wurden Mittelwert und Standardabweichung der verbliebenen Proben ermittelt. Dieser Prozess wurde so lange wiederholt, bis alle Proben im Bereich MW ± 2*STABW lagen. Der Mittelwert der verbliebenen Proben wurde als Grundniveau angesehen. Bei Aisha fand ein leicht modifizierter Prozess für die Gestagene Anwendung, der mit MW + 1,5*STABW rechnete, da sie über den Großteil der Studie trächtige oder nicht-trächtige Lutealphasen mit erhöhten Gestagenkonzentrationen aufwies (Herrick et al. 2010). So wurde ein relevanteres Grundniveau bestimmt. Gestagenkonzentrationen wurden als erhöht definiert, wenn sie mindestens dem Fünffachen des Grundniveaus entsprachen und mindestens eine Woche so blieben (Herrick et al. 2010). Da drei der Tiere während großer Teile der Studie Trächtigkeiten oder Scheinträchtigkeiten entwickelten, wurden für die iterative Berechnung der Östrogene alle Werte zwischen dem ersten Tag nach der letzten Verpaarung und der Geburt bzw. der Rückkehr der Gestagene zum Basalniveau bei den Scheinträchtigkeiten ausgeschlossen. So wurde wieder ein relevanteres Grundniveau bestimmt. Die erhöhten Östrogenwerte sollten das Zweifache des Grundniveaus übersteigen (Herrick et al. 2010). Dabei wurden Werte, die maximal durch drei Tage niedrigerer Östrogene getrennt waren, als zusammengehörig angesehen. Die Zykluslänge war die Zeit zwischen dem Maximalwert einer Phase erhöhter Östrogenkonzentrationen und dem Höchstwert der folgenden Phase.

Neben der Angabe des Medians, die aufgrund der fehlenden Normalverteilung der Daten die korrektere Darstellung ist, wurden die mittleren Konzentrationen der basalen und erhöhten Bereiche zum direkten Vergleich mit Ergebnissen aus anderen Studien ebenfalls als Mittelwert ± Standardabweichung, sowie in Klammern als Mittelwert ± Standardfehler (SEM), dargestellt. In der Diskussion erfolgt lediglich die Angabe von MW ± SEM. Nichtsdestotrotz folgten die Werte des Grundniveaus einer Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test, $p>0,05$), was die iterative Berechnung erst ermöglichte.

5 Ergebnisse

5.1 Beurteilung der Methoden zur Extraktaufbereitung

Um die optimale Methode zur Aufbereitung der Kotproben für die weitere Analyse zu definieren, wurde anhand von zehn Proben der Einfluss von Ätherextraktion, enzymatischer Hydrolyse und RP18-Festphasenextraktion auf die Ergebnisse der drei Gestagen-Enzymimmunoassays (Progesteron P4, Pregnandiol PD und 5α-Pregnanolon 5α-P) untersucht. Dafür wurden Proben aus unterschiedlichen Reproduktionsphasen gewählt – jeweils vier aus zwei Trächtigkeiten (vor der Verpaarung bzw. in der frühen Trächtigkeit, circa 20 Tage vor der Geburt, ein Tag vor der Geburt und einige Zeit nach der Geburt), sowie zwei Proben eines Weibchens, das keine Östrusanzeichen zeigte. Auf die Ergebnisse des PD-EIAs wird hier nicht weiter eingegangen, da bei diesem die Werte aller Proben annähernd gleich hoch waren und so eine Differenzierung zwischen Proben aus Trächtigkeit und Nichtträchtigkeit unmöglich war. Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse dieser Analyse für den 5α-Pregnanolon-EIA, der letztendlich für die Studie ausgewählt wurde.

Tabelle 6: Gestagenkonzentrationen im 5α-EIA für den Originalextrakt und die Aufbereitungsschritte. Die Konz. nach der RP18 (Standard) sind die Summen der beiden Eluate.

	Gestagenkonzentrationen (µg/g)				
	90 % MeOH-Extrakt Direkt-messung	**Freie Steroide im Ätherextrakt**	**Freie Steroide nach Lyse**	**Nach RP18 (Standard)**	**Nach RP18 (Test)**
Aishas Trächtigkeit im Sommer 2008					
kurz vor Verpaarung	25,2	15,3	17,6	21,1	18,0
späte Trächtigkeit	100,9	15,7	24,4	32,1	42,6
ein Tag vor Geburt	22,9	6,8	9,4	16,2	12,6
1,5 Wochen nach Geburt	16,2	3,8	9,8	10,2	9,2
Atiyas Trächtigkeit im Sommer 2008					
frühe Trächtigkeit	109,2	23,4	31,3	58,7	60,9
späte Trächtigkeit	67,1	7,8	11,0	26,8	31,3
ein Tag vor Geburt	38,5	6,6	16,7	23,2	31,2
1,5 Monate nach Geburt	56,0	13,0	20,5	35,6	32,9
Wis					
	12,0	9,3	10,0	14,2	8,9
	18,0	5,4	6,1	13,3	10,6

Allen aufbereiteten Proben war gemein, dass sie wesentlich geringere Gestagenkonzentrationen aufwiesen als der ursprüngliche Extrakt, der mit 90%-igem Methanol direkt aus dem Kot gewonnen wurde. So beliefen sich die auf die Konzentration im Ausgangsextrakt bezogenen Verluste auf bis zu 81 % im P4-EIA und bis zu 88 % im 5α-P-EIA. Tabelle 7 gibt einen detaillierteren Überblick über diese Verluste.

Tabelle 7: Prozentuale Verluste der Aufbereitungsmethoden bezogen auf die gemessene Konzentration im ursprünglichen Methanol-Extrakt (bei der RP18-Festphasenextraktion mit dem Standardelutionsverfahren wurden die Konzentrationen des 80 % Methanol-Eluats und des 100 % Methanol-Eluats summiert)

	Verluste im P4-EIA	**Verluste im 5α-P-EIA**
nach Ätherextraktion	42-81 %	23-88 %
nach enzymatischer Hydrolyse	20-63 %	17-84 %
beim RP18 Standardverfahren	0-70 %	0-68 %
beim RP18 Testverfahren	15-65 %	19-58 %

Insbesondere bei der Ätherextraktion und der Lyse schwankten die Verluste innerhalb eines Individuums stark, was zu einer Veränderung der Werte relativ zueinander führte. Unterschiede, besonders zu den hochkonzentrierten Trächtigkeitsproben, wurden abgeschwächt oder verschwanden gänzlich. Die Gestagenkonzentrationen des unverpaarten Weibchens lagen fast so hoch wie die der beiden trächtigen.

Aufgrund der hohen Verluste im Vergleich zum Ausgangsextrakt wurde zusätzlich getestet, ob sich die Differenz durch den Verbleib von Steroiden in der wässrigen Phase erklärt, die bei der Ätherextraktion zurückbleibt. Dabei müsste es sich folglich um polare, konjugierte Steroide handeln. Sowohl mit dem 5α-P-EIA als auch mit dem P4-EIA wurden in der wässrigen Phase (ohne Lyse) genauso viele oder bis zu doppelt so viele Gestagene wie in der Ätherphase nachgewiesen. Dies ließ auf einen hohen Anteil an Konjugaten schließen und favorisierte zunächst eine enzymatische Hydrolyse des Extraktes zur Freisetzung von Steroiden.

Allerdings wurden mit dem 5α-P-EIA nach der Hydrolyse wiederum genauso viele oder bis zu doppelt so viele Gestagene wie in der Ätherphase nachgewiesen, wohingegen im P4-EIA die Gestagenkonzentrationen in der wässrigen Phase nur circa die Hälfte bis ein Drittel betrugen.

Die Ätherextraktion, mit der freie von konjugierten Steroiden getrennt wurden, zeigte also, dass mehr konjugierte als freie Gestagene gemessen wurden und daher eine Hydrolyse sinnvoll schien um diese zu dekonjugieren. Der Erfolg dieser Lyse war allerdings nur mäßig, mit Gestagenkonzentrationen, die um durchschnittlich das 1,6-fache im Vergleich zur Ätherextraktion erhöht waren. Dies bedeutet, dass im Ursprungsextrakt ein beträchtlicher Anteil lyseresistenter Konjugate vorlag, was sich durch die hohen Konzentrationen in der wässrigen Phase nach der Lyse bestätigte. Die gezeigten Ergebnisse disqualifizieren demnach Lyse und Ätherextraktion zur Probenaufarbeitung.

Allerdings blieben die Aufarbeitungsverluste auch unter Einberechnung der wässrigen Phasen sehr hoch (Gesamtverlust bezogen auf den ursprünglichen Methanolextrakt für die Ätherextraktion 17-50 % [P4-EIA] bzw. 61-71 % [5α-P-EIA] und für die Hydrolyse 34-52 % [P4-EIA] bzw. 53-55 % [5α-P-EIA]). Aus diesem Grund sind die vorher ausgeführten Ergebnisse sehr kritisch zu betrachten, da vermutlich auch die Aufarbeitung selbst zu Verlusten führen kann, indem sich beispielsweise ein Teil der Steroide nicht wieder aus dem niedergetrockneten Extrakt löst.

Durch diese hohen, stark variablen Verluste und die damit einhergehende, oben beschriebene Abschwächung der Konzentrationsunterschiede zwischen Trächtigkeit und Nicht-Trächtigkeit wurden alle Enzymimmunoassays mit dem einfachen 90%-igen Methanol-Extrakt (vgl. Kapitel 4.2.2) durchgeführt.

Bei der Festphasenextraktion in RP-C18-Kartuschen waren die individuellen Schwankungen der Verluste nicht so stark ausgeprägt, wodurch die Unterschiede zwischen Trächtigkeit und Nichtträchtigkeit recht gut erhalten blieben. Dabei war das entsprechende Signal-Rausch-Verhältnis zwischen Trächtigkeit und Grundniveau bei der einmaligen Elution mit 100%-igem Methanol (RP18 Testverfahren) größer als bei der sequentiellen mit 80%-igem gefolgt von 100%-igem Methanol (RP18

Standardverfahren). Die freien und konjugierten Steroide, die nach dem Probenauftrag auf der stationären Phase verblieben (im Durchlauf fanden sich für RP18 Standard und Test durchschnittlich nur 0,3 % [P4-EIA] bzw. 0,1 % [5α-P-EIA] der im Ursprungsextrakt gemessenen Konzentration), wurden im Waschschritt mit Tris-Puffer (mit 20 % Methanol) nur zu einem geringen Teil herunter gewaschen (im aufgefangenen Puffer fanden sich für RP18 Standard bzw. Test durchschnittlich lediglich 5,3 % bzw. 5,2 % [P4-EIA] bzw. 6,2 % und 4,7 % [5α-P-EIA] der im Ursprungsextrakt gemessenen Konzentration). Durchschnittlich wurden circa 60 % der Hormonmenge des Ursprungsextrakts wieder eluiert (für RP18 Standard- bzw. Testverfahren 62 ± 26 % bzw. 56 ± 18 % [P4-EIA] bzw. 66 ± 24 % und 60 ± 12 % [5α-P-EIA]; alle Angaben als Mittelwert ± Standardabweichung). Die Gründe für das verbleibende Defizit sind unklar, könnten aber in Steroiden liegen, die auf der Säule verblieben.

Da die Verluste im Waschschritt für beide Methoden vernachlässigbar gering waren, die einmalige Elution mit 100%-igem Methanol allerdings schneller war und weniger variable Verluste bewirkte, kann diese abgewandelte Festphasenextraktion (vgl. Kapitel 4.2.2.3) zur Reinigung der Extrakte von Verunreinigungen vor der Durchführung einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) angewandt werden.

5.2 Beurteilung der verschiedenen Enzymimmunoassays

Wie bereits in Kapitel „2.3 Gonadale Steroidhormone“ ausgeführt wurde, scheiden verschiedene Spezies verschiedene Steroidmetaboliten mit dem Kot aus. Zusätzlich kreuzreagieren die in den Enzymimmunoassays verwendeten, gegen das native Steroid generierten Antikörper in unterschiedlichem Maße mit den diversen unbekannten Steroidmetaboliten (vgl. Kapitel 4.2.3.3). Daher ist eine Validierung verschiedener Tests für jede Art unabdingbar.

5.2.1 Gestagentests zum Monitoring der Lutealfunktion

Zum Monitoring der Lutealfunktion werden EIAs zum Nachweis von Gestagenen verwendet. In dieser Studie wurden initial drei Gestagen-Tests geprüft – der Progesteron- (P4), der Pregnandiol- (PD) und der 5α-Pregnanolon- (5α-P) EIA. Der PD-EIA erwies sich bereits im Vortest (vgl. Kapitel 5.1) als ungeeignet, da hier die

Werte aller Proben annähernd gleich hoch waren und so eine Differenzierung zwischen Proben aus Trächtigkeit und Nichtträchtigkeit unmöglich war. Da solch eine Einschätzung für die zwei verbliebenen Tests nicht ebenso eindeutig zu treffen war, wurden zwei Trächtigkeiten anhand beider EIAs untersucht (Abbildung 6 und Abbildung 7).

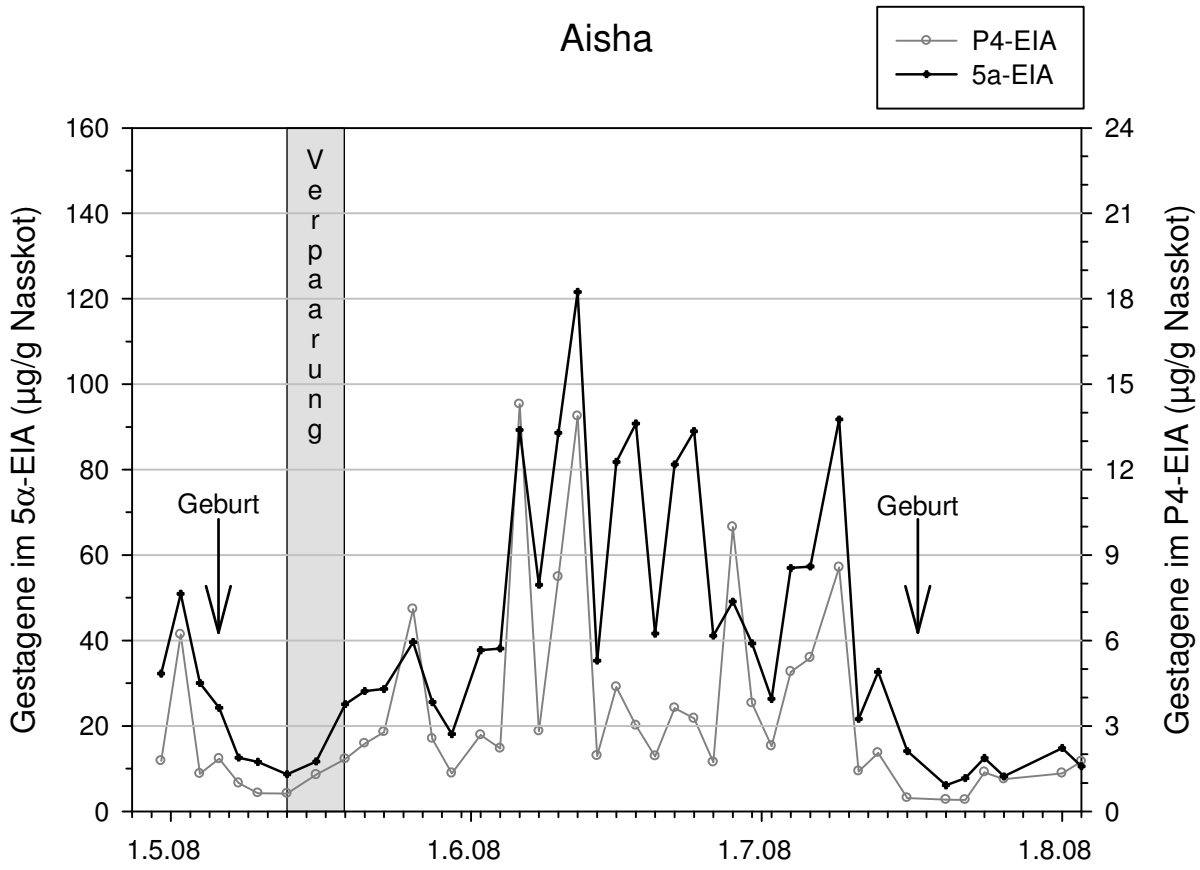


Abbildung 6: Verlauf der Gestagenkonzentrationen für zwei verschiedene Enzymimmunoassays (Progesteron- (P4) bzw. 5α-Pregnanolon- (5α-P) EIA) während einer Trächtigkeit bei der Sandkatze Aisha.

Das Signal-Rausch-Verhältnis von Trächtigkeit zu Grundniveau, insbesondere das der Spitzenwerte, war für den P4-EIA und den 5α-P-EIA annähernd gleich. Mit dem 5α-P-EIA wurden jedoch gleichmäßiger hohe Gestagenkonzentrationen während der Trächtigkeit gemessen, was die Diagnose einer solchen wesentlich erleichtert. Daher wurde das Reproduktionsmonitoring der Sandkatzen mit dem 5α-P-EIA durchgeführt, der auch eine große Kreuzreaktivität zu P4 aufweist (vgl. Kapitel 4.2.3.3). Obwohl mit dem 5α-P-EIA viel höhere Gestagenkonzentrationen gemessen wurden als mit dem P4-EIA, kann aufgrund seiner hohen Kreuzreaktivität (insbesondere zu 5α-Pregnan-3α-ol-20-on mit 650 % im Gegensatz zu 72 % für P4; vgl. Kapitel 4.2.3.3) nicht

automatisch geschlussfolgert werden, dass im Kot größere Mengen anderer Gestagene als Progesteron vorhanden waren. Die wahren Relationen könnten erst nach einer HPLC-Analyse der an den Antikörper bindenden Metaboliten abgeschätzt werden.

