

*In-vivo*-Untersuchungen zur Rolle von  
Prostaglandinen ( $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ ) bei der Regulation  
der Corpus luteum Funktion beim Hund

---

**Julia Fingerhut**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Fachbereich Veterinärmedizin  
Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß-  
und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

***In-vivo*-Untersuchungen zur Rolle von  
Prostaglandinen (PGE<sub>2</sub>/PGF<sub>2α</sub>) bei der Regulation der  
Corpus luteum Funktion beim Hund**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Dr. med.vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Julia Fingerhut**

Tierärztin aus Jülich

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Gutachter u. Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

2. Gutachter u. Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Martin Bergmann

Weiteres Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Joachim Geyer

Tag der mündlichen Prüfung: 04 Juni 2014

MEINEN ELTERN

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
1 Einleitung.....	4
2. Literaturübersicht.....	5
2.1 Der Reproduktionszyklus der Hündin .....	5
2.1.1 Einteilung aus klinischer und verhaltensbiologischer Sicht.....	5
2.1.2 Übersicht: Hormonelle Steuerung des Reproduktionszyklus .....	7
2.2 Steuerung der Gelbkörperfunktion .....	8
2.2.1 Hypophysäre und hypothalamische Regelfaktoren .....	10
2.2.2 Parakrine/ autokrine Regelfaktoren .....	12
2.2.2.1 Faktoren des Immunsystems .....	12
2.2.2.2 Prostaglandine (PG) .....	12
2.2.2.3 Steroide.....	15
2.3 Morphologie und Histologie des Corpus luteum im Verlauf des Diöstrus .....	17
2.4 Prostaglandinbiosynthese .....	19
2.5 Isoformen der Cox.....	21
2.6 Wirkungsweise der Prostaglandine .....	22
2.7 Cox-Hemmer .....	23
2.7.1 Spezifische Cox2-Hemmer.....	23
2.7.2 Firocoxib als spezifischer Cox2-Hemmer .....	24
3. Material und Methoden .....	25
3.1 Versuchsaufbau .....	25
3.2 Tiere .....	26
3.3 Blutproben.....	28
3.4 Hormonanalytische Verfahren .....	29
3.4.1 Radioimmunologische Bestimmung von Progesteron (P <sub>4</sub> ).....	29
3.4.1.1 Prinzip.....	29
3.4.1.2 Testdurchführung.....	29
3.4.1.3 Auswertung.....	31
3.4.1.4 Qualitätskontrolle .....	31
3.4.1.5 Antiserum.....	32

3.4.2 Bestimmung von 13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin F <sub>2α</sub> (PGFM) mit einem kommerziellen EIA-Kit (Enzymimmunoassay) .....	33
3.4.2.1 Prinzip .....	33
3.4.2.2 Vorversuche zur Etablierung des Tests .....	35
3.4.2.3 Testdurchführung .....	40
3.4.2.4 Auswertung .....	42
3.4.2.5 Inter- und Intraassayvariabilität .....	42
3.4.3 Bestimmung von Bicyclo PGEM mit einem kommerziellen EIA-Kit .....	43
3.4.3.1 Prinzip .....	43
3.4.3.2 Derivatisierung .....	44
3.4.3.3 Überprüfung der Zuverlässigkeit des Tests .....	45
3.4.3.4 Testdurchführung .....	46
3.4.3.5 Auswertung .....	47
3.4.3.6 Inter- und Intraassayvariabilität .....	47
3.5 Untersuchungen der Gewebeproben .....	48
3.5.1 Ausmessen der Luteinzellkernflächen .....	48
3.5.2 Immunhistochemischer Nachweis der Cox2 im Corpus luteum der Hündin .....	50
3.5.2.1 Antikörper und Serum .....	50
3.5.2.2 Testdurchführung .....	50
3.5.2.3 Auswertung der Präparate .....	52
3.5.3 Immunhistochemischer Nachweis des Proliferationsmarkers Ki67 .....	53
3.5.3.1 Antikörper und Serum .....	53
3.5.3.2 Testdurchführung .....	53
3.5.3.3 Auswertung der Gewebeschnitte .....	55
3.6 Statistische Auswertung .....	56
3.7 Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	57
3.8 Puffer und Lösungen .....	59
3.8.1 Puffer und Lösungen für P <sub>4</sub> -RIA .....	59
3.8.2 Puffer und Lösungen für die Prostaglandinbestimmung .....	59
3.8.3 Puffer und Lösungen für Immunhistochemie .....	60
3.9 Reagentien .....	62

4. Ergebnisse.....	63
4.1 Verläufe der P <sub>4</sub> -Konzentrationen bei der Kontroll- und Behandlungsgruppe...	63
4.2 Ergebnisse der PGFM-Bestimmung bei der Behandlungs- und Kontrollgruppe .....	67
4.3 Ergebnisse der Bicyclo PGEM-Bestimmung bei der Behandlungs- und Kontrollgruppe.....	70
4.4 Ergebnisse der Ausmessung der Fläche der Kerne der Luteinzellen.....	73
4.5 Darstellung der Cox2 mittels Immunhistochemie .....	75
4.6 Darstellung von Ki67 mittels Immunhistochemie .....	79
5. Diskussion .....	82
5.1 Diskussion des Versuchsaufbaus.....	82
5.2 Diskussion hormonanalytische Methoden .....	84
5.2.1 Progesteron .....	84
5.2.2 Prostaglandine.....	84
5.2.3 Messung der Fläche der Luteinzellkerne .....	85
5.2.4 Diskussion Immunhistochemie .....	86
5.3 Diskussion der Ergebnisse .....	86
5.3.1 Diskussion der Ergebnisse der Luteinzellkerngrößen.....	86
5.3.2 Diskussion der Ergebnisse der Progesteronbestimmung .....	87
5.3.3 Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen	88
5.3.4 Diskussion der Ergebnisse der Prostaglandinbestimmung.....	89
6 Zusammenfassung .....	91
7 Summary .....	93
8 Literaturverzeichnis .....	95
9 Abbildungsverzeichnis .....	115
10 Tabellenverzeichnis .....	117
11. Abkürzungsverzeichnis.....	118



## 1 Einleitung

Nachdem in vorausgehenden Untersuchungen Hinweise auf eine luteotrope Funktion von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) beim Hund erhalten wurden (Kowalewski et al., 2008a; 2012; 2013), sollte in einer weiterführenden Studie der Frage nachgegangen werden, ob unter *In-vivo*-Bedingungen durch Hemmung der endogenen Prostaglandinfreisetzung während des ersten Drittels des Diöstrus eine Beeinflussung der caninen Corpus luteum (CL)-Funktion nachweisbar ist.

Das Vorhaben wurde gemeinsam mit der Arbeitsgruppe Proff. Janowski/ Zdunczyk, University of Warmia and Mazury, Olsztyn, Polen geplant, wobei den polnischen Partnern die Durchführung der Tierversuche oblag (Projekt Nr. NN 308225936).

Die Überprüfung der Hypothese, ob eine Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Sekretion beim Hund einen negativen Einfluss auf den Funktionszustand des Corpus luteum aufweist, sollte in vorliegender Arbeit durch Erfassung geeigneter endokrinologischer und morphologischer Parameter erfolgen.

So sollten durch Erfassung der Progesteron (P<sub>4</sub>)-Konzentrationen und der Luteinzellkerngrößen Hinweise auf den Aktivitätszustand der Luteinzellen erhalten werden. Ebenfalls sollte überprüft werden, ob die Expression der Cyclooxygenase 2 (Cox2)<sup>1)</sup> sowie des Proliferationsmarkers Ki67 durch die Behandlung mit einem spezifischen Cox2-Hemmer beeinflusst werden.

Des Weiteren sollten durch die Messungen der Prostaglandinmetaboliten, PGFM und Bicyclo PGEM, im peripheren Blut Hinweise auf eine „sonstige“ Beeinflussung der Prostaglandinsynthese erhalten werden.

<sup>1)</sup>auch Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 (PTGS2), wird aber im Folgenden als Cox2 bezeichnet

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Der Reproduktionszyklus der Hündin

Der domestizierte Hund (*Canis lupus familiaris*) gehört zu den monoöstrischen, in der Regel asaisonalen, spontan ovulierenden Spezies (Johnston et al., 2001; Feldmann & Nelson, 2004; Concannon, 2011), wobei eine Spannweite von einem bis zu vier Zyklen pro Jahr vorkommen kann (Johnston et al., 2001).

Die klassische Einteilung des Reproduktionszyklus der nicht graviden Hündin erfolgt nach Evans & Cole (1931) in vier Phasen (Proöstrus, Dauer: 5-20 Tage; Östrus, Dauer: 5-15 Tage; Diöstrus, Dauer: 50-80 Tage; Anöstrus, Dauer: 80-240 Tage), die, wie Abb. 1 (Seite 9) zeigt, unter definierter hormoneller Kontrolle stehen, wobei sich in zahlreichen Textbüchern und Veröffentlichungen zum Teil stark variierende Angaben über die Dauer der einzelnen Phasen finden (Evans & Cole, 1931; Arbeiter, 1994; Johnston et al., 2001; Feldmann & Nelson, 2004).

Unter Östrogeneinfluss kommt es zu einer Proliferation der Vaginalschleimhaut, so dass mehrere Zellschichten entstehen. Die oberste Epithelzellschicht weist demnach einen dem Zyklusstadium entsprechenden Verhornungsgrad auf, welcher anhand von Zellausstrichen überprüft werden kann. Neben den Zellausstrichen und dem Verhalten der Hündin gegenüber dem Rüden, kann auch die Messung der P<sub>4</sub>-Konzentration im Blut zur Kontrolle des Zyklusstandes beziehungsweise des Ovulationszeitpunktes herangezogen werden (Arbeiter et al., 1991; Arbeiter 1994).

#### **2.1.1 Einteilung aus klinischer und verhaltensbiologischer Sicht**

Ausführliche Angaben zu den einzelnen Phasen des caninen Zyklus finden sich unter anderem in den Übersichtsarbeiten von Arbeiter (1994) und Berchtold (1993), sowie bei Feldmann & Nelson (2004) und Johnston et al. (2001).

Proöstrus: Dauer 5-20 Tage

Der Beginn des Proöstrus ist durch die östrogenbedingte Diapedese-Blutung gekennzeichnet und endet mit der Duldung des Rüden. Weiterhin klinisch sichtbar

sind eine Ödematisierung von Vulva und Perineum, sowie eine Hyperämie und Ödematisierung der Vaginalschleimhaut mit der Ausbildung von tiefen Längs- und Querfalten und Bildung von rötlichem Sekret. Die Hündin erscheint auf Grund der Sexualpheromone, die im vaginalen Ausfluss enthalten sind, für Rüden attraktiv, zeigt jedoch noch keine Paarungsbereitschaft. In der exfoliativen Vaginalzytologie finden sich vor allem Erythrozyten, sowie Basal-, Parabasal- und Intermediärzellen. Das klinische Erscheinungsbild wird maßgeblich durch die in dieser Phase ansteigenden und Maximalwerte erreichenden Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen bestimmt (Concannon, 2009).

Östrus: Dauer 5-15 Tage

Während der Dauer des Östrus zeigt die Hündin ein ausgeprägtes Duldungsverhalten. In der Vaginoskopie zeigt sich die Schleimhaut jetzt trocken bis pappig und schrumpft unter Ausbildung von kleineren Falten. Im Abstrich findet man vor allem große Superfizialzellen und Schollen, während Erythrozyten praktisch nicht mehr zu beobachten sind.

Diöstrus: Dauer 50-80 Tage

Der Diöstrus beginnt mit dem Verlust der Akzeptanz des Rüden. Die Vaginalschleimhaut zeigt sich in der Vaginoskopie longitudinal gefältelt, feucht und von blassrosaner Farbe. Mit Beginn des Diöstrus nimmt im Vaginalabstrich die relative Zahl an Superfizialzellen ab, während die der Parabasal- und Intermediärzellen ansteigt. Auch neutrophile Granulozyten als Reaktion des Endometriums auf die offene Cervix können auftreten.

Anöstrus: Dauer 80-240 Tage

Der Anöstrus ist definiert durch die Abwesenheit äußerlich erkennbarer ovarieller Aktivität (Concannon, 2011). Die Schleimhaut ist feucht, blassrosa und wenig konturiert. Der Ausstrich ist insgesamt zellarm, man findet Zellen aller Gewebeschichten, in der Regel jedoch keine Superfizialzellen.

### **2.1.2 Übersicht: Hormonelle Steuerung des Reproduktionszyklus**

Während des Proöstrus herrscht auf Grund der mit der Follikelanbildung ansteigenden Sekretion von Estradiol-17- $\beta$  eine Östrogendominanz (Übersicht bei Feldmann & Nelson, 2004), wobei Höchstwerte im Bereich von 20-120 pg/ml gemessen wurden (Jones et al., 1973; Concannon et al., 1975; Nett et al., 1975; Hoffmann et al., 1992; Concannon, 2011). Die Phase des Proöstrus endet mit dem Auftreten des präovulatorischen LH-Gipfels (Luteinisierendes Hormon; Concannon, 2011). Dieser tritt als Ergebnis der positiv rückkoppelnden Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  zeitgleich mit dem Abfall der Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen auf (Wildt et al., 1979; Klein et al., 2003). Eine Besonderheit der Hündin ist die zu einem messbaren Anstieg von P<sub>4</sub> im peripheren Blut führende präovulatorische Luteinisierung der Granulosazellen [Concannon et al., 1977a; Wildt et al., 1979; Feldmann & Nelson, 2004 (Übersichtsarbeit)]. Zum Zeitpunkt des Auftretens des präovulatorischen LH-Gipfels liegen die Werte bei ca. 2 ng P<sub>4</sub>/ml Blutplasma, zum Zeitpunkt der Ovulation bei ca. 5 ng/ml Blutplasma (Bouchard et al., 1991; Concannon, 1993). Innerhalb von 48-60 Stunden nach dem Beginn des LH-Anstiegs kommt es zur Ovulation (Concannon et al., 1977a; Concannon, 2011).

Im Verlauf des Diöstrus erreichen die P<sub>4</sub>-Konzentrationen Maximalwerte im Bereich von im Mittel 30 bis zu 80 ng/ml zwischen Tag 20 und 35 post ovulationem (p.o.; Concannon et al., 1987; 1989; Hoffmann et al., 1992; Concannon, 2011).

Der Übergang vom Diöstrus in den Anöstrus ist durch den Abfall des P<sub>4</sub> auf Werte  $\leq$  1 ng/ml definiert (Concannon, 1993; Hoffmann & Schneider, 1993).

Im Verlauf des Anöstrus steigt die Verfügbarkeit von FSH (Follikel Stimulierendes Hormon) und LH, welches letztlich zu einer Aufregulation der Follikulogenese mit der Ausbildung von Tertiärfollikeln führt (Concannon, 1993; Johnston et al., 2001; Okkens & Kooistra, 2006). Eine Auslösung der positiv rückkoppelnden Wirkung von Estradiol-17 $\beta$  ist offensichtlich jedoch erst am Ende des Anöstrus möglich (Klein et al., 2003).

## 2.2 Steuerung der Gelbkörperfunktion

Sowohl bei der graviden als auch bei der ingraviden Hündin wird  $P_4$  ausschließlich von den Corpora lutea gebildet (Sokolowski, 1971; Concannon et al., 1989).

Eine Besonderheit bei der Hündin ist, dass das  $P_4$ -Profil von graviden und ingraviden Hündinnen nahezu identisch ist, wie Abb. 1 (Seite 9) zeigt (Hoffmann et al., 1992). Maximalwerte werden zwischen Tag 10 und 30 p.o. gemessen, danach erfolgt ein allmählicher Abfall, der bei der graviden Hündin kurz vor dem Partus in einen abrupten Abfall übergeht, während bei der ingraviden Hündin die Konzentrationen langsam bis auf einen Wert von  $\leq 1$  ng/ml Blutplasma abfallen (Concannon et al., 1977b; 1978; Hoffmann et al., 1999). Daraus ergibt sich, dass die Lutealphase der ingraviden Hündin deutlich länger sein kann als die der graviden Hündin. Dies weist auf spezielle Gegebenheiten der Regulation der CL-Funktion bei der Hündin im Vergleich zu anderen Haussäugetieren hin, worauf im Folgenden näher eingegangen werden soll.

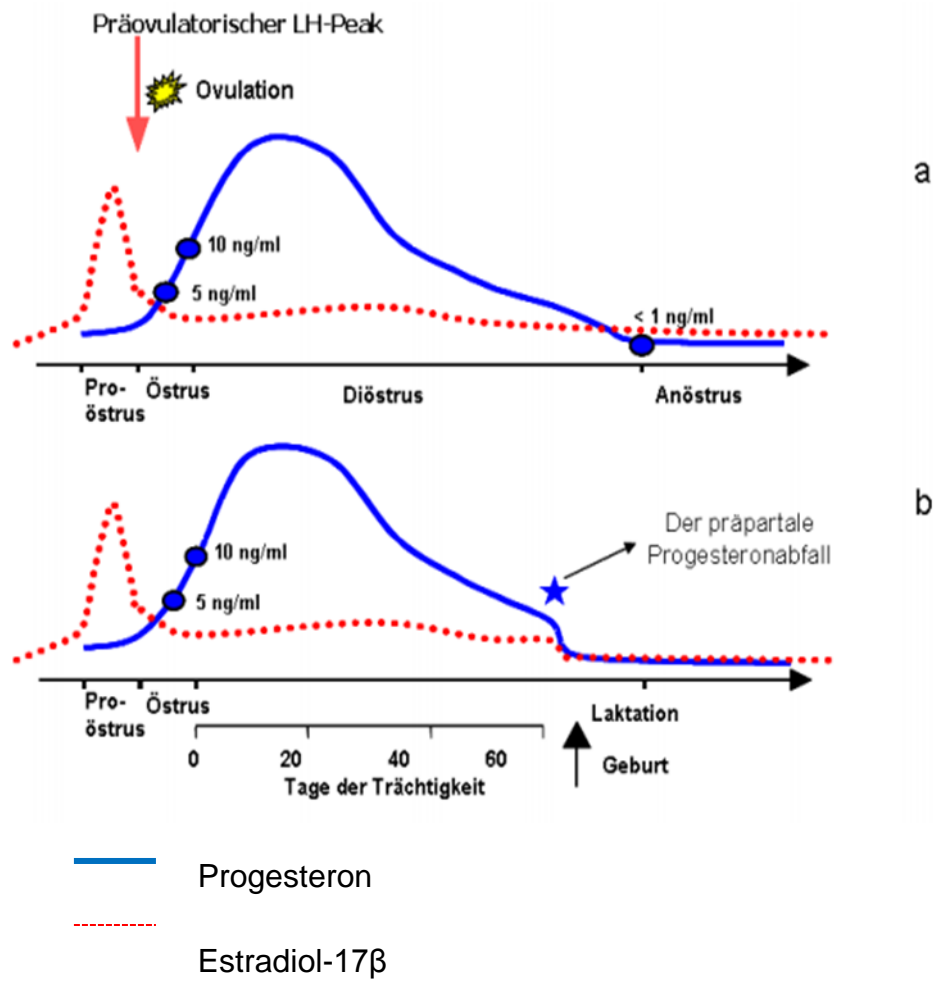


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Verlaufs der Progesteron- und Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen von ingraviden (a) und graviden Hündinnen (b) (nach Hoffmann et al., 1999)

### **2.2.1 Hypophysäre und hypothalamische Regelfaktoren**

Etwa ab dem zweiten Drittel des Diöstrus ist das Corpus luteum sowohl von graviden als auch ingraviden Hündinnen auf die hypophysären Gonadotropine angewiesen (Concannon, 1993; 2009; 2011). So berichteten Okkens et al. (1986), dass eine Hypophysektomie während der frühen Lutealphase am Tag 4 p.o. die Lutealfunktion nicht nachhaltig beeinflusst. Ein Abfall der  $P_4$ -Konzentration war nur vorübergehend zu beobachten und erholte sich innerhalb von sechs bis zehn Tagen. Eine Hypophysektomie ab Tag 18 p.o. (Okkens et al., 1986) beziehungsweise zwischen Tag 35 und 55 nach Östrusbeginn (Concannon, 1980) führte dagegen zu einem unmittelbaren und permanenten Abfall der peripheren  $P_4$ -Konzentrationen auf Basalniveau. 1987 konnten Concannon et. al. nach Verabreichung eines Anti-LH-Serums (anti-Rind LH Serum vom Pferd) an Tag 42 der Trächtigkeit beziehungsweise des ovariellen Zykluses einen vorübergehenden, ca. drei Tage dauernden  $P_4$ -Abfall beobachten. Eine Hemmung von Prolaktin nach Verabreichung des Dopaminagonisten Bromocriptin führte dagegen ab dem 22. Tag nach dem LH-Gipfel zu einem permanenten  $P_4$ -Abfall, der bei den tragenden Tieren zum Abort führte (Concannon et al., 1987). Eine entsprechende Beobachtung machten Onclin et al. (1993) sowie Onclin & Verstegen (1997), die nach Anwendung des Dopaminagonisten Cabergolin am 30. Tag nach dem LH-Gipfel einen dramatischen Abfall der  $P_4$ -Konzentration im Blutplasma vier bis fünf Tage nach der Injektion sowohl bei graviden als auch bei ingraviden Hündinnen beobachteten. Eine Suppression von LH nach Anwendung des GnRH (Gonadotropin Releasing Hormon)-Antagonisten Acyline am Tag 25-35 der Trächtigkeit führte innerhalb von sieben Tagen zum Abort, welcher stets mit einem Abfall der  $P_4$ -Konzentration auf  $< 2$  ng/ml einherging (Valiente et al., 2009). Aus diesen Versuchen wird deutlich, dass sich die Ausschaltung der Gonadotropine LH und Prolaktin sowohl bei graviden als auch ingraviden Hündinnen etwa ab dem zweiten Drittel der Lutealphase negativ auf die CL-Funktion, gemessen an der  $P_4$ -Produktion, auswirkt. Dies zeigt die Abhängigkeit des Corpus luteum ab dem ca. 20. Tag p.o. sowohl bei der graviden als auch bei der ingraviden Hündin von Prolaktin und LH (Concannon et al., 1987), wobei Prolaktin als der im Vordergrund stehende luteotrope Faktor beschrieben wird (Okkens et al., 1990).

Trotz der ansteigenden Prolaktinkonzentrationen in den letzten beiden Dritteln des Diöstrus beziehungsweise der Trächtigkeit (Graf, 1978), kommt es jedoch zu einem allmählichen Abfall der  $P_4$ -Konzentrationen im peripheren Blut. Untersuchungen von Fernandes et al. (1987), in denen über eine gleichbleibende Konzentration des Prolaktinrezeptors (PRLr) im CL berichtet wird, legten zunächst nahe, dass dieser Abfall als ein von der Prolaktinverfügbarkeit unabhängiges Phänomen anzusehen ist. Neuste Untersuchungen zur Expression des PRLr weisen jedoch auf eine Downregulation des Rezeptors zum Ende des Diöstrus beziehungsweise der Gravidität hin und führten zu der Hypothese, dass die luteale Bereitstellung von  $P_4$  auf Ebene des PRLr reguliert werden könnte (Kowalewski et al., 2011). Nachdem Kowalewski et al. (2008b) bisher die luteale Regression bei der nicht graviden Hündin als einen „Alterungsprozess“ ohne spezifische Regelfaktoren bezeichnet haben, handelt es sich hier um die ersten Hinweise überhaupt, die auf eine aktive Regulation der lutealen Regression der ingraviden Hündin schließen lassen.



## **2.2.2 Parakrine/ autokrine Regelfaktoren**

### *2.2.2.1 Faktoren des Immunsystems*

Bei Ratte, Maus, Meerschweinchen, Schaf, Schwein, Rind und Mensch konnte gegen Ende des Diöstrus eine erhöhte Infiltration von Immunzellen in das CL beobachtet werden (Hehnke et al., 1994; Niswender et al., 2000; Pate & Landis Keyes, 2001; Hoffmann et al., 2004b), wobei deren Produkte, die Zytokine, sowohl stimulierende (Kirsch et al., 1981; Naito & Takahashi, 1988; Emi et al., 1991) als auch hemmende (Benyo & Pate, 1992; Fukuoka et al., 1992) Wirkungen auf die steroidogene Funktion des CL ausüben. Auch im caninen CL konnte zu Beginn des Diöstrus eine vermehrte Präsenz von Lymphozyten (CD4-, CD-8 und MHC II-antigen exprimierende Zellen) beobachtet werden, wobei in der zweiten Hälfte des Diöstrus vor allem CD-8 und MHC II-antigen exprimierende Zellen beobachtet wurden (Hoffmann et al., 2004a). Die Zytokine Interleukin (IL)-8, IL-10, IL-12, Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Transforming-Growth-Factor  $\beta$  1 (TGF $\beta$ 1) konnten zu allen Zeitpunkten des Zyklus im caninen CL nachgewiesen werden (Engel et al., 2005), so dass Hoffmann et al. (2004b) vermuteten, dass die von den Immunzellen produzierten und nachgewiesenen Zytokine sowohl in luteotrope als auch luteolytische Mechanismen involviert sein könnten. Eindeutige funktionelle Beweise stehen jedoch noch aus.

### *2.2.2.2 Prostaglandine (PG)*

1972 wurde die Bedeutung des Uterus für die Regression des zyklischen Corpus luteum beim Schaf erkannt (McCracken et al., 1972). Aufbauend auf dieser Beobachtung wurde Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) endometrialen Ursprungs beim Schaf als der endogene luteolytische Faktor definiert (Goding et al., 1972; McCracken et al., 1972). Eine grundsätzlich ähnliche Situation ergab sich für die anderen landwirtschaftlichen Nutztiere wie Rind, Schwein und Pferd [Hansel et al., 1973; Horton & Poyser, 1976; Döcke, 1994 (Übersichtsarbeit)]. Bei diesen Spezies führt eine Hysterektomie zur Bildung eines CL persistens, das nach Concannon (2009) ungefähr eine der Dauer der Trächtigkeit der jeweiligen Spezies entsprechende

Lebensspanne aufweist. Auch bei kleinen Nagern (Maus, Ratte) konnte gezeigt werden, dass ein luteolytischer Faktor uterinen Ursprungs, sprich  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , bei graviden und pseudogriden Tieren eine Luteolyse bewirkt (Stouffer, 2006).

Bei der ingriden Hündin dagegen ist der Uterus nicht an der Steuerung der CL-Funktion beteiligt, wie an hysterektomierten Hündinnen gezeigt werden konnte (Olson et al., 1984; Hoffmann et al., 1992), bei denen ein normaler ovarieller Zyklus ablief. Die Frage nach der Steuerung der lutealen Regression beim Hund blieb daher lange Zeit unbeantwortet (Hoffmann et al., 2004b). Nachdem jedoch für das Rind und andere Spezies gezeigt werden konnte, dass auch Prostaglandine lutealen Ursprungs an der Steuerung der CL-Funktion beteiligt sind (Arosh et al., 2004), wurde in umfangreichen Untersuchungen die Expression des PG-Systems im CL der Hündin untersucht (Kowalewski et al., 2006; 2008a; b; 2013). Diese Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

Während der frühen lutealen Phase konnte bei der graviden und ingriden Hündin eine erhöhte Expression der Cox2 sowohl auf mRNA (messenger Ribonucleinsäure) als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden, wobei sich die höchste Expression an Tag 5 p.o. zeigte und nach Tag 15 p.o. langsam abnahm; Cox2 war im Zytoplasma der Luteinzellen lokalisiert (Kowalewski et al., 2006; 2009).

Auch die Expression der Prostaglandin-E-synthase (PGES) sowie die eines der Rezeptoren für  $\text{PGE}_2$ , der EP2-Rezeptor, war während der frühen Lutealphase der ingriden Hündin zwischen Tag 5 und 15 p.o. erhöht (Kowalewski et al., 2008a; 2009). Ebenso war die mRNA-Expression des Prostaglandintransporters (PGT), der für den Transport der Prostaglandine durch die Zellmembran verantwortlich ist (Schuster, 2002), zu Beginn des Diöstrus (Tag 5, 15, 25 p.o.) am höchsten, während sie zum Ende des Diöstrus wieder absank (Kowalewski et al., 2013). Bei zahlreichen Spezies ist die luteotrope Wirkung von  $\text{PGE}_2$  belegt. So stimuliert  $\text{PGE}_2$  die luteale  $\text{P}_4$ -Produktion über einen cAMP (cyclo Adenosinmonophosphat) vermittelten Reaktionsweg beim Menschen (Marsh & LeMaire, 1974; Hahlin et al., 1988) und Kaninchen (Boiti et al., 2001). Ebenfalls konnten Kotwica et al. (2003) sowie Fitz et al. (1984) und Weems et al. (1997) in bovinen und ovinen Zellkulturen zeigen, dass  $\text{PGE}_2$  die  $\text{P}_4$ -Produktion stimuliert. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass  $\text{PGE}_2$ , insbesondere im ersten Drittel des Diöstrus, wenn gonadotrope

Regelfaktoren keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen (siehe Kap. 2.2.1), bei der Hündin als luteotroper Faktor wirkt (Kowalewski et al., 2008a).

In *In-vitro*-Versuchen mit primären caninen Luteinzellen, die aus einer frühen Phase des Diöstrus stammten (7-14 Tage nachdem die sichtbaren Anzeichen des Östrus verschwunden waren), konnte gezeigt werden, dass  $\text{PGE}_2$  die StAR (Steroide Acute Regulatory Protein)-Genexpression aktiviert, wobei die  $3\beta\text{HSD}$  ( $3\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase-4/5-Isomerase)- und  $\text{P450scc}$  ( $\text{P450}$  side chain cleavage enzyme)-Expression jedoch unbeeinflusst blieben. Dass die erhöhte StAR-Expression auch funktional aktiv ist, zeigte sich in einer erhöhten  $\text{P}_4$ -Konzentration im Inkubationsmedium. Bei Luteinzellen, die von Tag 25-65 p.o. stammten, zeigten sich diese Effekte nicht (Kowalewski et al., 2013). Dies sind weitere Befunde, die die oben genannte Hypothese einer luteotropen Funktion von  $\text{PGE}_2$  in der frühen Phase des Diöstrus bei der Hündin unterstützen.

