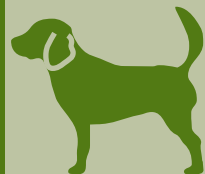
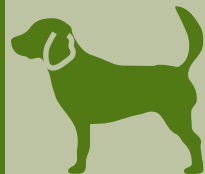


Downregulation von LH bei der Hündin durch Anwendung eines GnRH-Agonisten in Form eines Implantates

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Andrea Jäger

Gießen 2006



Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2006

© 2006 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 3-938026-70-7

Verlag: DVG Service GmbH
Frankfurter Straße 89
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere
mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

Downregulation von LH bei der Hündin durch Anwendung eines GnRH-Agonisten in Form eines Implantates

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Andrea Jäger
Tierärztin aus Wetzlar

Gießen 2006

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

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

1. Berichtserstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. Bernd Hoffmann
2. Berichtserstatter: PD Dr. Gerhard Schultheiß

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2006

Meinen Eltern

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG</u>	<u>1</u>
<u>2</u>	<u>LITERATURÜBERSICHT</u>	<u>2</u>
2.1	NEUROENDOKRINE STEUERUNG DER OVARFUNKTION BEIM HUND	2
2.2	DIE ZYKLUSPHASEN DER HÜNDIN	7
2.3	MÖGLICHKEITEN DER MANIPULATION DES REPRODUKTIONSZYKLUS BEI DER HÜNDIN	11
2.3.1	GONADEKTOMIE DER HÜNDIN	11
2.3.2	ANWENDUNG VON GESTAGENEN	12
2.3.3	ANWENDUNG VON ANDROGENEN	13
2.3.4	WEITERE MÖGLICHKEITEN ZUR UNTERDRÜCKUNG DER OVARFUNKTION	14
<u>3</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>21</u>
3.1	VERSUCHSTIERE UND HALTUNG	21
3.2	VERSUCHSAUFBAU UND VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	21
3.2.1	VERSUCHSAUFBAU	21
3.2.2	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	23
3.2.2.1	Bestimmung des Zyklusstandes der einzelnen Hündinnen	23
3.2.2.2	Gewinnung der Plasmaproben zur Kontrolle der Corpus luteum – Funktion	24
3.2.3	GEWINNUNG DER PLASMAPROBEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER LH-FREISETZUNG	25
3.2.3.1	Zeitfenster	25
3.2.3.2	Punktueller Blutentnahmen	25
3.2.4	OVARIOHYSTEREKTOMIE (OHE)	25
3.2.5	VERABREICHUNG DER BUSERELINIMPLANTATE	26
3.2.6	BEHANDLUNGSGRUPPEN	27
3.3	HORMONANALYTIK	28
3.3.1	BESTIMMUNG VON PROGESTERON	28
3.3.1.1	Bestimmung von Progesteron mittels Radioimmuntest (RIA)	28
3.3.1.2	Bestimmung von Progesteron mittels automatischer Chemilumineszenz	28
3.3.1.3	Vergleich der beiden Progesteronbestimmungsverfahren	29
3.3.2	BESTIMMUNG VON LH	29
3.3.2.1	Testprinzip	29
3.3.2.2	Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem 2. Antikörper	30
3.3.2.3	Testdurchführung	30
3.3.2.4	Testauswertung	31
3.3.2.5	Zuverlässigkeit	32
3.3.2.6	Testspezifische Substanzen	32
3.3.2.7	Lösungen und Puffer	34
3.4	AUSWERTUNG DER LH-BESTIMMUNGEN	36
3.4.1	GEWINNUNG VON HARNPROBEN	38
<u>4</u>	<u>ERGEBNISSE DER LH-BESTIMMUNGEN</u>	<u>39</u>
4.1	ZEITFENSTER	39
4.2	EFFEKT DER KASTRATION AUF DIE LH-FREISETZUNG	58

4.3	EFFEKT DES GNRH-IMPLANTATES AUF DIE LH-FREISETZUNG	59
4.4	BESONDERE BEOBACHTUNGEN	65
4.5	PUNKTUELLE LH-MESSUNGEN	65
5	<u>DISKUSSION</u>	69
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	76
7	<u>SUMMARY</u>	78
8	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	80
9	<u>ANHANG</u>	96
9.1	ZEITFENSTER HUND MAJA (GRUPPE 1)	97
9.2	ZEITFENSTER HUND FLO (GRUPPE 1)	100
9.3	ZEITFENSTER HUND PAT (GRUPPE 1)	103
9.4	ZEITFENSTER HUND ELA (GRUPPE 2)	106
9.5	ZEITFENSTER HUND ODA (GRUPPE 2)	109
9.6	ZEITFENSTER HUND KIM (GRUPPE 2)	112
9.7	ZEITFENSTER HUND LILLI (GRUPPE 3)	115
9.8	ZEITFENSTER HUND FOX (GRUPPE 3)	118
9.9	ZEITFENSTER HUND CLEO (GRUPPE 3)	121

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die Sexualfunktion der Hündin wird allgemein als asaisonal-monoöstrisch beschrieben. Der Hund nimmt damit eine Ausnahmestellung unter den Haussäugetieren ein.

Die jeweils von einer Anöstrusperiode eingerahmte sexualaktive Phase ist gekennzeichnet durch lange Proöstrus- und Östrusperioden, gefolgt von einer 2-3 Monate anhaltenden Diöstrusperiode. Zahlreiche bei der Hündin auftretende gynäkologische Probleme resultieren aus diesem Zyklusablauf, der auch die biotechnologische Kontrolle des Zyklus vor Probleme stellt.

So sind bisherige hormonelle Maßnahmen zur Zykluskontrolle durch Anwendung von Gestagenen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Anwendung und der Art des Präparates mit dem Risiko von Nebenwirkungen verbunden. Auch die chirurgische Kastration beinhaltet ein grundsätzliches Risiko, eventuell später auftretende Nebenwirkungen sind irreversibel. Zu beachten ist auch, dass heute von vielen Hundebesitzern die körperliche Unversehrtheit ihres Tieres gefordert wird, die auch das Verbleiben der Reproduktionsorgane einschließt.

Nachdem durch eine Downregulierung der hypophysären GnRH-Rezeptoren nach Anwendung eines GnRH-wirksamen Implantates (Buserelin, Profact®) beim Rüden eine vollständige, reversible hormonelle Kastration erreicht werden konnte, die bei den Tierbesitzern auf eine hohe Akzeptanz stieß (RIESENBECK et al. 2002), war es Ziel vorliegender Studie, erste Hinweise auf die LH-depressive Wirksamkeit dieses Präparates bei der Hündin zu erhalten.

2 Literaturübersicht

2.1 Neuroendokrine Steuerung der Ovarfunktion beim Hund

Abb. 1 zeigt das Schema der neuroendokrinen Regulation der sexualaktiven Phase des Zyklus beim Hund, Abb. 2 das sich daraus ergebende Hormonprofil für die ovariellen Steroide Estradiol-17 β und Progesteron sowie für die Hypophysenvorderlappenhormone Luteinisierendes Hormon (LH) und Prolaktin (PRL).

Die Steuerung der Ovarfunktion ist gekennzeichnet durch positive und negative Rückkopplungsmechanismen. Als übergeordnetes Organ setzt der Hypothalamus das Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) frei. Endogenes GnRH ist ein Dekapeptid, seine Biosynthese findet hauptsächlich im Nucleus infundibularis des rostralen Hypothalamus statt. Das GnRH entsteht durch Abspaltung des Prohormones mit 69 Aminosäuren vom Prä-pro-GnRH.

GnRH gelangt axonal zur medianen Eminenz, wo eine Speicherung erfolgt. Von dort tritt es, gesteuert durch den im Nucleus infundibularis gelegenen „Pulsgenerator“, episodisch in den Primärplexus der hypophysären Portalgefäße über. Die direkte Gefäßverbindung von Hypothalamus zur Hypophyse ist daher von großer Bedeutung für die biologische Wirkung des GnRHs (DÖCKE 1994a). GnRH wird nach seiner Freisetzung sehr schnell durch Peptidasen abgebaut, woraus dessen kurze Halbwertszeit resultiert. Die Elimination aus dem Blut verläuft zweiphasig; der Verteilungsphase mit einer Halbwertszeit von 2-4 Minuten schließt sich die ca. 20-minütige Eliminationsphase an. Das GnRH bindet an Membranrezeptoren der hypophysären Zellen und löst damit eine Reaktionskette aus, an deren Ende die Bereitstellung von Gonadotropinen aus einem schnell freisetzbaren Pool steht. Damit verbunden ist auch deren Übertritt aus dem Speicherpool in den Freisetzungspool (DÖCKE 1994b).

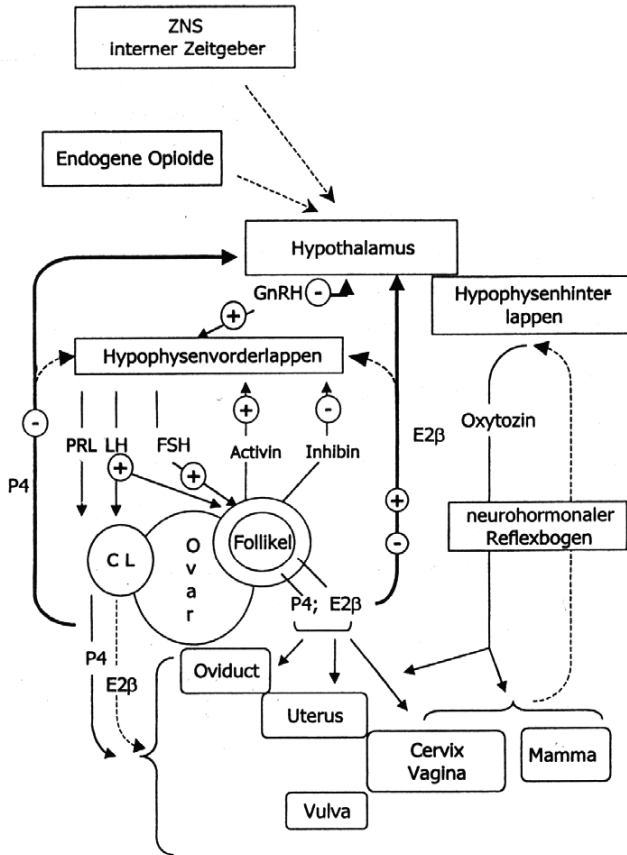


Abb. 1 Schema der hormonellen Interaktion des Hypothalamo-Hypophysen-Gonadensystems unter Berücksichtigung der Besonderheiten beim Haushund, PRL: Prolaktin, LH: Luteinisierendes Hormon, FSH: Follikel-stimulierendes Hormon, P4: Progesteron, E2β: Estradiol-17β, GnRH: Gonadotropin-Releasing-Hormon, CL: Corpus luteum

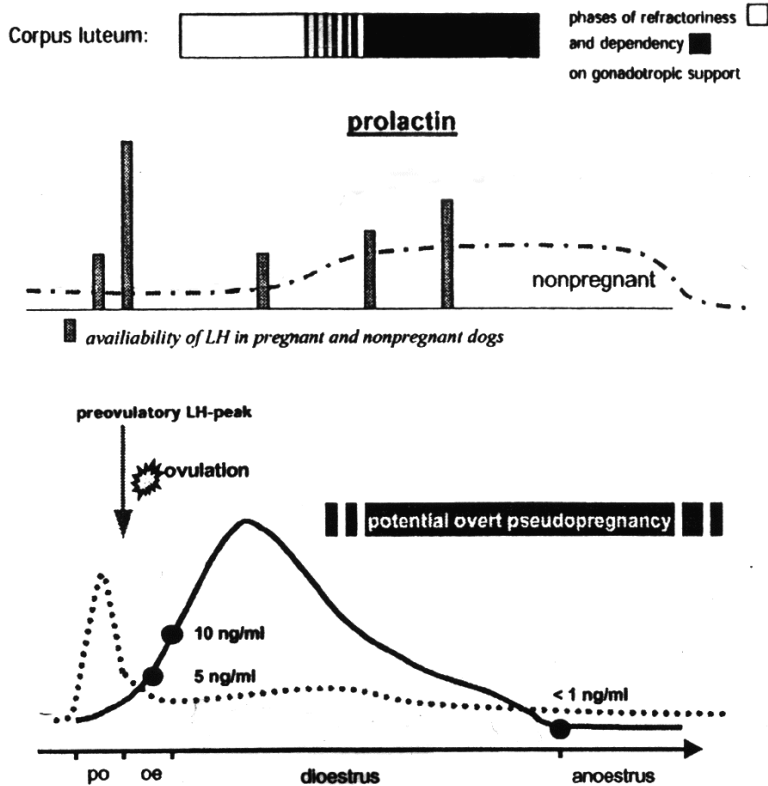


Abb. 2 Schematische Darstellung der Hormonprofile bei der ingraviden Hündin (aus HOFFMANN et al. 1999) für LH, Prolaktin (- - - - -), Östrogen (.....) und Progesteron (_____), po: Proöstrus, oe: Östrus

Die Ansprechbarkeit der Hypophyse auf GnRH verläuft in zwei Phasen; einer akuten Phase mit erhöhter GnRH- und infolge dessen erhöhter LH-Sekretion, und einer länger dauernden chronischen Phase mit einer verringerten bzw. basalen LH-Ausschüttung; letztere ergibt sich aus einer Downregulierung der GnRH-Rezeptoren an der Hypophyse (D'OCCHIO & ASPDEN 1999).

Die gleichzeitige Einwirkung von Östrogenen während der akuten Phase der GnRH-Sekretion hat eine Erhöhung der Anzahl der GnRH-Rezeptoren auf den gonadotropen Zellen zur Folge (Upregulation der Rezeptoren). Nur so kann es zur Induktion des die Ovulation auslösenden LH-Gipfels kommen. Progesteron wiederum hemmt durch Downregulation der Östrogenrezeptoren die Einwirkungsmöglichkeiten von Östrogenen, so dass während der Gelbkörperphase (Diöstrus) die Upregulation nicht zustande kommt (CLARK & MARKAVERICH 1988).

Bei den beiden Gonadotropinen LH und FSH handelt es sich um Glykoproteine. Sie werden unter GnRH-Einfluss in den gleichen basophilen Zellen der Adenohypophyse gebildet und aus diesen freigesetzt (DÖCKE 1994b).

GnRH hat in der Veterinärmedizin vor allem zur Stimulierung der Hypophysenvorderlappen-Gonadenachse als Arzneimittel Eingang gefunden. Verwendet werden dabei analog wirksame Verbindungen, die durch Peptidasen weniger stark angegriffen werden und damit eine längere Halbwertszeit aufweisen als endogenes GnRH (FUJINO et al. 1973).

LH bindet an spezifische Membranrezeptoren der Theca interna Zellen und der Granulosazellen. Nach Bindung des LH's an seine Rezeptoren wird durch Aktivierung der Adenylatcyclase die cAMP-Bildung in den Zellen verstärkt und die Proteinkinase aktiviert. Diese stimuliert wiederum die Proteinsynthese, aktiviert die Cholesterolesterase und fördert den Transport des Cholesterols in die Mitochondrien. Es reguliert auf diesem Wege die Biosynthese und Sekretion der Androgene, sowie die Bildung und Erhaltung des Corpus luteum (NISWENDER & NETT 1988).

FSH bindet an den Granulosazellen des Follikels, wo es für die Förderung der Eizellenreifung, die Proliferation der Granulosazellen, die Aromatisierung von Androgenen zu Östrogenen (Estradiol-17 β) und die Induktion von LH-Rezeptoren verantwortlich ist (DÖCKE 1994b). Dieses Zusammenspiel von Theka- und Granulosazellen stellt sicher, dass es zu der im Proöstrus auftretenden erhöhten Estradiolproduktion und damit über eine positive Rückkopplung zur Auslösung des präovulatorischen LH-Gipfels kommt. Dieser fördert die schnelle Endvergrößerung und Luteinisierung der sprungreifen Follikel und bewirkt post ovulationem die Anbindung der Progesteron sekretierenden Corpora lutea (CONCANNON et al. 1977).

Nach der Ovulation bildet sich vorwiegend aus den Granulosazellen eine einheitliche Population an großen Luteinzellen (30-40 μ M). Auch das Vorkommen von kleinen (2-5 μ M) sog. Theca-Luteinzellen wird beschrieben, die voneinander isoliert um die Kapillaren angeordnet sind (ANDERSEN & SIMPSON 1973)

Die positiv rückkoppelnde Wirkung von Östrogenen wurde erstmals von HOHLWEG (1934) beschrieben, der beobachtete, dass bei präpubertären Rattenweibchen durch die Verabreichung relativ hoher Östrogendosen eine vorzeitige Ovulation induziert werden konnte.

HAMMOND et al. (1942) zeigten später, dass dieser Effekt durch einen östrogenbedingten Anstieg der LH-Sekretion hervorgerufen wird.

Beim Hund findet der präovulatorische LH-Anstieg in Verbindung mit einem Progesteron-Anstieg null bis drei Tage nach dem Östrogenpeak statt (SMITH & McDONALD 1974, CONCANNON et al. 1975,1977, OLSON et al. 1982). Der Anstieg wird durch ein sinkendes Estradiol-17 β /Progesteron-Verhältnis ausgelöst (CONCANNON 1993).

Die beim Hund schon präovulatorisch ansteigenden Progesteronkonzentrationen wirken zunehmend negativ rückkoppelnd auf die übergeordneten Regelzentren (Hypothalamus, Hypophyse), durch die damit verbundene Downregulation der Östrogenrezeptoren im ZNS verliert auch Estradiol-17 β seine positiv rückkoppelnde Wirkung (s.o.), es wirkt ebenfalls zunehmend negativ rückkoppelnd. Daraus resultiert zunächst eine Hemmung der Freisetzung von GnRH und damit von LH und FSH.

Der kastrationsbedingte Wegfall der ovariellen Steroide führt deshalb zu einem erhöhten Basalplasmaspiegel von LH und FSH im Blut.

Neben Induktion der positiven und negativen Rückkopplungsmechanismen wirken die gonadalen Steroide in erster Linie auf die sekundären Geschlechtsorgane.

Folgen des Östrogeneinflusses sind: Hyperämie und Anschwellen der Vulva, Proliferation des Vaginalepithels mit Keratinisierung und Abstoßung der obersten Zellschichten, Schleimbildung an der Zervix und Hyperämie mit Wassereinlagerung, Verstärkung der Kontraktilität der Zervixmuskulatur.

Eine von den landwirtschaftlichen Nutztieren abweichende Besonderheit beim Hund liegt darin, dass die Ovarfunktion – ähnlich wie bei der Frau (HODGEN & ITSKOWITZ 1988) - offensichtlich unabhängig von einer uterinen PgF2a-Produktion verläuft, wie bei hysterektomierten Hündinnen gezeigt werden konnte (HOFFMANN et al. 1992). Weiterführende Untersuchungen haben bei der nicht graviden Hündin bisher keine Hinweise auf ein aktives luteolytisches Prinzip ergeben (HOFFMANN et al. 2004), die Lebensspanne der Corpora Lutea (CL) scheint daher in Abhängigkeit vom Alterungsprozess der Lutealzellen zu stehen (SONNACK et al. 2004).

Eine weitere Besonderheit stellen die bei der Hündin festgestellten luteotropen Mechanismen dar, auf die in Kap. 2.2 eingegangen wird.

2.2 Die Zyklusphasen der Hündin

Der Reproduktionszyklus des Haushundes wird allgemein als asaisonal-monöstrisch bezeichnet. Der Zyklus wird aufgrund verhaltensbiologischer, morphologischer und endokrinologischer Merkmale in unterschiedliche Phasen eingeteilt, wobei die hier getroffene Zuordnung in Proöstrus, Östrus, Diöstrus und Anöstrus die Einteilung nach FELDMANN und NELSON (1987) wiedergibt.

Proöstrus: Der Beginn des Proöstrus ist durch Ödematisierung der Vulva und das Auftreten von blutigem Ausfluss aus der Vulva gekennzeichnet. Die Hündin ist bereits in dieser Phase durch die Sekretion von Pheromonen für Rüden sexualattraktiv, duldet den Deckakt aber noch nicht. Die Dauer des Proöstrus wird in der Literatur mit 3-21 Tagen angegeben (CONCANNON et al. 1989) und geht mit dem Beginn der Sexualakzeptanz in den Östrus über.

Wie Abb. 2 zeigt, ist aus endokrinologischer Sicht der Proöstrus durch die Phase der follikulären Östrogenproduktion gekennzeichnet.

Östrus: Endokrinologisch markiert der präovulatorische LH-Gipfel den Wechsel vom Proöstrus zum Östrus (PHEMISTER et al. 1973). Ausgehend vom Verhalten der Hündin deckt der Östrus die Phase der Deckbereitschaft ab. Der Östrus dauert im Mittel 9 Tage. In dieser Phase zeigt sich anfangs ein gelb-rötlicher Vaginalausfluss von wässriger Konsistenz, der im weiteren Verlauf nachlässt oder vollständig versiegt. Neben dem präovulatorischen LH-Gipfel ist der Östrus durch steigende Progesteronkonzentrationen im Plasma gekennzeichnet. Diese liegen nach JOHNSTON et al (2001a) bei, angegeben als $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $1,37 \pm 0,1$ ng/ml am Tag des LH-Gipfels, $5,4 \pm 0,6$ ng/ml drei Tage später am Tag der Ovulation und 34,9 ng/ml zu Beginn des Diöstrus neun Tage nach dem LH-Gipfel. Nachdem am Tag der Ovulation Progesteronwerte zwischen 4-10 ng/ml gemessen werden können, sprechen Progesteronwerte von ca. 8-12 ng/ml für den Zeitraum zwei Tage danach, an dem optimale Konzeptionschancen bestehen (JOHNSTON et al. 2001a).

Diöstrus: Der sich anschließende Diöstrus beginnt mit dem ersten Tag fehlender Deckbereitschaft. Eine wesentliche tierartspezifische Besonderheit ist die Dauer des Diöstrus von 60-90 Tagen (STABENFELDT & SHILLE 1977), die damit die Dauer der Gravidität (63 ± 2 Tage) noch übersteigt. Der Diöstrus endet definitionsgemäß mit den Abfall der Progesteronkonzentration im Blut unter 1 ng/ml (CONCANNON 1989).

Wie aus Abb. 2 ersichtlich, müssen die sich entwickelnden CL zunächst als gonadotropinunabhängig angesehen werden, danach gewinnen LH und vorwiegend Prolaktin Bedeutung als luteotrope Faktoren (Übersicht bei HOFFMANN et al. 1996). Die Biosynthese des Glykoproteins LH erfolgt an den Ribosomen. Zuerst entsteht ein Prä-pro-Hormon, das später zum Prohormon, der häufigsten Speicherform, umgewandelt wird. Beide haben allerdings keine bzw. nur eine sehr geringe biologische Aktivität. Die enzymatische Umwandlung in die biologisch aktive Form erfolgt während des Sekretionsprozesses. Das Hormon setzt sich aus zwei nicht kovalent verbundenen Proteinketten zusammen, die als α - bzw. β -Untereinheiten bezeichnet werden, wobei nur die β -Untereinheit hormonspezifisch konfiguriert ist. Die Sekretion erfolgt wie bei allen Hormonen der Adenohypophyse episodisch (DÖCKE 1994b).

Die Verfügbarkeit von LH im Diöstrus, beschrieben als AUC (area under the curve), korrelierte negativ mit den Progesteronkonzentrationen ($r = -0,955$); so war im späten Diöstrus und frühen Anöstrus signifikant mehr LH verfügbar als direkt post ovulationem und im frühen Diöstrus ($p < 0,05$) (HOFFMANN et al. 1996).

Die während des größten Teil des Diöstrus gemessenen niedrigen LH-Basalwerte werden durch eine pulsatile, zyklusabhängige Ausschüttung von LH überlagert (CONCANNON 1993, HEGSTAD et al. 1993, JEFFCOATE 1993).

So bestimmten HOFFMANN und SCHNEIDER (1993) die Pulsrate während des Proöstrus mit 0,45 Pulsen/60 min, für den Diöstrus ergaben sich Werte zwischen 0,22 und 0,28 Pulsen/60 min.

Bei dem beim Hund auch gonadotrop wirksamen Prolaktin handelt es sich um ein Proteohormon, welches aus 200 Aminosäuren mit 3 Disulfidbrücken besteht (RIJNBEEK 1996). Seine Biosynthese erfolgt vorwiegend in den laktotropen Zellen der Adenohypophyse. Die Verfügbarkeit von Prolaktin wird vom Hypothalamus gesteuert. Eine wichtige Rolle kommt dabei dem Prolactin-inhibiting-factor (PIF) zu, bei dem es sich um das Catecholamin Dopamin handelt. Die Zellmembran der laktotropen Zellen enthält Dopamin-Rezeptoren, die hemmende Wirkung des Dopamins auf die Freisetzung wie auch auf die Synthese des Prolaktins beruht auf einer Reduzierung der cAMP-Bildung (DÖCKE 1994c).

Prolaktin zeichnet sich weiter durch seine pulsatile Ausschüttung aus, wobei große Unterschiede zwischen den einzelnen Zyklusstadien bestehen. Ein Anstieg ist in der zweiten Hälfte des Diöstrus bei nicht graviden Hündinnen, insbesondere aber bei graviden Hündinnen zu beobachten, welcher sich zu sehr hohen Plasmaspiegeln während der Laktation ausweit.

Als wichtigsten luteotropen Faktor haben OKKENS et al. (1990) und ONCLIN und VERSTEGEN (1997a) das Prolaktin beschrieben. Sowohl Prolaktin als auch LH steigen als luteotrope Faktoren, negativ korrelierend mit Progesteron, in der zweiten Hälfte des Diöstrus an (GRÄF 1978, OLSCHESKI 1987, HOFFMANN & SCHNEIDER 1993, ONCLIN & VERSTEGEN 1997b).

Anöstrus: Der Anöstrus weist eine sehr variable Zeitspanne von 1 bis 9 Monaten auf. Diese Phase wird aufgrund fehlenden Sexualverhaltens sowie weitgehend basaler Estradiol-17 β - und Progesteronspiegel als Periode der Sexualruhe angesehen (OETTEL 1979).

Beim Haushund kann davon ausgegangen werden, dass der dem Diöstrus folgende Anöstrus nicht saisonal sondern autonom-endokrin gesteuert wird (KLEIN et al. 2003).

Die hormonelle Situation bei der Hündin beim Übergang vom Diöstrus in den Anöstrus ist dadurch gekennzeichnet, dass bei auf unterem diöstrischem Niveau verlaufenden Estradiol-17 β Konzentrationen die bis zum Ende des Diöstrus angestiegene Verfügbarkeit von LH plötzlich nicht mehr gegeben ist (HOFFMANN et al. 1996, RIESENBECK 1997). So ermittelten HOFFMANN et al (1996) im späten Diöstrus für LH Basalwerte ($\bar{x} \pm SD$) von $16,3 \pm 5,4$ ng/ml mit einer maximalen Pulsamplitude von $70,0 \pm 20,0$ ng/ml, im frühen Anöstrus war der Basalwert auf $9,6 \pm 1,4$ ng/ml mit einer maximalen Pulsamplitude von $32,6 \pm 17,2$ ng/ml abgefallen.

Da Progesteron in dieser Phase auf <1 ng/ml Plasma abgefallen ist, kann dieser Abfall nicht mehr auf eine negativ rückkoppelnde Wirkung von Progesteron zurückgeführt werden.

Vielmehr scheint eine erhöhte Sensibilisierung des Hypothalamus-Hypophysensystems auf die negativ-rückkoppelnde Wirkung von Estradiol-17 β vorzuliegen, wie KLEIN et al. (2003) zeigen konnten.

Im Hinblick auf die Terminierung des Anöstrus zeigte sich, dass die Konzentrationen immunreaktiven FSH's vor denen von LH ansteigen (OLSON et al. 1982, CONCANNON 1993, KOOISTRA et al. 1999a, TANI et al. 1999). In diesem Zusammenhang berichten HOFFMANN et al. (1996) über große individuelle Variationen hinsichtlich des zeitlichen Beginns der LH- Freisetzung, wobei zum Teil ein Anstieg auf prä-proöstrische Werte bereits in der Mitte des Anöstrus beobachtet wurde. Nach VAN HAAFTEN et al. (1994) weist der Hypophysenvorderlappen im späten Anöstrus eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber GnRH auf, eine Mehrfachbehandlung mit GnRH (CAIN et al. 1989, CONCANNON 1989, INABA et al. 1998) oder Gonadotropinen (eCG+hCG, LH, FSH) (SHILLE et al. 1984, WEILENMANN et al. 1993, VERSTEGEN et al. 1997) im späteren Anöstrus führte zu dessen Terminierung. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich nach Anwendung des Dopaminagonisten Bromocriptin, wobei die Wirkung weniger in der

Suppression der Prolaktinfreisetzung als vielmehr in einer Erhöhung der basalen FSH-Sekretion gesehen wird (OKKENS et al. 1997a; KOISTRA et al. 1999b). Auch durch Anwendung von Östrogenen konnte der späte Anöstrus terminiert werden (BOUCHARD et al. 1993). Entscheidend für das Eintreten eines fertilen Östrus bei der Hündin ist jedoch die Tatsache, dass durch Estradiol-17 β der zur Freisetzung des präovulatorischen LH-Gipfels notwendige positive Feedback ausgelöst wird. Wie KLEIN et al. (2003) berichten, scheint es sich hierbei um ein sehr enges Zeitfenster am Ende des Anöstrus zu handeln. Der Effekt scheint an die volle follikuläre Funktionsfähigkeit gebunden zu sein, d.h. dass neben Estradiol-17 β auch das andere Spektrum follikulärer Wirkstoffe bereitsteht.