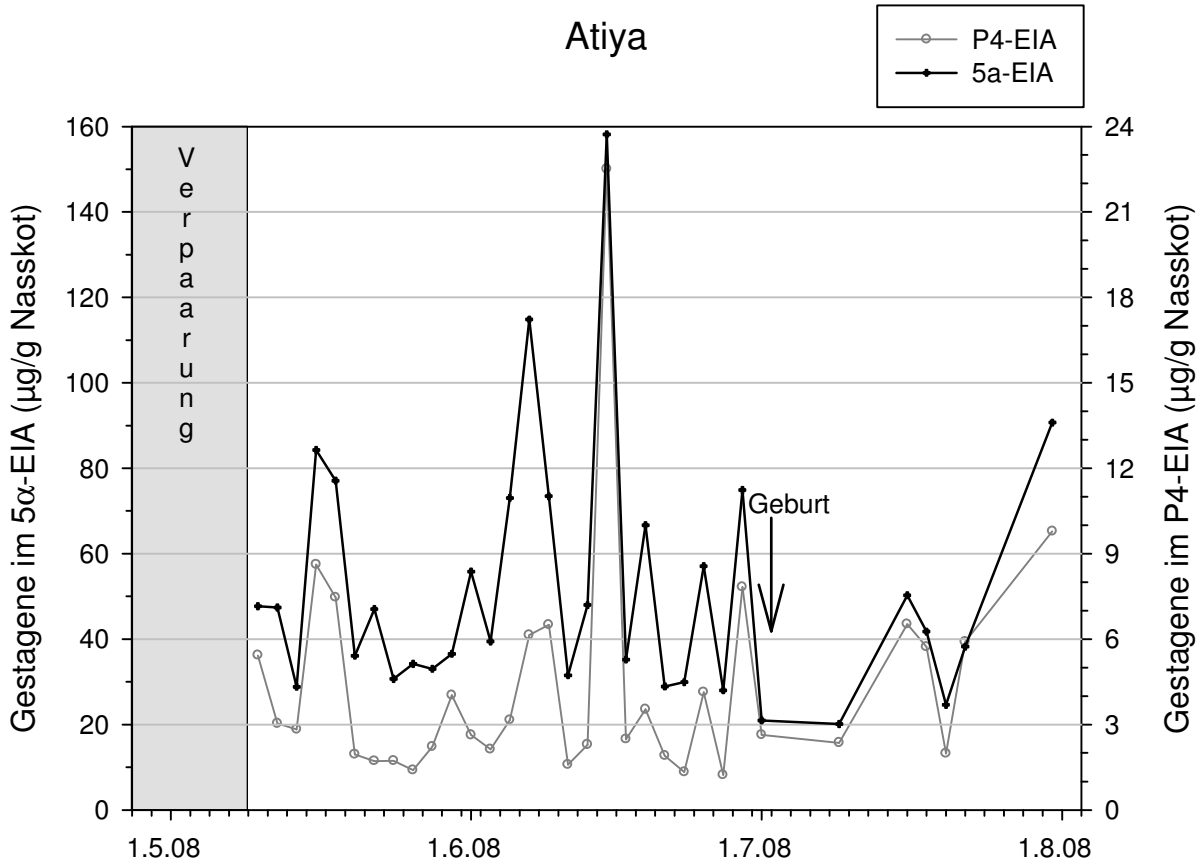


Abbildung 7: Verlauf der Gestagenkonzentrationen für zwei verschiedene Enzymimmunoassays (Progesteron- (P4) bzw. 5α-Pregnanolon- (5α-P) EIA) während einer Trächtigkeit bei der Sandkatze Atiya.

5.2.2 Östrogen- und Androgentests zum Monitoring der Follikelfunktion

Um die Follikelfunktion zu beurteilen, wurde ein Enzymimmunoassay für Gesamtöstrogene durchgeführt, der Östradiol und Östron gleichermaßen erkennt (E2-EIA). Alternativ wurde ein EIA getestet, der auf Antikörpern basierte, die gegen einen Metaboliten der Androgene (Epi-Androsteron) generiert wurden, welche als Vorläufer der Östrogene während der Steroidbiosynthese angesehen werden können (Epi-A-EIA). Der Verlauf der Androgenkonzentrationen, der für Aisha, Felicia und Huni untersucht wurde, lieferte aber keine Hinweise auf eine Follikelaktivität (Daten nicht gezeigt).

5.3 Reproduktionsmonitoring bei Sandkatzen

Für die in Kapitel „4.1 Untersuchte Tiere“ beschriebenen fünf Sandkatzen wurde dementsprechend ein Reproduktionsmonitoring mit Hilfe des 5α-Pregnanolon-EIAs und des Gesamtöstrogen-EIAs durchgeführt. Da diese Studie keine Identifizierung der ausgeschiedenen Hormonmetaboliten mittels HPLC-Immunogramm umfasste, wird im folgenden allgemein von Gestagenen bzw. Gestagenmetaboliten und Östrogenen die Rede sein. Alle im Text angegebenen Konzentrationen entsprechen Mittelwert ± Standardabweichung. In der Diskussion sind die Daten jedoch zum leichteren Vergleich mit Werten anderer Studien als Mittelwert ± Standardfehler aufgeführt. Standardfehler sowie Median sind hier in entsprechenden Tabellen gelistet. Alle Abbildungen sind für den leichteren Vergleich sowohl für die X- als auch für die Y-Achse gleich skaliert.

5.3.1 Gestagene

Der Verlauf der Gestagene spiegelte die Lutealfunktion wider. Die Konzentrationen stiegen nach der Ovulation, ausgelöst durch Verpaarungen, von einem Grundniveau aus an. Dieses belief sich auf durchschnittlich 8,5 ± 2,8 µg/g (Basalniveau der einzelnen Tiere von 6,1 µg/g bis 12,3 µg/g) (Tabelle 8; iterative Berechnung siehe Kapitel 4.3). Die Gestagene wiesen ab einem Zeitpunkt 1-2 Wochen (8-13 Tage) nach der ersten Verpaarung erhöhte Konzentrationen (mindestens fünffaches Grundniveau) von durchschnittlich 30,8-58,9 µg/g auf. Der Faktor des Grundniveaus zur Erhöhung unterschied sich dabei zwischen trächtigen und nicht-trächtigen Lutealphasen nicht wesentlich. Jedoch war die Konzentration mit 58,9 ± 34,8 µg/g bei einer Trächtigkeit mit vier Jungtieren verglichen mit 41,5 ± 21,0 µg/g bei einer mit einem Jungtier beim gleichen Individuum bzw. 45,0 ± 24,9 µg/g bei einem anderen Tier besonders hoch (vgl. Tabelle 8; Abbildung 8, Abbildung 9 und Abbildung 10).

Tabelle 8: Änderungen der Konzentrationen von Gestagenmetaboliten während trächtiger und nicht-trächtiger Lutealphasen gegenüber dem Basalniveau, angegeben als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung, MW ± Standardfehler (in Klammern) und Median.
Konzentrationen galten als erhöht, wenn sie mindestens fünffaches Grundniveau betrugen; für Atiya ließ sich kein Grundniveau berechnen, daher wurde das von Aisha verwendet; die x-fache Erhöhung berechnet sich aus dem Quotienten von erhöhten Konzentrationen zum Basalniveau; die Angaben zu den Tagen, in denen die Konzentrationen erhoben waren (bezogen auf die erste Verpaarung), waren aufgrund fehlender Proben teils unsicher; die Monatsangabe entspricht der die Lutealphase auslösenden Verpaarung

		Basalniveau (µg/g)	**Erhöhte Konz. in der Lutealphase (µg/g)**	**x-fache Erhöhung**	**Tage erhöhter Konz. (post-coitum)**
Trächtige Lutealphasen					
Aisha Mai 08 (4 Jungtiere)	MW	6,5 ± 1,4 (6,5 ± 0,2)	58,9 ± 34,8 (58,9 ± 5,1)	9,1	13-62
	Median	6,6	44,4	6,8	
Aisha April 09 (1 Jungtier)	MW		41,5 ± 21,0 (41,5 ± 3,9)	6,4	? (min. 10) -57
	Median		34,5	5,2	
Atiya April 08 (1 Jungtier)	MW		45,0 ± 24,9 (45,0 ± 3,5)	7,0	? (max. 13) -64
	Median		35,9	5,5	
Nicht-trächtige Lutealphasen					
Felicia Juni 08	MW	6,1 ± 2,0 (6,1 ± 0,2)	42,6 ± 19,7 (42,6 ± 4,5)	6,9	8-30
	Median	5,8	39,7	6,9	
Felicia Dez. 08	MW		46,7 ± 16,2 (46,7 ± 4,9)	7,6	? (max. 11) -31
	Median		44,1	7,6	
Felicia März 09	MW		30,8 ± 12,6 (30,8 ± 2,7)	5,0	10-31
	Median		30,2	5,2	
Ohne Lutealphasen					
Wis	MW	12,3 ± 3,9 (12,3 ± 0,6)			
	Median	12,2			
Huni	MW	9,0 ± 2,2 (9,0 ± 0,5)			
	Median	8,5			
Durchschnitt aller Individuen					
	MW	8,5 ± 2,8 (8,5 ± 1,4)			
	Median	8,3 ± 2,8 (8,3 ± 1,4)			

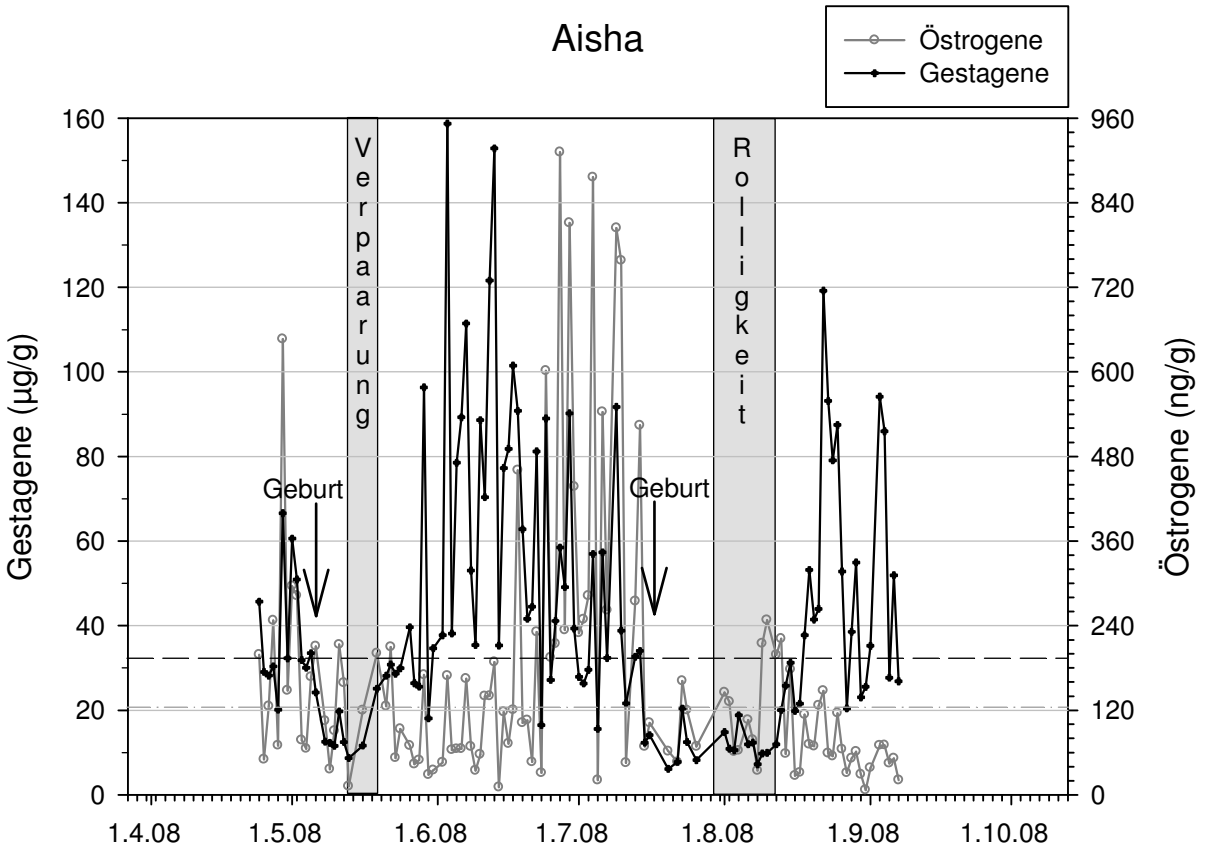


Abbildung 8: Profil der fäkalen Gestagene und Östrogene bei Aisha während einer Trächtigkeit, bei der vier Jungtiere geboren wurden und einer spontanen, nicht-trächtigen Lutealphase (nach beiden eingezeichneten Geburten verlor sie die Jungtiere).
Die gestrichelte schwarze Linie gibt die 5*Grundniveau-Schwelle für die Gestagene an und die graue die 2*Grundniveau-Schwelle der Östrogene.

Im Einzelnen wurde im Sommer 2008 bei Aisha eine komplette Trächtigkeit untersucht (Abbildung 8; 13.5.-17.7.2008). Diese folgte bereits eine Woche nach der vorigen Geburt, bei der sie beide Jungtiere sofort verlor. Die Konzentrationen der Gestagenmetaboliten stiegen daher kurz nach den Verpaarungen, ausgehend von einem Basalniveau von 6,5 ± 1,4 µg/g, wieder an, um ab dem 13. Tag post-coitum auf einem relativ konstanten, hohen Level von 58,9 ± 34,8 µg/g zu verbleiben. Die Rückkehr der Konzentrationen zum Grundniveau erfolgte am 63. post-coitalen Tag. Die vier Jungtiere dieser Trächtigkeit wurden zwei Tage später geboren. Eine erneute Trächtigkeit Aishas trat im Sommer 2009 ein, für die zu großen Teilen ebenfalls Kotproben gesammelt wurden (Abbildung 9; 5.4.-11.6.2009). Während dieser stiegen die Gestagene nur auf ein durchschnittliches Niveau von 41,5 ± 21,0 µg/g. Der Anstieg war in diesem Fall aufgrund fehlender Proben nicht bestimmbar, die Konzentrationen überschritten jedoch bis zum neunten post-coitalen

Tag den festgelegten Grenzwert des fünffachen Grundniveaus nicht. Der Abfall erfolgte am 58. Tag nach der ersten Verpaarung, was neun Tagen vor der Geburt entsprach. Nach 67 Tagen Tragzeit warf sie so ein Jungtier.

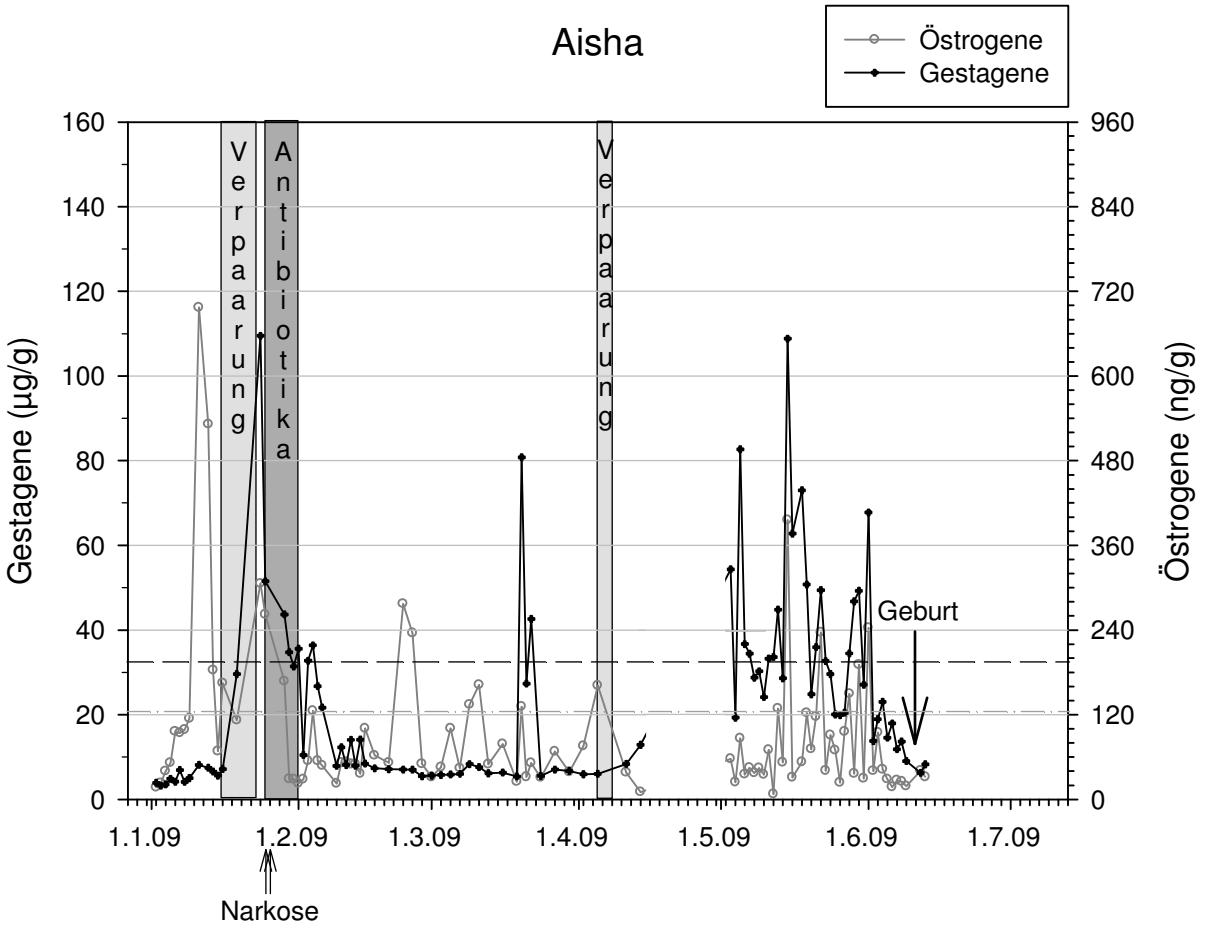


Abbildung 9: Profil der fäkalen Gestagene und Östrogene bei Aisha, die im Anschluss an Verpaarungen Ende Januar 09 eine schwere Krankheit erlitt, die durch Antibiotika und Narkosen behandelt werden musste, die dann aber nach einem erneuten Zuchtversuch Mitte Juni ein Jungtier warf (zu den gestrichelten Linien siehe Abbildung 8).

