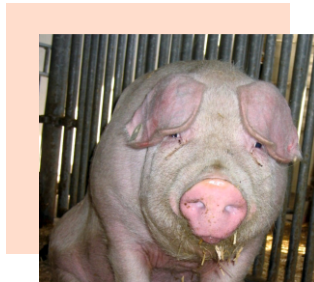


Wiederaufnahme der Hodenfunktion
bei Ebern nach Immunisierung gegen das
Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH)
mit dem kommerziellen Antigen IMPROVAC®

SILKE MAREN ROTTNER



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



edition wissenschaft
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2012

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

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine
der Justus-Liebig-Universität Gießen
– Professur für Schweinekrankheiten –
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner
und
dem Institut für Tierhaltung und Tierzucht
der Universität Hohenheim
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie
Betreuer: em. Prof. Dr. Dr. habil. R. Claus

**Wiederaufnahme der Hodenfunktion bei Ebern
nach Immunisierung gegen das Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH)
mit dem kommerziellen Antigen
IMPROVAC®**

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

eingereicht von

SILKE MAREN ROTTNER
Tierärztin aus Pforzheim

Gießen 2012

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

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

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner
em. Prof. Dr. Dr. habil. R. Claus

Tag der Disputation: 25.10.2012

Meinen Eltern und Frank

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1.	Besonderheiten der Anatomie des männlichen Reproduktionstraktes beim Schwein (<i>NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE 1999</i>).....	3
2.1.1.	Keimbereitende und keimleitende Organe, deren Hüllen und Gekröse ...	3
2.1.1.1.	Tubuli seminiferi, Sertolizellen und Keimzellen.....	5
2.1.1.2.	Interstitium mit Leydigzellen.....	9
2.1.2.	Anatomie und Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen.....	9
2.1.2.1.	Samenblasendrüse	11
2.1.2.2.	Prostata	11
2.1.2.3.	Bulbourethraldrüsen.....	12
2.1.2.4.	Zusammensetzung und Sekretion des Seminalplasmas	12
2.2.	Hormonale Regulation der Reproduktion beim Eber	13
2.2.1.	Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH)	13
2.2.2.	Gonadotropine und ihre Funktion	14
2.2.2.1.	Luteinisierungshormon (LH).....	15
2.2.2.2.	Follikelstimulierendes Hormon (FSH)	15
2.2.3.	Steroide des Hodens und ihre Funktion.....	16
2.2.3.1.	Androgene	17
2.2.3.2.	Östrogene	19
2.3.	Ebermast und Geschlechtsgeruch.....	20
2.3.1.	Kriterien der Mast- und Schlachtleistung bei Ebern und Börgen.....	20
2.3.1.1.	Ursachen des Geschlechtsgeruches	22
2.3.1.1.1.	Androstenon	22
2.3.1.1.2.	Skatol.....	25
2.3.1.2.	Verbraucherakzeptanz von Eberfleisch	25
2.3.2.	Möglichkeiten zur Unterdrückung des Geschlechtsgeruches	27
2.3.2.1.	Herkömmliche Durchführung der chirurgischen Kastration von Ferkeln	30
2.3.2.2.	Ansätze zur Anästhesie und Analgesie.....	31
2.3.2.3.	Hormonelle Kastration	35
2.3.2.3.1.	Steroidapplikation	35
2.3.2.3.2.	Applikation von GnRH-Agonisten und Antagonisten.....	36
2.3.2.4.	Selektive Blockade der Androstenonbiosynthese	36
2.3.2.5.	Sperma Sexing	38

2.3.2.6.	Immunologische Kastration.....	38
2.3.2.6.1.	Immunisierung gegen Androstenon	39
2.3.2.6.2.	Immunisierung gegen Testosteron	39
2.3.2.6.3.	Immunisierung gegen LH.....	40
2.3.2.6.4.	Immunisierung gegen GnRH	41
2.3.2.6.4.1.	Prinzip der Immunisierung gegen GnRH und Dauer der Antikörper- bildung	42
2.3.2.6.4.2.	Wirksamkeitsstudien beim Eber.....	43
2.3.2.6.4.3.	Erfahrungen bei anderen Spezies und dem Menschen	46
3.	KLÄRUNGSBEDARF UND FRAGESTELLUNG.....	52
4.	MATERIAL UND METHODEN.....	54
4.1.	Ablauf der Tierversuche.....	54
4.2.	Tierhaltung und experimentelle Techniken	54
4.2.1.	Haltung und Fütterung der Versuchstiere	54
4.2.2.	Operationsmethode zur Verlegung der Venenverweilkatheter.....	56
4.2.2.	Tägliche Blutentnahme und Katheterpflege	60
4.2.3.	24h Window Sampling	60
4.2.4.	Vakzinierung gegen GnRH	61
4.2.5.	Versuchsende, Entnahme und Charakterisierung der Gewebeproben..	62
4.3.	Analytische Verfahren.....	63
4.3.1.	Radioimmunologische Bestimmung von LH und FSH	64
4.3.2.	Radioimmunologische Bestimmung von Testosteron und Östrogenen .	68
4.3.3.	Enzymimmunologische Bestimmung von Androstenon im Blut und im Fettgewebe	70
4.3.4.	Bestimmung des Antikörpertiters gegen GnRH	72
4.3.5.	Bestimmung von Skatol im Blut und im Fettgewebe	75
4.4.	Morphologische und histologische Verfahren	78
4.4.1.	Sonographie und Bandmaß	78
4.4.2.	Färbetechniken	80
4.4.2.1.	Anfertigung der Paraffinschnitte.....	80
4.4.2.2.	Histomorphologische Beurteilung des Hodengewebes.....	81
4.4.2.2.1.	Durchführung der HE-Färbung	81
4.4.2.2.2.	Auswertung der HE gefärbten Gewebeschnitte	81

4.4.2.3.	Immuncytochemische Techniken zur Auswertung der Spermatogeneseaktivität mittels Ki-67 und GATA-4	83
4.4.2.3.1.	Durchführung der immuncytochemischen Färbungen	84
4.4.2.3.2.	Auswertung der immuncytochemisch gefärbten Gewebeschnitte.....	86
4.4.3.	Auswertung und statistische Verfahren.....	87
5.	ERGEBNISSE	89
5.1.	Blutparameter	90
5.1.1.	GnRH-Antikörpertiter	90
5.1.2.	LH	95
5.1.3.	FSH.....	101
5.1.4.	Testosteron	106
5.1.5.	Östrogene	111
5.1.6.	Androstenon	116
5.1.7.	Skatol.....	123
5.2.	Veränderungen der Hodengröße in vivo	126
5.2.1.	Auswertung der Bandmaßdaten	126
5.2.2.	Auswertung der Sonographie	130
5.3.	Veränderungen der Gewebeproben.....	135
5.3.1.	Ergebnisse der makroskopischen Auswertung der Hoden und akzessorischen Geschlechtsdrüsen.....	135
5.3.2.	Histologische Ergebnisse.....	138
5.3.2.1.	Morphologische Ergebnisse des Hodengewebes.....	138
5.3.2.2.	Auswertung der Spermatogeneseaktivität	144
6.	DISKUSSION.....	146
6.1.	Auswirkungen der Wiederaufnahme auf hormoneller Ebene.....	146
6.2.	Auswirkungen der Wiederaufnahme auf die Gewebeparameter.....	149
7.	ZUSAMMENFASSUNG	152
8.	SUMMARY	154
9.	LITERATURVERZEICHNIS.....	155
10.	ANHANG	193

Tab. 2. 1	Unterschiede in den Mastleistungsparametern zwischen Börgen und Ebern in der Mastphase 28-207 kg (<i>SPRING</i> et al. 2009)	20
Tab. 2. 2	Ebergeruchskomponenten im Vergleich zum Hormon 5 α -DHT.	23
Tab. 2. 3	Wahrnehmungsvermögen für den Ebergeruchsstoff Androstenon nach <i>CLAUS</i> 1983a.	26
Tab. 2. 4	Vergleich von Androstenonmesswerten mit einer subjektiven Beurteilung nach <i>CLAUS</i> 1978.....	27
Tab. 2. 5	Zusammensetzung und Indikation kommerziell erhältlicher anti-GnRH Vakzinen.....	41
Tab. 2. 6	Einsatz der immunologischen Kastration bei verschiedenen Tierarten und Geschlechtern sowie dem Menschen unter Berücksichtigung unterschiedlicher Immunisierungsschemata, Antikörperbildung und Eintritt des Immunisierungseffektes.....	43
Tab. 2. 7 a	Übersicht über den Einsatz verschiedener Vakzinen zur immunologischen Kastration bei verschiedenen Tierarten und Geschlechtern sowie dem Menschen.....	48
Tab. 2. 7 b	Übersicht über den Einsatz verschiedener Vakzinen zur immunologischen Kastration bei verschiedenen Tierarten und Geschlechtern sowie dem Menschen.....	49
Tab. 2. 8 a	Die immunologische Kastration bei verschiedenen Tierarten und Geschlechtern sowie dem Menschen unter Berücksichtigung unterschiedlicher Vakzinierungsschemata, Antikörperbildung und Verlust des Immunisierungseffektes.....	50
Tab. 2. 8 b	Die immunologische Kastration bei verschiedenen Tierarten und Geschlechtern sowie dem Menschen unter Berücksichtigung unterschiedlicher Vakzinierungsschemata, Antikörperbildung und Verlust des Immunisierungseffektes.....	51
Tab. 4. 1	Charakterisierung der Versuchstiere.....	55
Tab. 4. 2	Zusammensetzung der Futtrationen.	56

Tab. 4. 3	Überblick über die einzelnen analytischen Methoden und ihre Aussagekraft für den Versuch.....	64
Tab. 4. 4	Ablauf der Markierung der Proteohormone.....	65
Tab. 4. 5	Testparameter der Proteohormon- und Steroidhormon-Radioimmunoassays.....	67
Tab. 4. 6	Ergebnisse der Qualitätskriterien der radioimmunologischen Testreihen.....	68
Tab. 4. 7	Prinzip sowie Enzyme und Substrate der Enzyme Immuno Assays. ..	74
Tab. 4. 8	HPLC Testbedingungen für Blutplasma und Fettgewebe.....	76
Tab. 4. 9	Eichkurven für Skatol und Androstenon.....	77
Tab. 4. 10	Ablauf der Entwässerung und Einbettung in Paraffin.....	80
Tab. 4. 11	Morphologische Kriterien zur Charakterisierung des Hodengewebes sowie ihre Bestimmung.....	83
Tab. 5. 1	Tierindividuelles Einsetzen des Immunisierungseffektes und der Wiederaufnahme der Hodenfunktion.....	89
Tab. 5. 2	Konzentrationen von Androstenon und Skatol im Rückenfett am Versuchsende (Tag 184) und im Blutplasma (Tag 158-176).....	117
Tab. 5. 3	Kontinuierliche Kontrolle des Bandmaßes in mm (längs, quer) beider Hoden im Verlauf des Versuches von der 37. bis 52. Lebenswoche.	127
Tab. 5. 4	Kontinuierliche Kontrolle des Hodendurchmessers in mm (längs, quer) beider Hoden im Verlauf des Versuches von der 37. bis 52. Lebenswoche.....	131
Tab. 5. 5	Gewichte in g beider Hoden und der Geschlechtsdrüsen sowie Testosteronkonzentrationen der einzelnen Eber der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe (MW \pm S.E.M.).....	135
Tab. 5. 6	Charakterisierung der absoluten und relativen Gesamtfläche an Hodentubuli und Interstitium (MW \pm S.E.M.).....	138
Tab. 5. 7	Maße der einzelnen Tubuli seminiferi, der Keimepithelien und der mitotischen Aktivität der einzelnen immunisierten Eber.....	139
Tab. 5. 8	Charakterisierung des Interstitialgewebes: Gesamtfläche und relative Verteilung der Leydigzellen sowie das jeweilige Kern- und Cytoplasmavolumen.....	141

Abb. 2. 1	Schematische Darstellung der Spermatogenese (<i>CLERMONT</i> 1972, <i>HOFFMANN</i> 2003, <i>WAGNER</i> 2005).....	6
Abb. 2. 2	Charakterisierung der Stadien des Keimepithelzyklus nach <i>SWIERSTRA</i> 1968 und <i>GARCIA-GIL</i> et al. 2002.....	8
Abb. 2. 3	Anatomische Lage der Geschlechtsdrüsen des Ebers (rechts; <i>KÖNIG</i> , <i>LIEBICH</i> 1999) im Vergleich zu Gewebeproben (links).....	10
Abb. 2. 4	Stufen der Steroidbiosynthese in den Leydigzellen nach <i>BONNEAU</i> 1982.....	17
Abb. 2. 5	Schematische Darstellung der Physiologie der Eberpheromone nach <i>CLAUS</i> 1983b	24
Abb. 2. 6	Fließschema Alternativen zur konventionellen Kastration.....	28
Abb. 2. 7	Durchführung der konventionellen Kastration (<i>HELLWIG</i> 2006).....	31
Abb. 2. 8	Apparatur zur seriellen Ferkelkastration unter Allgemeinanästhesie... ..	32
Abb. 4. 1	Lage des Venenverweilkatheters im Tier (<i>ZEIFANG</i> 2000).....	58
Abb. 4. 2	Entnahmestellen für das Hodengewebe (schraffierte Fläche).....	62
Abb. 4. 3	Anatomische Strukturen in der Sonographie der Hoden quer (links) und längs (rechts).....	78
Abb. 4. 4	Ansatzpunkte für die Ermittlung des Bandmaßes (B = Breitenmaß, L = Längenmaß) sowie für den Quer- (links) und Längsschnitt (rechts) durch die Sonographie.	79
Abb. 4. 5	Prinzip der Auswertung der Tubuli seminiferi.....	82
Abb. 4. 6	Schematische Darstellung der indirekten Avidin-Biotin-Methode.....	84
Abb. 5. 1	Verlauf des Antikörpertiters (oben) gegen GnRH und entsprechende LH-Konzentrationen (unten) in 6 Ebern (MW ± S.E.M.) Beginn 4 Tage vor der zweiten Immunisierung (Tag 0) bis Tag 182.....	90
Abb. 5. 2 a	Verlauf des Antikörpertiters gegen GnRH in den Ebern 1-3 vier Tage vor der zweiten Immunisierung (Tag 0) bis Tag 182.	92
Abb. 5. 2 b	Verlauf des Antikörpertiters gegen GnRH in den Ebern 4-6 vier Tage vor der zweiten Immunisierung (Tag 0) bis Tag 182.	93

Abb. 5. 3 a	Individuelle Unterschiede in der Pulsatilität von LH in den drei 24h Windows (Vgl. Abb. 5.1) für Eber 1-3.....	97
Abb. 5. 3 b	Individuelle Unterschiede in der Pulsatilität von LH in den drei 24h Windows (Vgl. Abb. 5.1) für Eber 4-6.....	99
Abb. 5. 4 a	Individuelle Unterschiede in der Pulsatilität von FSH in den drei 24h Windows (Vgl. Abb. 5.1) für Eber 1-3.....	103
Abb. 5. 4 b	Individuelle Unterschiede in der Pulsatilität von FSH in den drei 24h Windows (Vgl. Abb. 5.1) für Eber 4-6.....	105
Abb. 5. 5	Verlauf der anabolen Hormone Testosteron und 17 β -Estradiol von Tag -4 bis Tag 182 in sechs Ebern (MW \pm S.E.M.).	106
Abb. 5. 6 a	Individueller Verlauf von Testosteron in den Ebern 1-3.....	108
Abb. 5. 6 b	Individueller Verlauf von Testosteron in den Ebern 4-6.....	109
Abb. 5. 7 a	Individueller Verlauf von 17 β -Estradiol in den Ebern 1-3 von Tag -4 bis Tag 182.....	112
Abb. 5. 7 b	Individueller Verlauf von 17 β -Estradiol in den Ebern 4-6 von Tag -4 bis Tag 182.....	113
Abb. 5. 8	Verlauf von Androstenon und Skatol im Blutplasma der Behandlungsgruppe (n=6, MW \pm S.E.M.) von Tag 0 (zweite Immunisierung) bis Tag 176.....	116
Abb. 5. 9	Konzentrationen von Androstenon (links) und Skatol (rechts) im Fettgewebe der Behandlungsgruppe 1-6 (oben) und Kontrollgruppe A-D (unten).....	118
Abb. 5. 10 a	Verlauf von Androstenon im Blutplasma der Eber 1-3 von Tag -4 bis Tag 176.....	120
Abb. 5. 10 b	Verlauf von Androstenon im Blutplasma der Eber 4-6 von Tag -4 bis Tag 176.....	121

Abb. 5. 11 a	Verlauf von Skatol im Blutplasma der Eber 1-3 von Tag -4 bis Tag 176.	124
Abb. 5. 11 b	Verlauf von Skatol im Blutplasma der Eber 4-6 von Tag -4 bis Tag 176.	125
Abb. 5. 12 a	Optischer Vergleich der Hodengröße unter der Immunisierung (Tag 39, oben) und nach der Wiederaufnahme der Hodenfunktion (Tag 180, unten).	128
Abb. 5. 12 b	Optischer Vergleich der Hodengröße der Kontrolltiere.	129
Abb. 5. 13 a	Optischer Vergleich der Hodendurchmesser unter der Immunisierung (Tag 76, oben), unter der Wiederaufnahme (Tag 132, mitte) und nach der Wiederaufnahme der Hodenfunktion (Tag 180, unten) der Tiere 1-3.	132
Abb. 5. 13 b	Optischer Vergleich der Hodendurchmesser unter der Immunisierung (Tag 76, oben), unter der Wiederaufnahme (Tag 132, mitte) und nach der Wiederaufnahme der Hodenfunktion (Tag 180, unten) der Tiere 4-6.	133
Abb. 5. 13 c	Optischer Vergleich der Hodendurchmesser der Kontrolltiere.	134
Abb. 5. 14 a	Optischer Vergleich der Geschlechtsdrüsen (Tag 184) der Behandlungsgruppe.	136
Abb. 5. 14 b	Optischer Vergleich der Geschlechtsdrüsen der Kontrollgruppe. ...	137
Abb. 5. 15 a	Beispiele für die Unterschiede in der Keimepithelhöhe in Ebern der Behandlungsgruppe (oben), einem Kontrolltier (unten links) und einem immunisierten Eber (unten rechts).	142
Abb. 5. 15 b	Beispiele für die Ausprägung der Leydigzellen im Interstitialgewebe in Ebern der Behandlungsgruppe (oben), einem Kontrolltier (unten links) und einem immunisierten Eber (unten rechts).	143

Abb. 5. 16	Relative Verteilung der unterschiedlichen Spermatogenesestadien in immunisierten (n = 6, schwarze Balken) und intakten Ebern (n = 4, weiße Balken).....	144
------------	---	-----

A.	lat. arteria (sg.), Arterie
AA	Anionenaustauscher
ad us vet	lat. ad usum veterinarii, zum tierärztlichen Gebrauch
AK	Antikörper
AS	Aminosäure(n)
bidest	bidestillata, zweifach destilliert
CYP	Cytochrom P
d	lat. dies (pl.), Tage
d.A.	divergierende Angaben
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
EIA	Enzyme Immuno Sorbent Assay, Enzymimmunotest
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme Linked Immuno Assay, Enzymimmunotest
Em	Emmission
et al.	lat. et alii, et aliae, et alia: und andere
Ex	Extinktion
GH	Growth Hormone, Wachstumshormon
Gl.	lat. glandula (sg.), Drüse
Gll.	lat. glandulae (pl.), Drüsen
h	lat. hora, Stunde
³ H	Tritium
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography, Hochdruckflüssigkeits- chromatographie
HWZ	Halbwertszeit
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin like Growth Factor
IM	Immunisierung, immunisiert
i.m.	intramuskulär
IU	engl. International unit, internationale Einheiten
i.v.	intravenös
¹²⁵ J	Jod, Isotop 125

kDA	Kilodalton
KFA	Komplettes Freund'sches Adjuvans
KGW	Körpergewicht
kr	kryptorch
Lnn.	lat. lymphonodi (pl.), Lymphknoten
LW	Lebenswoche
LZ	Leydigzellen
M	molar
M.	lat. musculus (sg.), Muskel
m	männlich
mBq	Millibequerel
mCi	Millicurie
ME	Metabolisierbare Energie
MHz	Megahertz
MJ	Megajoule
mk	männlich-kastriert
Mm.	lat. musculi (pl.), Muskeln
MW	Mittelwert
μ	griech. mikrós, klein; Kurzzeichen des Präfixes „Mikro“, 10^{-6}
N	Stickstoff
n =	Anzahl
n	griech. nános, Zwerg; Kurzzeichen des Präfixes „Nano“, 10^{-9}
OP	Operation
p	porcin; aus dem Lateinischen, das Schwein betreffend
p	griech. pico, sehr klein; Kurzzeichen des Präfixes „Pico“, 10^{-12}
RIA	Radio Immuno Assay, Radioimmunotest
s.	lat. seu, oder
s.c.	subcutan
SES	Sojaextraktionsschrot
SEM	Standard Error of the Mean, Standardfehler
T	Talkum
TCA	Trichloressigsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
V.	lat. vena (sg.), Vene

Vak	Vakzinierung
V.M.	Veterinärmedizin
w	weiblich
WZ	Wartezeit
XP	Rohprotein
XF	Rohfaser

1. EINLEITUNG

Seit langem werden männliche Ferkel innerhalb weniger Tage nach der Geburt ohne Schmerzausschaltung chirurgisch kastriert, um eine Beeinträchtigung der Schlachtkörperqualität durch den sogenannten „Ebergeruch“ zu vermeiden.

Dieser unangenehme Geschlechtsgeruch der Eber wird durch das Pheromon Androstenon hervorgerufen, welches mit Eintritt der Geschlechtsreife in den Leydigzellen des Hodens gebildet wird und sich im Fettgewebe anreichert (CLAUS et al. 1994, PATTERSON 1968a). Eine weitere Komponente, die für die sensorische Minderung von Eberfleisch verantwortlich gemacht wird, ist die Substanz Skatol, die bei einem Teil der Eber im Colon mikrobiell synthetisiert wird (CLAUS et al. 1994, HANSSON et al. 1980) und ebenfalls im Fett angereichert werden kann.

Seit der Entdeckung von Androstenon (PATTERSON 1968a) wurden viele Versuche unternommen, dessen Bildung und Anreicherung im Fettgewebe zu unterbinden. Da das Pheromon Androstenon als Bestandteil der Fertilitätsregulierung eng an andere Komponenten der Hodenfunktion und somit der Reproduktion gebunden ist, blieben diese Bemühungen aber erfolglos, so z.B. Selektionsversuche auf niedrige Gewebekonzentrationen von Androstenon (WILLEKE et al. 1980, ROBIC et al. 2008), die aktive Immunisierung gegen Androstenon (CLAUS 1975, DANIEL et al. 1984), die Applikation von kompetitiven Enzymblockern (KAUFMANN & SCHUBERT 1979) bis hin zur hormonellen Kastration (ECHTERNKAMP et al. 1969, DAXENBERGER et al. 2001) oder dem Sexing von Sperma (PARRILLA et al. 2003, GARNER 2006). Die Bildung von Skatol im Darm kann dahingegen leicht über entsprechende Fütterungsmaßnahmen reguliert werden (CLAUS et al. 1994, CLAUS et al. 2003). Allerdings bleibt dabei die Bildung von Androstenon unverändert.

Bislang ist die Kastration ohne Schmerzausschaltung laut *TIERSCHUTZGESETZ* bis zum 7. Lebenstag zulässig. Da aber das Wohlbefinden der Tiere immer mehr in den Fokus des Tierschutzes und damit auch der Verbraucher rückt, wird der Ruf nach Alternativen zur konventionellen Kastration ohne Schmerzausschaltung immer lauter. Ein wesentlicher Nachteil aller bisherigen Bemühungen, einschließlich der aktuell diskutierten chirurgischen Kastration unter Anästhesie und/oder Analgesie, ist es, dass neben der Ausschaltung des Geschlechtsgeruches auch die erwünschten geschlechtsspezifischen Mastvorteile der Eber (WALSTRA 1974) entfallen. Sie werden

durch die anabole Funktion der im Hoden gebildeten Androgene und Östrogene (*CLAUS & HOFFMANN 1980, METZ et al. 2002*) bewirkt.

Vorteil der immunologischen Kastration durch Antikörperbildung gegen GnRH ist es, dass durch eine optimale Wahl des Vakzinierungszeitpunktes innerhalb der Mastperiode die anabolen Hodenhormone bis kurz vor der Schlachtung erhalten bleiben, während der Geschlechtsgeruch eliminiert ist (*METZ & CLAUS 2003*). Ein vollständiger Immunisierungseffekt mit maximalen Antikörpertitern und vollständiger Unterdrückung der Steroidsynthese im Hoden ist innerhalb einer Woche nach der zweiten Immunisierung zu erwarten (*CLAUS et al. 2007*). Auch wenn die Bildung von Androstenon innerhalb dieser Zeitspanne unterdrückt wird, benötigt die vollständige Elimination dieses Stoffes aus dem Fettgewebe weitere drei Wochen (*CLAUS 1976*). Folglich ist es durch die Immunokastration möglich, die anabolen Effekte der männlichen Geschlechtshormone bis vier Wochen vor der Schlachtung und damit über die Hauptphase der Mast zu nutzen.

Allerdings können die Zunahmen bei Mastgruppen zwischen einzelnen Tieren und damit die Ausstellungstermine erheblich streuen. Daher ist es für einen Praxiseinsatz wichtig zu wissen, wie lange der „Impfschutz“ anhält und wann die Hodenfunktion wieder aufgenommen wird.

2. LITERATURÜBERSICHT

Die männlichen Geschlechtsorgane gliedern sich in drei funktionelle Abschnitte: die keimbereitenden und keimleitenden Organe (Hoden, Nebenhoden und Samenleiter), die akzessorischen Geschlechtsdrüsen und das Begattungsorgan. Im Folgenden sollen die beiden erst genannten Organsysteme sowie die hormonellen Grundlagen, deren Auswirkungen auf die Fleischqualität des Ebers und die Möglichkeiten der Unterdrückung des Geschlechtsgeruches besprochen werden.

2.1. Besonderheiten der Anatomie des männlichen Reproduktionstraktes beim Schwein (*NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE 1999*)

Der Hodensack (Scrotum) des Ebers liegt mit seiner breiten Basis perineal der Kaudalfläche der Hinterschenkel dicht unter dem After an und wird distal von den ovalgeformten Hoden (Testes) ausgebuchtet. Die Scrotalhaut ist spärlich behaart und faltig aufgeworfen; mit zunehmendem Alter kann die Cutis stark verhornen.

Die Extremitas capitata der Hoden und der Nebenhodenkopf (Caput epididymidis) kommen cranioventral zu liegen. Der Nebenhodenkörper (Corpus epididymidis) verläuft am Perineum entlang, um in dem kolbigen Nebenhodenschwanz (Cauda epididymidis) caudodorsal in Richtung After im Bereich der Extremitas capitata zu enden. Der freie Rand der Hoden (Margo liber) liegt caudal.

2.1.1. Keimbereitende und keimleitende Organe, deren Hüllen und Gekröse

Der Hoden als Organ der Leibeshöhle ist von Bauchfell (Lamina visceralis der Tunica vaginalis) überzogen, das fest mit der dicken derben Hodenkapsel (Tunica albuginea testis) verwachsen ist. Sie hält unter Druck das Hodenparenchym zusammen und entlässt die, das Parenchym stützenden, Bindegewebssepten (Septula testis), die sich am angeschnittenen Hoden bereits makroskopisch sehr deutlich darstellen, radial auf das Hodenzentrum zulaufen und sich dort mit einem die ganze Länge der Hodenachse durchziehendem Mediastinum testis verbinden. Hierdurch entsteht eine Unterteilung des Organs in die Lobuli testis, welche die Gewebekomponenten des Hodenparenchyms umfassen: die samenzellbildenden Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi) und die hormonbildenden Zellpopulationen des Zwischengewebes.

Der Nebenhodenkopf (Caput epididymidis) ist mit der Extremitas capitata des Hodens großflächig und eng verwachsen.

Im Caput verlaufen beim Eber 14-21 stark geschlängelte Ductuli efferentes, welche durch bindegewebige gefäßreiche Anteile mit Strukturen glatter Muskulatur in kleine Lappchen (Lobuli s. Coni epididymidis) gegliedert werden. Luminal weisen die Ductuli efferentes zum einen hochprismatische kinozilientragende Epithelzellen auf, welche den kontinuierlichen Transport des Sekretes und der noch unbeweglichen Samenzellen gewährleisten, zum anderen finden sich zilienfreie Epithelzellen, welche den Großteil der Sekrete aus dem Hoden resorbieren.

Die gesamten Ductuli efferentes eines Nebenhodenkopfes bilden einen eng und dicht geschlängelten Nebenhodenkanal (Ductus epididymidis) von enormer Länge (17-18 m beim Schwein), welcher in Bindegewebe gehüllt den Corpus und die Cauda des Nebenhodens darstellt. Durch das zweireihige luminale Epithel mit diversen Differenzierungsgraden und hier vor allem durch die hohen prismatischen Zellen mit Stereozilienbüscheln und deren vielfältigen resorptiven und sekretorischen Fähigkeiten erlangen die Spermien hier ihre Bewegungs- und Befruchtungsfähigkeit. In diesem Milieu können die Spermien gespeichert werden.

Nach distal nimmt das Lumen des Kanals sowie die Anzahl der Schichten glatter Muskulatur zu, die bei der Ejakulation die Samenzellen durch peristaltische Kontraktionen in den Ductus deferens leiten.