Insgesamt weisen diese Befunde die neuroendokrine Steuerung des Zyklus der Hündin als ein sehr komplexes Geschehen aus, wobei gleichzeitig die Stellung von GnRH als ein zentraler Regelfaktor deutlich wird.

2.3 Möglichkeiten der Manipulation des Reproduktionszyklus bei der Hündin

Im Vordergrund stehendes Ziel dieser Maßnahme ist die Unterbindung der Fortpflanzungsfähigkeit.

Als einzige praxisreife Verfahren stehen dafür zur Zeit die Ovarioektomie bzw. Ovariohysterektomie und die Behandlung mit Gestagenen zur Verfügung

2.3.1 Gonadektomie der Hündin

Die Ovarioektomie hat insbesondere bei jüngeren, nulliparen Hündinnen die früher generell praktizierte Ovariohysterektomie weitgehend verdrängt (OKKENS et al. 1997b). Beide Methoden beinhalten jedoch eine „Organentfernung“, eine Maßnahme, die nach § 6 Abs. 1 Tierschutzgesetz grundsätzlich verboten ist. Soweit keine medizinischen Indikationen vorliegen (z.B. Ovariumtumor, Pyometra) muss demnach die Ovario(hyster)ektomie mit der Ausnahmeregelung des § 6 Abs. 1 Tierschutzgesetz begründet werden. Die dort genannten Indikationen „Verhinderung der unkontrollierten Fortpflanzung“ und „Unfruchtbarmachung zur weiteren Nutzung und Haltung“ gestatten

zwar eine weite Auslegung, eine nachvollziehbare Begründung ist jedoch trotzdem unumgänglich.

Bei der Ovario(hyster)ektomie handelt es sich um einen operativen Eingriff, der unter Allgemeinanästhesie durchgeführt wird und demnach mit einer nicht zu unterschätzenden Belastung verbunden sein kann. Dies gilt insbesondere für Tiere mit vorgeschädigten Organsystemen (Herz-Kreislauf, Leber, Niere), so dass im Hinblick auf das Risiko einer Operation die Anwendung alternativer Methoden einer sorgfältigen Abwägung bedarf.

2.3.2 Anwendung von Gestagenen

Progestagene wirken wie endogenes Progesteron negativ rückkoppelnd. Wie aus Abb. 1 (s. Kap 2.1) hervorgeht, zeigt sich dies in einer Hemmung der GnRH-Freisetzung und damit nachgeordnet in einer Hemmung der LH- und FSH-Freisetzung. Daraus resultiert eine Hemmung der Ovarfunktion, die zum präovulatorischen LH-Gipfel und der Ovulation führenden Vorgänge finden nicht mehr statt.

Unter physiologischen Bedingungen zeigt sich diese Hemmung von Hypothalamus und Hypophyse in der frühen Phase des Diöstrus, in der bei der Hündin bei hohen endogenen Progesteronwerten eine reduzierte LH-Freisetzung festgestellt wurde (HOFFMANN & SCHNEIDER 1993)

Als Tierarzneimittel zur Anwendung beim Hund derzeit in Deutschland zugelassene Progestagene sind Medroxyprogesteronazetat (MPA) und Proligeston in Form von Depotpräparaten. Präparatebeispiele und die entsprechenden Dosierungen sind in Tab. 1 zusammengefasst. Mit Ausnahme des Proligestons (VAN OS & OLDENKAMP 1978) müssen unten aufgeführten Präparate strikt im Anöstrus verabreicht werden, um unerwünschte Wirkungen, vor allem Metropathien, auf ein Minimum zu reduzieren.

Tab. 1: Progestagenderivate und ihre Dosierungen zur Läufigkeitsunterdrückung bei der Hündin

Progestagen-derivat	Präparatebeispiel	Dosierung mg/kg	Injektionsabstände
Medroxy- progesteronazetat	Supprestal ® (Selectavet)	2-3	alle 5 Monate
Proligeston	Delvosteron ® (Intervet)	12-30	alle 3-4-5 Monate

Folgende unerwünschte Wirkungen können je nach Präparat auftreten: Läufigkeitsdurchbrüche, Metropathien, gesteigerter Appetit und Gewichtszunahme, Mattigkeit, Akromegalie, Mammatumorbildung, lokale Hautreaktionen (Haarverlust und Hautatrophie), Polydipsie. (COX 1970, WITHERS & WHITNEY 1967, EVANS & SUTTON 1989, JOHNSTON et al. 2001b).

Das Wiederauftreten der nächsten Läufigkeit nach einer letzten Behandlung kann zeitlich nicht genau eingeschätzt werden, und eine Bedeckung ist nicht immer sofort erfolgreich, so dass die Anwendung von Progestagenen bei Zuchthündinnen eher kontraindiziert ist.

2.3.3 Anwendung von Androgenen

Miboleron, ein in den USA zugelassenes synthetisches Androgen, wird zur Östruskontrolle eingesetzt (JOHNSTON et al. 2001b). Es ist eine oral einsetzbare androgen wirksame Verbindung, deren Wirkung ebenfalls primär auf ihrem antigonadotropen Effekt beruht. Von Vorteil ist das Freisein von Nebenwirkungen, die den Uterus betreffen, jedoch löst Miboleron häufig Hypertrophie der Klitoris, vaginalen Ausfluss, abnormales Sexualverhalten, übel riechenden Körpergeruch und Adipositas aus (EVANS & SUTTON 1989, SOKOLOWSKI & GENG 1977).

2.3.4 Weitere Möglichkeiten zur Unterdrückung der Ovarfunktion

Theoretisch können folgende Verfahren in Betracht gezogen werden (RIESENBECK et al. 2002):

- Hypophysektomie
- Vakzinierung gegen LH
- Anwendung von Dopamin-Agonisten
- Ausschaltung der GnRH-Wirkung

Hypophysektomie

Im Rahmen wissenschaftlicher Untersuchungen wurde auch bei der Hündin eine operative Entfernung der Hypophyse durchgeführt. Erste Erkenntnisse über die „Autotomie“ der Corpora lutea im ersten Drittel ihrer Lebensspanne ergaben sich aus diesen Untersuchungen (CONCANNON 1980, OKKENS et al. 1986)

Vakzinierung gegen LH

Nachdem WIDE und NEWTON (1971) eine Kreuzreaktivität eines gegen hCG gerichteten Antiserums mit humanen- und anderen primaten-Gonadotropinen beschrieben, versuchten AL-KAWAWI et al. (1974) mittels Immunisierung gegen hCG eine Zyklusbeeinflussung bei der Hündin zu bewirken; das Ergebnis war jedoch negativ, da offensichtlich keine ausreichende Kreuzreaktion bestand.

CONCANNON et al. (1987) verabreichten Hündinnen am Tag 42 des Zyklus ein equines Anti-LH-Serum. Durch eine Einzelinjektion wurde der Plasma-Progesterongehalt auf 24 bis 7 % der Werte vor der Injektion reduziert. Nachteilig war, dass die Antikörper durch die ständige Nachproduktion von LH zu schnell aufgebraucht wurden.

Anwendung von Dopamin-Agonisten

Wie in Kap 2.2 beschrieben, kommt dem Prolaktin ab dem ca. 2. Drittel des Diöstrus eine wichtige luteotrope Funktion zu (s. Abb. 2).

Nach Hemmung der Prolaktinfreisetzung durch Behandlung mit Dopaminagonisten (Bromocriptin, Cabergolin) sind die entsprechenden Ausfallserscheinungen zu erwarten.

CONCANNON et al. (1987) verabreichten Bromocriptin über 6 Tage an gravide Hündinnen, beginnend an Tag 8, 22 und 42 der Gravidität ; entsprechend wurden ingravide Hündinnen ab dem Tag 42 behandelt. Bei allen Hündinnen ergab sich eine verminderte Progesteronsekretion, der Effekt war jedoch an den Tagen 22 (Abfall der Progesteronkonzentrationen auf 10 % der Ausgangswerte) und 42 (Abfall auf $P4 < 2 \text{ ng/ml}$) besonders stark ausgeprägt. Nur bei ab Tag 42 behandelten Tieren trat ein Abort ein, die anderen Hündinnen gebaren normale Welpen. Als Nebenwirkungen traten meist innerhalb von drei Stunden nach der Behandlung Erbrechen, Abgeschlagenheit, Inappetenz und Polydipsie auf.

JÖCHLE et al. (1989) verabreichten eine relativ geringe Dosis von Cabergolin (5 µg/kg/d) über fünf Tage bei Pseudogravidität, Gravidität und verlängertem Interöstrus-Intervall. Ergebnisse waren vollständiger Abort in der zweiten Graviditätshälfte, Eintritt des Östrus bei verlängertem Zyklus mit darauffolgender Fertilität, jedoch keine Verkürzungen normaler Zyklen.

Über eine Verkürzung der Interöstrus-Intervalle (von $245,9 \pm 8,8$ auf $123,3 \pm 23,1$ Tage) berichten OKKENS et al. (1985), die ab Beginn der lutealen Phase bis zum Eintreten des nächsten Proöstrus bzw. zum Ende der lutealen Phase des folgenden Zyklus täglich 250 µg Bromocriptin verabreichten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Hemmung des luteotropen Faktors Prolaktin lediglich zu einer Supression der Corpus luteum – Funktion in den letzten beiden Dritteln des Diöstrus führt, die Möglichkeit einer Zykluskontrolle im Sinne einer Hemmung der Ovulation ist damit nicht gegeben.

Ausschaltung der GnRH-Wirkung

Hier ergeben sich drei methodische Ansatzpunkte:

1. Immunisierung gegen GnRH
2. Anwendung von GnRH-Antagonisten
3. Anwendung von GnRH-Agonisten mit dem Ziel einer Downregulation

Eine Übersicht über die Grundlagen der genannten drei Möglichkeiten findet sich bei SCHALLY et al. (1980).

1.) Immunisierung gegen GnRH

Über die Entwicklung einer antifertilen GnRH-Vakzine zur Anwendung bei Hund und Katze berichten LADD et al. (1994). Bei Rüden ließ sich durch eine dreimalige Injektion eines an Tetanustoxoid konjugierten GnRH-Analogons im Abstand von je zwei Wochen eine Immunisierung erreichen, die bei allen Tieren zu erniedrigten Serum-Testosteron-Werten führte, aber nur bei einigen Rüden waren die Werte vergleichbar mit denen von kastrierten Rüden. Histologisch konnte eine testikuläre Atrophie festgestellt werden. Eine Reimmunisierung bei wiederkehrenden hohen Testosteronspiegeln konnte erfolgreich durchgeführt werden, Angaben zur Reversibilität der beobachteten Effekte nach längerer Anwendung wurden nicht gemacht.

In Australien ist bereits eine GnRH-Vakzine (Vaxtrate®) zugelassen, die ursprünglich zur Anwendung bei Färsen zur Verhinderung einer Gravidität entwickelt worden war (HOSKINSON et al. 1990).

BROWN et al. (1994) testeten diese Vakzine an jungen Schafböcken, GODFREY et al. (1996) an Ziegenböcken. In beiden Fällen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Hodengröße, die bei den Ziegen sogar bis zu 394 Tagen nach der zweiten Immunisierung (zwei bis vier Wochen nach Erstinjektion) anhielt. Sowohl die Geruchskomponente als auch die Plasmakonzentrationen von LH, FSH und Testosteron waren 56 Tage nach der Erstinjektion vermindert.

DUNSHEA et al. (2001) berichten zur ebenfalls in Australien zugelassenen GnRH-Vakzine Improvac®, dass nach Immunisierung intakter Eber ein 92%-iger Abfall der Serum-Testosterongehalte auf unter 2 ng/ml beobachtet wurde. Der typische Geschlechtsgeruch, gemessen an Androstenon und Skatol, war in allen Fällen im niedrigen bzw. nicht messbaren Bereich. Die Vakzine erlaubt eine Produktion von schweren Ebern mit verbesserter Fleischqualität bei gleichzeitiger Verhinderung des unerwünschten Geschlechtsgeruches.

ZENG et al. (2002) immunisierten weibliche chinesische Schweine gegen GnRH. Die bei 10 von 12 Schweinen erfolgreiche Immunisierung hatte Reduktion der Serum-LH Werte zur Folge ($p < 0,05$) im Vergleich zu intakten Kontrolltieren. Ebenso verbesserte sich die tägliche Gewichtszunahme bei den immunisierten Tieren im Vergleich zu den unkastrierten Kontrolltieren, dieser Effekt war allerdings statistisch nicht signifikant.

2.) Anwendung von GnRH-Antagonisten

BINT AKHTAR et al. (1984) konnten nach einer Dosisfindungsstudie bei kastrierten männlichen Makaken-Affen durch tägliche Injektionen von 5 mg eines GnRH-Antagonisten (Org 30276) über 9 Wochen bei intakten männlichen Affen einen sofortigen Rückgang des Serum-Testosterons und - LH's beobachten. Die Suppression dieser beiden Hormone war während des Behandlungszeitraumes fortbestehend, das Hodenvolumen nahm ab und es konnten keine oder allenfalls tote Spermien nachgewiesen werden. Diese Veränderungen waren nach Behandlungsende reversibel. Die Effekte konnten allerdings nur bei drei von fünf Affen beobachtet werden. Zwei der Affen zeigten auch nach Verdopplung der Dosis über weitere acht Wochen keine Suppression.

VICKERY et al. (1989) konnten bei Hündinnen durch tägliche Injektionen des GnRH-Antagonisten Detirelix in einer Dosierung von 300 µg/kg über 7-14 Tage nach Auftreten der ersten Proöstrussympptome eine Rückkehr zum zytologischen Anöstrus innerhalb von 2 Tagen erreichen. Nach durchschnittlich 37 Tagen begann ein neuer fertiler Zyklus. Darüber hinausgehende Untersuchungen zur Anwendung von GnRH-Antagonisten bei Haustieren konnten nicht gefunden werden.

3.) Anwendung von GnRH-Agonisten

Ziel der Anwendung von GnRH-Agonisten ist die Downregulation von LH zur Unterdrückung der hormonellen Sexualfunktionen.

Das der Downregulation zugrunde liegende Prinzip beruht auf der Fähigkeit des GnRH's, seine eigenen Rezeptoren zu regulieren; bei der pulsatischen Freisetzung des Hormons wird die Bildung von dessen Rezeptoren induziert (Upregulation), wohingegen die Zahl der Rezeptoren bei kontinuierlicher Exposition gegenüber GnRH abnimmt (Downregulation) (FERLAND et al. 1981, CLAYTON 1982, JEGOU et al. 1985)

In der Humanmedizin werden GnRH-Analoga routinemäßig zur Behandlung des Prostatakarzinomes, des Mammakarzinomes bei prae- und perimenopausalen Frauen, zur Behandlung der Endometriose und zur Vorbereitung auf die „In Vitro Fertilisation“ eingesetzt. Zur Anwendung kommen z.B. Buserelin, Triptorelin, Leuprorelin, Goserelin und Nafarelin. (BORGSMANN et al. 1982, FLEMING et al. 1982, KLIJN & DE JONG 1982, LEMAY & QUESNEL 1982)

Hinsichtlich der Anwendung beim Rüden berichteten 1984 TREMBLAY und BÉLANGER, dass nach täglicher Behandlung mit einem GnRH-Analogen ([D-Tryp⁶]LHRH Ethylamid) die Hoden- und Prostatagewichte um 40 bis 60% sanken. Nach vier Wochen Behandlung konnte kein Ejakulat mehr gewonnen werden. Die Effekte waren vollständig reversibel. Die Spermatogenese war vier Monate nach Behandlungsende wieder physiologisch, Hoden und Prostata hatten nach ca. 26 Wochen wieder ihr Ausgangsgewicht erreicht.

RIESENBECK et al. (2002) zeigten, dass durch eine einmalige Implantation von 6,6 mg Buserelin (Profact ®) eine reversible nicht-chirurgische Kastration beim Rüden möglich ist. Nach anfänglicher Stimulation kam es nach 15 Tagen zum Abfall der Testosteron- und Estradiol-17 β -Werte im Blutplasma auf Basalniveau. Die Ausgangswerte wurden erst wieder nach durchschnittlich 233 Tagen erreicht. In dieser Zeit verringerte sich sowohl die Hoden- als auch die Prostatagröße. Nach spätestens 41 Tagen konnte kein Ejakulat mehr gewonnen werden. Die beobachteten Veränderungen waren reversibel.

TRIGG et al. (2004) kamen zu ähnlichen Ergebnissen nach Anwendung des GnRH-Agonisten Deslorelin.

Auch bei der Hündin wurden Untersuchungen zur Downregulierung mit verschiedenen GnRH-Analoga durchgeführt. Ein Problem bei allen Ansätzen war jedoch die fast immer auftretende Induzierung eines Östrus innerhalb von ein bis zwei Wochen nach Behandlungsbeginn.

MC RAE et al. (1985) verabreichten das GnRH-Analagon Nafarelin in der ersten Woche des Proöstrus via subkutan implantierter osmotischer Minipumpen, die je nach Füllung im Abstand von 2-4 Wochen entfernt und erneuert werden mussten. Bei allen Hunden trat der

ausstehende Östrus zum erwarteten Zeitpunkt auf. Eine Dosierung von 2 µg je Tier und Tag hatte keinen Effekt auf den weiteren Zyklusablauf, Dosierungen von 8 und 32 µg je Tier und Tag bewirkten eine signifikante Reduktion der Progesteronwerte in dem dem Östrus folgenden Diöstrus, eine über den Behandlungszeitraum hinausgehende Suppression der Ovarfunktion von 18 Monaten ergab sich jedoch nur bei den mit 32 µg pro Tag behandelten Tieren. Bei den so behandelten Tiere zeigten sich erst zwischen 3 und 18 Wochen nach Behandlungsabbruch erneut Östrussympptome. Diese Untersuchungen zeigten auch, dass bei Behandlungsbeginn im Proöstrus und nachfolgender Belegung eine normale Gravidität ausgetragen werden kann. Bei Behandlungsbeginn im späten Diöstrus bzw. frühen Anöstrus wurde jeweils eine Läufigkeit induziert, wobei sich nachfolgend ein normaler und zwei verkürzte Zyklusverläufe ergaben.

CONCANNON et al. (1988), die nach einer Dosisfindungstudie an ovarioektomierten Hündinnen das GnRH-Analogon RS49947 (Syntex Research) bei 4 bis 5 Monate alten präpubertären Hündinnen einsetzten, konnten während des Behandlungszeitraumes von 12 Monaten keinen Östrus beobachten. Nach Behandlungsende dauerte es bis zum Auftreten des ersten Östrus noch weitere 1-6 Monate.

VICKERY et al. (1989) verabreichten in monatlichen Abständen ein hochwirksames GnRH-Analogon ([D-Trp6,Pro9NHet]LHRH) an präpubertäre 10-11 Monate alte Hündinnen. Bei drei Tieren trat innerhalb von einer Woche nach Behandlungsbeginn ein Östrus auf; ein Phänomen, das während des weiteren Behandlungszeitraumes von einem Jahr nicht mehr beobachtet wurde. Alle Tiere kamen innerhalb von 8 Monaten nach Abbruch der Behandlung in den Östrus. Es konnten keine, die Fertilität betreffenden Spätfolgen beobachtet werden, da alle Hündinnen im ersten bzw. zweiten Östrus nach Behandlungsende erfolgreich bedeckt werden konnten und aufnahmen. Die Kontrolltiere kamen mit 11,5 Monaten zum erstem Mal in den Östrus, der nächste folgte nach sieben Monaten.

Andere GnRH-Analoga, wie z.B. Azagly-Nafarelin, kamen bei RUBION et al. (2004) zum Einsatz. Ein mit 18 mg Wirkstoff bestücktes Implantat wurde 4-5 Monate alten Beagle-Hündinnen eingesetzt und verhinderten das Eintreten der Pubertät im Vergleich zu den Kontrolltieren, die nach durchschnittlich 11,9 Monaten in den ersten Östrus kamen.

Nach Entfernung der Implantate folgte der erste Östrus bei 5 von 10 Hündinnen im Alter von 18-22 Monaten (bei Veröffentlichung war der Versuch noch fortdauernd).

Auch nach Anwendung des GnRH-Agonisten Deslorelin konnten TRIGG et al. (2004) bei 4 Monate alten Hündinnen das Eintreten der Pubertät verhindern, bei 7 Monate alten Hündinnen dagegen zeigte sich auch hier ein vorzeitiges Auftreten der ersten Läufigkeit.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere¹ und Haltung

Die Untersuchungen wurden an neun 3-6 Jahre alten Beaglehündinnen durchgeführt. Die Hündinnen wurden in Dreiergruppen in überdachten Außenboxen gehalten. Sie wurden einmal täglich mit einer Mischung aus handelsüblichem Trockenfutter und Dosenfutter versorgt. Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

Die Hunde bekamen nach den Blutentnahmen „Hundebiscuits“ zugefüttert.

Vor Versuchsbeginn wurden die Hunde einer klinischen Allgemeinuntersuchung und speziellen gynäkologischen Untersuchung unterzogen. Es wurden nur klinisch allgemein- und geschlechtsgesunde Tiere in den Versuch aufgenommen und den weiteren Untersuchungen zugeführt.

Die Hündinnen wurden während der gesamten Versuchsdauer regelmäßig auf ihren allgemeinen Gesundheitszustand untersucht, gleichzeitig wurden die Applikationsstellen der Implantate adspektorisch und palpatorisch untersucht.

3.2 Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung

3.2.1 Versuchsaufbau

Ziel vorliegender Untersuchungen war es, den Effekt der Downregulation bei der Hündin darzustellen und weitere Informationen über Dosis- Wirkungsbeziehungen zu erhalten, wozu drei Dosisgruppen gebildet wurden (Gruppen 1, 2 und 3).

¹ Es handelte sich um ein anzeigepflichtiges Vorhaben gemäß § 8 Abs. 7 in Verbindung mit § 8 a Tierschutzgesetz. Die Genehmigung wurde durch das Regierungspräsidium Gießen mit dem AZ II 25.3-19 c 20/15 c, GI 18/14-20/99 erteilt.

Nachdem eine Downregulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren primär zu einem Rückgang der Gonadotropinsekretion führt, sollte dieser Effekt anhand der Erfassung von LH im peripheren Blut dargestellt werden (s. Kap. 3.2.3). Die Untersuchungen wurden an kastrierten (ovario-hysterektomierten) Tieren durchgeführt, um negativ rückkoppelnde Effekte gonadaler Steroide auf die Hypophysenfunktion ausschließen zu können. Der erwartete Anstieg der LH-Werte nach der Kastration wurde als ein Zeichen der Intaktheit der Hypothalamus-HVL-Gonadenachse gewertet. Zur sicheren Darstellung dieses Effektes wurde die Ovariohysterektomie während der Phase des Diöstrus durchgeführt, in der aufgrund der aktiven Progesteronsekretion der negativ-rückkoppelnde Effekt besonders deutlich ausgeprägt sein sollte.

Die Tiere dienten als ihre eigenen Kontrollen, d.h. die LH-Freisetzung wurde sowohl vor als auch nach Durchführung der Ovariohysterektomie charakterisiert, das Wirkungsende der Buserlinbehandlung wurde als erreicht bezeichnet, wenn die post castrationem gemessenen LH-Werte wieder den LH-Ausgangswerten vor der Behandlung entsprachen.

Versuchsabschnitt A

Dieser Abschnitt umfasste die Zeitspanne von der Übernahme der Tiere bis zur Verabreichung der Implantate 42 Tage nach der Ovariohysterektomie. Die Definition des Zyklusstandes und die Zuordnung in die Phase des Diöstrus erfolgte mittels Progesteronbestimmungen im Blut. Soweit zutreffend, kam während des Proöstrus und Östrus auch die Vaginalzytologie zur Anwendung.

Zur Erfassung des Kastrationseffektes erfolgte in diesem Versuchsabschnitt die Charakterisierung der LH-Freisetzung (s.Kap.3.2.3) mindestens 10 Tage vor der Ovariohysterektomie sowie 21 und 35 Tage nach der Ovariohysterektomie (Zeitfenster 1, 2 und 3). Dazu wurde wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben vorgegangen.

Versuchsabschnitt B

Dieser Abschnitt umfasste die Zeitspanne von der Applikation des GnRH-Implantates bis Versuchsende.

Die Verabreichung der Buserelinimplantate erfolgte nach einer postoperativen Erholungsphase von 42 Tagen. Die weiteren Zeitfenster zur Charakterisierung der LH-Freisetzung ergaben sich wie folgt:

- | | |
|-----------------|--------------------------------|
| 4. Zeitfenster: | 14 Tage nach Behandlungsbeginn |
| 5. Zeitfenster: | 28 Tage nach Behandlungsbeginn |
| 6. Zeitfenster: | 42 Tage nach Behandlungsbeginn |

Weitere Zeitfenster folgen im Abstand von 4 Wochen bis die LH-Werte wieder das Ausgangsniveau vor Behandlungsbeginn erreicht hatten. Dabei wurden unabhängig von der Dosierung die Tiere aller Gruppen einer gleich langen Beobachtungsdauer unterworfen.

Die Abstände zwischen den Zeitfenstern waren so gewählt worden, dass bei Sicherstellung des notwendigen Informationsgewinnes die Belastung der Hunde durch die Katheterisierungen (Kap 3.2.3) im verträglichen Bereich blieb und somit das Allgemeinbefinden der Tiere nicht beeinflusst wurde.

3.2.2 Versuchsdurchführung

3.2.2.1 Bestimmung des Zyklusstandes der einzelnen Hündinnen

Aufgrund klinischer Beobachtungen konnte festgestellt werden, dass sich keine der Hündinnen zum Zeitpunkt der Übernahme in der Phase des Proöstrus oder Östrus befand. Zur weiteren Charakterisierung der Ovarfunktion durch Progesteronmessungen im Blut erfolgten die Probenentnahmen zunächst in 4-tägigem Abstand; die Frequenz wurde auf tägliche Blutentnahmen während des Östrus erhöht, um den Progesteronanstieg und daraus resultierend den Ovulationszeitpunkt feststellen zu können. Dabei galt, dass die Ovulation durch einen Progesteronwert von $> 5 \text{ ng/ml}$ ($15,9 \text{ nmol/l}$) Plasma angezeigt wurde (CONCANNON et al. 1989). Bei drei Hündinnen zeigten die initialen hohen

Progesteronwerte, dass sich diese bereits in der Phase des Diöstrus befanden; sie wurden ohne das Abwarten einer erneuten Läufigkeit sofort in den Versuch aufgenommen.

Tab. 2 zeigt das Alter der in den Versuch aufgenommenen Tiere, den Progesteronwert und das Zyklusstadium bei Übernahme der Tiere, den Zeitpunkt der Ovulation sowie den Progesteronwert zum Zeitpunkt der Ovariohysterektomie.

Tab. 2: In den Versuch aufgenommene Hündinnen; Alter und Zykluscharakteristik

Hund	Alter (Jahre)	P4 bei Aufnahme ng/ml	Zyklusstand bei Übernahme	Ovulation	P4 bei OHE ng/ml
Maja	3	0,75	Anöstrus	19.05.99	33,87
Flo	4	0,69	Anöstrus	24.05.99	58,67
Ela	3	35,4	Diöstrus	n.f. ¹⁾	25,36
Lilli	6	40,4	Diöstrus	n.f. ¹⁾	29,98
Oda	3	0,41	Anöstrus	04.08.99	27,03
Fox	3	0,20	Anöstrus	06.08.99	33,75
Kim	4	0,29	Anöstrus	10.08.99	51,25
Pat	6	0,57	Anöstrus	12.08.99	55,87
Cleo	3	19,76	Diöstrus	n.f. ¹⁾	8,48

1) n.f.: nicht feststellbar, da Hund mit hohen Progesteronwerten in Klinik eingestellt wurde

2) P4 = Progesteron

3.2.2.2 Gewinnung der Plasmaproben zur Kontrolle der Corpus luteum – Funktion

Die Blutroben wurden aus der Vena cephalica antebrachii oder an der Vena saphena entnommen. Die Punktion erfolgte mit sterilen Kanülen (Sterican 0,9 x 40 mm, Fa. B. Braun, 34212 Melsungen).

