

Aus der Forschungsstelle für Wirbeltierforschung (im Tierpark Berlin)
(Direktor: OVR Prof. Dr. med. vet. habil. R. IPPEN)

Trächtigkeitsdiagnose beim Panzernashorn (*Rhinoceros unicornis*) anhand von Progesteronbestimmungen im Speichel

VON BERND KUCKELKORN & HOLGER H. DATHE, Berlin

Mit 3 Abbildungen

Bei der Suche nach Erfahrungen und Instrumentarien, mit deren Hilfe gehaltene Tiere bestmöglich versorgt und vor allem zur vollen Eigenreproduktion gebracht werden können, müssen grundsätzlich neue Wege begangen werden (31). Es bietet sich an, für die Zootierhaltung auf den Erfahrungsvorlauf der Nutztierforschung aufzubauen, aber es ist dabei stets auch zu beachten, daß in der Tiergartenpraxis spezifische Bedingungen bestehen, die eigens Forschungen notwendig machen (8).

Der wichtige Bereich hormonphysiologischer Kontrollen an reproduktionsfähigen Haltungsgruppen ist gewöhnlich verschlossen durch die Notwendigkeit, direkte Manipulationen am Wildtier zu vermeiden. Die neuen Techniken der Hormonanalyse, etwa aus Milch oder anderen nichtinvasiv erreichbaren Substraten wie Kot, Urin oder Speichel (u.a. 13, 15, 22, 32), sind daher lohnende Untersuchungsobjekte. Einige Erkenntnisse wurden bereits an Zootieren gewonnen (1, 2, 9, 10, 23, 25, 26). Die Verwendung von Speichel als Substrat hormonanalytischer Untersuchungen bietet dabei einige Vorteile gegenüber Kot- und Urinanalysen, gute Handhabbarkeit der Versuchstiere vorausgesetzt. Erste Erfahrungen mit großen Säugetieren (Nashörner, Elefanten, Zwergflupferd) liegen vor (6, 7, 9); sie sind ermutigend und fordern zur Ergänzung heraus. Die nachfolgende Darstellung möge der weiteren Anwendung einige biologische und technische Erkenntnisse hinzufügen.

Im Tierpark Berlin lebt ein Paar erwachsener Panzernashörner (*Rhinoceros unicornis*). Das weibliche Tier „Kumari“ kam im Jahr seiner Geburt (1967) in den Tierpark und ist bei einer Lebenserwartung von etwa 40 Jahren doch schon im fortgeschrittenen Alter. Nach langer Vergesellschaftung mit dem Bullen (geboren 1969, im Tierpark seit 1971) kam es am 28. VI. 1984 zu einer erfolgreichen Verpaarung. Das daraus resultierende Kalb wurde am 23. IX. 1985 nach einer Tragzeit von 453 Tagen vollständig entwickelt, aber tot geboren. Auf Grund dieser unklaren Reproduktionsprobleme wurde „Kumari“ in ein Screeningprogramm zur Fertilitätsdiagnostik einbezogen. Mittels der Bestimmung der Progesteron-Konzentration im Speichel (SP4) sollte versucht werden, Oestruszyklen und Trächtigkeitsphasen zu charakterisieren.

Im Hinblick auf offene methodische Fragen wurden in einigen Abschnitten des Untersuchungszeitraumes ergänzend die Konzentrationen von Estradiol im Kot sowie an 3 Tagen um den Geburtstermin Progesteron in der Milch analysiert. Stichprobenartig erfolgte ein Vergleich von unbehandeltem und enzymatisch hydrolysiertem Speichel hinsichtlich der SP4.

Material und Methoden

Die Untersuchungen erstreckten sich über einen Zeitraum von 3 Jahren (Februar 1987 bis Januar 1990). Mit Unterstützung der Tierpfleger erfolgte die Probennahme im Abstand von 1–6 Tagen (Speichel) bzw. sporadisch in der Phase einer wahrscheinlichen Trächtigkeit (Kot). Bedingt durch technische Schwierigkeiten im Pflegerbereich war von Mitte August bis Mitte Oktober 1989 keine Probengewinnung möglich.