Anders als für die PGES konnte eine Expression der Prostaglandin-F-synthase (PGFS), welche die direkte Umwandlung von  $\text{PGH}_2$  zu  $\text{PGF}_{2\alpha}$  vermittelt (siehe Abb. 3, Seite 21), nicht nachgewiesen werden (Kowalewski et al., 2008b). Allerdings scheint der Rezeptor von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (FP) im Zytoplasma der Luteinzellen konstitutiv exprimiert zu werden, und zwar mit ansteigender mRNA-Expression vom frühen zum späten Diöstrus (Kowalewski et al., 2008b), ein Befund, der erklärt, warum das CL der Hündin auf exogen applizierte  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analoge mit einer Luteolyse reagiert, wenn auch deutlich protrahierter als bei landwirtschaftlichen Nutztieren (Concannon & Hansel, 1977; Christiansen, 1982; Tsutsui et al., 1989; Romagnoli et al., 1991). Aus diesen Befunden, die das offensichtliche Fehlen eines endogenen Luteolysins bei der Hündin nahe legen, wurde die luteale Regression bei der ingraviden Hündin zunächst von Kowalewski et al. (2008b) als ein altersbedingter, passiver degenerativer Prozess eingestuft. Wie oben dargestellt, lassen neuere Untersuchungen (Kowalewski et al., 2011) jedoch vermuten, dass dabei der Expression des Prolaktinrezeptors eine wichtige Rolle zukommt.

Anders als bei der ingraviden Hündin kommt es bei der graviden Hündin präpartal zu einem plötzlichen Abfall der  $\text{P}_4$ -Konzentration, zeitgleich erfolgte ein Anstieg von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Concannon et al., 1988; Nohr et al., 1993). Versuche die  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese mit dem Cox-Hemmer Indomethacin kurz vor der Geburt zu hemmen, zeigten, dass es bei der mit deutlichen Nebenwirkungen verbundenen sehr hohen Dosierung von 5

mg Indomethacin/ kg KGW/ Tag andeutungsweise zu einer Verlängerung der Trächtigkeit kam (Riesenbeck, 1997). Daraus ergaben sich Hinweise, dass  $\text{PGF}_{2\alpha}$  eine Rolle bei der Luteolyse der graviden Hündin spielen könnte (Riesenbeck, 1997). Es dauerte jedoch bis 2010, bis Kowalewski et al. (2010) ein schlüssiges Konzept zur Herbeiführung der präpartalen Luteolyse bei der Hündin entwickelten. Diesem Konzept liegt zugrunde, dass die den Progesteronrezeptor (PR) exprimierenden und in der Plazenta lokalisierten Deciduazellen eine Aufregulation der plazentaren (Trophoblast) Cox2-Expression herbeiführen, sobald die auch bei der graviden Hündin stattfindende luteale Regression einen Schwellenwert von ca. 2 ng  $\text{P}_4$ /ml unterschritten hat. Mit der Aufregulation von Cox2 ist ein plötzlicher Anstieg der plazentaren  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Produktion verbunden (Nohr et al., 1993), die dann via Interaktion mit dem lutealen FP-Rezeptor die Luteolyse induziert.

### 2.2.2.3 Steroide

Bisher durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, dass auch im CL gebildete Steroide eine autokrine/ parakrine Rolle bei der Regulation der CL-Funktion spielen. So beschrieben Endo et al. (1998), dass in humanen Luteinzellkulturen niedrige, das heißt physiologische, Konzentrationen an Estradiol-17 $\beta$  die  $\text{P}_4$ -Produktion stimulieren, während sich hohe Konzentrationen negativ auswirkten.

Auch im CL des Hundes wurde die Expression der Östrogenrezeptoren, ER $\alpha$  und ER $\beta$ , sowie die des PR in den Luteinzellen nachgewiesen (Papa, 2001; Hoffmann et al., 2004b; Papa & Hoffmann, 2011). Die Autoren folgerten daraus, dass im CL produziertes  $\text{P}_4$  und Estradiol-17 $\beta$  auch beim Hund eine lokale Rolle als parakrine und autokrine Regulatoren bei der Steuerung der CL-Funktion spielen könnten.

Im Hinblick auf  $\text{P}_4$  ergaben sich funktionelle Beweise für diese These aus Untersuchungen mit  $\text{P}_4$ -Antagonisten. So berichten Concannon et al. (1990) und Linde-Forsberg et al. (1992) über eine beschleunigte luteale Regression nach Behandlung gravider Hündinnen zur Aborteinleitung mit dem Antigestagen RU38486 (Mifepriston). Entsprechende Beobachtungen machten Blendinger et al. (1997) sowie Hoffmann et al. (2000) nach Anwendung des Antigestagens RU 46534 (Aglepriston) zur Behandlung der Pyometra. Auch bei normal-zyklischen Hündinnen beobachteten Polisca et al. (2010) eine vorzeitige luteale Regression nach Behandlung der Tiere

mit Aglepriston in der Mitte der Lutealphase. Kowalewski et al. (2009) gehen davon aus, dass die von ihnen beobachtete verminderte luteale Expression von StAR und 3 $\beta$ -HSD - also von zwei Schlüsselkomponenten der P<sub>4</sub>-Synthese - nach Anwendung von Aglepriston auf eine Interaktion mit dem PR zurückzuführen ist.

### 2.3 Morphologie und Histologie des Corpus luteum im Verlauf des Diöstrus

Im Anschluss an die Ovulation bildet sich aus der kollabierten Follikelhöhle zunächst das Corpus haemorrhagicum, welches mit Blutserum, Blutkoagulum und Resten der Follikelflüssigkeit gefüllt ist. Nach Resorption des Blutkoagulums transformieren die Granulosazellen und die Stromazellen der Theca interna durch Vergrößerung des Zytoplasmaanteils (funktionelle Hypertrophie) und Zellerneuerung (Hyperplasie) zu Luteinzellen (Übersicht bei Schnorr & Kressin, 2011). Von der Peripherie ausgehend sprießen Gefäße, zusammen mit Makrophagen, Stromazellen und Fibroblasten in die ehemalige Follikelhöhle ein und führen zur Organisation des CL, bis fast jede Luteinzelle engen Kontakt mit einer Kapillare aufweist (Übersicht bei Liebich, 2005). Bei zahlreichen Spezies, wie Rind, Schaf, Schwein und Ratte können große und kleine Luteinzellen unterschieden werden (Gregoraszczyk & Krzysztofowicz, 1989; McLean et al., 1992; Brannian et al., 1993; Fields & Fields, 1996). Eine Übersicht gibt Liebich (2005). Aus den Granulosazellen entwickeln sich die großen Luteinzellen und aus den Thekazellen die kleinen Luteinzellen (Niswender et al., 2000). Laut Andersen & Simpson (1973) kann eine solche Differenzierung beim Hund lichtmikroskopisch nicht festgestellt werden. Auch elektronenmikroskopisch konnte beim Hund nicht zwischen großen und kleinen Luteinzellen differenziert werden (Sonnack, 2009).

Im frühen Diöstrus sind die caninen Luteinzellen rund bis polygonal mit deutlichen Zellgrenzen und haben einen Durchmesser von 40-60 µm (Piseddu et al., 2012). Das Zytoplasma erscheint homogen granuliert und färbt sich eosinophil (Rehm et al., 2007). Der Nukleus zeigt sich rund bis oval mit homogener, euchromatinreicher Struktur und ist meist in der Peripherie, teilweise aber auch im Zentrum lokalisiert und besitzt ein bis zwei Nukleoli (Andersen & Simpson, 1973; Sonnack, 2009; Piseddu et al., 2012). Während der Proliferationsphase, in der auch eine erhöhte Expression des Ki67-Antigens festgestellt wurde (Papa & Hoffmann, 2011), vergrößern sich die polyedrischen Granulosazellen um das Zwei- bis Dreifache, wodurch das Organ stark an Größe zunimmt.

Sonnack (2009) beschreibt das Erscheinungsbild des CL in der Proliferationsphase und der beginnenden Regressionsphase wie folgt: „Charakteristisch für die sich bis Tag 45 erstreckende Proliferationsphase sind rundliche Kerne mit homogener

euchromatinischer Struktur und ein bis zwei Nukleoli, zahlreichen Mitochondrien vom Tubulustyp und das sehr voluminöse glatte endoplasmatische Retikulum (ER). Die Zellzwischenräume zeigen neben freien Erythrozyten zahlreiche gut ausgebildete Kapillaren, wobei offensichtlich fast jede Luteinzelle einen engen, direkten Kontakt mit den Kapillaren aufweist. Ab Tag 45 zeigt das glatte ER erste degenerative Veränderungen, wie Verhellungen und Verschmelzungsherde, sowie Lipidvakuolen im Zentrum der wirbelartigen Komplexe (fettige Degeneration). Am Tag 60 zeigen die Zellkerne beginnende Chromatinkondensation (Heterochromatin).“

Der rundliche Zellkern misst in diesem Zeitraum 10-12 µm im Durchmesser. Mitosen können nur noch selten beobachtet werden (Andersen & Simpson, 1973).

Ab Tag 25 p.o. zeigte sich ein Rückgang der Ki67-Antigen-Expression in den lutealen Zellen, was mit den abfallenden P<sub>4</sub>-Konzentrationen nach Tag 35 korreliert (Papa & Hoffmann, 2011).

Sonnack (2009) konnte apoptotische Signale immunhistochemisch (TUNEL und Caspase-3) erst nach Tag 65 nachweisen.

## 2.4 Prostaglandinbiosynthese

Prostaglandine sind Abkömmlinge der Arachidonsäure (AA) und gehören zur Gruppe der Eicosanoide. Zu den Eicosanoiden zählen neben den Prostaglandinen noch die Prostazykline, Leukotriene und Thromboxane.

Arachidonsäure (all-cis-5, 8, 11, 16-Eicosatetraensäure) wird durch Phospholipase A<sub>2</sub> aus Membranphospholipiden abgespalten und kann auf zwei Wegen weiter verstoffwechselt werden; erstens via Lipoxygenase, welche die Bildung von Leukotrienen katalysiert und zweitens via Cyclooxygenase, auch als Prostaglandin-G/H-Synthase bezeichnet, welche die Bildung der Prostaglandine, Prostazykline und Thromboxane katalysiert (Übersicht bei Horn et al., 2005). Bei dem Schlüsselenzym „Cyclooxygenase“ handelt es sich um ein bifunktionelles Enzym, bestehend aus zwei aktiven katalytischen Zentren (Miyamoto et al., 1976). Die Endoperoxid-Synthase, welche die AA zu Prostaglandin-G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) oxidiert und zyklisiert, wobei der für die Prostaglandine typische Cyclopentanring entsteht, bildet das erste katalytische Zentrum des Enzyms (Cyclooxygenase-Reaktion). Im zweiten aktiven Zentrum findet durch die Peroxidase die Reduktion der Hydroperoxylgruppe am C-15 Atom zur Hydroxylgruppe statt, wodurch Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) entsteht (Smith & Marnett, 1991; siehe Abb. 2). Der Metabolismus von PGH<sub>2</sub> ist abhängig vom Gewebe und damit von der Verfügbarkeit der entsprechenden Synthesen (Smith, 1986; 1991; 1992).



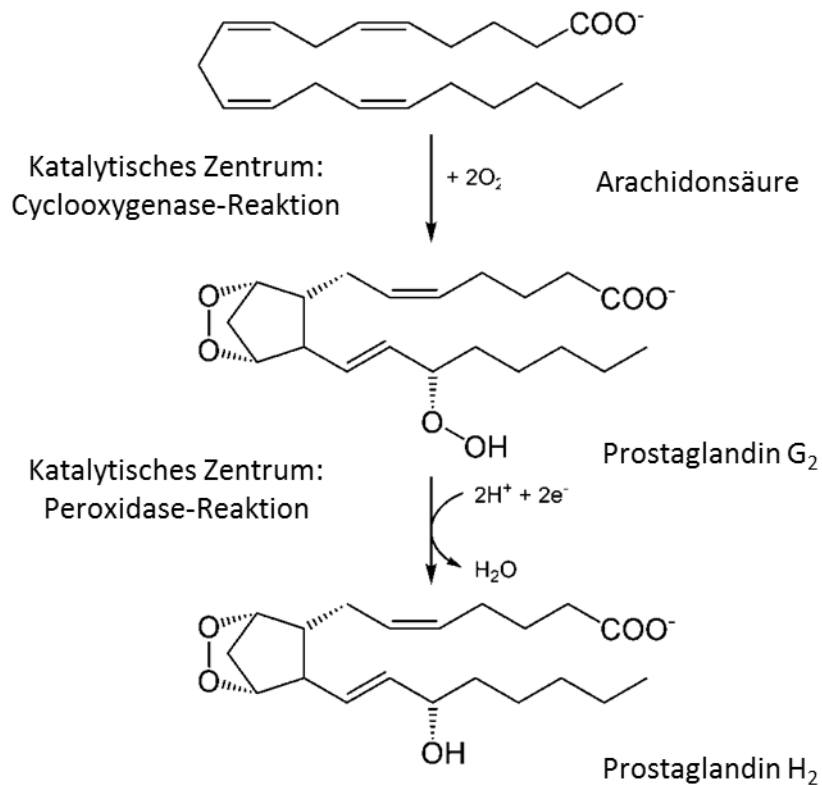


Abbildung 2: Bildung von PGH<sub>2</sub> aus Arachidonsäure [modifiziert nach [www.wikimedia.org/wiki/File:Prostaglandin\\_H2.png](http://www.wikimedia.org/wiki/File:Prostaglandin_H2.png); Smith & Marnett (1991); Übersicht bei Kächler (2005)]

PGH<sub>2</sub> wird durch die Prostaglandin E-Synthase weiter zu PGE<sub>2</sub> oder durch die Prostaglandin-D-Synthase zu PGD<sub>2</sub> synthetisiert. PGF<sub>2α</sub> kann entweder direkt durch Reduktion mittels Prostaglandin-F-Synthase aus PGH<sub>2</sub> entstehen oder aus PGD<sub>2</sub> beziehungsweise PGE<sub>2</sub> durch Reduktasen synthetisiert werden (siehe Abb. 3). Des Weiteren können durch die Prostazyklinsynthase die Prostazykline und durch die Thromboxansynthase die Thromboxane aus PGH<sub>2</sub> synthetisiert werden (Madore et al., 2003).

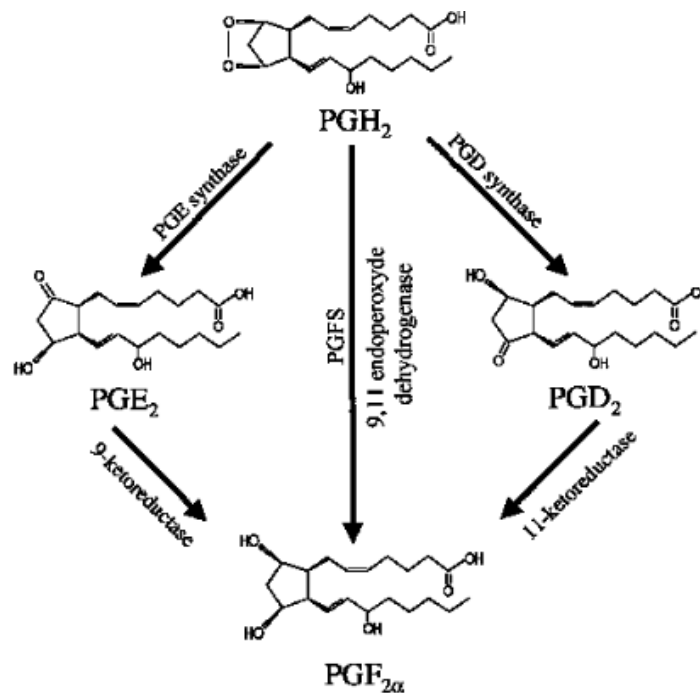


Abbildung 3: Bildung von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> aus PGH<sub>2</sub> [modifiziert nach Madore et al. (2003)]

## 2.5 Isoformen der Cox

Man unterscheidet hauptsächlich zwei Isoformen der Cox: Cox1 und Cox2. Eine Cox3 Isoform wurde im caninen cerebralen Kortex gefunden (Chandrasekharan et al., 2002), deren genaue Funktion jedoch noch unklar ist. Die Cox1, die von Miyamoto et al. (1976) isoliert wurde, wird auch als konstitutive Form bezeichnet und in den meisten Geweben des Körpers exprimiert, wo sie eine Vielzahl von physiologischen Aufgaben übernimmt. So ist sie für homöostatische Funktionen, wie zum Beispiel die Plättchenfunktion, die Protektion der Magenschleimhaut, sowie die Kontrolle des renalen Blutflusses verantwortlich (Crofford, 1997). Sie besteht aus einem membrangebundenen, ins Lumen des ER orientierten Hämoprotein (Otto & Smith, 1994; 1996) und hat ein Molekulargewicht von 71 kDa (Kam & See, 2000). Die Enzymkonzentration in den Geweben ist grundsätzlich niedrig, kann aber bei Bedarf durch Hormone und Wachstumsfaktoren auf das Zwei- bis Vierfache ansteigen (Kam & See, 2000). Die Cox2 wird als induzierbare Form bezeichnet und

durch verschiedene extra- sowie intrazelluläre Stimuli wie IL-1, TNF $\alpha$ , Wachstumsfaktoren und bakterielle Lipopolysaccharide induziert (Hempel et al., 1994; Kam & See, 2000). Die Expression erfolgt vorwiegend in Zellen, die an Entzündungsvorgängen beteiligt sind, wie Makrophagen, Monozyten (Hempel et al., 1994), aber auch in Synovialzellen (Hinz & Brune, 2000a) und Fibroblasten und kann nach Stimulation auf das 10-80-fache ansteigen (Kam & See, 2000). Es konnte allerdings für einige Gewebe auch eine Expression der Cox2 unabhängig von Entzündungsmediatoren gezeigt werden, zum Beispiel im Gehirn (Peri et al., 1995), in der Niere (Harris et al., 1994), in der bovinen Plazenta (Shenavai et al., 2012), sowie in Follikeln und frühen Luteinzellstadien des Corpus luteum des Hundes (Kowalewski et al., 2006). Außerdem wird die Cox2 auch in Endothelzellen konstitutiv exprimiert, wo sie eine vasoprotektive Wirkung zeigt, indem sie für die Produktion von Prostazyklin (PGI $_2$ ), welches vasodilatatorisch und antithrombotisch wirkt, verantwortlich ist (Mukherjee & Topol, 2003).

### **2.6 Wirkungsweise der Prostaglandine**

Um ihre Wirkung zu entfalten, müssen die Prostaglandine an membranständige Rezeptoren binden, die an G-Proteine gekoppelt sind. Der so entstandene Prostaglandin-Rezeptor-Komplex kann durch Kopplung an die Adenylatcyclase entweder zu einer Veränderung des cAMP-Spiegels in der Zelle führen oder durch Kopplung an die Phospholipase C über den IP $_3$ /DAG-Mechanismus (Inositoltriphosphat/Diacylglycerol) die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen beziehungsweise durch Aktivierung der Proteinkinase C ihre Wirkung entfalten [Arosh et al., 2004; Horn et al., 2005 (Übersichtsarbeit)].

Für PGE $_2$  sind vier verschiedene Rezeptor-Subtypen, (EP 1-4) des EP-Rezeptors bekannt, während für PGF $_{2\alpha}$  nur zwei Rezeptor-Subtypen bekannt sind (FPA und FPB; Arosh et al., 2004). EP1 und die FP-Rezeptoren sind an Phospholipase C gekoppelt (Arosh et al., 2004). EP3 kann sowohl über eine Hemmung der Adenylatcyclase als auch über einen Anstieg der Calciumkonzentration und des Inositoltriphosphates agieren. EP2 und EP4 führen nach Bindung von PGE $_2$  und Aktivierung der Adenylatcyclase zur Bildung von cAMP und damit zur Aktivierung der

Proteinkinase A als Signalübertragungsweg (Narumiya et al., 1999; Arosh et al., 2004).

EP2 und EP4 werden während des gesamten Diöstrus im caninen Corpus luteum exprimiert, wobei EP2 zusammen mit der PGES die höchste mRNA-Expression zu Beginn der Lutealphase (Tag 5 p.o.) aufweist. EP4 wird dagegen durchgängig exprimiert, unabhängig von der Zyklusphase. EP3-mRNA konnte im caninen Corpus luteum nicht nachgewiesen werden (Kowalewski et al., 2008a). Ebenso konnte EP1 nicht eindeutig nachgewiesen werden, woraus Kowalewski et al. (2008a) von einer organspezifischen Expressierung der PGE<sub>2</sub>-Rezeptoren ausgehen. Der FP-Rezeptor wird im caninen Corpus luteum konstitutiv während des gesamten Diöstrus exprimiert, zum Ende zeigt sich ein signifikanter Anstieg (Kowalewski et al., 2008b).

### **2.7 Cox-Hemmer**

Der entzündungshemmende Effekt der nichtsteroidalen Entzündungshemmer „nonsteroidal antiinflammatory drugs“ (NSAIDs) wird hauptsächlich einer Hemmung der Cox2 zugeschrieben, während die unerwünschten Nebenwirkungen (gastrointestinale Ulzerationen und Blutungen, Plättchendysfunktionen etc.) auf die Hemmung der Cox1 zurückgeführt wurden. Diese Aussage kann heute nicht mehr ganz aufrechterhalten werden, da auch die Cox2 eine Reihe physiologischer Funktionen aufweist (siehe oben). Dennoch war dies der Grund für die Entwicklung von spezifischen Cox2-Hemmern (Seibert et al., 1997).

#### **2.7.1 Spezifische Cox2-Hemmer**

Als spezifische Cox2-Hemmer werden „Substanzen, die auch in maximaler therapeutischer Dosierung keine klinisch relevante Hemmung der Cox1 hervorrufen“ definiert (Hinz & Brune, 2000b). Die strukturellen Unterschiede der Cox2 im Vergleich zur Cox1 bestimmen die Spezifität der Cox2-Hemmer (Kurumbail et al., 1996).

### 2.7.2 Firocoxib als spezifischer Cox2-Hemmer

Firocoxib (3-cyclopropylmethoxy-5,5-dimethyl-4-[4-(methyl sulfonyl) phenyl]-2-(5H)-furanone) ist ein nichtsteroidales Antiphlogistikum, welches beim Hund 384-fach (McCann et al., 2004) beziehungsweise 350-fach (EMA, 2006) selektiver die Cox2 hemmt als die Cox1. Die orale Bioverfügbarkeit ist mit 100% als sehr hoch einzustufen. Die Eliminationshalbwertszeit liegt bei 5,9 h (McCann et al., 2004). Maximale Plasmakonzentrationen werden nach etwa 1,25 h erreicht (EMA, 2006). Die gastrointestinalen Nebenwirkungen bei diesem spezifischen Cox2-Hemmer sind gering und werden in einer Studie von Autefage et al. (2011) über 52 Wochen mit 5,1% angegeben. In der Veterinärmedizin ist Previcox® (Fa. Merial, Lyon, F) zur Behandlung von Osteoarthritiden und Synovitiden bei Hund und Pferd zugelassen. Firocoxib besitzt antiinflammatorische, antipyretische und analgetische Eigenschaften (EMA, 2006). Die therapeutische Dosierung wird laut Herstellerangaben mit 5 mg/kg KGW beim Hund angegeben, die Anwendung erfolgt oral.

### 3. Material und Methoden

Der Tierversuch wurde an der University of Warmia and Mazury, Olsztyn, Polen, durchgeführt. Die Genehmigung erfolgte durch die zuständigen Behörden (lokale Ethikkommission; Aktenzeichen 54/2008; Projekt Nr. NN 308225936). Die Untersuchungen wurden durch eine Forschungsbeihilfe des polnischen Wissenschaftsministeriums unterstützt. Die im Rahmen des Tierversuches gewonnenen Blutproben wurden für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen verwendet. Die mittels Ovariohysterektomie gewonnenen Ovarien wurden fixiert und als Paraffinblöcke an das veterinäranatomische Institut der Universität Zürich, Schweiz, versandt. Dort wurden unter der Leitung von PD Dr. M.P. Kowalewski, PhD, ca. 3-4 µm dicke Schnitte hergestellt und für die vorliegende Arbeit verwendet.

#### 3.1 Versuchsaufbau

Es erfolgte eine randomisierte Zuordnung der Hündinnen in eine Behandlungs- (BG) und eine Kontrollgruppe (KG). Über einen Zeitraum von ca. einem Jahr kamen die für den Versuch zur Verfügung stehenden Tiere zusammen.

Entsprechend dem Versuchsdesign, das eine Ovariohysterektomie von jeweils fünf Tieren an den Tagen 0, 5, 10, 20 und 30 p.o. vorsah, erfolgte eine weitere Zuordnung zu den Gruppen BG 5, 10, 20 und 30 beziehungsweise KG 0, 5, 10, 20 und 30 (KG 0  $\cong$  BG 0). Ab dem Tag 0, d.h. dem Tag der Ovulation, wurden von allen Tieren in zweitägigen Abständen bis zum Tag der Ovariohysterektomie Blutproben entnommen.

Der Zeitpunkt der Ovulation (Tag 0) wurde nach Eintritt der Läufigkeit nach klinischen Kriterien mittels exfoliativer vaginaler Zytologie und der Bestimmung von P<sub>4</sub> mittels eines Enzyme-Immuno-Assay (EIA)-Kits abgeschätzt. Bis zum Auftreten der Läufigkeit standen die Hündinnen über einen unterschiedlich langen Zeitraum unter Beobachtung, wobei zum Teil Zeiträume von mehr als einem Jahr vergingen. Aufgrund der Problematik bei der Gewinnung der Probanden für den Versuch, die großen zeitlichen Spannen bis zum Auftreten einer Läufigkeit, sowie die zeitliche Befristung der Forschungsmittel, wurden die weiterführenden analytischen Untersuchungen auf der Basis der bis zum 11.04.2012 gewonnenen Proben

aufgenommen, die von insgesamt 31<sup>1)</sup> Tieren stammten, bei denen die später durchgeführten P<sub>4</sub>-Messungen mittels etabliertem Radioimmunoassay (RIA) bestätigten, dass der Ovulationszeitpunkt mit einer akzeptablen Genauigkeit bestimmt worden war.

Die Tiere, die der Behandlungsgruppe zugeteilt waren, erhielten ab dem Tag 0 täglich 10 mg/kg KGW Firocoxib (Previcox®; Fa. Merial, Lyon, F) per os, was der doppelten vom Hersteller empfohlenen Dosis entsprach. Der Wirkstoff Firocoxib hat - wie bereits oben angegeben - eine 384 fache Selektivität für eine spezifische Cox2-Hemmung (McCann et al., 2004).

Aus der Gesamtzahl der 31 Versuchstiere ergab sich folgende Gruppeneinteilung:<sup>1)</sup>

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Tiere

Zyklustag	Behandlungsgruppe (BG)	Kontrollgruppe (KG)
<b>0</b>	-	n= 3
<b>5</b>	n= 4	n= 5
<b>10</b>	n= 3	n= 3
<b>20</b>	n= 2	n= 3
<b>30</b>	n= 5	n= 3 (2) <sup>1)</sup>

### 3.2 Tiere

Die in dem Versuch aufgenommen Tiere bestanden aus einer heterogenen Gruppe von klinisch gesunden Hündinnen verschiedener Rassen, sowie unterschiedlichen Alters und Gewichtes (siehe Tab. 2 und 3).

<sup>1)</sup>Bei dem Tier 30/2 K aus der Kontrollgruppe stand kein CL-Gewebeschnitt zur Verfügung

Tabelle 2: Tiere der Behandlungsgruppe (BG)

Gruppe	Tier Nr.	Rasse	Alter	Gewicht
BG 5	5/1	Mischling	7 Jahre	10 kg
	5/2	Mischling	3 Jahre	5 kg
	5/3	Mischling	6 Jahre	12,5 kg
	5/5	Mischling	5 Jahre	14,5 kg
BG 10	10/3	Mischling	3 Jahre	5,5 kg
	10/4	Mischling	7 Jahre	9 kg
	10/5	Mischling	2 Jahre	6 kg
BG 20	20/2	Mischling	7 Jahre	26 kg
	20/4	Mischling	5 Jahre	8 kg
BG 30	30/1	Mischling	3 Jahre	24 kg
	30/2	Mischling	6 Jahre	19,5 kg
	30/3	Polnischer Niederungshütehund	4,5 Jahre	26 kg
	30/4	Mischling	3 Jahre	16,5 kg
	30/5	Mischling	6 Jahre	21 kg



Tabelle 3: Tiere der Kontrollgruppe (KG)

Gruppe	Tier Nr.	Rasse	Alter	Gewicht
KG 0	0/1	Mischling	4 Jahre	4 kg
	0/2	Mischling	2,5 Jahre	8,5 kg
	0/3	Mischling	5 Jahre	9 kg
KG 5	5/1 K	Mischling	6 Jahre	11 kg
	5/2 K	Mischling	2 Jahre	12 kg
	5/3 K	Mischling	7 Jahre	13 kg
	5/4 K	Groenendaeler	4 Jahre	22 kg
	5/5 K	Mischling	3 Jahre	20 kg
KG 10	10/1 K	Labrador	6 Jahre	34 kg
	10/2 K	Polnischer Niederungshütehund	4,5 Jahre	28 kg
	10/3 K	Mischling	4 Jahre	16 kg
KG 20	20/1 K	Husky	3 Jahre	24 kg
	20/2 K	Dobermann	3 Jahre	27 kg
	20/3 K	Dobermann	7 Jahre	36 kg
KG 30	30/1 K	Mischling	4 Jahre	24 kg
	30/2 K	Mischling	2,5 Jahre	12,8 kg
	30/4 K	Mischling	3 Jahre	34 kg

### 3.3 Blutproben

Die Gewinnung der Blutproben erfolgte durch Punktion der Vena cephalica antebrachii beziehungsweise der Vena saphena. Das Blut wurde in Heparinröhrchen aufgefangen, auf Eis gekühlt, abzentrifugiert und das abgeheberte Plasma bei -20°C eingefroren.

### **3.4 Hormonanalytische Verfahren**

Sofern nicht im laufenden Text spezifiziert, finden sich alle Angaben zu den verwendeten Verbrauchsmaterialien und Geräten, den Puffern und Lösungen sowie den Reagenzien und Chemikalien in den Kap. 3.7, 3.8 und 3.9.