Das Blut wurde in mit Ammonium-Heparinat präparierten Probenröhrchen (Fa. Sarstedt, 51582 Nümbrecht und Fa. Kabe, 51588 Nümbrecht) aufgefangen und 10 min bei 1500g zentrifugiert und das Plasma mittels Pasteurpipetten in Polypropylenröhrchen (Fa. Sarstedt, 51582 Nümbrecht) überführt. Diese wurden bis zur weiteren Untersuchung bei –20°C gelagert.

3.2.3 Gewinnung der Plasmaproben zur Charakterisierung der LH-Freisetzung

3.2.3.1 Zeitfenster

Zur Erfassung der LH-Freisetzung erfolgten hochfrequente Blutentnahmen im Abstand von 20 Minuten ab Zeitpunkt 0 über einen Zeitraum von 6 Stunden, der als „Zeitfenster“ bezeichnet wurde (HOFFMANN et al. 1996).

Dazu wurde der Venenkatheter Vasofix® Braunüle® (Fa. B. Braun, 34212 Melsungen) mit einem Durchmesser von 1,2 mm in die Vena jugularis externa gelegt. Zwischen den einzelnen Blutprobenentnahmen wurde der Katheter mit einem sterilen Mandrin verschlossen. Das Blut wurde in Na-Heparinbeschichteten Plastikröhrchen aufgefangen, die Gewinnung des Plasmas erfolgte durch Zentrifugation bei 2000 g/min für acht Minuten. Der Überstand wurde mittels Pasteurpipetten in Kunststoffröhrchen (Fa. Sarstedt, 51582 Nümbrecht) überführt und bis zur Hormonbestimmung bei –20°C aufbewahrt.

3.2.3.2 Punktueller Blutentnahmen

Zur Beantwortung der Frage, ob die LH-Freisetzung unter der Downregulierung auch durch einmalige Blutentnahmen charakterisiert werden kann, wurden punktuell weitere Blutproben unmittelbar vor der Implantatgabe sowie 1, 2, 4, 6, 8, 24, 32, 48, 56, 72, 80, 96, 104 und 120 Stunden nach der Applikation entnommen. Weitere Blutentnahmen erfolgten 7, 14, 21, 28 und 42 Tage nach der Applikation und anschließend in 28-tägigen Abständen bis zum Versuchsende; dabei wurde wie in Kap 3.2.2.2 beschrieben vorgegangen.

3.2.4 Ovariohysterektomie (OHE)

Die OHE erfolgte nach dem in der Klinik etablierten Standardverfahren. Über einen venösen Zugang an der Vena cephalica antebrachii erfolgte die Einleitung der Narkose mit L-Methadon (L-Polamivet®; 0,75 mg/kg KGW) und Azepromazin (Vetranquil® 1%; 0,0375 mg/kg KGW). Nach Vorbereitung des Abdomens für die Laparotomie unter aseptischen Kautelen erfolgte die tracheale Intubation und Einleitung der Inhalationsnarkose mit Sauerstoff, Lachgas und Isofluran. Die mediane Laparatomie, etwa

1,5 cm cranial des Nabels beginnend und etwa einen Zentimeter vor dem Schambein endend, erlaubte die Vorlagerung der Gebärmutter und der Ovarien. Eine Massenligatur direkt am Übergang von Zervix uteri zur Scheide unter Einbeziehung der Uteringefäße mit Softcatgut 6 metric ging der Darstellung des linken Mesovars voraus. Dieses wurde mit Softcatgut 6 metric möglichst weit proximal ligiert und ca. 1 cm distal dieser Ligatur und noch proximal der Bursa ovarica mit einer Präparierschere durchtrennt. Das Mesometrium war bis zur Ligatur kaudal der Zervix stumpf zu durchtrennen. Auf dieselbe Weise wurden die rechte Bursa ovarica mit Ovar und das rechte Uterushorn dargestellt. Die Gebärmutter wurde aus dem Wundbereich nach kaudal gelegt, bis sich der Übergang vom Corpus uteri über die Zervix zur Vagina darstellte. Als Fixation wurde direkt auf die erste Massenligatur eine Darmklemme gelegt und über das Corpus uteri eine Péan-Klemme gesetzt. Nach Trennung des Organs im Bereich der Zervix und Entfernung der vorliegenden Zervikalschleimhaut wurde der Stumpf mit Jodtinktur touchiert und einstülpend nach Schmieden mit Softcatgut 3,5 metric vernäht, wobei die Uteringefäße jeweils in den Anfangs- und Endknoten der Naht einbezogen wurden. Nach Verschluss der Bauchwunde mit synthetischem, resorbierbarem Nahtmaterial wurde die Inhalationsnarkose ausgeleitet. Während der gesamten Operation erfolgte die bedarfsgerechte Dauertropfinfusion mit physiologischer (0,9%iger) Kochsalzlösung. Zur post operativen Analgesie erhielten die Hündinnen einmalig Metamizol-Natrium (Novalgin®; 1 mg/kg KGW s.c.).

3.2.5 Verabreichung der Buserelinimplantate

Die Implantate wurden 42 Tage nach erfolgter Ovariohysterektomie subkutan mittels der mitgelieferten Injektionskanüle an der lateralen Halsgegend platziert, die zuvor mit Alkohol desinfiziert worden war.

Zur Anwendung kam ein den Wirkstoff Buserelinazetat enthaltendes Implantat, das von dem pharmazeutischem Unternehmen Fa. Hoechst Roussel Vet zur Verfügung gestellt wurde. Der Wirkstoffgehalt eines Implantates lag bei 3,3 mg Buserelinazetat, die galenische Zusammensetzung entsprach dem zur Anwendung in der Humanmedizin zugelassenem Implantat „Profact Depot®“.

Die Lagerung der Implantate bis zu deren Verwendung erfolgte im Kühlschrank bei + 5°C.

3.2.6 Behandlungsgruppen

Es wurden drei Gruppen zu je drei kastrierten Beaglehündinnen gebildet.

Folgende Dosierungen kamen zur Anwendung:

- Gruppe 1: 3,3 mg Buserelin/Tier (1 Implantat)
- Gruppe 2: 6,6 mg Buserelin/Tier (2 Implantate)
- Gruppe 3: 13,2 mg Buserelin/Tier (4 Implantate)

Die Zuordnung der Tiere mit den laufenden Nummern 1-9 zu den Versuchsgruppen 1-3 erfolgte randomisiert nach Erreichen des Diöstrus (siehe Tab. 2).

Dabei ergaben sich folgende Zuordnungen

Tab. 3: Zuordnung der Hündinnen, Randomisierungsschema

Lfd. Nr.	Hündin	Zuordnung zu Gruppe
1	Maja	1
2	Flo	1
3	Ela	2
4	Lilli	3
5	Oda	2
6	Fox	3
7	Kim	2
8	Pat	1
9	Cleo	3

3.3 Hormonanalytik

3.3.1 Bestimmung von Progesteron

3.3.1.1 Bestimmung von Progesteron mittels Radioimmunotest (RIA)

Die Bestimmung der Progesteronkonzentration im Plasma mittels RIA erfolgte nach dem bei HOFFMANN et al. (1973) beschriebenen Radioimmunotest (RIA); weitere detaillierte Angaben zur Durchführung finden sich bei PAPA (2001).

3.3.1.2 Bestimmung von Progesteron mittels automatischer Chemilumineszenz

Testprinzip

Als Gerät stand das Automatische Chemilumineszenzsystem (ACS 180 der Firma Bayer Diagnostics, 35403 Fernwald) zur Verfügung.

Bei dem für den Einsatz auf dem vollautomatischen Immunoassay-Analysegerät konzipierten Test handelt es sich um einen heterologen, immunometrischen Test. Unmarkiertes Progesteron bindet an einen mit Akridiumester markierten monoklonalen und im Überschuss zugegebenen Maus-Antiprogesteron-Antikörper (MAK). In einem nachfolgendem Schritt binden die nicht Progesteron-besetzten Antikörper an ein an Paramagnetische Partikel (PMP) kovalent gebundenes Progesteron-Derivat. Die Trennung des Progesteron-MAK-Komplexes von dem PMP-MAK-Komplex erfolgt magnetisch, gemessen wird die sich aus dem PMP-MAK-Komplex ergebende Licht (Lumineszenz)-reaktion (Bayer Diagnostics Kundeninformation).

Es besteht eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen der Menge an Progesteron in der Probe und den von dem System gemessenen relativen Lichteinheiten (RLUs).

Testdurchführung

Der Test wurde mit den von der Fa. Bayer Diagnostics dazu bereitgestellten speziellen Reagenzien durchgeführt.

Das System führt automatisch die folgenden Schritte durch: Spülung der Probennadel mit 225 µl Waschreagenz; Dispensierung von 10 µl Probe und 90 µl so genanntem

Releasing Agents in die Küvette; Dispensierung von 100 µl Lite-Reagenz und Inkubation für 2,5 Min bei 37°C; Dispensierung von 200 µl Solid-Phase und Inkubation für 2,5 Min bei 37°C; Reinigung der Küvetten mit deionisiertem Wasser; Dispensierung von jeweils 300 µl der Reagenzien 1 (0,5 % H₂O₂; 0,1 M HNO₃) und 2 (0,25 M NaOH), um die Chemilumineszenz-Reaktion auszulösen; Messung des emittierten Lichtes und Berechnung der Ergebnisse nach einer einprogrammierten Standardkurve (kleinster gemessener Wert der Progesteron Konzentration = 0,01 ng/ml; Maximal Wert der Progesteron-Konzentration = 43,41 ng/ml). Das Ergebnis wird in ng/ml oder mmol/l angegeben, je nachdem welche Einheiten in den Testdefinitionen angewählt wurden.

Zu Beginn jeder Messreihe ist eine Kalibration des Gerätes mit einem vorgegebenen niedrigen und hohen Kalibrator (Probe mit definiertem Progesterongehalt) erforderlich.

Spezifität

Der beschriebene Progesteron-Test ist hochspezifisch. Den Angaben zufolge wurden lediglich mit 11-Deoxycorticosteron (0,08%), Corticosteron (0,95%), Pregnenolon (0,46%) und 17 α -Hydroxyprogesteron (0,31%) Kreuzreaktionen festgestellt.

3.3.1.3 Vergleich der beiden Progesteronbestimmungsverfahren

Anhand von 21 Hundebloodproben im Konzentrationsbereich von 0,11 bis 50,5 ng/ml wurde die Vergleichbarkeit des etablierten RIA und des ACS:180 getestet.

Der Korrelationskoeffizient (r) betrug 0,928. Die Korrelation war mit $p < 0,001$ hochsignifikant.

3.3.2 Bestimmung von LH

3.3.2.1 Testprinzip

Die Bestimmung von LH erfolgte mit einem Enzym-Immuno-Assay (EIA). Es handelt sich um einen heterologen, kompetitiven Test, mit caninem LH als Standard und biotiniliertem bovinem LH als Tracer, der nach dem Prinzip des Sequenztest (STRECKER et al. 1979) aufgebaut war und als „Solid-Phase-Assay“ durchgeführt wurde.

Der verwendete erste Antikörper war monoklonalen Ursprungs (Maus) und gegen bovines LH gerichtet, der zweite und als Solid Phase dienende Antikörper stammte von der Ziege und war anti-Maus IgG Fc-spezifisch; als Standard diente canines LH.

Alle Proben wurden im Doppelansatz eingebracht. Die Standardkurvenpunkte umfassen den Bereich von 1,2 ng/ml bis 19,2 ng/ml.

3.3.2.2 Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem 2. Antikörper

Die Mikrotiterplatten wurden pro Vertiefung mit je 500 ng Antikörper (Ziege, anti-Maus IgG FC-spezifisch), aufgenommen in je 0,1 ml Carbonatpuffer, beschickt.

Es erfolgte eine Inkubation über 48 Stunden im Kühlschrank bei 4°C.

Nach dem Entleeren durch Abkippen wurden 0,2 ml Blockpuffer pro Vertiefung zugegeben, gefolgt von einer weiteren Inkubation über 1 Stunde, wonach 3 mal mit 0,2 ml Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen wurde.

Nach dem Entleeren wurden die beschichteten Platten mit Parafilm verschlossen und konnten so über mehrere Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

3.3.2.3 Testdurchführung

Die Durchführung des Sequenztestes erstreckte sich über drei Tage. Von den Puffern abgesehen, wurden alle Gebrauchslösungen für jeden Test aus den entsprechenden Stammlösungen frisch angesetzt. Die Standardkurve umfasste folgende Punkte:

Standard 1:	0,6 ng/ml
Standard 2:	1,2 ng/ml
Standard 3:	2,4 ng/ml
Standard 4:	4,8 ng/ml
Standard 5:	9,6 ng/ml
Standard 6:	14,4 ng/ml
Standard 7:	19,2 ng/ml

Desweiteren wurden biologische Kontrollen mit bekannt hohem und niedrigem LH-Gehalt eingesetzt.

Alle Proben, Kontrollen, die Standardkurvenpunkte, NSB (nicht spezifische Bindung) und B₀ (keine LH-Zugabe, ansonsten wie Standardpunkte) wurden im Doppelansatz angesetzt.

Das verwendete Enzymsystem war Streptavidin-POD mit dem Chromogen Phenylendiamin. Abgestoppt wurde die Reaktion mit 1 N H₂SO₄.

Der Ablauf der Testdurchführung mit den fünf aufeinanderfolgenden Inkubationen ergibt sich aus Tab. 4.

Tab. 4: Pipettierschema EIA, LH in Hundeplasma

Inkubationen	Art der Probe und Volumen Testreagenz					Inkubations-		Beendigung durch
	Zugegebenes Testreagenz	NSB	B ₀	Std	Probe	Dauer	Temperatur	
1. Inkubation	1. Antikörper		100	100	100	24 h	4°C	Waschung ¹⁾
2. Inkubation	Standard			50		24 h	4°C	Waschung ¹⁾
	Probe				50			
	Probenpuffer	100	100	50	50			
3. Inkubation	Tracer	100	100	100	100	90 min	Raumtemperatur	Waschung ¹⁾
4. Inkubation	Streptav.- Peroxidase	100	100	100	100	30 min	Raumtemperatur (dunkel)	Waschung ¹⁾
5. Inkubation	Substrat	100	100	100	100	5-10 min	Raumtemperatur (dunkel)	Zugabe von 50 µl H ₂ SO ₄

¹⁾ Der Waschvorgang beinhaltet jeweils 3 Waschungen mit je 200 µl Waschpuffer.

3.3.2.4 Testauswertung

Die am Titertek[®] Multiskan (Fa. Flow Laboratories GmbH, 53340 Meckenheim) bei 450 nm gemessenen Extinktionen wurden im "offline"-Betrieb über das einem Gammacounter (Fa Berthold Technologies GmbH & Co. KG, 75323 Bad Wildbach) angeschlossene Rechenprogramm ausgewertet. Dieses Programm benutzt zur Erstellung der Standardkurve eine Polynom-Interpolation der einzelnen Standardkurvenpunkte nach

statistischer Wichtung der Meßergebnisse. Je nach berechnetem "curve-fit" als Maß der Übereinstimmung des mathematischen Modells mit den gemessenen Werten, erfolgt die weitere Auswertung nach linearer, quadratischer oder kubischer Regression. Die Darstellung der Kurve erfolgte hier als linear-log.

3.3.2.5 Zuverlässigkeit

Der Messbereich lag zwischen 0,34 ng/ml (mittlere untere Nachweisgrenze) und 19,2 ng/ml.

Der Intraassayvariationskoeffizient lag bei 9,77% (n=14) im hohen und 18,59% (n=12) im niedrigen Bereich. Der Interassayvariationskoeffizient lag bei 6,5% bzw. 29,2% (je n=40).

Bei Aliquotierung von Proben mit hohem LH-Gehalt ergaben sich den Erwartungen entsprechend lineare Regressionen.

3.3.2.6 Testspezifische Substanzen

- *Mikrotiterplatten F8 maxisorp*: Fa. Nunc GmbH & Co. KG, 65201 Wiesbaden-Biebrich
- *Zweiter Antikörper*: Goat anti Mouse IgG Fc specific (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82041 Deisenhofen)
- *Erster Antikörper*: 518 B7 Mouse anti bovine LH [monoklonal; Dr. Janet Roser, University of California, Davis, CA (MATTERI et al. 1987)] verdünnt in Trisma-Basepuffer (=> Stammlösung I mit einer Konzentration von 1 µg/µl; aliquotiert zu je 25 µl in Eppendorfgefäßen und bei -20°C tiefgefroren; zur Herstellung der Arbeitslösung wird jeweils ein Eppendorfgefäß auf 2,5 ml aufgefüllt, so dass man eine Arbeitslösung mit der Konzentration 25 µg/2,5 ml erhält).
- *Standard*: canines LH: LER-1685-1 [Dr. L. E. Reichert (Albany Medical College, New York)] gelöst in Trisma-Base-Puffer (=> Stammlösung I mit der Konzentration 1 µg/ml), aliquotiert in Glasgefäßen zu jeweils 200 µl und bei -20° C tiefgefroren aufbewahrt; zur Herstellung der Stammlösung II wird die Stammlösung I mit Trisma-Base-Puffer auf eine Konzentration von 1 µg/10 ml verdünnt und diese dann wiederum

zu 500 µl aliquotiert und ebenfalls bei -20°C gelagert. Die Standardkurve wurde für jeden Test frisch aus Stammlösung II angesetzt (s. Kap.3.3.2.7).

- *Tracer*: bovines LH: USDA bLH I-1, biotiniliert nach dem bei MUTAYOBA et al. (1990) beschriebenen Prinzip; 300 mg bovines LH wurden in 200 µl PBS-Puffer gelöst und mit 45 µg in 10µl N,N Dimethylformamid gelöstem Biotin-NHS (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82041 Deisenhofen) gemischt, vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 0,1 mg Glycin in 100 µl PBS gestoppt. Nach einer Inkubation von 4 Stunden erfolgte die Zugabe von 1mg BSA in 1 ml PBS. Die Umpufferung erfolgte über eine PD-10-Säule (Pharmacia) in PBS. Das Eluat wurde in PBS verdünnt, zu 100 µl aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.
- *Streptavidin-POD*: Streptavidin-POD-conjugate, 500 U (Biochemica Roche Diagnostics Nr. 1089153, 82372 Penzberg)
- *Substrat*: Phenylendiamin (Fa. Merck KGaA, 64293 Darmstadt)

3.3.2.7 Lösungen und Puffer

- 1. Antikörper: 0,6 ng pro Ansatz, aufgenommen in 100 µl Probenpuffer
- Standardkurve: Aus der Stammlösung II mit der Konzentration von 1 µg LH/10 ml wurde folgende absteigende Verdünnungsreihe angesetzt:

Standard 7 (19,2 ng/ml)	153,6 µl Stammlösung II	+ 646,4 µl Probenpuffer
Standard 5 (9,6 ng/ml)	400,0 µl Standard 7	+ 400,0 µl Probenpuffer
Standard 4 (4,8 ng/ml)	400,0 µl Standard 5	+ 400,0 µl Probenpuffer
Standard 3 (2,4 ng/ml)	400,0 µl Standard 4	+ 400,0 µl Probenpuffer
Standard 2 (1,2 ng/ml)	400,0 µl Standard 3	+ 400,0 µl Probenpuffer
Standard 1 (0,6 ng/ml)	400,0 µl Standard 2	+ 400,0 µl Probenpuffer

Nicht in die Verdünnungsreihe fiel Standard 6, er wurde wie folgt angesetzt:

Standard 6 (14,4 ng/ml)	57,6 µl Stammlösung II	+ 342,4 µl Probenpuffer
-------------------------	------------------------	-------------------------

- Tracer: Der Tracer wird in einer Verdünnung von 1:6000 in Probenpuffer angesetzt.
Für die Beschickung einer Platte werden 1,67 µl bovines LH (UsdA bLH I-1) in 10 ml Probenpuffer benötigt.
- Streptavidin-POD: Die Streptavidin-POD wird in einer Verdünnung von 1:30.000 in Waschpuffer angesetzt.
- Substrat²⁾:

Substratpuffer	1,000 ml
1,2 Phenylendiamine (Merck)	0,002 g
H ₂ O ₂ (Sigma)	0,700 µl

 Die Substratlösung wird unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.

Material und Methoden

- Carbonatpuffer: Na_2CO_3 (MG 106,0; Merck) 1,325 g
 NaHCO_3 (MG 84,0; Merck) 1,050 g
 Thimerosal (0,02%; Sigma) 0,050 g
 Aqua dest ad 250,00 ml

- Blockpuffer: Bovines Serum Albumin (Sigma) 1,0 g
 Carbonatpuffer ad 10,0 ml

- Trisma-Base-Puffer: Trisbase (MG 121,1; 20 mmol; Sigma) 2,422 g
 EDTA (MG 292,3; 15 mmol; Serva) 0,438 g
 NaCl (MG 58,4; 0,3 mmol; Merck) 17,530 g
 Aqua dest ad 1000,00 ml
 mit 1 N HCl auf pH 7,2 einstellen.

- Probenpuffer: Bovines Serum Albumin (Sigma) 0,10 g
 Trisma-Base-Puffer ad 100,00 ml

- Waschpuffer: Tween 20 (Sigma) 0,50 ml
 Trisma-Base-Puffer ad 1000,00 ml

- Substratpuffer: Puffer 1 12,50 ml
 Puffer 2 12,50 ml
 Aqua dest 25,00 ml
 Der Substratpuffer wird unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.

- Puffer 1: di-Natrium-Hydrogen-Phosphat
 (MG 177,99; Merck) 3,56 g
 Aqua dest ad 100,00 ml

- Puffer 2: Citronensäure-Monohydrat (MG 210,14; Merck) 2,10 g
 Aqua dest ad 100,00 ml

Fa. Merck: Merck KGaA, 64293 Darmstadt

Fa. Serva: SERVA Electrophoresis GmbH, 69115 Heidelberg

Fa. Sigma: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82041 Deisenhofen

3.4 Auswertung der LH-Bestimmungen

Die Ergebnisse wurden als Tabellen und Grafiken dargestellt.

Zur Beschreibung der während der Zeitfenster (s. Kap.3.2.3) erfassten LH-Freisetzung wurden folgende Zielvariablen abgeleitet und einer statistischen Auswertung zugeführt.

a) Basalkonzentration:

Für jede Hündin wurde aus den Hormonwerten einer 6-stündigen Entnahmephase der Mittelwert gebildet. Werte, die um mehr als zwei Standardabweichungen vom Mittelwert ($\bar{x} + 2SD$) abwichen, wurden eliminiert, die restlichen Werte erneut ermittelt. Dieser Rechenvorgang wiederholt sich so oft, bis alle Werte innerhalb von zwei Standardabweichungen lagen (SCHALLENBERGER et al. 1985, SCHALLENBERGER 1990); der so berechnete Mittelwert wurde als Basalwert definiert.

Die Standardabweichungen aller Zeitfenster wurden einer Winsorisierung (Heranschieben von sehr niedrigen Werten auf eine festgelegte Untergrenze) unterzogen, da die Standardabweichungen der Zeitfenster mit niedrigen Basalwerten häufig sehr niedrig oder Null waren. Es wurde eine Winsorisierung von 10 % am unteren Verteilungsende angewendet, aus welcher eine Mindeststandardabweichung von 0,30 resultierte (SACHS 1984, DIXON 1993).

b) LH-Puls:

Für einen LH-Puls, definiert als ein Messwert, der die Basalkonzentration um Mindestens $\bar{x} + 2SD$ übersteigt, gilt, dass bei dem gewählten Probenintervall von 20 Minuten ein Puls nur dann durch mehr als einen Messpunkt dargestellt werden kann, wenn die Amplitude mehr als doppelt so hoch ist wie $\bar{x} + 2SD$. Unter der Voraussetzung, dass zuvor und danach die LH-Basalkonzentration darstellbar war, wurde daher auch dann von einem LH-Puls ausgegangen, wenn nur ein Wert oberhalb von $\bar{x} + 2SD$ lag. Messwerte, die zu Beginn beziehungsweise am Ende der sechsständigen Probenentnahme über dem Wert von $\bar{x} + 2SD$ lagen, konnten demzufolge definitionsgemäß nicht als Puls gewertet werden. Des Weiteren wurden Punkte, die zwar die Basalkonzentration um zwei Standardabweichungen ($\bar{x} + 2SD$) überschritten, aber nebeneinander lagen, nur als ein Puls gewertet, da in diesen

Fällen eine unvollständige Erfassung des ansteigenden Schenkels unterstellt werden musste (SCHNEIDER 1992).

c) LH-Amplitude:

In Zeitfenstern mit LH-Pulsen wurde noch die Amplitude $C_{\max}$ berechnet, die sich aus dem Maximalwerte eines LH-Pulses minus der Basalkonzentration ergab.

Wie die Auswertung der LH-Pulse und der Amplitude zeigte, ergab sich eine rechtsschiefe Verteilung bei zahlreichen Nullwerten (kein Puls pro Zeitfenster); eine Normalisierung dieser Werte war nicht möglich. Zur statistischen Auswertung wurde daher der Friedmann-Rangtest herangezogen.

d) AUC:

Für alle erfassten Zeitfenster wurde außerdem noch die Verfügbarkeit von LH durch die Berechnung der AUC dargestellt. Die AUC (area under the curve) wird in ng/ml Plasma als Produkt der Summe der LH-Werte und der Zeit dargestellt (ng/ml*min).

Die statistische Auswertung erfolgte für die Variablen AUC, LH-Basalkonzentration, Anzahl der Pulse und Amplitude anhand einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor „Beobachtungszeitpunkt“.

Da für die einmalig zu erhebende Variable „Zeitdauer vom Behandlungsbeginn bis zum Wiedererreichen des Ausgangswertes nach der Kastration (Bolus-Wirkungsdauer)“ eine monotone Dosisabhängigkeit zu erwarten war, wurde die Auswertung in Form einer Trendanalyse als lineare Regressionsrechnung vorgenommen.

In beiden Fällen wurden in Abhängigkeit von der Form der statistischen Verteilung (rechtsschiefe Verteilung) der Zielvariablen Datentransformationen (Logarithmen) vorgenommen; die Ergebnisdarstellung erfolgte dabei für die Variablen AUC und LH-Basalkonzentration als geometrischer Mittelwert ($\bar{x}_g$) mit Streufaktor (SF).

Die Variablen Pulse und Amplitude wurden als arithmetischer Mittelwerte ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) dargestellt.

Die statistische Auswertung wurde von der AG Biomathematik und Datenverarbeitung am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Herrn Dr. Failing durch das Statistikprogrammpaket BMDP/Dynamic Release 7.0 (DIXON 1993) vorgenommen.

3.4.1 Gewinnung von Harnproben

Für eine getrennt von vorliegender Arbeit erfolgenden Charakterisierung der Wirkstofffreisetzung, erfolgte eine Gewinnung von Harnproben.

Die Gewinnung der Harnproben erfolgte durch eine entsprechende Auffangvorrichtung am Stoffwechselkäfig. Beginnend am Tag 1 nach Applikation der Buserelinimplantate wurde jedes Tier einmal wöchentlich über Nacht (12-16 Stunden) in den Stoffwechselkäfig verbracht. Am nächsten Morgen wurde die Menge des über Nacht spontan ausgeschiedenen Urins mit einem entsprechend tariertem Gefäß (Messzylinder) quantitativ bestimmt. Anschließend wurde der Sammelharn gründlich durchmischt und drei Aliquots zu je 10 ml für die Analytik entnommen. Bis zur Analytik wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

Transport der Proben

Der Transport zum analytischen Labor erfolgte in geeigneten Isolierbehältern. Zur Vermeidung des Auftauens der Proben während des Transportes wurde dem Transportbehälter Trockeneis oder ein anderes geeignetes Kühlmedium beigelegt.

4 Ergebnisse der LH-Bestimmungen

4.1 Zeitfenster

Für alle Hündinnen sind im Anhang die in den einzelnen Zeitfenstern ermittelten Werte grafisch dargestellt. Die sich für die einzelnen Tiere und Zeitfenster berechneten Werte für die AUC, Basalwert, Zahl der LH-Pulse und Amplituden-Maxima sind in den Tab. 5 bis Tab. 13 und Abb. 3 bis Abb. 20 wiedergegeben.