Bei der Speichelgewinnung und -aufarbeitung wurde analog dem für das Hautsekret von Zwergflußpferden beschriebenen Verfahren vorgegangen (9).

In Vorbereitung der enzymatischen Hydrolyse wurden 400 µl Speichel bei 50°C eingetrocknet, anschließend im gleichen Volumen Phosphatpuffer (pH 5,0) aufgenommen. Nach Zugabe von 5 µl β-Glucuronidase/Arylsulfatase (BOEHRINGER Mannheim) folgte eine Inkubation über 12 Stunden bei 37°C. Die weitere Verarbeitung entsprach der unbehandelten Proben.

Die SP4 wurde mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt (9). Im Verlauf der Untersuchungen ergab sich eine wesentliche Vereinfachung der Prozedur durch Weglassen des Extraktionsschrittes. Voraussetzung dafür war allerdings eine zweite Zentrifugation des Speichels nach dem Auftauen (3500 g, 15 min). Der glasklare Überstand wurde direkt im RIA eingesetzt.

Kotproben wurden 48 h bei 37°C getrocknet, zerkleinert und nach dem Verfahren von BAMBERG & MÖSTL (2) für den RIA aufbereitet. Für den eigentlichen Estradiol-RIA kam ein kommerziell verfügbares Testbesteck zur Bestimmung von Estradiol im Serum (Fa. Isocommerz Berlin-Buch) zum Einsatz, das sich nach entsprechenden Vorversuchen als für unsere Zwecke geeignet erwiesen hatte. Die Kreuzreaktivität des Antiserums lag für Estron bei 3,8%, für Estriol bei 0,48% sowie für weitere Gestagene und Androgene <0,1%.

An den Tagen –11 und –4 a.p. sowie +1 p.p. war es möglich, einige Milliliter abtropfende Milch aufzufangen. Die Progesteron-Konzentrationen in diese Proben wurden freundlicherweise von Frau E. BIRKELBACH (Humboldt-Universität zu Berlin, Sektion Tierproduktion und Veterinärmedizin) im Rahmen routinemäßiger Milchanalysen mit einem Enzymimmunoassay bestimmt.

Ergebnisse

1. Fertilitäts- und Trächtigkeitsdiagnostik

Im Ergebnis liegt das Verlaufsprofil für die SP4 über eine Phase normaler ovarieller Tätigkeit und eine vollständige Trächtigkeit vor (Abb. 1).

Im Zeitraum von Februar 1987 bis September 1988 konnte 5mal arttypisches Brunstverhalten mit „Quietschen“, Spritzharnen, gegenseitigem Treiben usw. beobachtet werden, wobei die Tiere am 23. IV. 1987 und 16. IX. 1988 kopulierten. Keine dieser Phasen sexueller Aktivität reflektierte sich in den Werten der SP4 (Abb. 1A). Auffällig war lediglich eine Erhöhung des Progesteron-Niveaus im Sommer 1988.

Aus der zweiten Kopulation resultierte eine Trächtigkeit, die nach 471 Tagen (459–489 Tage sind die Norm) mit der Geburt eines männlichen Kalbes endete. Erst nach etwa 7 Monaten p.c. begann die SP4 deutlich anzusteigen und erreichte Werte, die bis 14fach über dem durchschnittlichen Progesteron-Niveau lagen. 10 Wochen darauf fiel die SP4 drastisch, gefolgt von einem allmählichen Anstieg über mehrere Wochen. Im letzten Viertel der Gravidität schließlich wurden Spitzenwerte von 25000 pmol/l SP4 und darüber gemessen (Abb. 1B). Mit Einsetzen der Laktation etwa 20 Tage a.p.