#### **3.4.1 Radioimmunologische Bestimmung von Progesteron ( $P_4$ )**

##### *3.4.1.1 Prinzip*

Bei dem RIA zur Bestimmung von  $P_4$  handelt es sich um einen Competitionstest, bei dem der Analyt ( $P_4$ ) mit einem radioaktiv markierten Antigen ( $^3\text{H}$ -Progesteron) um die Bindung an einen spezifischen Antikörper (AK) konkurriert. Die Antigen-Antikörperreaktion wird mit Hilfe radioaktiv markierter Isotope quantitativ erfasst, wobei der Test so einzustellen ist, dass bei alleiniger Verbringung des radioaktiv markierten Analyten (Tracer) in den RIA eine deutliche Absättigung der AK-Bindungsstellen erreicht wird ( $B_0$ -Wert, siehe unten). Limitierender Faktor ist dabei, dass es sich bei der mit dem  $B_0$ -Wert erfassten Radioaktivität um eine ausreichende Anzahl von Impulsen handeln muss, damit eine ausreichend hohe Zählgenauigkeit bei einer akzeptablen Zählzeit erreicht wird. Die gemessene Radioaktivität ist proportional zu der Menge des an Antikörper gebundenen Tracers und somit umgekehrt proportional zu der Menge des Analyten (Hoffmann, 1977).

##### *3.4.1.2 Testdurchführung*

Der Progesteron-RIA wurde nach dem von (Hoffmann et al., 1973) beschriebenen Verfahren entsprechend der im hiesigen Labor etablierten SOP (Standard Operation Procedures) durchgeführt.

Die eingesetzte Menge an Blutplasma wurde je nach Zyklusstand und zu erwartender  $P_4$ -Konzentration entsprechend variiert (100, 50, 25, 20, 12,5 und 10  $\mu\text{l}$ ). Der Test erfolgte im Doppelansatz. Jede Probe wurde zunächst zweimal mit 2 ml n-Hexan in 13 ml Wheaton Schraubgläsern an einem Rotationsmischer über 20 Minuten extrahiert. Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert, die

wässrige Phase im Alkohol-Trockeneisbad abgefroren und die Überstände in RIA-Testgläschen dekantiert. Die Proben wurden dann im Vortex-Evaporator zur Trockne gebracht und anschließend dem RIA zugeführt. Der RIA-Testansatz setzte sich wie in Tab. 4 angegeben zusammen.

Tabelle 4: Testansatz P<sub>4</sub>-RIA

	<b>Totale</b>	<b>NSB</b>	<b>B0</b>	<b>Standard- kurve</b>	<b>Leerwert*</b>	<b>Proben*</b>
<b>BSA-Puffer</b>	0,5 ml	0,5 ml	0,1 ml	-	0,1 ml	0,1 ml
<b>Tracer</b>	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
<b>Standard- Lösungen</b>	-	-	-	0,1 ml	-	-
<b>Antiserum- Verdünnung</b>	-	-	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml

\* RIA-Röhrchen mit niedergetrockneten Extrakten (Proben) beziehungsweise Lösungsmittel (Leerwert)

Die „Totale“ steht für die Gesamtmenge an in den RIA eingebrachtem radioaktiv markiertem Tracer (1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)-Progesteron; 3,5762 TBg/mmol, angesetzte Lösung: ca 10000 cpm/100 µl).

Die „nichtspezifische Bindung“ (NSB) definiert den Anteil an radioaktiv markiertem Tracer, der bei Abwesenheit des Antiserums nicht an die zur Trennung von „Frei“ und „Gebunden“ eingebrachte Holzkohlesuspension gebunden wird. Die Bindung (B0) ist definiert als die Menge an Tracer, die bei Abwesenheit eines freien Analyten durch den Antikörper gebunden wird.

Die in Bovinem-Serum-Albumin (BSA)-Phosphatpuffer angesetzte Standardkurve deckte folgenden Bereich pro Ansatz ab: 40 fmol/ 0,1 ml; 80 fmol/ 0,1 ml; 160 fmol/ 0,1 ml; 320 fmol/ 0,1 ml; 640 fmol/ 0,1 ml; 1280 fmol/ 0,1 ml; 1920 fmol/ 0,1 ml; 2560 fmol/ 0,1 ml.

Um die Reaktion (Bindung des Antikörpers an den Analyten beziehungsweise Tracer) zu beschleunigen, sowie um die zur Trockne gebrachten Proben sicher zur Lösung zu bringen, wurde der Testansatz zunächst für 20 Minuten in einem auf 37°C temperierten Wärmeschüttelbad inkubiert. Nach einer weiteren mindestens 60 Minuten dauernden Inkubation in einem Eiswasserbad (0-4°C) wurden zur Trennung

von freiem und Antikörper gebundenem Progesteron 0,2 ml Holzkohlesuspension (0,5% Norit, 0,05% Dextran) zugegeben. Nach einer zehnmütigen Standzeit im Eiswasserbad wurden die Proben bei 3200 rpm (rotations per minuteM;  $g = 2220$ ) und  $4^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten abzentrifugiert (Varifuge K) und 0,6 ml des Überstandes mittels Diluter-Dispenser zügig abgehebert und unter gleichzeitiger Zugabe von 3 ml Szintillatorflüssigkeit (Aqua safe 300) in Zinsser Mini 2000 Zählfläschchen überführt. Die Erfassung der Radioaktivität ( $^3\text{H}$ - Impulse) erfolgte über zwei Minuten an einem Flüssigkeitsszintillatorzähler ( $\beta$ -Counter) mit angeschlossenem Auswertprogramm.

### *3.4.1.3 Auswertung*

Die Auswertung erfolgte anhand von Eichkurven, die bei jedem Test mit angesetzt wurden (siehe Kap. 3.4.1.2).

Die Erstellung der Standardkurven und nachfolgende Berechnung des  $\text{P}_4$ -Gehaltes in dem eingebrachten Probenvolumen erfolgte mit dem am  $\beta$ -Counter angeschlossenen Auswertprogramm der Firma Beckmann.

### *3.4.1.4 Qualitätskontrolle*

Als Kontrollpunkte dienten der Leerwert und zwei biologische Kontrollproben aus Rinderplasma, deren bekannte Konzentrationen im unteren mittleren und im oberen mittleren Standardkurvenbereich lagen.

Für die Progesteronbestimmung ergab sich eine Interassayvariabilität von 10,2% (hohe  $\text{P}_4$ -Konzentration der Kontrolle) beziehungsweise 14,7% (niedrige  $\text{P}_4$ -Konzentration der Kontrolle).

Der Intraassayvariationskoeffizient lag zwischen 8,8 und 9,6 % bei  $n = 15$  (Papa, 2001).

### 3.4.1.5 Antiserum

Das verwendete Antiserum GI P<sub>4</sub> IV Progesteron-Gießen (15.08.1986) wurde in einer Arbeitsverdünnung von 1:50000 angesetzt, wovon 0,4 ml pro Probe eingesetzt wurden. Daraus ergab sich eine Endverdünnung im RIA von 1:75000. Das Antiserum war nach Immunisierung eines Kaninchens mit 11 $\alpha$  OH-Progesteron-Hemisuccinat-Rinderserumalbumin als Antigen gewonnen worden.

Die Spezifität des Antiserums ergab sich wie folgt:

mit Androstendion, DHEA, Estradiol, Estron, Cortisol und 17 $\alpha$ -Hydroxy-Pregnenolon ergab sich eine Kreuzreaktivität von weniger als 0,01%, bei Testosteron, 17 $\alpha$ -OH-Progesteron und Pregnenolon lag die Kreuzreaktivität bei 0,37, 0,49 bzw. 0,69%.

### **3.4.2 Bestimmung von 13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGFM) mit einem kommerziellen EIA-Kit (Enzymimmunoassay)**

Die Bestimmung von PGFM erfolgte mit dem 13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  EIA Kit (Item No. 516671) der Firma Cayman Chemical Company (Ann Arbor, USA, vertrieben über die Firma IBL-International, Hamburg). Laut Herstellerangaben darf das Kit nur für Forschungszwecke verwendet werden; Eignungen für bestimmte Spezies werden nicht angegeben.

#### **3.4.2.1 Prinzip**

Prostaglandine ( $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGE_2$ ) werden *In-vivo* in Leber und Lunge sehr schnell durch 15-hydroxy-Prostaglandin-dehydrogenase und -reduktase zu 13,14-dihydro-15-keto- $PGF_{2\alpha}$  (PGFM) beziehungsweise 13,14-dihydro-15-keto- $PGE_2$  (PGEM) metabolisiert [(Giertz & Flohe, 1987; Aurich, 2002 (Übersichtsarbeit)]. Da demzufolge in Plasmaproben die Konzentration an intakten Prostaglandinen sehr gering ist, ist es notwendig, über die Bestimmung von deren Metaboliten einen Rückschluss auf die aktuelle Prostaglandinproduktion zu ziehen. Aus diesem Grund wird die Messung von PGFM aus Plasma als Marker für die *In-vivo*-Produktion von  $PGF_{2\alpha}$  genutzt (Meyer et al., 1989; Del Vecchio et al., 1992).

Der PGFM EIA beruht auf demselben Prinzip der Competition wie der RIA zur Bestimmung von  $P_4$ . Nicht markiertes PGFM konkurriert mit Acetylcholinesterase (AChE) markiertem PGFM (Tracer) um Bindungsstellen an einen spezifischen Antikörper gegen PGFM (1. Antikörper, aus Kaninchen), der im Überschuss vorliegt. Auch in diesem Test ist die Menge des an den 1. Antikörper gebundenen Tracers umgekehrt proportional zu der Menge des gebundenen Analyten (PGFM).

Die Trennung von freiem und an den 1. Antikörper gebundenen PGFM erfolgt mittels eines 2. Antikörpers (monoklonaler Maus-anti-Kaninchen-IgG AK) mit dem die „Wells“ der 96-Loch-Platte beschichtet wurden („solid-phase-assay“). Nach Waschung der Platte erfolgt die Auslösung der Farbreaktion.

Die Quantifizierung des gebundenen Tracers erfolgt über die Messung der AChE-Aktivität mittels Ellman's Reagenz. Das im Kit mitgelieferte Ellman's Reagenz besteht laut Herstellerangaben aus Acetylthiocholin, welches das Substrat der AChE

darstellt, und 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB). Acetylthiocholin wird durch AChE hydrolytisch gespalten. Es entsteht Thiocholin, welches durch eine nicht enzymatische Reaktion mit DTNB dessen Disulfidbindung spaltet und somit zur Bildung von 2-Nitro-5-Thiobenzoat (NTB) führt. NTB liegt bei neutralem und alkalischem pH als ein NTB<sup>2-</sup>-Dianion vor (Ellman, 1958). Das NTB<sup>2-</sup>-Dianion weist eine gelbe Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 412 nm auf (Ellman, 1958).

Die Spezifität des 1. Antikörpers wird wie folgt angegeben:

Tabelle 5: Spezifität des PGFM-EIA-Antiserums

Verbindung	Kreuzreaktion
<b>13,14-dihydro-15-keto PGF<sub>2α</sub></b>	100%
<b>13,14-dihydro-15-keto PGE<sub>2</sub></b>	2,7%
<b>15-keto PGF<sub>2α</sub></b>	1,8%
<b>PGD<sub>2</sub></b>	< 0,01%
<b>PGE<sub>2</sub></b>	< 0,01%
<b>PGF<sub>1α</sub></b>	< 0,01%
<b>2,3-dinor-6 keto PGF<sub>2α</sub></b>	< 0,01%
<b>6-keto PGF<sub>1α</sub></b>	< 0,01%
<b>PGF<sub>2α</sub></b>	< 0,01%
<b>8-iso PGF<sub>2α</sub></b>	< 0,01%
<b>8-iso-13,14-dihydro-15-keto PGF<sub>2α</sub></b>	< 0,01%
<b>8-iso-15-keto PGF<sub>2α</sub></b>	< 0,01%
<b>PGF<sub>2β</sub></b>	< 0,01%
<b>8-iso PGF<sub>3α</sub></b>	< 0,01%
<b>Thromboxan B<sub>2</sub></b>	< 0,01%

### 3.4.2.2 Vorversuche zur Etablierung des Tests

Laut Produktbeschreibung kann PGFM direkt im Plasma gemessen werden. Auf die Möglichkeit einer Aufreinigung (Extraktion) wird verwiesen.

Nachdem sich bei der Bestimmung von PGFM beim Rind und Anwendung dieses Testkits zeigte, dass als zuverlässig erscheinende Ergebnisse nur bei direkter Einbringung der Plasmaprobe in den Test erzielt wurden (Diss. Preißing in Vorbereitung; persönliche Mitteilungen Prof. G. Schuler), kam auch in den eigenen Untersuchungen die Direktmessung im Plasma zur Anwendung.

Im Hinblick auf die mit dem Kit beim Rind gemachten Erfahrungen (Diss. Preißing in Vorbereitung; persönliche Mitteilungen Prof. G. Schuler), wurde in Vorversuchen zunächst jedoch dessen grundsätzliche Eignung überprüft.

Es sollten daher zunächst folgende Fragen geklärt werden:

- 1) Inwieweit unterscheidet der Test zwischen Plasmaproben mit erwartet hohen und niedrigen PGFM-Werten?
- 2) Inwieweit liegen die Messwerte in einer Größenordnung, wie sie bisher in der Literatur beschrieben wurden?
- 3) Lässt sich ein Effekt der Behandlung mit Firocoxib (Previcox®) im Plasma nachweisen?
- 4) Inwieweit ergibt sich eine Linearität bei Messung in unterschiedlichen Aliquoten der gleichen Plasmaprobe?

Ad 1) Dazu wurde Plasma mit einer als hoch zu erwartenden Konzentration an PGFM („Cleo“; Hündin in der Geburt) und Plasma mit einer als niedrig zu erwartenden Konzentration an PGFM („Muffin1“; Hündin mit unbekanntem Zyklusstand) verwendet. Wie Tab. 6 zeigt, unterscheidet der Test eindeutig zwischen Hoch und Niedrig; in Abhängigkeit von der in den Test eingebrachten Menge an Plasma liegen die bei „Cleo“ gemessenen Werte 35-65 mal höher als bei „Muffin1“. Dieser Vorversuch zeigte auch, dass, um Konzentrationen im Standardkurvenbereich zu erhalten, die Proben



mindestens 1:5 mit Enzym-Immunoassay-Puffer (EIA-Puffer) verdünnt werden mussten.

Tabelle 6: Vorversuch zur Überprüfung der Eignung des PGFM-EIA durch Einbringung von Plasmaproben mit erwartet hohen und niedrigen PGFM-Werten (Angabe in pg/ml)

Verdünnung	Cleo <sup>1)</sup>		Muffin1 <sup>2)</sup>	
	pg/Probe	pg/ml <sup>3)</sup>	pg/Probe	pg/ml
<b>1:5</b>	3357,7	18273,8	62,8	327,2
<b>1:10</b>	1642,8	19399,7	25,0	276,5
<b>1:20</b>	560,3	17147,7	16,2	377,9
$\bar{x}$		18273,8		327,2
<b>SD</b>		1126		50,7

<sup>1)</sup>Hündin in Geburt    <sup>2)</sup> Hündin mit unbekanntem Zyklusstand

<sup>3)</sup>pg/ml: nach Berechnung mittels der in Abb. 4 und Tab. 9 beschriebenen Korrektur

Ad 2) Bei Vergleich mit den in der Literatur bisher veröffentlichten Werten für PGFM beim Hund während beziehungsweise kurz nach der Geburt, zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung wie aus Tab. 7 hervorgeht.

Tabelle 7: In der Literatur beschriebene PGFM-Konzentrationen beim Hund (pg/ml)

<b>Reproduktionsstatus</b>	<b>Wert (pg/ml)</b>	<b>Zitat</b>
3 Tage antepartum	280- 590 (MW:390 ± 50)	(Concannon et al., 1988)
12 Stunden antepartum	570- 2805 (MW: 1190 ± 320)	
1-3 Stunden antepartum	900-4000 (MW: 2100 ± 600)	
0-9 Stunden post partum des 1. Welpen	1060-7150 (MW: 3640 ± 815)	
Tag 63 ± 6,3 der Gravidität	7941 ± 950	(Luz et al., 2006)
Tag 15 Diöstrus ingraavid	903 ± 146	(Nohr et al., 1993)
18-48 Stunden (33,6±9,9) nach P <sub>4</sub> - Abfall, zeitgleich mit ersten Geburtsanzeichen	28925 ± 6841	
PGFM-Basalniveau (=Mittelwert aller bis 24h vor dem Beginn des P <sub>4</sub> -Abfalls gezogenen Proben)	730 ± 358	

Ad 3) Bei einem unkastrierten Rüden wurden Blutproben vor und nach Firocoxibgabe (Previcox®) in doppelter Dosierung (10 mg/kg KGW und Tag) entnommen. Wie Tab. 8 zeigt, deutet sich nach Behandlungsbeginn an den Tagen 7, 8 und 9 ein temporärer Abfall der Werte an, eindeutige Unterschiede zeigen sich jedoch nicht.

Tabelle 8: PGFM-Konzentrationen eines unkastrierten Rüden vor und nach Firocoxibgabe

Blutentnahme an	Previcoxgabe	PGFM-Wert in pg/ml
<b>Tag 1 morgens</b>		7263,0
<b>Tag 3 morgens</b>		8213,9
<b>Tag 5 morgens</b>		9472,8
<b>Tag 7 morgens vor Medikamentengabe</b>	10 mg/kg Previcox®	12049,9
<b>Tag 7 abends</b>		7384,9
<b>Tag 8 morgens vor Medikamentengabe</b>	10 mg/kg Previcox®	3527,9
<b>Tag 8 abends</b>		8720,8
<b>Tag 9 morgens</b>		5209,7
<b>Tag 11 morgens</b>		8317,2
<b>Tag 13 morgens</b>		10916,4
<b>Tag 15 morgens</b>		14514,4

Ad 4) Bei Betrachtung der bei Einbringung unterschiedlicher Aliquote (siehe Tab. 6) erhaltenen Messwerte zeigte sich, dass mit  $r = 0,99$  sowohl für „Cleo“ als auch für „Muffin1“ sehr gute, einer Geraden entsprechende, Regressionskoeffizienten erzielt wurden. Allerdings schnitten die Regressionsgeraden die y-Achse nicht bei 0, sondern bei -2,7 beziehungsweise -297,1. Ähnliche Phänomene wurden in früheren Untersuchungen bei der Bestimmung von Östrogenen im Urin von Kälbern beobachtet (Hoffmann, persönliche Mitteilung). Entsprechend der damals gemachten Verfahren, wurde der sich aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse ergebende Wert als „individueller Probenblindwert“ angesehen.

Bei Berücksichtigung des Probenblindwertes und Hochrechnung auf pg/ml Plasma ergab sich für „Cleo“ ein Mittelwert von  $18273 \pm 1126$  und für „Muffin1“ einer von  $327 \pm 50,7$  pg/ml.

Bei allen weiteren Messungen wurden daher aliquote Plasmamengen (bei Beibehaltung des Inkubationsvolumens von 50 µl) von 2,5, 5 und 10 µl in den Test eingebracht, die Regressionsgeraden berechnet und bei einem Wert von  $r \geq 0,95$  der Schnittpunkt mit der y-Achse als individueller Probenblindwert angesehen und wie oben beschrieben vorgegangen. Ein weiteres Beispiel mit der dazugehörigen Berechnung findet sich in Abb. 4 und Tab. 9.

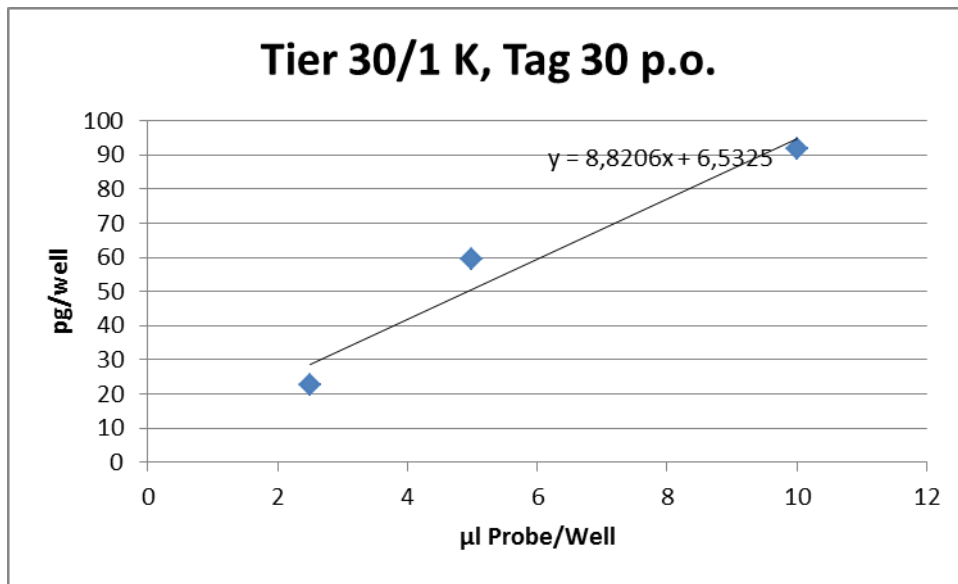


Abbildung 4: Regressionsgerade zur Berechnung des individuellen Probenblindwertes am Beispiel des Tieres 30/1/16 K

Tabelle 9: Vorgehen zur Berechnung der Konzentration in pg/ml aus den 3 Verdünnungsstufen unter Berücksichtigung des Probenblindwertes

<b>Tier 30/1 K</b>			
µl Probe /well	10	5	2,5
Messwert PGFM	91,8	59,5	22,7
r	0,97		
Individueller Probenblindwert	6,5		
durch Probenblindwert korr. Messwerte	85,3	53	16,2
Faktor zur Angleichung auf höchste Verdünnungsstufe	1/4	1/2	1
pg/2,5 µl	21,3	26,5	16,2
Mittelwert	21,3		
Auf PGFM/ml mit Faktor 20 <sup>1)</sup> hochgerechneter Wert	426,8		

<sup>1)</sup> der Faktor 20 ergibt sich aus  $50/2,5$

Die Ergebnisse der Vorversuche lassen insgesamt erkennen, dass das kommerzielle Kit zur Messung von PGFM bei Anwendung im Hundeplasma zwischen hohen und niedrigen Werten unterscheiden kann. Bei Anwendung der Korrektur durch Erfassung des individuellen Probenblindwertes ist weiterhin davon auszugehen, dass zumindest „semiquantitative“ Daten erhalten werden.

#### 3.4.2.3 Testdurchführung

Die Testdurchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Die acht Standardkurvenpunkte wurden in einer Verdünnungsreihe für jeden Test aus der Stammlösung frisch angesetzt und gingen in folgenden Konzentrationen in den Test ein: S1 5000 pg/ml; S2 1667 pg/ml; S3 556 pg/ml; S4 185 pg/ml; S5 61,7 pg/ml; S6 20,6 pg/ml; S7 6,9 pg/ml; S8 2,3 pg/ml.

Anders als im Testkit vorgesehen wurden (wie oben beschrieben) von den Proben drei aufsteigende Aliquote (2,5 – 5 – 10 µl) in den Test eingebracht und die Korrekturberechnung wie oben angegeben durchgeführt.

Bei allen Tests dienten Proben von „Cleo“ und „Muffin1“ als „hohe“ beziehungsweise „niedrige“ Referenzproben.

Tabelle 10: Testansatz PGFM-EIA

<b>Well</b>	<b>EIA Puffer</b>	<b>Standard/Probe</b>	<b>Tracer</b>	<b>Antiserum</b>
<b>Total Activity (TA)</b>	-	-	5 µl (nach Substratzugabe)	-
<b>NSB*</b>	100 µl	-	50 µl	-
<b>B0*</b>	50 µl	-	50 µl	50 µl
<b>Std**</b>	-	50 µl	50 µl	50 µl
<b>Probe</b>	-	2,5/ 5/ 10 µl <sup>1</sup>	50 µl	50µl

\*im Dreifachansatz \*\* im Doppelansatz

<sup>1)</sup> aliquote Plasmavolumina ad 50 µl mit EIA-Puffer

Nach Beschickung wurden die Platten für 18 h bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Nach fünfmaligem Waschen der gesamten Platte mit dem mitgelieferten Waschpuffer erfolgte als letzter Schritt die Zugabe des Ellman's Reagenz (200 µl), gefolgt von einer eineinhalbstündigen Inkubation, in der der Farbumschlag erfolgte. Danach wurden die Platten bei einer Wellenlänge von 405 nm mit dem ELISA-Reader MRXe Microplate Reader (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA) abgelesen. Laut Herstellerangaben kann die Ablesung zwischen 405 und 420 nm Wellenlänge erfolgen.

#### 3.4.2.4 Auswertung

Die Auswertung wurde mit dem an den ELISA-Reader angeschlossenen Programm MRXe Revelation (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA), durchgeführt. Diesem lag folgendes Vorgehen zu Grunde:

Die Berechnung der relativen Bindung, bezogen auf den B<sub>0</sub>-Wert (100%), erfolgte nach Korrektur mit dem NSB-Wert. Die weitere Auswertung mit automatischer Datenausgabe erfolgte anhand einer Standardkurve im Log (x)/ Lin (y)-Format. Da die Berechnung des Programms von einer Plasmamenge von 50 µl ausgeht, war eine weitere Berücksichtigung der tatsächlich eingebrachten Plasmamenge erforderlich (siehe Tab. 9).

#### 3.4.2.5 Inter- und Intraassayvariabilität

Die Interassayvariabilität wurde retrospektiv nach Durchführung der Probenmessungen bestimmt. Dabei ergab sich bei „Cleo“ (Wert im hohen Mittel des Messbereiches) aus neun Messungen ein Wert von  $30975,7 \pm 15619,9$  pg/ml, d.h. der Variationskoeffizient lag bei 50,4%. Die entsprechenden Werte für „Muffin1“ lagen bei  $996,3 \pm 470,24$  pg/ml, der Variationskoeffizient bei 47,2%.

In einem gesonderten Versuch wurde die Intrassayvariabilität anhand einer siebenmaligen Messung der Plasmaprobe Muffin1 bestimmt. Sie lag bei einem mittleren Probenwert von  $1545,9 \pm 482,9$ , der Variationskoeffizient bei 31,2 %.

Diese Werte zeigen erneut, dass mit dem Test allenfalls semiquantitative Werte erhalten werden können.

### **3.4.3 Bestimmung von *Bicyclo PGEM* mit einem kommerziellen EIA-Kit**

Auch die Bestimmung des PGE<sub>2</sub>-Metaboliten erfolgte mit einem speziellen Enzymimmunoassay der Firma Cayman (Prostaglandin E Metabolite EIA Kit, Item No 514331, vertrieben über die Fa. IBL, Hamburg, D). Dieser Test war ebenfalls nur zur Verwendung für Forschungszwecke bestimmt, ohne Angaben zur Eignung für bestimmte Spezies.

Alle Puffer wurden mit dem Kit mitgeliefert und mussten teilweise mit „Ultra-Pure-Water“ (Fa. IBL, Hamburg, D) auf die Endkonzentration eingestellt werden (siehe Kap. 3.8.2)

#### **3.4.3.1 Prinzip**

Wie in Kap. 3.4.2.1 bereits erläutert, werden nicht PGE<sub>2</sub> sondern seine Metaboliten gemessen. Der mittels der Prostaglandin-13-Reduktase entstehende Metabolit, 13,14, dihydro-15-keto PGE<sub>2</sub> (PGEM), ist jedoch instabil, da er in wässrigem Medium zu 13,14-dihydro-15-keto PGA<sub>2</sub> (PGAM) und dessen Produkten dehydriert (Granstrom et al., 1980). Auf Grund dessen müssen PGEM und PGAM zunächst in ein einziges stabiles Derivat (Derivatisierung) überführt werden. Bei einem pH von 10,5 werden beide Metaboliten einheitlich in 11-desoxy-13,14-dihydro-15-keto-11 beta, 16-xi-cyclo-PGE<sub>2</sub> (*Bicyclo PGEM*) degradiert (Bothwell et al., 1982).

Wie bei der Bestimmung von PGFM handelte es sich auch beim PGE<sub>2</sub>-Metaboliten Test um einen solid-phase-assay, bei dem nicht markierter und mit Acetylcholinesterase markierter Analyt um Bindungsstellen an dem im Unterschuss vorliegenden 1. Antikörper konkurrieren. Daher werden im Folgenden nur die Abweichungen vom PGFM-Test (siehe Kap. 3.4.2) beschrieben.

Als 1. Antikörper diente ein Kaninchenantiserum gegen den Prostaglandin E<sub>2</sub> Metaboliten. Dieses wies laut Herstellerangaben die in Tab. 11 angegebene Spezifität auf.



Tabelle 11: Spezifität des PGE<sub>2</sub>-Metaboliten-EIA Antiserums

Verbindung	Kreuzreaktion
<b>13,14-dihydro-15-keto PGE<sub>1</sub></b>	100 %
<b>13,14-dihydro-15-keto PGE<sub>2</sub></b>	100 %
<b>Bicyclo ProstaglandinE<sub>1</sub></b>	38 %
<b>13,14-dihydro-15-keto PGD<sub>2</sub></b>	0,08 %
<b>13,14-dihydro-15-keto PGF<sub>2α</sub></b>	0,02 %
<b>Arachidonsäure</b>	< 0,01 %
<b>Leukotriene B<sub>4</sub></b>	< 0,01 %
<b>Tetranor-PGEM</b>	< 0,01 %
<b>Tetranor- PGFM</b>	< 0,01 %
<b>Prostaglandin D<sub>2</sub></b>	< 0,01 %
<b>Prostaglandin E<sub>1</sub></b>	< 0,01 %
<b>6-keto Prostaglandin F<sub>1α</sub></b>	< 0,01 %
<b>Prostaglandin F<sub>2α</sub></b>	< 0,01 %
<b>Thromboxan B<sub>2</sub></b>	< 0,01 %

#### 3.4.3.2 Derivatisierung

Zur Derivatisierung der Proben wurden zu 50 µl Plasma 15 µl 1 M Carbonat-Puffer zugesetzt und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurden 20 µl 1 M Phosphatpuffer und 15 µl EIA-Puffer zugesetzt. Der im Kit mitgelieferte Standard (Item No. 414534) wurde 1:10 mit „Ultra-Pure-Water“ auf eine Konzentration von 40 ng/ml verdünnt. Davon wurden 50 µl mit 950 µl EIA-Puffer verdünnt und mit 300 µl 1M Carbonat-Puffer zur Derivatisierung versetzt und zusammen mit den Proben über Nacht im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurde die Standardprobe durch Zusatz von 400 µl 1 M Phosphatpuffer und 300 µl EIA-Puffer auf die Konzentration von 1000 pg/ml eingestellt (Standard).

### 3.4.3.3 Überprüfung der Zuverlässigkeit des Tests

Laut Produktinformation ist eine Aufreinigung der Plasmaproben erforderlich, wenn die Korrelation von mindestens zwei verschiedenen Verdünnungsstufen einer Probe in der errechneten Endkonzentration mehr als 20 % Abweichung zeigt.