Tab. 5: Hund Nr. 1 (Maja), Gruppe 1 (1 Implantat); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC, Basalkonzentration (Basal), Anzahl der Pulse, Höhe der Amplitude, Standardabweichung (SD) und Obergrenze (OG; = Basal + 2 SD)

ZF	AUC (ng LH/ml*min)	Basal (ng LH/ml)	n Pulse	Amplitude	SD	OG
1	784,20	2,04	1	2,43	0,36	2,76
2	1966,60	5,20	2	1,76	0,30	5,80
3	1687,10	4,68	0	0,00	0,52	5,72
4	971,90	2,64	1	1,29	0,48	3,59
5	1138,40	3,18	0	0,00	0,65	4,47
6	1237,30	3,46	0	0,00	0,63	4,71
7	1288,70	3,59	0	0,00	0,55	4,69
8	679,40	1,89	0	0,00	0,30	2,49
9	753,80	2,08	0	0,00	0,30	2,68
10	647,20	1,57	2	1,79	0,45	2,47
11	843,30	2,32	0	0,00	0,79	3,91
12	667,60	1,74	1	2,00	0,64	3,01
13	479,80	1,29	0	0,00	0,64	2,57
14	1190,60	3,27	0	0,00	0,80	4,87
15	1733,40	4,79	0	0,00	0,96	6,72
16	2116,50	5,42	3	2,62	0,57	6,56
17	2509,90	6,92	0	0,00	1,00	8,91

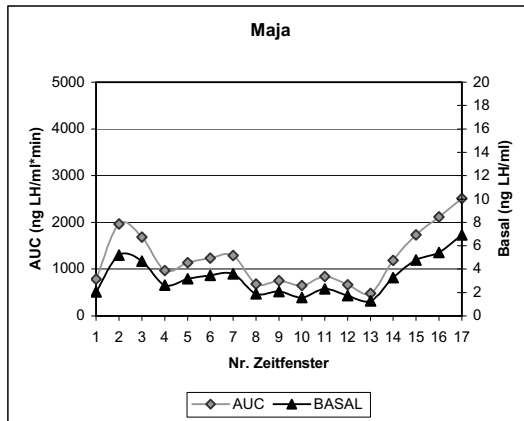


Abb. 3: Hund Nr. 1 (Maja), Gruppe 1 (1 Implantat); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC und Basalkonzentration (Basal)

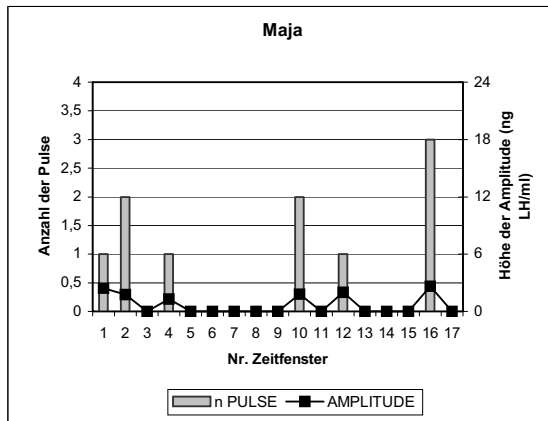


Abb. 4: Hund Nr. 1 (Maja), Gruppe 1 (1 Implantat); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter Anzahl der Pulse und Höhe der Amplitude

Tab. 6: Hund Nr. 2 (Flo), Gruppe 1 (1 Implantat); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC, Basalkonzentration (Basal), Anzahl der Pulse, Höhe der Amplitude, Standardabweichung (SD) und Obergrenze (OG; = Basal + 2 SD)

ZF	AUC (ng LH/ml*min)	Basal (ng LH/ml)	n Pulse	Amplitude	SD	OG
1	871,30	2,41	0	0,00	0,44	3,29
2	3305,10	9,19	0	0,00	1,26	11,71
3	2531,60	6,91	0	0,00	0,74	8,39
4	842,20	2,25	2	0,89	0,30	2,85
5	482,50	1,33	0	0,00	0,31	1,95
6	1048,80	2,77	1	3,01	1,15	5,06
7	978,90	2,77	0	0,00	0,73	4,23
8	459,30	1,27	0	0,00	0,30	1,87
9	411,00	1,14	0	0,00	0,31	1,76
10	451,60	1,14	1	1,98	0,60	2,34
11	641,40	1,40	3	2,00	0,30	2,00
12	1193,30	3,08	2	2,44	0,57	4,21
13	2357,30	6,23	2	3,41	1,07	8,38
14	2349,10	6,52	0	0,00	1,85	10,22
15	2908,40	7,77	1	4,88	1,90	11,58

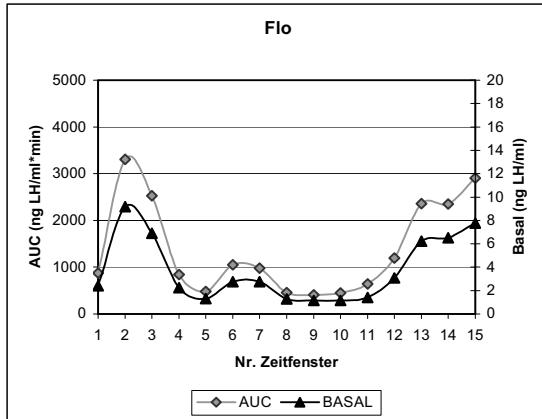


Abb. 5: Hund Nr. 2 (Flo), Gruppe 1 (1 Implantat); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC und Basalkonzentration (Basal)

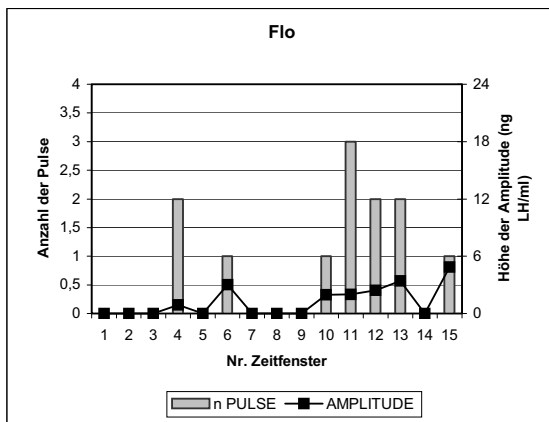


Abb. 6: Hund Nr. 2 (Flo), Gruppe 1 (1 Implantat); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter Anzahl der Pulse und Höhe der Amplitude

Tab. 7: Hund Nr. 8 (Pat), Gruppe 1 (1 Implantat); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC, Basalkonzentration (Basal), Anzahl der Pulse, Höhe der Amplitude, Standardabweichung (SD) und Obergrenze (OG; = Basal + 2 SD)

ZF	AUC (ng LH/ml*min)	Basal (ng LH/ml)	n Pulse	Amplitude	SD	OG
1	1375,50	3,79	0	0,00	0,93	5,66
2	3734,50	10,28	0	0,00	1,66	13,61
3	2892,50	8,09	0	0,00	1,79	11,67
4	1189,60	3,32	0	0,00	0,58	4,49
5	569,00	1,60	0	0,00	0,36	2,33
6	668,70	1,84	0	0,00	0,41	2,67
7	608,30	1,66	1	0,68	0,30	2,26
8	541,90	1,35	1	2,08	0,69	2,73
9	532,20	1,43	1	0,79	0,30	2,03
10	392,10	1,11	0	0,00	0,41	1,92
11	551,50	1,47	1	0,90	0,30	2,07
12	435,50	1,17	1	0,79	0,33	1,82
13	652,80	1,73	1	1,55	0,65	3,03
14	1620,30	4,31	1	2,51	0,71	5,73
15	2105,60	5,77	1	2,18	0,70	7,18
16	2507,10	6,97	0	0,00	1,08	9,13
17	2863,50	7,87	1	3,86	1,63	11,13

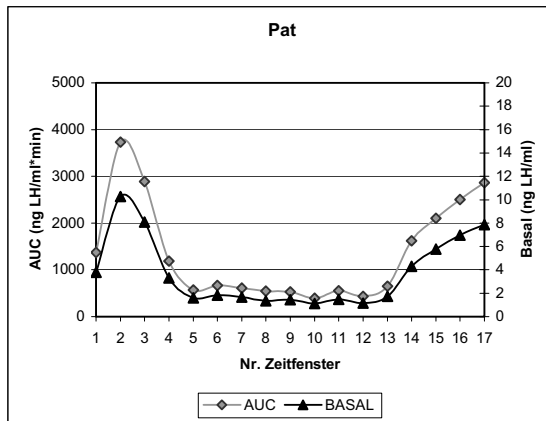


Abb. 7: Hund Nr. 8 (Pat), Gruppe 1 (1 Implantat); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC und Basalkonzentration (Basal)

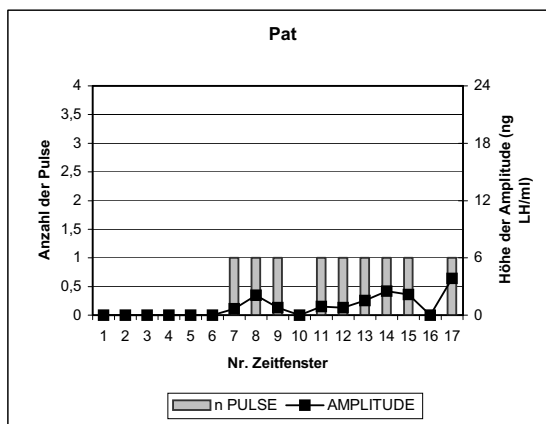


Abb. 8: Hund Nr. 8 (Pat), Gruppe 1 (1 Implantat); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter Anzahl der Pulse und Höhe der Amplitude

Tab. 8: Hund Nr. 3 (Ela), Gruppe 2 (2 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC, Basalkonzentration (Basal), Anzahl der Pulse, Höhe der Amplitude, Standardabweichung (SD) und Obergrenze (OG; = Basal + 2 SD)

ZF	AUC (ng LH/ml*min)	Basal (ng LH/ml)	n Pulse	Amplitude	SD	OG
1	1251,50	3,11	2	3,54	0,64	4,40
2	4077,20	10,93	1	7,87	0,94	12,80
3	4492,20	12,25	1	5,02	1,39	15,04
4	1649,60	4,59	0	0,00	0,68	5,95
5	1517,10	4,27	0	0,00	1,05	6,37
6	1180,30	3,27	0	0,00	0,76	4,79
7	1189,20	2,88	1	2,90	0,48	3,84
8	1228,60	3,41	0	0,00	0,39	4,19
9	831,30	2,34	0	0,00	0,83	4,00
10	777,10	2,16	0	0,00	0,88	3,92
11	433,50	1,22	0	0,00	0,64	2,49
12	1060,70	2,70	2	2,41	0,63	3,97
13	2386,90	6,56	1	2,51	0,96	8,47
14	3511,40	9,67	1	2,47	0,99	11,65
15	3199,30	8,68	1	3,12	0,96	10,60
16	4343,70	11,95	0	0,00	1,11	14,16

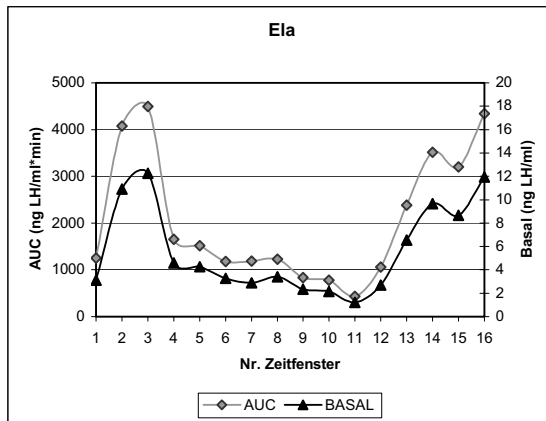


Abb. 9: Hund Nr. 3 (Ela), Gruppe 2 (2 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC und Basalkonzentration (Basal)

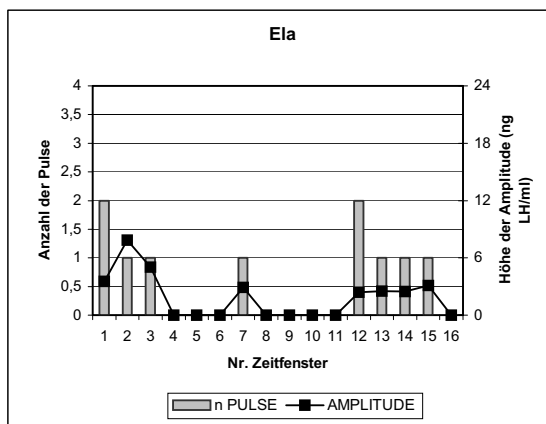


Abb. 10: Hund Nr. 3 (Ela), Gruppe 2 (2 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter Anzahl der Pulse und Höhe der Amplitude

Tab. 9: Hund Nr. 5 (Oda), Gruppe 2 (2 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC, Basalkonzentration (Basal), Anzahl der Pulse, Höhe der Amplitude, Standardabweichung (SD) und Obergrenze (OG; = Basal + 2 SD)

ZF	AUC (ng LH/ml*min)	Basal (ng LH/ml)	n Pulse	Amplitude	SD	OG
1	1376,70	3,76	0	0,00	0,84	5,44
2	2904,70	7,86	2	2,34	0,51	8,88
3	2610,90	7,09	1	2,09	0,74	8,57
4	892,40	2,15	4	2,82	0,30	2,75
5	761,80	2,12	0	0,00	0,55	3,23
6	609,50	1,57	1	2,08	0,59	2,74
7	540,10	1,51	0	0,00	0,30	2,11
8	559,50	1,55	0	0,00	0,52	2,59
9	373,60	1,10	0	0,00	0,85	2,80
10	599,30	1,68	0	0,00	0,88	3,45
11	646,20	1,41	2	5,86	0,38	2,16
12	768,40	1,75	3	2,69	0,52	2,79
13	1514,20	3,95	1	5,13	0,79	5,53
14	2777,70	7,61	0	0,00	0,88	9,38
15	3772,30	10,28	1	3,49	0,75	11,78
16	3421,60	9,57	0	0,00	1,06	11,69

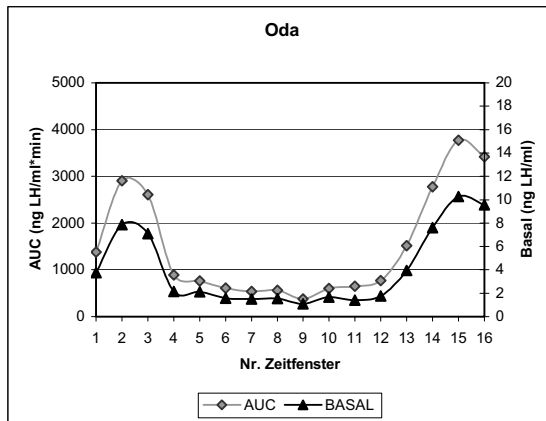


Abb. 11: Hund Nr. 5 (Oda), Gruppe 2 (2 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC und Basalkonzentration (Basal)

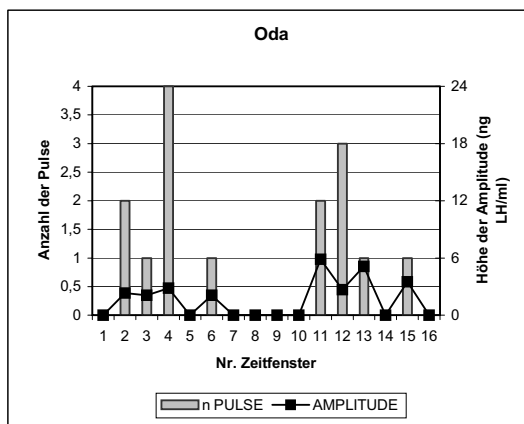


Abb. 12: Hund Nr. 5 (Oda), Gruppe 2 (2 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter Anzahl der Pulse und Höhe der Amplitude

Tab. 10: Hund Nr. 7 (Kim), Gruppe 2 (2 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC, Basalkonzentration (Basal), Anzahl der Pulse, Höhe der Amplitude, Standardabweichung (SD) und Obergrenze (OG; = Basal + 2 SD)

ZF	AUC (ng LH/ml*min)	Basal (ng LH/ml)	n Pulse	Amplitude	SD	OG
1	1491,60	3,10	3	4,86	0,62	4,34
2	2514,90	6,97	0	0,00	0,59	8,15
3	2107,00	5,74	1	2,34	0,81	7,35
4	1234,30	3,30	1	1,81	0,71	4,72
5	992,80	2,79	0	0,00	0,39	3,57
6	1103,80	2,97	1	1,30	0,30	3,57
7	800,00	2,14	1	1,69	0,69	3,53
8	532,40	1,34	2	1,36	0,44	2,22
9	805,30	1,99	2	2,95	0,63	3,25
10	571,70	1,58	0	0,00	0,37	2,32
11	465,70	1,30	0	0,00	0,41	2,12
12	166,50	0,29	2	1,57	0,30	0,89
13	1230,00	3,40	0	0,00	0,48	4,36
14	1422,20	3,54	3	2,69	0,66	4,85
15	2594,90	7,12	1	2,55	0,88	8,88
16	2892,40	8,03	0	0,00	0,57	9,17
17	3191,80	8,95	0	0,00	1,37	11,68

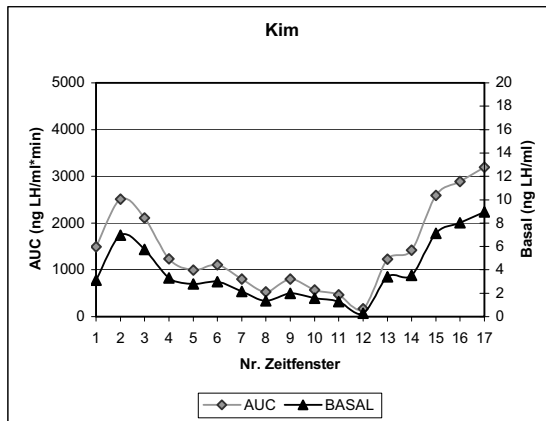


Abb. 13: Hund Nr. 7 (Kim), Gruppe 2 (2 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC, Basalkonzentration (Basal)

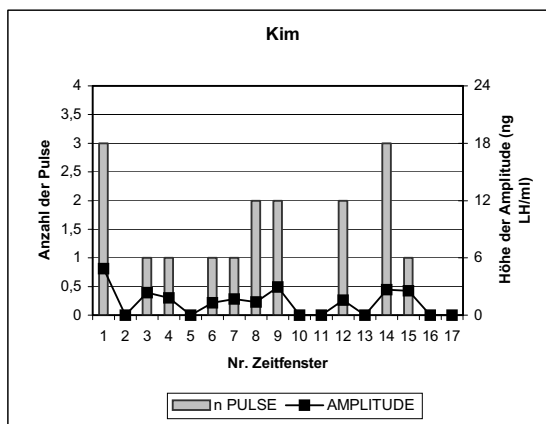


Abb. 14: Hund Nr. 7 (Kim), Gruppe 2 (2 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter Anzahl der Pulse und Höhe der Amplitude

Tab. 11: Hund Nr. 4 (Lilli), Gruppe 3 (4 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC, Basalkonzentration (Basal), Anzahl der Pulse, Höhe der Amplitude, Standardabweichung (SD) und Obergrenze (OG; = Basal + 2 SD)

ZF	AUC (ng LH/ml*min)	Basal (ng LH/ml)	n Pulse	Amplitude	SD	OG
1	809,40	1,71	3	3,48	0,55	2,81
2	5350,00	14,64	1	4,86	1,57	17,78
3	4724,80	13,07	0	0,00	1,67	16,41
4	1477,30	4,08	0	0,00	0,49	5,06
5	1562,00	4,11	1	4,50	0,97	6,04
6	1037,00	2,89	0	0,00	0,58	4,04
7	851,30	2,25	2	1,04	0,30	2,85
8	878,50	2,38	1	1,66	0,40	3,19
9	877,40	2,47	0	0,00	0,70	3,87
10	732,20	2,04	0	0,00	0,77	3,59
11	291,10	0,81	0	0,00	0,40	1,60
12	877,60	2,41	0	0,00	0,70	3,81
13	2638,50	7,40	0	0,00	1,38	10,16
14	4328,00	12,16	0	0,00	2,38	16,92
15	4061,20	11,29	0	0,00	1,69	14,67
16	5418,60	14,06	1	20,87	2,68	19,41

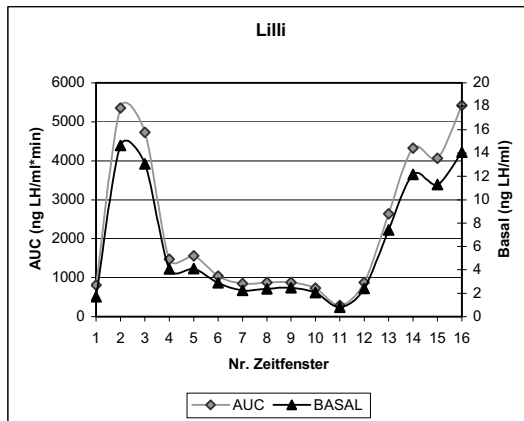


Abb. 15: Hund Nr. 4 (Lilli), Gruppe 3 (4 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC und Basalkonzentration (Basal)

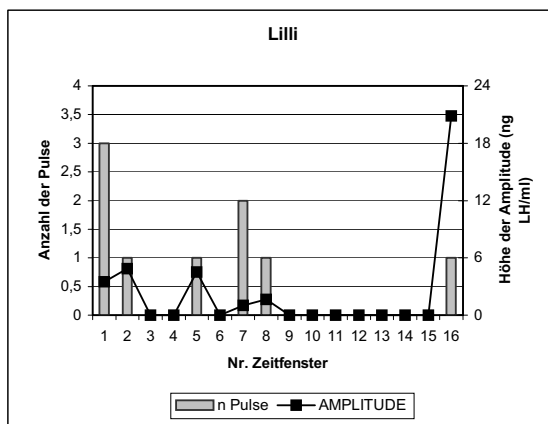


Abb. 16: Hund Nr. 4 (Lilli), Gruppe 3 (4 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter Anzahl der Pulse und Höhe der Amplitude

Tab. 12: Hund Nr. 6 (Fox), Gruppe 3 (4 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC, Basalkonzentration (Basal), Anzahl der Pulse, Höhe der Amplitude, Standardabweichung (SD) und Obergrenze (OG; = Basal + 2 SD)

ZF	AUC (ng LH/ml*min)	Basal (ng LH/ml)	n Pulse	Amplitude	SD	OG
1	1124,80	2,48	2	5,66	1,14	4,77
2	4096,40	11,11	1	4,09	1,19	13,48
3	3324,50	9,15	0	0,00	1,64	12,43
4	455,40	1,20	1	1,28	0,37	1,93
5	632,80	1,72	0	0,00	0,65	3,01
6	417,80	1,08	1	1,88	0,45	1,97
7	456,00	1,24	0	0,00	0,62	2,48
8	772,30	2,15	0	0,00	0,75	3,64
9	291,40	0,54	2	2,63	0,61	1,76
10	436,60	1,14	1	1,81	0,62	2,37
11	564,20	1,52	1	1,00	0,30	2,13
12	558,10	1,54	0	0,00	0,47	2,48
13	748,40	1,93	2	1,93	0,35	2,63
14	3074,30	8,28	1	4,75	1,36	11,00
15	3681,40	10,04	1	3,35	0,93	11,89
16	3775,30	10,36	1	2,93	0,94	12,24

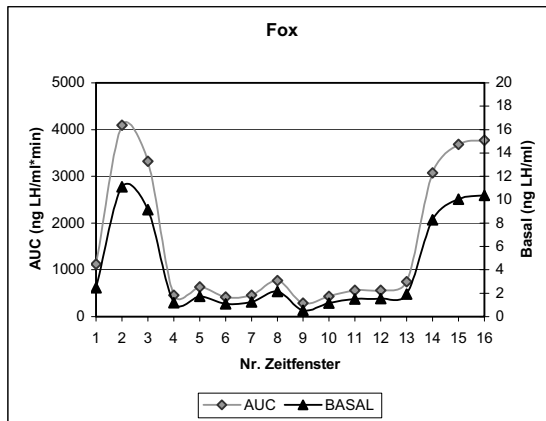


Abb. 17: Hund Nr. 6 (Fox), Gruppe 3 (4 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC und Basalkonzentration (Basal)

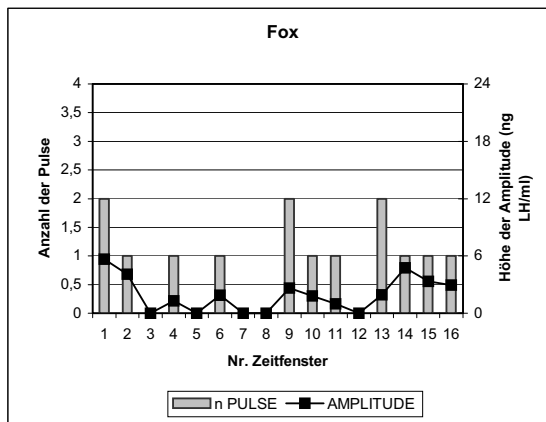


Abb. 18: Hund Nr. 6 (Fox), Gruppe 3 (4 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter Anzahl der Pulse und Höhe der Amplitude

Tab. 13: Hund Nr. 9 (Cleo), Gruppe 3 (4 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC, Basalkonzentration (Basal), Anzahl der Pulse, Höhe der Amplitude, Standardabweichung (SD) und Obergrenze (OG; = Basal + 2 SD)

ZF	AUC (ng LH/ml*min)	Basal (ng LH/ml)	n Pulse	Amplitude	SD	OG
1	1400,80	2,89	3	6,33	0,30	3,49
2	2571,00	7,21	0	0,00	1,62	10,44
3	2304,50	6,17	1	3,67	0,94	8,05
4	1560,00	4,28	1	1,04	0,43	5,15
5	1542,30	4,27	0	0,00	0,57	5,41
6	1481,70	3,95	1	2,56	0,40	4,74
7	1409,30	3,94	0	0,00	0,78	5,49
8	347,50	0,83	1	1,65	0,41	1,66
9	777,80	2,13	0	0,00	0,49	3,11
10	1032,10	2,81	1	1,51	0,48	3,78
11	1015,80	2,86	0	0,00	0,68	4,21
12	934,60	2,58	0	0,00	0,45	3,47
13	1497,70	4,17	0	0,00	0,53	5,23
14	2774,10	7,75	0	0,00	0,77	9,28
15	3093,10	8,62	0	0,00	0,90	10,41
16	2891,60	8,02	0	0,00	1,24	10,50

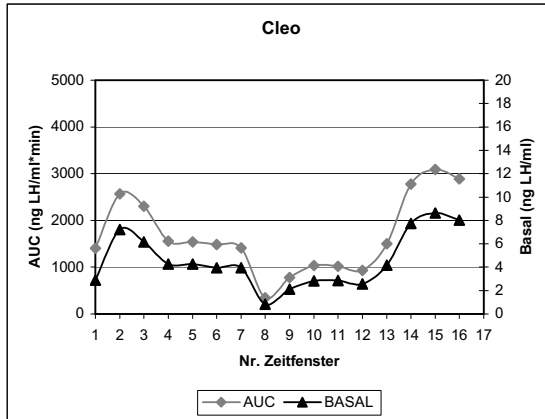


Abb. 19: Hund Nr. 9 (Cleo), Gruppe 3 (4 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter AUC und Basalkonzentration (Basal)

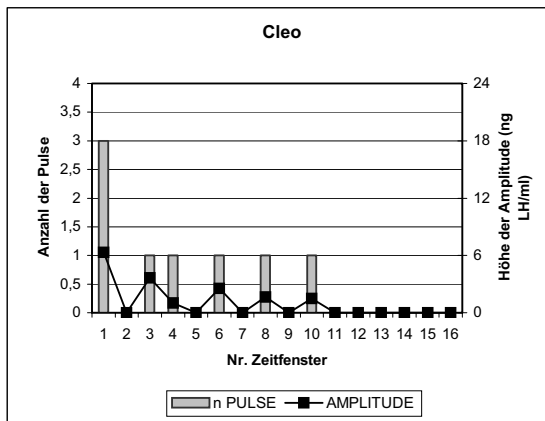


Abb. 20: Hund Nr. 9 (Cleo), Gruppe 3 (4 Implantate); Charakteristik der LH-Freisetzung für die Parameter Anzahl der Pulse und Höhe der Amplitude

4.2 Effekt der Kastration auf die LH-Freisetzung

Zur Auswertung des Kastrationseffektes (Wegfall des negativen Feedbacks) wurden die ersten drei Zeitfenster aller neun Hündinnen herangezogen. Die Tiere stellten bis dahin eine einheitliche Gruppe dar, da eine Behandlung mit dem Implantat noch nicht stattgefunden hatte.

Zeitfenster 1 lag mindestens 10 Tage vor der Ovariohysterektomie, die Zeitfenster 2 und 3 lagen am 21. und 35. Tag nach der OHE.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 14 bis 16 wiedergegeben.

Wie Tab. 14 zeigt, lagen die Werte für die AUC 21 und 35 Tage nach der Kastration um den Faktor 2,9 bzw. 2,5 höher; dieser Anstieg war mit $p < 0,0001$ hoch signifikant.

Aus Tab. 15 ergibt sich, dass auch die Basalwerte nach der Kastration hochsignifikant ($p < 0,0001$) von 2,72 auf im Mittel 8,88 bzw. 7,71 ng/ml anstiegen.