Eine dritte Trächtigkeit aus dem Sommer 2008 wurde bei Atiya analysiert (Abbildung 10; 27.4.-2.7.2008). Für diese begann die Beprobung erst nach der relativ langen Paarungsphase. Das konstant hohe Gestagenniveau von 45,0 ± 24,9 µg/g war somit am 13. Tag post-coitum bereits erreicht und fiel erst wieder einen Tag vor der Geburt, 65 Tage post-coital, unter den Schwellenwert, der in diesem Fall von Aisha übernommen wurde, da hier keine Bestimmung eines Basalniveaus möglich war.

Auch nach der Geburt bei Atiya, bei der sie ein Jungtier warf, wurden mit Konzentrationen von 42,3 ± 29,5 µg/g (SEM = 4,6; Median = 34,1) vermehrt Gestagene gemessen (Abbildung 10), die auch vermutlich über die Laktation hinaus

anhielten. So zeigte sich beim Monitoring einer weiteren Woche 9,5 Monate nach der Geburt und eines weiteren Monats 11 Monate nach der Geburt (Daten nicht gezeigt) der gleiche Verlauf wie direkt nach der Geburt während der Laktation. Zu diesen Zeiten war die Katze weiterhin mit ihrem Jungtier zusammen, Säugeverhalten wurde aber zumindest nicht mehr beobachtet.

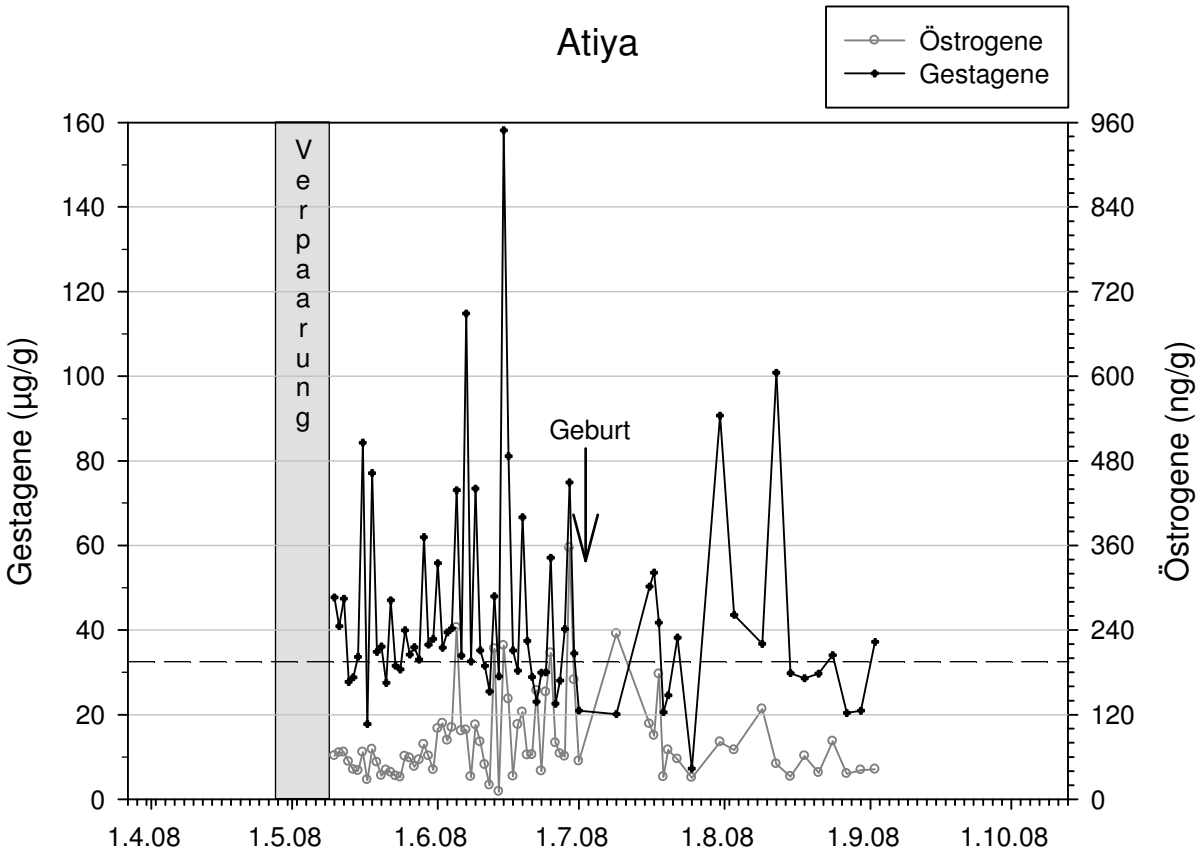


Abbildung 10: Profil der fäkalen Gestagene und Östrogene bei Atiya über eine Trächtigkeit mit einem geborenen Kätzchen und der anschließenden Laktation.
Die gestrichelte schwarze Linie gibt die 5*Grundniveau-Schwelle für die Gestagene an, die in diesem Fall von Aisha übernommen wurde, da hier keine Bestimmung des Basallevels möglich war.

Der große Unterschied zwischen Trächtigkeit und nicht-trächtiger Lutealphase, die auch Scheinträchtigkeit genannt wird, bestand im Zeitpunkt der Rückkehr zum Basalniveau, welche bei den Trächtigkeiten am 58., 63. und 65. Tag nach der ersten Verpaarung, respektive neun, zwei und einen Tag(e) vor der Geburt, erfolgte. Im Gegensatz dazu sanken die Gestagenkonzentrationen während der Scheinträchtigkeit bereits circa nach der Hälfte der Zeit, nach 31 und 32 Tagen post-coitum (vgl. Abbildung 8, Abbildung 9 und Abbildung 10 mit Abbildung 11).

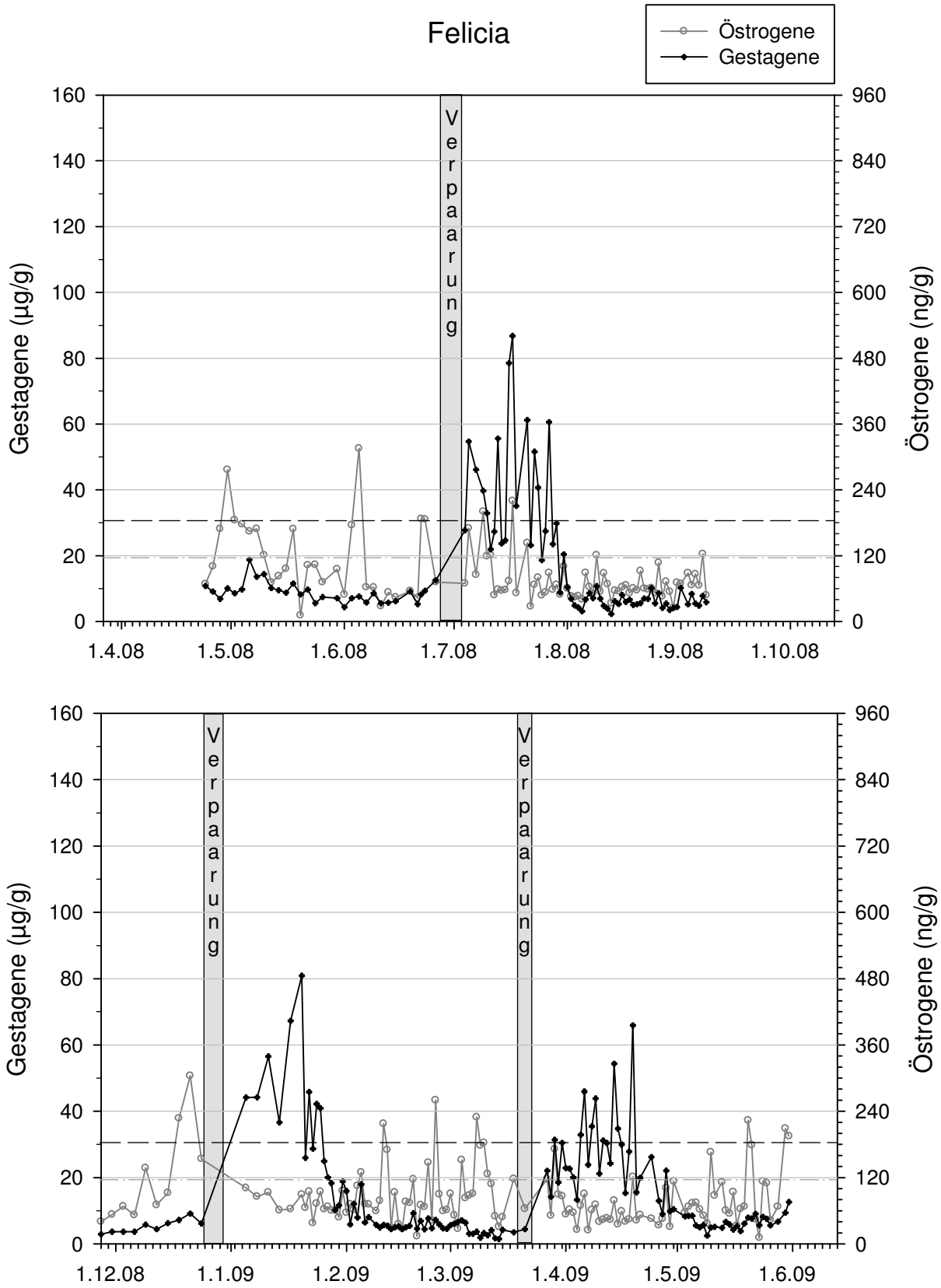


Abbildung 11 (a) (oben) und **(b)** (unten): Profile der fäkalen Gestagene und Östrogene bei Felicia über drei nicht-trächtige Lutealphasen (zu den gestrichelten Linien siehe Abbildung 8).

Diese nicht-trächtigen Episoden stammten aber alle von einem einzigen Tier. Für alle drei Lutealphasen zeigte sich dabei der gleiche Ablauf (Abbildung 11 (a) und (b)): Die Gestagenkonzentrationen stiegen nach den Verpaarungen von einem Grundniveau von 6,1 ± 2,0 µg/g bis zum achten bis zehnten Tag post-coitum an und blieben bis zum 30. bzw. 31. Tag erhöht, um dann steil abzufallen. Die Konzentrationen während dieser Lutealphasen betrugen im Sommer 2008 42,6 ± 19,7 µg/g, im Winter 2008/09 46,7 ± 16,2 µg/g und im Frühjahr 2009 30,8 ± 12,6 µg/g (vgl Tabelle 8).

Eine weitere nicht-trächtige Lutealphase mit gesteigerten Gestagenleveln trat bei Aisha auf (Abbildung 8; 30.7.-7.9.2008). Die Konzentrationen erreichten hier nach einer besonders langen und heftigen Rolligkeit einen mittleren Wert von 56,1 ± 28,7 µg/g (SEM = 6,6; Median = 51,9 µg/g) und blieben mindestens 20 Tage erhöht. Der exakte Zeitpunkt des Abfalls war nicht definierbar, da an dieser Stelle die Probensammlung vorerst endete. Diese Lutealphase wurde im Gegensatz zu denen bei Felicia allerdings nicht durch die Ovulation in Folge von Verpaarungen ausgelöst, sondern erfolgte spontan. Die Katze war zu keiner Zeit mit einem Kater zusammen, wurde aber in einem Gehege zwischen zwei Männchen gehalten.

Eine kürzere Phase (8. bis 19. Tag nach der ersten Verpaarung) hoher Gestagen-konzentrationen folgte einem neuerlichen Zuchtversuch mit Aisha im Januar 2009, der mit einer schweren Krankheit einherging, die mit Antibiotika und zweimaliger Narkose behandelt werden musste (Abbildung 9; 16.1.-5.2.2009). Das durchschnittliche Niveau während dieser Phase betrug 42,9 ± 27,3 µg/g (SEM = 9,1; Median = 35,6 µg/g).

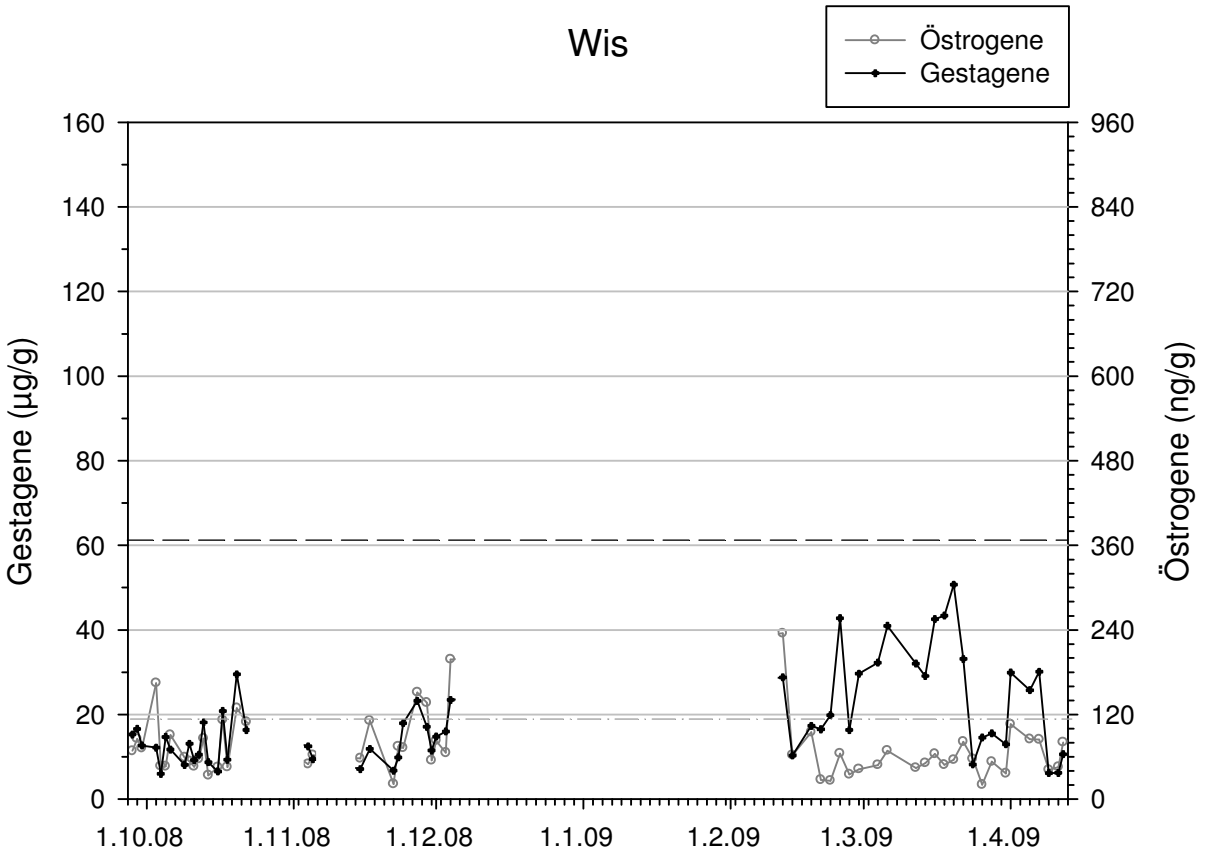


Abbildung 12: Profil der fäkalen Gestagene und Östrogene bei Wis, einem Weibchen, das permanent mit einem Kater zusammen gehalten wurde, dabei aber keinerlei Verhaltensweisen zeigte, die normalerweise im Zusammenhang mit Östrus stehen (zu den gestrichelten Linien siehe Abbildung 8).

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Fällen wiesen weder das Sandkatzenweibchen Wis, das keine Östrusanzeichen aufzeigte und bei dem keine Verpaarung beobachtet wurde (Abbildung 12), noch das Weibchen Huni, welches solitär gehalten wurde (Abbildung 13), eindeutig identifizierbare Phasen lutealer Aktivität auf. Das Monitoring von Wis zeigte einen Zeitraum (24.2.-22.3.2009), in dem die Gestagenlevel im Vergleich zum Rest leicht erhöht schienen (mit einem Spitzenwert von 50,1 µg/g). Allerdings erfüllte keiner der Werte die Bedingung nach einer fünffachen Steigerung über das Basalniveau hinaus. Dieses war allerdings mit 12,3 ± 3,9 µg/g höher als das der anderen Tiere (6,1 ± 2,0 µg/g und 6,5 + 1,4 µg/g).

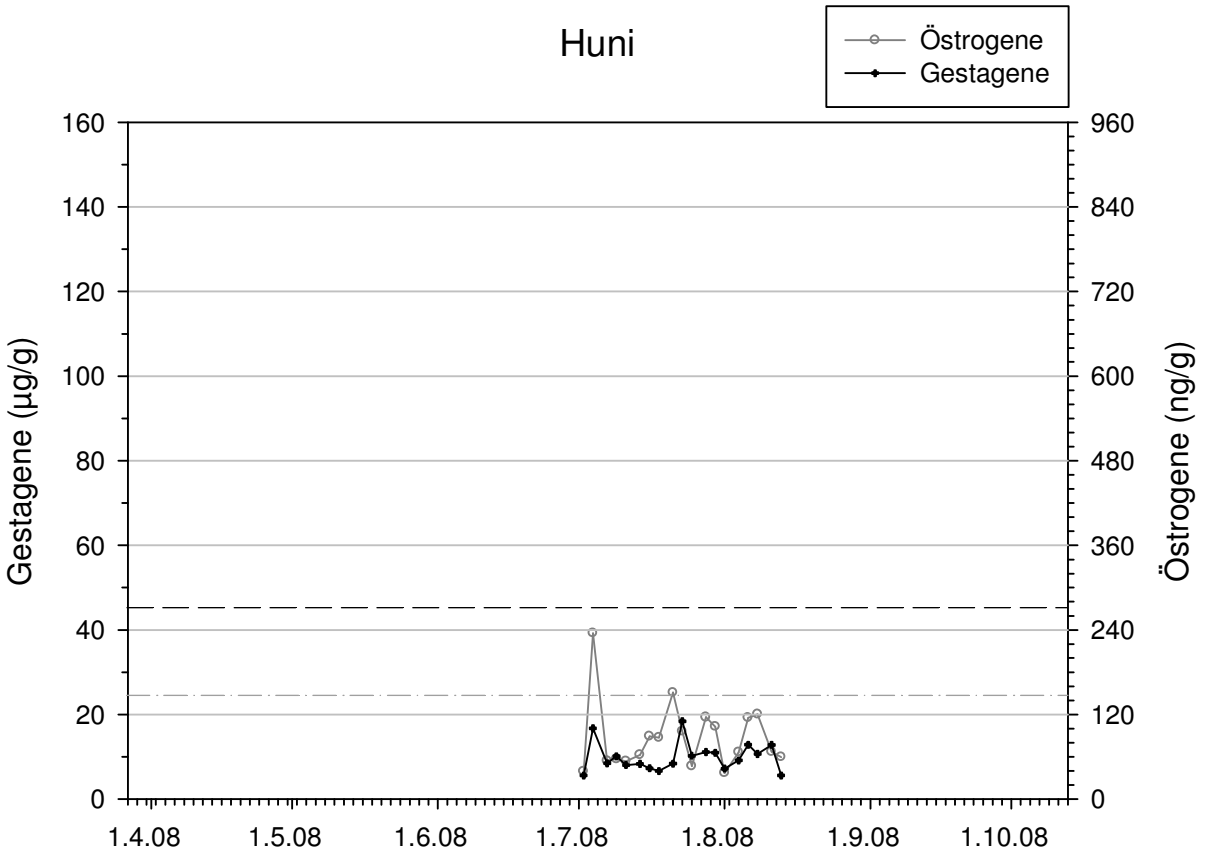


Abbildung 13: Profil der fäkalen Gestagene und Östrogene bei Huni, einem Sandkatzenweibchen, das ohne Männchen gehalten wurde (zu den gestrichelten Linien siehe Abbildung 8).