Der Samenleiter (Ductus deferens) verbindet als dessen Fortsetzung den Nebenhodengang mit der Pars pelvina der Harnröhre. Seiner vorrangigen Aufgabe des Transportes kommt er durch die dreifach geschichtete Wand aus glatter Muskulatur und durch ein einfaches oder zweireihiges prismatisches Epithel nach. Die Schleimhaut des distalen Abschnittes des Samenleiters wird mit ihren erweiterten Schlauchdrüsen (Gll. ampullae) funktionell zur Gruppe der akzessorischen Geschlechtsdrüsen gezählt. Bei Schwein und Katze sind diese jedoch nicht wie bei Hund, Rind und Pferd zu einer Ampulla ductus deferentis als Verdickung des Endabschnittes entwickelt.

In seinem geringgradig gewundenen Verlauf in Richtung Bauchhöhle bildet der Ductus deferens mit einem Konvolut aus Nerven und Gefäßen – der A. testicularis und dem Plexus pampiniformis der V. testicularis als Plica vasculosa – den Samenstrang (Funiculus spermaticus), in welchem der Ductus deferens in einer separaten Bauchfellfalte dem Samenleitergekröse (Mesoductus deferens) zu liegen kommt.

Beim Schwein münden der Ductus deferens und der Ductus excretorius der Gl. vesicularis meist separat dorsal in die Pars pelvina urethrae.

2.1.1.1. Tubuli seminiferi, Sertolizellen und Keimzellen

Die samenzellbildenden Kanälchen (Tubuli seminiferi contorti, Samenkanälchen) finden sich in den peripheren Regionen des Hodens. Die Gesamtlänge der Tubuli beträgt beim Eber 8,4 km (*TOENHARDT et al. 1976*), beim Menschen werden 30-60 cm auf 2-3 cm komprimiert (*NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE 1999*). Die durchschnittlich 160-300 µm großen aus Sertoli- und Keimzellen bestehenden Tubuli contorti (*GROTH & CLAUS 1977*) – liegen nach außen durch eine Basalmembran begrenzt – eingebettet in lockerem Bindegewebe.

Die germinativen Zellen durchlaufen einen dreiphasigen, in Schüben verlaufenden kontinuierlichen und lebenslang andauernden Entwicklungsprozess (Abb. 2.1), gekennzeichnet durch die Zellvermehrung (Mitose), die Zellteilung (Spermatozytogenese, Meiose) und eine sich anschließende Differenzierungsperiode (Spermiohistogenese).

In den Tubuli repräsentieren die Keimzellen unterschiedliche strukturelle und funktionelle Stadien (A-/B-Spermatogonien, Spermatozyten I und II, elongierte Spermatisden/Spermatozoen und Spermien). Die verschiedenen (*CLERMONT 1972*) wie auch die gleichen (*STEINBERGER & STEINBERGER 1972*) Keimzellstadien sind vertikal wie auch horizontal miteinander verbunden, wodurch eine synchrone wie auch aufeinanderfolgende Keimzellentwicklung gewährleistet wird. Es handelt sich hierbei um den sogenannten Keimepithelzyklus. Er wird als der Zeitraum vom ersten Auftreten eines Stadiums bis zu dessen erneuten Auftreten definiert (*LEBLOND & CLERMONT 1952*) und dauert beim Eber 8,6 Tage (*SWIERSTRA 1968*).

Nach *SWIERSTRA (1968)* wird er in 8 Stadien (I-VIII) eingeteilt, die sich nach *GARCIA-GIL et al. (2002)* in 3 Abschnitte (prä-, meiotisch, post-) einteilen lassen (Vgl. Abb. 2.2).

Die Dauer der Entwicklung einer A-Spermatogonie zur elongierten differenzierten Spermatisde nennt man Spermatogenesezyklus. Hierzu sind vier Keimepithelzyklen notwendig (*WAGNER 2005*), was beim Eber eine Dauer von 34,4 Tagen ergibt (*SWIERSTRA 1968*).

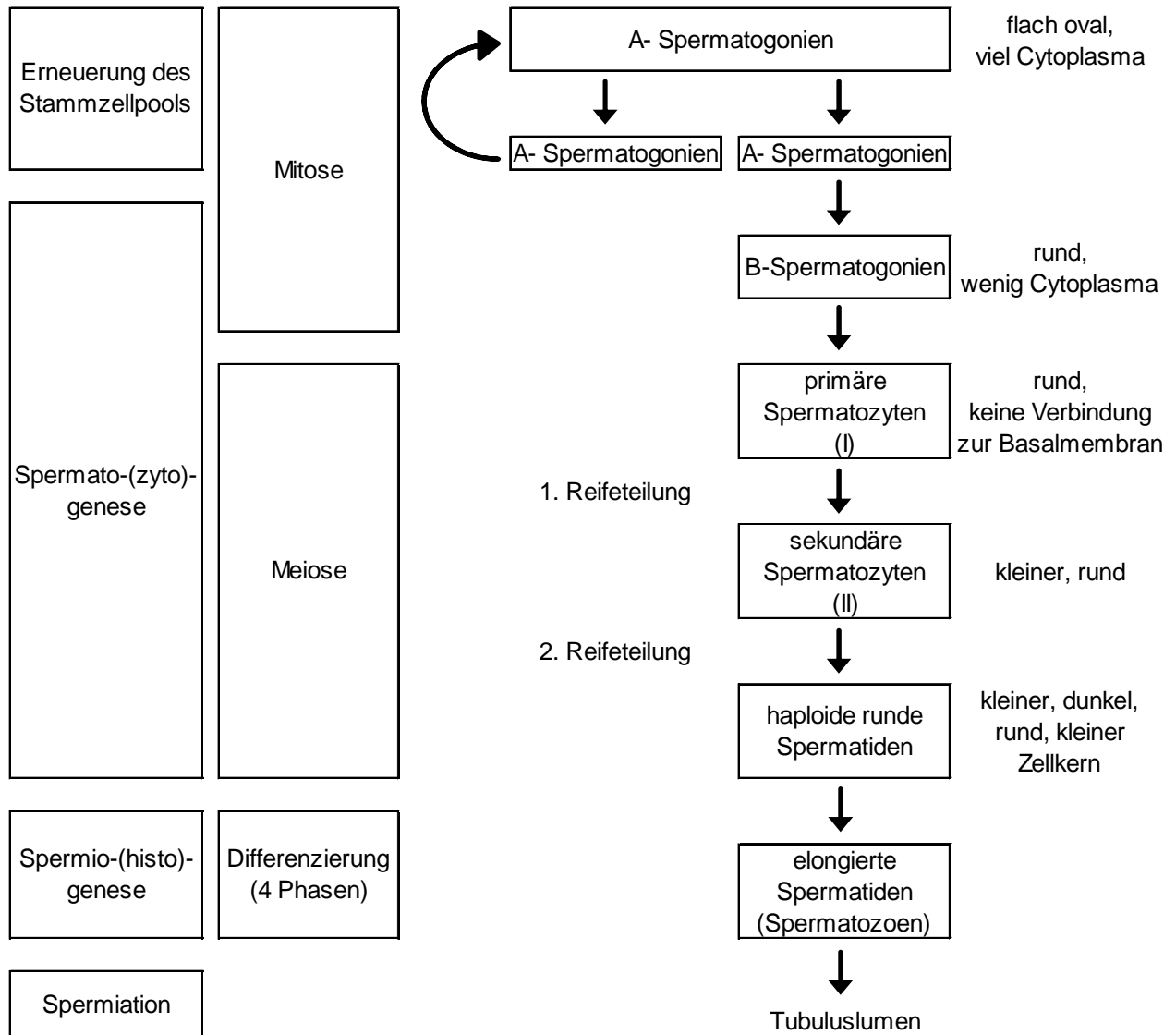


Abb. 2. 1 Schematische Darstellung der Spermatogenese (CLERMONT 1972, HOFFMANN 2003, WAGNER 2005).

Die 1. Reifeteilung (Meiose I) zeigt die primären Spermatozyten in den Phasen prälepto-, lepto-, zygo-, pachy-, diplotän und in der Diakinese. Die vier Differenzierungsphasen der Spermio-genese gliedern sich in die Golgi-, Kappen-, akrosomale und die Reifungsphase (CLAUS & WEILER 1987).

Die Sertolizellen liegen zwischen den Keimzellen der Basalmembran der Tubuli auf und erstrecken sich bis ins Lumen der Tubuli, wodurch sie diesen eine gewisse Stabilität verleihen. Sie fungieren als Ammenzellen, indem sie durch viele Falten, Einstülpungen und Fortsätze einen engen Kontakt zu den Keimzellen (sog. Gap junc-

tions) herstellen und so die Nährstoffe für die sich entwickelnden Spermien bereitstellen. Ferner

- vermitteln sie die Wirkung der übergeordneten Hormone FSH und LH (über Testosteron) auf die germinativen Zellen
- bilden sie einen erheblichen Bestandteil der Blut-Hoden (Spermatogenese)-Schranke (sog. Tight junctions; *AUMÜLLER* 1978)
- phagozytieren sie Cytoplasmareste
- kontrollieren sie die Zusammensetzung der Tubulusflüssigkeit

Die Zahl der Sertolizellen wird in der Pubertät bestimmt und ist fortan konstant (*McLACHLAN* et al. 1995, *WAGNER* 2005), aber individuell variabel (*OKWUN* et al. 1996).

Die sich daran anschließenden Hodenkanälchen sind nicht mehr mit der Bildung der Keimzellen betraut, sondern übernehmen ausschließlich die Sezernierung von spezifischen Flüssigkeiten. Man unterscheidet in septale Tubuli recti, welche die an das Lumen der Samenkanälchen abgegebenen Samenzellen (sog. Spermiation) aus den Tubuli contorti mehrerer Lobuli aufnehmen und in mediastinale Tubuli recti, welche die Verbindung zum Hodennetz (Rete testis) herstellen. An der Extremitas capitata entstehen aus dem Rete testis die Ductuli efferentes, welche die Tunica albuginea überwinden und zum Parenchym des Nebenhodenkopfes werden (siehe 2.1.1.). Der weitere Reifungsprozess der Spermatozoen findet während der beim Eber 10-14 Tage dauernden Nebenhodenpassage statt (*SWIERSTRA* 1968).

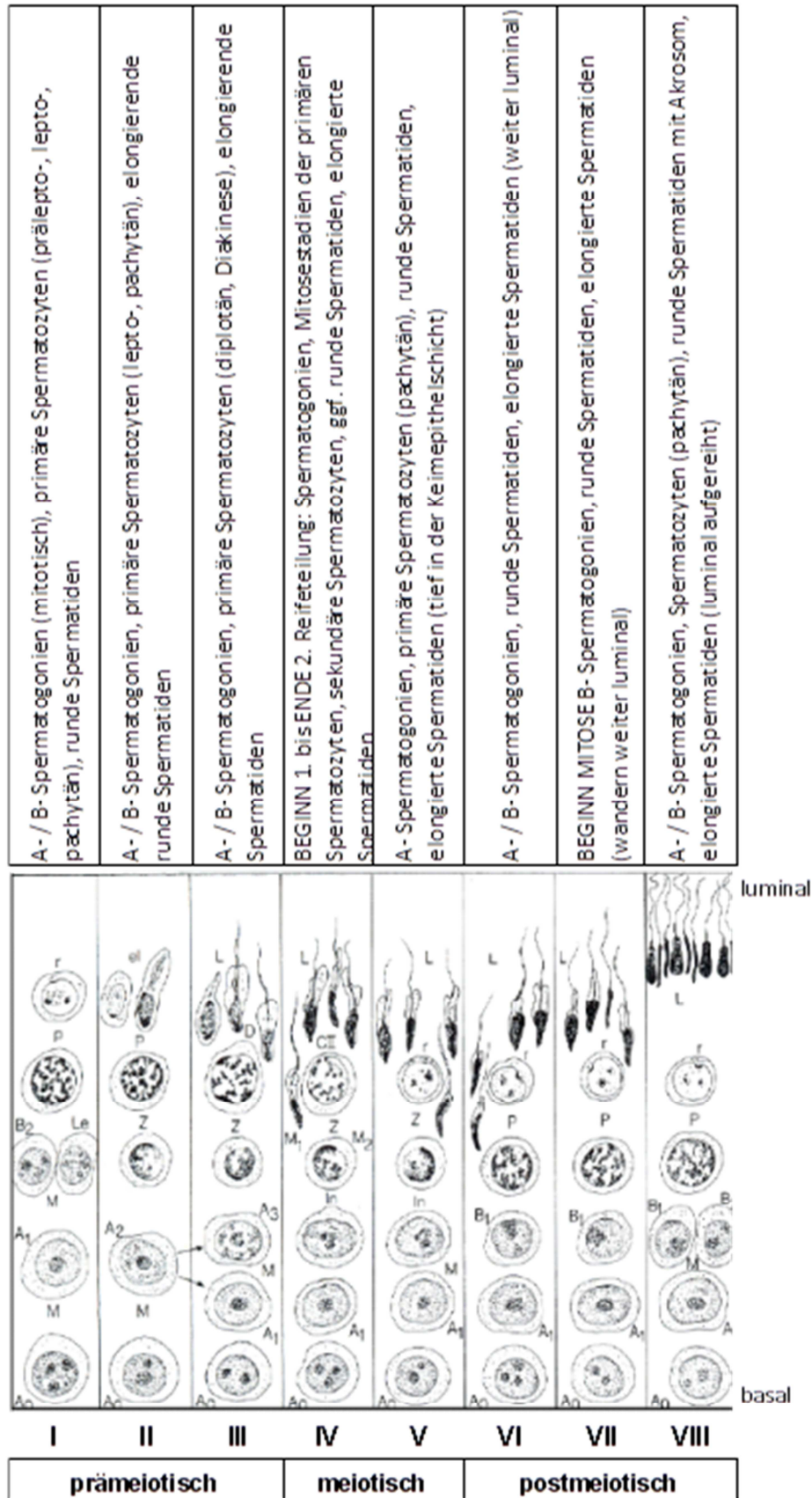


Abb. 2. 2 Charakterisierung der Stadien des Keimepithelzyklus nach SWIERSTRA 1968 und GARCIA-GIL et al. 2002

2.1.1.2. Interstitium mit Leydigzellen

Die Leydigzellen (Zwischenzellen) liegen als große polygonale Zellen dicht gepackt zwischen vereinzelt liegenden Blut- und Lymphgefäßen im intertubulären lockeren Bindegewebe.

Beim Eber machen sie zwischen 25 % (*AWONIYI et al. 1988a, CLAUS et al. 1983*) und nahezu 30 % (*GROTH & CLAUS 1977*) des gesamten Hodengewebes aus; der Eber übertrifft andere Tierarten und den Menschen hierbei um das Drei- bis Achtfache (*WAGNER 2005*).

In den Leydigzellen findet die Steroidbiosynthese (Bildung von Androgenen und Östrogenen) statt. Die hierzu notwendigen Enzyme finden sich in den Endoplasmatischen Reticuli (ER) und den Mitochondrien.

Durch ihren engen Kontakt zu den Blutgefäßen und den Tubuli seminiferi werden die synthetisierten Steroide an das periphere Blutplasma abgegeben und die Spermatogenese in den Samenkanälchen ermöglicht (*WAGNER 2005*).

Die Androgene nehmen Einfluss auf die Differenzierung und Funktion der männlichen Geschlechtsorgane inklusive der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, die Ausbildung typischer sekundärer Geschlechtsmerkmale und das Verhalten. Bei Kastraten finden sich je nach Kastrationszeitpunkt (prä- oder postpubertär) entsprechende Auswirkungen.

2.1.2. Anatomie und Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen

Bei den akzessorischen Geschlechtsdrüsen (*Glandulae genitales accessoriae*) handelt es sich um exokrine Drüsen, die ihr Sekret dorsal in die Pars pelvina urethrae abgeben. Bezüglich ihrer Anlage (Vgl. Abb. 2.3), Größe und Lage bestehen große speziesspezifische Unterschiede, wobei der Eber die anderen landwirtschaftlichen Nutztiere diesbezüglich deutlich übertrifft – auch was das Ejakulatvolumen betrifft (*McKENZIE et al. 1938*).

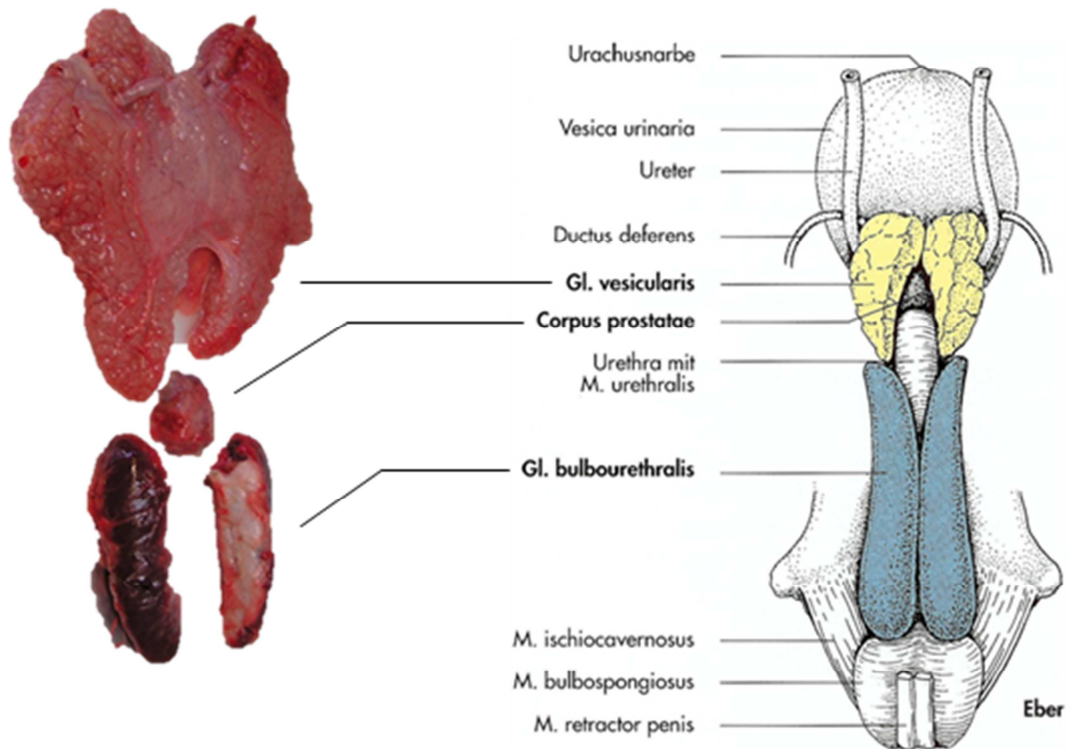


Abb. 2. 3 Anatomische Lage der Geschlechtsdrüsen des Ebers (rechts; *KÖNIG, LIEBICH* 1999) im Vergleich zu Gewebeproben (links).

Von cranial nach caudal lassen sich topographisch folgende Drüsen unterscheiden:

- die Samenleiterampulle, Ampulla ductus deferentis:
Beim Eber ist lediglich eine geringere Anzahl von Drüsen in der Wand des distalen Samenleiters ausgebildet, die sogenannten Glandulae ampullae. Sie ersetzen die fehlende Ampulla.
- die Samenblasendrüse, Glandula vesicularis
- die Vorsteherdrüse, Prostata
- die Harnröhrenzwiebeldrüse, Glandula bulbourethralis

Die Gl. vesicularis und Gl. bulbourethralis zeichnen sich im Vergleich zur Prostata durch ihre enorme Größe aus und nehmen einen beträchtlichen Teil des Beckenraumes ein.

Wachstum und Funktion der Geschlechtsdrüsen werden von Geschlechtshormonen gesteuert (*JOSHI & RAESIDE* 1973). Bei Frühkastraten sind sie nur mäßig ausgebildet, während zwischen Spätkastraten und intakten Ebern kaum ein Unterschied feststellbar ist. Die Drüsengewebe von Spätkastraten stellen ihre Funktion ein und atro-

phieren, was sich in einer Reduktion der Gesamtsekretmenge äußert (*JOSHI & RAESIDE 1973, RAESIDE et al. 1999*).

2.1.2.1. Samenblasendrüse

Die Gl. vesicularis besteht als paariges Organ aus zwei bindegewebig miteinander verbundenen pyramidenförmigen rosarot gefärbten Drüsenlappen, deren Basis nach cranial und deren Spitze nach caudal weist. Beim intakten ausgewachsenen Eber ist sie zwischen 12 und 17 cm lang, 6-8 cm breit und etwa 3-5 cm dick (*NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE 1999*). Die kompakten, grobhöckrigen Vesicularlappen ragen in die Bauchhöhle vor und schieben sich zwischen die beiden Lamellen der Plica genitalis ein. Die Vesica urinaria – sowohl der Harnblasenkörper als auch der -hals –, die Pars preprostatica urethrae und der Corpus prostaticae werden teilweise von ihnen bedeckt.

Das Schnittbild der stark verzweigten tubulo-alveolären Samenblasendrüse zeigt sich deutlich lobuliert mit großen Sammelräumen, die enorme Sekretmengen bevorraten können. Das interstitielle Bindegewebe sowie der Organüberzug enthalten glatte Muskelfaserzüge, welche das Sekret bei der Ejakulation auswerfen. Die Ausführungsgänge führen beiderseits in den Ductus excretorius, der dicht neben dem Samenleiter separat auf dem Samenhügel (Colliculus seminalis) in die Harnröhre mündet.

Die Samenblasendrüse steuert Zitronensäure und Fructose zum Seminalplasma bei (*MANN 1954, MANN 1974*), sowie auch Inositol, Ergothionein und Zink (*CLAUS & WEILER 1987*).

2.1.2.2. Prostata

Der kleine Corpus prostaticae (Ø 3-4 cm lang, 2-3 cm breit, 1 cm dick) liegt plattenförmig als Lobus dexter et sinister dorsal der Harnröhre (Urethra) auf.

Der größte Teil der Drüse (Pars disseminata) ist manschettenartig in die vom quergestreiften M. urethralis ummantelte Harnröhrenwand integriert.

Die Kapsel des Corpus und das Interstitium bestehen aus glatter Muskulatur.

Aus beiden Anteilen der Prostata wird das Sekret über zahlreiche Ausführungsgänge seitlich des Samenhügels in einer Vertiefung der Schleimhaut (Sinus prostaticus)

an die Pars prostatica der Harnröhre abgegeben (*NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE 1999*).

Die Prostata produziert den Chloridanteil (300 mg/100 ml) des Seminalplasmas (*CLAUS & WEILER 1987*).

2.1.2.3. Bulbourethraldrüsen

Mit durchschnittlich 17-18 cm Länge und einer Dicke von 5 cm ist die Gl. bulbourethralis sowohl die Größte aller akzessorischen Geschlechtsdrüsen beim Schwein als auch im Vergleich zu anderen Spezies (*NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE 1999*). Die paarigen, walzenförmigen vom M. bulboglandularis eingehüllten Drüsenkörper bedecken dorsal – median eng aneinanderliegend – fast den gesamten pelvinen Anteil der Harnröhre bis an den Beckenausgang sowie den Beckenboden. Dieser raumfordernde Situs macht eine rektale Exploration der Bulbourethraldrüsen möglich.

Im Schnittbild zeigen sich die Sekretsammelräume innerhalb der Drüsenläppchen groß und blasig. Das Interstitialgewebe und die Organkapsel enthalten reichlich glatte Muskulatur. Paarige Ausführungsgänge (je ein Ausführungsgang je Drüsenhälfte) am caudalen Ende der Drüsenkörper geben das glasig-schleimige, zähflüssige Bulbourethralsekret („Gel“ 20-40 mg/100 ml Seminalplasma; *CLAUS & WEILER 1987*) unter dem Bulbus penis in die Harnröhre ab.

2.1.2.4. Zusammensetzung und Sekretion des Seminalplasmas

Menge und Zusammensetzung des Seminalplasmas (Samenflüssigkeit, Sperma) entspricht der sekretorischen Aktivität der tierartlich unterschiedlich ausgebildeten akzessorischen Geschlechtsdrüsen und hängt stark vom Androgen- wie auch Östrogenstatus der Tiere ab (*SINOWATZ et al. 1978, RAESIDE et al. 1999*). Somit variieren Farbe und Viskosität der diversen Samenergüsse. Ihre Sekrete werden den Samenzellen bei der Ejakulation beigefügt. Da die Geschlechtsdrüsen den größten Anteil des Spermas liefern, bestimmt die von ihnen abgegebene Sekretmenge das Volumen des Ejakulates. Die Qualität eines Ejakulates jedoch ist abhängig von der Zahl (Ø 30 Mrd. Spermien/Ejakulat; *CLAUS & WEILER 1987*), Vitalität und Morphologie der Samenzellen. Die Menge und Beschaffenheit wiederum korreliert mit der Häufigkeit des Deckaktes bzw. der Samengewinnung.

Die Drüsensekrete regen die Samenzellen zu einer lebhaften zielgerichteten Motilität an bzw. erlauben deren freie Fortbewegung und bieten ein optimales Stoffwechsellieu (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE 1999).

Die akzessorischen Geschlechtsdrüsen geben ihre Sekrete nicht simultan, sondern fraktioniert, d.h. in drüsen- und tierarttypischer zeitlicher Abfolge und Dauer ab. Folglich wechseln die einzelnen Bestandteile der Samenflüssigkeit während der Ejakulation – es können unterschiedliche Ejakulatfraktionen differenziert werden.

Der Eber ejakuliert fraktioniert Volumina von bis zu 500 ml, bedingt durch einen besonders großen Anteil an Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen (SINOWATZ et al. 1978). Das Vorsekret (Ø 5-15 ml) oder auch Präpermienfraktion ist von wässrig-schleimiger Konsistenz, dem sagokornartige Flocken beigemengt sein können. Hierbei handelt es sich um Beimengungen der Bulbourethraldrüsen. Das Seminalplasma der ersten Hauptphase oder spermienreichen Fraktion (Ø 120-350 ml) enthält 80-90 % aller Spermien und besteht vorwiegend aus den Sekreten der Prostata und der Gl. vesicularis. Das Sekret der Gl. bulbourethralis verleiht der nachfolgenden Postpermienfraktion (zweite Hauptphase, Ø 50-300 ml) durch ihre sagokornartige Konsistenz eine grau-weißliche Färbung. Sie enthält nur noch sehr wenige Samenzellen (HOFFMANN 2003).

2.2. Hormonale Regulation der Reproduktion beim Eber

Die Regulation der männlichen Fortpflanzung erfolgt durch das endokrine System – insbesondere durch den Hypothalamus (Freisetzung von GnRH), den Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse; Sekretion von LH und FSH) und den Leydigzellen des Hodens (Steroidbiosynthese).

2.2.1. Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH)

Das Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH), auch bekannt als Luteinisierungshormon-Releasing Hormon (LHRH) (TURKSTRA & MELOEN 2006), ist bei den Säugetieren aus zehn Aminosäuren aufgebaut (Dekapeptid mit 1,18kDA).

Es wird im rostralen und mediobasalen Hypothalamus gebildet, auf axonalem Weg in die mediane Eminenz transportiert und dort gespeichert. Seine Freisetzung in den Primärplexus der hypophysären Portalgefäße erfolgt in charakteristischen Pulsen,

um dann auf humoralem Wege an die gonadotropen Zellen der Adenohypophyse transportiert zu werden. Die pulsatile GnRH Sekretion wird unmittelbar durch einen „Pulsgenerator“ im Nucleus infundibularis gesteuert sowie durch eine Vielzahl von Hormonen und Neurotransmittern reguliert. So inhibieren hohe Androgenkonzentrationen über Feedbackmechanismen sowohl direkt als auch indirekt die LH Sekretion der Hypophyse als auch die GnRH-Freisetzung im Hypothalamus (*TURKSTRA & MELOEN 2006*).

An den gonadotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens stimuliert GnRH die Sekretion, Synthese und Speicherung der Gonadotropine LH und FSH, welche die gonadale Hormonsynthese regulieren.

Die Synthese und Sekretion von LH wird ausschließlich über GnRH gesteuert, während GnRH lediglich die basalen FSH-Konzentrationen bedingt und kurzfristige Erhöhungen sowie die Pulsatilität von FSH über separate Mechanismen gesteuert werden (*CULIER & NEGRO-VILAR 1986*).

Niedrige Konzentrationen an GnRH führen zur Anbildung der eigenen hypophysären Rezeptoren sowie zur Proliferation der gonadotropen Zellen, hohe GnRH-Konzentrationen allerdings führen zu einer Desensibilisierung der Zellen und bedingen somit abfallende Konzentrationen von LH und FSH.

Im peripheren Kreislauf wird das GnRH schnell durch Peptidasen metabolisiert (\emptyset HWZ 4 min; *HALL & GOMEZ-PAN 1976*), was die nur geringen extrahypophysären Wirkungen erklärt.

2.2.2. Gonadotropine und ihre Funktion

Zu den Gonadotropinen gehören das Luteinisierungshormon (LH) und das Follikel stimulierende Hormon (FSH), beides Glykoproteine mit jeweils 115 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 29-30 kDa. Ihr Aufbau ist gekennzeichnet durch eine speziesspezifische β -Untereinheit sowie eine speziesspezifische α -Untereinheit (*KOENIG 1993*). Sie steuern direkt die Funktion des Hodens (*CLAUS & WEILER 1987*). Eine gewisse autonome Freisetzung der Gonadotropine, neben der durch GnRH gesteuerten, ist möglich.

2.2.2.1. Luteinisierungshormon (LH)

Das Luteinisierungshormon (LH) stellt einen entscheidenden Faktor in der Biosynthese der Gonadensteroiden dar.

Seine Wirkung entfaltet es beim Eber ausschließlich an den Leydigzellen über membranständige Rezeptoren, wo durch Anregung der spezifischen Enzyme die Bereitstellung der Vorstufen der Steroidbiosynthese (Pregnenolon, Progesteron) erfolgt wie auch alle nachfolgenden enzymgesteuerten Syntheseschritte reguliert werden können (WAGNER 2005). Es stimuliert außerdem die Umwandlung von Cholesterol, das in den Lipidtröpfchen der Leydigzellen gespeichert wird, zu Pregnenolon (CLAUS & WEILER 1987).