Anders als für die AUC und die Basalwerte konnte nach Anwendung des Friedmann-Rang-Testes für die Zahl der LH-Pulse pro Zeitfenster und die Amplitude kein Kastrationseffekt aufgezeigt werden ($p = 0,21$). Der Tendenz nach war die Kastration jedoch mit einem Abfall verbunden.

Tab. 14: geom. Mittelwerte und Streufaktoren (SF) der AUC (ng LH/ml*min) der ersten drei Zeitfenster

Zeitfenster	$\bar{x}_g$	SF
1	1133,2	1,29
2	3252,4	1,36
3	2813,8	1,40

Tab. 15: geom. Mittelwerte und Streufaktoren (SF) der Basalwerte (ng LH/ml) der ersten drei Zeitfenster

Zeitfenster	$\bar{x}_g$	SF
1	2,72	1,31
2	8,88	1,36
3	7,71	1,41

Tab. 16: Anzahl (n) der mittleren Pulse und Höhe der Amplitude (ng LH/ml) und deren Standardabweichungen (s) der ersten drei Zeitfenster

Zeitfenster	n Pulse	s	Amplitude	s
1	1,6	1,3	2,92	2,34
2	0,8	0,8	2,32	2,62
3	0,4	0,5	1,46	1,81

4.3 Effekt des GnRH-Implantates auf die LH-Freisetzung

Die für die einzelnen Zeitfenster und Gruppen berechneten Mittelwerte $[\bar{x}_g(SF)]$ sind getrennt für die AUC, die Basalkonzentration, die Zahl der Pulse und die maximale Amplitudenhöhe in den Tab. 17 bis Tab. 20 sowie in den Abb. 21 bis Abb. 24 wiedergegeben. Als Referenz- bzw. Ausgangswert dienten jeweils die 35 Tage nach der OHE in Zeitfenster 3 enthaltenen Werte.

Tab. 17: Charakteristik der LH-Freisetzung nach Applikation des GnRH-Implantates:
AUC (ng LH/ml*min); Angaben in $\bar{x}$ (SF)

Behandlung	Nr. ZF	Tage nach Implantation	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Nach OHE	3	-7	2311,8 (1,32)	2912,7 (1,48)	3308,0 (1,43)
Nach Implantat	4	14	991,1 (1,19)	1220,4 (1,36)	1016,3 (2,01)
	5	28	678,6 (1,58)	1046,9 (1,42)	1150,8 (1,68)
	6	42	953,9 (1,38)	926,0 (1,44)	862,6 (1,92)
	7	70	915,6 (1,46)	800,9 (1,48)	817,9 (1,76)
	8	98	553,0 (1,22)	715,3 (1,60)	617,7 (1,65)
	9	126	548,4 (1,36)	630,1 (1,57)	583,7 (1,83)
	10	154	485,7 (1,29)	643,3 (1,18)	691,0 (1,54)
	11	182	668,2 (1,24)	507,2 (1,24)	550,6 (1,87)
	12	210	702,8 (1,66)	513,9 (2,69)	770,7 (1,32)
	13	238	903,9 (2,33)	1644,4 (1,40)	1435,5 (1,88)
	14	266	1655,0 (1,41)	2402,7 (1,60)	3329,7 (1,26)
	15	294	2197,9 (1,30)	3152,1 (1,21)	3589,2 (1,15)

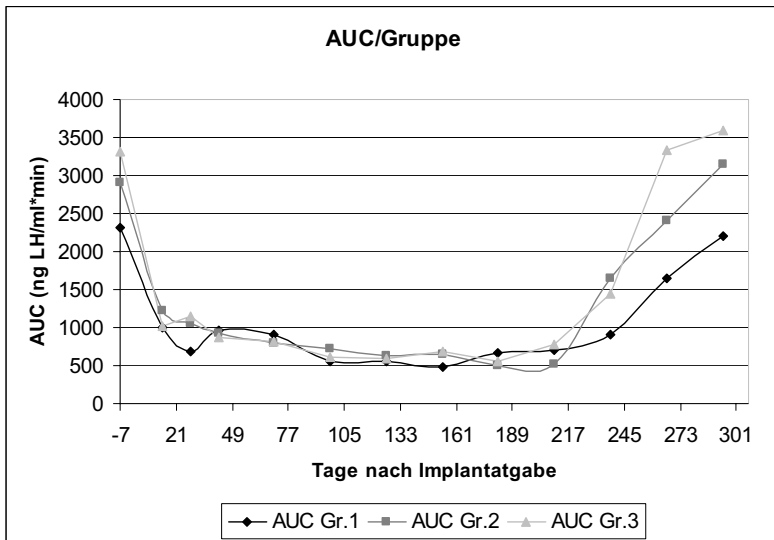


Abb. 21: Mittlerer Verlauf ($\bar{x}$) der AUC je Gruppe in den Zeitfenstern 3-15 im Gruppenvergleich bis zum Tag 294 nach Implantatgabe

Tab. 18: Charakteristik der LH-Freisetzung nach Applikation des GnRH-Implantates: Basalwerte (ng LH/ml); Angaben in xg(SF)

Behandlung	Nr. ZF	Tage nach Implantation	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Nach OHE	3	-7	6,40 (1,33)	7,93 (1,48)	9,04 (1,46)
Nach Implantat	4	14	2,70 (1,22)	3,19 (1,46)	2,76 (2,06)
	5	28	1,89 (1,58)	2,93 (1,42)	3,11 (1,67)
	6	42	2,60 (1,38)	2,48 (1,49)	2,31 (1,97)
	7	70	2,55 (1,48)	2,10 (1,38)	2,22 (1,78)
	8	98	1,48 (1,24)	1,92 (1,65)	1,62 (1,79)
	9	126	1,50 (1,35)	1,72 (1,49)	1,42 (2,31)
	10	154	1,26 (1,21)	1,79 (1,18)	1,87 (1,58)
	11	182	1,68 (1,32)	1,31 (1,08)	1,52 (1,88)
	12	210	1,84 (1,63)	1,11 (3,26)	2,12 (1,32)
	13	238	2,40 (2,31)	4,45 (1,41)	3,91 (1,96)
	14	266	4,51 (1,42)	6,39 (1,69)	9,21 (1,28)
	15	294	5,99 (1,28)	8,60 (1,20)	9,92 (1,14)

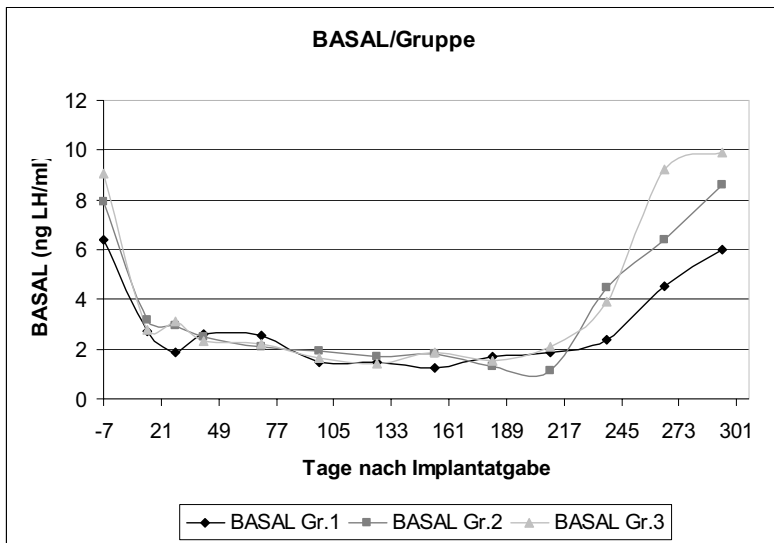


Abb. 22: Mittlerer Verlauf ($\bar{x}_g$) der Basalwerte je Gruppe in den Zeitfenstern 3-15 im Gruppenvergleich bis zum Tag 294 nach Implantatgabe

Tab. 19: Charakteristik der LH-Freisetzung nach Applikation des GnRH-Implantates: Zahl der Pulse pro Zeitfenster; Angaben in $\bar{x}$ (SD)

Behandlung	Nr. ZF	Tage nach Implantation	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Nach OHE	3	-7	0,000 (0,00)	1,000 (0,00)	0,333 (0,58)
Nach Implantat	4	14	1,000 (1,00)	1,667 (2,08)	0,667 (0,58)
	5	28	0,000 (0,00)	0,000 (0,00)	0,333 (0,58)
	6	42	0,333 (0,58)	0,667 (0,58)	0,667 (0,58)
	7	70	0,333 (0,58)	0,667 (0,58)	0,667 (1,15)
	8	98	0,333 (0,58)	0,667 (1,15)	0,667 (0,58)
	9	126	0,333 (0,58)	0,667 (1,15)	0,667 (1,15)
	10	154	1,000 (1,00)	0,000 (0,00)	0,667 (0,58)
	11	182	1,333 (1,53)	0,667 (1,15)	0,333 (0,58)
	12	210	1,333 (0,58)	2,333 (0,58)	0,000 (0,00)
	13	238	1,000 (1,00)	0,667 (0,58)	0,667 (1,15)
	14	266	0,333 (0,58)	1,333 (1,53)	0,333 (0,58)
	15	294	0,667 (0,58)	1,000 (0,00)	0,333 (0,58)

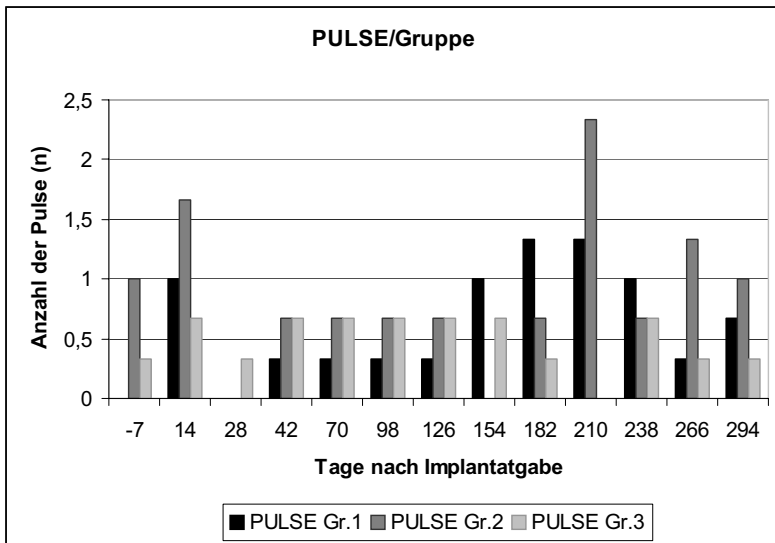


Abb. 23: Mittlere Anzahl ($\bar{x}$) der Pulse je Gruppe in den Zeitfenstern 3-15 im Gruppenvergleich bis zum Tag 294 nach Implantatgabe

Tab. 20: Charakteristik der LH-Freisetzung nach Applikation des GnRH-Implantates: maximale Amplitudenhöhe (ng LH/ml); Angaben in $\bar{x}$ (SD)

Behandlung	Nr. ZF	Tage nach Implantation	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Nach OHE	3	-7	*	3,150 (1,62)	1,223 (2,12)
Nach Implantat	4	14	0,727 (0,66)	1,543 (1,43)	0,773 (0,68)
	5	28	*	*	1,500 (2,60)
	6	42	1,003 (1,74)	1,127 (1,05)	1,480 (1,33)
	7	70	0,227 (0,39)	1,530 (1,46)	0,347 (0,60)
	8	98	0,693 (1,20)	0,453 (0,79)	1,103 (0,96)
	9	126	0,263 (0,46)	0,983 (1,70)	0,877 (1,52)
	10	154	1,257 (1,10)	*	1,107 (0,97)
	11	182	0,967 (1,00)	1,953 (3,38)	0,333 (0,58)
	12	210	1,743 (0,85)	2,223 (0,58)	*
	13	238	1,657 (1,71)	2,547 (2,57)	0,643 (1,11)
	14	266	0,837 (1,45)	1,720 (1,49)	1,583 (2,74)
	15	294	2,353 (2,44)	3,053 (0,47)	1,117 (1,93)

* Keine Amplitude wegen fehlender Pulse

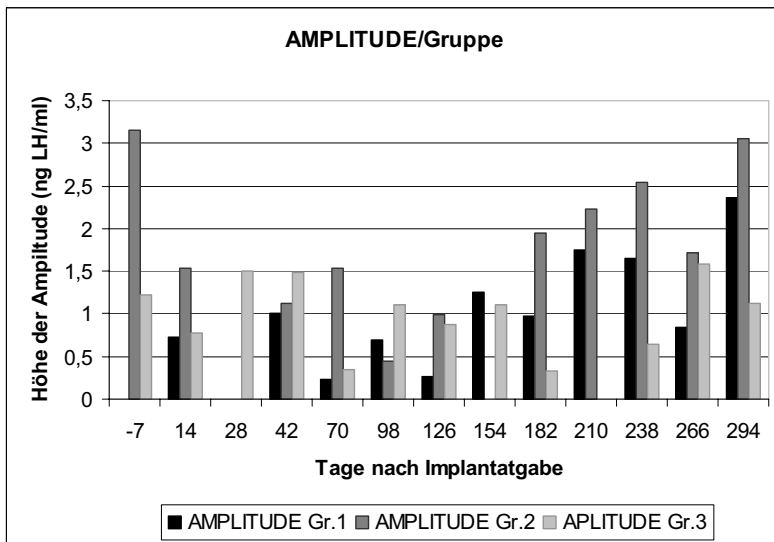


Abb. 24: Mittlere Höhe ($\bar{x}$) der Amplitude je Gruppe in den Zeitfenstern 3-15 im Gruppenvergleich bis zum Tag 294 nach Implantatgabe

Wie in Kapitel 3.2.1 angegeben, ergab sich die Versuchsdauer primär aus der Zeit, bis die LH- Werte wieder das Ausgangsniveau erreicht hatten. Da in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis unterschiedlich lange Zeiträume erwartet worden waren, war ursprünglich festgelegt worden, die Beobachtungsdauer an Gruppe 3, d.h. der Gruppe mit der höchsten Dosierung, zu orientieren. Wie jedoch aus Tab. 17 und Tab. 18 hervorgeht zeigte sich, dass offensichtlich unabhängig von der Dosierung bei allen Gruppen die Ausgangswerte im 14. Zeitfenster, d.h. nach 266 Tagen, annähernd wieder erreicht waren. Es ergab sich in Zeitfenster 3 für die AUC ($\bar{X}_g$, SF) im Mittel 2813,6 (1,4) ng/ml*min, sowie für den Basalwert ($\bar{X}_g$, SF) 7,71 (1,4) ng/ml im Vergleich zu Zeitfenster 14 mit 2365,6 (1,5) ng/ml*min für die AUC, sowie 6,43 (1,6) ng/ml für den Basalwert. In Zeitfenster 15 waren mit der AUC von 2918,7 (1,3) ng/ml*min und dem Basalwert von 8,0 (1,3) ng/ml die Ausgangswerte wieder erreicht ($p > 0,4$).

In die statistischen Berechnungen wurden daher lediglich die Zeitfenster 3 bis 15 einbezogen, obwohl insgesamt bis zu 17 Zeitfenster erfasst wurden.

Der Gruppenvergleich und die Wirksamkeitsdauer wurden anhand einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor Zeit berechnet.

Der Effekt der Zeit war mit $p < 0,0001$ für die AUC und die Basalwerte hochsignifikant, beide Parameter waren vom 4. bis einschließlich 13. Zeitfenster erniedrigt. Über alle Gruppen ergab sich demnach eine einheitliche Wirkungsdauer von 238 Tagen. Entsprechend ergab die Trendanalyse (lineare Regressionsrechnung) weder beim ersten Anstieg der LH-Werte, noch beim Erreichen der Ausgangswerte einen Unterschied in der Wirksamkeitsdauer zwischen den einzelnen Gruppen ($p > 0,4$).

Zur Absicherung dieser Beobachtung wurden die Werte von Zeitfenster 3 mit denen von Zeitfenster 4 mittels des t-Testes ($n=3$) verglichen. Für alle 3 Gruppen ergaben sich mit jeweils $p < 0,0003$ gesicherte Unterschiede. Demnach ergab sich ein Wirkungseintritt innerhalb von 14 Tagen.

Für Zeitfenster 13 gilt, dass im Vergleich zu Zeitfenster 12 die Werte erhöht waren ($p < 0,004$; t-Test), aber noch unter denen von Zeitfenster 14 ($p < 0,002$; t-Test) lagen.

Über alle Gruppen hinweg deuten demnach die Befunde von Zeitfenster 13 einen Wirkungsverlust an, nach weiteren 4 Wochen (Zeitfenster 14) ist eine Wirkung nicht mehr erkennbar.

Für die Parameter Zahl der Pulse und maximale Pulsamplitude konnten keine zeitabhängigen Effekte festgestellt werden. Dabei fällt auf, dass sich sowohl vor als auch nach der Implantation Zeitfenster ergaben, in denen keine Pulse feststellbar waren.

4.4 Besondere Beobachtungen

Bei der niedrigen Dosierung (Gruppe 1; 3,3 mg Buserelin/Tier) fiel auf, dass bei zwei Tieren (Flo, Pat) die ansonsten mehr oder weniger stabil verlaufende LH-Sekretion in dem Zeitfenster 6 (Flo) und Zeitfenster 8 (Pat) eine „ansteigende“ Tendenz aufwies (s. Anhang; Kap 9), die sich in den darauf folgenden Zeitfenstern (bis Zeitfenster 13) jedoch wieder verlor.

4.5 Punktuelle LH-Messungen

Diese Messungen erfolgten in den Blutproben, die wie in Kap. 3.2.3.2 beschrieben gewonnen worden waren. Der erwartete Anstieg der LH-Werte unmittelbar nach der Implantation ist gut erkennbar, ebenso der nachfolgende Abfall, wobei analog zu den Ergebnissen bei Erfassung der LH-Sekretion in den „Zeitfenstern“ (s. Kap. 4.3), ab der zweiten Woche die Messwerte im Bereich der Basalwerte liegen (s. Abb. 25 und 26).

Die Ergebnisse sind in Tab. 21 und den Abb. 25 und 26 zusammengefasst.

Da sich, wie in Kap. 4.3 dargestellt, kein Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen ergab, wurden die Werte über die Gruppen hinweg gemittelt. Für die Zeitpunkte bis 8 Stunden nach Implantation ergibt sich eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) der LH-Werte bis zum zweifachen der Ausgangswerte.

14 Tage (336 h) nach der Implantation war eine statistisch signifikante Erniedrigung der LH-Werte zu erkennen ($p < 0,005$). Ab diesem Zeitpunkt kann also von einer Downregulation gesprochen werden.

Diese hielt bis zum Tag 210 (30 Wochen/5040 h) an ($p = 0,001$). Nach 238 Tagen (34 Wochen/5712 h) wurde ein leichter Anstieg festgestellt, nach 38 Wochen war kein Unterschied mehr festzustellen ($p > 0,2$).

Daraus ergab sich anhand der LH-Einzelwertbestimmung eine Wirkdauer von 238 Tagen, bzw. eine Downregulationszeit von 210 Tagen.

Tab. 21: Ergebnisse der punktuellen LH-Messungen (ng/ml) der einzelnen Hündinnen vom Zeitpunkt direkt vor Implantatgabe (Zeit: 0 h) bis 42 Wochen nach Implantatgabe (Zeit: 7056 h), Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (SD)

Zeit h (Wo)	Maja	Flo	Pat	Ela	Oda	Kim	Lilli	Fox	Cleo	$\bar{x}$	SD
0	7,1	5,6	3,1	13,4	5,6	5,5	15,5	7,6	4,6	7,6	3,9
1	14,9	14,5	13,3	17,1	10,2	16,7	16,4	13,6	12,4	14,3	2,1
2	10,8	12,6	10,5	14,0	9,4	12,5	12,8	11,2	9,5	11,5	1,5
4	8,9	10,1	8,3	12,4	7,8	9,7	13,7	9,9	8,6	9,9	1,8
6	8,3	7,8	7,5	13,2	6,7	7,6	13,9	8,7	7,2	9,0	2,5
8	9,2	9,3	7,2	11,9	7,9	7,1	12,8	9,0	7,3	9,1	1,9
24	8,0	8,0	5,8	10,8	6,2	6,9	14,5	9,1	6,5	8,4	2,6
32	7,1	9,6	4,9	11,5	6,2	5,4	11,9	8,7	7,2	8,0	2,4
48	7,7	9,8	5,3	10,9	4,8	5,2	11,8	8,4	*	8,0	2,5
56	7,5	7,4	5,1	8,9	5,3	3,7	9,6	7,8	5,7	6,8	1,8
72	6,5	7,0	4,6	8,0	5,2	5,0	9,5	7,2	5,5	6,5	1,5
80	5,5	7,7	4,8	8,0	5,5	4,5	8,4	7,0	5,7	6,3	1,4
96	7,7	7,4	5,1	6,4	4,9	4,4	8,3	5,2	5,9	6,2	1,3
104	6,5	5,6	4,4	6,7	4,9	4,7	7,2	4,8	5,5	5,6	1,0
120	4,9	6,1	4,0	6,6	4,8	4,0	7,1	5,5	5,7	5,4	1,0
168 (1)	4,5	5,4	3,1	5,7	4,3	3,8	6,0	5,0	5,2	4,8	0,9
336 (2)	2,1	2,1	3,5	4,6	2,2	4,0	4,6	1,6	4,7	3,3	1,2
504 (3)	3,6	3,4	2,3	3,1	2,0	2,7	3,5	3,5	1,9	2,9	0,6
672 (4)	3,7	1,4	2,0	4,9	2,3	3,4	4,4	0,6	4,5	3,0	1,4
1008 (6)	3,6	2,8	1,5	3,3	1,7	3,8	3,2	1,5	3,3	2,7	0,9
1680 (10)	3,8	3,4	2,0	2,7	1,7	2,5	2,3	1,8	3,3	2,6	0,7
2352 (14)	1,7	1,2	1,7	3,4	1,8	2,2	3,1	3,0	1,1	2,1	0,8
3024 (18)	1,9	1,5	1,4	3,2	1,6	1,4	3,3	3,2	2,2	2,2	0,8
3696 (22)	3,4	0,7	1,7	3,1	1,1	1,8	1,4	1,7	3,3	2,0	1,0
4368 (26)	2,6	1,4	1,3	1,2	1,3	1,3	1,1	1,7	3,0	1,6	0,6
5040 (30)	1,0	5,5	1,2	3,3	1,7	0,8	4,2	1,4	1,8	2,3	1,5
5712 (34)	0,5	7,0	2,6	7,3	5,4	3,9	7,7	1,8	5,1	4,6	2,4
6384 (38)	3,5	6,6	6,8	11,6	7,3	4,4	16,6	7,3	8,6	8,1	3,7
7056 (42)	4,8	9,2	6,6	9,1	9,2	7,9	12,4	9,2	10,4	8,7	2,0

* ungenügend Plasma vorhanden

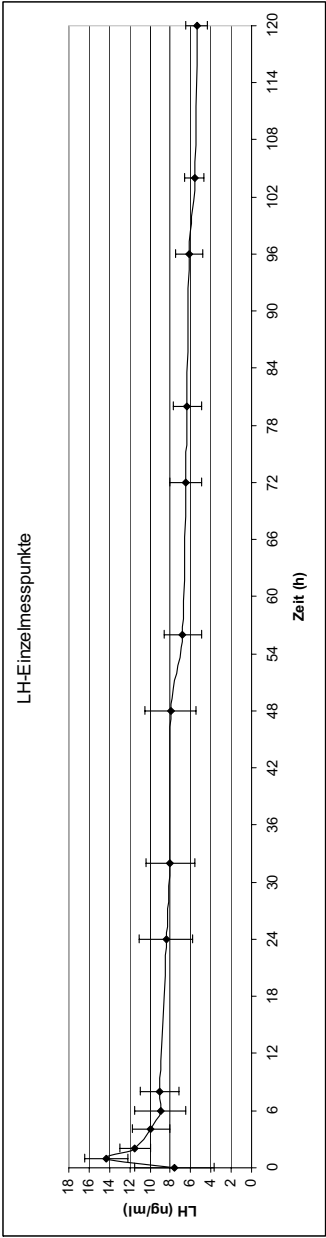


Abb. 25: Mittlerer Verlauf ($\bar{x} \pm \text{SD}$) der LH-Werte vor (0) und nach Implantation (1-120 h) in punktuell gewonnenen Blutproben

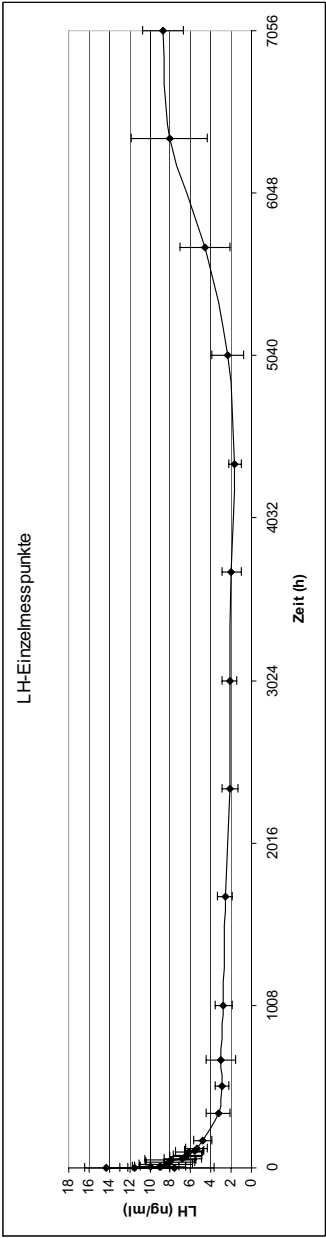


Abb. 26: Mittlerer Verlauf ($\bar{x} \pm \text{SD}$) der LH-Werte vor (0) und nach Implantation (1-7056 h) in punktuell gewonnenen Blutproben

5 Diskussion

Fragestellung, Versuchsdesign, Methodik

Alternativen zur chirurgischen Kastration sind heute insbesondere in der Kleintierpraxis vermehrt vorgebrachte Forderungen. Diese ergeben sich einmal aus ethischen Gründen, d.h. die Tierhalter wollen eine Operation und die damit verbundene Entfernung der Gonaden auf alle Fälle vermeiden. Daneben ergibt sich die Forderung aber auch aus medizinischen Indikationen, z.B. dass ein echtes Narkoserisiko besteht oder aber dass allenfalls eine temporäre, d.h. befristete, Hemmung der Gonadenfunktion gewünscht wird.

In der Praxis wurden diesbezügliche Erfahrungen bisher insbesondere mit Rüden gemacht, wobei die temporäre Kastration durch Anwendung eines GnRH-Implantates mit nachfolgender Downregulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren erreicht wurde (Riesenbeck et al. 2002).

Zu dieser Möglichkeit der Unterdrückung der Gonadenfunktion lagen Erfahrungen bei der Hündin bis jetzt nicht vor. Bisher erschienene Erfolgsberichte beziehen sich ausschließlich auf die Anwendung bei präpubertären Hündinnen, bei denen mittels Downregulation eine deutliche Verschiebung des Eintrittes des ersten Östrus erreicht werden konnte (CONCANNON et al. 1988, RUBION et al. 2004, TRIGG et al. 2004). Die Unterdrückung der Läufigkeit bzw. die Läufigkeitsverschiebung bei geschlechtsreifen Hündinnen basiert deshalb nach wie vor auf der Anwendung von Gestagenen. Dieses Verfahren wird weltweit praktiziert; im Hinblick auf die - auch in Abhängigkeit vom Präparat - beobachteten Nebenwirkungen, wie die vermehrte Inzidenz von Mammatumoren oder das Auftreten von Endokrinopathien (COX 1970, WITHERS & WHITNEY 1967, EVANS & SUTTON 1989, JOHNSTON et al. 2001b), wäre es wünschenswert, auch dazu wirksame Alternativverfahren zur Verfügung zu haben.

Ziel vorliegender Untersuchungen war es daher, in einem Modellversuch zu überprüfen, inwieweit durch Verabreichung eines GnRH-wirksamen Implantates bei der Hündin der Effekt der Downregulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren erreicht werden kann. Da sich das Ergebnis einer solchen Downregulation in einer Hemmung der LH- und FSH-

Sekretion manifestiert (CLAYTON 1982, D'OCCHIO & ASPDEN 1999), wurde als Maßstab für eine erfolgte Downregulation die LH-Sekretionscharakteristik erfasst. Nachdem weiterhin die bisher in der Praxis gemachten Erfahrungen nach Anwendung eines GnRH-Implantates bei intakten, geschlechtsreifen Hündinnen zu offensichtlich unklaren und nur schwer interpretierbaren Ergebnissen geführt hatten, (HOFFMANN 2000, persönliche Mitteilung), wurden die vorliegenden Untersuchungen an ovariohysterektomierten Hündinnen durchgeführt. Durch die Ovariohysterektomie sollte ausgeschlossen werden, dass negativ rückkoppelnde Mechanismen gonadaler Steroide überlagernd zur Wirkung des GnRH-wirksamen Implantates die LH-Freisetzung beeinflussen. Es wurde erwartet, dass an diesem Modell „echte Werte“ für die durch das GnRH-Implantat induzierte Hemmung der LH- Sekretion erhalten werden können. Analog zur Situation beim Rüden (RIESENBECK et al. 2002) wurde davon ausgegangen, dass an diesem Modell die initiale Aufregulierung der Gonadenfunktion, die nachfolgende Phase des Rückgangs der LH-Sekretion auf Basalwerte, die Dauer der basalen LH-Sekretion sowie das „Wieder in Gang kommen“ der Gonadenfunktion nach Wirkungsverlust des Implantates erfasst werden können.