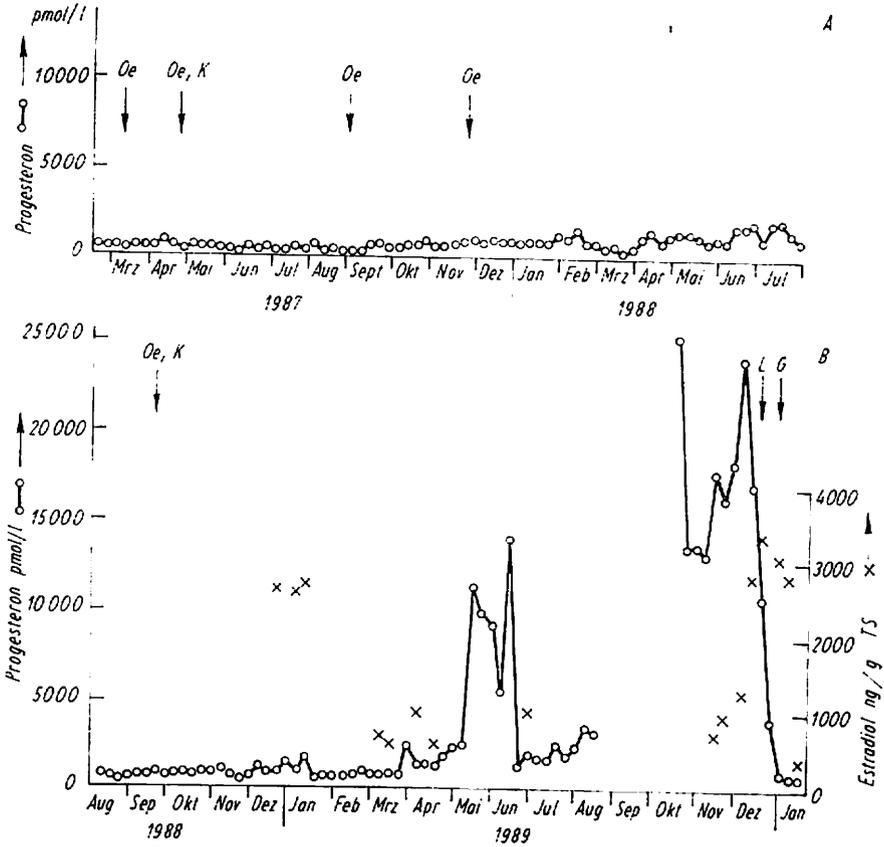


Abb. 1. Verlaufsprofil der Progesteron-Konzentration im Speichel beim Panzernashorn-♀ „Kumari“ von Februar 1987 bis Januar 1990. A – Phase normaler ovarieller Zyklen; B – eine sich anschließende Trächtigkeit.

Brunstverhalten (Oestrus: Oe) einschließlich Kopulation (K) werden durch das Verlaufsprofil nicht reflektiert (A). Ab 7. Monat der Trächtigkeit steigen die Werte auf ein Vielfaches des Basisniveaus, besonders im letzten Viertel (B). Kurz vor der Geburt (G) nimmt die Estradiol-Konzentration im Kot bei gleichzeitiger Abnahme der Progesteron-Konzentration im Speichel zu. L: beobachtetes Einsetzen der Laktation.

begann eine gleichmäßige Abnahme der SP4 bis auf das Basisniveau zum Zeitpunkt der Geburt. Nahezu zeitgleich wurde ein Anstieg der Estradiol-Konzentration im Kot registriert (Abb. 1B).

Die an den Tagen -11 , -4 a.p. und $+1$ p.p. gemessenen Konzentrationen von Progesteron in der Milch (9,9, 2,8 und 1,5 nmol/l) entsprechen in ihrer Tendenz – soweit die Stichproben Aussagen zulassen – der SP4.