Weiterhin stimuliert LH die morphologische Entwicklung der Leydigzellen sowie die Freisetzung von Androgenen und Östrogenen.

Bei adulten Tieren kommt es nach Einwirkung sehr hoher LH-Konzentrationen zu einer up-Regulation der LH-Rezeptoren, worauf eine sehr deutliche down-Regulation folgt.

2.2.2.2. Follikelstimulierendes Hormon (FSH)

Die Rolle des FSH ist beim Eber noch nicht vollständig geklärt und beim adulten Tier physiologisch kaum von Bedeutung.

Es entfaltet seine Wirkung auf die Samenkanälchen und dort primär auf die Sertolizellen, deren adult konstante Zahl bereits in der Pubertät über FSH festgelegt wird (z.B. McLACHLAN et al. 1995). Über diese bewirkt es einen indirekt fördernden Einfluss auf die frühen Stadien der Spermatogenese (LAURIA et al. 1979, BERGMANN 1987, McLACHLAN et al. 1996), das heißt es aktiviert die Bereitstellung von A-Spermatogonien sowie die nachfolgenden Spermatogeneseschritte.

Ferner ist FSH für die Wiederaufnahme der Spermatogonienteilungen bei saisonalen Reproduktionsformen verantwortlich (BERGMANN 1987). Die Spermatogenese in qualitativer Hinsicht bleibt erhalten auch wenn die testikuläre Testosteronproduktion unter 5 % des Normalwertes liegt.

FSH fördert bei verschiedenen Spezies die Spermatogenese, indem es die Sertolizellen zur Produktion unterschiedlicher lokal und zentral wirksamer Peptide veranlasst, darunter das Androgen bindende Protein (ABP), welches Testosteron und Dihydro-

testosteron mit hoher Affinität bindet und damit zur Förderung der Spermatogenese verfügbar macht (*TURKSTRA & MELOEN 2006*). Bei Eber und Hengst fehlt der Nachweis einer derartigen FSH Wirkung, sie besitzen kein ABP (*JÉGOU & LE GAC JÉGOU 1978, CLAUS & WEILER 1987*).

Die Bildung und Freisetzung von FSH betreffend bestehen speziesspezifische Unterschiede. Studien zur GnRH-Immunsierung und somit der selektiven Blockade von GnRH zeigten, dass die FSH-Konzentrationen bei Schwein und Pferd nicht beeinflusst wurden (*AWONIYI et al. 1988b, RABB et al. 1990*), während die Bildung und Freisetzung von LH vollständig gehemmt wurde. Bei Schafen, Rindern und Nagern wurde auch für FSH eine vollständige Unterdrückung der Synthese und Sekretion erreicht (*BROWN et al. 1994, FINNERTY et al. 1998, McLACHLAN et al. 1995*).

Beim Schwein wird FSH durch separate Steuerungsmechanismen wie Aktivin, Inhibin und Follistatin reguliert (*KUMAR & LOW 1993, BROWN & MCNEILLY 1999, BERNARD & WODRUFF 2001*); auch ein FSH-spezifisches Releasing Hormon steht zur Diskussion (*YU et al. 1997, YU et al. 2000*). Inhibin wird in den Sertolizellen gebildet und wirkt über ein negatives Feedback auf die Sekretion von FSH, wohingegen Aktivin in der Adenohypophyse gebildet wird und die FSH-Bildung beeinflusst. Der Stimulation des GnRH Rezeptors bzw. der direkten GnRH Sekretion durch Aktivin wirken Inhibin und Follistatin entgegen, indem sie die Aktivinbindung unterbinden (*GREGORY & KAISER 2004*).

FSH und Testosteron wirken synergistisch auf die Spermatogenese und garantieren ihr qualitatives und quantitatives Optimum (*SUN et al. 1990, McLACHLAN et al. 1996*). FSH steuert hierbei den Eintritt der Spermatogonien in die Spermatogenese, bestimmt also die Spermienzahl im Ejakulat (*SHARPE 1989*); Testosteron bedingt die Spermio-genese (*SUN et al. 1990*). Beim Eber scheint dieser Umstand jedoch umstritten (*WAGNER 2005*).

2.2.3. Steroide des Hodens und ihre Funktion

Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem sehr großen Anteil von Leydigzellen am Hoden des Ebers und dem breitgefächerten Spektrum an dort synthetisierten Steroiden: neben den Androgenen Testosteron, Androstendion und 5 α -Dihydrotestosteron, werden auch Östrogene kontinuierlich in das periphere Blutplasma freigesetzt („tonische Sekretion“, *CLAUS & WEILER 1987*). Darüberhinaus

wird auch das Pheromon 5 α -Androst-16-en-3-on – ein Δ 16-Steroid ohne hormonale Wirkung – synthetisiert (siehe auch 2.3.1.1.1. Androstenon).

Über Feedback-Mechanismen auf den Hypothalamus und den Hypophysenvorderlappen und damit auf GnRH bzw. LH und FSH regulieren die Gonadenhormone das Ausmaß ihrer Synthese und Freisetzung mit.

In deutlich geringerem Umfang („Spuren“) erfolgt eine extratestikuläre Synthese in der Nebennierenrinde (GOWER 1972).

Die Bildung der Steroide ist in Abb. 2.4 zusammengefasst.

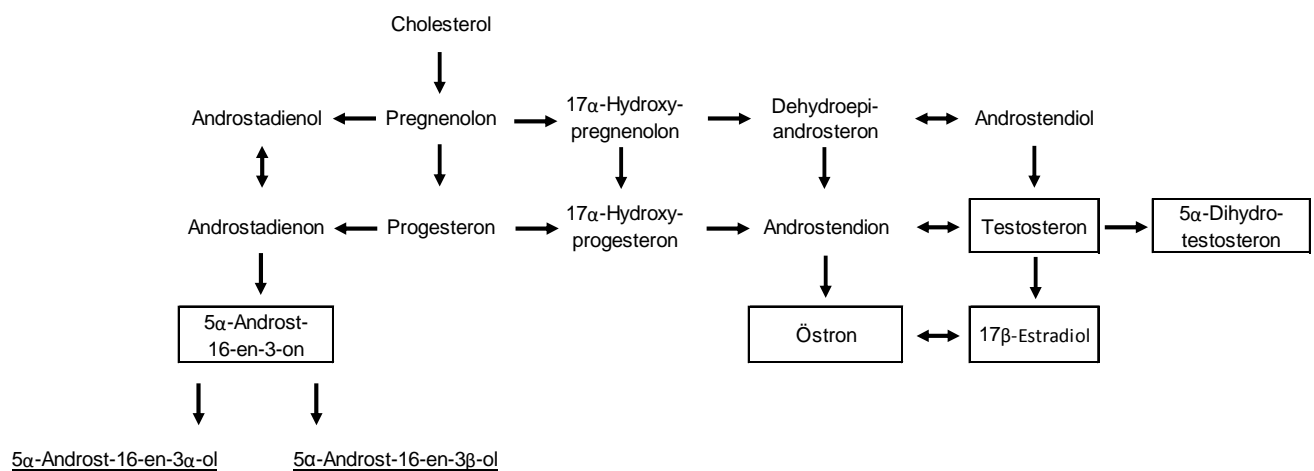


Abb. 2.4 Stufen der Steroidbiosynthese in den Leydigzellen nach *BONNEAU* 1982.

2.2.3.1. Androgene

Androgene sind männliche Geschlechtshormone testikulären Ursprungs. Sie binden an den Androgenrezeptor und üben so ihre androgene Wirkung aus.

Die Androgene steuern zahlreiche Körperfunktionen (*CLAUS & WEILER* 1987), sind also essentiell für

- den Hodenabstieg
- die Ausprägung der sekundären Geschlechtsmerkmale
- das männliche Sexualverhalten (auch das Aggressionspotential wird beeinflusst)
- die Libido

- die Spermatogenese (Vgl. 2.2.2.2. Follikelstimulierendes Hormon (FSH)): Auswirkungen auf das Spermogramm sind nach etwa 1 Monat zu erwarten (Wirkungseintritt der Steroide nach 2,5 Wochen + 2 Wochen Nebenhodenpassage)

außerdem

- unterhalten sie die Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Wirkungseintritt nach 5 Wochen)

und

- sind Stoffwechselformone (anabole Wirkung).

Die wichtigsten physiologischen Androgene sind Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron (5 α -DHT). 5 α -DHT ist stärker im Genitaltrakt vertreten und fördert Entwicklung der akzessorischen Geschlechtsdrüsen (PARROTT & BOOTH 1984).

In den zahlreichen Zielorganen der Androgene wandelt das Enzym 5 α -Reduktase Testosteron in 5 α -DHT durch eine Absättigung der Doppelbindung am A-Ring um, was eine drei- bis vierfach höhere Affinität zum Androgenrezeptor aufweist und somit eine erheblich höhere androgene Wirksamkeit entfaltet.

Androgenrezeptoren sind nukleäre Rezeptoren, welche als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren fungieren. Rezeptoren wurden nachgewiesen in peritubulären Zellen, Sertoli- und Leydigzellen, aber nicht in den Keimzellen. Demnach wirkt Testosteron im Hoden eher als parakriner Faktor, in allen übrigen Organen wie den Geschlechtsdrüsen aber als klassisches Hormon, also endokrin.

Im Blutplasma findet man durchschnittlich Werte von 2,15 ng Testosteron/ml (max: 11,50 ng Testosteron/ml) und etwa durchschnittlich 0,75 ng 5 α -DHT/ml (max: 2,75 ng 5 α -DHT/ml) (CLAUS et al. 1983) abhängig von

- Tageszeit (CLAUS & GIMÉNEZ 1977, CLAUS & HOFFMANN 1980)
- Alter (ALLRICH et al. 1982, SCHWARZENBERGER et al. 1993)

und

- Photoperiode (CLAUS et al. 1983), welche dem saisonalen Effekt der Fruchtbarkeit zugrunde liegt.

Testosteron besitzt wachstumsfördernde, anabole (CLAUS & WEILER 1994) und antikatabole Wirkungen (MAYER & ROSEN 1977, CHEN et al. 1997).

2.2.3.2. Östrogene

Die Bildung der Östrogene im männlichen Organismus weist deutliche artbedingte Unterschiede auf. Beim Eber und dem Menschen werden sie ausschließlich in den Leydigischen Zwischenzellen gebildet, da hier die für die Synthese notwendige Aromatase exprimiert wird (z.B. *CARREAU et al. 2001*).

Eine sehr hohe Östrogenproduktion (z.B. 17 β -Estradiol) findet sich beim Hengst und beim Eber, welche zum Teil sogar die Konzentrationen von östrischen Sauen übersteigen (*CLAUS & HOFFMANN 1980, CLAUS et al. 1983*).

Man unterscheidet zwischen den in größerer Menge vorkommenden konjugierten Östrogenen und den unkonjugierten Östrogenen. Die Konzentrationen an Östron liegen demnach höher als die von 17 β -Estradiol, welches jedoch stärker östrogen wirksam ist. So weisen mature Eber durchschnittlich bis zu 280 pg Östrogene/ml auf, aber nur 180 pg 17 β -Estradiol/ml Blutplasma (*WEILER et al. 1998, CLAUS & HOFFMANN 1980*).

Östrogene fördern synergistisch mit Testosteron die Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, die Libido des Ebers und beeinflussen das männliche Sexualverhalten (*JOSHI & RAESIDE 1973, PARROTT & BOOTH 1984*), sowie die Spermatogenese (*WAGNER et al. 2006*), sind im Ejakulat enthalten und stimulieren somit im weiblichen Genitale die Uteruskontraktionen, was den Spermientransport erleichtert und die Ovulation fördert (*CLAUS 1990*).

Ihre Wirkung entfalten sie direkt über lokale Östrogenrezeptoren, die anabole Wirkung auf den Proteinstoffwechsel wird über die Steigerung der GH-IGF-1-Achse (*CLAUS & WEILER 1994*), allerdings dosisabhängig erzielt, auf den Kohlenhydratstoffwechsel bezogen verstärken sie die Insulinwirkung und fördern den Fettansatz.

RAGO et al. 2004 konnte den Östrogenrezeptor α (ER α) in Spermatogonien, Spermatozyten und Leydigzellen sowohl immaturer als auch maturer Eber nachweisen, den Östrogenrezeptor β (ER β) jedoch nur in Spermatogonien und Spermatozyten maturer Eber.

2.3. Ebermast und Geschlechtsgeruch

Während früher zu Zeiten harter körperlicher Arbeit durch Fleisch ein sehr hoher Energiebedarf gedeckt werden musste und somit der Fettanteil des Fleisches erwünschtes Qualitätskriterium war, wünscht sich der Verbraucher heute einen höheren Magerfleischanteil. So kam auch die Diskussion auf, den Wunsch nach mehr Magerfleischanteil über die Mast von Ebern zu decken (*BAUER* 2010). Problematisch stellt sich hierbei das Auftreten des Ebergeruches dar, der in unterschiedlichen Ausprägungen seitens der Verbraucher wahrgenommen wird (Vgl. 2.3.1.2. Verbraucherakzeptanz von Eberfleisch) und zu Beanstandungen der Fleischqualität führt.

2.3.1. Kriterien der Mast- und Schlachtleistung bei Ebern und Börgen

Bezüglich der Mast- und Schlachtleistungsparametern von intakten Ebern, Kastraten (Börgen) und Sauen bestehen wesentliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern, die zum einen durch die anabolen Effekte der Geschlechtshormone bedingt werden, sich aber auch zwischen den einzelnen zeitlichen Phasen der Mast und somit den Gewichtsspannen unterscheiden (*WALSTRA* 1974, *NEUPERT* et al. 1995, *SPRING* et al. 2009).

Tab. 2. 1 Unterschiede in den Mastleistungsparametern zwischen Börgen und Ebern in der Mastphase 28-207 kg (*SPRING* et al. 2009)

	Eber	Börge
Futtermittelverbrauch (kg/d)	2,06	2,35
tgl. Zunahmen (g/d)	885	927
Futtermittelverwertungsrate	2,33	2,54
Rückenspeckdicke (cm)	1,29	1,95
Magerfleischanteil	56,6	53,2

Die Ebermast konnte sich bislang in Deutschland nicht durchsetzen, da die Verbraucher- bzw. Marktakzeptanz für Eberfleisch und die damit verbundene geruchliche Beeinträchtigung des Fleisches nicht gegeben ist. In anderen EU Ländern hat sich die Ebermast jedoch teilweise etabliert (z.B. Spanien, England, Irland).

Aus der Ebermast resultieren folgende wirtschaftliche Vorteile:

- kein Arbeitsaufwand für Kastrationen
- geringere Ferkelverluste
- weniger Wachstumseinbußen nach der Kastration
- schnellere Wachstumsrate bei intakten Ebern durch höhere tägliche Zunahmen (*HERZOG et al. 1993, CLAUS 1983a*)
- Eber besitzen eine bessere Futtermittelverwertung
- höhere Magerfleischanteile, höherer Proteinansatz resultieren in einem günstigeren Fleisch-Fett-Verhältnis
- verringerte Stickstoffausscheidung bei hohen Besatzdichten und weniger Boden- und Trinkwasserverschmutzungen durch Stickstoff in der Gülle (*CLAUS 1993*)

Börge setzen den Futterverbrauch vermehrt als Fett an, während Sauen bezüglich der Mast- und Schlachtleistungsparameter stets zwischen denen von Ebern und Börgen liegen (*DOBROWOLSKI et al. 1993, KAY & HOUSEMAN 1975*).

Nachteile der Ebermast:

- verminderte Fleischqualität
- zu mageres, weniger zartes Fleisch
- ein Defizit an intramuskulärem Fett bedingt ein weniger geschmackvolles und weniger saftiges Fleisch (*BRANSCHIED 1993*)
- das wenige Fett enthält mehr ungesättigte Fettsäuren, was eine höhere Oxidationsrate sowie eine bröckeligere Konsistenz des Fleisches zur Folge hat (*MALMFORS & NILSSON 1978, BARTON-GADE 1987*)
- der Ebergeruch (Androstenon, Skatol)
- bzgl. der Haltung von Ebern: mit Eintritt der Geschlechtsreife führen gesteigerte Aggressivität und sexuelle Aktivität zu Verletzungen und Gliedmaßenproblemen, sowie Stress- und Angstzuständen. Rangordnungskämpfe können die Testosteron-, Androstenon- und Skatolspiegel beeinflussen (*GIERSING et al. 2000*).

Nach *CLAUS 1983a* lassen sich Vor- und Nachteile der Ebermast jedoch nicht isoliert betrachten, vielmehr sollte eine zusammenhängende Beurteilung erfolgen. Dem-

nach wächst ein Eber nur dann gut, wenn auch ausreichend anabole Hormone im Hoden gebildet wurden, parallel dazu wurde somit auch reichlich Androstenon gebildet, was sich entsprechend auf die Qualität des Schlachtkörpers auswirkt. Umgekehrt gilt: ist ein Eber frei von einer geruchliche Beeinträchtigung, dann wurden wachstumsfördernde Hormone nicht in dem Maß gebildet, dass ein ein Mastvorteil zum Tragen kommt.

Wie der Syntheseweg der Steroide (Abb. 2.4) zeigt, ist Androstenon eng an die anabolen Geschlechtshormone gekoppelt. Auch *HERZOG et al.* (1993) konnte eine Korrelation zwischen den täglichen Zunahmen sowie der Nettofutterverwertung mit Androstenonwerten aufzeigen: die Zunahmen steigerten sich von 812 g pro Tag bei Werten $< 0,5 \mu\text{g}$ Androstenon/g Fett auf 936 g pro Tag bei Werten $> 1,0 \mu\text{g}$ Androstenon/g Fett, die Nettofutterverwertung verbesserte sich um 0,2 zwischen diesen Androstenonspannen.

2.3.1.1. Ursachen des Geschlechtsgeruches

Für den Geschlechtsgeruch des Ebers und damit der qualitativen Beeinträchtigung der Schlachtkörper sind im Wesentlichen zwei Substanzen verantwortlich: das Pheromon Androstenon und der Tryptophan-Metabolit Skatol.

Für Androstenon gilt ein Grenzwert von $0,5 \mu\text{g}$ Androstenon/g Fett, für Skatol beträgt dieser 250 ng Skatol/g Fett (*HERZOG et al.* 1993).

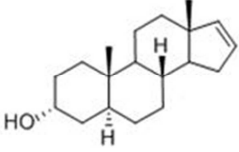
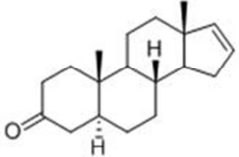
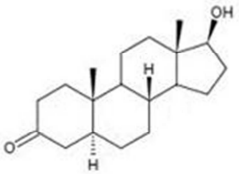
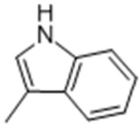
2.3.1.1.1. Androstenon

Der Geschlechtsgeruch des Ebers setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen, die teils moschus- teils urin- oder schweißartig riechen. Der typische Uringeruch konnte 1968 von *PATTERSON* (a, b) einer aus Fett isolierten Substanz zugeordnet werden – dem Steroid 5α -Androst-16-en-3-on, der moschusartige Geruch konnte auf eine strukturähnliche Substanz in den Speicheldrüsen des Ebers – dem 5α -Androst-16-en-3 α -ol – zurückgeführt werden. Sie gehören zur Gruppe der $\Delta 16$ -Steroide, die bereits 1944 von *PRELOG & RUZICKA* aus Eberhoden isoliert wurden und große strukturelle Ähnlichkeiten zu den Hodensteroiden mit hormoneller Wirkung haben (Vgl. Tab. 2.2). Entscheidend für die Geruchswirkung ist die $\Delta 16$ -Doppelbindung.

Die Synthese der Eberpheromone wie auch die der Sexualhormone – beim Schwein sind dies Androgene und Östrogene (CLAUS & HOFFMANN 1980) – sind eng aneinander gekoppelt (GOWER & AHMAD 1967). Sie findet in den Leydigzellen des Hodens ausgehend von den gemeinsamen Vorstufen (Pregnenolon, Progesteron) nach Stimulierung durch das Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) und nachfolgend des LH statt. Ein feststehendes enzymatisches Muster gewährleistet, dass die Vorstufen auf die beiden nachfolgenden Synthesewege gleichmäßig verteilt werden. Beide Substanzgruppen – Pheromone und Sexualhormone – werden somit aufeinander abgestimmt ans Blut abgegeben (CLAUS & GIMÉNEZ 1977). Die Ausprägung des Ebergeruches ist streng an die Bildung der anabolen Hormone und somit an den sexuellen Reifegrad des Ebers gekoppelt. Der Geschlechtsgeruch kann also nicht selektiv ohne eine Beeinflussung der Hormonbildung unterdrückt werden (Vgl. 2.3.2. Möglichkeiten zur Unterdrückung des Geschlechtsgeruches).

Tab. 2. 2 Ebergeruchskomponenten im Vergleich zum Hormon 5 α -DHT.

Die chemische Struktur des Androstenons ähnelt der der Sexualhormone aber es besitzt keine hormonelle Aktivität (CLAUS 1979).

		chemische Struktur	Syntheseort	Geruch	Physiologische Wirkung	Synthesehemmung
	5 α -Androst-16-en-3 α -ol	3-Hydroxysteroid	Testes / Gll. salivariae	moschusartig	Pheromon	nicht selektiv beeinflussbar
	5 α -Androst-16-en-3-on	3-Ketosteroid	Testes	urinartig	Pheromon	nicht selektiv beeinflussbar
	5 α -Dihydrotestosteron	Steroid	Testes	-	Hormon	-
	Skatol (3-Methyl-Indol)	Indol	Colon	fäkalartig	-	durch Fütterung bidirektional beeinflussbar

Die Pheromone werden in die Speicheldrüsen des Ebers transportiert, dort gespeichert und durch das typische „Patschen“ bei Sauenkontakt freigegeben. Bei der östlichen (rauschigen) Sau wird die Duldungsstarre (Immobilisierungsreflex) ausgelöst. Die Pheromone lösen darüberhinaus neuroendokrine Prozesse aus, die in einer Oxytocinfreisetzung resultieren. Oxytocine fördern durch Gebärmutterkontraktionen den Transport der Spermien zur Befruchtung. Ein Eber vermag auch durch seine Anwesenheit die Zeit nach dem Absetzen der Ferkel bis zum Einsetzen des neuen Zyklus zu verkürzen (CLAUS 1989/90).

Sowohl die Steroid- als auch die Pheromonbildung im Hoden kann kurzfristigen Schwankungen unterworfen sein. Um einem eventuellen Mangel an diesen Stoffen vorzubeugen, dienen Einlagerungen zu Zeiten hoher Syntheseleistungen in die Speicheldrüsen und in das gesamte Körperfett als Puffer. In das Körperfett kann allerdings nur die lipophile Substanz 5α -Androst-16-en-3-on eingelagert werden (Vgl. Abb 2.5, CLAUS 1979, CLAUS 1983b).

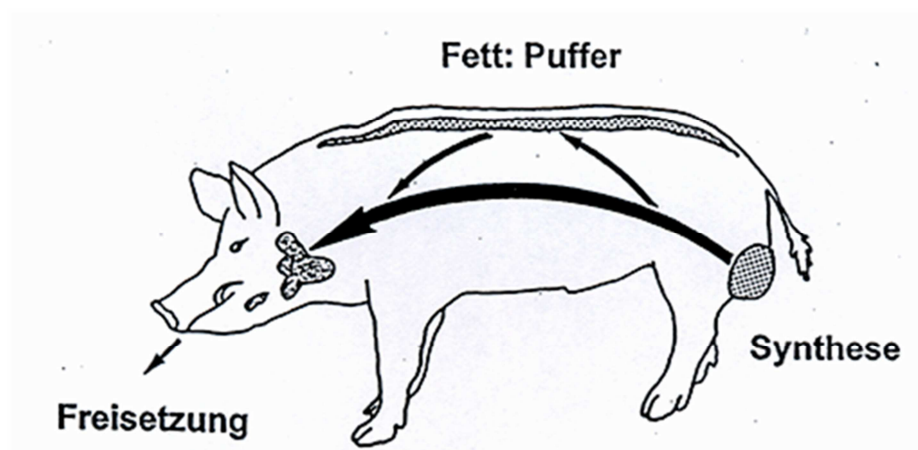


Abb. 2.5 Schematische Darstellung der Physiologie der Eberpheromone nach CLAUS 1983b

Aus dem Fettdepot in „Notzeiten“ mobilisiertes als 3-Ketosteroid vorliegendes 5α -Androst-16-en-3-on wird in den Speicheldrüsen das 3-Hydroxysteroid 5α -Androst-16-en-3 α -ol gebildet (Reduktion), so dass die gesamte Duftpalette zur Stimulierung der Sau bereit steht. Die Enzymaustattung zur De-Novo-Synthese fehlt den Speicheldrüsen (CLAUS 1979).

2.3.1.1.2. Skatol

Skatol (3-Methyl-Indol) entsteht beim bakteriellen Abbau der Aminosäure Tryptophan im Colon von Schweinen ohne strikte Koppelung an das Geschlecht (VOID 1970); zum einen wird Skatol mit den Fäzes ausgeschieden zum anderen ebenfalls wie Androstenon im Fettgewebe gespeichert (HERZOG et al. 1993). Skatol steht also nicht in einem direkten Zusammenhang zur Hodenfunktion.

Wahrgenommen wird Skatol als fäkalartig (VOID 1970, WEILER et al. 2000) und findet sich sowohl bei Börgen, Sauen und Ebern, wobei der Anteil an mit über dem Grenzwert von 250 ng Skatol/g Fett belasteten Schlachtkörpern deutlich häufiger bei Ebern auftritt.

Im Gegensatz zu Androstenon kann Skatol über die Fütterung beeinflusst werden: eine Fütterung mit roher Karoffelstärke in der Mastendphase reduziert die Skatolwerte auf deutlich unterhalb des Grenzwertes (CLAUS et al. 1994, CLAUS et al. 2003, LOESEL et al. 2006, SPRING et al. 2009).

2.3.1.2. Verbraucherakzeptanz von Eberfleisch

Die Verbraucherakzeptanz von Eberfleisch wird durch den Ebergeruch (Δ -16-Steroid 5 α -Androst-16-en-3-on, PATTERSON 1968a) stark beeinträchtigt, der sich v.a. nach der Erhitzung (MALMFORS & LUNDSTRÖM 1983, MATTHEWS et al. 2000) entfaltet.

Erstaunlich ist jedoch, dass das Vermögen diesen Ebergeruch wahrzunehmen sowohl regional als auch zwischen den Geschlechtern sehr unterschiedlich ausgeprägt ist. Generell scheinen Frauen sensitiver für dieses Pheromon zu sein als der männliche Anteil der Bevölkerung. Diverse Studien kamen zu dem Ergebnis, dass etwas mehr als ein Viertel der Bevölkerung (Vgl. Tab. 2.3) eine androgen-spezifische Anosmie bei ansonsten intaktem Riechvermögen aufweist (ELSELY 1968, GRIFFITH & PATTERSON 1970).

Tab. 2.3 Wahrnehmungsvermögen für den Ebergeruchsstoff Androstenon nach *CLAUS* 1983a.

* androstenon-spezifisch

Probanden (n)	Wahrnehmung (%)				Literaturverweis
	keine - Anosmie* -	schwach	mittel	stark	
286	25.0	23.6	33.5	18.0	Elsley 1968
301	27.5			17.5	Griffith & Patterson 1970
> 2000	26.2	22.2	27.0	24.6	Claus seit 1970 (unpubl.)
1.5 Mio	EUR, ASIA, AUS	24.1 - 25.5			Gilbert & Wysocki 1987
	♂ US	37.5			
	UK	30.0			
	♀ EUR, ASIA, AUS	15.8 - 17.9			
	US	29.5			
	UK	20.9			
472 (GER)	♂ GER	69.7	14.7	15.6	Weiler et al. 2000
	ESP	59.7	16.6	23.7	
480 (ESP)	♀ GER	65.9	14.7	19.3	
	ESP	48.1	14.6	37.3	

Gleichzeitig wird das individuelle Wahrnehmungsvermögen auch durch die jeweilige „Tagesform“ eines jeden sowie durch die Eigenschaften des Fleisches beeinflusst (*CLAUS* 1983a). Dazu gehören

- die Zubereitung des Fleisches
- Größe und Fettgehalt des zum Verzehr vorgesehenen Teilstückes
- kalter oder warmer Verzehr
- die tatsächliche Konzentration des Geruchsstoffes

Entscheidend ist auch, dass negative Proben als falsch positiv identifiziert werden können, da die Rezeptoren nach dem Geruch von Androstenon für eine gewisse Zeit blockiert sind (sog. „Nachklangeffekt“, *BAUER* 2010).

Nach *CLAUS* 1978 wird Androstenon bei vorhandenem Wahrnehmungsvermögen erst ab 1 µg Androstenon/g Fett sicher wahrgenommen (Vgl. Tab. 2.4).

Tab. 2. 4 Vergleich von Androstenonmesswerten mit einer subjektiven Beurteilung nach *CLAUS* 1978

Die minimal messbaren Konzentrationen von Androstenon bei Sauen und Börgen werden in der Nebennierenrinde gebildet (*GOWER* 1972, *CLAUS* 1976).

Androstenon (μg / g Fett)	Wahrnehmung und Ablehnung (subjektiv)	Bemerkung
≤ 0.15		auch bei Sauen und Börgen vorkommende Konzentrationen
0.16 - 0.30	nur im Einzelfall	
0.31 - 0.50	individuell zunehmend	abhängig von der Zubereitung des Fleisches
0.51 - 1.00	zu erwarten	starker Geruch
≥ 1.00	sicher	deutlich unangenehmer Geschlechtsgeruch

Skatol wird zwar, im Gegensatz zu Androstenon, zu 99 % von den Verbrauchern wahrgenommen und als widerlich eingestuft (*WEILER* et al. 1997), der Anteil der mit Skatol geruchlich belasteten Schlachtkörper fällt jedoch deutlich geringer aus als die von Androstenon beeinträchtigten (z.B. *NEUPERT* et al. 1995).