Die Profile der scheinträchtigen Sandkatzen ergaben übereinstimmend einen Abfall der Gestagenkonzentrationen am 30. oder 31. Tag nach der ersten Verpaarung, was circa der Hälfte der Tragzeit entspricht. Dagegen unterschieden sich die Konzentrationen während einer Trächtigkeit zwischen erster und zweiter Trächtigkeitshälfte nicht. Dieses Ergebnis bestätigte der Mann-Whitney-U-Test, welcher für alle Scheinträchtigkeiten einen hochsignifikanten Unterschied der gemessenen Gestagenkonzentrationen zwischen der ersten und der zweiten Hälfte ergab ($p<0,005$) (Abbildung 14, rechte Hälfte). Dabei beliefen sich die Konzentrationen der ersten Hälfte auf 28,8-41,2 µg/g und die der zweiten Hälfte auf 6,2-8,2 µg/g (Tabelle 9). Für die Trächtigkeiten fand sich kein solcher Unterschied ($p>0,05$) (Abbildung 14, linke Hälfte). Die Konzentration an Gestagenen betrug im Mittel in der ersten Trächtigkeitshälfte 33,2-60,2 µg/g und in der zweiten 34,1-47,3 µg/g.

In diesem Zusammenhang ist allerdings noch auf die teilweise serielle Korrelation (Autokorrelation, Box-Ljung-Statistik, $p<0,05$) der Daten hinzuweisen, die zu einer potentiellen Unterschätzung der p-Werte führen kann. Dies bedeutet, dass die Statistik möglicherweise einen Unterschied bestätigt, der keiner ist, wenn die Daten wie in dieser Verlaufsstudie jeweils von den Werten der vorhergehenden Tage abhängen. Da die p-Werte allerdings 0,005 unterschritten, sollte der signifikante Unterschied für die Scheinträchtigkeiten erhalten bleiben.

Tabelle 9: Gegenüberstellung der mittleren Gestagenkonzentrationen der ersten und zweiten Hälften bei Trächtigkeiten und Scheinträchtigkeiten; angegeben sind jeweils Mittelwert (MW) ± Standardabweichung, MW ± Standardfehler (in Klammern) und Median

		Gestagenkonzentrationen (µg/g)	
		1. Hälfte	**2. Hälfte**
Trächtigkeiten			
Aisha Mai 08 (4 Jungtiere)	MW	60,2 ± 41,0 (60,2 ± 7,9)	47,3 ± 26,8 (47,3 ± 5,1)
	Median	38,1	40,2
Aisha April 09 (1 Jungtier)	MW	33,2 ± 21,7 (33,2 ± 6,9)	34,1 ± 22,4 (34,1 ± 4,1)
	Median	29,5	29,1
Atiya April 08 (1 Jungtier)	MW	41,2 ± 15,8 (41,2 ± 3,3)	47,1 ± 30,1 (47,1 ± 5,5)
	Median	36,1	35,2
Scheinträchtigkeiten			
Felicia Juni 08	MW	38,4 ± 19,7 (38,4 ± 4,0)	6,2 ± 2,2 (6,2 ± 0,4)
	Median	31,4	5,8
Felicia Dez. 08	MW	41,2 ± 17,9 (41,2 ± 4,8)	7,5 ± 3,9 (7,5 ± 0,7)
	Median	41,6	5,7
Felicia März 09	MW	28,8 ± 12,6 (28,8 ± 2,5)	8,2 ± 5,2 (8,2 ± 1,0)
	Median	26,1	6,7

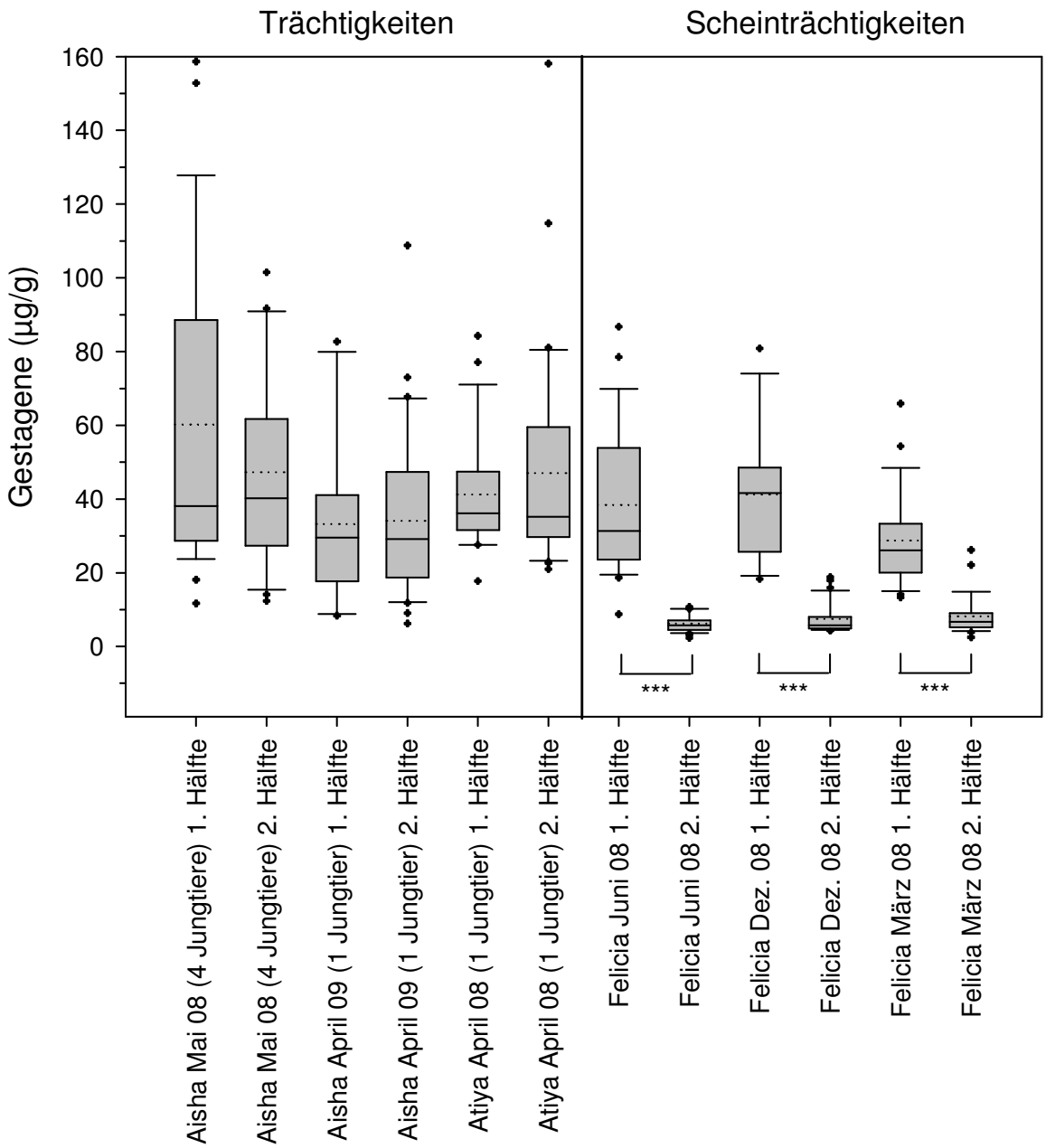


Abbildung 14: Gestagenkonzentrationen in den verschiedenen Hälften bei Trächtigkeiten und Scheinträchtigkeiten unter Angabe der Signifikanzniveaus (Mann-Whitney-U-Test); die durchgehenden Linien repräsentieren die Mediane, die gepunkteten die Mittelwerte; die Boxen umfassen die mittleren 50% der Daten (25. bis 75. Perzentil), die Whisker geben das 10. bzw. 90. Perzentil an, Punkte markieren Ausreißer.

5.3.2 Östrogene

Die Bestimmung von Bereichen erhöhter Östrogene, die mit dem Östrus korreliert sein könnten, war nicht eindeutig zu treffen, da diese einerseits teils stark schwankten und andererseits Werte, die im Zusammenhang mit Verpaarungen

standen, häufig niedriger waren als andere, bei denen keine Östrusanzeichen beobachtet wurden (siehe z. B. Abbildung 11). Die Probensammlung kurz vor und während der Verpaarungen war jedoch sehr lückenhaft, so dass es nicht unwahrscheinlich ist, dass die für andere Katzenarten beschriebenen, mit dem Östrus korrelierenden Östrogenmaxima, die nur ein bis zwei Tage andauern, verpasst wurden. Einen Hinweis darauf lieferte die Detektion eines ausgeprägten Östrogenpeaks vor einer Verpaarung von Aisha (Abbildung 9; 11.-13.1.2009). Bei fast allen anderen Verpaarungen fehlten diese letzten Tage vor dem Coitus, aber auch während der Verpaarungsphase lagen kaum Kotproben vor, so dass an dieser Stelle ebenfalls hohe Östrogenkonzentrationen nicht bemerkt worden wären.

Durch die iterative Berechnung (siehe Kapitel 4.3) eines Basalniveaus war es trotzdem möglich, Phasen erhöhter Östrogene zu bestimmen, die dieses um das Zweifache überstiegen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt. Für Atiya erfolgte diese Analyse nicht, weil sie über den gesamten Untersuchungszeitraum hohe Gestagenwerte ausprägte. Das Basalniveau der anderen vier Sandkatzen lag zwischen 57,4 ng/g und 74,8 ng/g, von dem aus sich die Östrogene im Mittel um das 2,6- bis 3,8-fache auf 169,1-232,3 ng/g erhoben (Tabelle 10). Das durchschnittliche Intervall zwischen zwei Östrogenmaxima, die nicht durch eine Lutealphase getrennt waren, betrug 14,5 Tage. Dieses konnte allerdings nur in wenigen Fällen bestimmt werden.

Die meisten Östrogenmaxima, für welche die Berechnung dieses Intervalls möglich war, traten bei Felicia vor einer Verpaarung (Abbildung 11 (a); Mai/Juni 2008) und nach dem Ende der Lutealphasen auf (Abbildung 11 (b); Februar/März sowie Mai 2009). Die gesteigerten Östrogenwerte, die per Definition mindestens das Zweifache des Basalniveaus übersteigen sollten (gestrichelte graue Linie in den Abbildungen), taten dies im Mittel um das 3,1-fache mit durchschnittlichen Konzentrationen von 185,5 ± 49,6 ng/g (vgl. Tabelle 10). Die Periode zwischen den Maxima variierte zwischen 10 und 20 Tagen. Auch während der Lutealphase traten zeitweise erhöhte Östrogene auf (Abbildung 11 (a); Juli 2008).

Wie bei Felicia folgten bei Aisha nach Beendigung einer nicht-trächtigen Lutealphase Bereiche erhöhter Östrogenwerte aufeinander, die durch 9-16 Tage niedrigerer Konzentrationen getrennt waren (Abbildung 9; Ende Februar bis Anfang April 2009).

Zu Beginn dieser Lutealphase wurde ein ausgeprägter Östrogenpeak detektiert (Abbildung 9; 11.-13.1.2009), welcher sich bis auf 697,0 ng/g erhob, was dem 11,3-fachen des Basalniveaus entsprach. Durchschnittlich wuchsen die Östrogenkonzentrationen jedoch um das 3,8-fache auf 232,3 ± 138,0 ng/g an.

Sowohl bei Aisha (Abbildung 8 und Abbildung 9) als auch bei Felicia (Abbildung 11 (a) und (b)) überschritten die Östrogenkonzentrationen um den Zeitpunkt der Verpaarungen das Zweifache des individuellen Grundniveaus. Diese Erhöhung war allerdings teilweise weniger stark ausgeprägt als die vorangegangenen Maximalwerte.

Ebenso waren die Östrogenkonzentrationen während einer beobachteten Rolligkeit, in der keine Verpaarung stattfand, bis zum 4,0-fachen des Grundniveaus erhöht (Abbildung 8; Anfang August 2008).

Tabelle 10: Mittlere Östrogenkonzentrationen für das Basalniveau und Bereiche erhöhter Konzentrationen, die durch die Überschreitung des zweifachen Basalniveaus definiert waren (Peaklevel) angegeben als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung, MW ± Standardfehler (in Klammern) und Median; die x-fache Erhöhung berechnet sich aus dem Quotienten von Spitzenwert zu Basalniveau; das Intervall zwischen Ösrogenmaxima wird bestimmt durch den Bereich zwischen dem Höchstwert einer Episode erhöhter Konzentrationen und jenem der nächsten

		Basalniveau (ng/g)	**Peaklevel (ng/g)**	**x-fache Erhöhung**	**Intervall zwischen Östrogenmaxima (Tage)**
Aisha	MW	61,6 ± 29,2 (61,6 ± 4,2)	232,3 ± 138,0 (232,3 ± 30,1)	3,8	16, 9, 16
	Median	51,9	198,6	3,8	
Felicia	MW	59,6 ± 18,8 (59,6 ± 1,7)	185,5 ± 49,6 (185,5 ± 8,6)	3,1	10, 10, 12, 13, 14, 17, 18, 20
	Median	60,3	177,1	2,9	
Wis	MW	57,4 ± 18,9 (57,4 ± 2,8)	169,1 ± 40, 5 (169,1 ± 16,5)	2,9	17
	Median	55,8	158,0	2,8	
Huni	MW	74,8 ± 27,6 (74,8 ± 6,7)	193,3 ± 59,6 (193,3 ± 42,1)	2,6	17
	Median	66,7	193,3	2,9	
Durchschnitt	MW	63,3 ± 7,8 (63,3 ± 3,9)	195,1 ± 26,8 (195,1 ± 13,4)	3,1 ± 0,5 (3,1 ± 0,2)	14,5 ± 3,5 (14,5 ± 1,0)
	Median	58,7 ± 6,3 (58,7 ±3,2)	181,7 ± 18,3 (181,7 ± 9,2)	3,1 ± 0,5 (3,1 ± 0,2)	

Die beiden Sandkatzenweibchen Wis (Abbildung 12) und Huni (Abbildung 13) wiesen ebenfalls einige Tage erhöhter Östrogenkonzentrationen auf (169,1 ± 40,5 ng/g bzw. 193,3 ± 59,6 ng/g), die um das 2,9- bzw. 2,6-fache über dem jeweiligen Basalniveau lagen. Das Intervall zwischen zwei aufeinanderfolgenden solchen Phasen betrug jeweils einmal 17 Tage. Aufgrund der kurzen zusammenhängenden Untersuchungszeiträume und dem Fakt, dass bei beiden Weibchen kein Östrusverhalten beobachtet wurde, können jedoch keine weiteren Aussagen getroffen werden.

Neben diesen Episoden vermehrter Östrogene traten in der zweiten Trächtigkeitshälfte höhere Konzentrationen als in der ersten Hälfte auf (Mann-Whitney-U-Test, $p<0,005$; Abbildung 15). Ein solcher Unterschied konnte für Aishas Trächtigkeit Mitte 2009 zwar statistisch nicht bestätigt werden (U-Test, $p=0,089$), für deren erste Hälfte lagen allerdings auch nur zehn Proben vor (Abbildung 9). Während der Scheinträchtigkeiten trat kein vergleichbarer Unterschied der gemessenen Östrogenwerte auf (U-Test, $p>0,05$; Abbildung 15). Auch hier muss wieder die potentielle Unterschätzung der p-Werte aufgrund der seriellen Korrelation (Autokorrelation, Box-Ljung-Statistik, $p<0,05$) beachtet werden (siehe das vorige Kapitel 5.3.1.). Auch hier dürfte aufgrund des p-Wertes unter 0,005 der bestätigte Unterschied bestehen bleiben.