2. Vergleich von Extraktions- und direktem RIA

Im Unterschied zum Extraktions-RIA wurde beim direkten RIA der Speichel nach dem Einfrieren und sorgfältiger zweiter Zentrifugation ohne weitere Vorbehandlung im Test eingesetzt. So behandelter Speichel verliert seine Viskosität und ist frei von Ver-

unreinigungen (12, 15). Die Eignung des direkten Verfahrens für unsere Zwecke erwies sich in 2 Vorversuchen: Proben aufeinander folgender Tage bzw. eine zufällige Auswahl von Proben (jeweils $n = 10$) wurden mit beiden Verfahren analysiert und die Resultate gegenübergestellt. In beiden Fällen korrelierten die Ergebnisse gut miteinander

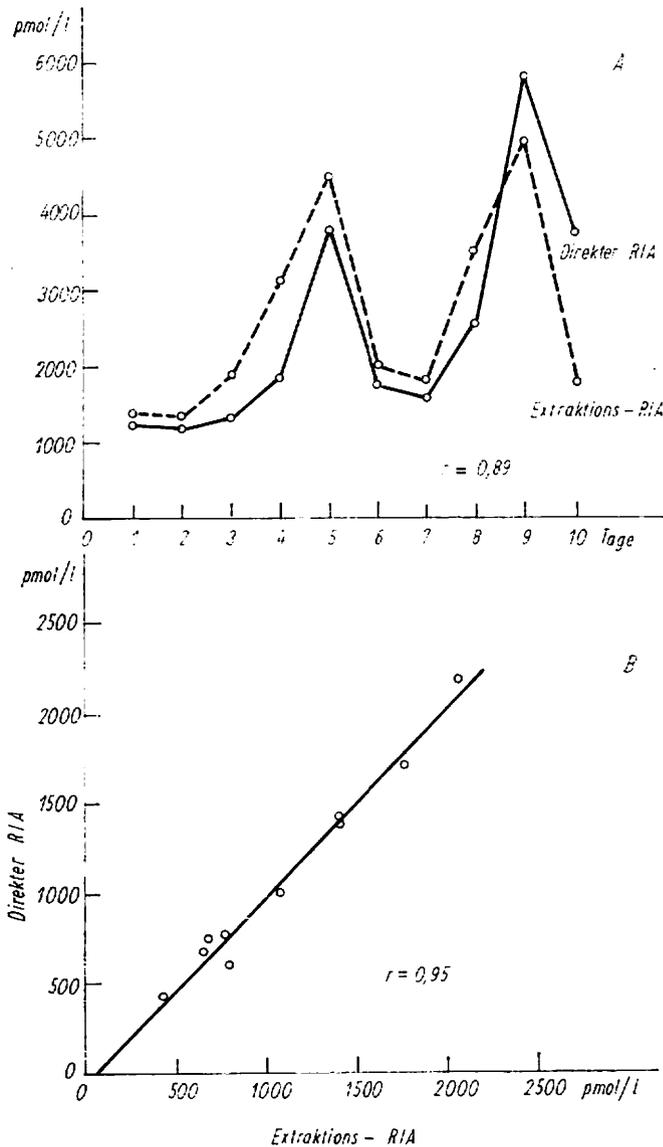


Abb. 2. Vergleich der Meßwerte von Extraktions-RIA und direktem RIA. Es wurden Speichelproben an 10 aufeinander folgenden Tagen (A) bzw. eine zufällige Auswahl (B) hinsichtlich ihrer Progesteron-Konzentration mit beiden Verfahren verglichen. r — Korrelationskoeffizient; in B ist die Regressionsgerade eingetragen.

($r = 0,89$ bzw. $r = 0,95$, Abb. 2A, B). Zur gleichen Einschätzung kamen bereits BOURQUE et al. (3) bei ähnlichen Untersuchungen im humanen Speichel. Die Wiederfindungsraten von zugesetztem „kaltem“ Progesteron (750 bzw. 1500 pmol/l, jeweils $n = 5$) lagen in beiden Verfahren zwischen 83,9 und 104,8%.