2.3.2. Möglichkeiten zur Unterdrückung des Geschlechtsgeruches

Zur Unterdrückung des Geschlechtsgeruches gibt es derzeit folgende Alternativen (Vgl. Abb. 2.6):

Zum einen die bislang ohne Schmerzausschaltung durchgeführte konventionelle chirurgische Kastration, die bis zum 7. Lebenstag gesetzlich erlaubt ist. Zum anderen die chirurgische Kastration mit Schmerzausschaltung, wie sie bei Ferkeln ab dem 8. Lebenstag nur noch unter Narkose und von einem Tierarzt durchgeführt werden darf.

Bei den nicht traumatischen Varianten sind die immunologische Kastration, wie sie Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, sowie die hormonelle Kastration zu nennen.

Jedwede Form der Kastration lässt sich insofern umgehen, wenn

- Eber gemästet werden, wie dies in einigen EU-Ländern usus ist (Vgl. auch 2.3.1. Kriterien der Mast- und Schlachtleistung bei Ebern und Börgen)
- versucht wird, die geruchliche Komponente Androstenon züchterisch zu beeinflussen

oder

- bereits die Keimzellen durch sogenanntes Sperma Sexing vorsortiert werden, so dass der Anteil weiblicher Ferkel stark erhöht wird

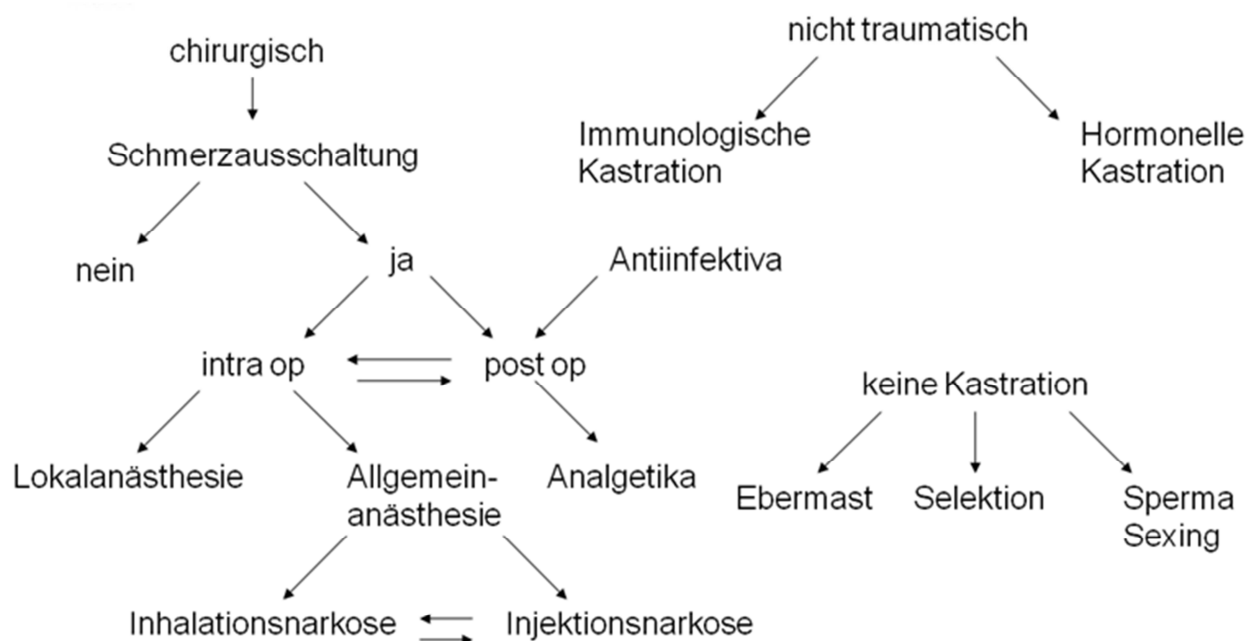


Abb. 2. 6 Fließschema Alternativen zur konventionellen Kastration.

Bezüglich der chirurgischen Kastration – mit und ohne Betäubung – gilt derzeit folgende Rechtsgrundlage (§ 5 *TIERSCHUTZGESETZ*):

„(1) An einem Wirbeltier darf ohne Betäubung ein mit Schmerzen verbundener Eingriff nicht vorgenommen werden. Die Betäubung warmblütiger Wirbeltiere (...) ist von einem Tierarzt vorzunehmen. (...) (3) Eine Betäubung ist ferner nicht erforderlich
 1a. für das Kastrieren von unter acht Tage alten männlichen Schweinen, sofern kein von der normalen anatomischen Beschaffenheit abweichender Befund vorliegt (...)“ wonach keine Bruchferkel

(Hernia scrotalis) und Binneneber (Kryptorchiden) sowie Ferkel älter als 7 Tage konventionell kastriert werden dürfen.

Der § 6 *TIERSCHUTZGESETZ* besagt „(1) Verboten ist das vollständige oder teilweise Amputieren von Körperteilen oder das vollständige oder teilweise Entnehmen oder Zerstören von Organen oder Geweben eines Wirbeltieres. Das Verbot gilt nicht, wenn 2. ein Fall des § 5 Abs. 3 Nr. 1, 1a oder 7 vorliegt (...)“ und erlaubt folglich die Kastration von Ferkeln unter 8 Tagen Lebensalter.

“ Eingriffe nach Satz 2 Nr. 1 und 5 sind durch einen Tierarzt vorzunehmen; Eingriffe nach Satz 2 Nr. 2 und 3 sowie Absatz 3 dürfen auch durch eine andere Person (i.d.R. der Landwirt) vorgenommen werden, die die dazu notwendigen Kenntnisse und Fähigkeiten hat.“ Hier wird auf die EU-Richtlinie 2001/93/EG verwiesen, wonach die Kastration von Ferkeln ab dem 8. Lebenstag unter Anästhesie und Analgesie nur von einem Tierarzt vorgenommen werden darf.

“Im Anschluss an die Kastration eines über sieben Tage alten Schweines sind schmerzstillende Arzneimittel einschließlich Betäubungsmitteln bei dem Tier anzuwenden.“ Eine Kastration unter Anästhesie und Schmerzausschaltung ist folglich ab dem 8. Lebenstag verpflichtend und kann nur durch einen Tierarzt vorgenommen werden.

Der Deutsche Bauernverband (DBV), der Verband der Fleischwirtschaft (VDF) und der Hauptverband des Deutschen Einzelhandels (HDE) haben sich 2008 darauf verständigt, dass bis ein praxistaugliches alternatives Verfahren zur traditionellen Kastration zur Verfügung steht, die Ferkelkastration in Verbindung mit einem schmerzstillenden Mittel durchzuführen ist (*DÜSSELDORFER ERKLÄRUNG 2008*).

In 2010 wurde europaweit beschlossen, ab dem 1. Januar 2012 die chirurgische Kastration nur noch bei verlängerter Applikation von Schmerz- und Betäubungsmitteln nach allseits anerkannten Methoden durchzuführen. Bis 1. Januar 2018 soll die chirurgische Kastration bei Schweinen ganz eingestellt werden (*BRÜSSELER ERKLÄRUNG 2010*). Diesbezüglich ist eine Änderung des Tierschutzgesetzes im Entwurf.

In anderen Ländern gilt folgendes:

- die Schweiz verbietet die Kastration ohne Betäubung seit 2009
- seit 2003 sieht Norwegen alle Ferkelkastrationen nur durch den Tierarzt und mit Betäubung vor und verbietet die chirurgische Kastration seit 2009
- die Niederlande sehen im Zugzwang durch die Supermarktketten, die kein „kastriertes Fleisch“ verkaufen wollen, das Verbot der chirurgischen Kastration bis spätestens 2015 vor
- Schweden verbietet die Kastration ab 2012

Die geruchliche Beeinträchtigung von Schlachtkörpern kann auch durch die chirurgische Kastration nicht zu 100 % vermieden werden: Zwitter (Intersexe) treten in 0,1-0,6 % der Fälle auf, Kryptorchiden zu 0,3-0,8 % (*BACKSTROEM & HENRICSON 1971, BELLOT & VOGT 1994*).

2.3.2.1. Herkömmliche Durchführung der chirurgischen Kastration von Ferkeln

In der EU werden jährlich ca. 100 Millionen Ferkel kastriert, dies entspricht 80 % aller männlichen Schweine in der EU (*THUN et al. 2006, HEINRITZI et al. 2008*). In Deutschland werden 100 % aller männlichen Ferkel kastriert, also in etwa 22 Millionen Ferkel.

Nach Überprüfung auf das Vorliegen einer pathologischen Anatomie (Bruchferkel/Hernia scrotalis, Binneneber/Kryptorchiden), welche der Durchführung der chirurgischen Kastration auf konventionellem Wege entgegenstehen, wird das Ferkel kopfüber so fixiert, dass das ipsilaterale Hinterbein unter dem Daumen der haltenden Hand zu liegen kommt, was zu einer Spannung des Scrotums führt. Das Operationsgebiet wird gereinigt und desinfiziert. Die schneidende Hand führt die Inzision der Scrotalhaut jeweils längs in Richtung caudal. Hoden und Nebenhoden treten durch den steten Daumendruck aus dem eröffneten Processus vaginalis hervor und der Samenstrang wird entweder mit Hilfe des Skalpells durchtrennt oder abgerissen.

Letztere Art und Weise schafft stumpfe Wundränder, die besser miteinander verkleben und so zu einer geringeren Blutung führen. Abschließend wird ein Wundspray oder -puder zur lokalen Antibiose aufgetragen. Das Ferkel wird sogleich zurück in seine Bucht gesetzt.



Abb. 2. 7 Durchführung der konventionellen Kastration (HELLWIG 2006).

Die konventionelle Kastration ohne medikamentöse Schmerzausschaltung verursacht akute Schmerzen und Stress, was die Ferkel über hochfrequente und hohe Laute vermitteln (MARX et al. 2003, PUPPE et al. 2005). Weiterhin zeigen sie bis zu vier Tage nach der Kastration veränderte Verhaltensweisen: die Ferkel bewegen sich weniger, liegen in Haufen, zittern und krampfen, scheuern ihr Hinterteil und zeigen vermehrt Hundesitzigkeit, sind isoliert und zeigen weniger Sozialkontakte (HAY et al. 2003, LLAMAS MOYA et al. 2008).

Als mögliche Komplikationen können Blutungen, Immunsuppressionen, Infektionen, Leistenbrüche bis hin zu Todesfällen auftreten (LESSARD et al. 2002).

2.3.2.2. Ansätze zur Anästhesie und Analgesie

Bezüglich der intra operationem erzielten Schmerzausschaltung über die Anästhesie gibt es folgende Untersuchungsansätze:

Bei der Inhalationsnarkose atmen die Ferkel über Narkosemasken das Narkosegas (Isofluran) ein. Kombiniert wird die Inhalationsnarkose mit einem Analgetikum (SCHULZ 2007, SCHULZ et al. 2007a, b), da Isofluran per se keine bis nur geringfügige analgetische Eigenschaften besitzt (FACHINFORMATION ISOFLORAN[®] ad us. vet. 2009). Hierzu wurden spezielle Kombinationen aus Fixationsmöglichkeiten und Narkosegeräten entwickelt, die es ermöglichen Ferkel seriell unter der Allgemeinanästhesie zu kastrieren. Vorteile der reinen Inhalationsnarkose sind die gute Steuerbarkeit der Narkosetiefe sowie das schnelle An- und Abfluten des Narkosegases. KUPPER et al. 2008 erreichten bei 92 % der Tiere so eine ausreichende Narkosetiefe.



Abb. 2. 8 Apparatur zur seriellen Ferkelkastration unter Allgemeinanästhesie.

(Quelle:http://www.wdr.de/tv/tieresucheneinzuhause/sendungsbeitraege/2010/0530/03_ferkelkastration.jsp)

Neben dem zugelassenen Inhalationsnarkotikum (s.u.) stand auch CO₂ als Narkotikum zur Diskussion. In den Niederlande wird ein Gemisch aus 70 % CO₂ und 30 % O₂ angewandt (GERRITZEN et al. 2008, KLUIVERS-POODT et al. 2007). Zur Betäubung bei der Schlachtung findet es bereits hierzulande Anwendung, problematisch für den Einsatz zur Ferkelkastration ist jedoch die Eigenschaft von CO₂ stark atemwegsreizend zu sein und eine sehr geringe therapeutische Breite aufzuweisen (RODRIGUEZ et al. 2008).

Zu bedenken bleibt auch die erhöhte Umweltbelastung, die durch die Freisetzung der Narkosegase entstehen könnte, wenn allein um die 22 Millionen Ferkel in Deutschland unter Inhalationsnarkose kastriert werden.

Die Injektionsnarkose (LAHRMANN et al. 2006) wird über die Kombination eines Sedativums mit einem Narkotikum (s.u.) erreicht. Auch hier können die Ferkel gruppen-

weise narkotisiert und kastriert werden. Im Vergleich zur Inhalationsnarkose ist diese weniger gut steuerbar, nur manche Wirkstoffgruppen können antagonisiert werden und sie flutet langsamer an sowie auch wieder ab, was zu einer verlängerten Nachschlafphase führt. Hierbei ist genau auf die Dosierung zu achten, da einige Injektionsnarkotika nur in höheren Dosen neben der erzielten Hypnose auch analgetisch wirken (LÖSCHER, UNGEMACH, KROKER 2003).

Bei der Allgemeinanästhesie muss generell beachtet werden, dass Schweine als schwierig bezüglich der Narkosefähigkeit einzustufen sind und dass die Ferkel bedingt durch den Nachschlaf wichtige Säugeperioden versäumen. LAHRMANN et al. 2006 sprechen von Verlusten um die 3-5 %.

Bei der Lokalanästhesie stößt man auf mehrere kritische Aspekte, welche deren Einsatz erschweren. Die einsetzbaren Medikamente werden anhand ihrer Struktur eingeteilt in Lokalanästhetika vom Ester- oder Amidtyp. Das in Deutschland für Schweine verfügbare Procain (s.u.) gehört zu den Lokalanästhetika vom Estertyp, das heißt es bringt einen längeren Wirkungseintritt und eine kürzere Wirkungsdauer mit sich, da sie direkt am Applikationsort nach Resorption im Blut aufgespalten werden. Im Gegensatz dazu diejenigen vom Amidtyp, die erst in der Leber metabolisiert werden und so schneller und länger wirksam sind (LÖSCHER, UNGEMACH, KROKER 2003).

Bei der Formulierung der Lokalanästhetika kommen sogenannte Sperrkörper zum Einsatz, die durch Vasokonstriktion die Wirkung verlängern und die Resorptionsrate sowie die Blutungsneigung senken. Durch die hierdurch erzielte verminderte Durchblutung des Operationsgebietes muss mit Wundheilungsstörungen und somit mit einer erhöhten Infektionsgefahr gerechnet werden. Die Sperrkörper vermögen die durchschnittliche Wirkungsdauer von 30 min – nach einem Wirkungseintritt von im Mittel 5-10 min – auf das Doppelte zu verlängern (LÖSCHER, UNGEMACH, KROKER 2003).

Die Lokalanästhesie wird intratestikulär oder intrafunikulär appliziert (HAGA & RANHEIM 2005).

Die Wirkung der Lokalanästhetika hält noch eine Weile nach der Kastration an, kann aber nicht ein Schmerzmittel für die folgenden Tage ersetzen (KLUIVERS-POODT et al. 2007). Der Schmerz während und nach der Kastration konnte durch eine intratestikuläre oder intraskrotale Applikation von Lidocain deutlich reduziert werden (HEINRITZI et al. 2006, ZOELS et al. 2006a, b), ebenso negative Auswirkungen der

chirurgischen Kastration auf den Hormonhaushalt (*PRUNIER et al. 2002*) und das Verhalten der Ferkel (*MARX et al. 2003*). Lidocain hat eine zweifach höhere Wirksamkeit als Procain, ist aber für die Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren (außer dem Pferd) nicht zugelassen, da hier Procain zur Verfügung steht (*LÖSCHER, UNGEMACH, KROKER 2003*).

Für das Tier bedeutet die lokale Anästhesie also eine längere Kastration (der Wirkungseintritt muss abgewartet werden), mehr Handling und auch zusätzliche Schmerzen bedingt durch die Infiltration der Gewebe, die allerdings geringer als der Kastrationsschmerz eingestuft werden dürften (*KLUIVERS-POODT et al. 2007*).

Postoperativ sollten die Ferkel immer mindestens drei Tage analgisch und antibiotisch versorgt werden.

In Deutschland zugelassen für lebensmittelliefernde Tiere sind:

- Sedativa: Azaperon (Stresnil[®], V.M.), WZ: 5 d
- Injektionsnarkotika: Ketamin (Ursotamin[®], V.M.), WZ: 3 d
- Inhalationsnarkotika: - keine -
- Lokalanästhetika: Procain (Procasel[®] (2 %), V.M.), WZ: 1 d
- Analgetika: z.B. Meloxicam (Metacam[®], V.M.), WZ: 5 d
- Antibiotikum: z.B. Procainpenicillin (Veracin[®], V.M.), WZ: 50d

Die Anwendung des Inhalationsnarkotikums Isofluran (Isoflo[®], V.M., WZ: 2 d) bei Ferkeln ist derzeit in Deutschland nicht zugelassen, wohingegen die Schweiz die Anwendung zur Allgemeinanästhesie vor der Frühkastration von Ferkeln erlaubt. In Deutschland ist die Anwendung von Isofluran höchstens über eine Umwidmung des Medikamentes nach Arzneimittelrecht und einer Erhöhung der Wartezeit auf mindestens 28 Tage denkbar, da der Wirkstoff in Tabelle 1 (Zugelassene Stoffe für lebensmittelliefernde Tiere) der EU Verordnung 37/2010 gelistet ist.

Abzulehnen bleibt eine Kastration, bei der präoperativ lediglich ein Analgetikum appliziert wird, weil dies wegen seiner nicht zentral dämpfenden Wirkung nicht den Amputationsschmerz unterbinden kann. *KLUIVERS-POODT et al. 2007* verabreichten einer Versuchsgruppe 15 min vor der Kastration Meloxicam und fanden Lautäußerungen, Plasmakortisol- und Lactatkonzentrationen, die denen der konventionell kas-

trierten Ferkel vergleichbar waren. Eine Schmerzausschaltung muss somit unbedingt intra wie post operationem vorgenommen werden.

2.3.2.3. Hormonelle Kastration

Die hormonelle Kastration, wie sie im Folgenden deshalb nur kurz beschrieben wird, ist in der Europäischen Union (EU) verboten.

In der EU unterliegen Substanzen mit hormoneller Aktivität den strikten Regeln der Richtlinie 96/22/EG (Anhang III). In den Erwägungsgründen der Richtlinie heißt es, dass „ (3) bestimmte Stoffe mit thyreostatischer, östrogenen, androgenen oder gestagenen Wirkung (...) auf Grund der Rückstände, die sie in Fleisch und anderen Lebensmitteln tierischen Ursprunges hinterlassen, die Gesundheit des Verbrauchers gefährden und die Qualität von Lebensmitteln tierischen Ursprunges beeinträchtigen“ können.

Deshalb wurde das bestehende Verbot der Verwendung von Stoffen mit hormonaler Wirkung aufrechterhalten.

Es gibt zwei Wege, wie eine hormonelle Kastration im theoretischen experimentellen Sinne erreicht werden kann: über die Applikation von Steroiden oder über die Applikation von GnRH- Agonisten bzw. Antagonisten.

2.3.2.3.1. Steroidapplikation

Die Anwendung der steroidal aufgebauten Gonadenhormone (*ECHTERNKAMP* et al. 1969, *ERTL* et al. 1972) löst ein negatives Feedback auf den Hypothalamus und die Hypophyse aus, die Leydigzellen atrophieren, nachfolgend wird die Hodenaktivität unterdrückt, d.h. die endogene Steroidbiosynthese inklusive der Bildung von Androstenon wird eingestellt (*DAXENBERGER* et al. 2001).

Gestagene binden wegen ihrer Strukturähnlichkeit an den Androgenrezeptor. Durch die Hemmung der eigenen anabolen Hormone erzielt man eine Mastleistung, die zwischen der von Ebern und Kastraten einzustufen ist.

2.3.2.3.2. Applikation von GnRH-Agonisten und Antagonisten

GnRH-Agonisten entfalten ihre GnRH-ähnliche Wirkung am Rezeptor in der Hypophyse. Bei kurzfristiger Applikation wird die Hypophysen-Gonaden-Achse stimuliert, bei längerer Anwendung kommt es jedoch zu einer Desensibilisierung der Hypophyse (*SINCLAIR* et al. 2001). Der GnRH-Agonist verhindert hier die Freisetzung von LH, was nachfolgend zu einer down-Regulation der testikulären LH- und Prolactin-Rezeptoren führt (*REID* et al. 1996). Auch wird die Möglichkeit diskutiert, dass LH unter der Einwirkung eines GnRH-Agonisten in einer biologisch weniger aktiven Form vorliegt (*XUE* et al. 1994). Schlussendlich wird die Steroidbiosynthese unterdrückt, die Steroidplasmakonzentrationen reduziert und das Hodenwachstum beeinträchtigt. Im Fettgewebe von mit GnRH-Agonisten behandelten Ebern finden sich verminderte Androstenonkonzentrationen, vergleichbar denen von Kastraten (*SCHNEIDER* et al. 1998).

Während GnRH-Agonisten um ihre hemmende Wirkung entfalten zu können über einen längeren Zeitraum verabreicht werden müssen, vermögen GnRH-Antagonisten bereits nach einer einmaligen Applikation die GnRH spezifischen Wirkungen aufzuheben (*ZANELLA* et al. 2000), indem sie unmittelbar die GnRH-Rezeptorbindung hemmen und so die Freisetzung von LH und FSH unterbinden, die Biosynthese und Freisetzung der Steroide (Testosteron, 17 β -Estradiol) aus den Leydigzellen wird unterdrückt und das Hodengewicht nimmt ab (*ZIECIK* et al. 1989).

Unter einer dauerhaften Behandlung mit GnRH-Antagonisten steigen die LH-Plasmakonzentrationen wieder an, wobei FSH und Testosteron deutlich erniedrigt bleiben. Dieser Sachverhalt lässt auf einen direkten Einfluss der GnRH-Antagonisten auf den Hoden schließen – unklar ist jedoch, ob dieser Effekt über noch nicht identifizierte testikuläre GnRH-Rezeptoren oder andere parakrine Mechanismen vermittelt wird (*ZANELLA* et al. 2000, *WISE* et al. 2000).

Auch ihr Effekt auf Androstenon ist nicht bekannt.

2.3.2.4. Selektive Blockade der Androstenonbiosynthese

Bezüglich der Ebermast wie sie bislang in einigen EU Ländern (in Großbritannien/Irland zu ~100 %, in Spanien zu 90 %, in den Niederlande zu 1-2 %) durchgeführt wird, müssten in Deutschland einige Kriterien eingehalten werden, um

den Ebergeruch und somit die Beeinträchtigung der Qualität ihres Fleisches zu vermeiden: ein Schlachtgewicht der Eber von 80 kg und ein maximales Schlachtalter von 150-170 Tagen dürfte nicht überschritten werden, um Androstenon unterhalb des Grenzwertes zu halten. Die Ebermastrate liegt in Deutschland derzeit unter 1 %.

In einem Versuch mit einem Ebermastbetrieb (*SIDLER* 2006) konnten im Sommer zu 1 %, im Frühling und Herbst sogar zu 7-9 % geruchsbelastete Eber gefunden werden. Mit einem speziellen Lichtprogramm (Vollspektrallampen), bei dem die Tiere 15 Stunden bei 100 Lux gehalten werden, konnte die Geruchsbelastung auf < 1 % gesenkt werden.

Setzt man auf die züchterische Selektion von Schweinen (*WILLEKE* et al. 1980) mit niedrigen Androstenonleveln zu Mastende, so kann man mit einer hohen Erblichkeit für Androstenon mit 50-60 % und für Skatol mit 23-56 % (*TAJET* et al. 2005) arbeiten.

Gearbeitet wird auch mit sogenannten Markergenen: für Androstenon mit dem Gen CYP 17 + b5 cytochrom, einem Gen für das Enzym 17 α Steroid Hydroxylase, welches eine wichtige Rolle bei der Synthese von Androstenon übernimmt, und für Skatol mit dem Gen CYP 2A6 und einem Enzym, das den Skatolabbau katalysiert (*SQUIRES* 2006, *ROBIC* et al. 2008).

CYP steht für die Gruppe der Cytochrom P450 Hämoproteine, eine Supergenfamilie, die diverse biochemische Reaktionen katalysieren.

Die Zucht gegen Ebergeruch bedingt jedoch einen verzögerten Eintritt der Geschlechtsreife (*WILLEKE* et al. 1987), da Androstenon eng an die Produktion der Gonadenhormone gekoppelt ist (*CLAUS* 1983a). Es besteht eine genetische Korrelation mit der Größe der Bulbourethraldrüse, sie dient als Indikator für die Geschlechtsreife (*SELLIER* et al. 2000, *SQUIRES* 2006).

Ziel der züchterischen Selektion sind also Gene mit Effekt auf eine verringerte Synthese und einen erhöhten Abbau der Geruchskomponenten.

Aufgrund der recht langen Generationsfolge beim Schwein eignet sich diese Methode auf kurz- bis mittelfristige Sicht nicht als echte Alternative zum akuten Brennpunkt Ferkelkastration.

2.3.2.5. Sperma Sexing

Beim Sexing von Sperma wird mit Hilfe der Durchflusszytometrie (flow cytometry) nach dem unterschiedlichen Gehalt an DNA in den X- und Y-Chromosomen sortiert. Beim Eber beläuft sich dieser Unterschied zwischen den Geschlechtschromosomen auf etwa 3,6 % im Vergleich zum z.B. Chinchilla mit etwa 7,5 % (*GARNER* 2006).

Je höher der unterschiedliche DNA-Gehalt, umso einfacher und mit höherer Reinheit sind die Spermien nach X und Y aufzutrennen.

Das Prinzip der Sperma Sexing-Methode beruht auf dem Prinzip eines fluoreszierenden Farbstoffes, der an die DNA der X- und Y-Chromosomen bindet. Die Bindung an X ist deutlich höher als an Y; X leuchtet somit heller (*PARRILLA* et al. 2003).

Die Leistungsfähigkeit dieses Verfahrens liegt bei 15 Millionen Spermien pro Stunde und einem Reinheitsgrad von 85-90 % (*JOHNSON* et al. 2005).

Als problematisch wird die kurze Lebensdauer der sortierten Spermien eingestuft (*VAZQUEZ* et al. 2001). Nativsperma zur künstlichen Besamung (KB) mit einer Portion von 80-100 ml liegt bei einer Dosis von 1,5-2,5 Milliarden Spermien. Aufgrund der oben angeführten methodischen Fakten dauert es mehrere Tage bis eine vergleichbare Spermaportion über die Durchflusszytometrie beim Sexing von Sperma erzielt wird. Auch sind die Spermien durch die langwierige Trennung bereits vorgeschädigt, weshalb sie nahe dem Uterushorn appliziert werden müssen, wozu eine spezielle Besamungstechnik notwendig ist. Für eine herkömmliche künstliche Besamung wären somit weit mehr Spermien je Ejakulat notwendig (*JOHNSON* et al. 2005, *MARTINEZ* et al. 2005)

Momentan erweist sich diese Alternative als nicht praktikabel und würde die Kosten der Ferkelproduktion enorm in die Höhe treiben.

2.3.2.6. Immunologische Kastration

Die nicht traumatische Alternative der Immunokastration beruht auf der Immunisierung männlicher Schweine gegen ihre Hodenfunktion. Hierzu gibt es verschiedene Ansatzpunkte.

2.3.2.6.1. Immunisierung gegen Androstenon

Bei der Immunisierung gegen Androstenon wurden sowohl die passive als auch die aktive Immunisierung in Betracht gezogen.

Die passive Immunisierung gegen Androstenon erwies sich aufgrund der sehr großen Injektionsvolumina, die im wirksamen Bereich notwendig würden, als nicht praktikabel. Auch wäre die Produktion dieser Antisera sehr aufwendig. Es wird vermutet, dass durch die passive Immunität auch nur das gegenwärtig im Blut zirkulierende Androstenon über die Antigen-Antikörperreaktion neutralisiert würde (*CLAUS* 1975, *FLIESS* et al. 1980).

CLAUS (1975) setzte als anti-Androstenon-Vakzine zur aktiven Immunisierung 4 mg Antigen suspendiert in komplettem Freund'schen Adjuvans und physiologischer Kochsalzlösung ein, welches in einem dreiwöchigen Immunisierungsschema sowohl intramuskulär als auch subcutan injiziert wurde. In einem weiteren Versuch wurde die Vakzine in den Lnn. poplitei appliziert.

Der Fettandrostenongehalt konnte um 20 % reduziert werden bzw. war 40-150 Tage nach Immunisierungsbeginn kein Anstieg an Androstenon im Fettgewebe zu verzeichnen und auch nicht sensorisch nachweisbar.

Auch *FLIESS* et al. (1980) konnten keine spezifischen Antikörper gegen Androstenon oder eine Bindungsfähigkeit im Blutserum nachweisen. Somit fiel der Androstenongehalt nicht signifikant unter den in der Kontrollgruppe erhobenen Wert.