Die Östrogenkonzentrationen für die jeweils erste und zweite Hälfte sind für alle Trächtigkeiten und Scheinträchtigkeiten in Tabelle 11 aufgeführt. Sie stiegen in allen drei untersuchten Trächtigkeiten zwischen dem 35. und 38. Tag post-coitum an, verblieben auf einem erhöhten Level und fielen letztendlich ein bis neun Tage vor der Geburt wieder zum Grundniveau hin ab (siehe Abbildung 8, Abbildung 9 und Abbildung 10). Während der Trächtigkeiten erreichten die Werte der zweiten Hälfte dabei im Mittel das 2,1- bis 3,5-fache der Werte der ersten Hälfte, wobei eine Steigerung um den Faktor 3,5 (340,7 ng/g gegenüber 96,2 ng/g) bei Aishas Trächtigkeit mit vier Jungtieren (Abbildung 8; Mitte Juni bis Mitte Juli 2008) auftrat und um den Faktor 2,1 (86,4 ng/g gegen 41,3 ng/g bzw. 111,0 ng/g gegen 53,2 ng/g) bei Aishas sowie Atiyas Trächtigkeit mit jeweils einem Jungtier (Abbildung 9 [Mitte Mai bis Mitte Juni 2009] bzw. Abbildung 10 [Juni 2008]; Tabelle 11). Individuelle Differenzen können als Begründung nicht ausgeschlossen werden, erscheinen jedoch als Erklärung nicht wahrscheinlich, weil Aisha in zwei Trächtigkeiten mit

unterschiedlicher Jungtieranzahl beträchtlich unterschiedliche Konzentrationen erreichte. Dies legt eine Abhängigkeit der Östrogenkonzentrationen von der Anzahl der Jungtiere nahe.

Bei den Scheinträchtigkeiten von Felicia wurden während der Lutealphase und nach ihrer Beendigung keine unterschiedlichen Östrogenkonzentrationen gemessen. Während der ersten Phase nach der Verpaarung, welche der ersten Trächtigkeitshälfte entsprechen würde, traten Werte von 64,4-87,9 ng/g auf, danach beliefen sich die Konzentrationen auf vergleichbare Werte von 61,8-77,7 ng/g (Tabelle 11).

Tabelle 11: Gegenüberstellung der mittleren Östrogenkonzentrationen der ersten und zweiten Hälften bei Trächtigkeiten und Scheinträchtigkeiten; angegeben sind jeweils Mittelwert (MW) ± Standardabweichung, MW ± Standardfehler (in Klammern) und Median

		Östrogenkonzentrationen (ng/g)	
		1. Hälfte	**2. Hälfte**
Trächtigkeiten			
Aisha Mai 08 (4 Jungtiere)	MW	96,2 ± 58,5 (96,2 ± 11,3)	340,7 ± 282,1 (340,7 ± 53,3)
	Median	69,7	241,2
Aisha April 09 (1 Jungtier)	MW	41,3 ± 20,1 (41,3 ± 6,4)	86,4 ± 85,5 (86,4 ± 15,6)
	Median	37,7	52,7
Atiya April 08 (1 Jungtier)	MW	53,2 ± 17,4 (53,2 ± 3,6)	111,0 ± 77,1 (111,0 ± 14,1)
	Median	53,3	97,5
Scheinträchtigkeiten			
Felicia Juni 08	MW	87,9 ± 50,3 (87,9 ± 10,3)	61,8 ± 20,0 (61,8 ± 3,5)
	Median	68,1	59,2
Felicia Dez. 08	MW	74,9 ± 18,3 (74,9 ± 4,9)	85,6 ± 53,2 (85,6 ± 9,6)
	Median	70,3	71,8
Felicia März 09	MW	64,4 ± 32,9 (64,4 ± 6,5)	77,7 ± 48,8 (77,7 ± 9,4)
	Median	54,9	63,3

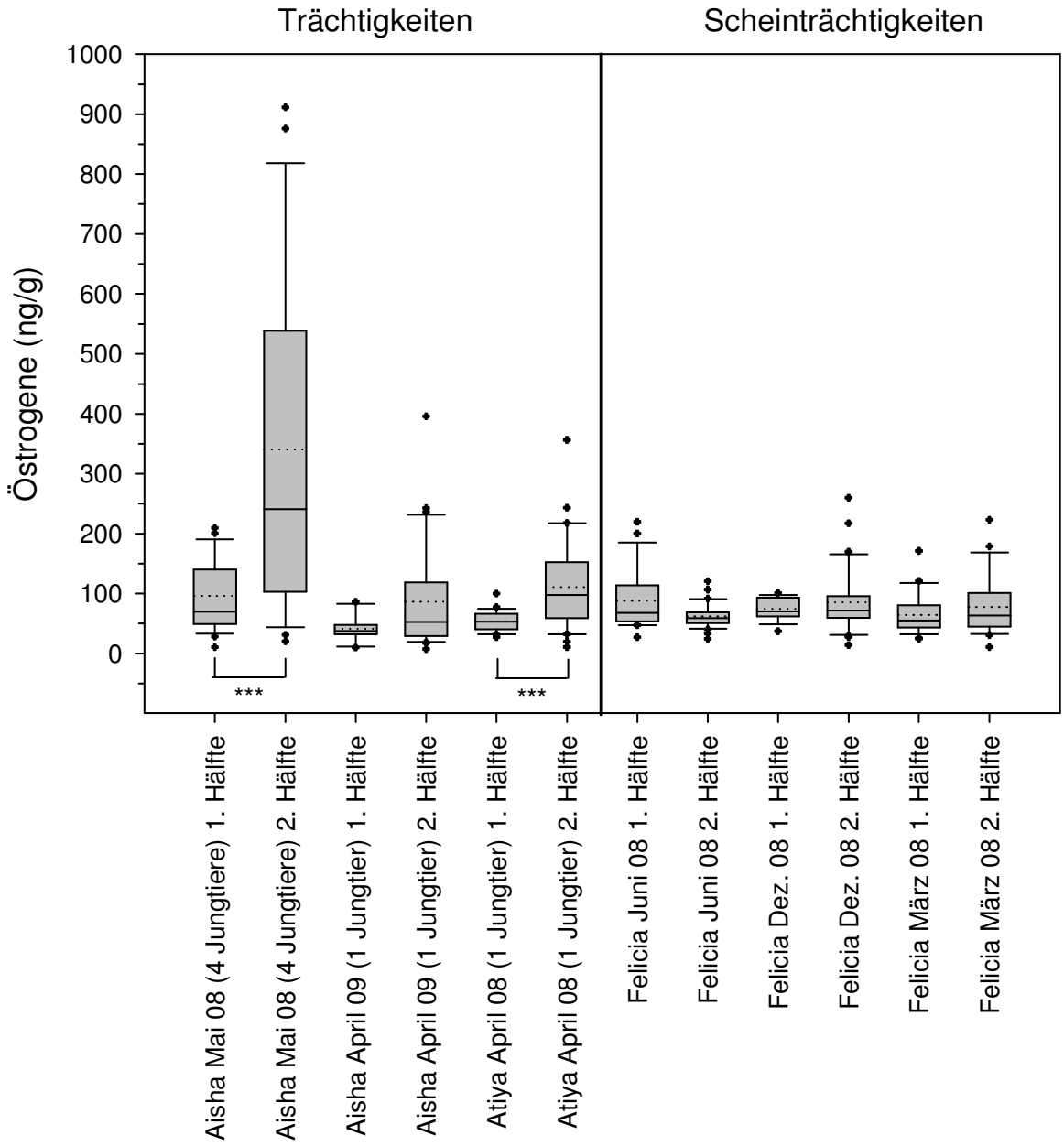


Abbildung 15: Östrogenkonzentrationen in den verschiedenen Hälften bei Trächtigkeiten und Scheinträchtigkeiten unter Angabe der Signifikanzniveaus (Mann-Whitney-U-Test); nähere Erläuterungen siehe Abbildung 14.

5.4 Reproduktionsmonitoring bei Schwarzfußkatzen

Neben der Sandkatze sollte weiterhin für die Schwarzfußkatze als weitere, bisher nicht untersuchte Kleinkatzenart eine Methode zum nicht-invasiven Reproduktionsmonitoring entwickelt werden. Da diese potentiell andere Steroidmetaboliten über den Kot ausscheidet als die Sandkatze wäre eine Validierung der Extraktion und Enzymimmunoassays, wie für die Sandkatze gezeigt, nötig. Diese war nicht realisierbar, da keine eindeutigen Kotproben zu reproduktionsrelevanten Zeiträumen wie Verpaarung und Trächtigkeit vorlagen.

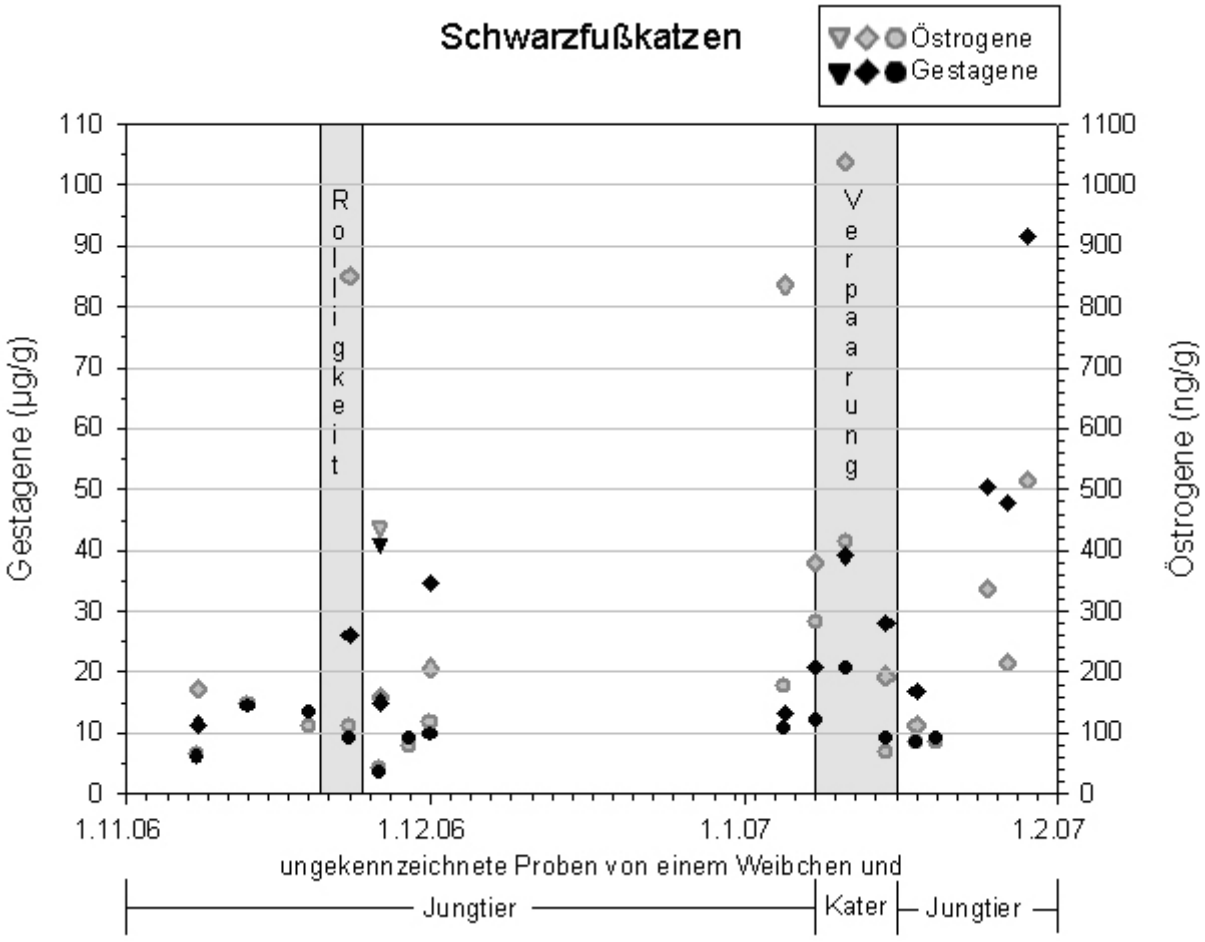


Abbildung 16: Gestagen- und Östrogenkonzentrationen für die einzelnen Proben der Schwarzfußkatzen; zusammengehörige Gestagen- und Östrogenwerte einer Probe eines Tages sind durch gleiche Symbole gekennzeichnet (An verschiedenen Tagen gemessene Werte die durch die gleichen Symbole dargestellt sind, stehen in keinem Zusammenhang.)

Stattdessen handelte es sich bei den zur Verfügung gestellten Kotproben um Sammelproben eines Weibchens zusammen mit ihrem Jungtier bzw. einem Kater, die dementsprechend nicht eindeutig identifizierbar waren. Aus diesem Grund wurden für jeden Tag mehrere Proben analysiert, die an verschiedenen Stellen in den Gehegen aufgenommen wurden. Für die Analyse wurden die gleichen Assays verwendet wie für die Sandkatzen auch.

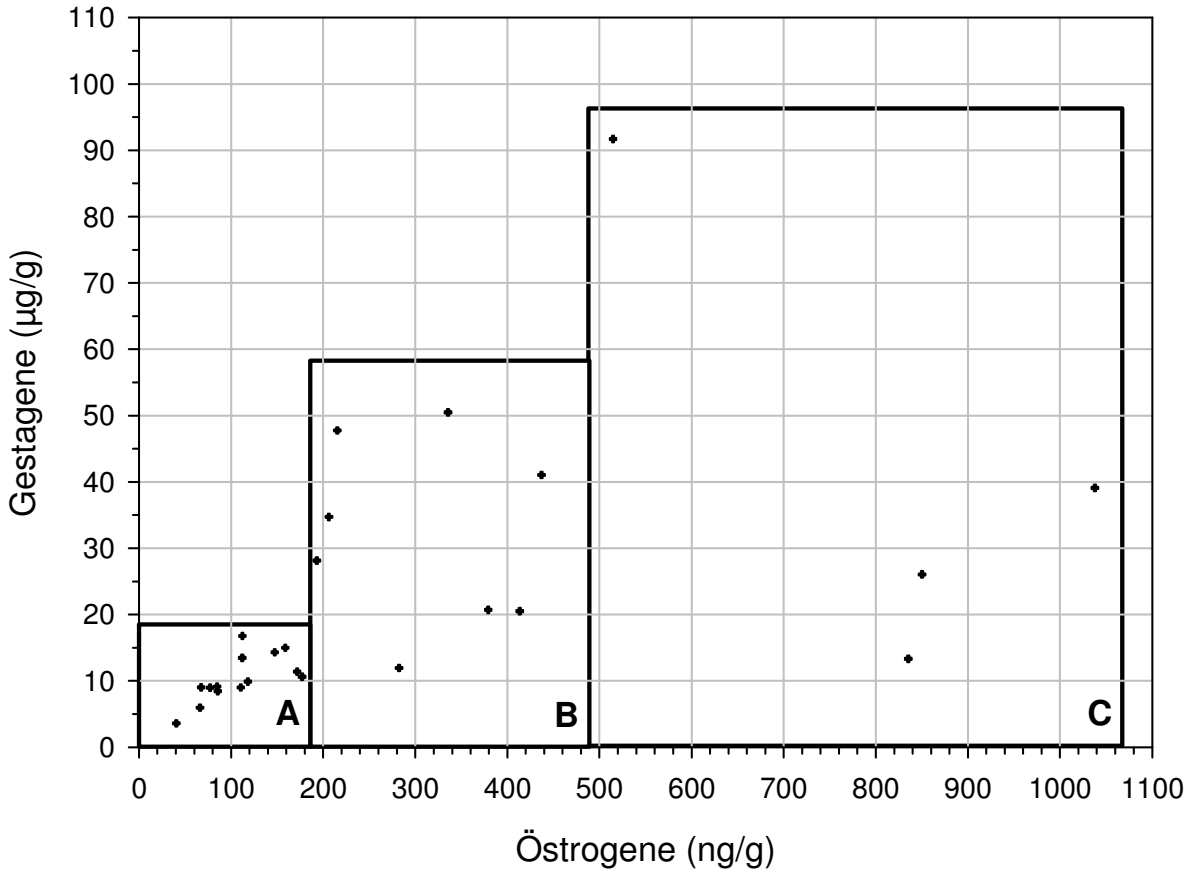


Abbildung 17: Korrelation der Gestagen- und Östrogenkonzentrationen für die Schwarzfußkatzenproben; weitere Erklärungen siehe Text

Der Großteil der Proben enthielt sowohl niedrige Östrogen- als auch Gestagenkonzentrationen und konnte deswegen gar nicht oder nur mit sehr großer Unsicherheit zugeordnet werden (Abbildung 17, Teilbereiche A und B). Diese Kotproben könnten entweder von dem Jungtier oder dem Männchen stammen oder aber niedrige Werte des Weibchens innerhalb der physiologisch möglichen Schwankungen darstellen. Nur bei vier Proben konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Kotprobe des Weibchens geschlossen werden (Abbildung 17, Teilbereich C). Diese wiesen entweder für die Gestagene oder für die Östrogene besonders

hohe Konzentrationen auf. So wurden erhöhte Östrogenkonzentrationen in Proben gemessen, die während einer beobachteten Rolligkeit und kurz vor sowie während einer Verpaarungsperiode gesammelt wurden (835,3, 850,3, und 1038,1 ng/g). Leicht erhöhte Gestagenwerte (34,7-91,7 µg/g) traten in Proben auf, die nach der Rolligkeit und den Verpaarungen gesammelt wurden (Abbildung 16).

Das für die Sandkatze entwickelte Verfahren schien veränderliche Östrogen- bzw. Gestagenwerte im Zusammenhang mit der Follikelfunktion während des Östrus bzw. der Lutealfunktion nach der Ovulation detektieren zu können. Für eine ausreichende Validierung wären allerdings individuell unterscheidbare Kotproben erforderlich.

6 Diskussion

Um den Zuchterfolg bedrohter Katzenarten in ex situ-Populationen zu verbessern, ist es wichtig, die Grundzüge der Reproduktion der entsprechenden Arten zu kennen. Für einige Feliden wurden bereits Methoden zum nicht-invasiven Hormonmonitoring basierend auf Kotproben etabliert, allerdings bestehen mannigfaltige Unterschiede zwischen den Spezies, die sowohl den Ausscheidungsmechanismus (Kot oder Urin) als auch die chemische Struktur der ausgeschiedenen Steroidmetaboliten umfassen, so dass eine Validierung für jede einzelne Spezies unerlässlich ist.