Dies sollte anhand der Vorversuche abgeklärt werden. Darüber hinaus sollten auch noch die beiden folgenden Fragen geklärt werden:

- 1) Inwieweit unterscheidet der Test zwischen Plasmaproben mit erwartet „hohen“ und „niedrigen“ Bicyclo PGEM Werten?
- 2) Inwieweit ergibt sich eine Linearität bei Messung in unterschiedlichen Aliquoten der gleichen Plasmaprobe?

Ad 1) Wie schon bei PGFM beschrieben, wurde auch hier das Plasma von einer Hündin in der Geburt („Zhara“) und das Plasma einer Hündin mit unbekanntem Zyklusstand („Muffin2“) herangezogen. Das Ergebnis zeigt Tab. 12. Auch hier zeigt sich ein Unterschied zwischen „hoch“ und „niedrig“ im Test.

Tabelle 12: Vorversuch zur Überprüfung der Eignung des PGE<sub>2</sub>-Metaboliten-EIA durch Einbringung von Plasmaproben mit erwartet hohen und niedrigen Bicyclo PGEM Werten (Angabe in pg/ml)

Aus Test 5	<b>Zhara<sup>1)</sup></b>		<b>Muffin2<sup>2)</sup></b>	
<b>Verdünnung</b>	pg/Well	pg/ml <sup>3)</sup>	pg/Well	pg/ml <sup>3)</sup>
<b>1:100</b>	20,5	2054,5	1,8	176,7
<b>1:50</b>	38,8	1937,8	3,1	154,2
<b>1:25</b>	79,8	1996,1	6,6	165,4
$\bar{x}$	1996,1		165,4	
<b>SD</b>	58		11,3	
<b>VK (SD/ <math>\bar{x}</math> x 100)</b>	2,9		6,8	
<b>R</b>	0,99		0,99	

1) Hündin in Geburt

2) Hündin mit unbekanntem Zyklusstand

3) Nach Anwendung der unter Abb. 4 und Tab. 9 angegebenen Korrektur

Ad 2) Tab. 12 zeigt ebenfalls die Austestung einer Verdünnungsreihe, bei der beide Proben im Messbereich der Standardkurve lagen. Der Korrelationskoeffizient der beiden Regressionsgeraden lag bei jeweils 0,99 wobei die Schnittpunkte mit der y-Achse zum Teil jedoch deutlich von 0 abwichen. Es wurde daher wie bei der Bestimmung von PGFM mit dem individuellen Probenblindwert gearbeitet (siehe Kap. 3.4.2). Nach dieser Korrektur ergab sich eine hohe Übereinstimmung der Messwerte (pg/ml), die Variationskoeffizienten lagen bei 2,9 („Zhara“) und 6,82 („Muffin2“). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Aufreinigung der Plasmaproben als nicht notwendig erachtet.

### *3.4.3.4 Testdurchführung*

Im Anschluss an die Derivatisierung, bei der bereits eine 1:1 Verdünnung der Proben erfolgt war, erfolgte eine weitere Verdünnung der Proben mit PGEM-Puffer, so dass bei einem Pipettiervolumen von 50 µl zwischen 0,5 bis 4 µl Plasma in den Test eingebracht wurden.

Die Standardkurvenpunkte S1 - S8, die durch Verdünnung mit PGEM-Puffer aus dem Standard (1000 pg/ml) für jeden Test frisch angesetzt wurden, hatten folgende Konzentrationen: 50 pg/ml; 25 pg/ml; 12,5 pg/ml; 6,25 pg/ml; 3,13 pg/ml; 1,56 pg/ml; 0,78 pg/ml und 0,39 pg/ml.

Die 96-Well-Platten wurden wie folgt beschickt:

Tabelle 13: Bicyclo PGEM Testansatz

<b>Well</b>	<b>PGEM Puffer</b>	<b>EIA Puffer</b>	<b>Standard/Probe</b>	<b>Tracer</b>	<b>Antiserum</b>
<b>TA</b>	-	-	-	5 µl (nach Substratzugabe)	-
<b>NSB*</b>	50 µl	50 µl	-	50 µl	-
<b>B0*</b>	50 µl	-	-	50 µl	50 µl
<b>Std**</b>	-	-	50 µl	50 µl	50 µl
<b>Probe</b>	-	-	Aliquote Plasmavolumina <sup>1)</sup>	50 µl	50 µl

\*im Dreifachansatz \*\* im Doppelansatz.

<sup>1)</sup> ad 50 µl mit PGEM-Puffer

Es folgte eine 18 stündige Inkubation des Testansatzes bei Raumtemperatur.

Nach fünfmaliger Waschung mit dem mitgeliefertem Waschpuffer und 60 minütiger Inkubation mit dem Ellman's Reagenz (200 µl/ Well) konnte die Platte bei 405 nm mit dem ELISA-Reader MRXe Microplate Reader (Fa. Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA) abgelesen werden.

#### 3.4.3.5 Auswertung

Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit dem Programm MRXe Revelation nach demselben Prinzip wie bei PGFM beschrieben (siehe Kap. 3.4.2.4).

#### 3.4.3.6 Inter- und Intraassayvariabilität

Auch hier erfolgte die Interassayvariabilität retrospektiv nach den Probenmessungen. Dabei ergab sich für „Zhara“ mit n=7 ein Wert von 2167,06 ± 664,37 pg/ml und ein Variationskoeffizient von 30,66%.

Das zeigt, dass auch mit diesem Test bestenfalls eine semiquantitative Bestimmung möglich ist.

### **3.5 Untersuchungen der Gewebeproben**

Entsprechend der getroffenen Absprachen, waren die Gewebeproben von der Arbeitsgruppe „Olsztyn“ fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Nach Verbringung der Blöcke an das veterinäranatomische Institut der Universität Zürich wurden dort durch die Arbeitsgruppe „Kowalewski“ 3-4  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte hergestellt, auf Objektträger aufgezogen und in dieser Form für die eigenen Untersuchungen verwendet.

#### ***3.5.1 Ausmessen der Luteinzellkernflächen***

Die Beurteilung erfolgte an Haematoxilin-Eosin (HE) gefärbten Präparaten bei 400-facher Vergrößerung. Pro Tier wurden 100 Zellkerne erfasst und jeweils fotografisch dokumentiert.

Die mikroskopische Untersuchung erfolgte an einem Durchlichtmikroskop mit Kameraaufsatz und angeschlossenem Pentium PC mit Bildschirm der Firma Leica (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D). Als Software stand das Programm „Leica Image Manager IM 1000“ zur Verfügung.

Folgende Kriterien mussten bei der Ausmessung eines Zellkerns erfüllt sein:

- rundlicher, exzentrisch lokalisierter deutlich abgesetzter Zellkern
- 1-2 deutlich sichtbare Nukleoli
- Kerngrenzen deutlich sichtbar

Der Längsdurchmesser a und der Querdurchmesser b wurden in einem annähernd rechten Winkel zueinander gemessen (siehe Abb. 5).

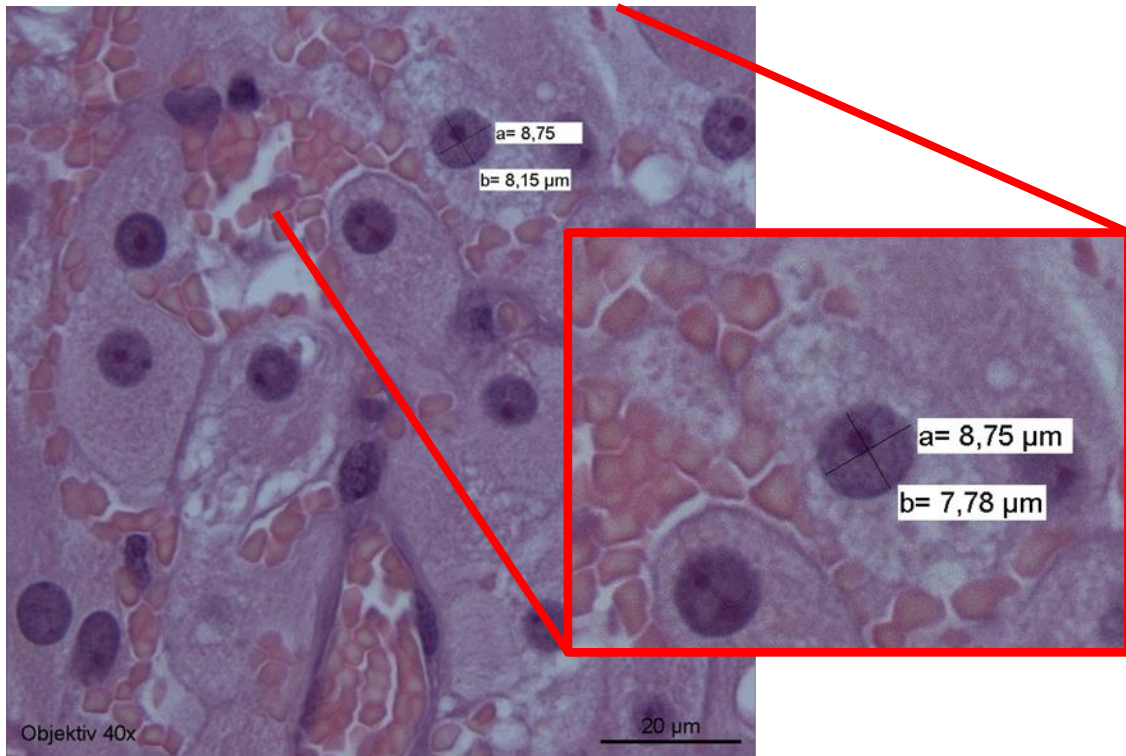


Abbildung 5: Darstellung der Zellkernmessung mit dem Programm Leica IM 1000 bei 400-facher Vergrößerung

Die Berechnung der Zellkernfläche (F) erfolgte nach der für eine Ellipse gültige Formel mit den Halbachsen A und B ( $A = 0,5 a$ ;  $B = 0,5 b$ ):

$$F = \pi AB$$

Aus den 100 errechneten Werten pro Tier wurde jeweils der arithmetische Mittelwert bestimmt und in die weitere statistische Auswertung eingebracht.

### **3.5.2 Immunhistochemischer Nachweis der Cox2 im Corpus luteum der Hündin**

Das immunhistochemische Verfahren selbst folgte weitestgehend dem im hiesigen Labor etablierten Verfahren.

#### *3.5.2.1 Antikörper und Serum*

Bei dem Primärantikörper handelte es sich um einen monoklonalen Maus-Anti-Ratte-Cox2 Antikörper (IgG1, clone 33 BD Biosciences, CA, USA), der in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt wurde.

Als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter Pferd-anti-Maus-IgG-Antikörper (BA-2000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), der in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt wurde.

Die Isotypenkontrolle bestand aus einem monoklonalen Maus-IgG1-Ab-1 Antikörper (Clone NCG01; Dianova GmbH, Hamburg, D) und war gegen ein synthetisches Hapten gerichtet, das den Herstellerangaben zufolge in tierischen Zellen nicht vorkommt. Sie wurde in der gleichen Proteinkonzentration eingesetzt wie der Primärantikörper.

Das zur Blockierung unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers verwendete Pferdeserum stammte aus einer hier gewonnenen Blutprobe vom Pferd. Das Serum wurde bei 56°C für 20 min inaktiviert und in einer 10%igen Verdünnung eingesetzt. Die Verdünnungen wurden mit Immunhistochemiepuffer (IHC-Puffer) durchgeführt.

#### *3.5.2.2 Testdurchführung*

##### *3.5.2.2.1 Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte*

Dazu wurden die Schnitte zunächst jeweils zweimal zehn Minuten in Xylol und danach jeweils zweimal zwei Minuten in 100%igem, 96%igem und 70%igem Ethanol inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Schnitte fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült.

### 3.5.2.2.2 Antigen-Demaskierung (Epitopretrieval)

Durch das Epitopretrieval werden fixationsbedingte Vernetzungen aufgebrochen, die eine Bindung des primären Antikörpers mit dem entsprechenden Epitop ermöglichen sollen [Lang, 2006 (Übersichtsarbeit)].

Dabei kam das im hiesigen Labor etablierte Routineverfahren zur Anwendung.

Nach fünfminütiger Inkubation in 10 mM Citratpuffer erfolgte eine dreimalige fünfminütige Erhitzung der Schnitte in einer haushaltsüblichen Mikrowelle bei 560 Watt in bereits vorgeheiztem Citratpuffer. Verdampfte Flüssigkeit wurde mit destilliertem Wasser ersetzt, um die Salzkonzentration konstant zu halten. Danach erfolgte eine Abkühlung für 20 Minuten und eine fünfminütige Spülung unter laufendem Leitungswasser.

### 3.5.2.2.3 Hemmung der endogenen Peroxidase

Die endogene Peroxidaseaktivität kann zu „falsch positiven“ Ergebnissen bei der Farbstoffumsetzung führen und muss daher in einer Vorbehandlung deaktiviert werden [Lang, 2006 (Übersichtsarbeit)]. Dies erfolgte durch eine 30 minütige Inkubation in 0,3%iger Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-Lösung in Methanol, gefolgt von einer fünfminütigen Waschung in IHC-Puffer.

### 3.5.2.2.4 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Objektträger mit 10%igem Pferdeserum überschichtet und für 30 Minuten inkubiert.

### 3.5.2.2.5 Zugabe des Primärantikörpers

Nach Absaugen der Blockierungslösung wurde der Primärantikörper beziehungsweise im Fall der Negativkontrollen der Isotypenantikörper aufgebracht und die Objektträger bei 4°C in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert.

### 3.5.2.2.6 Zugabe des Sekundärantikörpers

Danach wurden die Schnitte nach zweimaliger Waschung in IHC-Puffer für jeweils zehn Minuten mit dem Sekundärantikörper überschichtet und in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert.



### 3.5.2.2.7 Durchführung der Farbreaktion

Die Schnitte wurden nach zweimaliger fünfminütiger Waschung in IHC-Puffer für 30 Minuten mit dem Peroxidase konjugierten Avidin-Biotin-Complex (Vectastain® PK-6101 Rabbit Ig G Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) überschichtet, welcher entsprechend der Herstellerangaben 30 Minuten vor Gebrauch mit IHC-Puffer angesetzt worden war. Nach erfolgter Bindung des AB-Complexes an den Sekundärantikörper und erneuter Waschung in IHC-Puffer (2 x 5 Minuten) wurde die Peroxidase vermittelte Farbreaktion durch Zugabe des Chromogens Nova RED (Cat. No. SK-4800, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), initiiert.

### 3.5.2.2.8 Entwässerung und Einbettung der Gewebeschnitte

Die Gewebeschnitte wurden zweimal jeweils zwei Minuten in 70%igem, 96%igem und 100%igem Ethanol, sowie zweimal jeweils zehn Minuten in Xylol inkubiert. Zur Fixation des Gewebes wurde ein Tropfen Histokitt aufgetragen und ein Deckgläschen darüber blasenfrei platziert.

### 3.5.2.3 Auswertung der Präparate

Da sich die Färbung des Schnittes inhomogen darstellte und in einigen Präparaten nur partielle Anfärbungen auftraten (siehe Kap. 4, Abb. 16) war eine zielgerichtete, die Basis für eine statistische Beurteilung schaffende Auswertung nicht möglich. Die Auswertung erfolgte daher rein deskriptiv. Als Positivkontrolle dienten Schnitte aus Rinderplazenta im letzten Drittel der Trächtigkeit. Diese färbten sich durchgehend homogen während aller Testdurchläufe (siehe Kap. 4, Abb. 17).

### **3.5.3 Immunhistochemischer Nachweis des Proliferationsmarkers Ki67**

Die Darstellung des Ki 67 Antigens erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Veterinärpathologie, Dr. Kernt Köhler, wobei alternativ zu der im eigenen Labor etablierten Methode der Demaskierung von Epitopen durch Erhitzung in einer Mikrowelle (siehe Kap. 3.5.2), die Demaskierung durch Erhitzung im kochenden Wasserbad erfolgte. Das Ki67-Antigen ist ein nukleäres Protein und wird während aller aktiven Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2- und M-Phase) exprimiert (Gedes et al., 1984).

#### *3.5.3.1 Antikörper und Serum*

Bei dem Primärantikörper handelte es sich um einen monoklonalen Maus-Anti-Human-Ki-67-Ag Antikörper (Clone MIB-1; Dako Denmark A/S, bezogen über Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D), der in einer Verdünnung von 1:50 in TBS-Puffer mit 1% BSA eingesetzt wurde.

Die Isotypenkontrolle bestand aus einem monoklonalen Maus-IgG1-Ab-1 Antikörper (Clone NCG01; Dianova GmbH, Hamburg, D) und ist laut Herstellerangaben gegen ein synthetisches Hapten gerichtet, das in tierischen Zellen nicht vorkommt. Sie wurde in der gleichen Proteinkonzentration eingesetzt wie der Primärantikörper.

Rattenserum (PAA Laboratories GmbH, Pasching, A) wurde als 10%ige Verdünnung in Tris-buffered-saline (TBS)-Puffer eingesetzt.

Als Sekundärantikörper wurde ein Ratte-anti-Maus-IgG (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., PA, USA) in einer 1:100 Verdünnung in TBS-Puffer mit 1% BSA eingesetzt.

#### *3.5.3.2 Testdurchführung*

##### *3.5.3.2.1 Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte*

Die Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgte dreimalig für je drei Minuten in Xylol, zweimal für je drei Minuten in Isopropanol, sowie einmalig für drei Minuten in 96%igem und 80%igem Ethanol.

#### 3.5.3.2.2 Hemmung der endogenen Peroxidase

Die Hemmung der endogenen Peroxidase erfolgte durch Eintauchen in eine 0,3%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung in Methanol für 30 Minuten, gefolgt von einer fünfminütigen Waschung in TBS-Puffer.

#### 3.5.3.2.3 Antigen-Demaskierung (Epitopretrieval)

Zur Antigen-Demaskierung wurden die Objektträger für 25 Minuten in 10 mM Citratpuffer mit 1% Tween 20, der in einem Wärmewasserbad zum Kochen gebracht wurde, inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Objektträger für 15 Minuten im gleichen Puffer abgekühlt.

#### 3.5.3.2.4 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen

10%iges Rattenserum in TBS-Puffer diente als Blockierungslösung, mit dem die Objektträger für zehn Minuten überschichtet wurden.

#### 3.5.3.2.5 Zugabe des Primärantikörpers

Die mit Primärantikörper, sowie im Falle der Negativkontrollen mit der Isotypenkontrolle, beschichteten Objektträger wurden in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht inkubiert.

#### 3.5.3.2.6 Zugabe des Sekundärantikörpers

Nach dreimaligem fünfminütigem Waschen in TBS-Puffer, wurden die Objektträger für 30 Minuten mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 3.5.3.2.7 Durchführung der Farbreaktion

Nach erneutem dreimaligem fünfminütigem Waschen in TBS-Puffer kam es zur 30 minütigen Inkubation der Objektträger mit dem Maus-PAP-Komplex (Maus-Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex, Jackson Immuno Research Laboratories Inc., PA, USA). Der PAP-Komplex besteht aus drei Peroxidaseenzymen und zwei Antikörpern gegen Peroxidase, die aus derselben Spezies wie der Primärantikörper stammten. Der Sekundärantikörper fungiert als Brückenantikörper. Das Chromogen DAB (3,3'-Diamino-benzidin-tetrahydrochlorid Dihydrat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D), wurde durch Wasserstoffperoxid (Substrat) unter der

katalytischen Wirkung der Peroxidase in ein braunes Farbprodukt umgesetzt. Dies erfolgte, nach dreimaligem fünfminütigem Waschen in TBS, in frisch angesetzter und filtrierter DAB-Lösung unter Rühren der Objektträger für zehn Minuten.

Nach dreimaligem fünfminütigem Waschen in TBS und einmaligem fünfminütigem Waschen in Aqua dest. erfolgte eine fünfminütige Inkubation in KardaseWitch, darauffolgend zweimaliges fünfminütiges Waschen in Aqua dest.. Im Anschluss daran wurden die Objektträger mit Haematoxylin 1:10 in Aqua dest. gegengefärbt und fünf Minuten in Leitungswasser gebläut, sowie fünf Minuten in Aqua dest. gewaschen.

### 3.5.3.2.8 Entwässerung und Einbettung der Gewebeschnitte

Die Dehydrierung erfolgte in der aufsteigenden Alkoholreihe für je drei Minuten in Ethanol 80%, 96%, zweimal in Isopropanol und dreimal in Xylol. Die Einbettung der Gewebeschnitte erfolgte mittels Eindeckelautomat.

### 3.5.3.3 Auswertung der Gewebeschnitte

Als Positivkontrolle diente canines Darmepithel, welches vom Institut der Veterinärpathologie freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde und sich wie erwartet anfärbte (siehe Kap. 4, Abb. 21). Zudem dienten die Follikel in den zu untersuchenden Gewebeschnitten, sofern sie vorhanden waren, als interne Positivkontrollen. Für jeden Gewebeschnitt gab es eine Negativkontrolle, die anstatt mit dem Primärantikörper mit der Isotypenkontrolle überschichtet wurde. Für jeden Gewebeschnitt wurden drei Gesichtsfelder ausgewertet, die je aus der Peripherie, der Mitte und des Zentrums des Gelbkörpers stammten, wobei die gefärbten Zellen gezählt wurden. Auf Grund der sehr geringen Anzahl an gefärbten Zellen, war die Basis für eine statistische Auswertung zu schwach.

### 3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Leitung von Dr. rer. nat. Dipl. Math. Klaus Failing.

Auf Grund der rechtsschiefen Verteilung der  $P_4$ -, PGFM- und Bicyclo PGEM-Konzentrationen wurden die Werte zunächst logarithmisch transformiert, wonach sich eine Normalverteilung ergab. Daraus wurden der geometrische Mittelwert ( $\bar{x}_g$ ) und Streufaktoren (SF) berechnet.

Weiterhin erfolgte mittels t-Test für unabhängige Stichproben ein Vergleich der zu den einzelnen Zeitpunkten gemessenen Konzentrationen an  $P_4$ , PGFM und Bicyclo PGEM.

Um den Einfluss der Variablen „Zeit“ und „Behandlung“ auf die jeweiligen Hormonkonzentrationen ( $P_4$ , PGFM und Bicyclo PGEM) zu analysieren, wurde eine schrittweise zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor Zeit durchgeführt; da die einzelnen Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten (Ovariohysterektomie an Tag 0, 5, 10, 20 oder 30) aus dem Versuch ausschieden und somit zu den jeweiligen Zeitpunkten eine unterschiedliche Tieranzahl vorlag, musste die ANOVA (Analysis of Variance) schrittweise erfolgen.

Die statistische Auswertung der Zellkerngrößen erfolgte über eine zweifaktorielle ANOVA mit den Faktoren Kastrationstag und Behandlung. Bei den Zellkerngrößen lag eine Normalverteilung vor.

Die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Zellkerngröße und Progesteronkonzentration erfolgte mit Hilfe einer Korrelationsanalyse.

Die Berechnungen wurden mit der BMPD Statistical Software, Inc. durchgeführt.

### 3.7 Verbrauchsmaterialien und Geräte

- Aqua dest. aus Aqua demineralisata Seral-Anlage mit angeschlossener Millipore-Reinigungsanlage „Milli Q“, Water Purification System, Typ MQ 4-fach UF (Millipore GmbH, Eschborn, D)
- DakoPen (Dako Denmark A/S, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D)
- Diluter-Dispenser „Multilutor DIG“ (Rudolph Brand GmbH & Co KG, Wertheim, D)
- Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1,5 ml (Bezug: MAGV Laborbedarf + Laborgeräte, Rabenau-Langdorf, D)
- Faltenfilter (Schleicher und Schuell GmbH, Dassel, D)
- Flüssigkeitsszintillatorzähler ( $\beta$ -Counter LS 5000 TD) mit angeschlossenen RIA-Auswertungsprogramm (Beckmann Instruments GmbH, München, D)
- IKA Schüttler MTS 2 (MAGV Laborbedarf + Laborgeräte, Rabenau-Londorf, D)
- KimTech Tuch (Kimberley Clark Professional, Dallas, USA)
- Magnetrührer MR 2002 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kelkheim, D)
- Mikrowelle compact, Moulinex, 800 W
- Parafilm (American National Can Group Inc. Chicago, IL, USA)
- pH- Meter (MAGV Laborbedarf + Laborgeräte, Rabenau-Londorf, D)
- Pipetten (Applied Biosystems by Life Technologies, Warrington, UK)
- Pipettenspitzen (nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, D)
- RIA-Testgläschen: Einweg-Reaktionsgläser, AR-Glas, 75x 11,5 mm (Sarstedt, Nümbrecht, D)
- Rotationsmischer (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kelkheim, D)
- Vortex-Evaporator mit Kühlfalle und Vakuumpumpe zum Niedertrocknen der Proben bei der Extraktion:
  - Micro Dancer, Infrared Evaporation System (Hettich, über Fa. Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, D)
  - Pole Star Coldtrap System (Hettich, Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, D)
  - Vacuubrand CVC 3000, PC 3003 VARIO (Vacuubrand GmbH u. Co KG, Wertheim, D)
- Vortexer Heidolph REAX 2000 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kelkheim, D)

- Wärmeschüttelbad GFL 1083 (GFL, Burgwedel, D; Bezug: MAGV Laborbedarf + Laborgeräte, Rabenau-Langdorf)
- Wärmeschrank: Memmert Typ B26, F-Nr: 840073, 220 Volt, 380 Watt, 50/60 Hz, Din, Nenntemp.: 70°C, Schutzart Din (Schwabach, D)
- Wheaton-Schraubgläser 16x100 mm mit Aluminiumfolie enthaltenden Schraubverschlüssen (Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, D)
- Zinsser „Minis 2000“ (Zählfläschchen aus Polyäthylen), 6ml, und Schraubverschlüsse (Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, D)
- Zentrifuge: Varifuge K (Heraeus Christ GmbH, Osterode, D)
- Zentrifuge: Varifuge 3.0 R,  $g = 2220$ , (Heraeus Christ GmbH, Osterode, D)

### 3.8 Puffer und Lösungen

#### 3.8.1 Puffer und Lösungen für P<sub>4</sub>-RIA

- Phosphatpuffer (pH 7,2; 78,6 mM)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,356 g	(Merck KgaA, Darmstadt, D)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,656 g	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D)
NaN <sub>3</sub>	0,325 g	(Merck KgaA, Darmstadt, D)
Aqua dest.	ad 1000 ml	
- BSA-Puffer 0,1%ig (pH 7,2; 78,6 mM)

Bovines-Serum-Albumin (BSA)	1 g	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D)
Phosphatpuffer	ad 1000ml	
- Holzkohlesuspension (0,5% Norit A, 0,05% Dextran)

Norit A	0,5 g	(Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg, D)
Dextran	0,05 g	(Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg, D)
Aqua dest.	ad 100 ml	

#### 3.8.2 Puffer und Lösungen für die Prostaglandinbestimmung

Die Pufferkonzentrate wurden in den Kits mitgeliefert.

- EIA Puffer

EIA Puffer Konzentrate (10x)	
Ultra Pure Water	ad 90 ml
- Wasch Puffer

Wasch Puffer Konzentrat (400x)	5 ml
Ultra Pure Water	ad 2000 ml
- Phosphat Puffer (1M)

Phosphat Puffer (100dtn)	
Ultra Pure Water	ad 30 ml



- Carbonat Puffer (1M)  
Carbonat Puffer (100dtn)  
Ultra Pure Water ad 25 ml
- PGEM Assay Puffer  
EIA Puffer 13 ml  
Carbonat Puffer 3 ml  
Phosphat Puffer 4 ml
- Ellmanns Reagenz  
Ellmanns Reagenz (100dtn)  
Ultra Pure Water ad 20 ml

### 3.8.3 Puffer und Lösungen für Immunhistochemie

- IHC-Puffer:  
Aqua dest. 1000 ml  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2g (Merck KgaA, Darmstadt, D)  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2g (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D)  
KCl 0,2g (Merck KgaA, Darmstadt, D)  
NaCl 8,0g (Merck KgaA, Darmstadt, D)  
HCL ad pH 7,2-7,4 (Fluka™ Analytical, Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, München, D)  
Triton X 3ml (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D)
- 10 mM Citratpuffer (pH 6)  
Stammlösung A 10,505 g C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> x H<sub>2</sub>O (Merck KGaA, Darmstadt, D)  
+500 ml Aqua bidest.  
Stammlösung B 29,41 g C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub> x H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D)  
+ 1000 ml Aqua bidest  
Gebrauchslösung: Stammlösung A 9 ml + Stammlösung B 41 ml  
ad Aqua bidest. 500 ml

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung 0,3%ig:  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%ig            2ml  
Aqua dest.                ad 200ml
- TBS-Puffer: pH 7,6  
Stammlösung:  
60,57g Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D)  
610 ml Aqua dest.  
390 ml HCL 1 m/l (Titrisol, Merck KGaA, Darmstadt, D)  
Gebrauchslösung:  
100 ml Stammlösung  
900 ml NaCl 0,8% in Aqua dest.
- Imidazol Puffer  
6,81 g Imidazol (Carl Roth GmbH u. Co KG, Karlsruhe, D)  
Ad 1000 ml Aqua dest.  
Mit ca 500 ml 0,1 m/l HCl (Titrisol, Merck KGaA, Darmstadt, D) auf pH 7,1 einstellen
- DAB-Lösung  
100 mg DAB (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D)  
200 ml Imidazol Puffer (pH 7,1)  
70 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %ig)
- Kardase Witch  
800 ml 70 % Ethanol  
200 ml Ammoniak 25 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D)

### 3.9 Reagentien

- Bovines-Serum-Albumin (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D)
- Ethanol (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D)
- Hämatoxin-Lösung modifiziert nach Gill IIII (Merck KGaA, Darmstadt, D)
- Histokitt (MAGV Laborbedarf + Laborgeräte, Rabenau-Langdorf, D)
- Isopropanol (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D)
- Methanol (Merck KGaA, Darmstadt, D)
- n-Hexan (Merck KGaA, Darmstadt, D)
- Szintillatorflüssigkeit: Aqua safe 300 plus (Zinnser Analytic GmbH, Frankfurt, D)
- Triton® X-100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D)
- Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D)
- Wasserstoffperoxid: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Merck KGaA, Darmstadt, D)
- Xylol (VWR International S.A.S., ProLabo® Fontenay sous Bois, F)

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Verläufe der P<sub>4</sub>-Konzentrationen bei der Kontroll- und Behandlungsgruppe

Zur Verfügung standen die Plasmaproben von den in Kap. 3, Tab. 2 und 3 aufgelisteten Hündinnen. Von allen Tieren waren in zweitägigen Abständen (Tag 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 p.o.) Blutproben bis zum Zeitpunkt der Kastration (0, 5, 10, 20 oder 30 Tage p.o.) gewonnen worden. Daraus ergibt sich, dass die Zahl der pro Entnahmetag zur Verfügung stehenden Plasmaproben mit aufsteigendem Tag p.o. abnimmt. Folgende Blutproben standen für die Untersuchungen jedoch nicht zur Verfügung: Tier 30/2 K Tag 2 sowie Tag 14 bis 30 und Tier 30/3 Tag 30.