Die aktive Immunisierung gegen Androstenon ist demnach prinzipiell durchführbar, jedoch ist die Titerentwicklung großen Schwankungen unterworfen, was wiederum viele Boosterinjektionen erforderlich macht (*CLAUS* 1975, *BROOKS* et al. 1986). Auch die Vorteile der Schlachtleistung und Schlachtkörperzusammensetzung eines Ebers blieben unter der Immunisierung gegen Androstenon voll erhalten (*WILLIAMSON* et al. 1985).

2.3.2.6.2. Immunisierung gegen Testosteron

Der Immunisierung gegen Testosteron liegt folgende Hypothese zugrunde: Antikörper gegen die körpereigenen Hodensteroide verringern über die Antigen-Antikörperreaktion die Menge an freien Steroiden, die die peripheren Zielorgane wie z.B. die Hypothalamus-Hypophysen-Achse erreichen. Dadurch kommt es zur Stimu-

lation der Gonadotropinsekretion und somit zur Stimulation der Hodenentwicklung (*WALKER* et al. 1984).

Tatsächlich fanden *THOMPSON* et al. 1985 höhere Plasmatestosteronkonzentrationen in gegen Testosteron immunisierten Ebern, welche sie eher auf die Antikörperbindung und die daraus resultierende reduzierte Verstoffwechslung als auf eine gesteigerte Sekretion zurückführten, da die Androgenkonzentration im Hodenparenchym sowie die Plasmaöstrogenkonzentrationen nicht durch die Immunisierung beeinflusst wurden. Die Sekretion von LH und FSH wurde unterdrückt, Hoden- und Nebenhodengewichte wie die tägliche Spermienproduktion und Charakteristika der Ejakulate waren bei der Behandlungs- und Kontrollgruppe vergleichbar. Ein Effekt auf das Körpergewicht blieb aus.

Obwohl gegen Testosteron als Antigen hohe Titer entwickelt werden, bleibt nicht alles des zirkulierenden Testosterons antikörpergebunden und der negative Feedback auf LH wird nur unvollständig beseitigt (*SCHANBACHER* 1982).

2.3.2.6.3. Immunisierung gegen LH

Durch eine Immunisierung gegen das körpereigene LH induzierte Antikörper vermögen die periphere Wirkung des LH zu neutralisieren. Nach etwa 8-16 Wochen der Immunisierung wurden in Primaten um 90 % geringere Serumtestosteronkonzentrationen gemessen und nach etwa 15-18 Wochen äußerte sich der Immunisierungseffekt in einer Azoospermie durch Hemmung der Meioseschritte im Rahmen der Spermatogenese, das Hodengewicht wurde verringert (*JEYAKUMAR* et al. 1995, *MOUDGAL* et al. 1997).

In Kaninchen wurden nach einer Immunisierung gegen den LH Rezeptor zwei Typen von Antikörpern nachgewiesen (*JEYAKUMAR & MOUDGAL* 1996): in den ersten 80-100 Tagen der Immunisierungsphase wurden Antikörper mit agonistischer Wirkung gebildet, was zu drei- bis sechsfach erhöhten Testosteronkonzentrationen führte, nach weiteren Boosterinjektionen wurden antagonistisch wirkende Antikörper produziert und es kam zum erwarteten Testosteronabfall mit Blockade der Keimzellentwicklung.

Durch eine Immunisierung gegen FSH bzw. gegen die Komponenten des FSH Rezeptors wurde in Primaten eine reversible Infertilität durch Oligozoospermie bei erhal-

tenen Testosteronkonzentrationen und Libido erzielt. *MOUDGAL* et al. 1997 sehen hier die Zukunft einer rekombinanten Antifertilitätsvakzine für den Mann.

2.3.2.6.4. Immunisierung gegen GnRH

Hierbei handelt es sich um eine aktive Immunisierung gegen GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormon) mit dem kommerziell erhältlichen Impfstoff IMPROVAC®.

Er enthält 200 µg eines synthetischen, unvollständigen GnRH-Analogen-Protein-Konjugates je ml als wirksamen Bestandteil, 0,1 mg Thiomersal/ml als Konservierungsstoff und ein synthetisches wässriges Adjuvans auf Dextranbasis.

IMPROVAC® wirkt als konventioneller Impfstoff und ist weder hormonell noch pharmakologisch wirksam.

Tab. 2. 5 Zusammensetzung und Indikation kommerziell erhältlicher anti-GnRH Vakzinen.

	Handelsname	IMPROVAC®	VAXSTRATE®	GONADIMMUNE®
	Hersteller	Pfizer	Arthur Webster Pty Ltd, Castle Hill, N.S.W	Apton and SmithKline Beecham
	Land	Australien	Australien	USA/UK
Vakzine	Hapten	GnRH Analogon	synthetisches Carboxyl-GnRH Analogon	synthetisches "look like" GnRH
	Spacer			
	Trägerprotein		Ovalbumin	- enthalten -
	Adjuvans	Dextran	DEAE Dextran/Mineralöl Mixtur	wässrige Lösung
	Zulassung	Eber	Färsen	Menschen
	Indikation	immunologische Kastration	Graviditätskontrolle	Prostata- und Brustkrebs

Die Impfdosis von je 2 ml wird subcutan am Ohrgrund mittels einer Impfpistole appliziert. Laut Hersteller sind zwei Immunisierungen im Abstand von 4 Wochen notwendig (*FACHINFORMATION IMPROVAC® ad us. vet. 2007*), mit einer letzten Boosterrung 4 bis (5) 6 Wochen vor dem Schlachtttermin.

Tab. 2.5 gibt einen Überblick über kommerziell erhältliche anti-GnRH Vakzinen.

IMPROVAC® der Firma Pfizer hat im Jahr 2009 die EU-Zulassung erhalten.

2.3.2.6.4.1. Prinzip der Immunisierung gegen GnRH und Dauer der Antikörperbildung

Nach Bildung ausreichender Antikörper gegen das synthetische GnRH-Analogon von IMPROVAC[®], wird auch eine humorale Immunreaktion gegen das körpereigene GnRH induziert.

Antigen-Antikörper-Komplexe hindern das Hormon daran durch die Kapillarwände zu diffundieren oder besetzen die Rezeptorbindungsstellen am GnRH-Molekül selbst (*THOMPSON 2000, EINARSSON 2006*).

Entzündliche Reaktionen als Nebenwirkung der Impfung waren in Hypothalamus und Hypophyse nicht feststellbar (*HILBE et al. 2006*). Ebenso sind bei den Immunisierungsversuchen der Universität Hohenheim keine Reaktionen an der Impfstelle aufgetreten.

Die erste Impfung „sensibilisiert“ das Immunsystem der Schweine, die Hodenfunktion bleibt zunächst voll erhalten, erst 2 - 3 Wochen nach der Boosterung stellt sich durch eine starke Immunreaktion eine vorübergehende Kastration ein (*EINARSSON 2006, CRANE 2006*, Vgl. Tab. 2.6), gekennzeichnet durch eine Hemmung der Testosteronproduktion inklusive aller vor- und nachgeschalteten Vorgänge. Bei den hausinternen Versuchen der Universität Hohenheim konnte der Testosteronabfall bereits nach 5-10 Tagen verzeichnet werden (*CLAUS et al. 2007, CLAUS et al. 2008b*).

Ebenso werden die Bildung und Anhäufung der eberspezifischen Geruchsstoffe zuverlässig reduziert, Hoden inklusive Nebenhoden und Geschlechtsdrüsen atrophieren, Eber zeigen ein reduziertes aggressives Verhalten sowie eine verminderte Libido, die stickstoffbelasteten Ausscheidungen durch eine erhöhte N-Retention in der frühen Mastphase werden verringert. Auch bei Kryptorchiden tritt eine vollständige Immunität gegen GnRH ein (*DUNSHEA et al. 2001*).

Tab. 2. 6 Einsatz der immunologischen Kastration bei verschiedenen Tierarten und Geschlechtern sowie dem Menschen unter Berücksichtigung unterschiedlicher Immunisierungsschemata, Antikörperbildung und Eintritt des Immunisierungseffektes.

Tierart	Geschlecht	IM Schema (Wo)	1. IM (LW)	AK Bildung - anamnest. Reaktion - (LW)	IM Effekt (d.A.)	Literaturverweis
Ziegen	m	$\frac{0/2}{0/4}$			56 d nach 1. IM	Godfrey et al. (1996)
Schweine	m	0/8	9-10	17-18	26 LW	Meloen et al. (1994)
Primaten	m				20 Wo nach IM-Beginn	Giri et al. (1991)
Menschen	w				60 d nach der anamnestischen Reaktion	Gual et al. (1997)
Schweine	m	0/4	18	22	5 d nach 2. IM	Claus et al. (2007)
Schweine	m	0/6/13	10	23	2 Wo nach 2. IM	Metz & Claus (2003)
Schweine	m	0/4(5)	$\frac{15}{18}$ $\frac{14}{18}$	$\frac{19}{22}$ $\frac{18}{18}$	2 Wo nach 2. IM	Einarsson (2006)

2.3.2.6.4.2. Wirksamkeitsstudien beim Eber

In den Zulassungsstudien an über 400 Schweinen aus 4 Betrieben mit variierenden Fütterungs- und Haltungsbedingungen sowie unterschiedlichem Betriebsmanagement erbrachte IMPROVAC[®] unabhängig von der Jahreszeit eine 100 %ige protektive anti-GnRH-Immunantwort (CRANE 2006, HENNESSY 2006), vorausgesetzt es wurden sicher zwei Injektionen im Abstand von 4 Wochen durchgeführt.

Weltweite Studien an Schweinen bestätigen dies; die hier in den Tab. 2.7 a, b und Tab. 2.8 a, b erwähnten Studien stellen nur einen beispielhaften Auszug neben den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

FALVO et al. 1986 (Tab. 2.8 b) konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen den von ihm verwendeten Adjuvantien (KFA, Muramyldipeptid) feststellen; die GnRH-immunisierten Eber zeigten im Vergleich zu den mit den Adjuvantien immunisierten Ebern nicht nachweisbare Konzentrationen an LH und Testosteron vier Wochen

nach der letzten Boosterinjektion. Das Hodengewicht nahm um 70 % ab, das Gewicht der akzessorischen Geschlechtsdrüsen unterschied sich nicht von dem klassischer Kastraten. Die Tiere blieben insgesamt 24 Wochen im Versuch, zeigten keine Veränderungen der täglichen Zunahmen und die Schlachtkörperqualität war innerhalb der Versuchsgruppen vergleichbar. Bei den Immunkastraten wurde der Ebergeruch reduziert und unterschied sich nicht von den Werten, die bei klassischen Kastraten gemessen werden.

CARATY & BONNEAU 1986 (Tab. 2.8 b) immunisierten Eber im Alter von 100 Tagen, wobei Eber – immunisiert mit Aluminiumoxidgel als Adjuvanssystem – keine signifikanten Antikörpertiter aufbauten. Mit KFA immunisierte Tiere lieferten vergleichbare Ergebnisse.

MELOEN et al. 1994 (Tab. 2.8 a) untersuchte mögliche Ursachen für Unterschiede in der Immunantwort bei Ebern, was ihn zu der Annahme brachte, dass wenn die Hälfte des GnRH-Konjugates nicht als körpereigen erkannt wird, spezifischere Antikörper gegen GnRH gebildet würden. Die Immunisierung mit einem 20 AS-GnRH-Analogen erbrachte eine sichere Unterdrückung der Testosteronkonzentrationen im Blut, die Hodengröße reduzierte sich 8-9 Wochen nach der Boosterinjektion um 87 %. Androstenon war nicht nachweisbar. KFA als kommerzielles Adjuvans erwies sich wegen der lokalen Abszessbildung als nicht praktikabel.

BONNEAU et al. 1994 (Tab. 2.8 b) legten bei ihrer Studie den Schwerpunkt auf die Mastleistungsparameter: immunisierte Eber zeigten eine reduzierte Futteraufnahme, bessere Futtermittelverwertung, mehr Muskelmasse, weniger Fettanteil bei einem Schlachtgewicht von 105 kg. Der Fettandrostenongehalt konnte auf durchschnittlich 210 ng Androstenon/g Fett verringert werden.

Auch *DUNSHEA* et al. 2001 fanden bei 8 und 4 Wochen vor der Schlachtung immunisierten Ebern innerhalb 2 Wochen nach der 2. Immunisierung reduzierte Testosteronkonzentrationen, um 50 % geringere Hoden- und Bulbourethralgewichte, Skatol- und Androstenonwerte um die Nachweisgrenze, eine bessere Futtermittelverwertung und ein besseres Wachstum der Tiere nach der „immunologisch kastrierenden Impfung“ aufgrund reduzierten Sexual- und Aggressionsverhaltens. Die immunisierten Tiere scheinen mehr Zeit für die Futteraufnahme aufzuwenden und können so die gesamte Energie in das Körperwachstum investieren. So sinkt mit steigenden Testosteronkonzentrationen wiederum auch der Appetit bei den Tieren (*WEILER* et al. 1996). Die

Tiere konnten bis 100 kg Lebendgewicht gemästet werden, ohne dass Ebergeruch die Schlachtkörper beeinträchtigte. Die Impfung zeigte sich als gut verträglich – es traten keine Impfreaktionen an der Impfstelle auf (*DUNSHEA et al. 2001*).

IMPROVAC[®] bietet bezüglich der Wirtschaftlichkeit, der Lebensmittelqualität und –sicherheit sowie des Tierschutzes folgende Vorteile (*CRANE 2006, HENNESSY 2006*):

- die Produktionsvorteile der Ebermast auf die Schlachtgewichte können voll genutzt werden, da die zweite „immunologisch kastrierende“ Impfung 4-5 Wochen vor der Schlachtung erfolgt
- es werden die Wachstumsraten und Futterverwertungsraten von Ebern erreicht
- das spätere Fleisch ist frei von Ebergeruch
- weniger verfettete Schlachtkörper
- höhere Magerfleischanteile
- Fleisch immunisierter Eber wird als genauso hochwertig empfunden wie das von chirurgisch kastrierten oder weiblichen Tieren
- keine Wartezeit für den Impfstoff, da dieser aufgrund der Eiweißstruktur der körpereigen gebildeten Antikörper als rückstandsfrei zu beurteilen ist
- der Impfstoff als Protein hat somit keine orale Wirksamkeit nach einmaliger und wiederholter hochdosierter Applikation (*CLARKE et al. 2008*), dadurch wird eine hohe Eigensicherheit für Verbraucher von Schweinefleisch/-produkten erzielt
- die Impfung wird aufgrund des wässrigen Adjuvanssystems an der Injektionsstelle sehr schnell resorbiert (keine Bildung von Gewebedepots) und ist daher gut verträglich für die Schweine
- Verhalten, Futteraufnahme und Allgemeinbefinden veränderten sich nicht nach der Impfung, es traten keine Lokalreaktionen an der Injektionsstelle auf (Versuche der Universität Hohenheim)

In anderen Studien traten bei 10 % der Impfungen leichte Lokalreaktionen auf, die aber meist innerhalb von 7-10 Tagen vollständig abgeklungen waren, in 0,3 % bildete sich ein Abszess, der innerhalb von 21 Tagen ausgeheilt war und bei 2 % von

400 immunisierten Tieren mussten an den Schlachtkörpern minimale Gewebemengen verworfen werden (*CRANE 2006*).

Impfstoffe auf Ölbasis führen zwar zu höheren Antikörpertitern, jedoch verursachen sie auch Impfreaktionen (*HALL et al. 1989, STRAW et al. 1990*).

Auch bei der Applikation der doppelten Dosierung traten keine toxischen oder systemischen Nebenwirkungen auf (*CRANE 2006*).

Als Maß für die Eigenkontrolle auf dem Betrieb, die Effektivität der Impfung (Ermittlung von Impfversagern), die sog. Producer Compliance oder als mögliches Monitoring am Schlachthof schlägt *HENNESSY 2006* ein um das zwei- bis dreifache reduziertes Hodenmaß mit einem Durchmesser von unter 110 mm in Verbindung mit einem weniger ausgeprägten Scrotum vor. *DUNSHEA et al. 2001* definierten als Referenzwert für die Hodengröße 350-400 g in der 23.- 26. Lebenswoche.

Erste Studien zur Verbraucherakzeptanz zeigten wenig Bedenken auf Seiten der Verbraucher und die Immunokastration wurde der chirurgischen Kastration vorgezogen (*LAGERKVIST CJ et al. 2006, HENNESSY & NEWBOLD 2004*).

2.3.2.6.4.3. Erfahrungen bei anderen Spezies und dem Menschen

Die Immunisierung gegen GnRH wird bei anderen Tierarten hauptsächlich zur Fruchtbarkeitskontrolle eingesetzt (z.B. bei Hund und Katze), beim Menschen stehen der Einsatz als Verhütungsmittel und bei hormonabhängigen Brust- und Prostatakrebsarten im Focus der Wissenschaft.

Die Tab. 2.7 a, b und Tab. 2.8 a, b geben einen Überblick über die verschiedenen Vakzinen und ihren Einsatz zur immunologischen Kastration bei anderen Spezies sowie dem Menschen.

Neben kommerziell erhältlichen Impfstoffen wie VAXSTRATE[®] und GONADIMMUNE[®] wurden auch individuell hergestellte anti-GnRH-Vakzinen eingesetzt.

Auch wurden sehr unterschiedliche Immunisierungsschemata gefahren, welche von einer einmaligen Vakzinierung (*ADAMS & ADAMS 1992, ADAMS et al. 1993, ADAMS et al. 1996, JAGO et al. 1997*), über zwei- bis mehrfache Boosterinjektionen

variierten und bis hin zu Immunisierungsschemata reichten, die ein halbes Jahr umfassten (*THOMPSON* 2000) (Vgl. Tab. 2.8 a und b).

Vereinzelt wurden nachlassende Immunisierungseffekte dokumentiert, welche anhand abfallender GnRH-Titer und Normalisierung der Geschlechtshormone (*ADAMS & ADAMS* 1992, *BROWN* et al. 1994, *LADD* et al. 1994, *SCHANBACHER & PRATT* 1985) bzw. über die Wiederaufnahme des Hodenwachstums (*BROWN* et al. 1994, *GODFREY* et al. 1996, *LADD* et al. 1994) oder im Falle von Rotwild über den Aushärtungsgrad des Geweihs (*LINCOLN* et al. 1982) definiert wurden (Vgl. Tab. 2.8 a und b).

Auch wurde über Re-Immunisierungseffekte berichtet, die sich in einer schnellen Antikörperproduktion und Wiederaufnahme des ehemaligen Kastrationseffektes äußerten (*LADD* et al. 1994, *SCHANBACHER & PRATT* 1985).

RABB et al. 1990 berichteten weiterhin über um 31 % reduzierte Hypophysengewichte bei kastrierten Ponyhengsten.

Beim Eber waren die Wiederaufnahmeeffekte der Hodenfunktion nach der immunologischen Kastration bislang nicht Gegenstand der Untersuchungen.

Tab. 2.7 a Übersicht über den Einsatz verschiedener Vakzinen zur immunologischen Kastration bei verschiedenen Tierarten und Geschlechtern sowie dem Menschen.

Vakzine							
Tierart	Geschlecht	Hapten	Spacer	Trägerprotein	Adjuvans	Technik	Literaturverweis
Kaninchen	m	GnRH			Polyvinylpyrrolidon		Arimura et al. (1973)
Kaninchen	m	GnRH		BSA Bovines Serumalbumin		Carbodiimid Technik	Fraser & Gunn (1973)
Ratten*	w	GnRH					
Ratten	w						Kerdelhué et al. (1976)
Schweine	m	GnRH		Glutaraldehyd			Caraty & Bonneau (1986)
Schafe	m						Hötzel et al. (1997)
Ratten	m	GnRH	D-LYS ⁶	Diphtherie-/Tetanus-toxoid			Sad et al. (1991)
Ratten	m	GnRH	GLY ¹⁰ OH	Tetanustoxoid			Ladd et al. (1989, 1990)
Lämmer	m	GnRH Analogon (Cystein subst. an Position 1, 6, 10)	m-Maleimido-benzoyl Sulfosuccinimid Ester	KLH Keyhole Limpet Hemocyanin			Goubau et al. (1989)
Ratten	m	GnRH	Carboxyl GLY-CYS	gereinigtes Tuberkulin-Protein Derivat	ohne Adjuvans		Morrison et al. (1987)
Mäuse	m	GnRH	LYS		Muramyl-dipeptid (synthet. Adjuvans-Peptid)		Hosmalin et al. (1987)
Rinder	w	Carboxyl-enth. GnRH Analogon (VAXSTRATE®)		Ovalbumin			Hoskinson et al. (1990)
Schafe	m						Brown et al. (1994)
Ziegen	m						Godfrey et al. (1996)

Tab. 2.7 b Übersicht über den Einsatz verschiedener Vakzinen zur immunologischen Kastration bei verschiedenen Tierarten und Geschlechtern sowie dem Menschen.

Vakzine							
Tierart	Geschlecht	Hapten	Spacer	Trägerprotein	Adjuvans	Technik	Literaturverweis
Ratten	m	GnRH	rekombinantes TriaT-LHRH		Mycobacterium- freies Adjuvans		McLachlan et al. (1995)
Ratten Kaninchen	m	GnRH conj. an Position 1, 6, 10		Tetanustoxoid			Ladd et al. (1990)
Menschen	m/w	synthet. "look like" GnRH (GONADIMMUNE®)		- enthalten -	Wässrige Lösung		Talwar (1997) Henderson (1998)
Kälber	m						Robertson et al. (1979, 1981, 1982) Jeffcoate et al. (1982)
Rinder	m/mk						Robertson et al. (1982)
Rinder (x)	m/mk						Lobley et al. (1992)
Lämmer (x)							Schanbacher (1982)
Schweine (x)	m	GnRH		Humanes Serumglobulin			Awoniyi et al. (1988b)
Rotwild	m						Lincoln et al. (1982, 1984)
Pferde	w						Garza et al. (1986) Garza et al. (1988)
Primaten	m						Hodges & Hearn (1977)
Primaten	m	GnRH		Diphtherietoxoid			Giri et al. (1991)

Tab. 2. 8 a Die immunologische Kastration bei verschiedenen Tierarten und Geschlechtern sowie dem Menschen unter Berücksichtigung unterschiedlicher Vakzinierungsschemata, Antikörperbildung und Verlust des Immunisierungseffektes.

Vakzine										
Tierart	Geschlecht	Haptene	Spacer	Trägerprotein	Adjuvans	IM Schema (d.A.)	1. IM (Alter, d.A.)	AK Bildung - anamnest. Reaktion - (Alter, d.A.)	Verlust IM Effekt - Wiederaufnahme - (Zeit, d.A.)	Literaturverweis
Kälber	m	GnRH	CYS-GLY	HSA Humanes Serumalbumin	Diethyl- Aminoethyl Dextran	0/56 (d)				Finnerty et al. (1994)
Schweine	m	20 AS GnRH Analogon Monomer (physiol.) GnRH		Keyhole Limpet Hemocyanin		0/8 (Wo)	9-10 (LW)	17-18(LW)		Meloen et al. (1994)
Rinder	mk m	GnRH		KLH Keyhole Limpet Hemocyanin		einmalige IM	10.5 - 11 (LM)	10.5 - 11 (LM)	> 28 (Wo) ¹	Adams & Adams (1992)
Rinder	m					einmalige IM	3.6 (LM)			Adams et al. (1993)
Rinder	m					einmalige IM	7 (LM)			Adams et al. (1996)
Rinder	m					einmalige IM	2.5 (LM)			Jago et al. (1997)
							4 (LM)			
							7.5 (LM)			
Rinder	m					einmalige IM	1 (LM)			Huxsoll et al. (1998)
							4 (LM)	12 (LM)		
							6 (LM)			
Lämmer	m					0/6/12/28 (Wo)	16-20 (Wo)	44-48 (LW)		Jeffcoate et al. (1982)
Lämmer	m					0/10 (Wo)	vor / um die Zeit der Pubertät	> 115 (LW) ²		Brown et al. (1994)
Ziegen	m	Carboxyl enth. GnRH Analogon (VAXSTRATE [®])		Ovalbumin		0/2 (Wo)				Godfrey et al. (1996)
						0/4 (Wo)				

¹ gemessen an GnRH Titer, LH Reduktion, verzögertes Hodenwachstum

² einige Tiere zeigten subnormale Hodengrößen in der 115. LW; Wiederaufnahme wenn der GnRH Titer abfällt

³ Reduktion der Hodengröße hält bis zu 394 Tage nach der 1. IM an

Tab. 2. 8 b Die immunologische Kastration bei verschiedenen Tierarten und Geschlechtern sowie dem Menschen unter Berücksichtigung unterschiedlicher Vakzinierungsschemata, Antikörperbildung und Verlust des Immunisierungseffektes.

Vakzine										
Tierart	Geschlecht	Hapten	Spacer	Trägerprotein	Adjuvans	IM Schema (d.A.)	1. IM (Alter, d.A.)	AK Bildung - anamn. - Reaktion (Alter, d.A.)	Verlust IM Effekt - Wiederaufnahme - (Zeit, d.A.)	Literaturverweis
Schweine (x)	m	GnRH	Humanes Serumglobulin	KFA komplettes Freund'sches Adjuvans Muramyl-dipeptid	0/4/6 (Wo)	12 (LW)	18 (LW)			Falvo et al. (1986)
										Caraty & Bonneau (1986)
Schweine	m	GnRH	BSA Bovines Serumalbumin	komplettes Freund'sches Adjuvans Aluminiumoxid-gel	100 (LT)					Bonneau et al. (1994)
										Ladd et al. (1994)
Schweine (x)	m	GnRH	Globulin	hochgereinigtes Mineralöl (1. IM) Saponin (2. IM)	29 kg		89 kg			Bonneau et al. (1994)
										Ladd et al. (1994)
Hunde Katzen	m	GnRH	Tetanustoxoid	Muramyl-peptid	0/2/6 (Wo)					Lincoln et al. (1982)
Rotwild	m	GnRH								Schanbacher & Pratt (1985)
Pferde	m kr	GnRH								Thompson (2000)
Pferde	mk	GnRH	BSA Bovines Serumalbumin	immunisiert über 6 Mo						Gual et al. (1997)
Menschen	w *	GnRH	LYS ⁶	Diphtherie-toxoid						
Schweine	m	GnRH Analogon (IMPROVAC [®])	Dextran		0/4(5) (Wo)	15 (LW)	19 (LW)		180 (d) ⁷	Einarsson (2006)
						18 (LW)	22 (LW)			
						14 (LW)	18 (LW)			

⁴ Hodengröße und Testosteronkonzentrationen normalisieren sich

⁵ gemessen an der Aushärtung des Geweibs

⁶ LH, Testosteron normalisieren sich

⁷ Immunisierungseffekt vollständig aufgehoben

3. KLÄRUNGSBEDARF UND FRAGESTELLUNG

Die immunologische Kastration mit IMPROVAC[®] (Boar Taint Vaccine for Male Pigs, CSL Animal Health, Victoria, Australia) als handelsüblichem Impfstoff basiert auf einer Immunisierung gegen GnRH verbunden mit dem Aufbau eines Antikörpertiters gegen dieses Freisetzungshormon. Damit kommt es zur Hemmung der LH-Ausschüttung und somit zur Hemmung der Steroidsynthese einschließlich des Ebergeruchsstoffes Androstenon.

Um geruchsfreie Schlachtkörper zu garantieren, muss die Bildung von Androstenon durch zweimalige Vakzinierung im Abstand von ca. vier Wochen (CLAUS et al. 2007) unterdrückt werden. Die Neubildung von Androstenon muss anschließend für einige Wochen gehemmt bleiben, damit bereits ins Fettgewebe eingelagertes Androstenon vollständig ausgeschieden wird. Bislang liegen jedoch keine Untersuchungen dazu vor, ob die Hodenfunktion innerhalb dieser Zeitspanne von etwa vier Wochen (CLAUS 1976) wieder aufgenommen wird. Zudem ist es in der landwirtschaftlichen Praxis hinreichend bekannt, dass das Ausstellungsalter deutlich zwischen einzelnen Tieren variieren kann. Damit verlängert sich bei einem Teil der Tiere die Mastperiode über die angestrebten vier Wochen.

Während die Auswirkungen auf alle reproduktions- und metabolisch-relevanten Parameter beim Schwein sowie die zeitlichen Zusammenhänge unter der Immunisierung hinreichend bekannt sind (z.B. METZ et al. 2002, METZ & CLAUS 2003, CLAUS et al. 2007), fehlen noch detaillierte Informationen zur Zeitspanne bis zum Abklingen der Antikörperbildung und damit der Wiederaufnahme der Hodenfunktion. Derartige Untersuchungen wurden zuvor bei anderen Tierarten wie z.B. Nutztieren und Pferden (ADAMS & ADAMS 1992, BROWN et al. 1994, GODFREY et al. 1996, SCHANBACHER & PRATT 1985) oder auch Hund und Katze (LADD et al. 1994) vorgenommen. Die Ergebnisse deuten jedoch auf erhebliche Unterschiede zwischen Spezies und Art des Impfstoffes hin (Übersicht siehe EINARSSON 2006). Kontinuierliche Messungen der Blutparameter sowie histologische Befunde lagen nicht im jeweiligen Fokus der bislang durchgeführten Untersuchungen am Schwein (ZAMARATSKAIA et al. 2008).

Anhand der vorliegenden Arbeit soll daher die Aufrechterhaltung einer aktiven Immunisierung gegen GnRH mit IMPROVAC[®] (Boar Taint Vaccine for Male Pigs, CSL Animal Health, Victoria, Australia) näher untersucht werden. Der Schwerpunkt der Untersuchungen liegt auf der Erfassung tierindividueller Reaktionen sowohl der endokrinen Hodenfunktion als auch der morphologischen Veränderungen der Sexualorgane.

Die detaillierte Erfassung der Zeitabläufe zwischen den Vakzinierungen und der Wiederaufnahme der endokrinen Funktionen und der Spermatogenese war Ziel der vorliegenden Arbeit.