3. Enzymatische Hydrolyse

In hydrolysierten Speichelproben wurden gegenüber unbehandeltem Substrat 1,8fach höhere Konzentrationen an nachweisbarem SP4 gefunden. Beide Werte waren mit $r = 0,97$ gut korreliert (Abb. 3).

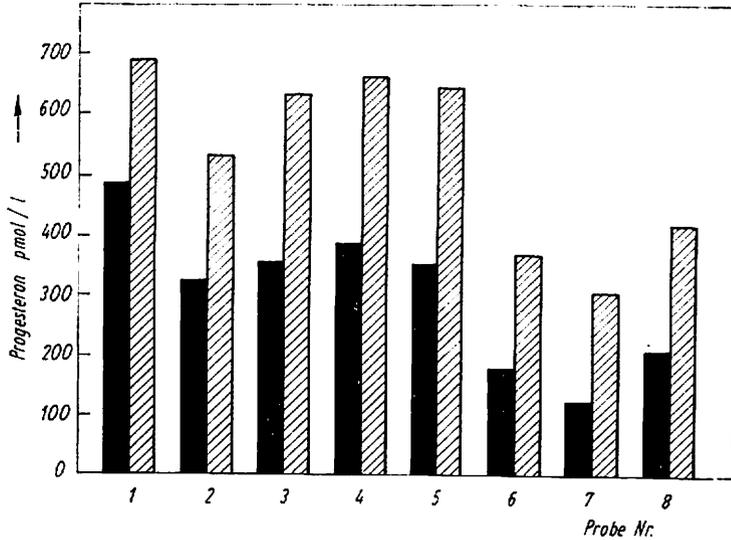


Abb. 3. Gegenüberstellung der Progesteron-Meßwerte von 8 unbehandelten ■ und enzymatisch hydrolysierten [//] Speichelproben. Im hydrolysierten Substrat wurde im Mittel die 1,8fache Menge Progesteron gemessen.

Diskussion

Die angewendete Technik erweist sich als geeignet und erbringt übereinstimmende Resultate mit den bisher bekannten Tatsachen zur Charakterisierung des ovariellen Zyklus beim Panzernashorn. Derartige Daten sowie eine Trächtigkeitsdiagnose liegen anhand von Estronsulfat- bzw. Pregnan diol-3-Glucuronid-(PdG)-Bestimmungen aus dem Urin vor (16, 17, 27). Die von KASMAN et al. (16) aufgestellte Verlaufskurve des PdG aus dem Urin entspricht der Abfolge der SP4 in unseren Untersuchungen (Abb. 1B). In beiden Fällen steigen die Hormonwerte etwa 7 Monate p.c. deutlich an, gefolgt von einer mehrwöchigen Depression. Die Ursachen für das starke Absinken der SP4 zu diesem Zeitpunkt sind unklar, scheinen aber typisch für diese Spezies zu sein. Extrem hohe Konzentrationen von PdG bzw. Progesteron charakterisieren das letzte Viertel der Gravidität. Die SP4 ist also direkt mit der Ausscheidung des PdG (als Hauptmetabolit des Progesterons) über den Urin vergleichbar. Beide Substanzen sind zur Trächtigkeitsdiagnose geeignet. Auch wenn diese erst in der zweiten Hälfte der Gravidität möglich wird, kann dem Tiergärtner damit ein wichtiges Hilfsmittel zur Einschätzung

seiner Tiere sowie zur Vorbereitung auf den Nachwuchs gegeben werden. Die Darstellung des Sexualzyklus ist nach unseren Ergebnissen mit Hilfe der SP₄ nicht möglich. Für diesen Zweck besser geeignet erwiesen sich neben Estronsulfat im Urin beim Panzernashorn auch 17 α -OH-Progesteron und 20 α -OH-Gestagen aus dem Speichel des Spitzmaulnashorns (6, 7).