6.1 Validierung der Enzymimmunoassays

Bei der Quantifizierung von Steroiden im Kot erfolgt keine absolute Konzentrationsbestimmung einzelner Metaboliten. Stattdessen werden unbekannte Metaboliten gemessen, die mit dem entsprechenden Antikörper in unterschiedlichem Maße kreuzreagieren. Diese Tests basieren demnach auf der Bestimmung von Immunreaktivitäten. Die genaue Identifizierung der Metaboliten ist allerdings auch gar nicht notwendig, viel wichtiger ist eine biologische Validierung wie in Kapitel „2.5 Hormonmonitoring“ bereits beschrieben. Dementsprechend sollten die Gestagene einen trächtigkeitsspezifischen bzw. allgemein lutealphasenspezifischen Anstieg aufweisen. Die Östrogene hingegen einen östrusspezifischen, der mit Rolligkeiten oder Verpaarungen assoziiert sein müsste. Beides wurde für verschiedene Feliden beschrieben (Brown 2006). Für die Sandkatze haben sich in dieser Studie ein Enzymimmunoassay, der auf einem Antikörper gegen 5α-Pregnan-3β-ol-20-on basierte zur Objektivierung der Lutealaktivität bzw. ein Gesamtöstrogenassay zum Monitoring der Follikelaktivität favorisiert.

Zum Zweck einer möglichen Optimierung der Assays im Hinblick auf eine Steigerung der Sensitivität und zur Charakterisierung der Immunreaktivitäten wurden verschiedene Methoden zur Extraktaufbereitung getestet. Die Dekonjugierung von Steroidmetaboliten durch enzymatische Hydrolyse erbrachte dabei für die Gestagene aufgrund der hierbei auftretenden hohen Verluste keinen Vorteil gegenüber dem Standardverfahren, welches auf der Extraktion mit 90 % Methanol basiert. Dieser Aufbereitungsschritt erschien sinnvoll, da bei einer Ätherextraktion, bei der polare (konjugierte) von unpolaren (freien) Steroiden getrennt werden, in der unpolaren

Ätherphase niedrigere Konzentrationen auftraten als im Originalextrakt. Dies ließ auf eine große Menge konjugierter Steroide schließen, die nach Dekonjugation möglicherweise eine höhere Affinität zum Antikörper aufweisen würden. Dies geschah bei den Gestagenen nicht, was allerdings auch nicht abwegig ist, da die zur Antikörperbildung verwendeten immunogenen Steroidmetaboliten über C3 an BSA gekoppelt waren, an dem auch überwiegend die metabolische Konjugation an Glucuron- oder Schwefelsäure erfolgt. Die Antikörper, die demnach den hinteren Teil des Hormons erkannten (B-, C- und D-Ring), wurden so nicht durch die Bindung von Schwefel- oder Glucuronsäure an C3 behindert. Eine erfolgreiche Lyse wäre möglicherweise bei der Analyse der Östrogene von Vorteil gewesen, weil bei diesen durch die BSA-Kopplung über C17 der vordere Teil des Steroids erkannt wurde, das sich durch eine Konjugation an C3 der Erkennung durch den Antikörper entziehen würde. Dies wurde aber in dieser Studie nicht getestet.

Abgesehen davon war in allen Proben ein hoher Anteil nicht-lysierbarer Gestagenmetaboliten erkennbar, der nach enzymatischer Hydrolyse weiterhin konjugiert vorlag und daher in der wässrigen Phase gefunden wurde. Das Phänomen nicht-lysierbarer Konjugate bei Feliden ist nicht unbekannt. So wurde für die Hauskatze die Ausscheidung von 17β-Östradiol zu annähernd gleichen Teilen als unkonjugiertes Östradiol und als nicht-enzymhydrolysierbare Östrogenkonjugate beschrieben (Brown et al. 1994). In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, dass bei Bengalkatze, Gepard, Nebelparder und Schneeleopard kein natives Progesteron im Kot nachweisbar ist. Dieses wurde gänzlich metabolisiert und über unkonjugierte Pregnane und polare Substanzen, die mutmaßlich ebenfalls nicht-enzymhydrolysierbare Konjugate darstellten, ausgeschieden. Es ist anzunehmen, dass diese Metabolitenkonstellation auch bei der Sandkatze vorlag, genauere Aufschlüsse könnten hierzu allerdings nur HPLC-Analysen liefern, bei denen die an den Antikörper bindenden Metaboliten dargestellt werden (HPLC-Immunogramme) oder radiomarkierte, injizierte Metaboliten aus einem Radiometabolismusversuch.

Dafür würde sich, zur vorangehenden Reinigung der Proben, das in Kapitel 4.2.2.3 „Festphasenextraktion in RP-C18-Kartuschen“ beschriebene Test-Verfahren eignen, das einen Waschschritt mit Tris-Puffer (mit 20%-igem Methanol) und die Elution mit 100%-igem Methanol vorsieht.

Allen aufbereiteten Proben war zudem gemein, dass durch hohe Aufarbeitungsverluste wesentlich geringere Gestagenkonzentrationen messbar waren als im ursprünglichen Extrakt, der mit 90%-igem Methanol direkt aus dem Kot gewonnen wurde. Die Ursachen hierfür sind unbekannt. Sie können aber in Aufarbeitungsverlusten beispielsweise durch das Niedertrockenen zu finden sein. Diese hohen Verluste waren ein weiterer Grund dafür, dass für das Hormonmonitoring das einfache methanolische Extrakt verwendet wurde.

Aufgrund der oben beschriebenen Exkretion freier und vermutlich konjugierter Pregnane ist ein Enzymimmunoassay, der auf einem sogenannten gruppenspezifischen Antiserum basiert, das eine hohe Kreuzreaktivität aufweist, am effektivsten zum Monitoring der Lutealfunktion (Brown 2006). Diese Aussage unterstützend, wurden in der hier vorliegenden Studie mit einem Antikörper gegen 5α-Pregnan-3β-ol-20-on-3-HS-BSA relevantere Ergebnisse erzielt als mit einem monoklonalen Antikörper gegen Progesteron mit geringerer Kreuzreaktivität. Der 5α-P-Antikörper hatte eine hohe Affinität zu 5α-Pregnan-3β-ol-20-on sowie zu 5α-Pregnan-3α-ol-20-on, zwei Gestagenmetaboliten, die zumindest im Kot der Hauskatze identifiziert wurden, wohingegen Progesteron abwesend war (Brown et al. 1994).

Damit vergleichbar konnte mit einem gruppenspezifischen Enzymimmunoassay für Gesamtöstrogene, der auf einem Antikörper basierte, der Östradiol und Östron gleichermaßen erkannte, die Follikelfunktion besser verfolgt und die Östrogene im Verlauf der Trächtigkeit besser dargestellt werden als mit einem Assay, der auf einem Antikörper gegen Epi-Androsteron basierte. Ein solcher EIA, der Androgene als Vorläufer der Östrogene quantifizierte, erwies sich beim Malaienbären (*Helarctos malayanus*) als geeignetes Mittel zur Detektion des Östrus, während ein Gesamtöstrogen-EIA versagte (Schwarzenberger et al. 1998).

6.2 Follikelfunktion und Östrus

Zwei unterschiedliche mit der Reproduktion verknüpfte Situationen können zu erhöhten Östrogenen führen – ein Anstieg im Zusammenhang mit der normalen zyklischen Follikelfunktion und einer während der Trächtigkeit. Dieser letzte Kontext wird erst im nächsten Kapitel „6.3 Besonderheiten im Zusammenhang mit

Östrogenen“ und im Kapitel „6.5 Ursprung der Steroidhormone und ihre Abhängigkeit von der Anzahl der Jungtiere“ behandelt.

Für die Sandkatze (*Felis margarita*) konnten durch die iterative Berechnung eines Basalniveaus Bereiche erhöhter Östrogene (über den grauen gestrichelten Linien in den Abbildungen) identifiziert werden, die teils mit Östrusverhalten und Verpaarungen einhergingen. Diese lagen 3,1 ± 0,2-fach (2,6- bis 3,8-fach) über dem Grundniveau, was circa dem von Herrick für die Sandkatze beschriebenen Verhältnis entspricht (4,0 ± 0,5 [2,7-5,9]), ebenso wie der 2,7 ± 0,1-fachen Erhöhung (2,4- bis 3,0-fach) der Schwarzfußkatze (*Felis nigripes*) (Herrick et al. 2010). Vergleichbar sind ebenfalls Verhältnisse von Gepard (*Acinonyx jubatus*) (4-fach), Manul (*Otocolobus manul*) (4,5-fach), Nebelparder (*Neofelis nebulosa*) (5-fach) und der Fischkatze (*Prionailurus viverrinus*) (6,9-fach) (Brown et al. 2002; Brown et al. 1994; Moreland et al. 2002). Im Gegensatz dazu waren die Östrogenkonzentrationen während des Östrus beim Schneeleoparden (*Panthera uncia*) um das 9-fache und bei Oncilla (*Leopardus tigrinus*) und Ozelot (*Leopardus pardalis*) um das 12- bis 14-fache gegenüber dem Grundniveau gesteigert, während die Erhöhung bei Margay (*Leopardus wiedi*) und Bengalkatze (*Prionailurus bengalensis*) sogar das 24- bzw. 30-fache betrug (Brown et al. 1994; Moreira et al. 2001). Dabei stammt der Wert für die Bengalkatze allerdings von einem einzigen Tier, das zum Zweck der Ovulationsinduktion vor der künstlichen Besamung mit Gonadotropinen behandelt wurde. Dieses Verfahren führt meist zu einer Hyperstimulation der Ovarien, die sich – verglichen mit dem natürlichen Östrus – in mehrfach höheren Östrogenkonzentrationen manifestiert (Brown 2006). Daher ist der Wert für die Bengalkatze möglicherweise nicht mit den mit natürlichem Östrus assoziierten Konzentrationen anderer Arten vergleichbar.

Die in dieser Studie gemessenen durchschnittlichen Östrogenkonzentrationen scheinen mit 63,3 ± 3,9 ng/g (59,6-74,8 ng/g) bzw. 195,1 ± 13,4 ng/g (169,1-232,3 ng/g) für die basalen bzw. erhöhten Phasen zu den niedrigsten bisher berichteten Werten zu gehören. Während sich beim Grundniveau von Nebelparder (33,2-37,5 ng/g), Gepard (65,8-70,6 ng/g), sowie Oncilla, Ozelot und Margay (60,3-97,1 ng/g) ähnlich niedrige Werte fanden (Brown et al. 1994; Moreira et al. 2001), lagen diese für viele andere Kleinkatzenarten höher (Fischkatze 99,4 ng/g, Manul 128,4 ng/g; Bengalkatze 313,7 ng/g, Schwarzfußkatze 1307,1 ng/g; (Moreland et al.

2002; Brown et al. 2002; Brown et al. 1994; Herrick et al. 2010). Der Schwankungsbereich für die Episoden vermehrter Östrogene ist mit Konzentrationen von 170 ng/g für den Nebelparder bis hin zu Konzentrationen von 9085 ng/g für die Bengalkatze wesentlich größer. Die Kleinkatzen (Oncilla, Ozelot, Margay, Manul, Fischkatze und Schwarzfußkatze) wiesen dabei durchschnittliche Östrogenkonzentrationen zwischen 513 ng/g und 2963 ng/g auf. Die hier präsentierten Daten bestätigten dadurch die Hypothese nicht eindeutig, nach der Kleinkatzenarten zu höheren fäkalen Konzentrationen an Östrogenmetaboliten tendieren (Grundniveau > 60 ng/g, Höchstwerte > 800 ng/g) als größere Spezies wie Gepard, Nebelparder und die meisten *Panthera*-Arten (Grundniveau < 50 ng/g, Maximalwerte < 500 ng/g) (Moreira et al. 2001; Brown 2006).

Bei dieser Gegenüberstellung der Daten ist jedoch zu beachten, dass Vergleiche der absoluten, fäkalen Konzentrationen zwischen verschiedenen Studien sehr vorsichtig zu ziehen sind, da in jedem Labor unterschiedliche Testverfahren und Reagenzien (insbesondere unterschiedliche Antikörper mit unterschiedlicher Affinität zu den Metaboliten) Verwendung finden. Beispielsweise wurde in den meisten Laboratorien getrockneter, pulverisierter Kot extrahiert und die Ergebnisse pro Gramm Trockengewicht angegeben (Brown et al. 1994; Brown et al. 2002; Herrick et al. 2010), was zum Teil die höheren Konzentrationen erklärt. Zwischen getrockneten und nass verwendeten Proben besteht aber eine große Übereinstimmung, die eine qualitative Ähnlichkeit der Profile mit sich bringt (Moreira et al. 2001), so dass zumindest ein qualitativer Vergleich der Daten trotzdem möglich ist, z. B. über die Beziehung von Grundniveau zu Maximalwerten, wie am Anfang dieses Kapitels gezeigt wurde.

Dementsprechend lassen sich auch die großen Differenzen der hier gemessenen Konzentrationen zu den von Herrick für die Sandkatze bestimmten Werten zu einem gewissen Teil erklären (basal 63,3 ± 3,9 ng/g [59,6-74,8 ng/g] bzw. erhöht 195,1 ± 13,4 ng/g [169,1-232,3 ng/g] gegenüber basal 493,9 ± 15,7 ng/g [264,1-1344,3 ng/g] bzw. erhöht 1669,9 ± 83.5 ng/g [1053,4-3572,7 ng/g]). In seiner Studie wurde zwar ebenfalls ein Antikörper gegen 17β-Östradiol verwendet, es ist allerdings nichts über seine Kreuzreaktivitäten bekannt. Ferner wurde in dieser Studie lyophilisierter Kot eingesetzt, so dass die Konzentrationen auf 1 g Trockenmasse anstatt wie in der hier vorliegenden Studie auf 1 g Feuchtmasse bezogen wurden.

Im Rahmen dieser Studie wurden nur wenige Zeiträume analysiert, in denen Zyklen aufeinanderfolgender Östrogenschübe detektiert wurden, die nicht mit Kopulationen und nachfolgenden trächtigen und scheinträchtigen Lutealphasen interferierten (siehe z. B. Abbildung 11 (b)), da die Tiere verpaart wurden, sobald eine Rolligkeit beobachtet wurde. Anhand dieser Daten ergab sich ein Östrusintervall (Zeit zwischen zwei Östrogenmaxima) von 14,5 ± 1,0 Tagen (9-20 Tage), das gut mit den bisher beschriebenen Östrusintervallen von 10-20 Tagen für die meisten Katzenarten korreliert (Brown 2006). Konkret wurden Zeiträume publiziert, die sich auf 11,1 bzw. 11,9 Tage für Sand- bzw. Schwarzfußkatzen, 14,3 Tage für Manule, 16,7 Tage für Oncillas, 17,6 Tage für Margays, 18,5 Tage für Ozelots und 23,6 Tage für Fischkatzen beliefen (Herrick et al. 2010; Brown et al. 2002; Moreira et al. 2001; Moreland et al. 2002). Innerhalb dieses Zeitraums reifen neue Follikel heran.

Dies war auch der Grund für die wieder vermehrt ausgeschiedenen Östrogene bei Felicia und Aisha, sobald eine nicht-trächtige Lutealphase endete (Abbildung 9 und Abbildung 11). Dieses Muster wurde bereits für die Hauskatze beschrieben, wobei erhöhte Östrogenwerte gelegentlich auch schon während der Lutealphase auftraten (Wildt et al. 1981), wie z. B. bei Felicias erster untersuchter Scheinträchtigkeit (vgl. Abbildung 11 (a)).

Insgesamt war die Östrusdetektion mit Hilfe des Gesamtöstrogen-EIAs allerdings nicht eindeutig, da die fäkalen Konzentrationen teils stark schwankten, wodurch die durch das zweifache Grundniveau definierte Schwelle nur circa 20 ng/g über dem Bereich lag, der durch den Mittelwert + die zweifache Standardabweichung bestimmt wurde. Da in diesem Bereich 95 % der Daten des Grundniveaus liegen (95 % Konfidenzintervall), könnten Ausreißer davon leicht als Östrogenpeak fehlinterpretiert werden.

Als weiteres Problem kommt hinzu, dass sich die mit dem beobachteten Paarungsverhalten assoziierten Östrogenpeaks nicht von anderen prä-coitalen Östrogenpeaks abgrenzten, ja diese sogar unterschritten (vgl. Abbildung 11 (a) und (b)). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der physiologischen Relevanz der prä-coitalen Peaks – ob diese mit einer Follikelreifung einhergingen und nur kein Östrus beobachtet wurde, wie es Moreira für Ozelots, Oncillas und Margays beschreibt, oder ob es sich dabei lediglich um physiologisch irrelevante

Schwankungen handelt. Zu diesem Problem ist die erhebliche Varianz fäkaler Östrogenkonzentrationen innerhalb einer Kotprobe zu beachten. So ergab die Messung radioaktiv markierter Östrogenmetaboliten in mehreren Portionen aus einem abgesetzten Kothaufen beim Elefanten eine enorme Varianz (SEM = 30%; Wasser et al. 1996), was zu Östrogenpeaks führen kann, die allein durch den Anteil der Probe begründet sind. Ob die bei der Sandkatze bestimmten Östrogenpeaks, die nicht mit offenem Östrusverhalten assoziiert waren, wirklich Follikelaktivität indizierten, hätte nur über laparoskopische Untersuchungen von vorhandenen Follikeln geklärt werden können. Es besteht also die Möglichkeit, dass die detektierten Östrogenpeaks keinerlei physiologische Relevanz besitzen.

Andererseits besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass die besonders hohen Östrogenwerte, die mit einem offenen Östrus assoziiert waren, verpasst wurden, da die markanten, mit der Paarung assoziierten Östrogenanstiege, die für andere Katzenarten beschrieben wurden, nur zwei Tage andauern (Brown et al. 1994). Für diese Theorie spricht die Detektion eines besonders hohen (max. 697 ng/g) Östrogenschubs Mitte Januar 2009 bei Aisha 2-4 Tage vor einer Verpaarung (siehe Abbildung 8). Für fast alle anderen Bereiche, in denen die Sandkatzen verpaart wurden oder rollig waren, fehlten die Proben der letzten drei bis vier Tage vor dem Östrus, ebenso wie Proben während der Verpaarungsperiode. Auf der anderen Seite wurde bei der Untersuchung von 109 Zyklen der Sandkatze auch lediglich eine vierfache Erhöhung der Östrogenkonzentrationen während des Östrus beschrieben (Herrick et al. 2010).