Die individuellen Progesteronprofile der Kontroll- und Behandlungsgruppe sind in Abb. 6 und 7 dargestellt. Es zeigte sich eine erhebliche Variationsbreite, wobei bei der Kontrollgruppe die Werte zwischen 1,17 und 65,9 ng/ml lagen und bei der Behandlungsgruppe zwischen 0,72 und 68,2 ng/ml. Die für die einzelnen Blutentnahmezeitpunkte berechneten geometrischen Mittelwerte ( $\bar{x}_g$ ) und Streufaktoren (SF) finden sich in Tab. 14, den Verlauf der geometrischen Mittelwerte zeigt Abb. 8. Dabei zeigt sich, dass für die Kontrollgruppe für alle Zeitpunkte höhere Werte errechnet wurden als für die Behandlungsgruppe. Das angewandte statistische Verfahren (schrittweise zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich der Zeit) zeigte jedoch keinen signifikanten Effekt der Behandlung auf die P<sub>4</sub>-Konzentration ( $p = 0,45$  (Tag 0, 2, 4);  $p = 0,1175$  (Tag 0, 2, 4, 6, 8, 10);  $p = 0,3051$  (Tag 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20);  $p = 0,6209$  (Tag 0-30)). Lediglich an Tag 10 ergab sich bei der Kontrollgruppe ein statistisch signifikant höherer Wert als bei der Behandlungsgruppe ( $p < 0,05$ ; t-Test für unabhängige Stichproben). Ein statistisch signifikanter Zeiteffekt innerhalb beider Gruppen wurde, wie zu erwarten war, mit  $p < 0,0001$ , bestätigt

## Ergebnisse

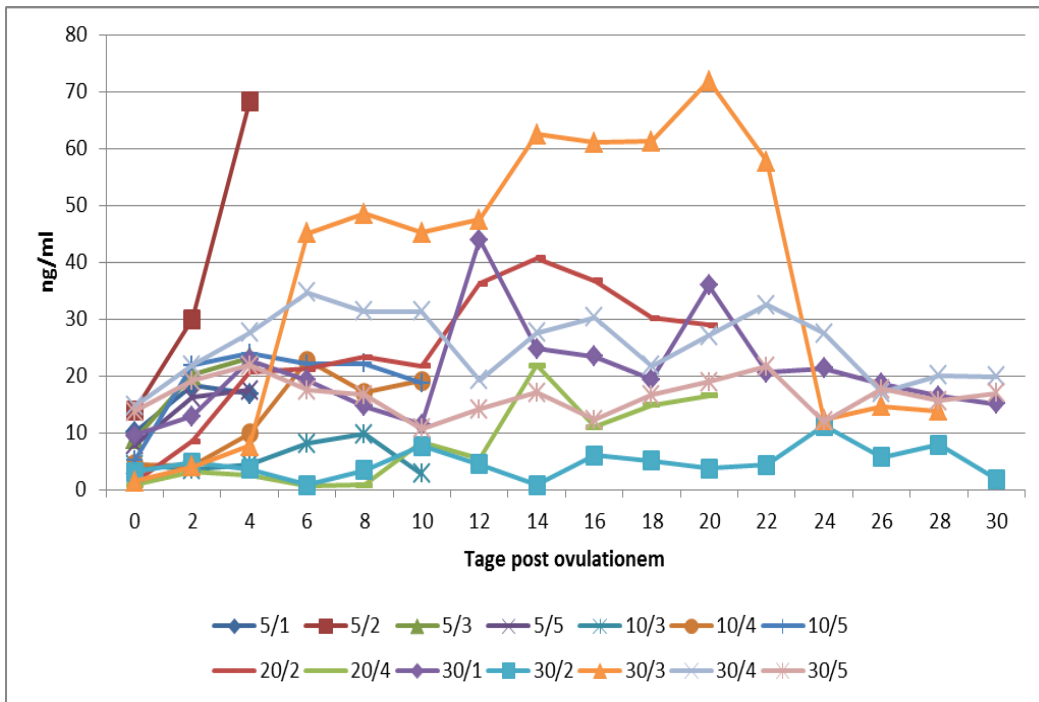


Abbildung 6: Individuelle Progesteronprofile der Behandlungsgruppe

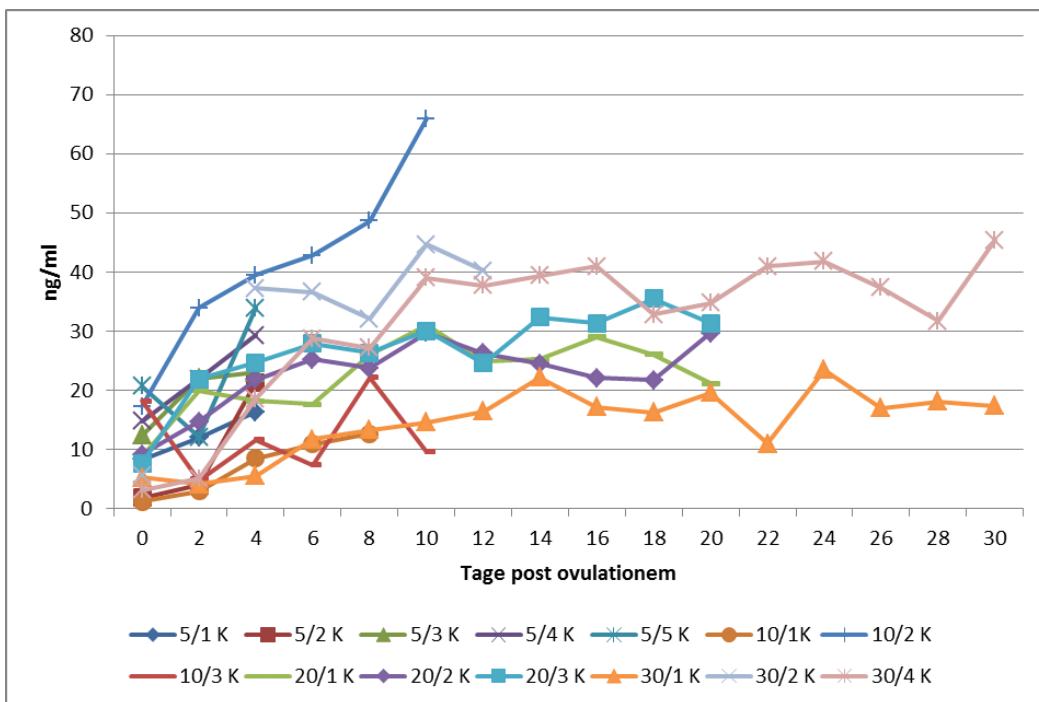


Abbildung 7: Individuelle Progesteronprofile der Kontrollgruppe

Tabelle 14: Geometrische Mittelwerte ( $\bar{x}_g$ ) in ng/ml und Streufaktoren (SF) der P<sub>4</sub>-Konzentrationen im Blut der Behandlungs- und Kontrollgruppe

Zeitpunkt	n	Behandlungsgruppe		n	Kontrollgruppe	
		$\bar{x}_g$	SF		$\bar{x}_g$	SF
<b>Tag 0</b>	14	5,1	2,6	17	6,3	2,6
<b>Tag 2</b>	14	10,4	2,2	13	10,4	2,3
<b>Tag 4</b>	14	13,9	2,5	14	19,5	1,8
<b>Tag 6</b>	10	11,1	4,3	9	20,1	1,8
<b>Tag 8</b>	10	12,5	3,3	9	23,9	1,5
<b>Tag 10*</b>	10	13,8	2,2	8	28,6	1,9
<b>Tag 12</b>	7	17,6	2,6	6	27,1	1,4
<b>Tag 14</b>	7	17,7	4,1	5	28,1	1,3
<b>Tag 16</b>	7	20,0	2,2	5	27,0	1,4
<b>Tag 18</b>	7	19,3	2,1	5	25,5	1,4
<b>Tag 20</b>	7	21,8	2,5	5	26,7	1,3
<b>Tag 22</b>	5	20,6	2,6	2	21,2	2,5
<b>Tag 24</b>	5	15,8	1,5	2	31,3	1,5
<b>Tag 26</b>	5	13,7	1,6	2	25,2	1,8
<b>Tag 28</b>	5	14,1	1,4	2	24,0	1,5
<b>Tag 30</b>	4	9,8	3,1	2	28,1	2,0

Tier 10/1 K Tag 10; Tier 30/3 Tag 30 Blutproben fehlen

\*Der paarweise Vergleich der P<sub>4</sub>-Konzentrationen zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten (t-Test) ergab für Tag 10 mit  $p < 0,05$  bei der Behandlungsgruppe einen signifikant niedrigeren Wert als bei der Kontrollgruppe.

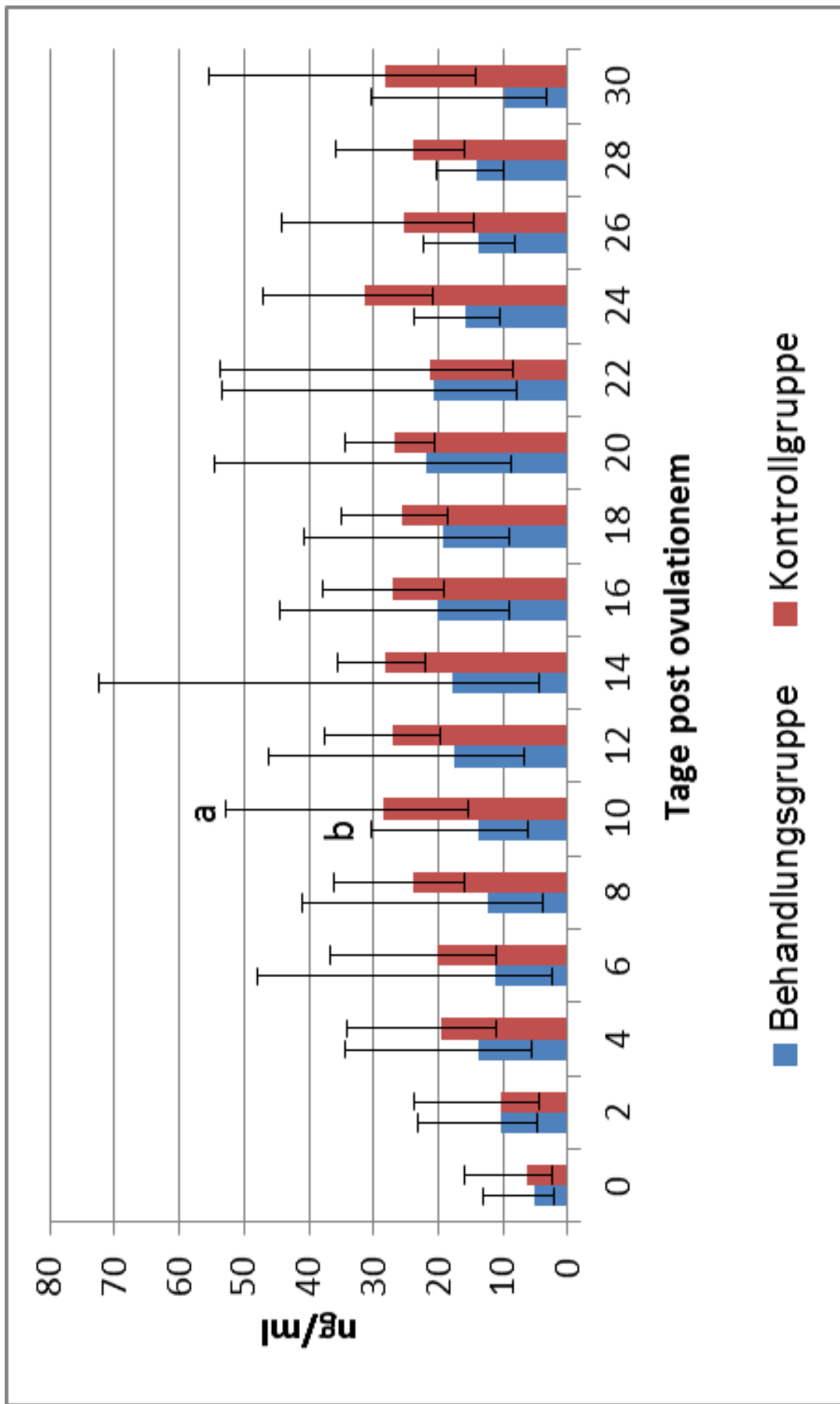


Abbildung 8: Verlauf der mittleren P<sub>4</sub>-Konzentrationen von Behandlungs- und Kontrollgruppe ( $\bar{x}_g \times SF^{\pm 1}$ ); a:b p < 0,05

#### **4.2 Ergebnisse der PGFM-Bestimmung bei der Behandlungs- und Kontrollgruppe**

Die Bestimmung von PGFM erfolgte in allen Plasmaproben, die von den Tagen 0, 4, 6, 12, 18, 24 und 30 stammten; es fehlten jedoch die Proben von Tier 5/5, Tag 4; Tier 20/2, Tag 6 und Tier 30/2 K, Tag 18 bis 30. Auch hier nimmt die Anzahl der Plasmaproben mit aufsteigendem Tag p.o. ab.

Die individuellen PGFM-Profile (siehe Abb. 9 und 10) weisen eine erhebliche Variationsbreite auf. Die Werte schwanken in der Kontrollgruppe zwischen 132,51 (Tier 10/2 K, Tag 0) und 8562,28 pg/ml (Tier 30/2 K, Tag 0) und in der Behandlungsgruppe zwischen 500,66 (Tier 5/1, Tag 4) und 10971,87 pg/ml (Tier 30/2, Tag 24).

Den mittleren Verlauf der PGFM-Konzentrationen ( $\bar{x}_g \times SF^{\pm 1}$ ) zeigen Tab. 15 sowie Abb. 11.

Die Behandlungsgruppe wies einen signifikant höheren Verlauf der PGFM-Konzentration auf als die Kontrollgruppe (ANOVA:  $p < 0,001$ ). Der paarweise Vergleich mittels Student's t-Test ergab für alle Tage, ausgenommen Tag 4 und 24, mit  $p < 0,05$  signifikante Unterschiede (siehe Abb. 11). Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Messzeitpunkte innerhalb der beiden Gruppen festgestellt werden, bei der Kontrollgruppe ergab sich jedoch die Tendenz abnehmender Werte im Verlauf des Diöstrus.



## Ergebnisse

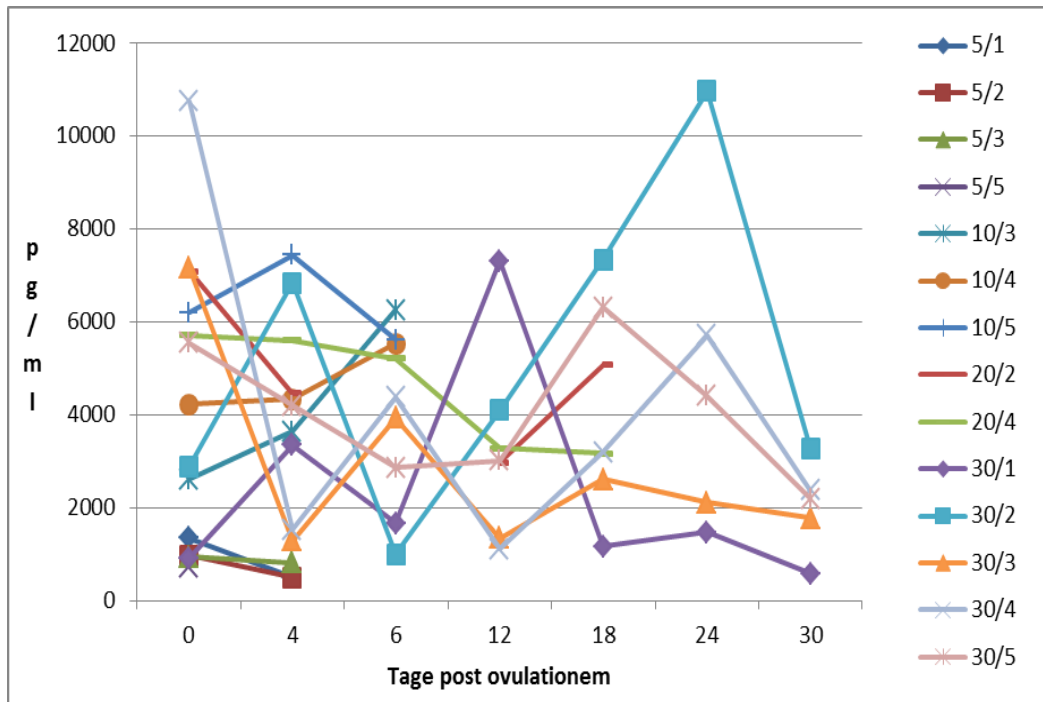


Abbildung 9: Individuelle PGFM-Profile in der Behandlungsgruppe

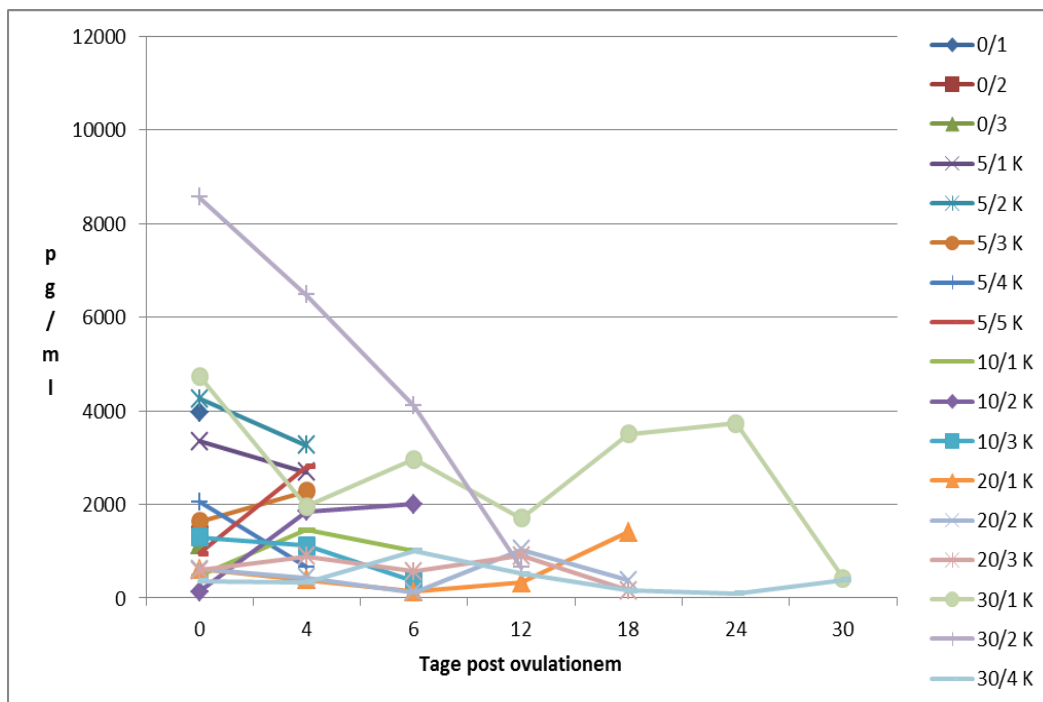


Abbildung 10: Individuelle PGFM-Profile in der Kontrollgruppe

Tabelle 15: PGFM-Konzentrationen im Blut der Behandlungs- und Kontrollgruppe (pg/ml;  $\bar{x}_g/SF$ )

Zeitpunkt	n	Behandlungsgruppe		n	Kontrollgruppe	
		$\bar{x}_g$	SF		$\bar{x}_g$	SF
Tag 0	14	2888,0	2,5	17	1287,7	2,9
Tag 4	13	2451,3	2,6	14	1361,8	2,4
Tag 6	9	3521,3	1,9	9	761,4	3,5
Tag 12	7	2789,3	1,9	6	748,9	1,8
Tag 18	7	3559,6	1,9	5	549,7	3,9
Tag 24	5	3867,2	2,2	2	613,2	12,9
Tag 30	5	1781,6	1,9	2	408,0	1,1

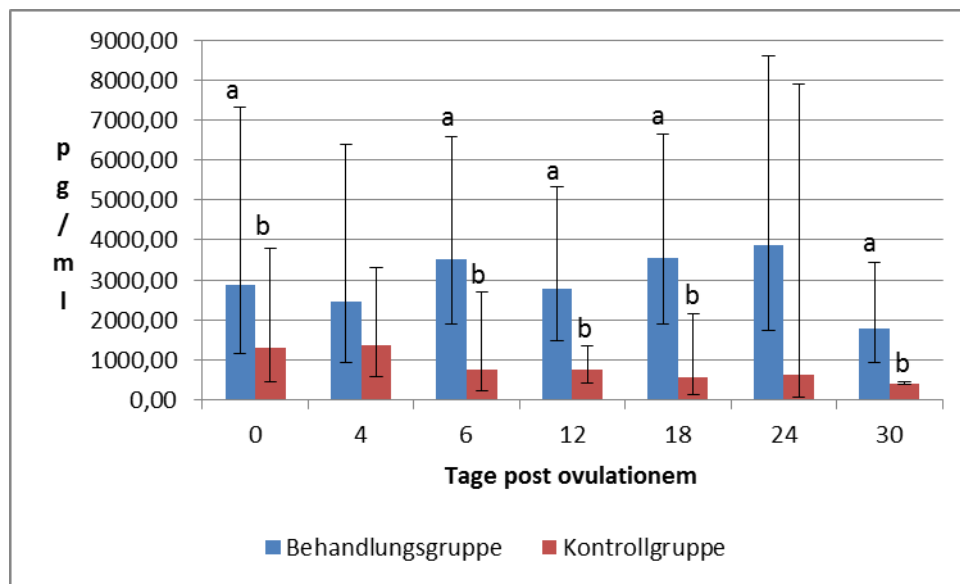


Abbildung 11: Verlauf der mittleren PGFM-Konzentrationen ( $\bar{x}_g \times SF^{\pm 1}$ ) bei der Behandlungs- und Kontrollgruppe; a:b p < 0,05 (gilt nur für die jeweiligen Tage)

### **4.3 Ergebnisse der Bicyclo PGEM-Bestimmung bei der Behandlungs- und Kontrollgruppe**

Die Messung der Bicyclo PGEM-Konzentrationen im Blutplasma erfolgte an den Tagen 0, 6, 12, 18, 24 und 30 p.o.; es fehlten jedoch die Proben von Tier 5/2 an Tag 0, von Tier 30/1 an Tag 12, von Tier 30/2 an Tag 18 und von Tier 30/2 K an den Tagen 0, 18, 24 und 30.

Wie die in Abb. 12 und 13 wiedergegebenen individuellen Messwerte zeigen, schwankten die Werte innerhalb der Kontrollgruppe zwischen 151,38 (Tier 20/1 K, Tag 12) und 3459,73 pg/ml (Tier 30/2 K, Tag 6) und innerhalb der Behandlungsgruppe zwischen 127,16 (Tier 30/2, Tag 30) und 4135,55 pg/ml (Tier 30/1, Tag 0).

Den mittleren Verlauf der Bicyclo PGEM-Konzentrationen ( $\bar{x}_g \times SF \pm 1$ ) zeigen Tab. 16 und Abb. 14.

Der Verlauf der Bicyclo PGEM-Konzentrationen waren in der Behandlungsgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe (ANOVA,  $p < 0,001$ ). Beim paarweisen Vergleich (t-Test) ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe an den Tagen 12 ( $p < 0,05$ ) und 18 ( $p < 0,05$ ). Es konnten keine Unterschiede bezüglich der Messzeitpunkte innerhalb der beiden Gruppen festgestellt werden, bei der Kontrollgruppe zeigte sich jedoch eine Tendenz abnehmender Werte im Verlauf des Diöstrus.

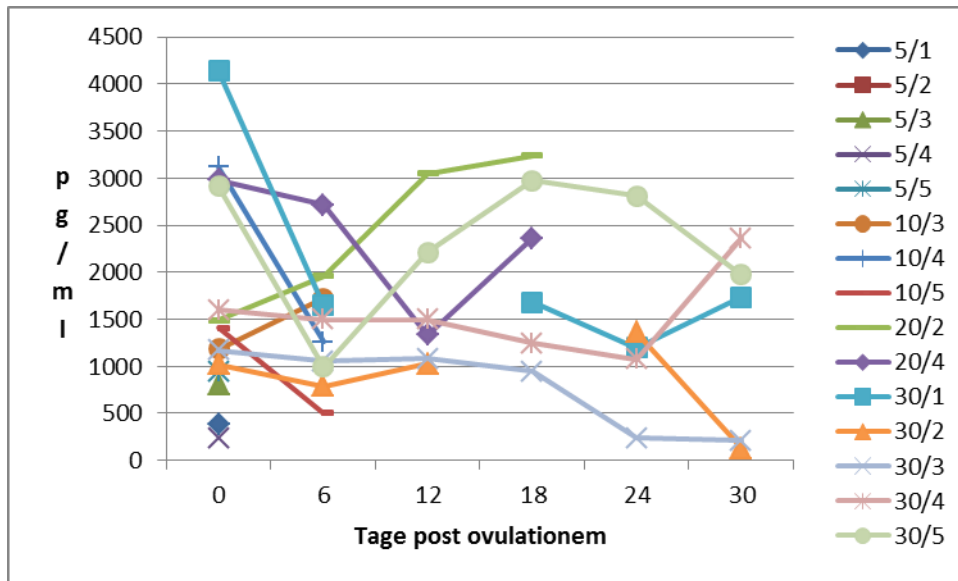


Abbildung 12: Individuelle Bicycle PGEM-Profile in der Behandlungsgruppe

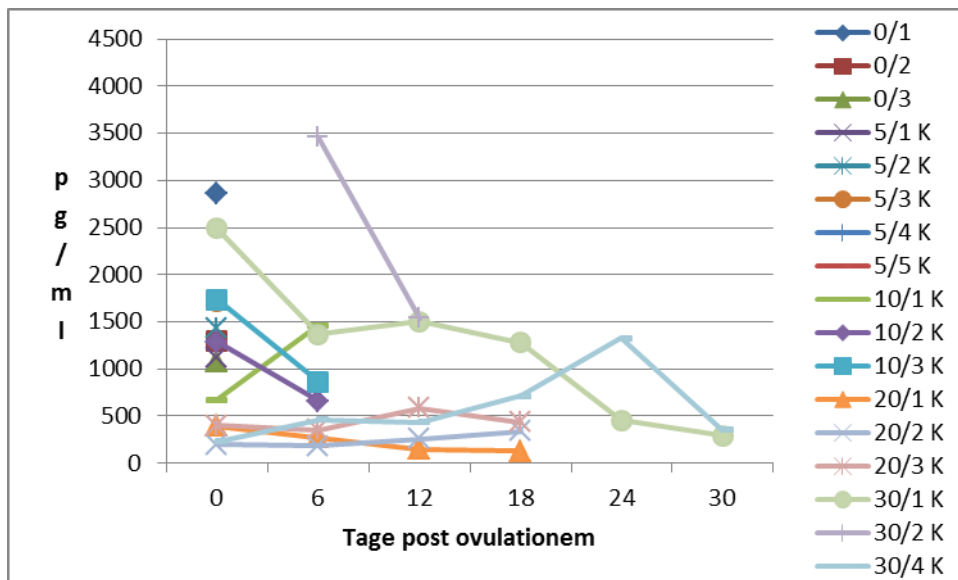


Abbildung 13: Individuelle Bicycle PGEM-Profile in der Kontrollgruppe

Tabelle 16: Bicyclo PGEM-Konzentrationen im Blut der Behandlungs- und Kontrollgruppe (pg/ml;  $\bar{x}g/SF$ )

Zeitpunkt	n	Behandlungsgruppe		n	Kontrollgruppe	
		$\bar{x}g$	SF		$\bar{x}g$	SF
Tag 0	15	1289,7	2,2	15	956,5	2,2
Tag 6	10	1279,4	1,6	9	680,8	2,5
Tag 12	6	1567,8	1,5	6	531,5	2,6
Tag 18	6	1884,9	1,6	5	440,9	2,4
Tag 24	5	1029,4	2,5	2	777,0	2,1
Tag 30	5	734,0	4,0	2	320,7	1,2

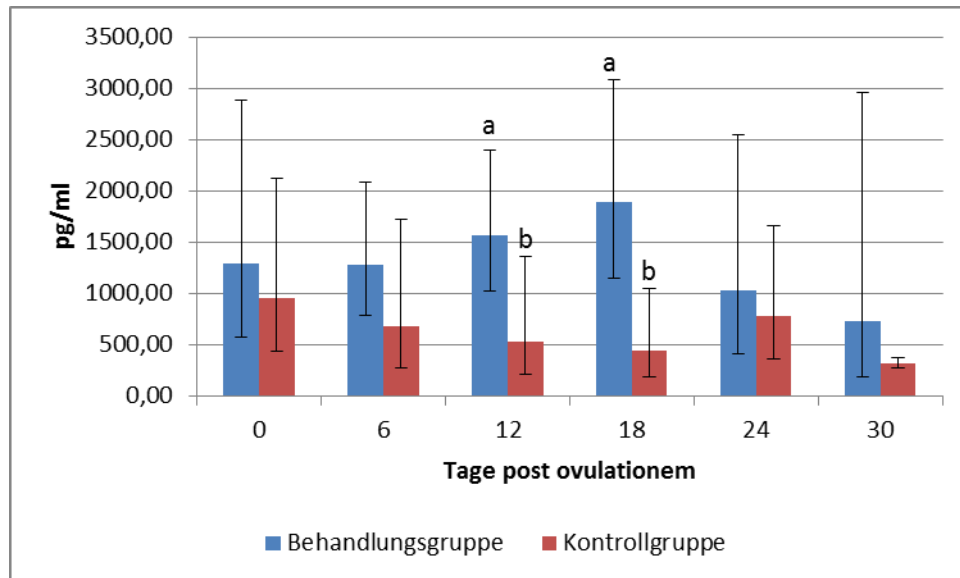


Abbildung 14: Verlauf der mittleren Bicyclo PGEM-Konzentrationen ( $\bar{x}g \times SF^{\pm 1}$ ) bei der Behandlungs- und Kontrollgruppe; a:b  $p < 0,05$  (gilt nur für den jeweiligen Tag)

#### 4.4 Ergebnisse der Ausmessung der Fläche der Kerne der Luteinzellen

Die Untersuchungen erfolgten an den zum Kastrationszeitpunkt gewonnenen CL der in Tab. 1 aufgelisteten Tiere. Da bei einem Tier der Kontrollgruppe (Tier 30/2 K) das konservierte Ovargewebe jedoch kein CL aufwies, erniedrigte sich die Zahl auf  $n = 2$  für den Tag 30 der Kontrollgruppe.