Weiteres Ziel vorliegender Untersuchungen war es, Hinweise auf Dosis-Wirkungsbeziehungen zu erhalten. Demzufolge wurden drei Gruppen zu je drei Tieren mit der einfachen (3,3 mg/Implantat), der doppelten (6,6 mg/Implantation) und der vierfachen Dosis (13,2 mg/Implantation) behandelt. Bei dem GnRH-Analogon handelt es sich um den Wirkstoff Buserelinazetat, die verabreichten Implantate entsprachen von der Galenik dem für die Humanmedizin zugelassenen Präparat Profact®.

Alle Hündinnen wurden im Diöstrus ovariohysterektomiert. Die zu diesem Zeitpunkt gemessenen Progesteronwerte lagen im Mittel bei $36,0 \pm 16,3$ ng Progesteron. Es war also davon auszugehen, dass präoperativ mit der charakteristischen, auf niedrigem Niveau verlaufenden LH-Freisetzung gerechnet werden konnte (HOFFMANN & SCHNEIDER 1993). Aufbauend auf dieser Beobachtung wurde weiter davon ausgegangen, dass nach Entfernung der Ovarien und der damit verbundenen Aufhebung der negativ rückkoppelnden Wirkung von Progesteron, eine deutliche Steigerung der LH-Sekretion

erfolgt; ein Ausbleiben dieses Anstiegs würde darauf hinweisen, dass ggf. eine Endokrinopathie vorliegt.

Da auch beim Hund eine pulsatile LH-Freisetzung beschrieben wurde (CONCANNON et al. 1989, CONCANNON 1993, JEFFCOATE 1993, KOOISTRA et al. 1999a) wurde auch in vorliegender Arbeit entsprechend früherer Untersuchungen (SCHNEIDER 1992) die Charakteristik der LH-Freisetzung im Rahmen so genannter „Zeitfenster“ erfasst. Bei einem Zeitfenster handelt es sich um einen Zeitraum von 6 Stunden, bei dem im Abstand von 20 Minuten Blutproben zur Bestimmung von LH entnommen wurden. Das erste Zeitfenster lag mindestens 10 Tage vor der Ovariohysterektomie, Zeitfenster 2 und 3 wurden auf die Tage 21 und 35 nach der Ovariohysterektomie festgesetzt. Die Zeitfenster 4, 5 und 6 ergaben sich 14, 28 und 42 Tage nach Behandlungsbeginn, danach folgten Zeitfenster im Abstand von 4 Wochen, bis die LH-Werte wieder das Ausgangsniveau vor Behandlungsbeginn erreicht hatten. In diesem Versuchsdesign dienten die Tiere demzufolge als ihre eigene Kontrolle. Wie bereits früher beschrieben (HOFFMANN & SCHNEIDER 1993), wurde auch in vorliegender Arbeit zur Beschreibung der LH-Sekretion für jedes Zeitfenster die AUC (area under the curve), der Basalwert, die Zahl der Impulse sowie die maximale Impulsamplitude ($C_{\max}$) erfasst.

Parallel zur Erfassung von LH im Rahmen der Zeitfenster wurden auch Einzelblutproben zunächst in stündlichen, dann in täglichen und schließlich in 14- bis 28-tägigen Abständen entnommen. Im Vergleich mit den während der Zeitfenster erhaltenen Ergebnissen sollten die LH-Messungen in diesen Blutproben einen Hinweis darauf geben, inwieweit in der Praxis durch Einzelmessungen von LH auf die Wirksamkeit des Implantates geschlossen werden kann.

Zur Bestimmung von LH kam ein hier etablierter (HOFFMANN, unveröffentlichte Ergebnisse) Enzym-Immuno-Assay (EIA) zur Anwendung. In diesem Test wurden Mikrotiterplatten zunächst mit einem 2. Antikörper (Goat-anti-mouse IgG FC spezifisch) beschichtet, danach erfolgte die Beschichtung mit dem ersten, monoklonalen Antikörper 518B7 Mouse-Antibovine, der uns dankenswerter Weise von Prof. Dr. Janet Roser, University of California, Davis, zur Verfügung gestellt worden war. Dieser Antikörper

weist eine hohe Kreuzaktivität mit LH-unterschiedlicher Spezies auf (MATERI et al. 1987). Um eine möglichst hohe Empfindlichkeit zu erreichen, wurde der Test als Sequenztest angesetzt (STRECKER et al. 1997), d.h. das als Tracer dienende biotinylierte bovine LH (USDA bLH1-1) wurde 24 Stunden nach Inkubation mit dem ersten Antikörper zugesetzt. Als Standard diente canines LH (LER-1685-1). Mit diesem heterologen Test ergaben sich gut reproduzierbare Werte, der Intra-Assay-Variationskoeffizient lag im hohen Bereich bei 9,8 % und bei 18,6 % im niedrigen Bereich. Die entsprechenden Inter-Assay-Variationskoeffizienten lagen bei 6,5 bzw. 29,2 %. Bei Verdünnung von Blutproben mit hohem LH-Gehalt ergaben sich lineare Regressionen. Der entwickelte LH-Test erwies sich demnach als zuverlässig, der erhaltene Datensatz lässt relevante Ergebnisse im Hinblick auf erzielbare bzw. nicht erzielbare Effekte erwarten.

Ergebnisse

Wie in Kapitel 4.2 dargestellt, kam es in den Zeitfenstern 2 und 3 im Vergleich zum Zeitfenster 1 zu einer signifikanten Erhöhung der AUC sowie der Basalwerte ($p < 0,001$) von LH. Dies zeigt den erwarteten Anstieg der Verfügbarkeit von LH. Dysfunktionen der Hypothalamus-Hypophysenachse bei den in den Versuch aufgenommenen Hunden können demzufolge ausgeschlossen werden.

Gemessen an der AUC sowie den Basalwerten ergab sich mit $p < 0,0001$ ein hochsignifikanter Behandlungseffekt. Kein Effekt zeigte sich dagegen für die Zahl der LH-Pulse pro Zeitfenster sowie die maximale Amplitudenhöhe ($C_{\max}$); bei dem Parameter Zahl der Pulse fällt auf, dass sich sowohl vor als auch nach der Implantation Zeitfenster ergaben, in denen keine Pulse feststellbar waren.

Überrascht hat der Befund, dass sich bei den auf die Behandlung hochsignifikant verändernden Parametern AUC und Basalwerte keine Abhängigkeiten von der verabreichten Dosis zeigten (Implantation von 3,3; 6,6 und 13,2 mg Wirkstoff). Dieser Befund lässt darauf schließen, dass in vorliegenden Untersuchungen und in dem gewählten Tiermodell (kastrierte weibliche Beaglehündinnen) bereits die niedrigste Dosis zu einer maximalen Wirkung führte, die durch eine Dosiserhöhung nicht mehr steigerbar war.

Die für die drei Gruppen erhaltenen Befunde können demnach zusammengefasst und einheitlich dahingehend interpretiert werden, dass bereits im 4. Zeitfenster, d.h. 14 Tage nach der Implantation, die AUC und die Basalwerte auf das unterste erreichbare Niveau abgefallen waren. Über die folgenden neun Zeitfenster zeigten sich keine Veränderungen, im 14. Zeitfenster, d.h. 266 Tage nach der Implantation, waren die Ausgangswerte wieder erreicht. Bereits im 13. Zeitfenster war bei allen drei Gruppen ein erster Anstieg zu erkennen; dieser war nur für die Gruppe 2 gemessen an der AUC und dem Basalwert im Vergleich zu Zeitfenster 12 statistisch signifikant ($p < 0,05$). Die vorliegenden Untersuchungen haben demnach über alle Gruppen hinweg eine einheitliche Wirkungsdauer von 238 Tagen ergeben, gerechnet ab dem Zeitpunkt der Implantation.

Die Phase der Downregulation selbst lag bei 224 Tagen. Während der Phase der Downregulation ergab sich für die AUC ($\bar{x}_g$, SF) über alle Gruppen hinweg ein Durchschnittswert von 762,0 (1,3) ng/ml*min, der entsprechende Wert für die Basalwerte ($\bar{x}_g$, SF) lag bei 2,0 (1,4) ng/ml. Diese Werte liegen noch unter jenen Werten ($p < 0,01$), wie sie im ersten Zeitfenster unter der negativ rückkoppelnden Wirkung von Progesteron gemessen wurden [AUC 1133,2 (1,29) ng/ml*min, Basalwert 2,72 (1,31) ng/ml]. Aus diesen Befunden kann in Verbindung mit den Ergebnissen von HOFFMANN & SCHNEIDER (1993) zur LH Sekretion während des Diöstrus und deren Stimulierbarkeit durch GnRH geschlossen werden, dass die unter der Downregulation gemessene LH-Freisetzung als eine Basalsekretion zu interpretieren ist, die Verfügbarkeit von LH liegt noch unterhalb der im ersten Drittel des Diöstrus gemessenen.

Die in Abb. 25 und 26 sowie in Tab. 21 zusammengefassten Ergebnisse der punktuellen LH-Messungen lassen erkennen, dass unmittelbar nach Verabreichung der Implantate die LH-Werte im Blutplasma angestiegen waren. Diese waren nach einer Stunde etwa doppelt so hoch wie die Ausgangswerte. Das Niveau der Ausgangswerte war nach ca. 6 Std. wieder erreicht. Erstmals lagen nach 120 Stunden (5 Tagen) die durchschnittlichen LH-Konzentrationen signifikant ($p < 0,05$) unter den Ausgangskonzentrationen. Von diesem Zeitpunkt an ergab sich über die gesamte Phase der Downregulierung ein gleich bleibend niedriges Niveau der LH-Konzentrationen. Das heißt, ab diesem Zeitpunkt (Zeitpunkt 120 h) kann von einer Manifestation der Downregulierung gesprochen werden. Auch bei

den punktuellen LH-Messungen zeigte sich das Nachlassen der Implantatwirkung durch einen Anstieg der durchschnittlichen LH-Konzentrationen; so ergab sich für die 34. Woche noch ein signifikanter Unterschied zu den Ausgangskonzentrationen ($p > 0,02$), in der 38. Woche war dieser nicht mehr gegeben.

Bei dem unmittelbar nach der Implantation festgestellten Anstieg der LH-Konzentrationen handelt es sich um ein erwartetes Ereignis. Verschiedene Untersuchungen (MC RAE et al. 1985, CONCANNON 1989, VICKERY et al. 1989, TRIGG et al. 2004) haben gezeigt, dass in Folge dieses Anstieges ein Östrus auftrat (präpubertäre Tiere), bzw. bei geschlechtsreifen Hündinnen die Läufigkeit induziert wurde. In letzteren Fällen hatten die Behandlungen in den Phasen Proöstrus, später Diöstrus und früher Anöstrus des Sexualzyklus stattgefunden. Daraus ergibt sich, dass - anders als z.B. beim Rüden (RIESENBECK et al. 2002)- der Erfolg der Downregulation und der dadurch induzierten zeitlich befristeten hormonellen Kastration, an den Zeitpunkt der Behandlung während des Sexualzyklus gebunden ist. Unbeschadet der neuroendokrinen Umstellung der Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-Gonadenachse beim Übergang vom Diöstrus in den Anöstrus, scheint das System immer noch die notwendige Empfindlichkeit aufzuweisen, um auf eine vermehrte Verfügbarkeit von GnRH und demzufolge von LH mit dem Eintreten von Östrus und Läufigkeit zu reagieren. Diese Ansprechbarkeit der neuroendokrinen Regulation der Fortpflanzung bei der Hündin zeigt sich auch an der Tatsache, dass – wie oben festgestellt – zu jedem Zeitpunkt LH – wenn auch in verringerten Mengen – verfügbar ist. Offensichtlich reichen diese Mengen aus, um z.B. durch Induktion der Synthese von LH-Rezeptoren an den Zielzellen im Ovar jederzeit die notwendige Ansprechbarkeit zu garantieren. Um diese initiale stimulierende Wirkung eines GnRH-Implantates zu umgehen, bietet sich an, die Behandlung in das 1. Drittel des Diöstrus zu legen, also die Zyklusphase, in der die hohen Progesteronkonzentrationen eine deutliche, negativ rückkoppelnde Wirkung auf den Hypothalamus ausüben und eine Freisetzung von LH nach Applikation von GnRH nicht möglich ist (HOFFMANN & SCHNEIDER 1993). Hier ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Progesteronverlaufskurven bei Haushunden durchaus unterschiedlich sein können (HOFFMANN & GERRES 1989), so dass man nicht pauschal einen Behandlungszeitraum von z.B. 5 bis 15 Tage nach Ende der Läufigkeit (Östrusende) angeben kann. Vielmehr sollte die Implantation an einen ausreichend hohen

Progesteronwert gekoppelt sein. Entsprechende Referenzwerte liegen allerdings noch nicht vor, so dass allenfalls vermutet werden kann, dass Werte > 10 ng/ml Plasma erreicht sein müssen.

Eine weitere denkbare Lösung könnte darin bestehen, das zusätzlich freigesetzte LH durch Anwendung eines Antiserums zu blockieren. Ein solches Vorgehen hat sich als erfolgreich erwiesen bei der Blockade von überschüssigem eCG bei Anwendung eines entsprechenden Antiserums (Neutra-PMSG®) im Rahmen des Embryotransfer.

Zusammenfassend ergibt sich also, dass durch Verabreichung eines GnRH-wirksamen Implantates bei der Hündin eine Downregulierung mit nachfolgender weitgehender Hemmung der LH-Freisetzung erzielt werden kann. Die verbliebene Verfügbarkeit entspricht annähernd den Werten, wie sie unter der negativ-rückkoppelnden Wirkung von Progesteron im frühen Diöstrus gemessen werden. Eine Applikation sollte in dieser Phase des Sexualzyklus erfolgen, da vermutlich nur in dieser Phase die initiale Freisetzung von LH unterbleibt, eine Downregulation der GnRH-Rezeptoren jedoch stattfindet. Dieser These wäre in weiteren Versuchen nachzugehen.

6 Zusammenfassung

In vorliegenden Untersuchungen sollte geklärt werden, inwieweit bei der Hündin durch Applikation eines GnRH wirksamen Präparates in unterschiedlichen Dosierungen eine Downregulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren und damit eine Hemmung der LH-Freisetzung als Voraussetzung für den Effekt einer zeitlich befristeten hormonellen Kastration erreicht werden kann. Die Untersuchungen wurden an Gruppen zu je drei Beaglehündinnen durchgeführt, denen jeweils 3,3, 6,6 bzw. 13,2 mg des GnRH wirksamen Analogons Buserelin in Form eines Implantates verabreicht worden waren. Die Charakterisierung der LH-Freisetzung erfolgte dabei primär anhand von Zeitfenstern, wobei sich ein Zeitfenster über eine Spanne von 360 min erstreckte in der Blutproben in 20 min Intervallen zur LH-Bestimmung entnommen wurden. Parallel dazu erfolgten Einzelblutprobenentnahmen, die – angepasst an den erwarteten Verlauf der LH-Freisetzung – zunächst in stündlichen Intervallen und letztlich in 28tägigen Intervallen erfolgten. Um möglich Einflüsse negativ rückkoppelnder Wirkungen von Ovarhormonen ausschließen zu können, wurden die Untersuchungen an ovariohysterektomierten Tieren durchgeführt. Die Operation wurde, kontrolliert am Verlauf der Progesteronwerte, in der Phase des Diöstrus durchgeführt, alle Tiere reagierten als Zeichen eine intakten Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse nach Entfernung der Ovarien (Wegfall negativer Feedbackmechanismen) mit dem erwarteten Anstieg der Verfügbarkeit von LH. Die Tiere dienten als ihre eigenen Kontrollen, d. h. vor der Implantation wurden zwei Zeitfenster platziert. Die Platzierung der Zeitfenster nach der Implantation erfolgte 14, 28 und 42 Tage danach, weitere Zeitfenster erfolgten bis zum Versuchsende in 4-wöchigen Abständen. Als Versuchsende wurde der Zeitpunkt definiert, an dem die Verfügbarkeit von LH wieder der vor der Implantation entsprach.

Bereits 14 Tage nach der Implantation zeigte sich eine signifikante Verminderung der Verfügbarkeit von LH ($p < 0,0001$) gemessen an der AUC und der LH-Basalkonzentration. Die Zahl der pro Zeitfenster erfassten LH-Pulse sowie deren Amplitude war dabei nicht verändert. Ein entsprechender Effekt zeigte sich bei der Bestimmung von LH in den punktuell entnommenen Blutproben. Dosiseffekte ergaben sich nicht, über alle Gruppen hinweg lag, gemessen ab dem Zeitpunkt der Implantation, die Phase der Downregulation

bei 238 Tagen. Die während der Phase der Downregulation noch messbare LH Sekretion ist als „Basalsekretion“ zu interpretieren, die diejenige im ersten Drittel des Diöstrus (maximale negative rückkoppelnde Wirkung ovarieller Steroide) unterschreitet.

Die punktuellen Blutentnahmen zeigen, dass in den ersten Stunden nach der Verabreichung des GnRH-wirksamen Implantates eine deutliche Steigerung der LH Sekretion festzustellen ist. In Abhängigkeit vom Stadium des Reproduktionszyklus (z. B. Anöstrus) kann durch diesen Anstieg eine Läufigkeit induziert werden. Daraus wird gefolgert, dass eine Behandlung zur Läufigkeitsunterdrückung in das erste Drittel des Diöstrus zu legen ist, in der auf Grund der negativ rückkoppelnden Wirkung ovarieller Steroide durch GnRH eine LH Freisetzung nicht provoziert werden kann, wohl aber mit dem Eintreten des Effektes der Downregulation zu rechnen ist.

7 Summary

The present experiments were designed to test for the possibility to induce a downregulation of pituitary GnRH-receptors and hence an inhibition of LH-secretion by application of a GnRH-active implant. By achieving such an effect a temporary hormonal castration could be obtained. The experiments were performed with groups of three beagle bitches, dosed with either 3.3, 6.6 or 13.2 mg of the GnRH analogon Buserelin in form of an implant. To characterise availability of LH, time windows were set; each window consisted of a period of 360 min where blood samples were taken in 20 min intervals. In parallel single blood samples were taken, timing was according to the expected release of LH, initially in hourly intervals and finally in 20 day intervals. To eliminate likely negative feedback mechanisms of ovarian hormones, the experiments were performed with ovariectomised bitches. As controlled by determinations of progesterone concentrations, ovariectomy was carried out during dioestrus. Following ovariectomy all dogs exhibited an increased availability of LH as an indication of an intact hypothalamus-pituitary-gonadal axis. The bitches served as their own controls. That is two time windows were placed prior to implantation, time windows after implantation were 14, 28 and 42 days afterwards, followed by time windows in 4-week-intervals until end of the experiment. By definition end of the experiment was the reaching of LH-levels as observed prior to implantation.

As determined by the area under the curve (AUC) and LH-basal concentrations, availability of LH was significantly reduced ($p < 0.0001$) 14 days after implantation. No changes were observed in respect to the number of LH-pulses and their amplitude. A respective effect was observed in the single blood samples collected. There were no dose effects and when measured from the time of implantation, downregulation lasted for an average of 238 days. The availability of LH as determined during downregulation must be considered as a basal secretion since it was lower when compared to the availability as observed during dioestrus, that is when ovarian steroids exhibit a maximum negative feedback action.

The single blood samples taken show a significant increase of LH during the first hours after implantation. Depending on the stage of the reproductive cycle this increase must be considered responsible for the induced oestrus observed in previous studies. From this observation it is concluded, that a treatment with a GnRH-active implant to achieve downregulation must be placed in the first trimester of dioestrus making use of the already existing feedback action of ovarian steroids. By this the first 14 critical days until achievement of downregulation could be overcome.

8 Literaturverzeichnis

Al-Kafawi, A.A., Hopwood, M.L., Pineda, M.H., Faulkner, L.C. (1974)

Immunization of dogs against human chorionic gonadotropin

Am J Vet Res, 35: 261-264

Andersen, A.C., Simpson, M.E. (1973)

The ovary and reproductive cycle of the dog (beagle)

Verlag Geron-X Inc., Los Altos, CA

Bint Akhtar, F., Weinbauer, G.F., Nieschlag, E. (1985)

Acute and chronic effects of a gonadotrophin-releasing hormone antagonist on pituitary and testicular function in monkeys

J Endocrinol, 104: 345-354

Borgmann, V., Hardt, W., Schmidt-Gollwitzer, M., Adenauer, H., Nagel, R. (1982)

Sustained suppression of testosterone production by the luteinising-hormone releasing-hormone agonist buserelin in patients with advanced prostate carcinoma. A new therapeutic approach?

Lancet, 1: 1097-1099

Bouchard, G.F., Gross, S., Ganjam, V.K., Youngquist, R.S., Concannon, P.W., Krause, G.F., Reddy, C.S. (1993)

Oestrus induction in the bitch with the synthetic oestrogen diethylstilboestrol

J Reprod Fertil, Suppl 47: 515-516

Brown, B.W., Mattner, P.E., Carroll, P.A., Holland, E.J., Paull, D.R., Hoskinson, R.M., Rigby, R.D. (1994)

Immunization of sheep against GnRH early in life: effects on reproductive function and hormones in rams

J Reprod Fertil, 101: 15-21

- Cain, J.L., Lasley, B.L., Cain, G.R., Feldman, E.C., Stabenfeldt, G.H. (1989)
Induction of ovulation in bitches with pulsatile or continuous infusion of GnRH
J Reprod Fertil, Suppl 39: 143-147
- Clark, J.H., Markaverich, B.M. (1988)
Actions of ovarian steroidhormones
In: E. Knobil and J.D. Neill (Eds.): The physiology of Reproduction, Vol.1
Raven Press, New York, pp 675-724
- Clayton, R.N. (1982)
Gonadotropin-releasing hormone modulation of its own pituitary receptors: evidence
for biphasic regulation
Endocrinology, 111: 152-161
- Concannon, P.W. (1980)
Effects of hypophysectomy and of LH administration on luteal phase plasma
progesterone levels in the beagle bitch
J Reprod Fertil, 58: 407-410
- Concannon PW (1989)
Induction of fertile oestrus in anoestrous dogs by constant infusion of GnRH agonist
J Reprod Fertil, Suppl 39: 149-160
- Concannon, P.W. (1993)
Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs
J Reprod Fert, Suppl 47: 3-27
- Concannon, P.W., Hansel, W., Visek, W.J. (1975)
The Ovarian Cycle of the Bitch: Plasma Estrogen, LH and Progesterone
Biol Reprod, 13: 112-121

Concannon, P.W., Hansel, W., McEntee, K. (1977)

Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch

Biol Reprod, 17: 604-613

Concannon, P.W., Weinstein, P., Whaley, S., Frank, D. (1987)

Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and by Bromocriptine

J Reprod Fert, 81: 175-180

Concannon, P.W., Montanez, A., Frank, D. (1988)

Suppression of LH secretion by constant infusion of GnRH Agonist in ovx dogs and prolonged contraception of prepubertal bitches by constant subcutaneous administration of GnRH-Agonist

11. International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination (Dublin) Brief Communications, Vol. 4: 427-429

Concannon, P.W., McCann, J.P., Temple, M. (1989)

Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog.

J Reprod Fert, Suppl 39: 3-25

Cox, J.E. (1970)

Progestagens in bitches: a review

J small Anim Pract, 11: 759-778

Dixon, W.J. (1993)

“BMDP Statistical Software Manual Vol 1 and 2”

University of California Press, Berkley, Los Angeles, London

D'Occhio, M.D., Aspden, W.J. (1999)

Endocrine and reproductive responses of male and female cattle to agonists of gonadotrophin-releasing hormone.

J Reprod Fert, Suppl 54: 101-114

Döcke, F. (1994a)

Veterinärmedizinische Endokrinologie

Hypothalamus-Adenohypophysensystem

Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart 1994, pp 162-175

Döcke, F. (1994b)

Veterinärmedizinische Endokrinologie

Regulation der Keimdrüsenfunktionen

Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart 1994, pp 399-508

Döcke, F. (1994c)

Veterinärmedizinische Endokrinologie

Regulation der Prolactinsekretion

Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart 1994, pp 207-211

Dunshea, F.R., Colantoni, C., Howard, K., McCauley, I., Jackson, P., Long, K.A., Lopaticki, S., Nugent, E.A., Simons, J.A., Walker, J., Hennessy, D.P. (2001)

Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance

J Anim Sci, 79: 2524-2535

Evans, J.M., Sutton, D.J. (1989)

The use of hormones, especially progestagens, to control oestrus in bitches

J Reprod Fertil, Suppl 39: 163-173

Feldmann, E.C. & Nelson, R.W. (1987)

Canine and feline reproduction

In: Canine and feline Endocrinology and Reproduction. W.B. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, pp 399-480

Ferland, L., Marchetti, B., Seguin, C., Lefebvre, F.A., Reeves, J.J., Labrie, F. (1981)

Dissociated changes of pituitary luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptors and responsiveness to the neurohormone induced by 17 beta-estradiol and LHRH in vivo in the rat

Endocrinology, 109: 87-93

Fleming R, Adam AH, Barlow DH, Black WP, MacNaughton MC, Coutts JR.

A new systematic treatment for infertile women with abnormal hormone profiles.

Br J Obstet Gynaecol, 89: 80-83.

Fujino, M., Shinagawa, S., Obayashi, M., Kobayashi, S., Fukuda, T. (1973)

Further studies on the structure-activity relationships in the C-terminal part of luteinizing hormone-releasing hormone

J Med Chem, 16: 1144-1147

Godfrey, S.I., Walkden-Brown, S.W., Martin, G.B., Speijers, E.J. (1996)

Immunisation of goat bucks against GnRH to prevent seasonal reproductive and agonistic behaviour

Anim Reprod Sci, 44: 41-54

Gräf, K.J. (1978)

Serum oestrogen and prolactin concentrations in cyclic, pregnant and lactating beagle dogs

J Reprod Fertil, 52: 9-14

Hammond, J., Jr., Hammond, J., Parkes, A.S. (1942)

Hormonal augmentation of fertility in sheep. I. Induction of ovulation, superovulation and heat in sheep.

J Agric Sci, 32: 308-323

Hegstad, R.L., Johnston, S.D., Pasternak, D.M. (1993)

Concentrations and pulse analyses of adrenocorticotrophin and luteinizing hormone in plasma from dogs in pro-oestrus, oestrus, dioestrus or anoestrus.

J Reprod Fertil, Suppl 47: 77-84

Hodgen, G.D., Itskowitz, J. (1988)

Recognition and Maintenance of Pregnancy.

In: E. Knobil and J.D. Neill (eds.), The Physiology of Reproduction.

Raven Press, Vol. 2, New York, pp. 1995-2021,

Höveler, R (1991)

Untersuchungen zur endokrinen Kontrolle der Overfunktion bei der graviden und ingraviden Hündin.

Inaugural-Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Hoffmann, B., Kyrein, H.J., Ender, M.L. (1973)

An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma.