Eine auffällige Änderung des Progesteron/Östrogen-Verhältnisses zum Ende der Gravidität wurde bereits von MCGARRIGLE & LACHELIN (19) für den Menschen und verschiedene Säugetiere beschrieben. BAMBERG & MÖSTL (2) fanden im Kot von Przewalskipferd, Mhorr gazelle und Schabrackentapir extrem hohe Östrogenwerte zum Ende der Trächtigkeit. Im Fall unseres Panzernashorns ist ein Anstieg der Estradiol-Konzentration im Kot nahezu zeitgleich mit der Abnahme der SP₄ zu beobachten. Diese Tatsache kann als bestätigendes Indiz in die Diskussion über die Bedeutung dieses Vorganges für die Geburtseinleitung (4, 18) eingebracht werden.

Unterschiedliche Ansichten bestehen zu der Frage, in welcher Form Steroide im Speichel vorkommen können. Nach RIAD-FAHMY et al. (28), WALKER et al. (30), ZORN et al. (33) u. a. reflektieren die Konzentrationen von Steroiden im Speichel deren ungebundene Fraktion im Plasma. So wurden zum Beispiel im Speichel des Menschen zwischen 41,4 und 53,7% freies Progesteron gefunden. FERGUSON (12) verneint eine Bindung von Steroiden an Speichelproteine, EVANS (11) schließt dagegen die Existenz solcher Komplexe nicht aus.

Unsere Untersuchungen hinsichtlich der enzymatischen Hydrolysierbarkeit des Substrates verweisen auf die tatsächlich vorliegende Konjugation von etwa 45% des Speichelprogesterons. Die Spezifika des verwendeten Enzymgemisches machen das Vorliegen von Glucuroniden bzw. Steroid/Proteinkomplexen (über Glucuronsäurereste) wahrscheinlich. Transportmechanismen innerhalb der Speicheldrüsen sind nach VINING et al. (29) auch für solche großen Moleküle vorhanden.

Zusammenfassend sei darauf verwiesen, daß Hormonbestimmungen in Sekreten und Exkreten eine mögliche Alternative zu den klassischen Methoden der Fertilitäts- und Trächtigkeitsdiagnostik darstellen, wobei deren Eignung und Aussagekraft von Fall zu Fall, d. h. von Art zu Art, neu geprüft werden muß (17, 23, 27). Es geht bei der Forschung in Zoologischen Gärten nicht nur um eine Dokumentation reproduktiver Ereignisse, vielmehr sollten Sammlungen normativer Profile, basierend auf Bekanntem, angelegt werden und zur Beurteilung des reproduktiven Status zur Verfügung stehen.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich herzlich bei den Tierpflegern des Dickhäuter-Revieres des Tierparks Berlin und den technischen Assistentinnen MARION BIERING und KATREN PASCHMIONKA für umfangreiche Mitarbeit.

Zusammenfassung

Die Progesteron-Konzentration im Speichel (SP₄) eines weiblichen Panzernashorns (*Rhinoceros unicornis*) wurde hinsichtlich ihrer diagnostischen Aussagefähigkeit zu Oestruszyklus und Trächtigkeit untersucht. Erst ab 7. Monat p.e. war die Gravidität am deutlich erhöhten SP₄-Spiegel sicher nachweisbar. Aussagen zum Oestruszyklus waren dagegen nicht möglich. Wie Einzelproben von Milch vor und nach der Geburt ergaben, kann auch daraus Progesteron bestimmt und vergleichbar bewertet werden.

Starker Abfall von Progesteron (im Speichel) und Ansteigen von Estradiol (im Kot) kurz vor der Geburt sind eindeutige Anzeichen. Sie unterstützen auch die These, nach der den Estrogenen bei der Geburtsauslösung eine wesentliche Bedeutung zukommt. Vergleiche von unbehandelten und enzymatisch hydrolysierten Speichelproben lassen eine teilweise Konjugation des Progesterons in diesem Substrat vermuten.