Ausgemessen wurden Luteinzellkerne in HE gefärbten Schnitten von Hündinnen zum Zeitpunkt der Ovulation (Tag 0; gilt gleichermaßen für die Kontroll- und Behandlungsgruppe), sowie an den Tagen 5, 10, 20 und 30 p.o.

Die Ergebnisse sind in Tab. 17 und Abb. 15 wiedergegeben.

Tabelle 17: Mittlere Größe der Luteinzellkernflächen ( $\mu\text{m}^2$ ) bei der Behandlungs- (BG) und der Kontrollgruppe (KG); Angaben in  $\bar{x} \pm \text{SD}$

Gruppe	Parameter	Tag				
		0	5	10	20	30
BG	n	3	4	3	2	5
	$\bar{x}$	25,4	44,9	36,8	35,4	37,9
	SD	7,4	8,9	5,2	6,5	4,6
KG	n	3	5	3	3	2
	$\bar{x}$	25,4	48,3	53,5	76,6	34,1/ 51,8
	SD	7,4	2,4	3,6	3,3	-

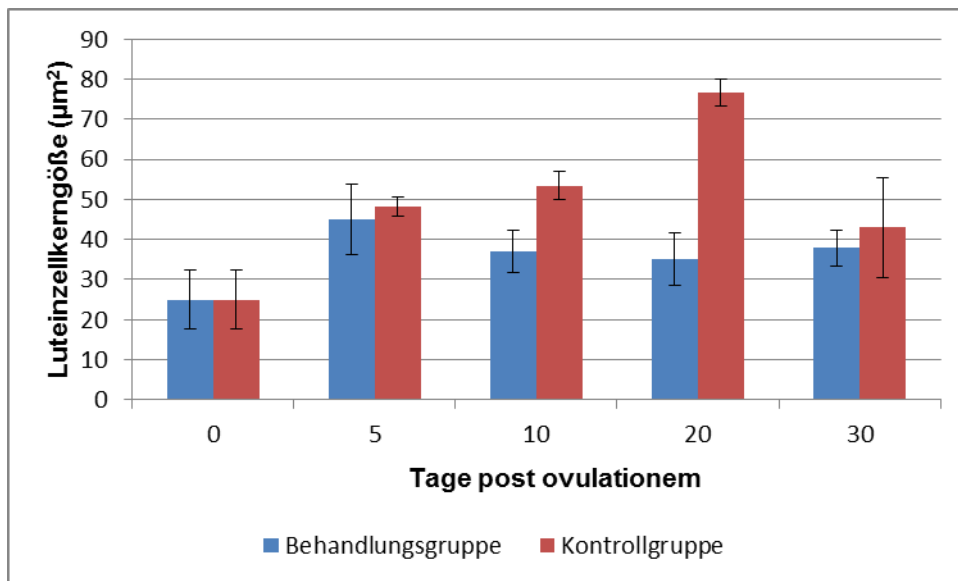


Abbildung 15: Mittlere Größe der Zellkernflächen ( $\mu\text{m}^2$ ) bei der Behandlungs- und Kontrollgruppe; Angaben in  $\bar{x} \pm \text{SD}$

In der zweifaktoriellen ANOVA mit den Faktoren Gruppe und Kastrationstag, wobei Tag 0 nicht berücksichtigt wurde, da dieser beiden Gruppen gleichermaßen zuzuordnen war, ergab sich mit  $p < 0,001$  ein signifikanter Effekt der Behandlung, wobei die Zellkernflächen der Kontrollgruppe deutlich höhere Werte aufwiesen als die der Behandlungsgruppe. Auch der Effekt der Zeit (Kastrationstag) war mit  $p < 0,05$  signifikant. Eine Interaktion beider Parameter ist gegeben und mit  $p < 0,001$  statistisch signifikant. Das bedeutet, dass der Unterschied zwischen den Gruppen von der Zeit, also vom Kastrationstag, abhängt (siehe Abb. 15).

Während an Tag 0 die durchschnittliche Zellkernfläche bei  $25,41 \pm 7,4 \mu\text{m}^2$  lag, stieg sie in der Kontrollgruppe im Verlauf des Diöstrus bis zum Tag 20 auf  $76,64 \pm 3,29 \mu\text{m}^2$ , um am Tag 30 auf  $42,99 \pm 12,51 \mu\text{m}^2$  abzufallen.

Im Gegensatz dazu blieb die Zellkerngröße innerhalb der Behandlungsgruppe, nach einem kurzen Anstieg von Tag 0 auf Tag 5, von Tag 10 bis Tag 30 in etwa gleich groß, der Mittelwert lag bei  $36,67 \pm 1,26 \mu\text{m}^2$ .

Weiterhin war in der Kontrollgruppe die Entwicklung der Zellkernfläche mit  $p < 0,05$  positiv mit dem Verlauf der  $P_4$ -Konzentration korreliert; d.h. je größer der Zellkern, desto höher war die  $P_4$ -Konzentration. Bei der Behandlungsgruppe war ein solcher Effekt nicht gegeben.

#### 4.5 Darstellung der Cox2 mittels Immunhistochemie

Um zu überprüfen, ob die Behandlung mit dem Cox2-Hemmer Previcox® mit einer Veränderung der Cox2-Expression auf Proteinebene einhergeht, wurden die Corpora lutea der Behandlungs- und der Kontrollgruppe der an den Tagen 0, 5, 10, 20 und 30 p.o. ovariohysterektomierten Tieren immunhistochemisch nach dem von Kowalewski et al. (2006) etablierten Protokoll gefärbt (siehe Kap. 3.5.2) und auf eine Expression von Cox2 untersucht.

Es zeigte sich, dass bei zahlreichen Schnitten keine homogene, sondern nur eine partielle, „zonare“ Anfärbung des Lutealgewebes erfolgte (siehe Abb. 16). Soweit erkennbar, war das Signal im Zytoplasma der Luteinzellen, sowie vereinzelt in Endothelzellen und Granulosazellen der Follikel lokalisiert. Dieses Phänomen der nur zonalen Anfärbung wurde auf Probleme bei der Gewebefixierung zurückgeführt, da die Positivkontrolle (Rinderplazenta aus dem letzten Drittel der Gravidität) durchwegs über den gesamten Schnitt gleichmäßig verteilte positive Signale in den einkernigen Trophoblastzellen aufwies (siehe Abb. 17). In der Negativkontrolle war kein Signal zu beobachten. Diese Situation erlaubte keine quantitative Auswertung der Schnitte, gestattete jedoch eine Differenzierung zwischen Schnitten, bei denen Cox2-positive Färbereaktionen festgestellt wurden, auch wenn diese nur vereinzelt auftraten (positiv) und solchen, bei denen Cox2-positive Färbereaktionen nicht beobachtet wurden (negativ). Die Abbildungen 18-20 zeigen beispielhaft einige Schnitte, bei denen die Expression von Cox2 erkennbar war, wobei die Intensität der Farbreaktion zum Teil deutlich unterschiedlich war.

Sowohl in der Behandlungsgruppe, als auch in der Kontrollgruppe, war eine Expression der Cox2 bis zum Tag 10 und bei einer Hündin auch noch am Tag 20 erkennbar. An Tag 30 waren sowohl in der Kontroll- als auch in der Behandlungsgruppe keine Färbungen mehr festzustellen. Dieses Ergebnis lässt nicht auf Unterschiede zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe schließen und ist in Tab. 18 zusammengefasst.



Tabelle 18: Anzahl Schnitte mit und ohne erkennbarer Cox2-Expression mittels IHC in der BG und KG

Tag p.o.	Kontrollgruppe		Behandlungsgruppe	
	Zahl n (Tiere)	Anzahl Tiere mit positiver Reaktion	Zahl n (Tiere)	Anzahl Tiere mit positiver Reaktion
0	3	2	-	-
5	5	1	4	2
10	3	3	3	3
20	3	1	2	0
30	2	0	5	0



Abbildung 16: IHC Cox2: zonare Färbung des Lutealgewebes am Beispiel des Tieres 10/5 BG (50-fache Vergrößerung)

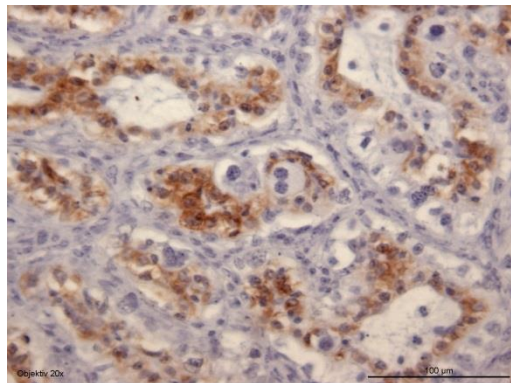


Abbildung 17: IHC Cox2: Positivkontrolle Plazenta Rind letztes Trächtigkeitsdrittel, braune Färbung weist auf Expression der Cox2 in den einkernigen Trophoblastzellen hin (200-fache Vergrößerung)

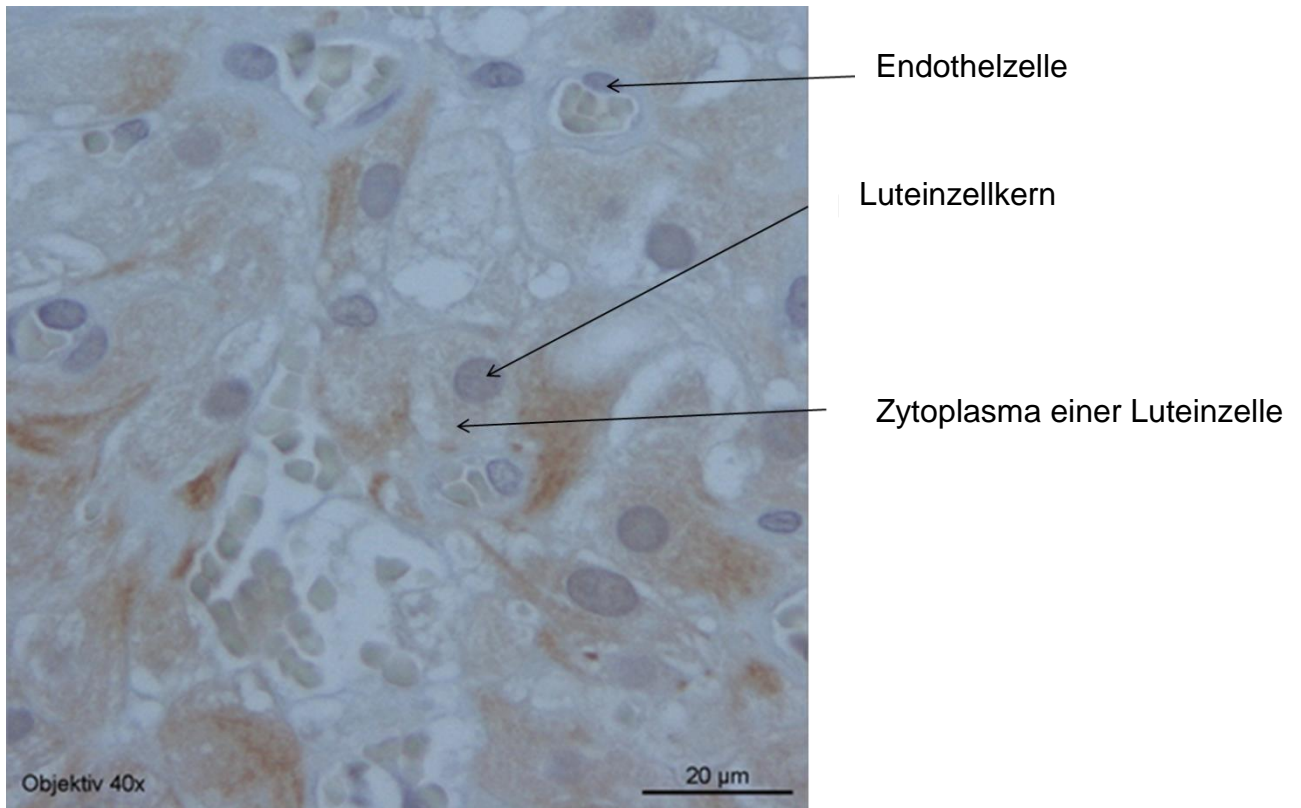


Abbildung 18: IHC Cox2 Kontrollgruppe (Tier 10/1 K); schwache Signale im Zytoplasma einiger Luteinzellen (400-fache Vergrößerung)

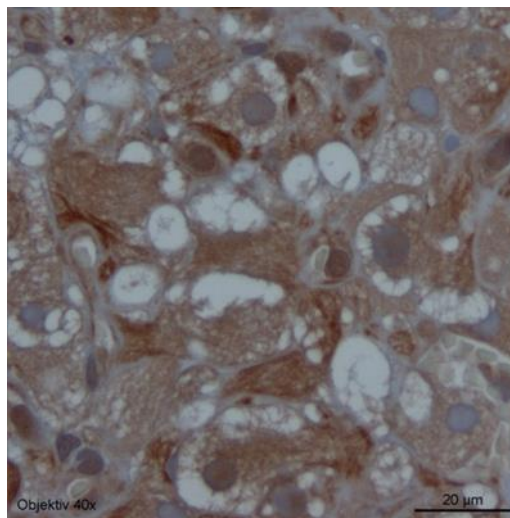


Abbildung 19: IHC Cox2 Behandlungsgruppe (Tier 10/4) deutliche Signale an Tag 10 (400-fache Vergrößerung)

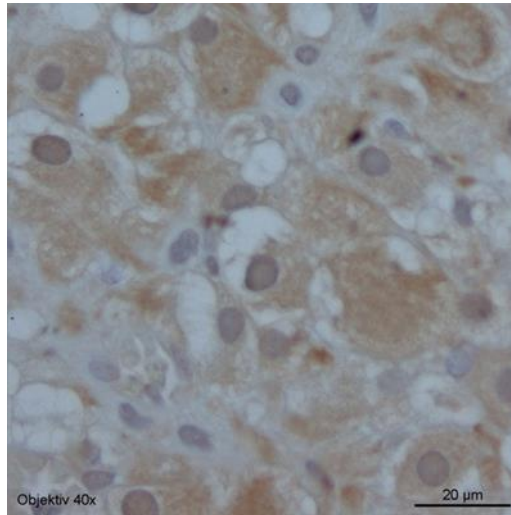


Abbildung 20: IHC Cox2 Behandlungsgruppe (Tier 5/1); schwache Signale an Tag 5 (400-fache Vergrößerung)

#### 4.6 Darstellung von Ki67 mittels Immunhistochemie

Ausgewertet wurden zwei Schnitte pro Tier bei 200-facher Vergrößerung. Davon wurden die gefärbten Zellen von 3 Gesichtsfeldern, ausgehend von der Peripherie des Gelbkörpers über einen mittleren Bereich bis hin zum Zentrum, ausgezählt.

Als Positivkontrolle diente das Darmepithel eines Hundes, das freundlicherweise vom Institut für Veterinär-Pathologie zur Verfügung gestellt wurde und sich deutlich anfärbte (siehe Abb. 21). Zu jedem Schnitt gab es eine Negativkontrolle, die anstatt dem Antikörper mit einer Isotypenkontrolle inkubiert worden war und immer ungefärbt blieb (siehe Abb. 22).

Positive Färbereaktionen wurden lediglich am Tag 0 sowie 20 bei der Behandlungsgruppe und Tag 30 bei beiden Gruppen beobachtet, wobei sich zum einen Endothelzellen und zum anderen Zellen, die sehr wenig Zytoplasma aufwiesen und nicht eindeutig einer Zellklasse zugeordnet werden konnten, anfärbten. Die Ergebnisse sind im Detail in Tab. 19 wiedergegeben. Es fällt auf, dass bei den zwei positiven Tieren der Behandlungsgruppe an Tag 20 eine deutlich erhöhte Zahl positiver Reaktionen feststellbar war, was möglicherweise auf einen Behandlungseffekt schließen lässt.

## Ergebnisse

Tabelle 19: Ergebnis IHC Ki67: Tiere mit positiver Färbereaktion und Anzahl der gefärbten Zellen pro Schnitt

Gruppe	Tag	n Tiere	n positive Tiere	Tier	Schnitt Nr.	Lokalisation Färbereaktion							
						Peripherie	Mitte	Zentrum					
	0	3	1	0/3	1	3	0	0					
					2	2	0	0					
BG	5	4	0										
	10	3	0										
	20	2	2						20/2	1	2	5	14
										2	16	23	19
									20/4	1	3	0	0
										2	3	2	8
	30	5	1						30/2	1	1	0	0
			2	1	0	0							
KG	5	5	0										
	10	3	0										
	20	3	0										
	30	2	1						30/4	1	1	0	0
										2	1	0	0

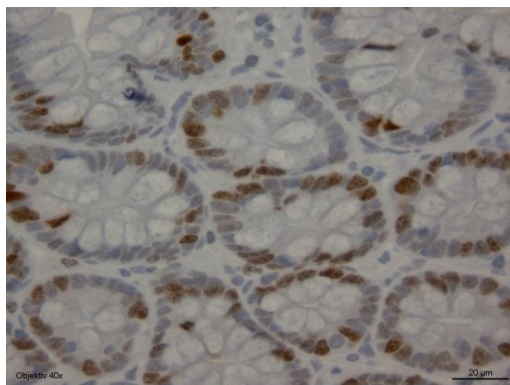


Abbildung 21: IHC Ki67: Positivkontrolle, Darmepithel Hund, (400-fache Vergrößerung)

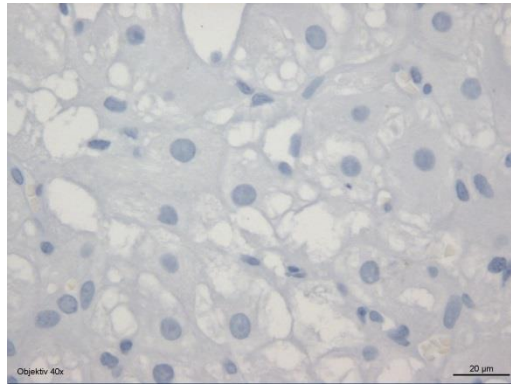


Abbildung 22: IHC Ki67: Negativkontrolle des Tieres 20/2 (400-fache Vergrößerung)

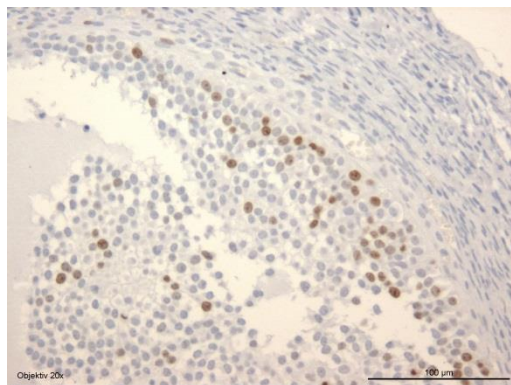


Abbildung 23: IHC Ki67: Follikel (200-fache Vergrößerung)

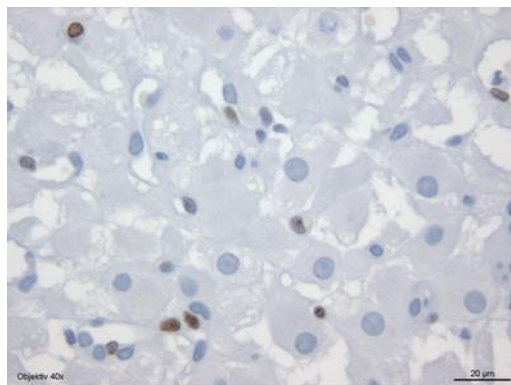


Abbildung 24: IHC Ki67: Tier 20/2 BG; Positivsignale vereinzelt vor allem in Nicht-Luteinzellen erkennbar (400-fache Vergrößerung)

## 5. Diskussion

### 5.1 Diskussion des Versuchsaufbaus

Ziel der vorliegenden Arbeit war es der Hypothese nachzugehen, ob PGE<sub>2</sub> bei der Hündin in der frühen Lutealphase des Diöstrus eine luteotrope Wirkung aufweist. Diese Hypothese beruhte auf der Beobachtung, dass PGE<sub>2</sub> bei zahlreichen Spezies (Arosh et al., 2004) eine luteotrope Wirkung aufweist und PGES sowie Cox2 beim Hund in der frühen Phase des Diöstrus offensichtlich verstärkt exprimiert werden (Kowalewski et al., 2006; 2008a).

Darüber hinausgehend zeigten *In-vitro*-Versuche, dass PGE<sub>2</sub> die Expression von StAR auf mRNA- und Proteinebene erhöht und somit auch die Steroidhormonproduktion stimuliert (Kowalewski et al., 2013).

Diese bisher auf Expressionsstudien sowie *In-vitro*-Befunden beruhenden Hinweise zu einer luteotropen Wirkung von PGE<sub>2</sub> sollten in einer weiterführenden Untersuchung durch Blockierung der endogenen Prostaglandinproduktion durch Hemmung des Schlüsselenzyms Cox2 verifiziert werden.

Die dazu konzipierte kooperative Studie (siehe Kap. 1 und 3) sah vor, dass Hündinnen ab dem Tag der Ovulation bis Tag 30 p.o., d.h. bis ca. Mitte des Diöstrus, mit einem selektiven Cox2-Hemmer (Firocoxib; Previcox<sup>®</sup>) behandelt werden

Als Parameter zur Erfassung einer möglichen Hemmung der luteotropen Wirkung von endogenem PGE<sub>2</sub> wurden in vorliegender Arbeit der Verlauf der P<sub>4</sub>-Werte im Blut sowie die Größe der Fläche der Kerne der Luteinzellen herangezogen.

Neben der Erfassung der P<sub>4</sub>-Konzentration im peripheren Blut als gängiger Parameter zur Erfassung des Funktionszustandes des CL beziehungsweise beim Hund der Corpora lutea, konnte am Beispiel der Leydigzellen gezeigt werden, dass die Größe des Zellkernes positiv mit der endokrinen Syntheseleistung korreliert (Kronthaler, 1960; Gentil et al., 2012). Eine entsprechende Situation wird in vorliegender Arbeit für das CL der Hündin unterstellt.

Begleitend dazu sollten Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung der Produktion von PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> durch Messung der entsprechenden Metaboliten im peripheren Blut sowie durch immunhistochemische Darstellung der Expression von Cox2 im CL erhalten werden.

Nachdem in vorausgehenden Untersuchungen gezeigt werden konnte (Hoffmann et al., 2004b), dass auch die Expression von Ki67 als Maßstab für die mitotische Aktivität besonders zu Beginn des Diöstrus nachweisbar war, sollte auch dieser Parameter in die Untersuchungen mit aufgenommen werden.

Als selektiver Cox2-Hemmer wurde für vorliegende Untersuchungen Firocoxib gewählt, welches laut McCann et al. (2004) eine bis zu 384-fache Selektivität für die Cox2 besitzt. Mit 10 mg/kg KGW und Tag wurde die doppelte therapeutische Dosierung gewählt, da bereits ab der 3-fachen Überdosierung mit gastrointestinalen Nebenwirkungen zu rechnen ist (EMA, 2006). Das festgelegte Versuchsdesign sah vor, dass von den Hündinnen der Behandlungs- und Kontrollgruppe in zweitägigen Abständen Blutproben entnommen wurden und jeweils fünf Tiere am Tag 0 und dann jeweils weitere fünf Tiere der Behandlungs- und Kontrollgruppe zur Gewinnung der CL an den Tagen 5, 10, 20 und 30 p.o. ovariohysterektomiert wurden.

Vereinbarungsgemäß wurde der Tierversuch mit Probengewinnung an der University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Polen, durchgeführt. Dabei ergab sich leider, dass sich auch bei Verlängerung des ursprünglich geplanten Zeitraumes nicht genügend Probanden rekrutieren ließen, um die vorgegebene Tierzahl pro Gruppe zu erreichen. Die Untersuchungen mussten daher mit den in Kap. 3; Tab. 1 angegebenen Tierzahlen pro Gruppe durchgeführt werden. Diese ursprünglich nicht zu erwartende Komplikation führt zwangsläufig zu einer Schwächung der statistisch absicherbaren Aussagemöglichkeiten der durchgeführten Messungen. Dies gilt insbesondere auch deshalb, da es sich bei den in die Untersuchungen aufgenommenen Hunden nicht um eine einheitliche Population, zum Beispiel Beagle Hündinnen, handelte, sondern um Tiere unterschiedlicher Rassen und Alters. Im Umkehrschluss kann aber auch gesagt werden, dass statistisch abgesicherte Daten - sofern sie denn beobachtet werden - eine besonders hohe Aussagekraft haben.



## 5.2 Diskussion hormonanalytische Methoden

### 5.2.1 Progesteron

Die  $P_4$ -Messungen in caninem Plasma mittels RIA gehört zu den etablierten, nach SOPs durchgeführten Standardmethoden im hiesigen Labor. Die Zuverlässigkeit dieser Methode konnte durch Erfassung der Inter- und Intraassayvariabilität abgesichert werden (siehe Kap. 3.4.1.4).

### 5.2.2 Prostaglandine

Bei der Bestimmung von  $PGF_{2\alpha}$  wurde auf ein kommerzielles EIA-Kit zurückgegriffen. Da  $PGF_{2\alpha}$  nur eine sehr kurze Halbwertszeit hat, misst dieses Verfahren den deutlich stabileren Metaboliten PGFM (siehe Kap. 3.4.2).

Auch die Messung von  $PGE_2$  erfolgte indirekt mit einem kommerziellen EIA-Kit anhand eines Metaboliten, der zusätzlich vor der Messung noch in ein stabiles Derivat (Bicyclo PGEM) umgewandelt wurde (siehe Kap. 3.4.3).

Aufgrund der bisher gemachten Erfahrungen (Diss. Preißing in Vorbereitung; pers. Mitteilungen Prof. Schuler), erfolgten die Messungen beider Metaboliten nicht mit vorausgehender Extraktion, sondern direkt im Plasma. Beide Kits waren nur für Forschungszwecke und nicht für analytische Diagnostik bestimmt, auch zur Eignung für bestimmte Spezies wurden keine Angaben gemacht. Für die Anwendung beim Hund lagen bisher keine Erfahrungen vor.

Es wurde daher zunächst überprüft, inwieweit annäherungsweise mit „richtigen Werten“ zu rechnen ist. Diese Überprüfungen ergaben, dass beide Tests zwischen hohen und niedrigen Werten unterscheiden können, dass die Werte für PGFM - für den  $PGE_2$ -Metaboliten liegen keine Angaben vor - in dem bisher beschriebenen Bereich liegen und dass sich bei Einbringung aufsteigender Plasmamengen lineare Regressionen ergeben, die allerdings nicht durch den 0-Punkt verliefen, sondern die y-Achse sowohl im positiven als auch im negativen Bereich schnitten. Im Hinblick auf die an anderer Stelle gemachten Erfahrungen bei der Bestimmung von Östrogenen im Urin (Prof. Hoffmann, pers. Mitteilung) wurde der Schnittpunkt mit der y-Achse als individueller Probenblindwert betrachtet. Das endgültige Verfahren sah dann so aus, dass bei der Messung von PGFM 2,5, 5 und 10  $\mu$ l und bei der Messung von Bicyclo

PGEM 1, 2, 4 oder 0,5, 1, 2 µl in den Test eingebracht wurden. Die sich aus den Messwerten ergebende Regressionsgerade wurde berechnet und der Schnittpunkt mit der y-Achse bei  $r \geq 0,95$  zur Korrektur herangezogen (siehe Kap. 3.4.2).

Es zeigte sich allerdings, unbeschadet dieser Korrektur, dass bei Bestimmung der Interassayvariabilität Werte zwischen 30% (Bicyclo PGEM) und 50% (PGFM) errechnet wurden, die die beiden angewandten Verfahren als zu ungenau und damit lediglich „semiquantitativ“ einstufen lassen<sup>1)</sup>. Die erhaltenen Ergebnisse wurden entsprechend kritisch bewertet. Allerdings war das Ziel dieser Messung nicht exakte Prostaglandinkonzentrationen zu erhalten, sondern einen Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen, wozu der Test auf Grund der Ergebnisse der Vorversuche als geeignet erschien.

### **5.2.3 Messung der Fläche der Luteinzellkerne**

Mittels HE-Färbung, bei der durch das Haematoxillin die basophilen Zellstrukturen, wie die Zellkerne, blau und durch das Eosin die azidophilen Strukturen, wie die meisten im Zytoplasma vorhandenen Bestandteile rot angefärbt werden, ist es möglich die Zellkerne gut vom Zytoplasma abzugrenzen (Avwioro, 2011).

Dank der von Andersen & Simpson (1973) sowie Sonnack (2009) beschriebenen Morphologie von Luteinzellen war es möglich, die Luteinzellen im Lichtmikroskop eindeutig zu identifizieren und von anderen im CL vorhandenen Zellen, wie Perizyten und Endothelzellen abzugrenzen.

Zur Messung gelangten weiterhin nur solche Luteinzellkerne, die die folgenden Kriterien erfüllten:

- rundlicher, exzentrisch lokalisierter deutlich abgesetzter Zellkern
- 1-2 deutlich sichtbare Nucleoli
- Kerngrenzen deutlich sichtbar

Die Luteinzellkerne konnten demnach spezifisch erfasst werden, um die Zellkernfläche zu bestimmen.

<sup>1)</sup> Im Hinblick auf den vorgegebenen Kostenrahmen waren weitere Untersuchungen zur Zuverlässigkeit der Prostaglandinbestimmung mit den nur kommerziell erhältlichen Kits nicht möglich.

Die Achsen a und b mussten im rechten Winkel zueinander stehen; die Berechnung erfolgte mit den Halbachsen a/2 (A) und b/2 (B) wie für eine Ellipse beschrieben ( $F = \pi A B$ ).