Horm Res, 4: 302-310

Hoffmann, B., Gerres, S. (1989)

Modellversuch zur Darstellung der antigestagenen Wirkung von RU 38486 bei der Hündin

Wien Tierärztl Mschr, 76: 10-14

- Hoffmann, B., Höveler, R., Hasan, S.H., Failing, K. (1992)
Ovarian and pituitary function in the dog following hysterectomy
J Reprod Fert, 96: 837-845
- Hoffmann, B., Schneider, S. (1993)
Secretion of luteinizing hormone during the luteal phase of the oestrus cycle in the dog
J Reprod Fert, Suppl 47: 85-91
- Hoffmann, B., Riesenbeck, A., Klein, R. (1996)
Reproductive endocrinology of bitches
Anim Reprod Sci, 42: 275-288
- Hoffmann, B., Riesenbeck, A., Schams, D., Steinetz, B.G. (1999)
Aspects on hormonal control of normal and induced parturition in the dog
Reprod Dom Anim, 34: 219-226
- Hoffmann, B., Büsges, F., Engel, E., Kowalewski, M.P., Papa, P. (2004)
Regulation of corpus luteum-function in the bitch
Reprod Dom Anim, 39: 232-240
- Hohlweg, W. (1934)
Veränderungen des Hypophysenvorderlappens und des Ovariums nach Behandlung mit
großen Dosen von Follikelhormon
Klin Wschr, 13: 92-95
- Hoskinson, R.M., Rigby, R.D., Mattner, P.E., Huynh, V.L., D'Occhio, M., Neish, A., Trigg,
T.E., Moss, B.A., Lindsey, M.J., Coleman, G.D., et al. (1990)
Vaxstrate: an anti-reproductive vaccine for cattle
Aust J Biotechnol, 4: 166-170, 176

Inaba, T., Tani, H., Gonda, M., Nakagawa, A., Ohmura, M., Mori, J., Torii, R., Tamada, H., Sawada, T. (1998)

Induction of fertile estrus in bitches using a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate)

Theriogenology, 49: 975-982

Jeffcoate, I.A. (1993)

Endocrinology of anoestrus bitches

J Reprod Fert, Suppl 47: 69-76

Jegou, B., Brekke, I., Naess, O., Torjesen, P., Hansson, V. (1985)

Properties and regulation of GnRH receptors in the anterior pituitary and the testis of the rat: different response of Leydig cell LH and GnRH receptors to hormonal treatments

Arch Androl, 14: 161-70

Jöchle, W., Arbeiter, K., Post, K., Ballabio, R., D'Ver, A.S. (1989)

Effects on pseudopregnancy, pregnancy and interoestrous intervals of pharmacological suppression of prolactin secretion in female dogs and cats

J Reprod Fertil, Suppl 39: 199-207

Johnston, S.D., Kustritz, M.V.R., Olson, P.N.S. (2001a)

Chapter 4: Breeding Managment and AI of the bitch

In: Canine and Feline Theriogenology

W.B. Saunders Company, pp 51-52

Johnston, S.D., Kustritz, M.V.R., Olson, P.N.S. (2001b)

Chapter 9: Prevention and Termination of Canine Pregnancy

In: Canine and Feline Theriogenology

W.B. Saunders Company, pp 177-178

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

Reprod Domest Anim, 38:13-20

Klijn, J.G.M., de Jong F.H. (1982)

Treatment with a luteinizing-hormone-releasing-hormone analogue (Buserelin) in premenopausal patients with metastatic breast cancer

The Lancet, 29: 1213-1216

Kooistra, H.S., Okkens, A.C., Bevers, M.M., Popp-Snijders, C., van Haaften, B., Dieleman, S.J., Schoemaker, J. (1999a)

Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of the estrous cycle and anestrus in beagle bitches

Biol Reprod, 60: 65-71

Kooistra, H.S., Okkens, A.C., Bevers, M.M., Popp-Snijders, C., van Haaften, B., Dieleman, S.J., Schoemaker, J. (1999b)

Bromocriptine-induced premature oestrus is associated with changes in the pulsatile secretion pattern of follicle-stimulating hormone in beagle bitches

J Reprod Fertil, 117: 387-393

Ladd, A., Tsong, Y.Y., Walfield, A.M., Thau, R. (1994)

Development of an antifertility vaccine for pets based on active immunisation against luteinizing hormone-releasing hormone

Biol Reprod, 51: 1076-1083

Lemay A, Quesnel G. (1982)

Potential new treatment of endometriosis: reversible inhibition of pituitary-ovarian function by chronic intranasal administration of a luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) agonist.

Fertil Steril, 38: 376-379.

- Matteri, R.L., Roser, J.F., Baldwin, D.M., Lipovetsky, V., Papkoff, H. (1987)
Characterisation of a monoclonal antibody which detects luteinizing hormone from
diverse mammalian species
Domest Anim Endocrinol, 4: 157-165
- McRae, G.I., Roberts, B.B., Worden, A.C., Bajka, A., Vickery, B.H. (1985)
Long-term reversible suppression of oestrus in bitches with nafarelin acetate, a potent
LHRH agonist
J Reprod Fertil, 74: 389-397
- Mutayoba, B.M., Meyer, H.H.D., Schams, D., Schallenberger, E. (1990)
Development of a sensitive enzyme immunoassay for LH determination in bovine
plasma using the streptavidin-biotin technique
Acta Endocrinol (Kph.), 122: 227-232
- Niswender, G.D., Nett, T.M. (1988)
The corpus luteum and its control.
In Knobil, E. and Neill, J.D. (eds), The Physiology of Reproduction.
Raven Press, Vol. I, New York, pp 489–526.
- Oettel, M. (1979)
Reproduktionsbiologie der Hündin
Mh Vet Med, 34: 937-942
- Okkens, A.C., Bevers, M.M., Dieleman, S.J., Willems, A.H. (1985)
Shortening of the interoestrous interval and the lifespan of the corpus luteum of the
cyclic dog by bromocryptine treatment
Vet Q, 7: 173-176
- 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
J Reprod Fertil, 77: 187-192

- Okkens, A.C., Bevers, M.M., Dielemann, S.J., Willemse, A.H. (1990)
Evidence für prolactin as the main luteotrophic factor in the cycling dog
Vet Q, 12: 193-201
- Okkens, A.C., Kooistra, H.S., Dieleman, S.J., Bevers, M.M. (1997a)
Dopamine agonistic effects as opposed to prolactin concentrations in plasma as the
influencing factor on the duration of anoestrus in bitches
J Reprod Fertil, Suppl 51: 55-58
- Okkens, A.C., Kooistra, H.S., Nickel, R.F. (1997b)
Comparison of long-term effects of ovariectomy versus ovariohysterectomy in bitches
J Reprod Fertil, Suppl 51: 227-231
- Olschewski, C. (1987)
Die Lactatio falsa der Hündin: Klinische und hormonanalytische Untersuchungen unter
besonderer Berücksichtigung einiger Therapieverfahren
Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig Universität
Gießen
- Olson, P.N., Bowen, R.A., Behrendt, M.D., Olson, J.D., Nett, T.M. (1982)
Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus,
proestrus and estrus
Biol Reprod, 27: 1196-1206
- Onclin, K., Verstegen, J.P., (1997a)
In vivo investigation of luteal function in dogs: effects of cabergoline, a dopamine
agonist, and prolactin on progesterone secretion during mid-pregnancy and –diestrus
Domest Anim Endocrinol, 14: 25-38

Onclin, K., Verstegen, J.P., (1997b)

Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant dioestrus beagle bitches

J Reprod Fertil, Suppl 51: 203-208

Papa de Carvalho, P. (2001)

Darstellung von Estradiol-17 β - und Progesteronrezeptoren im Corpus Luteum der Hündin zu definierten Zeitpunkten im Östrus und Diöstrus

Inaugural-Dissertation Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig Universität Gießen

Phemister, R.D., Holst, P.A., Spano, J.S., Hopwood, M.L. (1973)

Time of ovulation in the beagle bitch

Biol Reprod, 8: 74-84

Riesenbeck, A. (1997)

Untersuchungen über die Verfügbarkeit von LH bei ingraviden und graviden Hündinnen und zur Bedeutung des Regelfaktors PGF2a für die Luteolyse im peripartalen Zeitraum

Inaugural-Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Riesenbeck, A., Klein, R., Hoffmann B. (2002)

Downregulation, eine neue, reversible Möglichkeit zur Ausschaltung der Hodenfunktion beim Rüden

Der Praktische Tierarzt, 6: 512-520

Rijnberk, A. (1996)

Hypothalamus-pituitary system

Clinical endocrinology of dogs and cats

Rijnberk, A. (ed.); Kluwer Academic Publishers, pp 11-34

Rubion, S., Desmoulins, P.O., Riviere-Godet, E., Rutten, F., Flochlay, A., Driancourt, M.A. (2004)

Treatment with a subcutaneous GnRH Agonist containing controled release device reversibly prevents puberty in bitches

Abstracts book, 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduktion, Sao Paulo, Brazil

Sachs, L. (1984)

Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden

Springer Verlag, Heidelberg, 6.Auflage

Schallenberger, E. (1990)

Charakterisierung von Sekretionsrhythmen der Gonadotropine und Ovarsteroido während des Brunstzyklus, der Gravidität und post partum beim Rind.

Fortschritte der Veterinärmedizin, 40, Beiheft zum Zentralblatt für Veterinärmedizin, Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, pp 1-99

Schallenberger, E., Schöndorfer, A.M., Walters, D.L. (1985)

Gonadotropins and ovarian Steroids in cattle. I. Pulsatile changes of concentrations in the jugular vein throughout the oestrus cycle.

Acta Endocrinol (Kph.), 108: 312-321

Schally, A.V., Arimura, A., Coy, D.H. (1980)

Recent approaches to fertility control based on derivative of LH-RH

Vitam Horm, 38: 257-323

Schneider, S. (1992)

Untersuchungen zur Freisetzung von LH während des Zyklus der Hündin

Inaugural-Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Shille, V.M., Thatcher, M.J., Simmons, K.J. (1984)

Efforts to induce estrus in the bitch, using pituitary gonadotropins

J Am Vet Med Assoc, 184: 1469-1473

Smith, M.S., Mc Donald, L.E. (1974)

Serum levels of luteinizing hormone and progesterone during estrous cycle, pseudopregnancy and pregnancy in the dog

Endocrinology, 94: 404-412

Sokolowski, J.H., Geng, S. (1977)

Biological evaluation of mibolerone in the female Beagle

Am J Vet Res, 38: 1371-1376

Sonnack, M., Leiser, R., Meyer, W., Hoffmann, B. (2004)

Morphological characteristics of the canine Corpora lutea during dioestrus

Wien Tierärztl Mschr, 91, Suppl. 2: 63

Stabenfeldt, G.H., Shille V.M. (1977)

Reproduction in the dog and cat

In: Reproduction in Domestic Animals, Cole. H.H., Cupps, P.T. (eds.), 3rd ed.,

Academic Press, New York, San Francisco, London, pp 499-527

Strecker, H., Hachmann, H., Seidel, L. (1979)

Der Radioimmunoassay (RIA), eine hochspezifische, extrem empfindliche quantitative Analysemethode

Chemikerzeitung, Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, Sonderdruck 103: 53-68

Tani, H., Inaba, T., Nonami, M., Matsuyama, S., Takamori, Y., Torii, R., Tamada, H., Kawate, N., Sawada, T. (1999)

Increased LH pulse frequency and estrogen secretion associated with termination of anestrus followed by enhancement of uterine estrogen receptor gene expression in the beagle bitch

Theriogenology, 52: 593-607

Tremblay, Y., Bélanger, A. (1984)

Reversible inhibition of gonadal functions by a potent gonadotropin-releasing hormone agonist in adult dog

Contraception, 30: 483-497

Trigg, T.E., Doyle, A.G., Walsh, J.D., Theerawat Swangchan-uthai (2004)

Advances in the use of the GnRH-Agonist Deslorelin in control of reproduction

Abstracts book, 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction, Sao Paulo, Brazil

Van Haften, B., Bevers, M.M., van den Brom, W.E., Okkens, A.C., van Sluijs, F.J., Willemse, A.H., Dieleman, S.J. (1994)

Increasing sensitivity of the pituitary to GnRH from early to late anoestrus in the beagle bitch

J Reprod Fertil, 101: 221-225

Van Os, J.L., Oldenkamp, E.P. (1978)

Oestrus control in bitches with proligestone, a new progestational steroid

J small Anim Pract, 19: 521-529

Verstegen, J., Onclin, K., Silva, L., Concannon, P. (1997)

Termination of obligate anoestrus and induction of fertile ovarian cycles in dogs by administration of purified pig LH

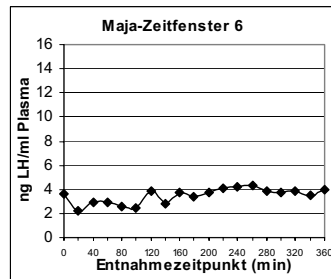
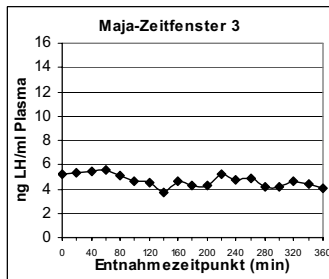
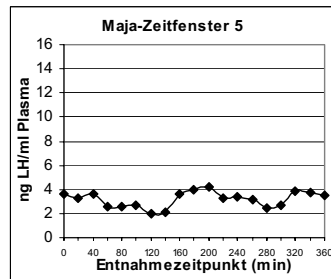
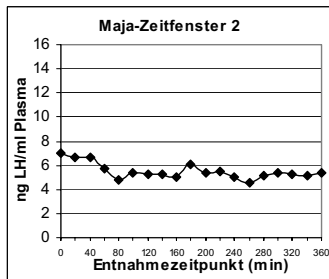
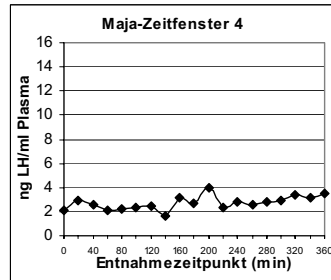
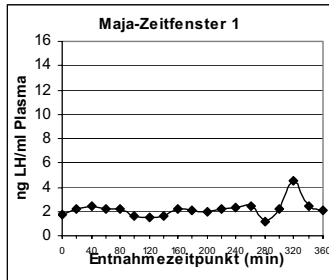
J Reprod Fertil, 111: 35-40

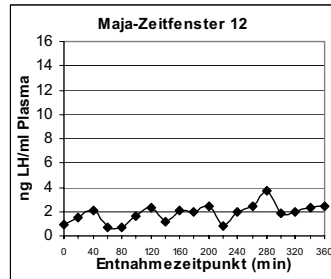
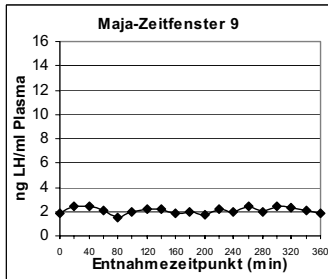
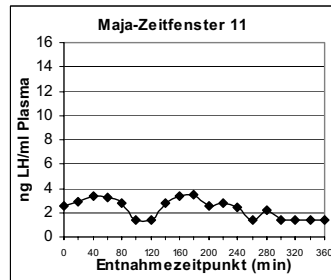
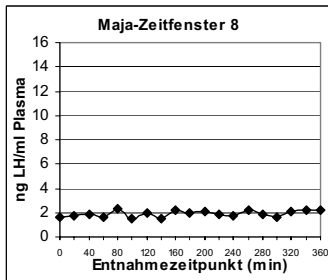
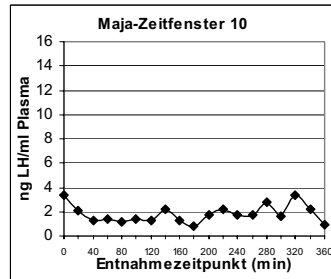
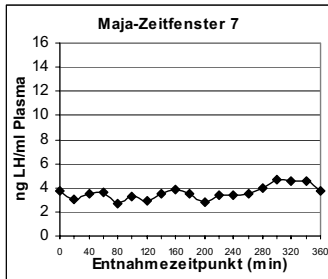
- Vickery, B.H., McRae, G.I., Goodpasture, J.C., Sanders, L.M. (1989)
Use of potent LHRH analogues for chronic contraception and pregnancy termination
in dogs
J Reprod Fert, Suppl 39: 175-187
- Weilenmann, R., Arnold, S., Döbeli, M., Rusch, P., Zerobin, K. (1993)
Estrus induction in bitches by the administration of PMSG and HCG
Schweiz Arch Tierheilkd, 135: 236-241
- Wide, L., Newton, J. (1971)
An immunological cross reaction between monkey gonadotrophin preparations and
antisera to human gonadotrophins
J Reprod Fertil, 27: 103-106
- Withers, A.R., Whitney, J.C. (1967)
The response of the bitch to treatment with medroxyprogesterone acetate
J Small Anim Pract, 8: 265-271
- Zeng, X.Y., Turkstra, J.A., Tsigos, A., Meloen, R.H., Liu, X.Y., Chen, F.Q., Schaaper,
W.M., Oonk, H.B., Guo, D.Z., van de Weil, D.F. (2002)
Effects of active immunization against GnRH on serum LH, inhibin A, sexual
development and growth rate in Chinese female pigs
Theriogenology, 58: 1315-1326

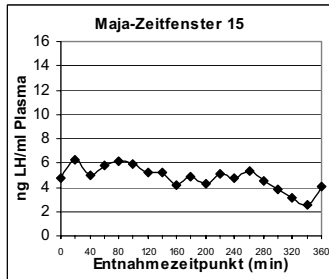
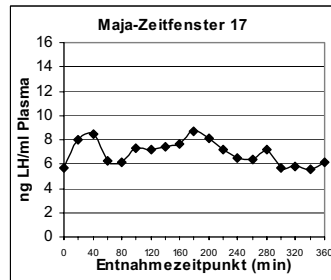
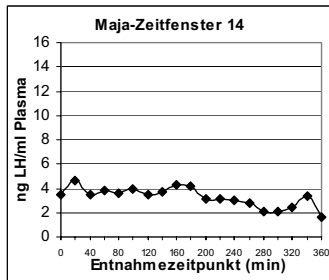
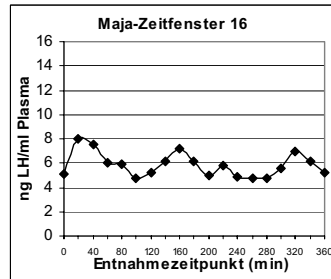
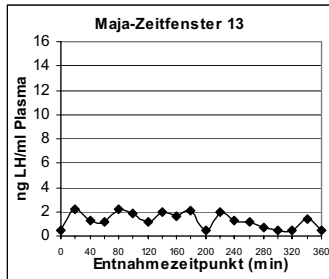
9 Anhang

Die vollständigen Zeitfenster aller Hunde sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

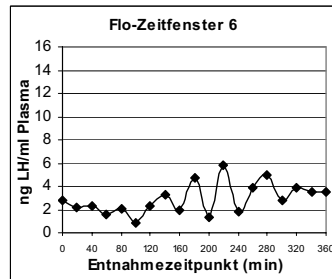
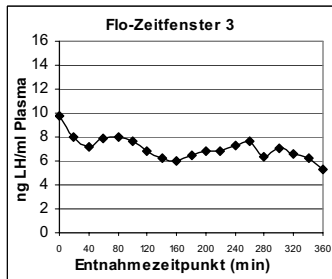
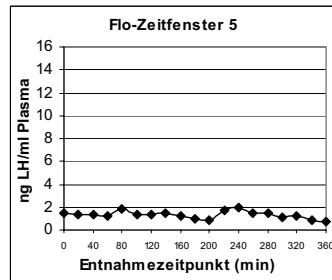
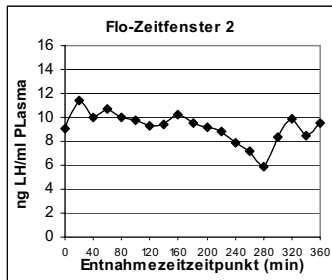
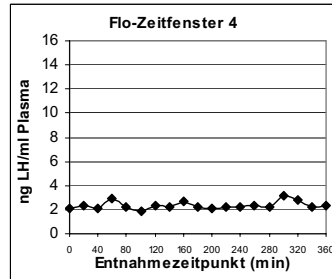
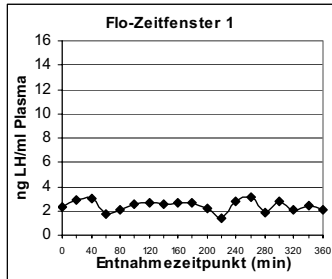
9.1 Zeitfenster Hund Maja (Gruppe 1)

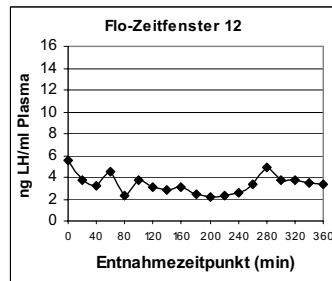
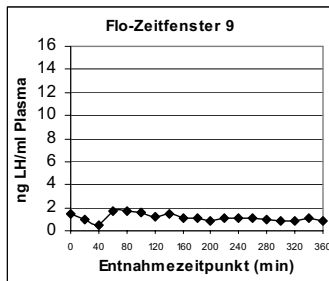
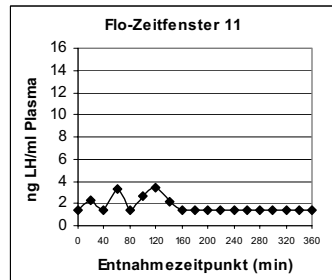
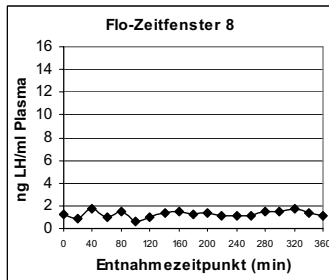
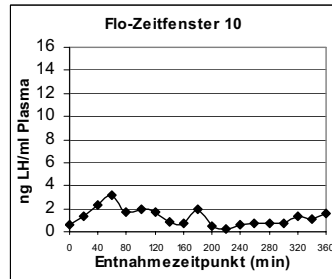
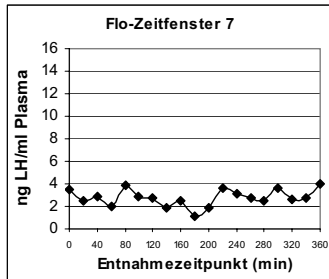


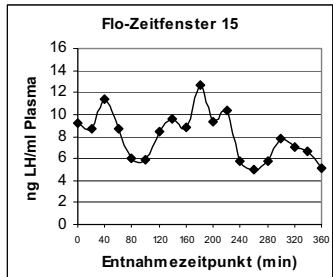
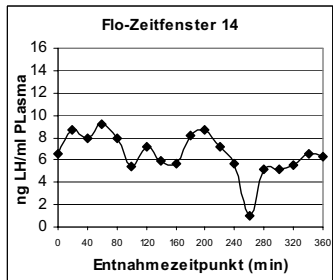
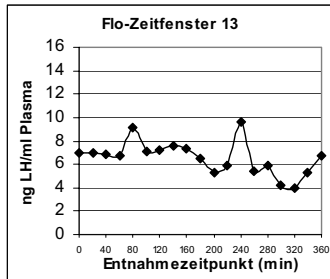




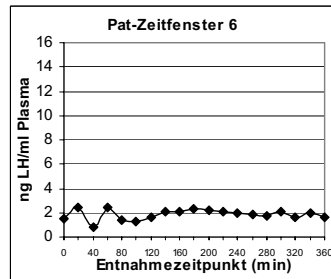
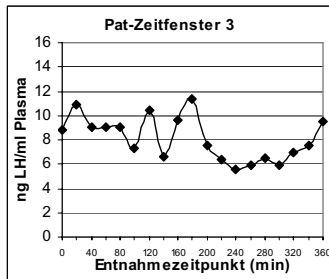
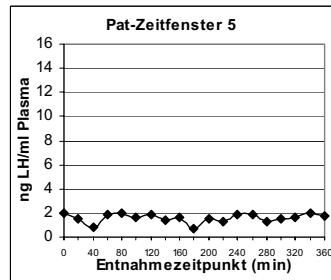
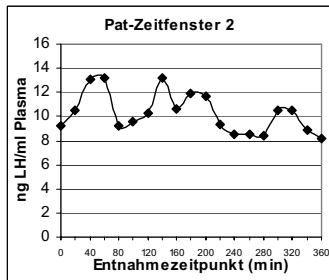
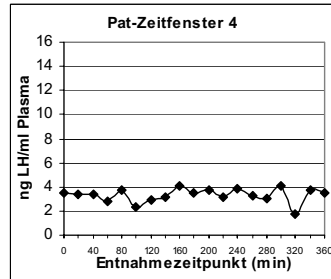
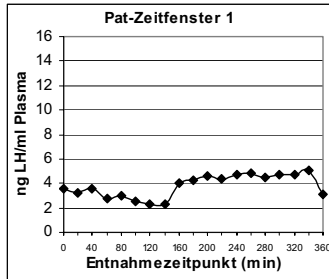
9.2 Zeitfenster Hund Flo (Gruppe 1)

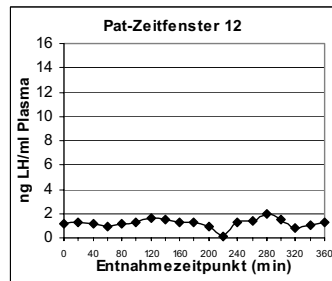
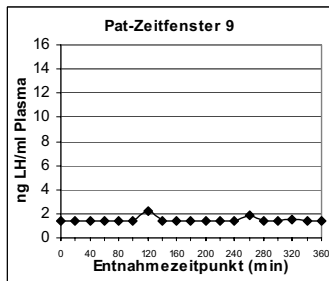
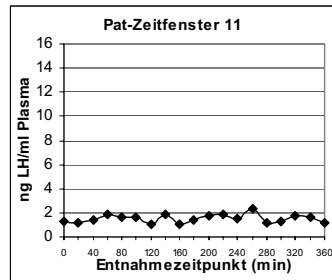
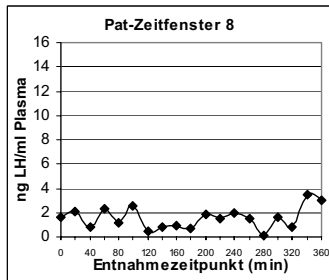
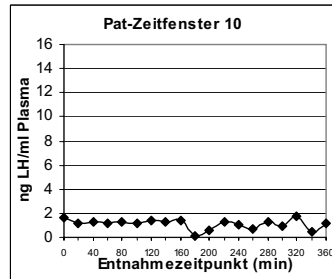
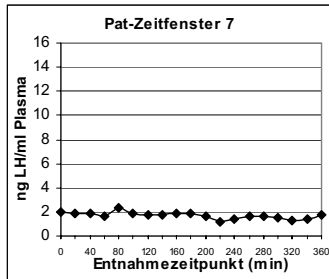


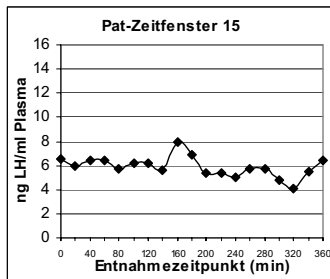
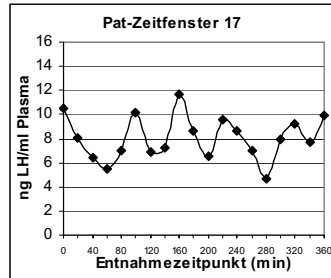
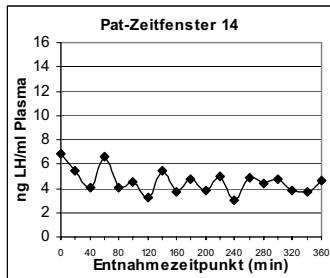
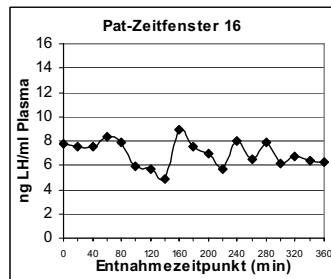
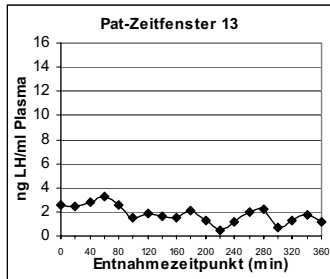




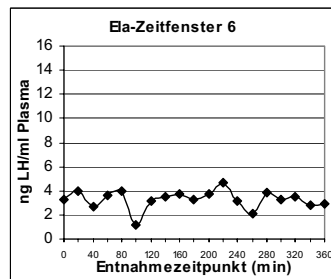
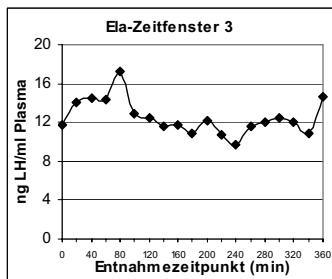
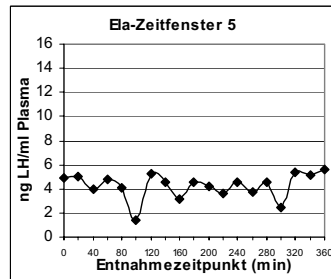
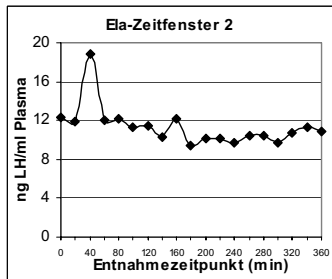
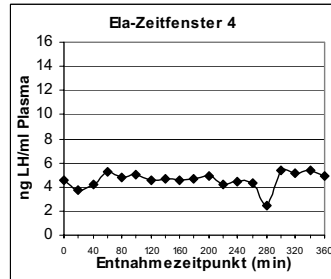
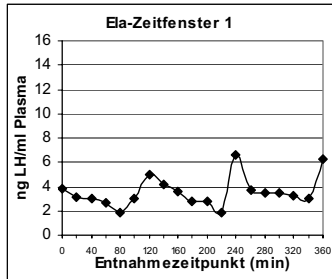
9.3 Zeitfenster Hund Pat (Gruppe 1)