Im Versuch soll die Dauer einer aktiven Immunisierung gegen GnRH mit einem handelsüblichen Impfstoff (IMPROVAC[®], Boar Taint Vaccine for Male Pigs, CSL Animal Health, Victoria, Australia) untersucht werden.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Ablauf der Tierversuche

Der Tierversuch wurde beim Regierungspräsidium Stuttgart nach § 8 des Tierschutzgesetzes beantragt und unter der Nummer V227/06 THs genehmigt.

Es wurden insgesamt 10 Eber der Deutschen Landrasse in den Versuch genommen. Die Zuordnung der Tiere zu den beiden Versuchsgruppen (Behandlungsgruppe bzw. Kontrollgruppe) erfolgte zufällig. Die experimentellen Maßnahmen sind in Tab. 4.1 zusammenfassend dargestellt.

Die Tiere der **Behandlungsgruppe** (n=6, V-Tiere = vakzinierte Eber) wurden mit einem Alter von 22 bzw. 23 Wochen (84,8 kg KGW \pm 7,6 kg) von der Versuchsstation Unterer Lindenhof geliefert und im Versuchsstall der Universität Hohenheim aufgestellt. Nach einer zweiwöchigen Eingewöhnungsphase wurden den Tieren (25./26. Lebenswoche, 91,3 kg KGW \pm 6,2 kg) chirurgisch Venenverweilkatheter eingesetzt (siehe 4.2.3. Operationsmethode zur Verlegung von Venenverweilkathetern). Der Versuch wurde durch die 2. Vakzinierung (26./27. Lebenswoche, 98,4 kg KGW \pm 6,6 kg) begonnen und als Tag 0 des Experimentes definiert.

Die Tiere der **Kontrollgruppe** (n=4, I-Tiere = intakte Eber) wurden im Alter von 46 Wochen (172,5 kg KGW \pm 6,1 kg) im Versuchsstall der Universität Hohenheim aufgestellt. Dieses Alter wurde gewählt, da die Gewebsentnahme (Hoden, akzessorische Geschlechtsdrüsen) im gleichen Alter wie bei der Behandlungsgruppe erfolgte. Die beiden Versuchsgruppen wurden nicht zeitlich parallel, sondern als zwei getrennte Durchgänge behandelt.

4.2. Tierhaltung und experimentelle Techniken

4.2.1. Haltung und Fütterung der Versuchstiere

Die Tiere wurden in Einzelbuchten von 2,90 x 2,00 m Größe auf Häckselstroh gehalten und hatten Sicht- und Sozialkontakt. Durch jeweils 8 Fenster pro Stallseite (1,00 x 0,60 m) waren die Tiere den normalen circadianen und saisonalen Lichtverhältnissen unterworfen.

Die Temperatur wurde über eine Klimaanlage auf durchschnittlich 18-20 °C geregelt.

Tab. 4. 1 Charakterisierung der Versuchstiere.

Eber	Versuchsbeginn			Immunisierung		Blutentnahmen		
	Alter (LW)	KGW (kg)	Katheter	1. Vak	2. Vak	24h		
				(18./19. LW)	(26./27.LW)	tgl.	Windows	Einzelprobe
1 VINO	26./27.	100	x	x	x	x	x	
2 VICO		107	x	x	x	x	x	
3 VITUS		98	x	x	x	x	x	
4 VINUR		85	x	x	x	x	x	
5 VALLENTHIN		103	x	x	x	x	x	
6 VIKTOR		97	x	x	x	x	x	
A ISLAY	46.	180						x
B ISKO		176						x
C IVEN		170						x
D IODOC		164						x

Eber	Versuchsende		Gewebeproben	
	Alter (LW)	KGW (kg)	Hoden	Geschlechts
				drüsen
1 VINO	52./53.	198	x	x
2 VICO		200	x	x
3 VITUS		203	x	x
4 VINUR		163	x	x
5 VALLENTHIN		204	x	x
6 VIKTOR		191	x	x
A ISLAY	52.	205	x	x
B ISKO		202	x	x
C IVEN		197	x	x
D IODOC		185	x	x

Die bedarfsgerechte Fütterung der V-Tiere wurde in 3 Abschnitte gegliedert: in der ersten Phase bis zu einem Lebensalter von 31 Wochen (122,3 kg KGW \pm 7,5 kg) erhielten die Eber zweimal täglich je 1,5 kg (insgesamt 3 kg/Tag) einer Mastfütterration mit 13,45 MJ ME/kg, 16,71 % Rohprotein und 3,91 % Rohfaseranteil. Im folgenden Fütterungsintervall von 4 Wochen bekamen sie von demselben Futter 3,5 kg/Tag. Im nachfolgenden Fütterungsabschnitt (36.-41. Lebenswoche, 149,4 kg KGW \pm 8,5 kg bis 164,0 kg KGW \pm 9,1kg) erfolgte eine Futterumstellung auf ein weniger energiereiches Eberfutter mit Grünfahleextrakten und 11,22 MJ/kg Energiedichte sowie 13,58 % Rohprotein und 7,87 % Rohfaseranteil; hiervon wurden 3 kg Futter pro Tag gefüttert. Ab einem mittleren Lebend-

gewicht von 160-170 kg KGW bis zu Versuchsende (52. Lebenswoche, 193,2 kg KGW \pm 14,1 kg) erhielten die Tiere nur noch 1,3 kg dieser Ration.

Die Kontrolleber bekamen über den gesamten Versuchszeitraum von 6 Wochen je 1,5 kg Eberfutter pro Ration.

Das Futter wurde zweimal täglich zu den Zeiten 8 und 15 Uhr zugeteilt. Vor jeder Fütterung erfolgte eine individuelle Futterrückwaage, um die Futteraufnahme jedes einzelnen Tieres berechnen zu können. Die Rationen wurden gemäß den Bedarfswerten auf der Versuchstation Unterer Lindenhof gemischt. Die Zusammensetzung der Rationen ist Tabelle 4.2 zu entnehmen.

Einmal wöchentlich wurde das Gewicht der Tiere kontrolliert.

Tab. 4. 2 Zusammensetzung der Futterrationen.

	Mastfutter	Eberfutter
MJ ME/kg	13,5	11,2
XP (%)	16,7	13,6
XF (%)	3,9	7,9
Rohstoff	% Anteil im Futter	
Gerste	37,3	38,0
Weizen	17,0	9,0
Weizenkleie		6,3
Triticale	20,0	
Hafer		16,0
Erbsen	7,0	3,0
SES	15,0	4,0
Sojaöl	1,0	1,0
Futterkalk	0,2	0,3
Vormischung		
Hühner		20,0
Mineralstoffe	2,5	2,5

4.2.2. Operationsmethode zur Verlegung der Venenverweilkatheter

Jedem Versuchstier der Behandlungsgruppe wurde über die Vena cephalica ein Venenverweilkatheter in die Vena jugularis mittels der am Institut etablierten Methode (CLAUS *et al.* 1990a) verlegt, um eine frequente Blutprobenentnahme ohne Belastung der Tiere zu ermöglichen.

Als Katheter diente je nach Größe und Gewicht des Tieres zum Zeitpunkt der Operation ein 160-200 cm langer Silastic[®]-Siliconschlauch (Aromando Medizin Technik GmbH, Düsseldorf, Deutschland) mit einem inneren Durchmesser von ca. 3 mm. An

diesen Schlauch wurde in der Mitte eine Dacron[®]-Scheibe (Imbra inc., C.R. Bard, Tempe, Arizona, USA) mit Silikon befestigt, welche während der Operation im Nackenfettgewebe des Tieres implantiert wurde. Das Dacron diente der Fixation des Katheters durch Verwachsung des umliegenden Gewebes mit der rauen Oberfläche des Velours und damit auch der Prophylaxe von aufsteigenden Infektionen entlang des Katheters.

Die initiale Injektionsnarkose der genücherten Tiere erfolgte mit Stresnil 4 %[®] (Azaperon, 2 mg/kg KGW i.m., 1 mg/kg KGW i.v., Fa. Janssen Animal Health, Neuss, Deutschland) und Ursotamin 10 %[®] (Ketaminhydrochlorid, 15 mg/kg KGW i.m., 10 mg/kg KGW i.v., Fa. Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland). Die Narkose wurde als Inhalationsnarkose mit Isofluran-Baxter[®] (Isofluran, 1:1 O₂-Lachgas : Isofluran, Einleitung: 4-5 %, Erhaltung: 1-1,5 %, Fa. Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) fortgesetzt.

Zur Narkoseüberwachung wurden die Tiere zusätzlich an ein Pulsoximeter und an ein EKG angeschlossen. Die Kontrolle des EKGs war vor allem beim Vorschieben des Katheters in Richtung des Herzens von besonderer Bedeutung: im Falle von Herzrhythmusstörungen war der Katheter zu weit vorgeschoben worden und musste daher zurückgezogen werden, so dass die Katheterspitze vor der Mündung der V. cava cranialis in den rechten Vorhof zu liegen kam.

Die Tiere wurden direkt vor der Operation gewaschen; im gesamten Operationsfeld wurden die Borsten entfernt und die geschorene Fläche mehrmals mit 70 % Alkohol und Braunoderm (Polyvidon-Iod, Fa. B. Braun Melsungen AG, Deutschland) desinfiziert.

Für jedes Tier wurde vor dem Hautschnitt die Länge des Katheters individuell abgemessen, indem man die Länge von der Austrittsstelle des Katheters, ca. 2 cm oberhalb des Dacrons, bis zur Eintrittsstelle in die Vena cephalica ermittelte und noch ca. 20 cm (Erfahrungswert) dazugab, welche später in der Vena jugularis zu liegen kamen. Der so gemessene Punkt wurde markiert.

Der Hautschnitt erfolgte ca. dreifingerbreit vor der Ellenbogenbeuge. Die Vena cephalica wurde stumpf freipräpariert. Nach Fixieren und Eröffnen der Vene wurde der kochsalzgefüllte Katheter über die Vena cephalica und die Vena jugularis, unter ständiger Kontrolle des EKGs, langsam in Richtung rechten Vorhof bis zur Markierung vorgeschoben. Die Funktionsfähigkeit des Venenverweilkatheters wurde durch Anziehen von Blut dreimal geprüft: nach Fixieren in der Vene, nach Verschluss der

Wunde im Bereich des Buggelenkes sowie nach Durchziehen des Katheters in die Nackenregion der Schweine und Verlegen des Dacrons.

Nach dem Abbinden des distalen Teils der Vene wurde der Katheter in der Vena cephalica durch eine doppelte Ligatur fixiert. Das freie Katheterende wurde nun mit Hilfe eines 80 cm langen, flexiblen Aluminiumtrokars durch das Unterhautfettgewebe in Richtung der Austrittsstelle im Nacken geführt. Das Dacron wurde etwa in 2 cm Tiefe durch ein liegendes U-Heft fixiert. Abb. 4.1 zeigt schematisch die endgültige Lage des Venenverweilkatheters im Tier.

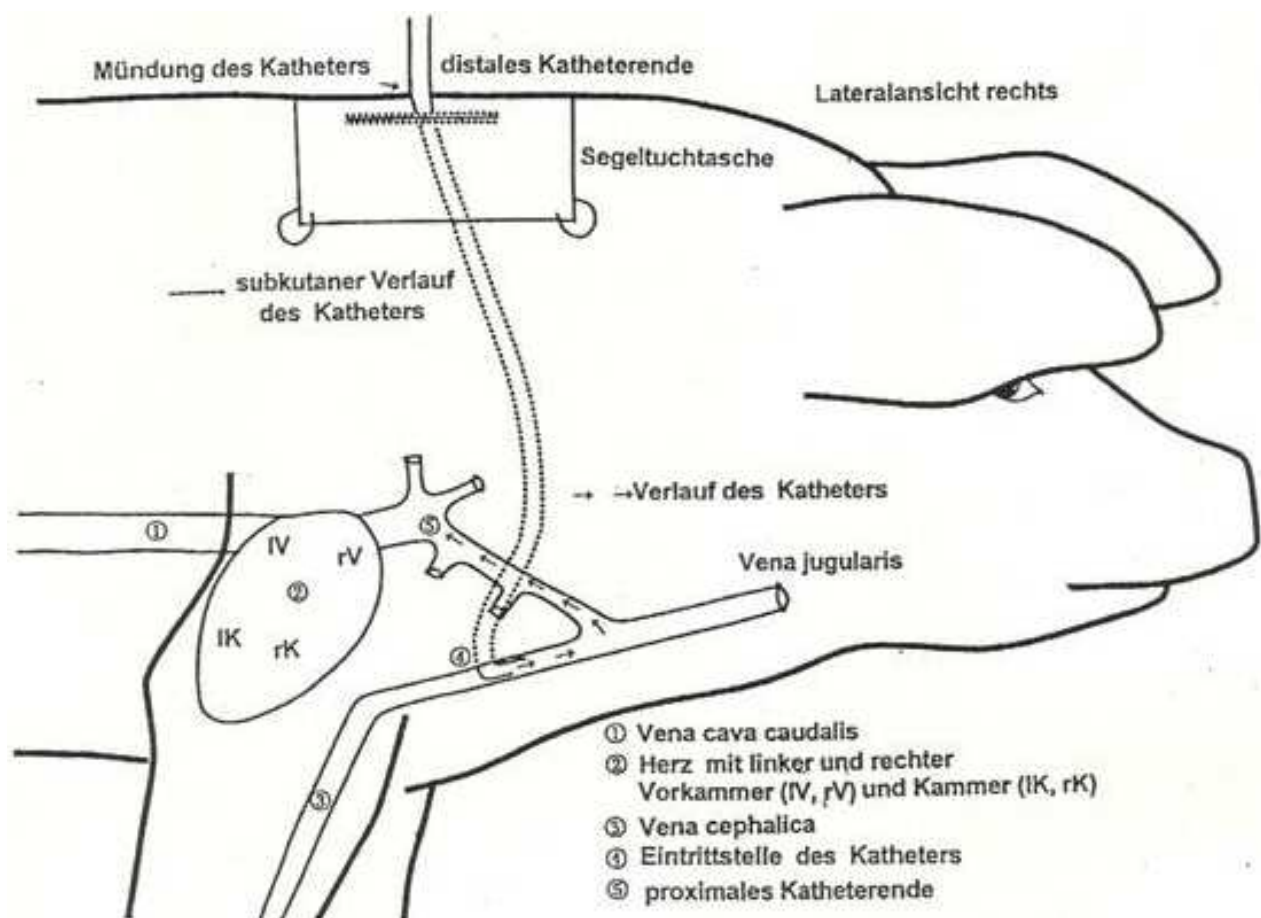


Abb. 4. 1 Lage des Venenverweilkatheters im Tier (ZEIFANG 2000).

Zur lokalen Antibiose wurden der Trokar und der Zugang zur Vene mit ca. 5 ml Veracín compositum[®] (Benzathin-Benzylpenicillin, Benzylpenicillin-Procaïn, Dihydrostreptomycinsulfat, 3 ml/50kg KGW i.m., Fa. Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) benetzt bzw. getränkt.

Das nun noch freie Katheterende wurde mit einem Dreiwegehahn versehen und nach Kontrolle der Durchgängigkeit, mit einer heparinisierten NaCl-Lösung (9 g NaCl, 1 g Heparin) gespült.

Das zugängliche distale Ende des Venenverweilkatheters wurde geschützt in einer Segeltuchtasche verwahrt, welche an allen vier Ecken durch einfache Einzelhefte im Nacken der Versuchstiere fixiert wurde.

Alle Wundflächen wurden mit Betaisodona[®] Salbe (10 g Povidon-Jod/100g Salbe, Fa. Mundipharma GmbH, Limburg/Lahn, Deutschland) und Aluminium Spray[®] (Isopropyl Alcohol, Acetone, Butane, Propane, Alumina, PVP/VA Copolymer, Fa. Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) abgedeckt.

Die Tiere erhielten post op Metacam[®] 20 mg/ml (Meloxicam, 0,4 mg Meloxicam/kg KGW, entsprechen 2 ml/100kg i.v., Fa. Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland) über drei Tage und dreimalig Veracin compositum[®] (Benzathin-Benzylpenicillin, Benzylpenicillin-Procaïn, Dihydrostreptomycinsulfat, 3 ml/50kg KGW i.m., Fa. Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) im Abstand von jeweils zwei Tagen.

Im laufenden Versuch wurden die Fäden nach 10 Tagen gezogen, die Taschenfäden täglich kontrolliert und bei Entzündung mit der Wundspüllösung Lavanid[®] 2 (Ringer DAB 7 mit 0,04 % Polyhexanid, Fa. Serag-Wiessner KG, Naila/Selbitz, Deutschland) per Knopfkanüle gespült und gegebenenfalls mit Aluminium Spray[®] (Isopropyl Alcohol, Acetone, Butane, Propane, Alumina, PVP/VA Copolymer, Fa. Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) bzw. CTC Blauspray[®] (Chlortetracyclinhydrochlorid, Fa. Eurovet Animal Health BV, Bladel, Niederlande) abgedeckt.

Durch das enorme Größenwachstum und damit durch die Gewichtszunahme der Tiere während der ersten Phase des Versuchs kamen manche Katheter nach einiger Zeit nicht mehr richtig oder teilweise gar nicht mehr in der Vene zu liegen, so dass die Blutentnahme zunächst erschwert und später gar nicht mehr möglich war. Bei diesen Tieren wurden die Katheter in einer Kurznarkose mit Stresnil 4 %[®] (Azaperon, 2 mg/kg KGW i.m., 1 mg/kg KGW i.v., Fa. Janssen Animal Health, Neuss, Deutschland) und Ursotamin 10 %[®] (Ketaminhydrochlorid, 15 mg/kg KGW i.m., 10 mg/kg KGW i.v., Fa. Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) nach Freipräparieren des Dacrons gezogen. Die Tiere wurden post operationem für einen Tag mit Metacam[®] 20 mg/ml (Meloxicam, 0,4 mg Meloxicam/kg KGW, entsprechen 2 ml/100kg i.v., Fa. Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein,

Deutschland) versorgt; im Falle von eitrigen Entzündungen und Fieber je nach Bedarf auch länger in Kombination mit einer systemischen Antibiose. Nach einer tierindividuellen Rekonvaleszenzphase wurde ein neuer Venenverweilkatheter auf der kontralateralen Seite verlegt. Ein direkter Zugang in die Vena jugularis wurde nur bei einem Tier (Vitus) vorgenommen.

4.2.2. Tägliche Blutentnahme und Katheterpflege

Die Entnahme der täglichen Blutproben begann einen Tag nach der Verlegung der Verweilkatheter, jeweils morgens um 8 Uhr und mittags um 15 Uhr zur Fütterungszeit. Es wurden je 10 ml Blut entnommen und in heparinbeschichtete Proberöhrchen überführt. Die Blutproben wurden 15 Minuten bei 3000 U/min in einer Kühlzentrifuge (4 °C) zentrifugiert. Das Blutplasma wurde anschließend in beschriftete Probenröhrchen abgekippt und bis zur späteren Analytik bei -20 °C tiefgefroren.

Um eine Koagulation des Blutes im Katheter zu verhindern wurde nach der Entnahme mit 20 ml einer 1 %igen Heparinlösung gespült. Der Dreiweghahn wurde im Anschluss mit einer Lösung aus 70 % Alkohol und 3 % Wasserstoffperoxid desinfiziert, mit Verschlussstopfen versehen und aufgerollt in die Segeltuchtaschen versenkt.

Bei jedem Versuchseber wurden täglich die Dacron-Umgebung sowie die Taschenfäden kontrolliert und gegebenenfalls mit Lavanid[®] 2 (Ringer DAB 7 mit 0,04 % Polyhexanid, Fa. Serag-Wiessner KG, Naila/Selbitz, Deutschland) und Knopfkanüle gespült. Das Allgemeinbefinden der Tiere wurde überprüft und der Befund gegebenenfalls durch Temperaturkontrollen ergänzt.

4.2.3. 24h Window Sampling

Um die circadiane Pulsatilität von LH und FSH sowie die Veränderungen nach der zweiten Immunisierung, vor Beginn der Wiederaufnahme und nach Beginn der Wiederaufnahme vergleichen zu können wurden zu drei Zeitpunkten des Versuchsablaufs frequente Blutentnahmen („Windows“) im Abstand von 20 min über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt. Das erste Window wurde 14 Tage nach der Boosterung (d 15/16, 28./29. Lebenswoche, 110,5 kg KGW \pm 6,6 kg), das zweite vor Beginn der Wiederaufnahme der Hodenfunktion (d 119/120, 43./44. Lebenswoche, 172,1 kg KGW \pm 9,3 kg) und die dritte 24-Stunden-Messung nach der Wiederauf-

nahme der Hodenfunktion gesammelt (d 175/176, 51./52. Lebenswoche, 189,4 kg KGW \pm 12,9 kg)¹.

Während eines Windows betrug das Probenvolumen 5 ml. Der Katheter wurde in dieser Zeit nach jeder Blutentnahme mit 10 ml einer 0,4 %igen Heparinlösung gespült; die Öffnungen des Dreiwege-Hahns blieben offen und wurden stündlich mit 70 % Alkohol gespült. Um einem erhöhten Risiko des Bakterieneintrags durch die hohe Frequenz der Blutentnahme bei der Window-Messung entgegen zu wirken, wurde die Spülflüssigkeit über ein Sterilfilter (Celluloseacetate Membrane, 0,2 μ m, steril, Renner GmbH, Dannstadt, Deutschland) verabreicht. Dieser wurde alle 4 Stunden erneuert.

Die Probenaufbereitung erfolgte wie bei den täglichen Blutproben (siehe 4.2.3. Tägliche Blutentnahme und Katheterpflege). Das Plasma wurde jedoch auf zwei Röhrchen aufgeteilt, wobei eine als Rückstellprobe diente.

Nach Beendigung des Windows wurde der Dreiwegehahn gewechselt.

4.2.4. Vakzinierung gegen GnRH

Die aktive Immunisierung gegen GnRH (Immunokastration) erfolgte mit dem kommerziellen Impfstoff (IMPROVAC[®], Boar Taint Vaccine for Male Pigs, CSL Animal Health, Victoria, Australia)² zweimal im Abstand von 4 Wochen.

Die Vakzine enthält 200 μ g synthetisches GnRH Analogon-Protein-Konjugat/ml als wirksamen Bestandteil, 0,1 mg Thiomersal/ml als Konservierungsstoff und zusätzlich ein synthetisches wässriges Adjuvans auf Dextranbasis.

Gemäß Herstellerempfehlung (*FACHINFORMATION* IMPROVAC[®] ad us. vet. 2007) wurde den V-Tieren eine Impfdosis von je 2 ml subcutan am Ohrgrund mittels Impfpistole injiziert.

Die Erstimmunisierung erhielten die Tiere im Alter von 18-19 Wochen, die Boostering allerdings erst nach 7 Wochen (26./27. Lebenswoche; 98,4 kg KGW \pm 6,6 kg)³.

¹ bei Vino wurde das zweite 24h Window bereits nach Wiederaufnahme durchgeführt, da die Anstiegsphase in einer Zeit ohne Katheter erfolgte

² zugelassen in Australien und Neuseeland seit 1998 sowie auf den Philippinen, in Südafrika, Mexico und Brasilien seit 2006, EU-weit zugelassen seit Juni 2009 sowie in der Schweiz

³ entgegen der Herstellerempfehlung, da die Tiere noch auf dem Unteren Lindenhof (Versuchsstation der Universität Hohenheim, Eningen) untergebracht waren und noch keine Katheter verlegt waren, was die Blutentnahme ausschloss

Dennoch zeigten alle Tiere eine sichere Immunität gegen GnRH (siehe Kapitel 5.1.1. GnRH-Antikörpertiter).

4.2.5. Versuchsende, Entnahme und Charakterisierung der Gewebeproben

Die Behandlungsgruppe wurde in der 52./53. Lebenswoche (193,2 kg KGW \pm 14,1 kg) durch die intravenöse Injektion von Narcodorm[®] (Pentobarbital, 40 mg Pentobarbital/kg KGW i.v., cp-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland) exzitationsfrei euthanasiert. Das Versuchsende wurde auf den Zeitpunkt festgelegt, an dem auch der letzte Eber den Grenzwert von 0,5 ng Testosteron/ml überschritten hatte. Hierzu wurden Einzelproben im Abstand von 2 Tagen kontinuierlich im Labor gemessen.

Die Kontrollgruppe wurde analog in der 52. Lebenswoche (196,9 kg KGW \pm 7,4 kg) euthanasiert.

Innerhalb von 2 Minuten nach Eintritt des Todes wurden beide Hoden inklusive Nebenhoden entnommen, fotografiert und ihr Gewicht bestimmt.

Für die Histologie wurden Hodenstückchen (ca. 6 x 10 x 9 mm) aus dem inneren, mittleren und äußeren Bereich des rechten Hoden entnommen. Für die späteren morphologischen und immunocytoologischen Untersuchungen wurden diese direkt in

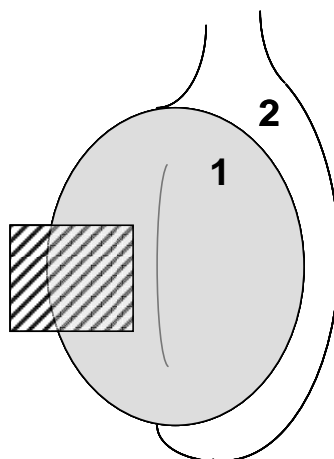


Abb. 4. 2 Entnahmestellen für das Hodengewebe (schraffierte Fläche).

1 Testis mit Rete testis

2 Epididymis

4 % Formalin fixiert. Des Weiteren wurden Hodenstücke in flüssigem Stickstoff schockgefroren, mittels Hammer zerkleinert und in kleinen Metalldöschen bei -80 °C aufbewahrt.

Abb. 4.2 skizziert die Entnahmestellen am Hoden.

Außerdem wurden die akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Prostata, Bulbourethraldrüsen, Samenblasendrüse) in toto entnommen, fotografiert und gewogen.

Die Fixierung des Hodengewebes (7 mm³ Gewebe/ml Fixierlösung) erfolgte in 4 % Formalin (Formaldehyd ≥ 37 %, Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland) bei ≥ 12 °C für 24 h, was eine ausreichende Hemmung der Endopeptidasen gewährleistet und somit der Zersetzung von Gewebestrukturen vorbeugt. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren histologischen Aufarbeitung in 0,1 M Phosphatpuffer überführt (Lagerung bei 4 °C, Puffer alle 2 Tage wechseln).

Für die Messungen von Androstenon und Skatol wurden zusätzlich Proben aus dem Rückenfett entnommen und tiefgefroren.

4.3. Analytische Verfahren

Die angewandten analytischen Verfahren sind in Tab. 4.3 zusammengefasst.

Die Labormethoden werden nachfolgend einzeln besprochen. Details zu den verwendeten Reagenzien finden sich in den Anhängen (Kapitel 10).

Tab. 4.3 Überblick über die einzelnen analytischen Methoden und ihre Aussagekraft für den Versuch.

Parameter	Aussagekraft	Probenmaterial	Messintervall	Messmethode
GnRH	Immunisierungseffekt und -status	Blutplasma	3d	Enzymimmunotest EIA
Testosteron	Charakterisierung Wiederaufnahme der endokrinen Hodenfunktion			Radioimmunotest RIA
Östrogene				
LH	Pulsatilität unter nachlassender Immunisierung		24h	
FSH				
Androstenon	Wiederaufnahme der Ebergeruchsbildung ("male effect")	Blutplasma	3d / 9d	
	Beeinträchtigung der Schlachtkörperqualität	Fettgewebe	Einzelprobe	
Blutplasma		3d / 9d	Hochdruckflüssigkeitschromatographie HPLC	
Fettgewebe		Einzelprobe		
Morphologie	Charakterisierung der Gonaden über die Zeit zur Wiederaufnahme	Hodengewebe	Einzelprobe	Sonographie und Bandmaß
				Histologie und Immunocytoologie
		Geschlechtsdrüsen		Gewicht
				Makroskopie

4.3.1. Radioimmunologische Bestimmung von LH und FSH

Markierung der porcinen Hormone LH und FSH mit ^{125}Jod

Bei der Markierung der beiden Proteohormone wird ein ^{125}J -Atom mit Hilfe des Oxidationsmittels Jodogen zum reaktiven Kation oxidiert, welches sich vorrangig an der phenolischen Seitenkette der Aminosäure Tyrosin findet (SALACINSKY et al. 1981, CLAUS et al. 1990a, OVER 1992). Die Reaktion ist in diesen Publikationen beschrieben und in der Tab. 4.4 zusammengefasst.

Tab. 4. 4 Ablauf der Markierung der Proteohormone.

Markierungsschritte				
	Vorbereitung	Ablauf	Abstoppen	Markierungsprodukt / RV
1	Oxidationsmittel 200µg Jodogen in 1ml Chloroform > 10µl = 2µg Jodogen unter Stickstoff im Eppendorff-Cup niedertrocknen	Spülen der Säule 1ml 0.5M PBS pH7.4 3ml 0.05M PBS pH7.4 1ml RSA 1% 3ml 0.05M PBS pH7.4	Jodogencup 200µl KJ-Lösung	Inhalt des Cups auf die AA-Säule transferieren
2	AA-Säule 2ml Spritze mit Glaswolle als Filter und Anionenaustauscher (BioRad AG 1 X8, 50-100 mesh, Anion-exchange-resin) füllen	Silikonisiertes Auffangglas 0,5 ml RSA 1%		Spülen des Cups 0,5ml 0.05M PBS pH7.4 und auf die AA-Säule transferieren
3		Jodogencup 2µl = 1mg Hormon (pLH, pFSH) 12µl 0.5M PBS pH7,4 2µl 125J = 0,1mCi > mischen <		Spülen der Säule 2x 1ml RSA 1%
4		Reaktionszeit 5min		Filtrieren Markierungsprodukt über Sterilfilter (0,2µm) filtrieren

Qualitätskontrolle der Markierung

Ziel der Markierung ist es, eine möglichst hohe Aktivität der radioaktiven Vorlage (RV) zu erhalten, also möglichst viele ^{125}J -Atome pro Hormonmolekül bei geringer Veränderung und Schädigung des Moleküls durch die Markierung selbst.