### **5.2.4 Diskussion Immunhistochemie**

Zur immunhistochemischen Darstellung der Expression von Cox2 sowie Ki67 Antigenen kamen hier bereits etablierte, spezifische Verfahren zur Anwendung. Die bei der Darstellung der Expression von Ki67 aufgetretenen methodischen Probleme konnten in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Kernt Köhler, Institut für Veterinärpathologie, Universität Gießen, befriedigend gelöst werden. Die Spezifität beider Methoden konnte in den eigenen Untersuchungen durch die jeweils mitgeführten positiven und negativen Kontrollen bestätigt werden (siehe Kap. 3.5.2 und 3.5.3).

Unerwarteter Weise zeigte sich jedoch, dass bei der Darstellung der Cox2 die Signale auf der Schnittfläche nicht homogen verteilt waren, sondern vielfach auf bestimmte „Zonen“ beschränkt waren. Auf die hierbei möglicherweise zugrunde liegenden Probleme bei der Probenkonservierung wurde bereits in Kap. 3.5.2 eingegangen. Im Hinblick auf diese Situation wurde von Anfang an auf die eine statistische Berechnung ermöglichende Auswertung der Schnitte verzichtet. Da die Cox2 positiven Signale, wie bereits früher festgestellt, jedoch eine eindeutige Zyklusbezogenheit aufweisen (Kowalewski et al., 2006), ergab sich die Möglichkeit zur qualitativen Beurteilung zwischen Cox2 positiven und negativen Schnitten.

Bei der Darstellung von Ki67 ergaben sich nur vereinzelt positive Signale, so dass lediglich eine deskriptive Auswertung sinnvoll erschien.

## **5.3 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.3.1 Diskussion der Ergebnisse der Luteinzellkerngrößen**

Eine Zunahme des Zellkernvolumens wird von Benninghoff (1950) als funktionelle Kernschwellung bezeichnet und als Ausdruck einer gesteigerten zellulären Aktivität gedeutet. Dass die Kernvolumina abhängig sind vom Aktivitätszustand der Zelle berichten auch Krantz (1951) und Polster (1959), sowie Tietze et al. (1970). Mittels

karyometrischer Messungen schlossen auch Kronthaler (1960) und Gentil et al. (2012) auf die Aktivität der Leydigzellen, d.h. die Testosteronproduktion beim Bullen beziehungsweise beim Rüden.

In den vorliegenden Untersuchungen wiesen die mit Firocoxib behandelten Tiere eine signifikant geringere Größe der Luteinzellkerne auf als die Tiere der Kontrollgruppe, wobei dieser Unterschied an den Tagen 10 und 20 p.o. am deutlichsten war. Dies zeigt, dass durch Behandlung mit dem Cox2-Hemmer eine negative Beeinflussung der Funktion der Luteinzellen eingetreten ist. Im Hinblick auf die von Kowalewski et al. (2006; 2008a), gemachten Befunde, dass in der gleichen Phase des Diöstrus die Expression von Cox2 und PGES, sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene erhöht ist, kann davon ausgegangen werden, dass die festgestellte funktionelle Beeinträchtigung in einem Mangel in der Bereitstellung von lutealem PGE<sub>2</sub> und einer demzufolge verminderten Stimulierung der nachfolgenden zur Synthese von Progesteron führenden Signalkaskade zu sehen ist. Die Verifizierung dieser Folgerung erfordert jedoch, dass in weiterführenden Untersuchungen unter anderem die tatsächliche Produktion von lutealem PGE<sub>2</sub> erfasst wird, zum Beispiel durch Messung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Gelbkörpergewebe.

### **5.3.2 Diskussion der Ergebnisse der Progesteronbestimmung**

Die Progesteronwerte am Tag 0 p.o. der Versuchstiere erlauben die Aussage, dass der ermittelte Ovulationszeitpunkt mit akzeptabler Genauigkeit bestimmt worden ist. Die aus den geometrischen Mittelwerten abgeleiteten P<sub>4</sub>-Profile zeigen sowohl bei der Behandlungs- als auch bei der Kontrollgruppe einen zyklusspezifischen Verlauf, wie er in der Literatur vielfach beschrieben wurde (Concannon et al., 1975; Hoffmann et al., 1992; Hoffmann & Schneider, 1993; Hoffmann et al., 1999; Concannon, 2009; 2011). Wie die zum Teil sehr hohen Streufaktoren jedoch zeigen, wiesen die gemessenen Progesteronwerte eine sehr hohe Variabilität auf, was sicherlich zum Teil auf die Heterogenität der verwendeten Versuchstiere zurückzuführen ist (siehe Tab. 2 und 3), wie dies auch bei Gerres (1991) bei der Messung von P<sub>4</sub> bei einer sehr heterogenen Hundepopulation beobachtet wurde. Diese hohe Variabilität dürfte auch Ursache dafür sein, warum sich kein abgesicherter Effekt der Behandlung nachweisen lässt, obwohl die für die Behandlungsgruppe errechneten mittleren P<sub>4</sub>-

Konzentrationen zu allen Zeitpunkten niedriger lagen als bei der Kontrollgruppe. Im Zusammenhang mit den Befunden zur Größe der Luteinzellkerne lässt jedoch auch diese Beobachtung auf einen Effekt der Behandlung schließen, zumal bei Anwendung des t-Tests für den Tag 10 ein signifikanter Unterschied errechnet werden konnte. Dafür spricht auch der Befund, dass die Größe der Luteinzellkerne bei der Kontrollgruppe, nicht aber bei der Behandlungsgruppe, mit dem Verlauf der P<sub>4</sub>-Konzentrationen positiv korreliert ist.

### ***5.3.3 Diskussion der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen***

Die immunhistochemischen Untersuchungen zur Expression der Cox2 sowie von Ki67 im CL gaben keinerlei Hinweise auf Unterschiede zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe.

Am Beispiel der induzierten Entzündung der Pfote der Ratte konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit einem selektiven Cox2-Hemmer nicht nur entzündungshemmend wirkt, sondern auch die Expression von Cox2 selbst auf mRNA- und Proteinebene reduziert (Anderson et al., 1996). Dieser von den Autoren als „interessant“ bezeichnete Befund konnte in den eigenen Untersuchungen bei einer physiologischen Ausgangslage nicht festgestellt werden. Diese ist dadurch gekennzeichnet, dass, wie an anderer Stelle beschrieben wurde, eine erhöhte Expression von Cox2 zu Beginn des Diöstrus stattfindet (Kowalewski et al., 2006). Im Hinblick auf die in Kap. 3.5.2 beschriebenen methodischen Probleme kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eventuell eingetretene marginale Effekte nicht erkannt wurden. Hoffmann und Klein (persönliche Mitteilungen) sowie Papa & Hoffmann (2011) berichten über einen Abfall Ki67 positiver Zellen von Tag 15 auf die Tage 30, 45 und 60 p.o.. Die in vorliegenden Untersuchungen beobachtete vermehrte Expression von Ki67 an den Tagen 20 und 30 bei sonstigen Zellen in drei Schnitten der Behandlungsgruppen fällt noch in die erste Hälfte des Diöstrus und gestattet keine vergleichende Interpretation. Auch auf die bei Tumorzellen beschriebene antiproliferative Wirkung von Cox2-Hemmern (Grosch et al., 2001) ergaben sich in den eigenen Untersuchungen keine Hinweise.

### **5.3.4 Diskussion der Ergebnisse der Prostaglandinbestimmung**

Die Messungen von PGFM und Bicyclo PGEM wurden begleitend im peripheren Plasma durchgeführt. Im Hinblick auf die Vielzahl der Prostaglandine produzierenden Gewebe (Morita, 2002) und die als physiologisch zu bezeichnende Ausgangssituation (keine entzündlichen Reaktionen am Ovar) kann nicht davon ausgegangen werden, dass durch die Messungen Rückschlüsse auf die Prostaglandinsynthese im Ovar gezogen werden können.

Nachdem es sich bei Firocoxib um einen hoch selektiven Cox2-Hemmer handelt, ist jedoch davon auszugehen, dass die gemessenen Prostaglandinkonzentrationen aus der katalytischen Aktivität der Cox1, einem konstitutiv exprimierten Enzym, resultieren (Morita, 2002). Den durchgeführten Untersuchungen lag jedoch die Erwartung zugrunde, dass eine Hemmung der Cox2 gegebenenfalls auch zu einem Absinken der peripheren Prostaglandinkonzentration führt wie dies nach Behandlung mit dem unspezifischen Cox-Hemmer Indomethacin beobachtet wurde (Hoffmann et al., 1996). Ein dazu durchgeführter Versuch mit Firocoxib ergab jedoch kein eindeutiges Ergebnis (siehe Kap. 3.4.2, Tab. 8). Der Befund, dass in der Behandlungsgruppe signifikant höhere Werte der Metaboliten von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGE}_2$  als in der Kontrollgruppe gemessen wurden, hat daher überrascht. Über die zugrunde liegenden Mechanismen kann derzeit nur spekuliert werden.

Tanaka et al. (2002) zeigten, dass es zu einer Aufregulation der Cox2 durch Hemmung der Cox1 mit einem spezifischen Cox1-Hemmer kommt. Im Umkehrschluss stellt sich hier die Frage, ob durch Hemmung der Cox2 eine Aufregulation der Cox1 zustande kommen kann, die die Erhöhung der Prostaglandinkonzentration erklären könnte. Angaben dazu konnten in der Literatur jedoch nicht gefunden werden.

Da die Reinsubstanz Firocoxib nicht zur Verfügung stand, konnte auch nicht ausgetestet werden, ob diese mit dem eingesetzten EIA interferieren und somit zu verfälschten Ergebnissen führen könnten.

Letztendlich lässt sich dieses Phänomen nur durch weiterführende Untersuchungen klären. Dazu könnte man zum Beispiel Prostaglandine aus dem Blut der Ovarvene messen, um deren Herkunft abzuklären.

Unbeschadet dieser die Prostaglandinkonzentrationen im peripheren Blut betreffenden Werte, lassen die vorliegenden Untersuchungen jedoch die eindeutige

Folgerung zu, dass eine Hemmung der endogenen Prostaglandinproduktion negative Auswirkungen auf die Corpus luteum Funktion hat und demzufolge PGE<sub>2</sub> auch im caninen Corpus luteum eine Bedeutung als luteotroper Faktor, limitiert auf die Phase des frühen Diöstrus, zukommt.

## 6 Zusammenfassung

Der domestizierte Hund gehört zu den monoöstrischen, in der Regel asaisonalen, spontan ovulierenden Spezies. Der canine Zyklus unterscheidet sich deutlich von dem anderer Haussäugetiere. So ist die luteale Lebensspanne von graviden und ingraviden Hündinnen fast identisch und wird bei der ingraviden Hündin nicht durch ein Luteolysin uterinen Ursprungs beendet.

In der frühen Lutealphase der Hündin, während der höchsten steroidogenen Aktivität, ist das Corpus luteum unabhängig von gonadotropinen Stimuli hypophysären Ursprungs. In dieser Phase des Zyklus konnten Kowalewski et al. (2006; 2008a) eine erhöhte Expression der Cox2 und der Prostaglandin-E-Synthase im CL nachweisen, was zu der Hypothese führte, dass PGE<sub>2</sub> in dieser frühen Phase als luteotroper Faktor fungieren könnte. Im Sinne dieser Hypothese konnte in *In-vitro*-Untersuchungen mit caninen Luteinzellen ein Anstieg der steroidogenen Aktivität nach einer Behandlung mit PGE<sub>2</sub> aufgezeigt werden (Kowalewski et al., 2013).

Zur weiteren Verifizierung dieser Hypothese an einem „*In-vivo*-Modell“ wurden in vorliegender Studie Hündinnen mit einem Cox2-Hemmer behandelt mit dem Ziel, die Aktivität der endogenen Cox2 zu hemmen und mögliche Beeinträchtigungen der CL-Funktion zu erfassen.

Dazu wurden 31 Hunde in eine Kontroll-(KG) und eine Behandlungsgruppe (BG) unterteilt. Beginnend mit dem Tag der Ovulation wurden den Tieren der BG täglich 10 mg/kg KGW des Cox2-Hemmers Firocoxib (Previcox<sup>®</sup>, Fa. Merial, Lyon, F) per os verabreicht (doppelte therapeutische Dosierung); bei beiden Gruppen erfolgten Blutentnahmen in zwei-tägigen Abständen. Eine Ovariohysterektomie wurde an Tag 0 (Tag der Ovulation; 3 Hündinnen), Tag 5 (BG = 4 Hündinnen; KG = 5 Hündinnen), Tag 10 (BG = 3 Hündinnen; KG = 3 Hündinnen), Tag 20 (BG = 2 Hündinnen, KG = 3 Hündinnen) und Tag 30 post ovulationem (BG = 5 Hündinnen, KG = 3 Hündinnen) durchgeführt. P<sub>4</sub> wurde mittels RIA gemessen, die Metaboliten von PGF<sub>2α</sub> und PGE<sub>2</sub> mittels eines kommerziellen EIA-Kits (Cayman Chemical Company). Das Lutealgewebe wurde immunohistochemisch auf eine Expression von Cox2 und Ki67-Antigen untersucht, an Haematoxyllin-Eosin gefärbten Schnitten erfolgte die Ausmessung der Fläche der Luteinzellkerne bei 400-facher Vergrößerung.

Die Fläche der Luteinzellkerne erwies sich in der BG als signifikant ( $p < 0,0001$ ) kleiner als in der KG. Die Progesteronwerte folgten dem erwarteten zyklischen



Muster, wobei die Werte in der Behandlungsgruppe tendenziell niedriger waren als in der Kontrollgruppe. Zwischen der Größe der Luteinzellkernfläche und den  $P_4$ -Werten zeichnete sich eine positive Korrelation ab.

Es konnten keine Unterschiede in der Expression von Cox2 und Ki67-Antigen zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Die Konzentrationen der Metaboliten von  $PGF_{2\alpha}$  und  $PGE_2$  waren in der BG signifikant höher als in der KG.

Eine Behandlung mit dem selektiven Cox2-Hemmer Firocoxib während des ersten Drittels des Diöstrus bei der Hündin führte zu einer signifikanten Reduktion der Größe der Luteinzellkernflächen und folglich einer verminderten steroidogenen Aktivität, was sich auch an den verminderten  $P_4$ -Konzentrationen zeigte. Diese Ergebnisse geben weitere Hinweise einer luteotropen Rolle von  $PGE_2$  in der frühen Phase des Diöstrus der Hündin.

## 7 Summary

The domestic dog is a monoestrus, non-seasonal breeder with a long period of luteal activity (dioestrus). The regulatory mechanisms of the canine cycle strongly differ from those of other domestic animal species. In the early luteal phase during the highest proliferative and steroidogenic activity, the canine corpus luteum is largely independent of pituitary support. During this period a significantly elevated expression of Cox2 and of prostaglandin-E-synthase could be documented by Kowalewski et al. (2006; 2008a). This indicates a likely role of prostaglandin E<sub>2</sub> as a luteotropic factor during this period of cycle, a hypothesis supported by “*In vitro*” data showing an increase in steroidogenic activity in canine luteal cells in response to treatment with PGE<sub>2</sub> (Kowalewski et al., 2013).

To verify the *In vitro* observations of a luteotropic activity of PGE<sub>2</sub>, in the present study, bitches were treated with a selective Cox2 inhibitor in order to block endogenous Cox2 activity and to test for effects on CL function. Starting with the day of ovulation, dogs of the TG-group were treated daily with the Cox2-inhibitor firocoxib (Previcox®, Merial, Lyon, F) in a dose of 10 mg/kg bw (double of recommended dose); blood samples were collected in two day intervals. Thirty-one dogs were divided into a control group (CG) and a treatment group (TG). Dogs were consecutively ovario-hysterectomized on day 0 (day of ovulation; 3 dogs), day 5 (TG = 4 dogs, CG = 5 dogs), day 10 (TG = 3 dogs, CG = 3 dogs), day 20 (TG = 2 dogs, CG = 3 dogs) and day 30 after ovulation (TG = 5 dogs, CG = 3 dogs). Progesterone (P<sub>4</sub>) was measured via radioimmunoassay (RIA), prostaglandin F<sub>2α</sub>- and prostaglandin E<sub>2</sub> metabolites with a commercial enzyme immunoassay kits (Cayman Chemical). Expression of Cox2 and Ki67 antigen was assessed by immunohistochemistry. Haematoxylin-eosin (HE) stained slices with luteal tissue were used to measure sizes of luteal cell nuclei.

Size of luteal cell nuclei was significantly ( $p < 0.0001$ ) reduced in the TG. Course of P<sub>4</sub> values followed the expected cyclic pattern with a tendency to be lower in the treatment group. There was a positive correlation between size of nuclei and P<sub>4</sub>-secretion. Expression of Cox2 and Ki67 antigen was not different between the two groups. PGF<sub>2α</sub> and PGE<sub>2</sub>-metabolite concentrations were significantly higher in the treatment compared to the control group.

## Summary

---

Treatment with a selective Cox2 inhibitor during the first third of dioestrus significantly reduced size of luteal cell nuclei and consequently diminished P<sub>4</sub> secretion, as also indicated by the reduced values in the TG. These results are consistent with a luteotropic role of PGE<sub>2</sub>.

## 8 Literaturverzeichnis

ANDERSEN, A. L. & SIMPSON, M. E. (1973)

The Ovary and Reproductive Cycle of the dog (Beagle). Los altos, California, GERON-X, INC

ANDERSON, G. D., HAUSER, S. D., MCGARITY, K. L., BREMER, M. E., ISAKSON, P. C. & GREGORY, S. A. (1996)

Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. The Journal of Clinical Investigation 97, 2672-9

ARBEITER, K. (1994)

Anwendung von Hormonen in der Reproduktion von Hund und Katze. In Veterinärmedizinische Endokrinologie. 3. Auflage. Hrsg. Döcke, F., Gustav Fischer Verlag Jena-Stuttgart. 823-41

ARBEITER, K., DOBRETSBERGER, M., MÜLLER, E. & HOLZMANN, A. (1991)

Ein indirekter Nachweis der Ovulation und Fertilisation beim Hund durch Progesteronverlaufsuntersuchungen. Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A 38, 696-701

AROSH, J. A., BANU, S. K., CHAPDELAINE, P., MADORE, E., SIROIS, J. & FORTIER, M. A. (2004)

Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. Endocrinology 145, 2551-60

AURICH, J. E. (2002)

Endokrinpharmakologie. In Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. 2. Auflage. Hrsg. Frey, H.-H., Löscher W. Stuttgart, Enke Verlag. 280-317

AUTEFAGE, A., PALISSIER, F. M., ASIMUS, E. & PEPIN-RICHARD, C. (2011)  
Long-term efficacy and safety of firocoxib in the treatment of dogs with osteoarthritis.  
The Veterinary Record 168, 617

AVWIORO, G. (2011)  
Histochemical uses of Haematoxylin - A Review. International Journal of Research  
and Reviews in Applied Sciences 1, 24-34

BENNINGHOFF, A. (1950)  
Funktionelle Kernschwellung und Kernschrumpfung. Anatomische Nachrichten 1, 50-  
2

BENYO, D. F. & PATE, J. L. (1992)  
Tumor necrosis factor-alpha alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability.  
Endocrinology 130, 854-60

BERCHTOLD, M. (1993)  
Gynäkologie. In Klinik der Hundekrankheiten. 2. Auflage. Hrsg. Freudiger, U. G., E.-  
G.; Schimke, E. Jena, Gustav Fischer Verlag. 625-64

BLENDINGER, K., BOSTEDT, H. & HOFFMANN, B. (1997)  
Hormonal state and effects of the use of an antiprogestin in bitches with pyometra.  
Journal of Reproduction & Fertility, Supplement 51, 317-25

BOITI, C., ZAMPINI, D., ZERANI, M., GUELFY, G. & GOBBETTI, A. (2001)  
Prostaglandin receptors and role of G protein-activated pathways on corpora lutea of  
pseudopregnant rabbit in vitro. Journal of Endocrinology 168, 141-51

BOTHWELL, W., VERBURG, M., WYNALDA, M., DANIELS, E. G. & FITZPATRICK,  
F. A. (1982)  
A radioimmunoassay for the unstable pulmonary metabolites of prostaglandin E1 and  
E2: an indirect index of their in vivo disposition and pharmacokinetics. The Journal of  
Pharmacology and Experimental Therapeutics 220, 229-35

BOUCHARD, G. F., SOLORZANO, N., CONCANNON, P. W., YOUNGQUIST, R. S. & BIERSCHWAL, C. J. (1991)

Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone. *Theriogenology* 35, 603-11

BRANNIAN, J. D., STOUFFER, R. L., SHIIGI, S. M. & HOYER, P. B. (1993)

Isolation of ovine luteal cell subpopulations by flow cytometry. *Biology of Reproduction* 48, 495-502

CHANDRASEKHARAN, N. V., DAI, H., ROOS, K. L., EVANSON, N. K., TOMSIK, J., ELTON, T. S. & SIMMONS, D. L. (2002)

COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13926-31

CHRISTIANSEN, I. J. (1982)

Bitches, queens and prostaglandins. *Nordisk Veterinaermedicin* 34, 33-8

CONCANNON, P. (1980)

Effects of hypophysectomy and of LH administration on luteal phase plasma progesterone levels in the beagle bitch. *Journal of Reproduction & Fertility* 58, 407-10

CONCANNON, P., HANSEL, W. & MCENTEE, K. (1977a)

Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biology of Reproduction* 17, 604-13

CONCANNON, P. W. (1993)

Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *Journal of Reproduction & Fertility, Supplement*, 47, 3-27

CONCANNON, P. W. (2009)

Endocrinologic control of normal canine ovarian function. *Reproduction in Domestic Animals* 44, Supplement 2, 3-15

CONCANNON, P. W. (2011)

Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science* 124, 200-10

CONCANNON, P. W., BUTLER, W. R., HANSEL, W., KNIGHT, P. J. & HAMILTON, J. M. (1978)

Parturition and lactation in the bitch: serum progesterone, cortisol and prolactin. *Biology of Reproduction* 19, 1113-8

CONCANNON, P. W. & HANSEL, W. (1977b)

Prostaglandin F<sub>2</sub>α induced luteolysis, hypothermia, and abortions in beagle bitches. *Prostaglandins* 13, 533-42

CONCANNON, P. W., HANSEL, W. & VISEK, W. J. (1975)

The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biology of Reproduction* 13, 112-21

CONCANNON, P. W., ISAMAN, L., FRANK, D. A., MICHEL, F. J. & CURRIE, W. B. (1988)

Elevated concentrations of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F-2 α in maternal plasma during prepartum luteolysis and parturition in dogs (*Canis familiaris*). *Journal of Reproduction & Fertility* 84, 71-7

CONCANNON, P. W., MCCANN, J. P. & TEMPLE, M. (1989)

Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *Journal of Reproduction & Fertility, Supplement* 39, 3-25

CONCANNON, P. W., POWERS, M. E., HOLDER, W. & HANSEL, W. (1977b)

Pregnancy and parturition in the bitch. *Biology of Reproduction* 16, 517-26

CONCANNON, P. W., WEINSTEIN, P., WHALEY, S. & FRANK, D. (1987)

Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and by bromocriptine. *Journal of Reproduction & Fertility* 81, 175-80

CONCANNON, P. W., YEAGER, A., FRANK, D. & IYAMPILLAI, A. (1990)

Termination of pregnancy and induction of premature luteolysis by the antiprogestagen, mifepristone, in dogs. *Journal of Reproduction & Fertility* 88, 99-104

CROFFORD, L. J. (1997)

COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *The Journal of Rheumatology*, Supplement 49, 15-9

DEL VECCHIO, R. P., MAXEY, K. M. & LEWIS, G. S. (1992)

A quantitative solid-phase enzymeimmunoassay for 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 alpha in plasma. *Prostaglandins* 43, 321-30

DÖCKE, F. (1994)

Keimdrüsen. In *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Hrsg. Döcke, F. Jena, Gustav Fischer Verlag. 399-498

ELLMAN, G. L. (1958)

A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archiv of Biochemics & Biophysics* 74, 443-50

EMEA (2006)

Firocoxib Summary ReportAccess, 2006

EMI, N., KANZAKI, H., YOSHIDA, M., TAKAKURA, K., KARIYA, M., OKAMOTO, N., IMAI, K. & MORI, T. (1991)

Lymphocytes stimulate progesterone production by cultured human granulosa luteal cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 165, 1469-74

ENDO, T., HENMI, H., GOTO, T., KITAJIMA, Y., KIYA, T., NISHIKAWA, A., MANASE, K., YAMAMOTO, H. & KUDO, R. (1998)

Effects of estradiol and an aromatase inhibitor on progesterone production in human cultured luteal cells. *Gynecological Endocrinology* 12, 29-34



ENGEL, E., KLEIN, R., BAUMGÄRTNER, W. & HOFFMANN, B. (2005)

Investigations on the expression of cytokines in the canine corpus luteum in relation to dioestrus. *Animal Reproduction Science* 87, 163-76

EVANS, H. M. & COLE, H. H. (1931)

An introduction of the study of the oestrous cycle in the dog. *Memoirs University of California* 9, 65-199

FELDMANN, E. C. & NELSON, R. W. (2004)

Ovarian Cycle and Vaginal Cytology. In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3. Auflage. Hrsg. Feldmann, E. C., Nelson, R.W. St.Louis, Missouri, USA, Elsevier Science (USA). 752-74

FERNANDES, P. A., BOWEN, R. A., KOSTAS, A. C., SAWYER, H. R., NETT, T. M. & OLSON, P. N. (1987)

Luteal function in the bitch: changes during diestrus in pituitary concentration of and the number of luteal receptors for luteinizing hormone and prolactin. *Biology of Reproduction* 37, 804-11

FIELDS, M. J. & FIELDS, P. A. (1996)

Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology* 45, 1295-325

FITZ, T. A., MOCK, E. J., MAYAN, M. H. & NISWENDER, G. D. (1984)

Interactions of prostaglandins with subpopulations of ovine luteal cells. II. Inhibitory effects of PGF<sub>2</sub> alpha and protection by PGE<sub>2</sub>. *Prostaglandins* 28, 127-38

FUKUOKA, M., YASUDA, K., FUJIWARA, H., KANZAKI, H. & MORI, T. (1992)

Interactions between interferon gamma, tumour necrosis factor alpha, and interleukin-1 in modulating progesterone and oestradiol production by human luteinized granulosa cells in culture. *Human Reproduction* 7, 1361-4

GENTIL, M., HOFFMANN, B., SPANG, A., FAILING, K. & GOERICKE-PESCH, S. (2012)

Restart of steroidogenesis in dogs during recrudescence of testicular function following downregulation with a GnRH-agonist implant. *Cell and Tissue Research* 350, 513-23

GERDES, J., LEMKE, H., BAISCH, H., WACKER, H. H., SCHWAB, U. & STEIN, H. (1984)

Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of Immunology* 133, 1710-5

GERRES, S. (1991)

Untersuchungen zur Bedeutung von Progesteron als Regelfaktor bei der Entstehung der Pseudogravidität der Hündin. Diss. med. vet. Justus-Liebig-Universität Gießen, Germany

GIERTZ, H. & FLOHE, L. (1987)

Mediatoren der Entzündung und Allergie

Pharmakotherapie der Allergie; Arzneimittelallergie. In *Pharmakologie und Toxikologie*. 5. Auflage Auflage. Eds Forth, W., Henschler, D. & Rummel, W. Mannheim/ Wien/ Zürich, BI Wissenschaftsverlag. 176-215

GODING, J. R., CAIN, M. D., CERINI, J., CERINI, M., CHAMLEY, W. A. & CUMMING, I. A. (1972)

Prostaglandin F<sub>2</sub> 'the' luteolytic hormone in the ewe. *Journal of Reproduction & Fertility* 28, 146-7

GRAF, K. J. (1978)

Serum oestrogen, progesterone and prolactin concentrations in cyclic, pregnant and lactating beagle dogs. *Journal of Reproduction & Fertility* 52, 9-14

GRANSTROM, E., HAMBERG, M., HANSSON, G. & KINDAHL, H. (1980)

Chemical instability of 15-keto-13,14-dihydro-PGE<sub>2</sub>: the reason for low assay reliability. *Prostaglandins* 19, 933-57

GREGORASZCZUK, E. & KRZYSZTOFOWICZ, E. (1989)

The corpus luteum of the pig. Scanning electron microscopic study of surface features at different times of incubation. *Acta biologica Hungarica* 40, 145-56

GROSCH, S., TEGEDER, I., NIEDERBERGER, E., BRAUTIGAM, L. & GEISLINGER, G. (2001)

COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, 2742-4

HAHLIN, M., DENNEFORS, B., JOHANSON, C. & HAMBERGER, L. (1988)

Luteotropic effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on the human corpus luteum of the menstrual cycle and early pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 66, 909-14

HANSEL, W., CONCANNON, P. W. & LUKASZEWSKA, J. H. (1973)

Corpora lutea of the domestic animals. *Biology of Reproduction* 8, 222-45

HARRIS, R. C., MCKANNA, J. A., AKAI, Y., JACOBSON, H. R., DUBOIS, R. N. & BREYER, M. D. (1994)

Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *The Journal of Clinical Investigation* 94, 2504-10

HEHNKE, K. E., CHRISTENSON, L. K., FORD, S. P. & TAYLOR, M. (1994)

Macrophage infiltration into the porcine corpus luteum during prostaglandin F<sub>2</sub> alpha-induced luteolysis. *Biology of Reproduction* 50, 10-5

HEMPEL, S. L., MONICK, M. M. & HUNNINGHAKE, G. W. (1994)

Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *The Journal of Clinical Investigation* 93, 391-6

HINZ, B. & BRUNE, K. (2000a)

New insights into physiological and pathophysiological functions of cyclo-oxygenase-2. *Current Opinion in Anaesthesiology* 13, 585-90

HINZ, B. & BRUNE, K. (2000b)

Spezifische Zyklooxygenase-2-Inhibitoren Grundlagen und Optionen eines pharmakotherapeutischen Prinzips. *Der Anaesthesist* 49, 964-71

HOFFMANN, B. (1977)

Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind Entwicklung von Messverfahren und physiologische Daten. *Fortschritte der Veterinärmedizin (Beiheft zum Zentralblatt für Veterinärmedizin)* 26. Berlin, Hamburg, Parey Verlag

HOFFMANN, B., BUSGES, F. & BAUMGÄRTNER, W. (2004a)

Immunohistochemical detection of CD4-, CD8- and MHC II-expressing immune cells and endoglin in the canine corpus luteum at different stages of dioestrus. *Reproduction in Domestic Animals* 39, 391-5

HOFFMANN, B., BÜSGES, F., ENGEL, E., KOWALEWSKI, M. P. & PAPA, P. (2004b)