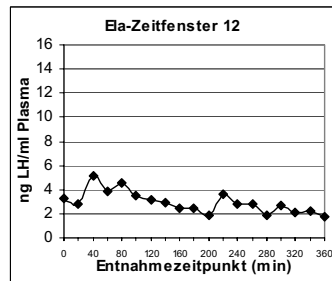
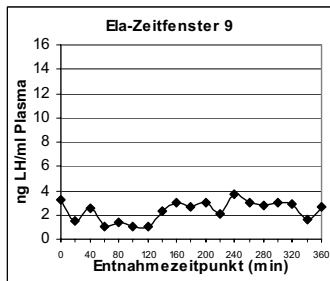
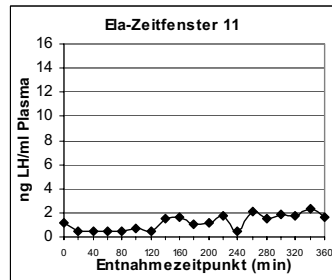
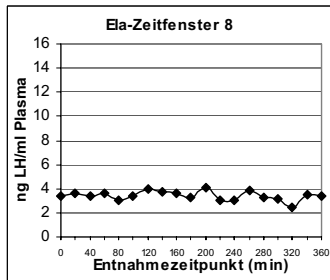
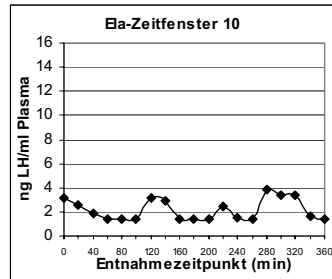
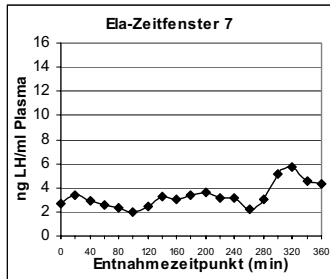


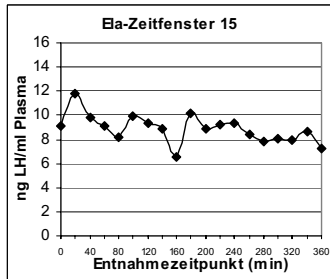
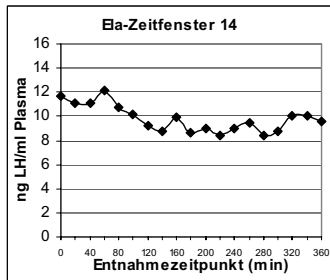
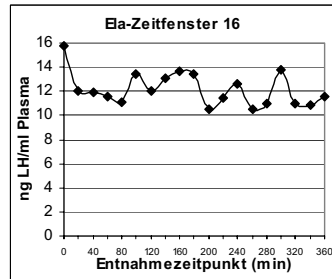
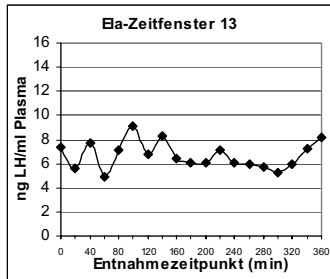




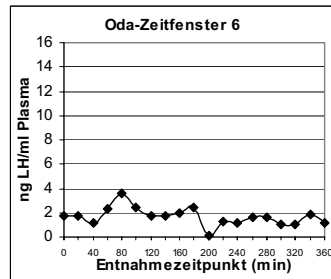
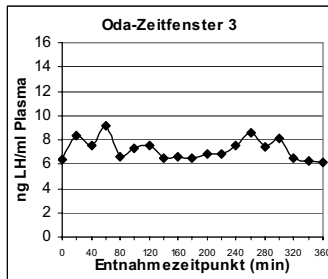
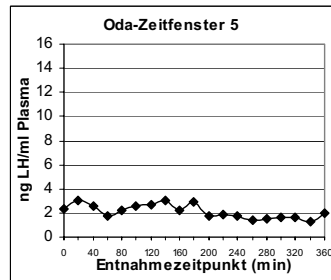
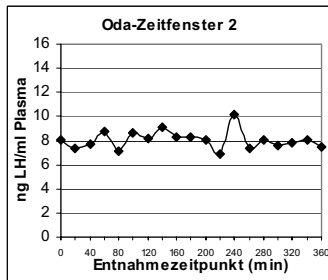
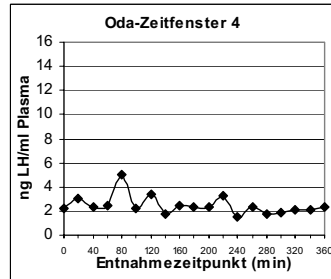
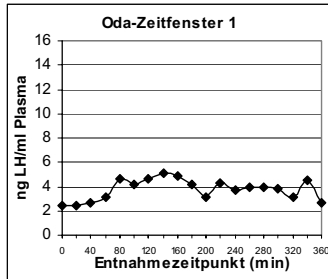
9.4 Zeitfenster Hund Ela (Gruppe 2)

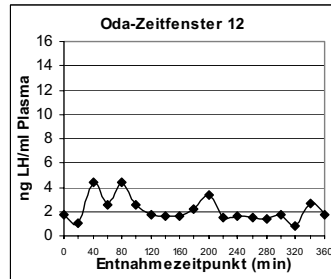
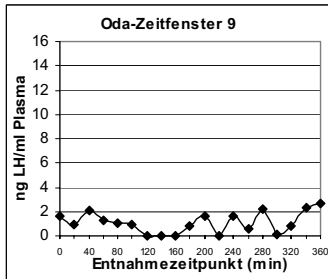
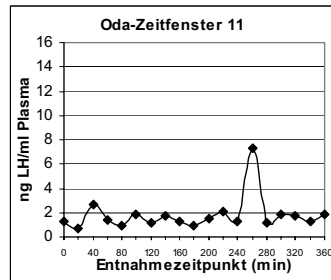
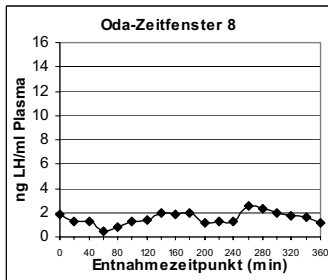
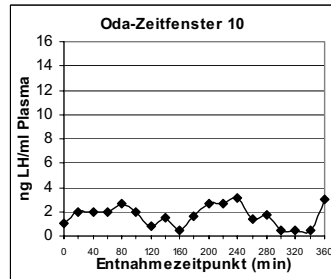
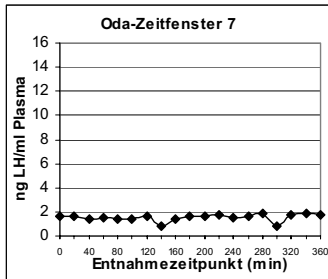


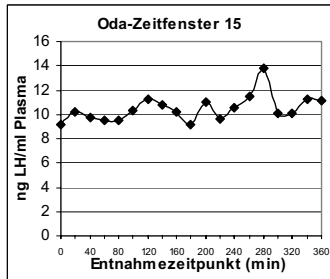
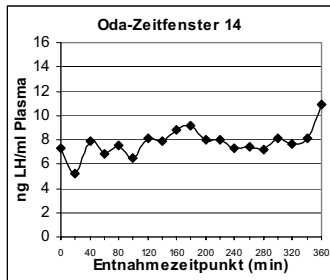
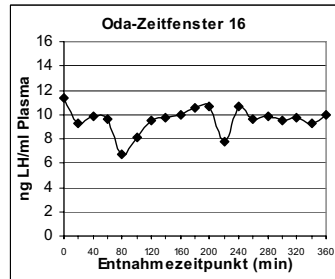
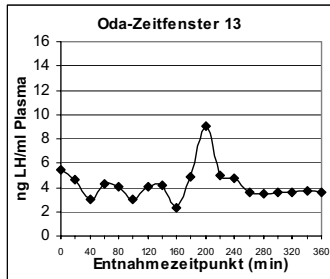




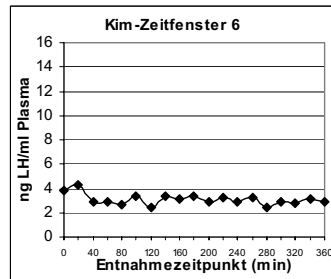
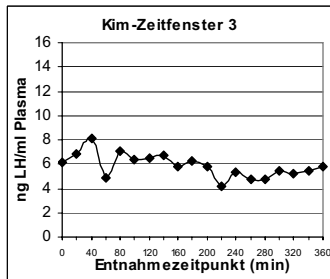
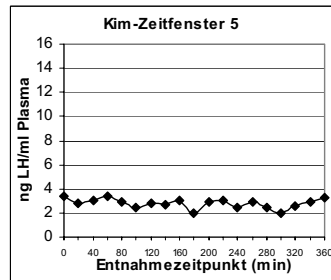
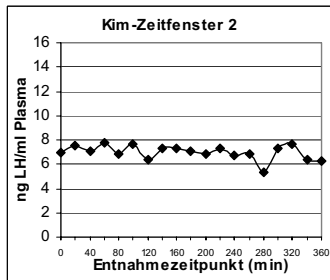
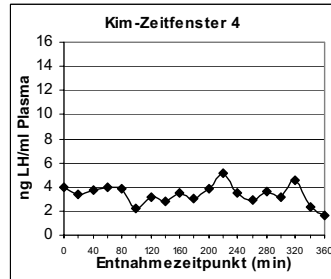
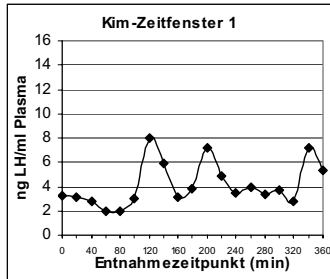
9.5 Zeitfenster Hund Oda (Gruppe 2)

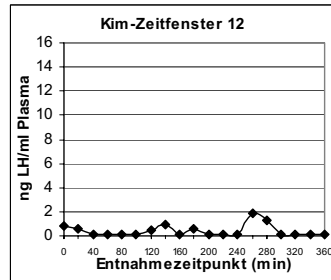
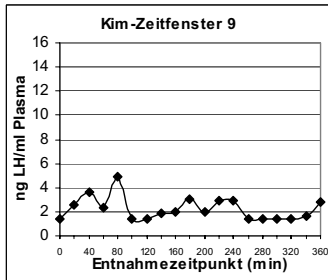
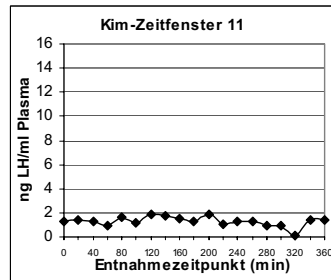
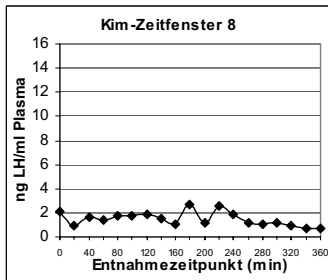
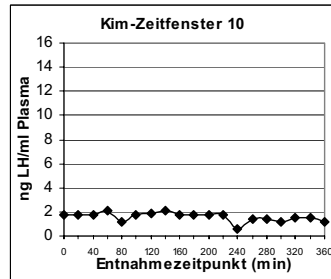
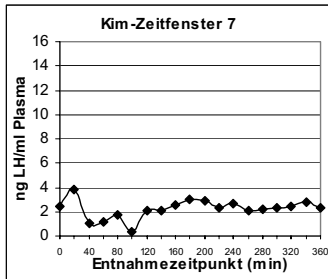


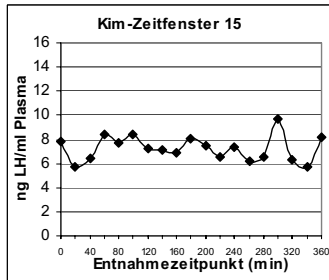
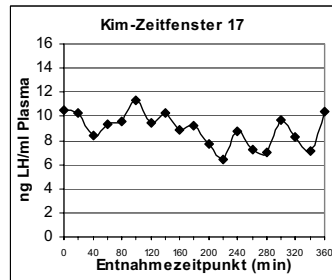
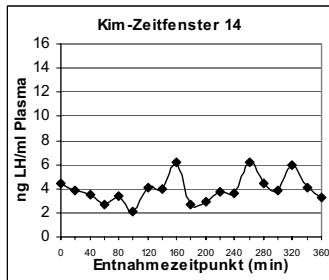
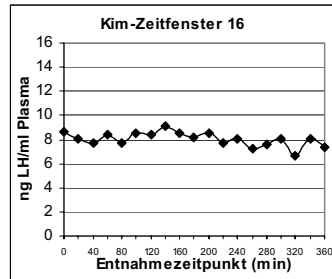
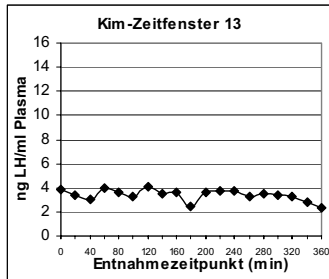




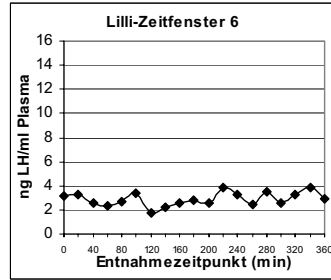
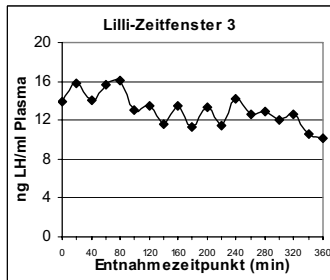
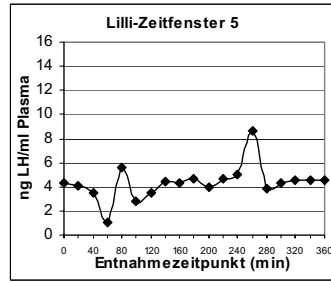
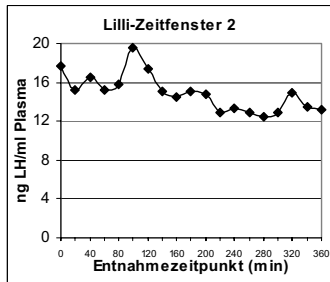
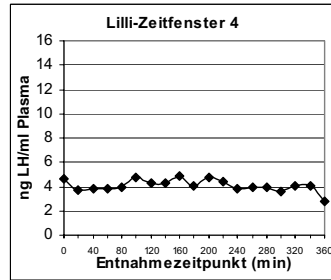
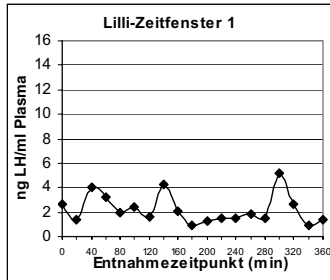
9.6 Zeitfenster Hund Kim (Gruppe 2)

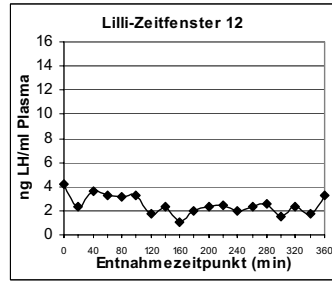
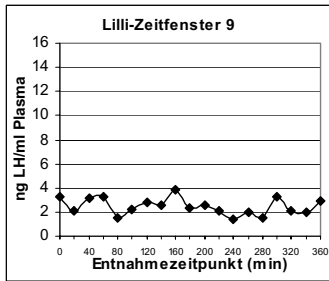
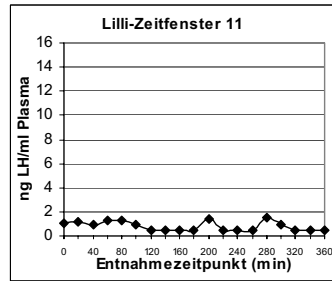
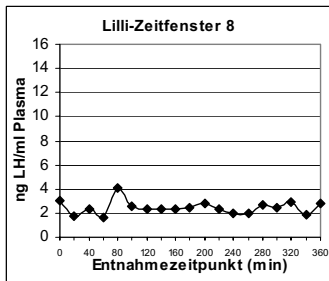
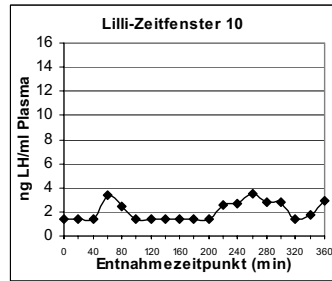
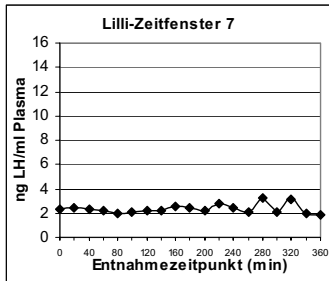


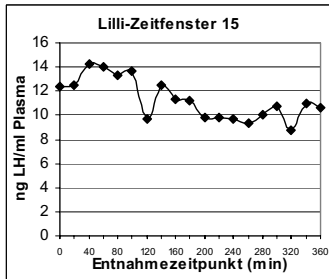
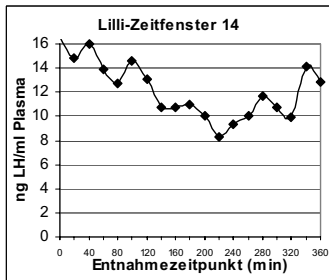
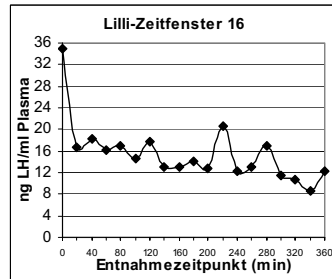
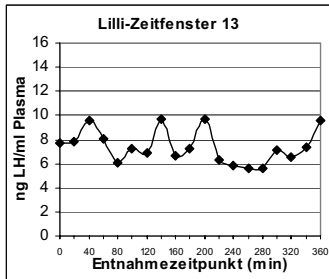




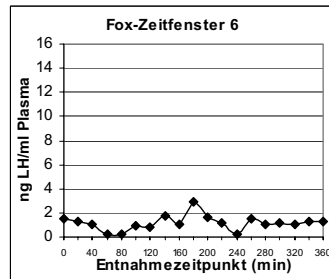
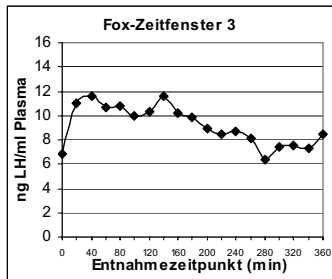
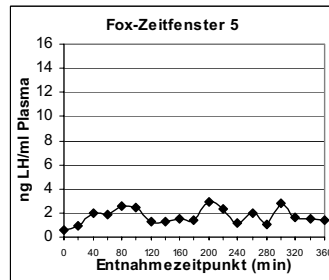
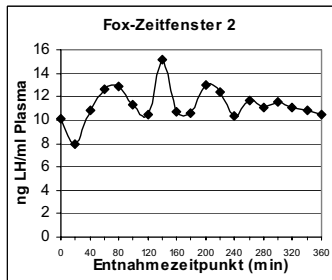
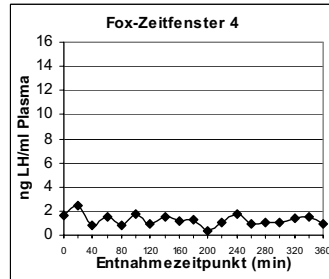
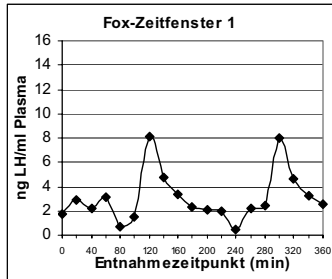
9.7 Zeitfenster Hund Lilli (Gruppe 3)

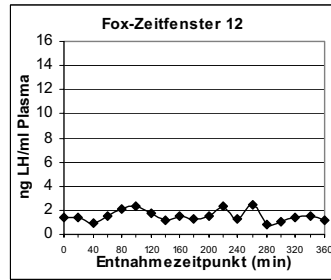
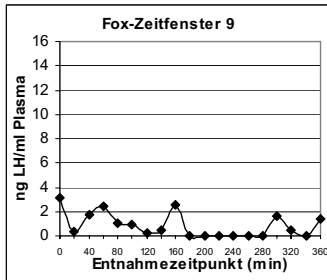
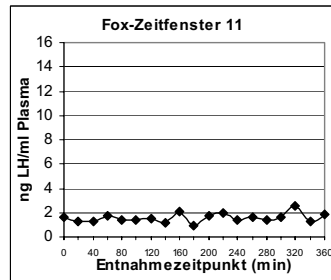
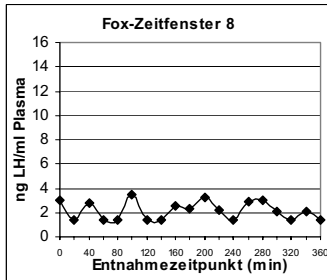
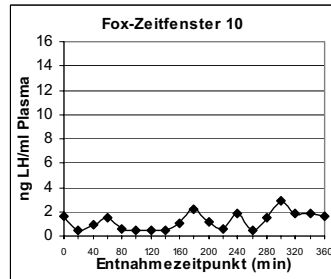
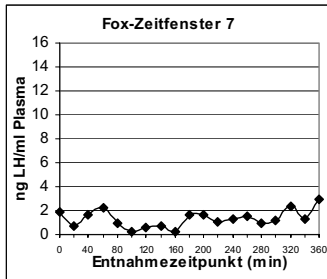


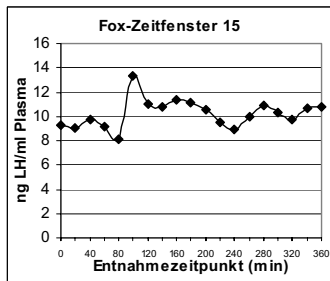
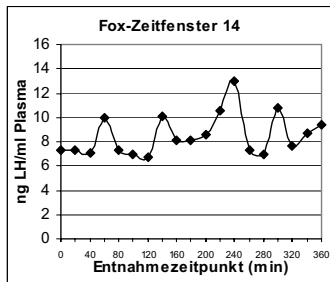
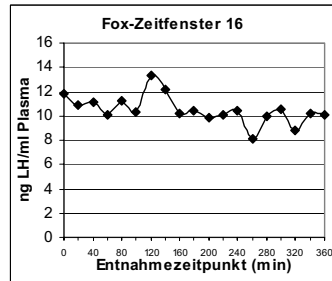
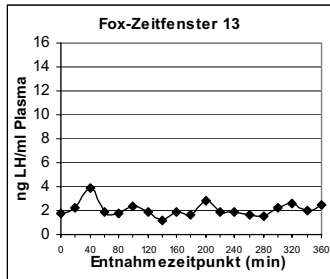




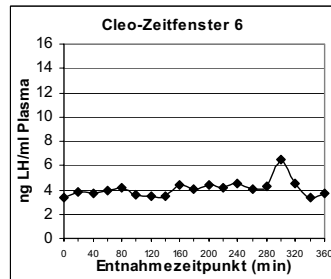
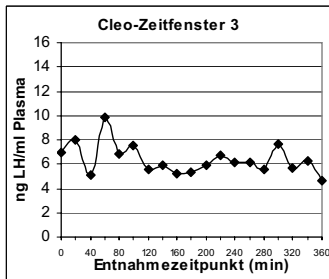
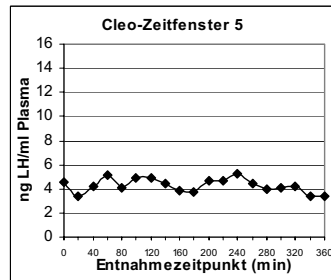
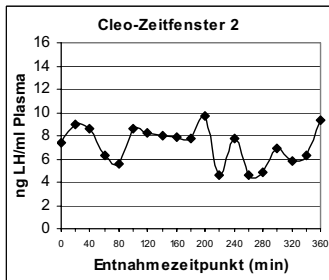
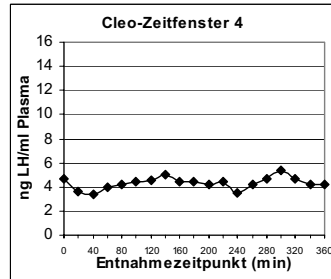
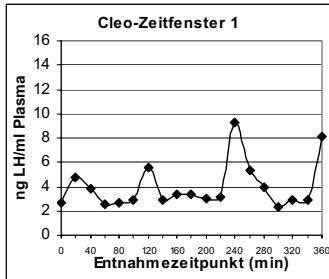
9.8 Zeitfenster Hund Fox (Gruppe 3)

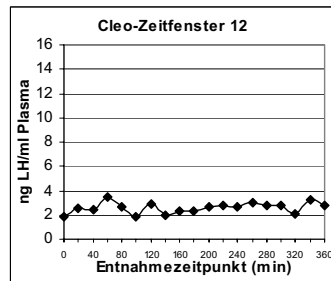
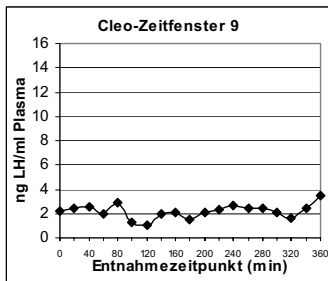
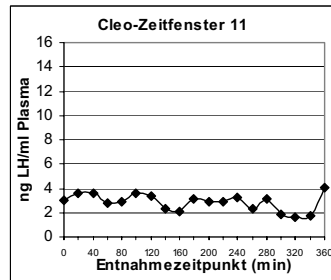
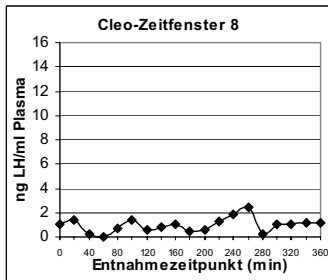
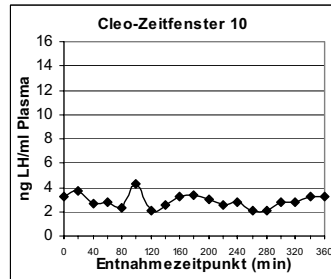
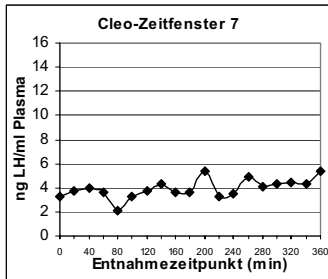


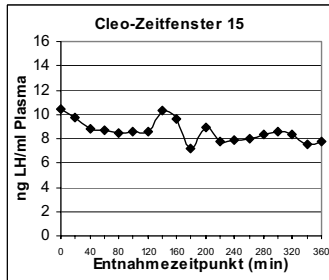
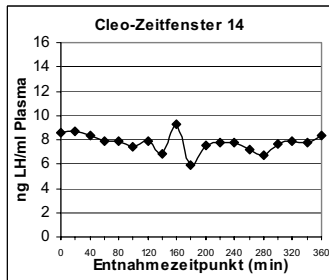
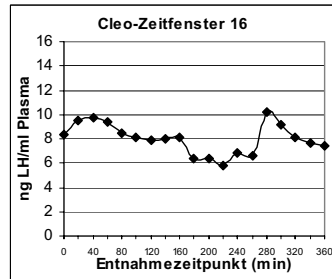
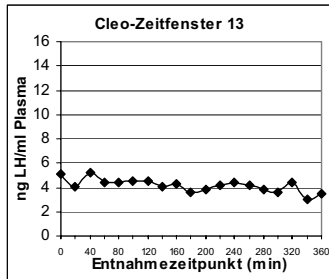




9.9 Zeitfenster Hund Cleo (Gruppe 3)







Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Prof. Dr. Dr. hc. B. Hoffmann für die Überlassung des Themas und die niemals endende Geduld und Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Frau Dr. R. Klein und Frau Dr. A. Riesenbeck danke ich für die unerschöpfliche fachliche Unterstützung. Ihnen, sowie allen Doktoranden und technischen Mitarbeitern, danke ich besonders für die zeitintensive Mithilfe bei den hochfrequenten Blutentnahmen und den Laborauswertungen, sowie der Betreuung der Beagle-Hündinnen.

Den Mitarbeitern der Abteilung Biomathematik und Datenverarbeitung, insbesondere Herrn Dr. Failing, danke ich für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Mann, die mich mit Geduld und Hilfe während der ganzen Zeit der Anfertigung dieser Arbeit unterstützten.

Diese Arbeit wurde durch Mittel der Firma Hoechst Roussel Vet GmbH, jetzt Intervet Innovation GmbH, gefördert.

ISBN 3-938026-70-7



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
e-mail: Geschaeftsstelle@dvg.net · Homepage: <http://www.dvg.net>**