Die Qualität der einzelnen Markierungen, also die counts per minute/10 µl radioaktiver Vorlage (RV), wurde mittels des Anionenaustauscher-Trichloressigsäure-Talkum-Test (AA-TCA-T-Test, *TOWER et al. 1980*) überprüft.

Prinzip des Proteohormon Radio Immuno Assays (RIA)

LH und FSH wurden direkt radioimmunologisch nach dem kompetitiven Prinzip mit Doppelantikörpermethode im Isotopenlabor ermittelt.

Als Tracer wurde ^{125}J -markiertes pLH (^{125}J -pLH) bzw. pFSH (^{125}J -pFSH) eingesetzt, welches mit dem nativen Proteohormon um die Bindungsstellen am – in definierter Menge zugesetzten – ersten polyklonalen Antikörper (erzeugt in Kaninchen) konkurriert.

Der aus dem Schaf stammende zweite Antikörper richtet sich gegen die Komponenten des ersten Antikörpers, bindet diesen und führt so zur Bildung größerer Antigen-

Antikörper-Komplexe. Die Zugabe von Normal Rabbit Serum (NRS) verstärkt diese Komplexbildung zusätzlich.

In der Bound/Free-Trennung werden die Komplexe dann mittels Polyethylenglykol (PEG) gefällt, so dass nach dem Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes, die Radioaktivität im Pellet am Boden des Teströhrchens im Gammazähler direkt bestimmt werden kann.

Je mehr Radioaktivität (counts per minute, cpm) ermittelt wird, umso weniger natives Hormon war in der biologischen Probe.

Die Durchführung der radioimmunologischen Bestimmung der Proteohormone erfolgte in Anlehnung an die Methode von *CLAUS et al.* 1990b.

Durchführung des LH Radio Immuno Assays (LH-RIA)

Es wurden die 24h-Windows sowie die Proben von jedem zweiten Blutentnahmetag zur Untersuchung herangezogen.

An Tag 1 des LH-RIAs wurden die Proben und Kontrollen mit dem ersten Antikörper, der sich gegen das in der Probe vorhandene LH richtet, in der Verdünnung 1:666.666 je 100 µl angesetzt und 24 h bei Raumtemperatur inkubiert.

An Tag 2 wurde die radioaktive Vorlage (RV) – ^{125}J -markiertes LH – in einem Volumen von 100 µl zugegeben und ebenfalls bei Raumtemperatur für 24 h inkubiert.

An Tag 3 wurde der zweite Antikörper für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Gemisch aus NRS/2.Antikörper wird hinzu pipettiert, was diese Komplexbildung weiterhin verstärkt (Inkubation 45 min bei Raumtemperatur). Über die Zugabe von PEG wird die Fällung der Antikörperkomplexe eingeleitet, welche durch die Zentrifugation verstärkt wird (Bound/Free-Trennung). Der Überstand mit freien Antikörpern und radioaktiv markierten sowie nativen Hormonen wird mit Hilfe einer Vakuumpumpe über eine feine Pipette vorsichtig abgesaugt. Anschließend wird die Aktivität des Pellet direkt im Gammazähler ermittelt (Detektion).

Durchführung des FSH Radio Immuno Assays (FSH-RIA)

Es wurden ausschließlich die 24 h-Windows auf die Pulsatilität von FSH analysiert.

Im Unterschied zum LH-RIA, wurden die Proben an Tag 1 mit dem ersten Antikörper (Verdünnung 1:150.000) und direkt im Anschluss mit der RV über 24 h bei Raumtemperatur inkubiert.

An Tag 2 wurde der Test analog zu Tag 3 des LH-RIAs fortgeführt.

Die Testparameter der einzelnen Radio Immuno Assays sind in Tab. 4.5 dargestellt.

Tab. 4.5 Testparameter der Proteohormon- und Steroidhormon-Radioimmunoassays.

		Proteohormon-RIA		Steroidhormon-RIA	
		LH	FSH	Testosteron	17 β -Estradiol
Eichkurve	Eichpunkte	E0 - E11	E0 - E10	E0 - E10	E0 - E11
	Messbereich	0,0024 - 2,5ng je 100 μ l RSA 3%	0,0098 - 5,0ng je 100 μ l RSA 3%	0,005 - 1,0ng je 100 μ l PBS	0,002 - 1,0ng je 100 μ l PBS
Kontrollen	dotierte	k0 - k3 (0,0 - 1,0ng/ml)	k0 - k3 (0,0 - 5,0ng/ml)	k0 - k5 (0,0 - 1,0ng/ml)	k4 - k7 (20 - 100pg/ml)
	biologische	Sau, intakter Eber, Kastrat, im. Kastrat		keine	
Probenaliquot	Plasma (μ l)	100		50	250
Extraktion	tBM (ml)	keine		3	4
Primärantikörper polyklonal	Antigen	pLH	pFSH	T-3-CMO-RSA	E2-6-CMO-RSA
	Herkunft	Kaninchen		Kaninchen	
	Verdünnung	1:666.666	1:150.000	1:75.000 bis 1:77.000	1:45.000 bis 1:50.000
Sekundärantikörper polyklonal	Antigen	Kaninchen			
	Herkunft	Schaf			
	Verdünnung	01:10			
Tracer	Aliquot (μ l)	100		100	

Qualitätskriterien und Auswertung des Proteohormon Radio Immuno Assays (RIA)

Zur Charakterisierung der Qualität der Testreihen werden folgende Parameter herangezogen:

- Die *Präzision* stellt ein Maß für die zufälligen Abweichungen vom Erwartungswert im Ablauf der Immunoassays dar. Sie wird als *Intra-* und *Interassay-Varianz* ermittelt.
- Durch die *Wiederfindung* wird die *Richtigkeit* eines Tests ermittelt. Es handelt sich um starke Abweichungen von der wahren Konzentration eines Analyten, die trotz höchster Präzision auftreten können (sog. systematische Fehler).

- Die kleinste messbare Konzentration im jeweiligen Test ist die sogenannte *Nachweisgrenze*.

Die jeweiligen Qualitätskriterien der Testreihen sind in Tab. 4.6 dargestellt.

Tab. 4. 6 Ergebnisse der Qualitätskriterien der radioimmunologischen Testreihen.

	<u>LH</u>	<u>FSH</u>	<u>Testosteron</u>	<u>17β-Estradiol</u>	
Präzision	Intraassay- Varianz bei 100pg/ml	8.2%	6.3%	4.2%	8.1%
	Interassay- Varianz bei 350pg/ml	12.5%	11.6%	8.4%	9.4%
Wieder- findung			95%	90%	
untere Nachweisgrenze (WAGNER 2005)	25pg/ml	97pg/ml	50pg/ml	12pg/ml	

Weichen die Einzelwerte mehr als 5 % voneinander ab, werden die Messungen wiederholt.

Für die Auswertung der Pulsatilität der Proteohormone in den 24 h Windows siehe Kapitel 4.4.4. Auswertung und Statistik.

4.3.2. Radioimmunologische Bestimmung von Testosteron und Östrogenen

Prinzip des Steroid Radio Immuno Assays (RIA)

Testosteron und 17 β -Estradiol wurden radioimmunologisch nach Extraktion aus dem Blutplasma bestimmt.

Eine konstant zugesetzte Menge an Tritium-markiertem Testosteron (^3H -Testosteron) bzw. 17 β -Estradiol (^3H -17 β -Estradiol) wurde als Tracer eingesetzt, welches mit dem endogenen Steroid um die Bindungsstellen des – in definierter Menge zugesetzten – polyklonalen Antiserums (T-3-CMO, E-6-CMO) konkurriert. In diesem kompetitiven System wird das „heiße“ zugunsten des „kalten“ Hormons verdrängt.

Im Anschluss wurden die nicht an Antikörper gebundenen, freien endogenen bzw. markierten Hormone durch Ausschütteln mit Aktivkohle (Bound/Free-Trennung) von

den gebundenen getrennt. Der Anteil gebundenen radioaktiven Steroids wurde gemessen und anhand einer Eichkurve als Messwert angegeben.

Je mehr counts per minute (cpm) ermittelt wurden, umso weniger Hormon war in der biologischen Probe enthalten.

Durchführung des Steroid Radio Immuno Assays (RIA)

Die radioimmunologische Bestimmung sowohl von Testosteron (*BUBENIK et al. 1982, WAGNER & CLAUS 2004*) als auch von 17β -Estradiol (*CLAUS et al. 1983*) erfolgte im Blutplasma das im Abstand von zwei Tagen gewonnen worden war.

In Tab. 4.6 sind die jeweiligen Verdünnungsstufen und Volumenanteile (Aliquots) der Testansätze aufgeführt.

Bei der Extraktion wurde Plasma in die sorgfältig gespülten Extraktionsgefäße im Doppelansatz vorgelegt und mit Filterwasser verdünnt. Als Lösungsmittel wurde tertiärer Butyl-Methyl-Ether zugegeben. Die Proben wurden auf dem Horizontalschüttler für 30 min extrahiert und danach für 1 h bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Beim Einfrieren werden unerwünschte Stoffe wie Plasmabestandteile am Boden des Gläschens gefällt, zudem kann die Lösungsmittelphase, die das Steroid enthält, leicht von der festen Wasserphase abgetrennt werden. Anschließend wurde die Lösungsmittelphase für 30 min in einer Vakuumzentrifuge niedergetrocknet.

Der Rückstand wurde in Phosphatpuffer aufgenommen und aliquote Teile in den RIA überführt. Anhand einer Eichkurve erfolgte die quantitative Auswertung, eine Reihe von Kontrollproben, die in jeder RIA-Charge mit analysiert wurde, diente zur Abschätzung der Zuverlässigkeitskriterien.

Zu den in Puffer gelösten Proben wird der Antikörper in der jeweiligen Verdünnung mit RSA-Puffer zugegeben (s. Tab. 4.6). Anschließend wurde die radioaktive Vorlage pipettiert. Alle Proben wurden gevortext und mit Alufolie bedeckt für 20 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad inkubiert, um die kompetitive Gleichgewichtslage einzustellen. Die Antikörper-Antigen-Reaktion wurde im Eisbad bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ für eine Stunde abgestoppt.

Die Bound/Free-Trennung erfolgte mit 0,5 %iger Kohlesuspension. Alle Ansätze wurden eine Minute lang geschüttelt und dann die Bound/Free-Trennung durch Zentrifugation für 20 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 3000 U/min durchgeführt.

Die abzentrifugierten Proben wurden in die Zählgefäße mit 5 ml Szintillatorflüssigkeit abgekippt und verschlossen.

Die Detektion der verbliebenen Strahlung (counts per minute, cpm) erfolgte im Beta-zähler für 2 min.

Qualitätskriterien und Auswertung des Steroid Radio Immuno Assays (RIA)

Die Qualitätskriterien der Steroidbestimmung sind Tab. 4.6 zu entnehmen.

4.3.3. Enzymimmunologische Bestimmung von Androstenon im Blut und im Fettgewebe

Prinzip des Androstenon Enzyme Immuno Assay (EIA)

Die Androstenonbestimmung erfordert wegen der Flüchtigkeit des Steroids besondere Sorgfalt.

Zur Bestimmung von Androstenon wurde ein Enzyme Immuno Assay mit Solid-Phase Technik (ELISA) und vorgeschalteter Extraktion eingesetzt.

Hierbei wird ein spezifischer Antikörper (IgG anti Androstenon) an die Oberfläche der wells der Mikrotitrationsplatte gebunden.

Als Tracer wurde das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) eingesetzt, welches über einen Spacer an das gesuchte Steroid gekoppelt wird. Während der Inkubation treten das enzymmarkierte und das native Androstenon in Konkurrenz um die Bindungsstellen am Antikörper.

Die Antigen-Antikörper-Komplexe werden von nicht gebundenem Androstenon-Enzym-Konjugat durch einfaches Dekantieren der Lösungen und anschließendem Waschen separiert (Bound/Free-Trennung).

Die gebundene Enzymaktivität äußert sich in der Stärke der Farbreaktion, die bei der Umsetzung des Substrates entsteht. Nach Abstoppen der Umsetzungsreaktion mittels Schwefelsäure, wird die optische Dichte photometrisch bei 450 nm bestimmt.

Das Prinzip sowie Enzyme und Substrate der EIAs sind Tab. 4.7 zu entnehmen.

War wenig endogenes Androstenon in der jeweiligen Probe enthalten, so wird viel Substrat umgesetzt (stärkere Farbreaktion).

Durchführung des Androstenon Enzyme Immuno Assay

Androstenon wurde in den Plasmaproben jeden dritten Tag gemessen; der Wert für das Fettgewebe wurde in der Einzelprobe vom Tag der Schlachtung ermittelt.

Zunächst wurde die Mikrotiterplatte mit der IgG Fraktion Kaninchen (affinitätsgereinigt an Protein G; 1:10 aliquotiert) in einer Endverdünnung 1:8.000 beschichtet. Blank und NSB (Nicht Spezifische Bindung) erhielten nur 150 µl Beschichtungspuffer. Die Platte wurde über Nacht bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.

Am Folgetag wurde die Androstenonextraktion aus dem Blutplasma (CLAUS et al. 2008a) durchgeführt. Die Plasmaproben wurden im Einfachansatz mit einem Aliquot von 1 ml pipettiert und mit 3 ml n-Hexan bei Raumtemperatur für 30 min auf dem Horizontalschüttler extrahiert.

Bei dieser Extraktion wird das flüchtige, fettlösliche Androstenon aus dem Blutplasma in die n-Hexan-Phase überführt.

Beim folgenden Tiefgefrieren (1 h bei -20 °C bis -30 °C) wurde das Plasma gefroren. Der nichtgefrorene Überstand – also die androstenonhaltige Lösungsmittelphase – wird in beschriftete Reagenzgläser abgekippt.

Diese Lösungsmittelphase wurde für 18 min in der Vakuumzentrifuge niedertrocknet, wobei die verbliebene Lösungsmittelmenge laufend überprüft wurde (wird zu lange niedertrocknet, verflüchtigt sich auch das Androstenon!).

Im Niederschlag findet sich nun die reine Androstenonmenge aus der Probe. Diese Niederschlagsphase wurde sofort in 100 µl Methanol aufgenommen und gevortext.

Es wurden 900 µl Testpuffer hinzugegeben, die Reagenzgläschen verschlossen und 15 sec lang gevortext.

Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C dunkel gelagert.

Zur Extraktion von Androstenon aus dem Fettgewebe (CLAUS et al. 1997), wurde das aufgetaute Fett in ca. erbsengroße Stücke geschnitten und in Fettschmelzgläschen (Einfachbestimmung) gegeben. Die in Fett angesetzten Standards und Kontrollen wurden ebenfalls geschmolzen. Die Proben, Standards und Kontrollen wurden für 4-5 min in der Mikrowelle bei mittlerer Wärmeleistung geschmolzen. 50 µl dieses Fettes werden im Doppelansatz in das vorgewärmte Methanol (450 µl) pipettiert und gevortext. Es folgt eine Ruhephase von 30 min bei Raumtemperatur. In die Reagenzgläschen werden 900 µl Testpuffer vorgelegt. 100 µl des Methanol-Überstandes wurden hinzupipettiert und gevortext.

Am letzten Tag wurde der eigentliche ELISA durchgeführt. Die beschichtete Mikrotiterplatte wurde dekantiert und dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

In Blank wurden 120 µl, in NSB 100 µl PBS (Phosphatpuffer) pipettiert. Die übrigen Wells wurden mit je 100 µl Eichkurve, Proben bzw. Kontrollen belegt. Alle Wells außer

Blank erhielten 20 µl Tracer (Androstenon-HRP-Lösung). Es folgte ein Inkubationsschritt von 75 min bei 37 °C unter schütteln (Geschwindigkeit 150).

In der Zwischenzeit wurde eine 0,6 % TMB-Lösung und eine 1 % H₂O₂-Lösung hergestellt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Platte in Alufolie zusammen mit 17 ml Substratpuffer, Spitzen und Plastikwanne für 10 min bei 37 °C im Wärmeschrank angewärmt.

Die gebrauchsfertige Substratlösung wurde mit einem Aliquot von 150 µl/well pipetiert und für 40 min bei 37 °C inkubiert.

Die Umsetzungsreaktion wurde mit 50 µl H₂SO₄/well abgestoppt.

Die optische Dichte wurde bei 450 nm gemessen. Je höher die Extinktion, desto mehr Androstenon (pg/well) war in der Probe enthalten.

Die jeweiligen Konzentrationen im Blut und im Fettgewebe werden in ng/ml angegeben.

Qualitätskriterien des Androstenon Enzyme Immuno Assay

Die untere Nachweisgrenze des enzymimmunologischen Tests auf Androstenon im Blutplasma und Fettgewebe lag bei 2,5 pg/well. Die Intraassay-Varianz lag bei 5,9 % für den Nachweis im Plasma. Die Interassay-Varianz lag bei 4,9 % für Blutplasma und bei 6,2 % für Fettgewebe.

4.3.4. Bestimmung des Antikörpertiters gegen GnRH

Prinzip des GnRH Enzyme Immuno Assay (EIA)

Der GnRH-Titer wurde mittels eines am Institut etablierten Enzyme Immuno Assay mit Solid-Phase-Technik (ELISA) und Doppelantikörpermethode⁴ ermittelt. Details dieser Methodik sind publiziert worden (CLAUS *et al.* 2007).

Das Prinzip beruht darauf, dass die Kavitäten (wells) der Mikrotiterplatte mit GnRH beschichtet wurden. Daran können die endogenen Antikörper im Blutserum der vakzinierten Schweine binden.

Als Tracer wurde wiederum Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) eingesetzt, welche an einen polyklonalen Antikörper, der sich gegen die Gammaglobuline des Schweins richtet, gebunden wird. Während der Inkubation bindet dieser

⁴ Sie unterscheidet sich von der klassischen Doppelantikörpermethode dadurch, dass der endogene Antikörper als Primärantikörper dient

an den endogenen Antikörper und führt so zu größeren Antigen-Antikörper-Komplexen.

Die Isolierung dieser Antigen-Antikörper-Komplexe von nicht gebundenen Antikörper-Enzym-Konjugaten erfolgte durch einfaches Dekantieren und Waschen (Bound/Free-Trennung).

Um die gebundene Enzymaktivität des Antigen-Antikörperkomplexes zu messen, wird ein spezifisches Substrat benötigt, bei dessen Umsetzung ein photometrisch messbares Chromogen entsteht. Bei dieser Enzym-Substrat-Reaktion werden von einem Enzymmolekül mehrere Substratmoleküle umgesetzt (Verstärkereffekt). In Tab. 4.7 sind das Prinzip sowie die verwendeten Enzyme und Substrate der EIAs angeführt.

Um den vollständigen Abbau des Substrates zu verhindern, muss diese Umsetzungsreaktion nach einer gewissen Zeit mittels Schwefelsäure abgestoppt werden.

Die Detektion erfolgt photometrisch bei 450 nm.

Je höher der GnRH-Titer, desto mehr Substrat wird umgesetzt und desto stärker die gemessene optische Dichte.

Durchführung des GnRH Enzyme Immuno Assay (CLAUS et al. 2007)

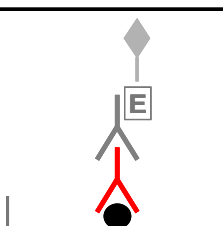
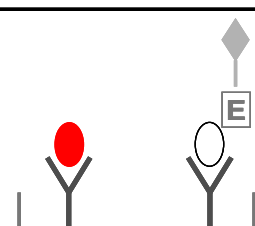
Für die Bestimmung wurde eine 96well-Mikrotiterplatte (Maxisorp Immunoplate, Thermo Fisher Scientific (Nunc GmbH & Co. KG, Roskilde, Dänemark) mit GnRH-Molekülen beschichtet, an die dann die körpereigenen humoralen Antikörper binden können. Dann wurde die Platte für 1 h bei 37 °C im Wärmeschüttler inkubiert, danach dekantiert, mit Puffer abgesättigt und mit Alufolie abgedeckt über Nacht bei 4 °C dunkel gelagert.

Am Folgetag wurden die Verdünnungsstufen 1:1.600 und 1:3.200 aus den Plasma-proben und den biologischen Kontrollen mit Puffer hergestellt.

Anschließend wurde die Mikrotiterplatte dekantiert und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Verdünnungsstufen wurden unter Aussparung der randständigen Kavitäten mit einem Aliquot von 100 µl/well aufgetragen. Die Belegung der Platte wurde dokumentiert.

Nicht belegte wells werden mit Puffer aufgefüllt. Die Mikrotiterplatte wurde mit Alufolie abgedeckt und für 2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Tab. 4. 7 Prinzip sowie Enzyme und Substrate der Enzyme Immuno Assays.

	<u>GnRH</u>	<u>Androstenon</u>
Material	Blutplasma	Fettgewebe
Nachweis von	Antikörpern gegen GnRH	Androstenon (endogen)
Prinzip		
Antikörper	1	IgG Fraktion Kaninchen 1:8.000
	2	Polyclonal Rabbit anti Swine Immunoglobulin/HRP 1:10.000
Tracer	sekundärer AK	Androstenon-HRP
Enzym	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	
Substrat/Chromogen	H_2O_2/TMB	
Messung	photometrisch bei 450nm	

Nach einem erneuten Waschschrift wurde der 2. AK (Polyclonal rabbit anti swine Immunoglobulin/HRP, Dako Cytomation, Denmark) in der Verdünnung 1:10.000 mit Puffer zugegeben. In Alufolie wurde die Platte erneut für 1 h bei 37 °C im Wärmeschüttler inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die 0,6 % TMB in DMSO-Lösung und die 1 % H_2O_2 -Lösung angesetzt und dunkel aufbewahrt. Die gewaschene Platte wurde nun in Alufolie verpackt und zusammen mit Pipettenspitzen, Färbewanne und Substratpuffer für 15 min im Wärmeschrank bei 37 °C gewärmt.

Die gebrauchsfertige Substratlösung wurde mit einem Aliquot von 150 μ l/Kavität pipettiert und bei 37 °C für 40 min inkubiert. Die Umsetzungsreaktion mit einem Farbumschlag von farblos nach türkis wurde mittels 2 M H_2SO_4 abgestoppt (Farbänderung nach Gelbstufen).

Die optische Dichte wurde photometrisch bei 450 nm bestimmt; die individuelle GnRH-Titerhöhe wird als Extinktion angegeben.

Qualitätskriterien des GnRH Enzyme Immuno Assay

Es konnte eine Interassay-Varianz von 17,2 % bei einer Extinktion von 3,5 und einer Verdünnung von 1:800 ermittelt werden.

4.3.5. Bestimmung von Skatol im Blut und im Fettgewebe

Prinzip der Skatol High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Bei der High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) handelt es sich um ein flüssigchromatographisches Trennverfahren. Hierbei wird die zu untersuchende Substanz Skatol (3-Methylindol) zusammen mit einer mobilen Phase (sog. Laufmittel, Eluent) durch die stationäre Phase in der Trennsäule gepumpt.

Abhängig von der jeweiligen Stärke der Wechselwirkungen zwischen der zu analysierenden Substanz und der stationären Phase der Trennsäule zeigt der Detektor Peaks im Chromatogramm an. Um die Konzentrationen von Skatol in den jeweiligen Blutplasma- und Fettproben der Versuchstiere zu bestimmen, wurden Standards mit definierten Konzentrationen an Skatol hergestellt, die ebenfalls die HPLC durchlaufen. Anhand eines Vergleichs der detektierten Peak-Flächen der Standards mit denen der Proben wurden dann die individuellen Konzentrationen unter Berücksichtigung der Wiederfindungsrate berechnet.

Durchführung der Skatol High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Skatol wurde sowohl im Blutplasma (*CLAUS et al.* 1993) als auch im Fettgewebe (*DEHNHARD et al.* 1993) mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion bestimmt.

Die Plasmaproben (500 µl) wurden nach Zugabe des internen Standards (2-Methylindol in Methanol, 30 µl) mit Diethylether (2 ml) extrahiert (30 sec vortexen). Hierzu wurden die Ansätze zunächst für 10 min bei 4 °C und 1000 U/min zentrifugiert und anschließend für 1 h tiefgefroren. Die skatolhaltige Etherphase wurde dann in ein Reagenzglas mit 500 µl des Eluent A abgekippt. Im 60 °C heißen Heizblock wurde der Ether anschließend verdampft und 250 µl des reinen Laufmittels wurden in die HPLC-Vials mit Mikroeinsatzgläsern vorgelegt.

Von den Fettgewebsproben wurden etwa 2 g in Reagenzglaschen bei mittlerer Leistung in der Mikrowelle erhitzt. Von diesem geschmolzenem Fett wurde ein Aliquot von 100 µl mit 1 ml n-Hexan versetzt, worin sich das Fett löst. Anschließend erfolgte nach Zugabe des internen Standards (2-Methylindol in Methanol) die Extraktion mit einem Acetonitril-Wasser-Gemisch 4:1 v/v (30 sec vortexen). Nach der Zentrifugation (15 min, 20 °C, 3000 U/min) wurde die Hexan-Phase abgesaugt und die verbliebene Acetonitril-Phase komplett in die HPLC-Vials überführt. Aliquots von 20 µl wurden mittels HPLC analysiert.

Die HPLC Anlage bestand aus Autosampler (Merck Hitachi L-7200), Pumpe (Merck Hitachi L-7100) und Detektor (Merck Hitachi F-1050). Die Auswertung erfolgte mittels Chrom-Card Software und Interface. Im Falle von Fettgewebe erfolgte die Elution mit Eluent A und einer Flußrate von 1 ml/min. Für die Elution von Skatol im Blutplasma wurde ein Gradient mit den Eluenten A/B verwendet. Die Testbedingungen sind in Tab. 4.8 dargestellt.

Die Auswertung erfolgt über externe Standards (Eichkurve, s. Tab. 4.9) unter Berücksichtigung des internen Standards (Zugabe von 2-Methylindol).

Tab. 4.8 HPLC Testbedingungen für Blutplasma und Fettgewebe.

Test Bedingungen	Blutplasma		Fettgewebe
Eluent A	x		x
Eluent B	x		
Flow	1,2ml/min		1,0ml/min
Eluentengradient	Eluent 100%	Zeit (min)	
	A	0,0	
	A	8,0	
	B	8,1	
	B	13,0	
	A	13,1	
	A	15,0	
Säule	LiChrospher 100 RP 18,5µm (125 x 4,6 mm) mit Vorsäule		
Säulentemperatur	Zimmertemperatur		
Laufzeit	15min		10min
Injektionsvolumen	50µl		20µl
Detektion	Ex 275nm, Em 352nm		

Standardkalibriergerade:

Den Quotienten aus den Peak-Flächen jedes Analyten mit den Peak-Flächen des zugehörigen internen Standards gegen die Konzentration auftragen und die Geradengleichung ermitteln.

Probengehalt:

Den Quotienten aus den Peak-Flächen jedes Analyten mit dem jeweiligen internen Standard in die ermittelte Geradengleichung einsetzen (Konzentration ng/ml).

Tab. 4. 9 Eichkurven für Skatol und Androstenon.

Eichpunkte	Androstenon		Skatol	
	Blutplasma (ng/ml)	Fett (µg/g)	Blutplasma (ng/ml)	Fett (ng/100µl)
E0	0,000	0,000	0,000	0,000
E1	0,025	0,100	0,250	0,500
E2	0,050	0,200	0,500	1,000
E3	0,100	0,500	1,000	1,250
E4	0,300	1,000	2,500	2,500
E5	0,500	2,000	5,000	5,000
E6	1,000		10,000	10,000
E7	2,000		20,000	25,000
E8	4,000		30,000	
E9	6,000		40,000	

Qualitätskriterien der Skatol High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Für die Bestimmung von Skatol im Blutplasma konnte eine Intraassay-Varianz von 6,2 % bei 0,88 ng/ml und eine Interassay-Varianz von 6,4 % bei 0,81 ng/ml ermittelt werden. Die Wiederfindung lag bei einer Dotierung von 1,5 ng/ml um die 95 %, die untere Nachweisgrenze war 0,06 ng/ml (LÖSEL 2006).

Für das Fettgewebe lag die Intraassay-Varianz bei 4,9 % (170 ng/g) und die Interassay-Varianz bei 3,2 % (174 ng/g). Bei einer Dotierung von 15 ng/g konnte eine Wiederfindung von 114 % verzeichnet werden. Die untere Nachweisgrenze für das Fettgewebe lag bei 0,8 ng/g (LÖSEL 2006).

4.4. Morphologische und histologische Verfahren

Die Entwicklung der Hodengröße unter nachlassendem Immunisierungseffekt und beginnender Wiederaufnahme wurde *in vivo* kontinuierlich durch Sonographie und per Bandmaß erfasst, zudem wurde *post mortem* der funktionelle Status histomorphologisch und immunocytoologisch untersucht.

4.4.1. Sonographie und Bandmaß

Mit der beginnenden Wiederaufnahme der Hodenfunktion des ersten Ebers *Vino* wurde die Hodengröße aller Tiere untersucht.

Sowohl für die Behandlungs- als auch die Kontrollgruppe wurden beide Hoden im zweiwöchigen Rhythmus sonographisch mit dem Ultraschallgerät Picker CS9600/E (Hitachi GmbH, Hilden, Deutschland) ausgemessen. Der Ultraschallkopf 7,5 MHz wurde mittig auf den Hoden aufgesetzt; das Hodenparenchym wurde einmal längs und einmal quer geschallt (Vgl. Abb. 4.3).