Summary

During 3 years including a full gestation period, the course of salivary progesterone (SP4) profile of a female Indian rhino was studied to test its diagnostic aptitude for oestrus and pregnancy detection. First a distinct rise of SP4 from month 7 after mating indicated clearly pregnancy; specification of oestrus cycles was not possible on this basis yet. Just before birth, progesterone (in saliva) dropped whereas estradiol (in faeces) increased. This tendency could be confirmed from casual perinatal milk progesterone analyses.

A comparison of direct SP4 measurement with hydrolyzed samples gave clues for the occurrence of partially conjugated progesterone in saliva.

Schrifttum

1. BAMBERG, E., MÖSTL, E., CHOI, H. S., & ISMAIL, M. N. (1986): Östrogenbestimmung im Kot zur Trächtigkeitsdiagnose bei Zootieren. 7. Symp. Dt. Veterinärmed. Gesellsch. 13.—15. 3., Giessen.
2. —, & — (1988): Pregnancy test in zoo animals by EIA of oestrogens in faeces. Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. Artificial Insem., Dublin, Vol. 2, Abstr. 82.
3. BOURQUE, J., SULON, J., DEMEY-PONSART, E., SODOYEZ, J. C., & GASPARD, U. (1986): A simple, direct radioimmunoassay for salivary progesterone determination during the menstrual cycle. Clin. Chem. 32, 948—951.
4. CHALLIS, J. R. G. (1971): Sharp increase in free circulating oestrogens immediately before parturition in sheep. Nature 229, 208.
5. CHOI, H. S. (1987): Immunologische Bestimmung von Sexualsteroiden zur Fertilitätskontrolle bei Rind, Schwein und Pferd. Wien. tierärztl. Msehr. 74, 14—22.
6. CZEKALA, N. M. (1988): pers. Mitt.
7. — (1989): pers. Mitt.
8. DATHE, H. H. (1985): Zur Anwendbarkeit biotechnischer Methoden in Zoologischen Gärten. Milu, Berlin, 6, 325—335.
9. —, & KUCKELKORN, B. (1989): Progesteronnachweis in Sekreten des Zwergflußpferdes (*Choe-ropsis liberiensis* Morton, 1844). D. Zool. Garten (NF) 59, 201—208.
10. ERB, L., LASLEY, B. L., CZEKALA, N. M., MONFORT, S. L., & BERCOVITZ, A. B. (1982): A dual radioimmunoassay and cytosol receptor binding assay for the measurement of estrogenic compounds applied to urine, fecal and plasma samples. Steroids 39, 33—46.
11. EVANS, J. J. (1986): Progesterone in saliva does not parallel unbound progesterone in plasma. Clin. Chem. 32, 542—544.
12. FERGUSON, D. B. (1984): Physiological considerations in the use of salivary steroid estimation for clinical investigations. Front. oral Physiol. 5, 1—20.
13. GAO, Y., SHORT, R. V., & FLETCHER, T. P. (1988): Progesterone concentrations in plasma, saliva and milk of cows in different reproductive states. Br. Vet. J. 144, 262—268.
14. HOFFMANN, B. (1977): Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind. Berlin u. Hamburg.
15. KANCHEV, I. N., MARINOVA, C. P., & STANKOV, B. M. (1988): Bovine salivary progesterone: Application to the assessment of ovarian function and early pregnancy diagnosis. Anim. Reprod. Sci. 17, 1—8.