Ein endgültiges Fazit über die Östrusdetektion mit Hilfe von Enzymimmunoassays bedürfte des Monitorings eines längeren Zeitraumes mit ausreichender Probenausstattung und der Korrelation der Ergebnisse mit Beobachtungen offener Östren oder einer hCG-Stimulation (humanes Choriongonadotropin), durch die bei Feliden ein dramatischer Östrogenanstieg induzierbar ist (Brown 2006).

6.3 Besonderheiten im Zusammenhang mit Östrogenen

Da die Follikelreifung im Zusammenhang mit erhöhten Östrogenwerten nicht immer eine offene Rolligkeit nach sich zieht (Moreira et al. 2001) und die Bestimmung von Östren anhand der Östrogenprofile nicht eindeutig war, konnte für das Weibchen Wis

aus dem Berliner Zoo, für das keinerlei Östrusverhalten oder Verpaarungen während des Untersuchungszeitraumes beschrieben wurden, nicht mit Sicherheit geklärt werden, ob es eine normale zyklische Ovaraktivität aufwies, oder ob bei ihm eine physiologische Störung vorlag. Zu vier Zeiten wurden über den Schwellenwert hinausgehende Östrogenkonzentrationen gemessen, von denen eine von leicht erhöhten Gestagenkonzentrationen von Mitte Februar bis Mitte März 2009 gefolgt wurde, die allerdings das Schwellenniveau der Gestagene nicht überschritten (Abbildung 12). Unter Umständen zeigte das Sandkatzenweibchen hier trotzdem eine Ovulation mit angeschlossener nicht-trächtiger Lutealphase. Andererseits wurde für ständig zusammen gehaltene Paare von Geparden auch schon eine Suppression der Reproduktion mit fehlendem Brunstverhalten vermutet (Brown et al. 1996). Da wildlebende Weibchen, begründet durch die solitäre Lebensweise, Artgenossen normalerweise meiden, zeigten selbst einige Weibchen, die nur in räumlicher Nähe zu Artgenossen gehalten wurden, keine Anzeichen ovarieller Aktivität (Lindburg & Fitch-Snyder 1994). Vermutlich ist die soziale Kompatibilität des Pärchens auch ein wichtiger Faktor für den Reproduktionserfolg (Brown 2006).

Ein ganz anders gearteter Grund der Ovulationssuppression ist die Phase der Anovulation während der Laktation, die bei Säugetieren weit verbreitet ist (Rosetta & Mascie-Taylor 1996). Beim Menschen wurde nachgewiesen, dass das Säugen die Sensitivität des Hypothalamus gegenüber der negativen Rückkopplung von Östradiol erhöht, welche die Ausschüttung von GnRH unterdrückt (McNeilly 2001). Diese negative Rückkopplung entwickelt sich nur in Anwesenheit von Progesteron. Der beschriebene Mechanismus scheint bei vielen Arten üblich zu sein. In einer Studie zur Reproduktion des Schwarzbären (*Ursus americanus*) waren dementsprechend die Gestagenkonzentrationen während eines solchen Anöstrus gesteigert gegenüber denen bei einem Anöstrus, der nicht durch Laktation bedingt war (Foresman & Daniel 1983). Die hohen post-partalen Gestagenwerte, die bei Atiya auftraten, hingen also vermutlich mit solch einem durch Laktation begründeten Anöstrus zusammen. Für eine von zwei Sandkatzenträchtigkeiten einer anderen Studie ist eine vergleichbare, 85 Tage dauernde Laktationsazyklie beschrieben (Herrick et al. 2010). Auch der Luchs weist post-partal erhöhte Gestagen- und Östrogenwerte auf, die sich durch die Entdeckung von Corpora lutea im Ultraschall begründen ließen (Dehnhard et al. 2008). Bei der Hauskatze konnte es während dieser Phase der Laktationsazyklie

trotzdem zu Östrogenschüben geringer Amplitude kommen, vermutlich sekretiert durch unreife, sich entwickelnde Follikel, die aber ohne die Ausbildung reifer Follikel abliefen (Schmidt et al. 1983).

Wenn dieser laktationsbedingte Anöstrus durch den direkten Tod der Jungtiere oder das Absetzen dieser direkt nach der Geburt für die Handaufzucht ausfällt, wie bei Aisha Anfang Mai bzw. Mitte Juli geschehen, kann die Hauskatze bereits nach 10 Tagen wieder in einen Östrus kommen (Tsutsui & Stabenfeldt 1993). Bei Aisha vergingen 7 Tage nach dem sofortigen Verlust der Jungen bzw. 13 Tage nach dem Absetzen der Kätzchen am 2. Tag post-partum, bis sie wieder rollig wurde (vgl. Abbildung 8).

Weitere um ein Vielfaches gesteigerte Östrogenkonzentrationen, die jedoch nicht mit dem Östrus zusammenhingen, traten in der zweiten Hälfte der Trächtigkeiten auf (siehe z. B. Abbildung 8), wie es auch schon bei Hauskatzen, Fischkatzen, Manulen und Geparden festgestellt wurde (Schmidt et al. 1983; Brown et al. 2002; Brown 2006). Diese waren aber vermutlich nicht lutealen, sondern plazentären Ursprungs. Daher blieb ein vergleichbarer Anstieg während der Scheinträchtigkeit aus (siehe Abbildung 15), so wie es bei den vorher schon genannten Arten ebenfalls beschrieben wurde. Eine weitere Ausführung dieser Ergebnisse erfolgt in Kapitel „6.5 Ursprung der Steroidhormone und ihre Abhängigkeit von der Anzahl der Jungtiere“.

6.4 Lutealfunktion

Die Messung fäkaler Gestagene ist eine effektive Methode zur Untersuchung der Lutealfunktion in Trächtigkeit oder Scheinträchtigkeit, die bereits bei vielen Katzenarten angewandt wurde und nun auch für die Sandkatze Rückschlüsse ziehen lässt.

Der Verlauf der Gestagene über die Lutealphase bei der Sandkatze gleicht denen anderer Arten. Bald nach der Verpaarung erhob sich der Gestagenwert über die Basalwerte und blieb auf einem relativ konstanten Niveau, um dann kurz vor der Geburt bzw. für die Scheinträchtigkeit schon nach der Hälfte dieser Zeit wieder abzufallen (z. B. Abbildung 8 bzw. Abbildung 11). Das Grundniveau von 6,1-12,3 µg/g stimmt dabei mit dem anderer Arten gut überein, mit Werten von 4,0 µg/g für die Schwarzfußkatze (Herrick et al. 2010), 4,6 µg/g für die Fischkatze

(Moreland et al. 2002), 6,4-8,8 µg/g für Ozelot, Oncilla und Margay (Moreira et al. 2001), 4,6-5,1 µg/g für Gepard, Schneeleopard und Nebelparder und 16,2 µg/g für die Bengalkatze (Brown et al. 1994). Die Daten dieser Studie sind allerdings zehnfach höher als die von Herrick mit 0,6 µg/g für die Sandkatze bestimmten, was aber möglicherweise auf die Verwendung verschiedener Antikörper und Testverfahren zurückzuführen ist. In der hier vorliegenden Studie wurde ein Antikörper gegen 5α-Pregnan-3β-ol-20-on verwendet, der eine viele Kreuzreaktivitäten aufweist. Im Gegensatz dazu verwendete Herrick einen monoklonalen Antikörper gegen 4-Pregnen-11-ol-3,20-dion, der vermutlich spezifischer ist. Auf jeden Fall beschrieb er für zwei Trächtigkeiten eine 9,3- bzw. 11,2-fache Steigerung der Gestagenkonzentrationen, die etwas höher liegen als die Faktoren dieser Arbeit (6,4- bis 9,1-fach). Die Zunahme der Gestagene während der Scheinträchtigkeit (5- bis 7-fach) ähnelt den für Margay (4,9- und 10,7-fach; (Moreira et al. 2001), Fischkatze (7,3-fach; (Moreland et al. 2002) und Schwarzfußkatze (5,7- bis 17,6-fach; (Herrick et al. 2010) dargestellten Verhältnissen. Die Konzentrationen zwischen nicht-trächtigen und trächtigen Lutealphasen (30,8-46,7 µg/g gegenüber 41,5-58,9 µg/g; Abbildung 14) unterschieden sich wie bei Gepard und Nebelparder nicht wesentlich (Brown et al. 1994).

Der Unterschied zwischen Gravidität und Pseudogravidität bestand jedoch im Zeitpunkt der Rückkehr zum Basalniveau. Während diese bei den Trächtigkeiten kurz vor der Geburt, 58-65 Tage post-coitum, erfolgte, fielen die Gestagenkonzentrationen bei den Scheinträchtigkeiten bereits nach der Hälfte dieser Zeit, 31-32 Tage post-coitum, ab. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit vielen anderen Studien über verschiedenste Katzenarten, wie z. B. Manul, Nebelparder, Tiger und Löwe, in denen dargestellt wurde, dass eine nicht-trächtige Lutealphase circa ein Drittel bis die Hälfte der Zeit einer Trächtigkeit andauert (Brown 2006). In dieser Studie wurden allerdings nur bei einem Weibchen komplette Scheinträchtigkeiten begleitet, die eine Aussage über die Länge dieser Episode zuließen. Der Grund für den fehlenden Zuchterfolg mit diesem Weibchen ist unklar. Eine Ultraschalluntersuchung ließ aufgrund vergrößerter Nebennieren auf vermehrten Stress folgern, jedoch wurde die Möglichkeit einer Eileiterverklebung wurde aber bisher ebenfalls noch nicht ausgeschlossen.

Eine noch kürzere Lutealphase trat bei einem Weibchen auf, das im Anschluss an Verpaarungen schwer erkrankte und mit Narkosen und Antibiotika behandelt werden musste (Abbildung 9). Die Gestagene fielen hier bereits am 20. Tag post-coitum unter den Schwellenwert. Unklar ist, ob die progesteronproduzierenden Gelbkörper durch die Behandlung oder die Krankheit schneller degenerierten oder ob dieser Zeitraum einer normalen nicht-trächtigen Lutealphase entsprach. Die Länge liegt jedenfalls im Rahmen der mit einem Drittel bis die Hälfte der Gestationslänge angegebenen Zeitfenster für solch eine Lutealphase.

All diese Phasen lutealer Aktivität nach der Ovulation wurden durch Verpaarungen ausgelöst, was lange Zeit für alle Katzenarten etabliert war. Dennoch wurde eine Lutealphase bei Aisha spontan, ohne Verpaarung induziert (siehe Abbildung 8). Heute ist bekannt, dass mehrere Arten, genauer gesagt Manul, Margay, Fischkatze, Schwarzfußkatze, Nebelparder, Leopard, Löwe und Hauskatze, auch spontan ovulieren, während andere Arten dies nicht tun (Brown et al. 2002; Moreira et al. 2001; Moreland et al. 2002; Herrick et al. 2010; Brown 2006). Die Stimuli dafür sind nicht bekannt, vermutete Einflüsse betreffen aber die Haltungsbedingungen, die Nähe zu einem Männchen und möglicherweise die genetische Disposition (Brown 2006). Das hier beschriebene Sandkatzenweibchen wurde zum entsprechenden Zeitpunkt zwischen zwei Männchen gehalten und war über einen Zeitraum von fast zwei Wochen besonders heftig rollig. Im Gegensatz zu der hier dargestellten Spontanovulation erfasste Herrick bei 109 Zyklen von Sandkatzen in Einzelhaltung keine einzige folgende Lutealphase. Er beschrieb allerdings für einzeln gehaltene Sandkatzenweibchen, dass gelegentlich bei Laparoskopien Corpora albicans identifiziert wurden (Herrick et al. 2010).

Aus den Ergebnissen der Gestagenuntersuchungen bei den Sandkatzen ergibt sich somit die Möglichkeit, circa 35 Tage nach der Verpaarung, aufgrund der unterschiedlichen Länge der Lutealphase zwischen Gravidität und Pseudogravidität, eine Trächtigkeit anhand fäkaler Gestagene zu diagnostizieren. Dies kann aber aufgrund der hohen Schwankungen von Tag zu Tag nicht anhand von Stichproben erfolgen, sondern bedarf mehrerer seriell genommener Proben für eine zuverlässige Trächtigkeitdiagnose.

6.5 Ursprung der Steroidhormone und ihre Abhängigkeit von der Anzahl der Jungtiere

Seit einigen Jahren wurde vermutet, dass die verlängerte Gestagensekretion während der Trächtigkeit aus der Progesteronproduktion durch die Plazenta resultiert. Einen Hinweis darauf lieferte auch die Entdeckung des Enzyms in der Plazenta von Katzen, das Pregnenolon zu Progesteron metabolisiert. Eine neuere Studie schließt diesen Ursprung hingegen aus und vermutet stattdessen die Produktion durch die Corpora lutea (Tsutsui et al. 2009). Ungeklärt blieb jedoch, ob die Plazenta andere Gestagene als Progesteron sekretiert, welche die Trächtigkeit aufrechterhalten, jedoch vom in der Studie verwendeten Radioimmunoassay nicht detektiert wurden.

Die Quelle der Östrogene während der Gravidität ist für Katzen bisher unbekannt. In einigen Tieren, beispielweise Ratten und Mäusen, trägt das Ovar zur Östrogensekretion bei, viel häufiger gilt allerdings die Plazenta als Hauptquelle, wie bei Primaten, Pferden, Schweinen, Rindern, Schafen und Ziegen (Brown et al. 2002). Für die Hauskatze vermutete Schmidt 1983 eben so eine plazentäre Produktion.

Dementsprechend würde die Masse an Plazenten, die mit der Wurfgröße zusammenhängt, die Menge an sekretierten Östrogenen bestimmen (Manalu et al. 1997). Bei der Sandkatze waren die Östrogenkonzentrationen der zweiten Trächtigkeitshälfte während einer Gravidität mit vier Jungtieren 3,5-fach erhöht gegenüber zweien mit jeweils einem geborenen Jungtier (340,7 ± 53,3 µg/g gegenüber 86,4 ± 15,6 µg/g bzw. 111,0 ± 77,1 µg/g; vgl. Tabelle 11 und Abbildung 15). Dabei unterschieden sich die ermittelten Werte eines Tieres bei zwei Trächtigkeiten mit unterschiedlicher Wurfgröße so erheblich, dass die Differenz nicht allein auf individuelle Unterschiede zurückzuführen war.

Beispielsweise bei Ratten und Schafen stammen die Östrogene, ebenso wie das bei ihnen auftretende Laktogen, aus der Plazenta (Jameson Jr. 1998). Beide Hormone steuern die Mammogenese, so dass auf diese Weise die Milchproduktion auf die Anzahl der Jungtiere abgestimmt wird. In einer Studie an Schafen hingen neben dem Laktogen auch die Progesteronkonzentration im Plasma von der Anzahl der Jungtiere ab (Butler et al. 1981). Eine adäquate Relation wurde ebenfalls für fäkale

Östrogen- und Gestagenmetaboliten bei Ziegen beschrieben (Capezzuto et al. 2008).

Bei der Sandkatze fanden sich Gestagenkonzentrationen von 58,9 ± 5,1 µg/g in der Trächtigkeit mit vier Jungen und 41,5 ± 3,9 µg/g bzw. 45,0 ± 3,5 µg/g in denen mit jeweils einem (vgl. Tabelle 8), was ein geringerer Unterschied als bei den Östrogenen war. Wenn also die Wurfgröße von der Anzahl an ovulierten Follikeln abhängt, die wiederum die Anzahl der Progesteron synthetisierenden Corpora lutea bestimmt, so sind Wurfgröße und Gestagenkonzentrationen proportional (Manalu et al. 1997). Dieser Effekt wird möglicherweise durch den Fakt abgeschwächt, dass die Anzahl der Corpora lutea zwar mit der Anzahl der Jungtiere in Verbindung steht, ihr aber nicht exakt entspricht. Diese Diskrepanz entsteht dadurch, dass nicht alle Eier springen, einige nicht befruchtet werden und sich andere wiederum nicht einnisten (Crowe 1975).

Bei den Carnivoren ist zumindest die Korrelation der Wurfgröße mit den Östrogenkonzentrationen für den Schwarzfußiltis beschrieben (Young et al. 2001), während es zur Abhängigkeit der Gestagene bisher keine Untersuchungen gab.

Der genaue Grund der Abhängigkeit der Gestagene und Östrogene von der Anzahl der Jungtiere pro Wurf ist für die Katze nicht zufriedenstellend geklärt. Der Einfluss durch die Anzahl der Corpora lutea und die Masse an plazentalem Gewebe als Sekretionsorte scheinen aber plausibel.

Der hier dargestellte Einfluss der Wurfgröße auf die Steroidhormonkonzentrationen entspricht nur einer grundlegenden Theorie und bedürfte zur eindeutigen Beantwortung weiterer systematischer Studien.

6.6 Die Schwarzfußkatze und das Problem der nicht-identifizierbaren Kotproben

Für die Schwarzfußkatze konnten keine konkreten Aussagen zur Reproduktionsbiologie getroffen werden. Die Daten lieferten aber einen Hinweis darauf, dass die Messung fäkaler Gesamtöstrogene Rückschlüsse auf die Follikelfunktion zulässt und diese Steroide mindestens Konzentrationen von rund 1000 ng/g erreichen (Abbildung 16). Damit liegen sie vermutlich über den für die

Sandkatze bestimmten mit einem östrusabhängigen Maximalwert von 700 ng/g (Abbildung 8). Desgleichen schienen die Gestagenkonzentrationen, indem sie nach Verpaarungen anstiegen, der Lutealfunktion zu folgen. Ferner könnte aufgrund leicht gesteigerter Gestagenwerte nach einer Rolligkeit ohne Verpaarungen eine Spontanovulation vermutet werden. Diese Angaben beruhen allerdings alle nur auf einzelnen Werten nicht eindeutig identifizierbarer Kotproben und sind daher mit Vorbehalt zu betrachten.

Letzten Endes hatte es den Anschein, als könnte man mit dem für die Sandkatzen validierten Enzymimmunoassay auch die Reproduktionsbiologie der Schwarzfußkatze untersuchen. Dies müsste aber noch durch eine ausgiebige Validierung und das Monitoring verschiedener Individuen geklärt werden.