Regulation of corpus luteum-function in the bitch. *Reproduction in Domestic Animals* 39, 232-40

HOFFMANN, B., HÖVELER, R., HASAN, S. H. & FAILING, K. (1992)

Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. *Journal of Reproduction & Fertility* 96, 837-45

HOFFMANN, B., KYREIN, H. J. & ENDER, M. L. (1973)

An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma. *Hormone Research* 4, 302-10

HOFFMANN, B., LEMMER, W., BOSTEDT, H. & FAILING, K. (2000)

Die Anwendung des Antigestagens Aglepristone zur konservativen Behandlung der Pyometra bei der Hündin. Tierärztliche Praxis 28, 323-9

HOFFMANN, B., RIESENBECK, A. & KLEIN, R. (1996)

Reproductive endocrinology of bitches. Animal Reproduction Science 42, 275-88

HOFFMANN, B., RIESENBECK, A., SCHAMS, D. & STEINMETZ, B. (1999)

Aspects of hormonal control and induced parturition in the dog. Reproduction in Domestic Animals 34, 219-26

HOFFMANN, B. & SCHNEIDER, S. (1993)

Secretion and release of luteinizing hormone during the luteal phase of the oestrous cycle in the dog. Journal of Reproduction & Fertility, Supplement 47, 85-91

HORN, F., MOC, I., SCHNEIDER, N., GRILLHÖSL, C., BERGHOLD, S. & LINDENMEIER, G. (2005)

Hormone. In Biochemie des Menschen Das Lehrbuch für das Medizinstudium. 3. Auflage. Hrsg. Horn, F., Moc, I., Schneider, N., Grillhösl, C., Berghold, S. & Lindenmeier, G. Stuttgart, Thieme Verlag. 331-432

HORTON, E. W. & POYSER, N. L. (1976)

Uterine luteolytic hormone: a physiological role for prostaglandin F<sub>2</sub> alpha. Physiological Reviews 56, 595-651

JOHNSTON, S. D., ROOT KUSTRITZ, M. V. & OLSON, P. N. S. (2001)

The Canine Estrous Cycle. In Canine and Feline Theriogenology. Hrsg. Johnston, S. D., Root Kustritz, M. V. & Olson, P. N. S., W.B. Saunders Company. 16-31

JONES, G. E., BOYNS, A. R., CAMERON, E. H., BELL, E. T., CHRISTIE, D. W. & PARKES, M. F. (1973)

Plasma oestradiol, luteinizing hormone and progesterone during pregnancy in the Beagle bitch. Journal of Reproduction & Fertility 35, 187-9

KÄCHLER, E. (2005)

Hormone und Zytokine. In: Intensivkurs Biochemie. Hrsg. Dettmer, U. F., M.; Kächler E.; Sönnichsen, A. München, Urban und Fischer, 319-59

KAM, P. C. & SEE, A. U. (2000)

Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. *Anaesthesia* 55, 442-9

KIRSCH, T. M., FRIEDMAN, A. C., VOGEL, R. L. & FLICKINGER, G. L. (1981)

Macrophages in corpora lutea of mice: characterization and effects on steroid secretion. *Biology of Reproduction* 25, 629-38

KLEIN, R., SCHAMS, D., FAILING, K. & HOFFMANN, B. (2003)

Investigations on the re-establishment of the positive feedback of oestradiol during anoestrus in the bitch. *Reproduction in Domestic Animals* 38, 13-20

KOTWICA, J., SKARZYNSKI, D., MLYNARCZUK, J. & REKAWIECKI, R. (2003)

Role of prostaglandin E2 in basal and noradrenaline-induced progesterone secretion by the bovine corpus luteum. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 70, 351-9

KOWALEWSKI, M. P., FOX P, BOOS A., REICHLER I. (2012)

Prostaglandin E2 (PGE2)- the luteotropic factor of the gonadotropin-independent phase in the dog acts at the level of steroidogenic acute regulatory (STAR) protein. *Reproduction in Domestic Animals*, (Suppl.2) 47, 32

KOWALEWSKI, M. P., BECERIKLISOY, H. B., ASLAN, S., AGAOGLU, A. R. & HOFFMANN, B. (2009)

Time related changes in luteal prostaglandin synthesis and steroidogenic capacity during pregnancy, normal and antiprogesterin induced luteolysis in the bitch. *Animal Reproduction Science* 116, 129-38

KOWALEWSKI, M. P., BECERIKLISOY, H. B., PFARRER, C., ASLAN, S., KINDAHL, H., KUCUKASLAN, I. & HOFFMANN, B. (2010)

Canine placenta: a source of prepartal prostaglandins during normal and antiprogestin-induced parturition. *Reproduction* 139, 655-64

KOWALEWSKI, M. P., FOX, B., GRAM, A., BOOS, A. & REICHLER, I. (2013)

Prostaglandin E2 (PGE2) functions as a luteotropic factor in the dog. *Reproduction* 145, 213-26

KOWALEWSKI, M. P., MICHEL, E., GRAM, A., BOOS, A., GUSCETTI, F., HOFFMANN, B., ASLAN, S. & REICHLER, I. (2011)

Luteal and placental function in the bitch: spatio-temporal changes in prolactin receptor (PRLr) expression at dioestrus, pregnancy and normal and induced parturition. *Reproductive Biology & Endocrinology* 9, 109

KOWALEWSKI, M. P., MUTEMBEI, H. M. & HOFFMANN, B. (2008a)

Canine prostaglandin E2 synthase (PGES) and its receptors (EP2 and EP4): expression in the corpus luteum during dioestrus. *Animal Reproduction Science* 109, 319-29

KOWALEWSKI, M. P., MUTEMBEI, H. M. & HOFFMANN, B. (2008b)

Canine prostaglandin F2alpha receptor (FP) and prostaglandin F2alpha synthase (PGFS): molecular cloning and expression in the corpus luteum. *Animal Reproduction Science* 107, 161-75

KOWALEWSKI, M. P., SCHULER, G., TAUBERT, A., ENGEL, E. & HOFFMANN, B. (2006)

Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus. *Theriogenology* 66, 1423-30

KRANTZ, H. (1951)

Kern und Funktion I: Die Kerngröße und ihre Abhängigkeit von äußeren und inneren Faktoren. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 35, 425-57

KRONTHALER, O. (1960)

Karyometrische Untersuchungen über den Einfluß einiger Wirkstoffe auf die Interstitialzellen von Gonaden. Diss. med. vet. Ludwig-Maximilian-Universität München

KURUMBAIL, R. G., STEVENS, A. M., GIERSE, J. K., MCDONALD, J. J., STEGEMAN, R. A., PAK, J. Y., GILDEHAUS, D., MIYASHIRO, J. M., PENNING, T. D., SEIBERT, K., ISAKSON, P. C. & STALLINGS, W. C. (1996)

Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 384, 644-8

LANG, G. (2006)

Histotechnik: Praxislehrbuch für Biomedizinische Analytik. Wien, Springer, 257-94

LIEBICH, H.-G. (2005)

Weibliche Geschlechtsorgane. In Funktionelle Histologie der Haussäugetiere  
Hrsg. Liebich, H.-G. Stuttgart, Schattauer GmbH. 293-310

LINDE-FORSBERG, C., KINDAHL, H. & MADEI, A. (1992)

Termination of mid-term pregnancy in the dog with oral RU486. *Journal of Small Animal Practice* 33, 331-6

LUZ, M. R., BERTAN, C. M., BINELLI, M. & LOPES, M. D. (2006)

Plasma concentrations of 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin F<sub>2</sub>-alpha (PGFM), progesterone and estradiol in pregnant and nonpregnant diestrus cross-bred bitches. *Theriogenology* 66, 1436-41

MADORE, E., HARVEY, N., PARENT, J., CHAPDELAINE, P., AROSH, J. A. & FORTIER, M. A. (2003)

An aldose reductase with 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin f<sub>2</sub> alpha in the bovine endometrium. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 11205-12



MARSH, J. M. & LEMAIRE, W. J. (1974)

Cyclic AMP accumulation and steroidogenesis in the human corpus luteum: effect of gonadotropins and prostaglandins. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 38, 99-106

MCCANN, M. E., ANDERSEN, D. R., ZHANG, D., BRIDEAU, C., BLACK, W. C., HANSON, P. D. & HICKEY, G. J. (2004)

In vitro effects and in vivo efficacy of a novel cyclooxygenase-2 inhibitor in dogs with experimentally induced synovitis. *American Journal of Veterinary Research* 65, 503-12

MCCRACKEN, J. A., CARLSON, J. C., GLEW, M. E., GODING, J. R., BAIRD, D. T., GREEN, K. & SAMUELSSON, B. (1972)

Prostaglandin F<sub>2</sub> identified as a luteolytic hormone in sheep. *Nature: New Biology* 238, 129-34

MCLEAN, M. P., NELSON, S. E., BILLHEIMER, J. T. & GIBORI, G. (1992)

Differential capacity for cholesterol transport and processing in large and small rat luteal cells. *Endocrinology* 131, 2203-12

MEYER, H. H., EISELE, K. & OSASO, J. (1989)

A biotin-streptavidin amplified enzymeimmunoassay for 13,14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2</sub> alpha. *Prostaglandins* 38, 375-83

MIYAMOTO, T., OGINO, N., YAMAMOTO, S. & HAYAISHI, O. (1976)

Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *The Journal of Biological Chemistry* 251, 2629-36

MORITA, I. (2002)

Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68-69, 165-75

MUKHERJEE, D. & TOPOL, E. J. (2003)

Cox-2: where are we in 2003? - Cardiovascular risk and Cox-2 inhibitors. *Arthritis Research & Therapy* 5, 8-11

NAITO, K. & TAKAHASHI, M. (1988)

The effects of peritoneal macrophages on monolayered luteal cell progesterin secretion in the rat. *Endocrinologia Japonica* 35, 439-46

NARUMIYA, S., SUGIMOTO, Y. & USHIKUBI, F. (1999)

Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiological Reviews* 79, 1193-226

NETT, T. M., AKBAR, A. M., PHEMISTER, R. D., HOLST, P. A., REICHERT, L. E., JR. & NISWENDER, G. D. (1975)

Levels of luteinizing hormone, estradiol and progesterone in serum during the estrous cycle and pregnancy in the beagle bitch (38491). *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine* 148, 134-9

NISWENDER, G. D., JUENGEL, J. L., SILVA, P. J., ROLLYSON, M. K. & MCINTUSH, E. W. (2000)

Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews* 80, 1-29

NOHR, B., HOFFMANN, B. & STEINETZ, B. E. (1993)

Investigation of the endocrine control of parturition in the dog by application of an antigestagen. *Journal of Reproduction & Fertility, Supplement* 47, 542-3

OKKENS, A. C., BEVERS, M. M., DIELEMAN, S. J. & WILLEMSE, A. H. (1990)

Evidence for prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog. *The Veterinary Quarterly* 12, 193-201

OKKENS, A. C., DIELEMAN, S. J., BEVERS, M. M., LUBBERINK, A. A. & WILLEMSE, A. H. (1986)

Influence of hypophysectomy on the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog. *Journal of Reproduction & Fertility* 77, 187-92

OKKENS, A. C. & KOOISTRA, H. S. (2006)

Anoestrus in the dog: a fascinating story. *Reproduction in Domestic Animals* 41, 291-6

OLSON, P. N., BOWEN, R. A., BEHRENDT, M. D., OLSON, J. D. & NETT, T. M. (1984)

Concentrations of progesterone and luteinizing hormone in the serum of diestrous bitches before and after hysterectomy. *American Journal of Veterinary Research* 45, 149-53

ONCLIN, K., SILVA, L. D., DONNAY, I. & VERSTEGEN, J. P. (1993)

Luteotrophic action of prolactin in dogs and the effects of a dopamine agonist, cabergoline. *Journal of Reproduction & Fertility, Supplement* 47, 403-9

ONCLIN, K. & VERSTEGEN, J. P. (1997)

In vivo investigation of luteal function in dogs: effects of cabergoline, a dopamine agonist, and prolactin on progesterone secretion during mid-pregnancy and -diestrus. *Domestic Animal Endocrinology* 14, 25-38

OTTO, J. C. & SMITH, W. L. (1994)

The orientation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 19868-75

OTTO, J. C. & SMITH, W. L. (1996)

Photolabeling of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 with 3-trifluoro-3-(m-[125I]iodophenyl)diazirine as a probe of membrane association and the cyclooxygenase active site. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 9906-10

PAPA, D. C. (2001)

Darstellung von estradiol-17- $\beta$  und Progesteronrezeptoren im Corpus luteum der Hündin zu definierten Zeitpunkten im Östrus und Diöstrus. Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen, Germany

PAPA, P. C. & HOFFMANN, B. (2011)

The corpus luteum of the dog: source and target of steroid hormones? *Reproduction in Domestic Animals* 46, 750-6

PATE, J. L. & LANDIS KEYES, P. (2001)

Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? *Reproduction* 122, 665-76

PERI, K. G., HARDY, P., LI, D. Y., VARMA, D. R. & CHEMTOB, S. (1995)

Prostaglandin G/H synthase-2 is a major contributor of brain prostaglandins in the newborn. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 24615-20

PISEDDU, E., MASSERDOTTI, C., MILESI, C. & SOLANO-GALLEGO, L. (2012)

Cytologic features of normal canine ovaries in different stages of estrus with histologic comparison. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology* 41, 396-404

POLISCA, A., SCOTTI, L., ORLANDI, R., BRECCHIA, G., MARANESI, M., ZERANI, M. & BOITI, C. (2010)

Aglepristone (RU534) administration to non-pregnant bitches in the mid-luteal phase induces early luteal regression. *Theriogenology* 74, 672-81

POLSTER, C. (1959)

Karyometrische und karyologische Untersuchungen an den Hauptstückepithelien der Rattenniere bei experimenteller Eiweißnephrose. *Virchows Archiv Pathological Anatomy* 332, 420-30

REHM, S., STANISLAUS, D. J. & WILLIAMS, A. M. (2007)

Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. Birth Defects Research Part B: Developmental & Reproductive Toxicology 80, 233-45

RIESENBECK, A. (1997)

Untersuchungen über die Verfügbarkeit von LH bei ingraviden und graviden Hündinnen und zur Bedeutung des Regelfaktors PGF2 alpha für die Luteolyse im peripartalen Zeitraum. Diss. med. vet, Justus-Liebig-Universität Gießen, Germany

ROMAGNOLI, S. E., CELA, M. & CAMILLO, F. (1991)

Use of prostaglandin F2 alpha for early pregnancy termination in the mismated bitch. The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice 21, 487-99

SCHNORR, B. & KRESSIN, M. (2011)

Entwicklungen und Bau der Eizellen. In: Embryologie der Haustiere. 6. Auflage Auflage. Eds Schnorr, B.& Kressin, M. Stuttgart, Enke Verlag. 14-23

SCHUSTER, V. L. (2002)

Prostaglandin transport. Prostaglandins & Other Lipid Mediators 68-69, 633-47

SEIBERT, K., ZHANG, Y., LEAHY, K., HAUSER, S., MASFERRER, J. & ISAKSON, P. (1997)

Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. Advances in Experimental Medicine & Biology 400A, 167-70

SHENAVAI, S., PREISSING, S., HOFFMANN, B., DILLY, M., PFARRER, C., OZALP, G. R., CALISKAN, C., SEYREK-INTAS, K. & SCHULER, G. (2012)

Investigations into the mechanisms controlling parturition in cattle. Reproduction 144, 279-92

SMITH, W. L. (1986)

Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells. Annual Review of Physiology 48, 251-62

SMITH, W. L. (1992)

Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *The American Journal of Physiology* 263, F181-91

SMITH, W. L. & MARNETT, L. J. (1991)

Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1083, 1-17

SMITH, W. L., MARNETT, L. J. & DEWITT, D. L. (1991)

Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacology & Therapeutics* 49, 153-79

SOKOLOWSKI, J. H. (1971)

The effects of ovariectomy on pregnancy maintenance in the bitch. *Laboratory Animal Science* 21, 696-9

SONNACK, M. (2009)

Untersuchungen zur Bildung, Regression und Funktionalität des Corpus luteum der nicht graviden Hündin, morphologische und biochemische Aspekte. Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen, Germany

STOUFFER, R. L. (2006)

Structure, Function and Regulation of the Corpus Luteum. In: *Physiology of Reproduction*. 3. Auflage. Hrsg. Neill, J. D., Editor in Chief, Academic Press. 475-526

TANAKA, A., ARAKI, H., HASE, S., KOMOIKE, Y. & TAKEUCHI, K. (2002)

Up-regulation of COX-2 by inhibition of COX-1 in the rat: a key to NSAID-induced gastric injury. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 16, Supplement 2, 90-101

TIETZE, K. W., INTHRAPHUVASAK, J. & HIERSCHKE, H.-D. (1970)

Funktionelle Morphologie des Endometrium corporis uteri. *Archiv für. Gynäkologie*. 209, 331-8

TSUTSUI, T., KAWAKAMI, E., ORIMA, H., YAMAUCHI, M., OKUBO, T. & STABENFELDT, G. H. (1989)

Effects of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha-analogue administration on luteal function, implantation of embryos and maintenance of pregnancy in bitches. *Nihon juigaku zasshi. The Japanese Journal of Veterinary Science* 51, 496-504

VALIENTE, C., CORRADA, Y., DE LA SOTA, P. E., BLANCO, P. G., ARIAS, D. & GOBELLO, C. (2009)

Comparison of two doses of the GnRH antagonist, acyline, for pregnancy termination in bitches. *Reproduction in Domestic Animals* 44, Supplement 2, 156-9

WEEMS, Y. S., BRIDGES, P. J., TANAKA, Y., SASSER, R. G., LEAMASTER, B. R., VINCENT, D. L. & WEEMS, C. W. (1997)

PGE<sub>1</sub> or PGE<sub>2</sub> not LH regulates secretion of progesterone in vitro by the 88-90 day ovine corpus luteum of pregnancy. *Prostaglandins* 53, 337-53

WILDT, D. E., PANKO, W. B., CHAKRABORTY, P. K. & SEAGER, S. W. (1979)

Relationship of serum estrone, estradiol-17beta and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch. *Biology of Reproduction* 20, 648-58

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Verlaufs der Progesteron- und Estradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen von ingraviden (a) und graviden Hündinnen (b) (nach Hoffmann et al. 1999).....	9
Abbildung 2: Bildung von PGH <sub>2</sub> aus Arachidonsäure [modifiziert nach <a href="http://www.wikimedia.org/wiki/File:Prostaglandin_H2.png">www.wikimedia.org/wiki/File:Prostaglandin_H2.png</a> ; Smith & Marnett (1991); Kächler (2005)] .....	20
Abbildung 3: Bildung von PGE <sub>2</sub> und PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> aus PGH <sub>2</sub> [modifiziert nach Madore et al. (2003)] .....	21
Abbildung 4: Regressionsgerade zur Berechnung des individuellen Probenblindwertes am Beispiel des Tieres 30/1/16 K.....	39
Abbildung 5: Darstellung der Zellkernmessung mit dem Programm Leica IM 1000 bei 400-facher Vergrößerung .....	49
Abbildung 6: Individuelle Progesteronprofile der Behandlungsgruppe .....	64
Abbildung 7: Individuelle Progesteronprofile der Kontrollgruppe .....	64
Abbildung 8: Verlauf der mittleren P <sub>4</sub> -Konzentrationen von Behandlungs- und Kontrollgruppe ( $\bar{x}$ g x SF $^{\pm 1}$ ); a:b p < 0,05.....	1
Abbildung 9: Individuelle PGFM-Profile in der Behandlungsgruppe .....	68
Abbildung 10: Individuelle PGFM-Profile in der Kontrollgruppe .....	68
Abbildung 11: Verlauf der mittleren PGFM-Konzentrationen ( $\bar{x}$ g x SF $^{\pm 1}$ ) bei der Behandlungs- und Kontrollgruppe; a:b p < 0,05 (gilt nur für die jeweiligen Tage) ....	69
Abbildung 12: Individuelle Bicyclo PGEM-Profile in der Behandlungsgruppe.....	71
Abbildung 13: Individuelle Bicyclo PGEM-Profile in der Kontrollgruppe .....	71
Abbildung 14: Verlauf der mittleren Bicyclo PGEM-Konzentrationen ( $\bar{x}$ g x SF $^{\pm 1}$ ) bei der Behandlungs- und Kontrollgruppe; a:b p < 0,05 (gilt nur für den jeweiligen Tag) 72	72
Abbildung 15: Mittlere Größe der Zellkernflächen ( $\mu$ m <sup>2</sup> ) bei der Behandlungs- und Kontrollgruppe; Angaben in $\bar{x} \pm$ SD .....	74
Abbildung 16: IHC Cox2: zonare Färbung des Lutealgewebes am Beispiel des Tieres 10/5 BG (50-fache Vergrößerung) .....	76
Abbildung 17: IHC Cox2: Positivkontrolle Plazenta Rind letztes Trächtigkeitsdrittel, braune Färbung weist auf Expression der Cox2 in den einkernigen Trophoblastzellen hin (200-fache Vergrößerung) .....	76
Abbildung 18: IHC Cox2 Kontrollgruppe (Tier 10/1 K); schwache Signale im Zytoplasma einiger Luteinzellen (400-fache Vergrößerung) .....	77



Abbildung 19: IHC Cox2 Behandlungsgruppe (Tier 10/4) deutliche Signale an Tag 10 (400-fache Vergrößerung) ..... 77

Abbildung 20: IHC Cox2 Behandlungsgruppe (Tier 5/1); schwache Signale an Tag 5 (400-fache Vergrößerung) ..... 78

Abbildung 21: IHC Ki67: Positivkontrolle, Darmepithel Hund, (400-fache Vergrößerung) ..... 80

Abbildung 22: IHC Ki67: Negativkontrolle des Tieres 20/2 (400-fache Vergrößerung) ..... 81

Abbildung 23: IHC Ki67: Follikel (200-fache Vergrößerung) ..... 81

Abbildung 24: IHC Ki67: Tier 20/2 BG; Positivsignale vereinzelt vor allem in Nicht-Luteinzellen erkennbar (400-fache Vergrößerung) ..... 81

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Tiere .....	26
Tabelle 2: Tiere der Behandlungsgruppe (BG).....	27
Tabelle 3: Tiere der Kontrollgruppe (KG).....	28
Tabelle 4: Testansatz P <sub>4</sub> -RIA .....	30
Tabelle 5: Spezifität des PGFM-EIA-Antiserums .....	34
Tabelle 6: Vorversuch zur Überprüfung der Eignung des PGFM-EIA durch Einbringung von Plasmaproben mit erwartet hohen und niedrigen PGFM-Werten (Angabe in pg/ml) .....	36
Tabelle 7: In der Literatur beschriebene PGFM-Konzentrationen beim Hund (pg/ml) .....	37
Tabelle 8: PGFM-Konzentrationen eines unkastrierten Rüden vor und nach Firocoxibgabe .....	38
Tabelle 9: Vorgehen zur Berechnung der Konzentration in pg/ml aus den 3 Verdünnungsstufen unter Berücksichtigung des Probenblindwertes.....	40
Tabelle 10: Testansatz PGFM-EIA .....	41
Tabelle 11: Spezifität des PGE <sub>2</sub> -Metaboliten-EIA Antiserums.....	44
Tabelle 12: Vorversuch zur Überprüfung der Eignung des PGE <sub>2</sub> -Metaboliten-EIA durch Einbringung von Plasmaproben mit erwartet hohen und niedrigen Bicyclo PGEM Werten (Angabe in pg/ml) .....	45
Tabelle 13: Bicyclo PGEM Testansatz .....	47
Tabelle 14: Geometrische Mittelwerte ( $\bar{x}_g$ ) in ng/ml und Streufaktoren (SF) der P <sub>4</sub> -Konzentrationen im Blut der Behandlungs- und Kontrollgruppe .....	65
Tabelle 15: PGFM-Konzentrationen im Blut der Behandlungs- und Kontrollgruppe (pg/ml; $\bar{x}_g$ /SF) .....	69
Tabelle 16: Bicyclo PGEM-Konzentrationen im Blut der Behandlungs- und Kontrollgruppe (pg/ml; $\bar{x}_g$ /SF) .....	72
Tabelle 17: Mittlere Größe der Luteinzellkernflächen ( $\mu\text{m}^2$ ) bei der Behandlungs- (BG) und der Kontrollgruppe (KG); Angaben in $\bar{x} \pm \text{SD}$ .....	73
Tabelle 18: Anzahl Schnitte mit und ohne erkennbarer Cox2-Expression mittels IHC in der BG und KG .....	76
Tabelle 19: Ergebnis IHC Ki67: Tiere mit positiver Färbereaktion und Anzahl der gefärbten Zellen pro Schnitt.....	80

## 11. Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
AK	Antikörper
ANOVA	Analysis of Variance
Aqua dest.	Aqua destillata
BG	Behandlungsgruppe
Bicyclo PGEM	11-desoxy-13,14-dihydro-15-keto-11 $\beta$ -16-xi-cyclo-PGE <sub>2</sub>
BSA	Bovines-Serum-Albumin
ca.	circa
CD4	T-Helfer-Lymphozyten
CD8	T-Suppressor-Lymphozyten
cAMP	cyclo Adenosinmonophosphat
CL	Corpus luteum
Cox	Cyclooxygenase
Cox1	Cyclooxygenase 1
Cox2	Cyclooxygenase 2
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
d.h.	das heißt
DTNB	5,5`-Dithio-bis-(2Nitrobenzoesäure)
ELISA	Enzyme-linked-Immunsorbent-assay
EIA	Enyme-immuno-assay
EP1	Prostaglandin-E <sub>2</sub> -Rezeptor 1
EP2	Prostaglandin-E <sub>2</sub> -Rezeptor 2
EP3	Prostaglandin-E <sub>2</sub> -Rezeptor 3
EP4	Prostaglandin-E <sub>2</sub> -Rezeptor 4
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Er <sub><math>\alpha</math></sub>	Estradiolrezeptor $\alpha$
Er <sub><math>\beta</math></sub>	Estradiolrezeptor $\beta$
et al.	et alii/ et aliae/ et alia
etc.	et cetera

## Abkürzungsverzeichnis

---

Fa.	Firma
FP (FPA und B)	Prostaglandin-F <sub>2α</sub> -Rezeptor
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
HE	Haematoxillin-Eosin
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
Il-1	Interleukin-1
Il-8	Interleukin-8
Il-10	Interleukin-10
Il-12	Interleukin-12
IP3/DAG	Inositoltriphosphat/Diacylglycerol
Kap.	Kapitel
KG	Kontrollgruppe
KGW	Körpergewicht
LH	Luteinisierendes Hormon
MHC II	Major Histocompatibility Complex II
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NSAIDs	nonsteroidal antiinflammatory drugs
NSB	nicht spezifische Bindung
NTB	2-Nitro-5-Thiobenzoat
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase Komplex
PGAM	13,14-dihydro-15-keto PGA <sub>2</sub>
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGEM	13,14-dihydro-15-keto PGE <sub>2</sub>
PGES	Prostaglandin-E-Synthase
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
PGFM	13,14-dihydro-15-keto PGF <sub>2α</sub>
PGFS	Prostaglandin-F-synthase
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandin G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin 2

## Abkürzungsverzeichnis

---

PGT	Prostaglandintransporter
p.o.	post ovulationem
PR	Prostaglandinrezeptor
PRLr	Prolaktinrezeptor
P <sub>4</sub>	Progesteron
P450 <sub>scc</sub>	P450 side chain cleavage enzyme
RIA	Radioimmunoassay
Rpm	rotations per minute
SD	Standardabweichung
SF	Streufaktor
SOP	Standard Operation Procedure
StAR	Steroide Acute Regulatory Protein
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered-saline
TGFβ1	Transforming-Growth-Factor-β1
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor-α
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert
$\bar{x}_g$	geometrischer Mittelwert
z.B.	zum Beispiel
3βHSD	3β Hydroxysteroiddehydrogenase

### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die in irgendeiner Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die Überlassung des Themas bedanke ich mich neben Herrn Prof. Dr. Hoffmann und Herrn Prof. Dr. Schuler auch bei der Arbeitsgruppe der University of Warmia and Mazury in Olsztyn unter der Leitung von Proff. Janowski und Zdunczyk, die in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. M.P. Kowalewski, PhD (veterinäranatomisches Institut in Zürich), für die Planung und Durchführung des Tierversuchs in Polen verantwortlich waren und mir die Blut- und Gewebeproben zur Verfügung gestellt haben. Vielen Dank für die gute Kooperation und Gesprächsbereitschaft zur Lösung von aufgetretenen Problemen.

Mein ganz besonderer Dank gilt nochmals Herrn Prof. Dr. Bernd Hoffmann, der durch sein großes Engagement, seine ständige Gesprächsbereitschaft, seine Geduld, seine Hilfestellungen und Korrekturen sowie durch sein enormes Fachwissen einen wesentlichen Beitrag zur Fertigstellung dieser Arbeit geleistet hat.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Gerhard Schuler, der diese Arbeit mitbetreute und mir stets mit seinem fachlichen Rat zur Seite stand.

Herrn PD Dr. M.P. Kowalewski und seinem Team danke ich ebenfalls für die Anfertigung und Überlassung der Gewebeschnitte.

Beim RIA-Labor Team möchte ich mich für die geduldige Einführung in die Labortechniken und die stetige Hilfsbereitschaft bedanken. Herrn Willi Damm auch noch für die Unterstützung bei kleineren und größeren Computerproblemen.

Bei der Professur für Veterinärpathologie bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit bei der Lösung des Ki67 Immunhistochemie Problems, insbesondere bei Herrn Dr. Kernt Köhler und Frau Diana Klotz.

Herrn Prof. Dr. Leiser danke ich für seine Zeit und Unterstützung bei morphologischen Fragestellungen.

## Danksagung

---

Den Mitarbeitern der Abteilung für Biomathematik und Datenverarbeitung unter der Leitung von Herrn Dr. K. Failing danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

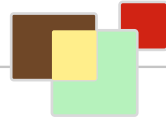
Bei meiner guten Freundin Frau Dr. Hanna Stinshoff bedanke ich mich für die bedingungslose Unterstützung im Kampf mit Microsoft Office und Endnote, für ihre guten und hilfreichen Ratschläge und ihre ständige Motivation.

Zuletzt möchte ich mich vor allem bei meiner Familie bedanken, insbesondere bei meinen Eltern, die mich bei all meinen Entscheidungen immer unterstützt und ermutigt haben und mir sowohl emotional als auch finanziell zur Seite gestanden haben. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Julia Fingerhut





*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6169-2



9 783835 961692