16. KASMAN, L. H., RAMSAY, E. C., & LASLEY, B. L. (1986): Urinary steroid evaluations to monitor ovarian function in exotic ungulates: III. Estrone sulfate and pregnanediol-3-glucuronide excretion in the Indian rhinoceros. *Zoo Biol.* **5**, 355–361.
17. KASSAM, A. A. H., & LASLEY, B. L. (1981): Estrogen excretory patterns in the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) determined by simplified urinary analysis. *Am. J. Vet. Res.* **42**, 251–255.
18. LIGGINS, G. L., FAIRCLOUGH, R. G., GRIEVES, S. A., KENDALL, J. Z., & KNOX, B. X. (1973): The mechanism of parturition in the ewe. *Recent Prog. Horm. Res.* **29**, 111–150.
19. MCGARRIGLE, H. H. G., & LACHELIN, G. C. L. (1984): Increasing saliva (free) oestriol to progesterone ratio in late pregnancy: a role for oestriol in initiating spontaneous labour in man? *Br. Med. J.* **289**, 457–459.
20. MÖSTL, E., CHOI, H. S., WURM, W., & BAMBERG, E. (1983): Trächtigkeitsdiagnose beim Rind mittels Östrogenbestimmung im Kot. *Wien. tierärztl. Mschr.* **70**, 60–61.
21. —, NÖBAUER, H., CHOI, H. S., WURM, W., & BAMBERG, E. (1983): Trächtigkeitsdiagnose bei der Stute mittels Östrogenbestimmung im Kot. *D. prakt. Tierarzt* **64**, 491–494.
22. —, CHOI, H. S., WURM, W., ISMAIL, N., & BAMBERG, E. (1984): Pregnancy diagnosis in cows and heifers by determination of oestradiol-17 α in faeces. *Br. Vet. J.* **140**, 287–291.
23. —, MEYER, H. H. D., HEGEL, G. v., WIESNER, H., & BAMBERG, E. (1987): Trächtigkeitsdiagnose bei Zootieren mittels Östrogenbestimmung im Kot. *Vortragsveranst. Physiologie u. Pathologie der Fortpflanzung*, 12.–13. 3., Rosenheim.
24. NECHANSKY, S., CHOI, H. S., & BAMBERG, E. (1984): Trächtigkeitssnachweis beim Rind mittels dünn-schichtchromatographischer Östrogenbestimmung im Kot. *Zuchthyg.* **19**, 70–73.
25. RISLER, L., WASSER, S. K., & SACKETT, G. P. (1987): Measurement of excreted steroids in *Macaca nemestrina*. *Am. J. Primatol.* **12**, 91–100.
26. RAHIM, S. E. A. A., & EL-NAZIER, A. E. (1987): Estimation of progesterone levels in camels (*Camelus dromedarius*) milk and its application in pregnancy diagnosis. *Br. Vet. J.* **143**, 555–559.
27. RAMSAY, E. C., KASMAN, L., & LASLEY, B. L. (1985): Urinary steroid evaluations for monitoring ovarian function in Indian and Black rhinoceros. *Ann. Meeting Americ. Ass. of Zoo Veterinarians*, Scottsdale, Arizona.
28. RIAD-FAHMY, D., READ, G. F., WALKER, R. F., & GRIFFITHS, K. (1982): Steroids in saliva for assessing endocrine function. *Endocr. Rev.* **3**, 367–395.
29. VINING, R. F., & MCGINLEY, R. A. (1984): Flux of steroids between blood and saliva. *Front. oral Physiol.* **5**, 21–32.
30. WALKER, R. F., READ, G. F., & RIAD-FAHMY, D. (1979): Radioimmunoassay of progesterone in saliva: Application to the assessment of ovarian function. *Clin. Chem.* **25**, 2030–2032.
31. WILDT, D. E. (1989): Reproductive research in conservation biology: priorities and avenues for support. *J. Zoo Wildlife Med.* **20**, 391–395.
32. WORSFOLD, A. I., BOOTH, J. M., WELLS, P. W., HUDDART, A. C., & STANLEY, C. J. (1987): The evaluation of a new rapid milk progesterone test as an aid to improving dairy herd fertility. *Br. Vet. J.* **143**, 83–87.
33. ZORN, J. R., McDONOUGH, P. G., NESSMAN, C., JANSSENS, Y., & CEDARD, L. (1984): Salivary progesterone as an index of the luteal function. *Fertil. Steril.* **41**, 248–253.

Dr. BERND KUCKELKORN & Prof. Dr. sc. HOLGER H. DATHE,
 Forschungsstelle für Wirbeltierforschung (im Tierpark Berlin), Am Tierpark 125,
 O-1136 Berlin (BRD)