Es bleibt festzustellen, dass die retrospektive Untersuchung von Probenmaterial nur bei ausreichender und individuell unterscheidbarer Probensammlung zu fortpflanzungsrelevanten Zeiten möglich ist.

Bei Kotproben, die nicht bestimmten Individuen zuzuordnen sind, wie hier bei der Schwarzfußkatze, können alle Proben analysiert und die Daten durch die Festlegung entsprechender Grenzen bewertet werden. Dies ist jedoch, wie hier gezeigt, nur begrenzt sinnvoll, da die Hormonprofile von Tag zu Tag sehr großen Schwankungen unterliegen, sodass bei Proben mit niedrigen Konzentrationen eine Individualisierung nicht möglich ist, da niedrige Konzentrationen sowohl bei adulten Weibchen als auch bei Männchen und Jungtieren anzutreffen sind. Eine eindeutige Zuordnung wäre demnach nur durch genetische Analysen möglich, die allerdings zu aufwändig und teuer sind um sie in solch einem großen Umfang einzusetzen.

Stattdessen sollte bei zusammengehaltenen Tieren einem Individuum Lebensmittelfarbe unter das Futter gemischt werden um so den Kot differenzieren zu können, so wie es bei einigen Sandkatzen dieser Studie erfolgte, bei denen einerseits das weiße Titaniumdioxid und andererseits das blaue Coomassie verwendet wurden.

6.7 Anwendung der Ergebnisse und Ausblick

Mit Hilfe des in dieser Studie validierten Enzymimmunoassays, der auf einem Antikörper gegen 5α-Pregnan-3β-ol-20-on-3-HS-BSA basiert, ist eine nicht-invasive Trächtigkeitsdiagnose bei Sand- und möglicherweise Schwarzfußkatzen auf der Grundlage fäkaler Gestagene ab dem 35. Tag post-coitum möglich. Diese Diagnose ermöglicht es, trächtige Tiere zum erwarteten Zeitpunkt der Geburt zu überwachen um bei einem eventuellen Infantizidversuch eingreifen zu können. Weiterhin können als trächtige diagnostizierte Katzen rechtzeitig (spätestens 14 Tage vor der Geburt) in ein ruhigeres Umfeld gebracht und ihnen entsprechende Wurfboxen eingerichtet werden. Dies ist eine gute Möglichkeit, das Überleben der Jungtiere bei diesen stressanfälligen Kleinkatzen zu sichern, da Trächtigkeitsanzeichen sonst meist nicht bemerkbar sind (Puschmann 2007). In diesem Zusammenhang wäre die nicht-invasive Messung der Nebennierenaktivität (als Stressindikator) fußend auf der Analytik fäkaler Cortisolmetaboliten eine sinnvolle methodische Ergänzung.

Des weiteren kann möglicherweise mittels des Enzymimmunoassays, der auf dem Antikörper gegen 1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol-17-HS-RSA basiert, die physiologische Funktionalität der Ovaraktivität abgeschätzt und damit Tiere identifiziert werden, die keine Follikelreifung aufweisen. Diese könnten dann entsprechend behandelt werden. Angesichts der in Kapitel „6.2 Follikelfunktion und Östrus“ dargestellten Schwierigkeiten sollten jedoch weitere Untersuchungen zu diesem Thema vorgenommen werden.

Ein weiterer zu bestimmender Punkt ist die Identifizierung der mit den EIAs nachgewiesenen Steroidhormonmetaboliten durch ein HPLC-Immunogramm. Bisher kann lediglich die Aussage getroffen werden, dass Gesamtöstrogene bzw. 20-Oxo-Pregnane quantifiziert werden, die vom Antikörper erkannt werden.

Alles in allem, scheint der relativ schlechte Reproduktionserfolg bei den Sandkatzen keine physiologischen Gründe zu haben, sondern dürfte eher auf Haltungsgegebenheiten und Inkompatibilitäten der Paare zurückzuführen sein.

7 Zusammenfassung

Zoologische Institutionen widmen sich durch Haltung und Nachzucht bedrohter Katzenarten deren Arterhaltung. Der Zuchterfolg von Kleinkatzen wie der Sandkatze und der Schwarzfußkatze ist dabei jedoch meist unbeständig und wird geprägt durch eine niedrige Reproduktionsrate sowie eine hohe Jungtiersterblichkeit durch Krankheiten und Infantizid. Bis heute war wenig über die Reproduktion dieser beiden Arten bekannt.

Durch die Entwicklung einer Methode zum nicht-invasiven Monitoring von Östrogen- und Gestagenmetaboliten im Kot weiblicher Sandkatzen konnten entscheidende Kenntnisse über ihre Fortpflanzung erlangt werden. So stiegen die Konzentrationen fäkaler Gestagenmetaboliten 8-13 Tage nach Verpaarungen an und verblieben über die gesamte Länge der Trächtigkeit auf einem hohen Niveau um kurz vor der Geburt zum Basalniveau zurückzukehren (58-65 Tage post-coitum). Im Gegensatz dazu fielen sie während einer Scheinträchtigkeit bereits nach der Hälfte der Zeit ab. Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer Trächtigkeitsdiagnose circa ab dem 35. Tag nach der Verpaarung.

Die fäkalen Östrogene zeigten hingegen nicht zuverlässlich das Auftreten eines Östrus an. Dies war aber möglicherweise dem Fakt geschuldet, dass die Probensammlung während der entscheidenden Phasen sehr lückenhaft war. Weitere Studien in Verbindung mit Verhaltensdaten zu Östrusverhalten wären für eine endgültige Aussage zwingend notwendig. Auf der anderen Seite traten erhöhte Östrogenwerte während der zweiten Hälfte der Trächtigkeit auf, die vermutlich plazentalen Ursprungs waren. Ebenfalls gab es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Menge an gemessenen Östrogene und der Anzahl von Jungtieren.

Die Detektion einer Trächtigkeit ermöglicht es Zoos entsprechende Maßnahmen zu ergreifen, um das Überleben der Jungtiere besser zu sichern. Abgesehen davon scheint der schlechte Reproduktionserfolg aber weniger durch physiologische Infertilität als vielmehr durch Haltungsbedingungen, soziale Unverträglichkeiten, Stress oder anatomische Probleme begründet zu sein. Diese Punkte bedürfen weiterer Untersuchungen. Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Studie ist es nun möglich, passende assistierte Reproduktionstechnologien zu entwickeln, welche den

Reproduktionserfolg der Sandkatzen steigern können. Dasselbe Verfahren zum Reproduktionsmonitoring schien bei Schwarzfußkatzen Aussagen zu Follikel- und Lutealaktivität zu ermöglichen. Vor der Anwendung wäre allerdings eine ausreichende Validierung nötig.

Literaturverzeichnis

Bakker, J. & Baum, M.J., 2000. Neuroendocrine Regulation of GnRH Release in Induced Ovulators. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21(3), 220-262.

Brown, J.L. et al., 1994. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. *Biology of Reproduction*, 51(4), 776-786.

Brown, J.L. et al., 1996. Reproductive activity in captive female cheetahs (Acinonyx jubatus) assessed by faecal steroids. *J Reprod Fertil*, 106(2), 337-346.

Brown, J.L., 2006. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. *Theriogenology*, 66(1), 25-36.

Brown, J.L. et al., 2002. Reproductive endocrine responses to photoperiod and exogenous gonadotropins in the pallas' cat (*Otocolobus manul*). *Zoo Biology*, 21(4), 347-364.

Butler, W.R. et al., 1981. The Relationship between Breed and Litter Size in Sheep and Maternal Serum Concentrations of Placental Lactogen, Estradiol and Progesterone. *J. Anim Sci.*, 53(4), 1077-1081.

Capezzuto, A. et al., 2008. Correlation between serum and fecal concentrations of reproductive steroids throughout gestation in goats. *Animal Reproduction Science*, 103(1-2), 78-86.

Concannon, P., Hodgson, B. & Lein, D., 1980. Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. *Biology of Reproduction*, 23(1), 111-117.

Crowe, D.M., 1975. Aspects of Ageing, Growth, and Reproduction of Bobcats from Wyoming. *Journal of Mammalogy*, 56(1), 177-198.

Dehnhard, M. et al., 2008. Non-invasive Monitoring of Hormones: A Tool to Improve Reproduction in Captive Breeding of the Eurasian Lynx. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(s2), 74-82.

Foresman, K.R. & Daniel, J.C., 1983. Plasma progesterone concentrations in pregnant and nonpregnant black bears (Ursus americanus). *J Reprod Fertil*, 68(1), 235-239.

Graham, L.H., 2001. FELID ENDOCRINOLOGY. *Assisted Reproductive Technology (ART) for the Conservation and Genetic Management of Wildlife*, 124.

Herrick, J. et al., 2010. Fecal endocrine profiles and ejaculate traits in black-footed cats (Felis nigripes) and sand cats (Felis margarita). *General and Comparative Endocrinology*, 165(2), 204-214.

IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 05 September 2009.

Jameson Jr., E.W., 1998. Prepartum mammogenesis, milk production, and optimal litter size. *Oecologia*, 114(2), 288-291.

Johnson, W.E. et al., 2006. The Late Miocene Radiation of Modern Felidae: A Genetic Assessment. *Science*, 311(5757), 73-77.

Lindburg, D.G. & Fitch-Snyder, H., 1994. Use of behavior to evaluate reproductive problems in captive mammals. *Zoo Biology*, 13(5), 433-445.

Magiera, U., 2009. Sand Cat EEP Annual Report 2008.

Manalu, W., Sumaryadi, M.Y. & Kusumorini, N., 1997. Effect of fetal number on the concentrations of circulating maternal serum progesterone and estradiol of does during late pregnancy. *Small Ruminant Research*, 23(2-3), 117-124.

McNeilly, A.S., 2001. Lactational control of reproduction. *Reprod. Fertil. Dev.*, 13(8), 583-590.

Mellen, J.D., 1993. A Comparative Analysis of Scent-Marking, Social and Reproductive Behavior in 20 Species of Small Cats (Felis). *Amer. Zool.*, 33(2), 151-166.

Mellen, J.D., 1998. Life History Information on Small Cats. *Husbandry Manual for Small Felids, American Zoo- and Aquarium Association, Felid Taxon Advisory Group, published by Disney's Animal Kingdom Lake Buena Vista, FL*, 5-9.

Moreira, N. et al., 2001. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. *Zoo Biology*, 20(2), 103-116.

Moreland, R. et al., 2002. Basic reproductive biology of the fishing cat (Prionailurus viverrinus). *Biol Reprod*, 66(Suppl 1), 328.

Müller-Esterl, W., 2009. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Spektrum Akademischer Verlag.

Pelican, K. et al., 2005. Short term suppression of follicular recruitment and spontaneous ovulation in the cat using levonorgestrel versus a GnRH antagonist. *General and Comparative Endocrinology*, 144(2), 110-121.

Puschmann, W., 2007. *Säugetiere: Tiere in menschlicher Obhut* 4. Aufl., Thun [et al.]: Deutsch.

Rosetta, L. & Mascie-Taylor, C.G.N., 1996. *Variability in human fertility*, Cambridge University Press.

Sausman, K., 1997. Sand cat *Felis margarita*: a true desert species. *International Zoo Yearbook*, 35(1), 78-81.

Schmidt, P.M., Chakraborty, P.K. & Wildt, D.E., 1983. Ovarian activity, circulating hormones and sexual behavior in the cat. II. Relationships during pregnancy, parturition, lactation and the postpartum estrus. *Biology of reproduction*, 28(3), 657.

Schwarzenberger, F., 2007. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *International Zoo Yearbook*, 41(1), 52-74.

Schwarzenberger, F. et al., 1998. Fecal steroid analysis for monitoring ovarian function and the effect of PZP in the Sun bear (*Helarctos malayanus*). In *Proceedings from the European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians and the British Veterinary Zoological Society. 2nd Scientific Meeting, Chester, UK p*. S. 387–95.

Shille, V.M. et al., 1983. Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus. *J Reprod Fertil*, 69(1), 29-39.

Sliwa, A., 2007. Schwarzfußkatzen und ihr Lebensraum. *Zeitschrift des Kölner Zoo· Heft*, 2, 50.

Sunquist, M.E. & Sunquist, F., 2002. *Wild cats of the world*, University of Chicago Press.

Swanson, W.F., 2006. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology*, 66(1), 49-58.

Tsutsui, T. & Stabenfeldt, G.H., 1993. Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 47, 29-35.

Tsutsui, T. et al., 2009. The Role of the Ovary for the Maintenance of Pregnancy in Cats. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(s2), 120-124.

Wasser, S.K. et al., 1996. Excretory fate of estradiol and progesterone in the African elephant (*Loxodonta africana*) and patterns of fecal steroid concentrations throughout the estrous cycle. *General and comparative endocrinology*, 102(2), 255–262.

Wildt, D.E. et al., 1981. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biol. Reprod*, 25, 15–28.

Wilson, D.E. & Mittermeier, R.A. hrsg., 2009. *Handbook of the mammals of the world*, Barcelona: Lynx.

Wilson, D.E. & Reeder, D.M., 2005. *Mammal Species of the World*, JHU Press.

Young, K., Brown, J. & Goodrowe, K., 2001. Characterization of reproductive cycles and adrenal activity in the black-footed ferret (*Mustela nigripes*) by fecal hormone analysis. *Zoo Biology*, 20(6), 517-536.

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Martin Dehnhard und Jennifer Ringleb für die Betreuung dieser Diplomarbeit und dafür, dass sie sich immer Zeit genommen haben meine Fragen zu beantworten.

Außerdem möchte ich mich bei Marlies Rohleder und Katrin Paschmionka bedanken, die meine Anlaufstellen für alle Fragen bezüglich des Labors waren.

Allen Mitgliedern der Forschungsgruppe 4 des IZW gebührt ebenfalls mein Dank für die angenehme Atmosphäre, die netten Mittagspausen und den stets interessanten fachlichen Austausch.

Weiterhin möchte ich mich bei den Kuratoren und Pflegern der Zoos Berlin, Ebeltoft und Poznan bedanken, die durch das Sammeln der Proben diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben. Besonders hervorheben möchte ich den Einsatz von Julia Stagegaard und den Pflegern des Zoos Ebeltoft, die eine besonders wichtige Rolle bei der Erstellung dieser Arbeit gespielt haben. Ohne ihren Einsatz wäre diese Arbeit nicht das, was sie jetzt ist.

An dieser Stelle auch ein Dank an Ute Magiera und André Stadler, die mir als Koordinatoren der EEPs wertvolle Informationen über die Sand- und Schwarzfußkatzen zur Verfügung gestellt haben.

Ein großer Dank gilt natürlich meinen Freunden und meiner Familie für ihre unermüdliche Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir dadurch geboten haben.

Besonders möchte ich mich bei Gunnar Grah bedanken, der mich auf dieses Thema aufmerksam gemacht hat und mir im Laufe dieser Arbeit in vielerlei Hinsicht geholfen hat.

Stefan, dir kann ich gar nicht genug danken. Tausend Dank für alles was du tust.

Anhang 1: Verwendete Materialien

Tabelle 1: Auflistung der in dieser Studie verwendeten Gerätschaften nach Gerätename, Modellbezeichnung und Hersteller.

Gerätename	**Modell**	**Firma, Niederlassung**
Diluter	Microlab 1000 plus	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Dispenser für Mikrotiterplatten	Easy Spense 2/v1.1 Dispenser	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Heizblock	Dri-Block DB3	Techne Ltd., Cambridge, UK
Mikrotiterplatten-Reader	Infinite M200 mit Software Magellan	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Mikrotiterplatten-Washer	SLT 96 PW	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Schüttler	Thys 2	VEB MLW Labortechnik, Ilmenau, DDR
Stickstoffüberleitung	Sample Concentrator	Techne Ltd., Cambridge, UK
Untertischzentrifuge	Rotanta 46 RC	Hettich Zentrifugen, Königs-Wusterhausen, Deutschland
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage	CG-150C	Drexel Wiege- & Kraftmess-systeme, Hannover, Deutschland
Wärmeschrank	600 UM	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland

Tabelle 2: Auflistung der in dieser Studie verwendeten Chemikalien (Reinheitsgrad „*pro analysis*“) und Verbrauchsmaterialien nach im Text verwendetem Namen, Handelsnamen / Produktbezeichnung bzw. chemischem Kürzel und Hersteller.

Substanz/Wirkstoff	**Handelsname/ chemische Formel**	**Firma, Niederlassung**
Ammoniumsulfat	$H_8N_2O_4S$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Azetatpuffer, Natriumazetat	CH_3COONa	Merck, Darmstadt, Deutschland
β-Glucuronidase/Arylsulfatase		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Essigsäure	$C_2H_4O_2$ (Rotipuran 100%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat - Dihydrat	Na_2HPO_4 x 2 H_2O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid	$(CH_3)_2SO$ (DMSO)	Baker, Deventer, Niederlande
Meerettichperoxidase	HRP	Roche, Mannheim, Deutschland
Methanol	CH_3OH	Baker, Deventer, Niederlande
Mikrotiterplatten	Nunc-Immuno Maxisorp F96	Thermo Fischer Scientific, Roshilde, Dänemark
Natriumcarbonat-Decahydrat	Na_2CO_3 x 10 H_2O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Rinderserumalbumin	Albumin bovine Fraction V (BSA)	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland

Substanz/Wirkstoff	**Handelsname/ chemische Formel**	**Firma, Niederlassung**
Petroläther	PE	Baker, Deventer, Niederlande
RP-C18-Säulen 0,1g	Bakerbond spe™ Octadecyl (C18) Disposable Extraction Columns	Baker, Deventer, Niederlande
Salzsäure rauchend	HCl (Rotipuran 37%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure 95%	H_2SO_4	Th.Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Tetramethyl-Benzidin	TMB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tert-Butylmethyläther	TBME	Baker, Deventer, Niederlande
Tris-Puffer, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	$H_2NC(CH_2OH)_3$ (TRIS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 80-Lösung		Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid-Harnstoff	$NH_2CONH_2 \times H_2O_2$	Merck-Schuchard, Hohenbrunn, Deutschland
Zitronensäure- Monohydrat	$C_6H_8O_7 \times H_2O$	Merck, Darmstadt, Deutschland

Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen nicht benutzt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Berlin, den 02.12.2009

_____

Anne Hanschke