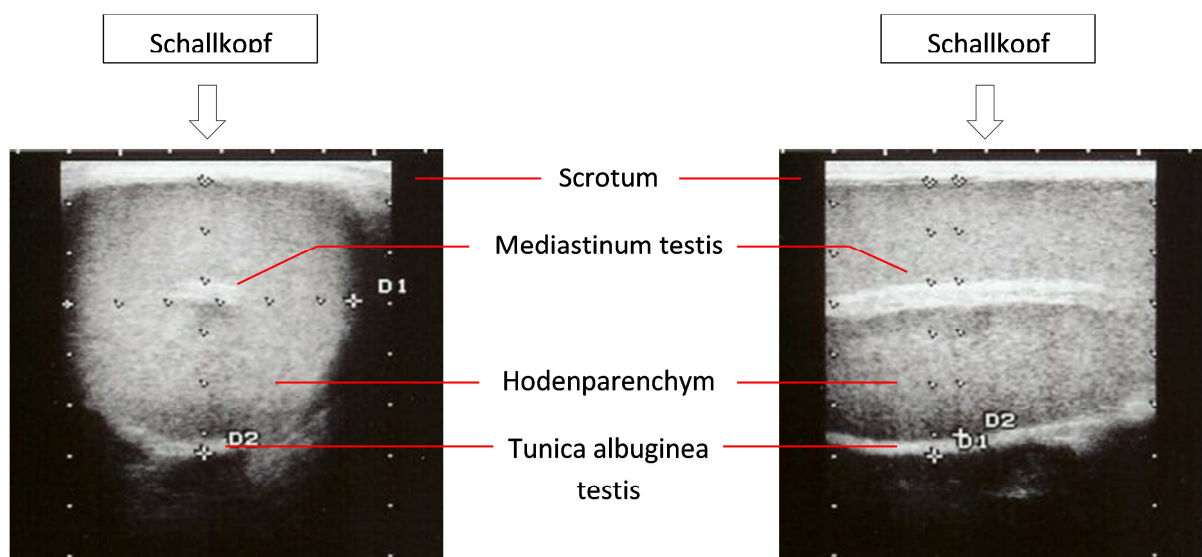


Abb. 4. 3 Anatomische Strukturen in der Sonographie der Hoden quer (links) und längs (rechts).

Der Durchmesser der Hoden wurde als Mittelwert aus zwei Einzeldurchmessern (D1, D2) im Querschnitt ermittelt.

Ein Längsschnitt des Hodens war zu Beginn der Messungen nicht bei allen Tieren in toto möglich – aufgrund der Länge der Hoden trotz anhaltenden Immunisierungseffektes. Es wurde daher auf die Auswertung des Längsschnittes verzichtet.

Durch die zunehmende Größe der Hoden war es gegen Ende der Messungen gerade bei den „frühen“ Tieren nicht mehr möglich den Querschnitt in toto zu schallen. Daher wurde zusätzlich das Bandmaß des Hodens im selben Rhythmus bestimmt. Dieser Parameter erlaubte eine kontinuierliche Messung der äußeren Hodenanteile. Hierbei wurde ein flexibles Metermaß einmal längs (vertikal) und einmal quer (horizontal) mittig über die einzelnen Hoden gelegt. Gemessen wurde jeweils von Beginn bis Ende der tastbaren Hodenanteile (längs) bzw. bis zur Raphe scroti für den Querdurchmesser.

Abb. 4.4 zeigt die Ansatzpunkte der Messung.

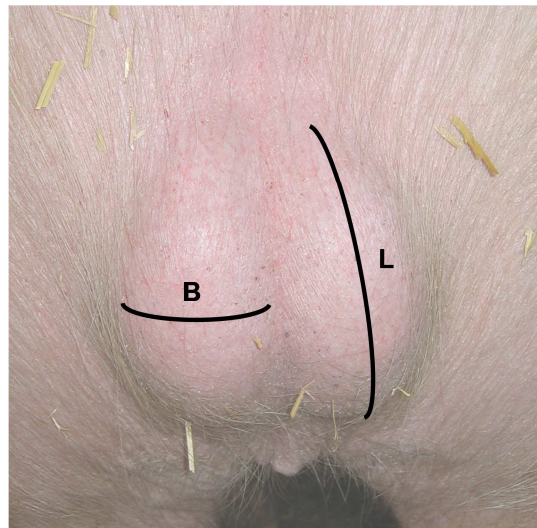


Abb. 4. 4 Ansatzpunkte für die Ermittlung des Bandmaßes (B = Breitenmaß, L = Längenmaß) sowie für den Quer- (links) und Längsschnitt (rechts) durch die Sonographie.

Außerdem wurde die Größenzunahme der Hoden unter nachlassendem Immunisierungseffekt fotografisch dokumentiert.

4.4.2. Färbetechniken

4.4.2.1. Anfertigung der Paraffinschnitte

Für die histomorphologischen und immunocytoologischen Färbungen wurden die fixierten Gewebeproben zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert: 50 %, 70 %, 96 % und 2 x 100 % Ethanol (Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland). Anschließend wurden die Proben in Xylol (Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert und in Paraffin (Paraplast[®], Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet (ROMEIS 1989).

Tab. 4.10 zeigt den Ablauf der Entwässerung und Einbettung in Paraffin.

Tab. 4. 10 Ablauf der Entwässerung und Einbettung in Paraffin.

	Medium	Dauer	
Entwässerung	50% EtOH	1-2h	
	50% EtOH	12h	
	70% EtOH	2h	
	96% EtOH	1h	
	100% EtOH	1h	
	100% EtOH	1h	
Einbetten	Xylol	1h	
	Paraffin	12h	60°C
	Paraffin	1h	
	Paraffin	1h	

Aus den abgekühlten und ausgehärteten Paraffinblöckchen wurden mit einem Schlittenmikrotom Leica SM2000R (Leica Microsystems GmbH, Nussbach, Deutschland) Schnitte von 4 µm Dicke angefertigt, welche anschließend in einem 35 °C warmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger aufgezogen und bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet wurden.

4.4.2.2. Histomorphologische Beurteilung des Hodengewebes

Um das Hodengewebe insbesondere die Tubuli seminiferi und das Interstitium der Versuchsgruppen histomorphologisch zu vergleichen, wurde die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung gewählt.

Sie stellt die Zellkerne dunkelblau dar, wohingegen Eosin die cytoplasmatischen Anteile hellrot anfärbt. Von dieser Hintergrundfärbung hebt sich die Immunfärbung mit ihrem braunen Farbton deutlich ab.

4.4.2.2.1. Durchführung der HE-Färbung

Die Färbung des Hodengewebes mit Hämatoxylin-Eosin (HE) erfolgte nach *ROMEIS (1989)*.

Vor den eigentlichen Färbeschritten mussten die Gewebeschnitte zunächst in 4 % Chloroform (Trichlormethan, Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland) zweimal für je 15 min entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (zweimal 100 %, 96 % und 70 %) jeweils für mindestens 2 min hydriert werden.

Anschließend wurden die Schnitte für 3 sec in filtrierte Hämalaun-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) getaucht, dann sofort in Aqua bidest gestellt und unmittelbar im Anschluss daran für mindestens 10 min unter fließendem Wasser gewässert (sog. bläuen).

Es folgte die Gegenfärbung in 0,2 % Eosinlösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit 50 µl Eisessig (Essigsäureanhydrid, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) für 5-10 sec. Nach mehreren Spülschritten mit Aqua bidest wurden die gefärbten Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70 %, 96 % (jeweils nur kurz) und zweimal 100 % für 2 min dehydriert, in Xylol zweimal für 2 min inkubiert und abschließend in Depex eingedeckt (DEPEX[®], Serva electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland).

4.4.2.2.2. Auswertung der HE gefärbten Gewebeschnitte

Für die Auswertung der histomorphologischen Kriterien (Tab. 4.11) wurden die Schnitte im Lichtmikroskop (Leitz DM, Leica Microsystems GmbH, Bensheim, Deutschland) bei verschiedenen Vergrößerungen betrachtet und geeignete Stellen,

d.h. Hodenausschnitte ohne Artefaktbildungen (Löcher, Fehlfärbungen etc.) über eine Kamera (Donpisha 3 CCD Color Vision Camera Module, Modell XC-003P, Sony, LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland) auf einen Rechner gespeichert und ausgedruckt (HP Laser Jet 1200 series, Hewlett Packard GmbH, Böblingen, Deutschland). Die Ausdrücke wurden planimetrisch (OTT-Planimeter, A.OTT, Kempen, Deutschland) ausgewertet und die einzelnen histomorphologischen Parameter unter Berücksichtigung der Vergrößerungsfaktoren berechnet.

Die Verteilung der relativen Anteile an Hodentubuli und Interstitialgewebe wurde über 5 in etwa gleich große Referenzflächen je Tier direkt planimetrisch ermittelt.

Zur Charakterisierung von Tubulusradien und Keimepithelhöhe bzw. -höhe wurden 8 annähernd runde Tubuli planimetriert und die entsprechenden Parameter berechnet (s. Abb. 4.5).

Die mittlere Fläche der Leydigzellen wurde anhand 10 zufällig ausgewählter Leydigzellen und -kerne bestimmt. Aus den planimetrisch ermittelten Flächenangaben wurde das mittlere Leydigzell- und Kernvolumen nach der Methode von *ABERCROMBIE* (1946) berechnet.

Die Leydigzellzahl je Tier wurde durch direkte planimetrische Bestimmung der Leydigzellzahl je mm^2 von 5 Interstitialausschnitten mit einer Referenzfläche von $106 \mu\text{m}^2$ erhalten.

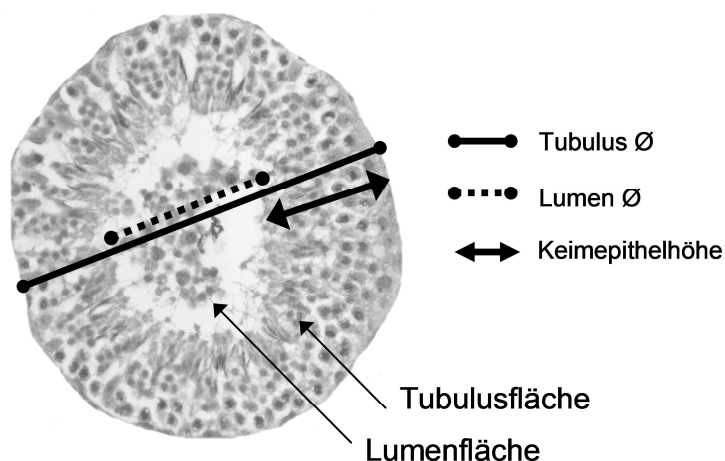


Abb. 4.5 Prinzip der Auswertung der Tubuli seminiferi.

Tab. 4.11 Morphologische Kriterien zur Charakterisierung des Hodengewebes sowie ihre Bestimmung.

Parameter	Vergrößerung	Faktor	direkte Bestimmung / Berechnung	Referenz
Morphologie phänotypisch				
Hodengewicht	makroskopisch		gewogen	rechter Hoden
Hodendichte			1g/cm ³	WAGNER 2005
Morphologie der Kompartimente				
Tubuli %	5x	x 480,8	Tubulifläche/Bezugsfläche	Bezugsfläche 1300112µm ²
Tubulifläche			planimetrisch	
Interstitialium %			100 - Tubuli %	
Interstitialiumfläche			Bezugsfläche - Tubulifläche	
LZ-freies Interstitium			ausgezählte Interstitiumfläche - LZ-Gesamtfläche	
Morphologie der Tubuli				
Tubulus Ø	10x	x 119	gemessen	
Tubulusfläche			planimetrisch	
Lumen Ø			gemessen	
Lumenfläche			planimetrisch	
Keimepithelhöhe			Tubulusradius - Lumenradius	
Keimepithelfläche			Tubulusfläche - Lumenfläche	
Morphologie der Leydigzellen (LZ)				
LZ-Zahl/µm ² x10 ⁶	40x	x 7,43	ausgezählt	Referenzfläche 10 ⁶ µm ²
LZ-Zahl x 10 ¹⁰ /Hoden			LZ-Volumen/Hoden / mittleres Volumen einer LZ	
LZ-Fläche			planimetrisch	
LZ-Kern Ø			gemessen	
LZ-Volumen			$\frac{4}{3} \pi r^3$	
LZ-Kernvolumen				
LZ-Plasmavolumen			LZ-Volumen - LZ-Kernvolumen	
Morphologie des Keimzellzyklus und der Keimzellen				
Keimzellstadien %	40x	x 7,43	ausgezählt	
Keimzellzahl			ausgezählt	
Keimzell Ø			gemessen	
Mitoserate gesamt			ausgezählt	
Mitoserate je Stadium			ausgezählt	

4.4.2.3. Immunocytochemische Techniken zur Auswertung der Spermatogeneseaktivität mittels Ki-67 und GATA-4

Um die Spermatogeneseaktivität der Wiederaufnahmetiere und der intakten Eber gegenüber zu stellen, wurden die Schnitte des Hodengewebes GATA-4 (McCOARD *et al.* 2001, HAEUSSLER *et al.* 2007) und Ki-67 (MENTSCHERL *et al.* 2001) gefärbt. GATA-4 ist ein Marker zur Darstellung der Sertoli-Zellen, Ki-67 ein Mitosemarker.

Das Prinzip der immunocytochemischen Färbungen beruht auf der indirekten Avidin-Biotin-Methode. Hierbei können bestimmte Proteine von Zellen (z.B. Transkriptionsfaktoren wie GATA-4 oder Ki-67) über spezifisch gegen sie gerichtete Antikörper detektiert werden. Ein biotinylierter Sekundärantikörper richtet sich gegen den Primärantikörper und bindet über das Biotin an seinen freien Bindungsstellen hoch affin an das Avidin (Streptavidin) des AB-Komplexes, bestehend aus Streptavidin und biotinylierter Peroxidase. Eine Farbentwicklung wird durch die Zugabe des Farbstoffes DAB (Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid Dihydrat) erzielt, welcher durch die Peroxidase des AB-Komplexes zu einer Braunfärbung umgesetzt wird.

Abb. 4.6 skizziert das Prinzip der Avidin-Biotin-Methode.

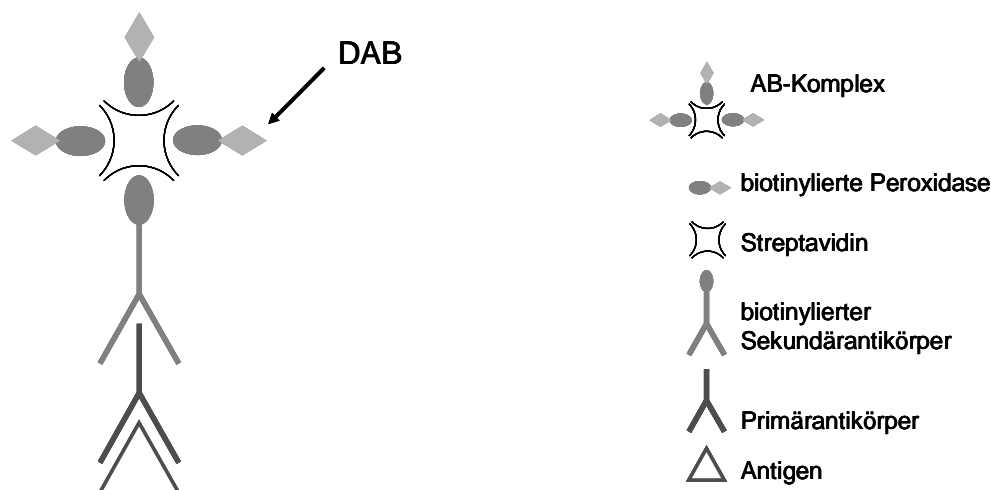


Abb. 4. 6 Schematische Darstellung der indirekten Avidin-Biotin-Methode.

AB: Avidin-Biotin, DAB: Diaminobenzidin

4.4.2.3.1. Durchführung der immunocytochemischen Färbungen

Die Durchführung der immunocytochemischen Färbungen wurde wie von *MENTSCHEL et al. 2001* beschrieben durchgeführt.

Zunächst mussten die Gewebeschnitte in 4 % Chloroform (Trichlormethan, Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland) zweimal für je 15 min entparaffiniert sowie in einer absteigenden Alkoholreihe – zweimal 100 %, 96 % und 70 % jeweils für mindestens 2 min – hydriert und mit Aqua bidest gespült werden.

Um vernetzende Methylenbrücken, wie sie bei der Fixierung mit Formalin entstehen und welche die Anlagerung des Antikörpers verhindern würden, zu demaskieren,

wurden die Schnitte fünfmal für je 5 min in Citratpuffer eingelegt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Die Schnitte wurden nach dem Abkühlen für 5 min in TBS (Tris balanced solution) inkubiert.

Dann wurde die endogene Peroxidase, welche in fast allen Zellen vorkommt und zu falsch positiven Ergebnissen führen würde, durch Einlegen in 7,4 %ige Wasserstoffperoxidlösung blockiert (5 min), die Schnitte mit Aqua bidest abgespült, neutralisiert und in TBS für 5 min inkubiert.

Unspezifische Bindungen und somit falsch positive Ergebnisse können auch durch unspezifische Komponenten im Kaninchen- (GATA-4) bzw. Ziegen Serum (Ki-67), welche zur Produktion des zweiten Antikörpers herangezogen wurden, entstehen. Um dies zu verhindern, wurden die Schnitte mit dem jeweiligen Serum bedeckt und 30 min in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur inkubiert.

Es folgten drei weitere Inkubationsschritte:

- Inkubation des Primärantikörpers
(60 min, 37 °C)
- Inkubation des Sekundärantikörpers
(30 min, Raumtemperatur)
- Inkubation des AB-Komplexes
(30 min, Raumtemperatur)

Nach jedem dieser Inkubationsschritte wurden die Schnitte für 5 min in TBS inkubiert. Die Farbentwicklung erfolgte über DAB für 2-3 min, währenddessen wurde die Färbung stichprobenweise kontrolliert.

Es folgte die Gegenfärbung mit filtrierter Hämalaun-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) für 3 sec. Die Schnitte wurden dann sofort in Aqua bidest gestellt und unmittelbar im Anschluss daran für mindestens 10 min unter fließendem Wasser gewässert.

Anschließend wurden die gefärbten Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70 %, 96 % (jeweils nur kurz) und zweimal 100 % für 2min dehydriert, in Xylol zweimal für 2 min inkubiert und abschließend mit Depex eingedeckt (DEPEX[®], Serva electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland).

Mit jedem Färbedurchgang wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der kein Primärantikörper zugegeben wurde.

Details der Färbung beider Antigene sind nachfolgend dargestellt:

Der Primärantikörper GATA-4 (C-20): sc-1237 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) 1:200 ist ein in Ziegen erzeugter, affinitätsgereinigter polyklonaler Antikörper, der sich gegen den Transkriptionsfaktor GATA-4 in den Sertolizellen richtet.

Die GATA-4 gefärbten Schnitte wurden zur Charakterisierung des Keimepithelzyklus sowie der Keimzellen herangezogen.

Als Sekundärantikörper 1:400 wurde ein in Kaninchen erzeugtes, biotinyliertes IgG eingesetzt, das sich gegen das IgG der Ziege richtet (Rabbit anti goat IgG: Biotin, Dako GmbH, Hamburg, Deutschland).

Der Primärantikörper Ki-67 (MIB 1) Histoprime Nr. EO59 (LINARIS Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen, Deutschland) 1:4 ist ein in Mäusezellkulturen erzeugter, monoklonaler Antikörper, der sich gegen das Zellproliferationsantigen Ki-67 richtet.

Das Ki-67 Protein wird nahezu über den gesamten Zellzyklus (S-, G2-, M- und späte G1-Phase) exprimiert (*GERDES et al. 1984*). Der Primärantikörper färbt laut Herstellerinformation auch die meiotischen Reifeteilungen an.

Als Sekundärantikörper 1:400 wird ein in Ziegen erzeugtes, biotinyliertes IgG eingesetzt, das sich gegen das IgG der Maus richtet (Goat anti mouse IgG: Biotin, Dako GmbH, Hamburg, Deutschland).

4.4.2.3.2. Auswertung der immunocytochemisch gefärbten Gewebeschnitte

Zunächst wurde bei 400-facher Vergrößerung die relative Häufigkeit der Keimepithelstadien je Tier an 100 Tubuli bestimmt.

Die Einteilung der Keimepithelstadien erfolgte anhand der vorkommenden Keimzellen und ihres jeweiligen Reifegrades (*SWIERSTRA 1968*). Stadium VI und VII wurden zusammengefasst, da eine eindeutige Differenzierung unter dem Lichtmikroskop nicht möglich war. Eine Unterteilung in prämeiotische (I, II, III), meiotische (IV, V) und postmeiotische Stadien (VI/VII, VIII) wurde nach *GARCIA-GIL et al. (2002)* vorgenommen.

Zur Beurteilung der jeweiligen Keimzellzahl je Stadium wurden für 5 Tubuli/Stadium bei 400-facher Vergrößerung A- und B-Spermatogonien, Spermatozyten, runde und elongierte Spermatiden sowie Sertolizellen ausgezählt.

Die jeweilige Keimzellgröße wurde für 10 Zellen/Keimzelltyp anhand des mittleren Zelldurchmessers ermittelt. Die elongierten Spermatiden wurden hierbei nicht berücksichtigt.

Die Sertolizellanzahl zwischen den Ebern wurde nicht weiter differenziert, da ihre Anzahl nach der Pubertät als stabil angesehen werden kann (*BERNDTSON et al.* 1987).

Bei der Charakterisierung der Mitoserate (Ki-67) wurden ausschließlich A- und B-Spermatogonien berücksichtigt. Positiv angefärbte meiotische Spermatozyten wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Bei 400-facher Vergrößerung wurde die Gesamtmitoserate je Tier an 100 Tubuli-Querschnitten ermittelt. Zur Bestimmung der Mitoserate im Verlauf des Keimepithelzyklus wurden 5 Tubuli je Stadium auf Ki-67 positive Spermatogonien ausgezählt.

4.4.3. Auswertung und statistische Verfahren

Da es das Ziel dieses Versuches war, die individuelle Wiederaufnahme der Hodenfunktion bei den einzelnen Ebern zu untersuchen, wurde weitestgehend auf statistische Auswertungen der Ergebnisse verzichtet.

Die Werte der unbehandelten Kontrollgruppe wurden jedoch stets als Mittelwerte \pm S.E.M. angegeben.

Die Auswertung der 24h Windows für LH und FSH erfolgte tierindividuell und stützt sich auf den Mittelwert \pm S.E.M. über 24h. Ein Basalniveau wurde aus den 20 niedrigsten Werten über das gesamte Window ermittelt. Ein Puls wurde dann angenommen, wenn mindestens 2 aufeinanderfolgende Werte das Basalniveau \pm 3 x S.D. überschritten. Die Frequenz gibt die Anzahl Pulse über 24h wieder. Die mittlere Amplitudenhöhe der Pulse wurde als mittlere Differenz zwischen den absoluten Werten und dem Basalniveau definiert.

Die Daten der Untersuchung des Keimepithels wurden mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft. Anschließend wurden sie mit Hilfe des

Statistikprogrammes Statistical Package for the Social Sciences (Version 15.0, 2006, SPSS, Chicago, IL, USA) über den T-Test für unabhängige Stichproben geprüft.

Für die angegebenen Signifikanzen gelten folgende Wahrscheinlichkeiten (p) als Grenzwerte:

$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.
$p \leq 0,05$	signifikant	*
$p \leq 0,01$	hoch signifikant	**
$p \leq 0,001$	höchst signifikant	***

5. ERGEBNISSE

Im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit soll vorrangig auf die tierindividuellen Reaktionen unter nachlassendem Immunisierungseffekt eingegangen werden, aber auch auf die jeweiligen Reaktionen, die innerhalb der Versuchsgruppen feststellbar waren.

Tab. 5.1 soll an dieser Stelle zunächst die tierindividuellen Zeitspannen bis zum Erreichen der Wiederaufnahme der Hodenfunktion darlegen. Als Grenzwert für die Wiederaufnahme wurde eine Konzentration von 0,5 ng Testosteron/ml Blutplasma definiert. Nachfolgend werden die Eber der Behandlungsgruppe (V-Tiere, Eber 1-6) stets in der Reihenfolge ihrer Wiederaufnahme gelistet und untereinander sowie mit der Kontrollgruppe (I-Tiere, Eber A-D) verglichen.

Die Spanne bis zum Beginn der tierindividuellen Wiederaufnahme der Hodenfunktion war beträchtlich und reichte von 74 Tagen (Eber 1 – Vino) bis hin zu 170 Tagen (Eber 6 – Viktor) bei gleichem Immunisierungserfolg (siehe Kapitel 5.4.2 GnRH-Antikörpertiter).

Das Einsetzen des Immunisierungseffektes (< 0,5 ng Testosteron/ml Blutplasma) zeigte sich im Vergleich dazu relativ einheitlich mit im Schnitt 5-8 Tagen.

Tab. 5. 1 Tierindividuelles Einsetzen des Immunisierungseffektes und der Wiederaufnahme der Hodenfunktion.

Eber	Zeit nach der 2. Immunisierung (Tage)	
	bis Testosteron < 0.5 ng/ml	bis Testosteron > 0.5 ng/ml
1 Vino	8	74
2 Vico	8	92
3 Vitus	5	107
4 Vinur	8	131
5 Vallenthin	5	158
6 Viktor	8	170

5.1. Blutparameter

5.1.1. GnRH-Antikörpertiter

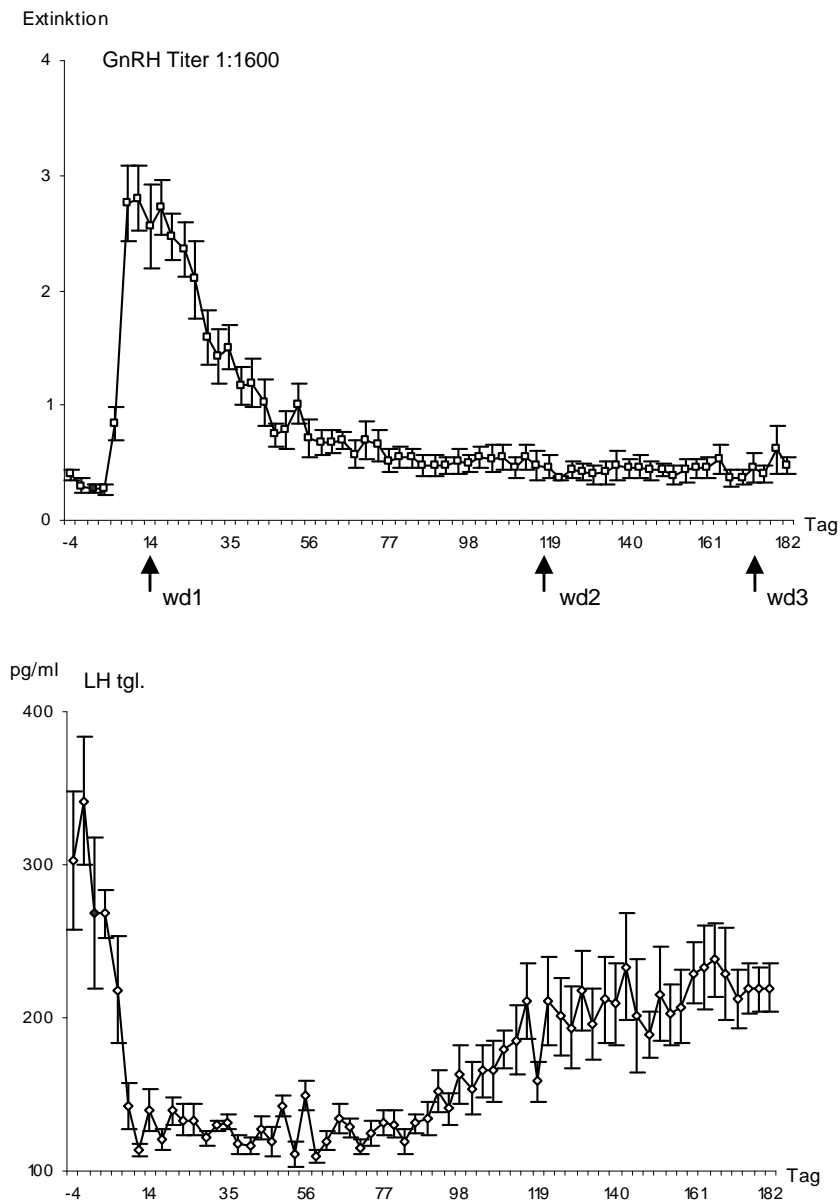


Abb. 5.1 Verlauf des Antikörpertiters (oben) gegen GnRH und entsprechende LH-Konzentrationen (unten) in 6 Ebern (MW \pm S.E.M.) Beginn 4 Tage vor der zweiten Immunisierung (Tag 0) bis Tag 182.

Pfeile geben die Tage der 24h Messungen (wd: window) an. Die Y-Achse für LH beginnt bei der Nachweisgrenze von 100 pg/ml.

Der Verlauf des Antikörpertiters gegen GnRH (Abb. 5.1) zeigte sich wie erwartet: am Tag 5 nach der zweiten Immunisierung (Tag 0) findet sich im Mittel ein deutlicher Anstieg des Titers, maximale Titerwerte wurden zwischen Tag 8 und 11 erreicht.

Danach fällt der Antikörpertiter wieder ab: ein erstes einschneidendes Absinken ist am Tag 50 zu verzeichnen, gefolgt von einem weiteren asymptotischen Abfall bis hin zum Ende des Untersuchungszeitraumes.

Obwohl alle Eber auf die Impfung reagiert haben, unterschieden sich die GnRH Titer (Abb. 5.2 a, b) und die erreichten LH-Level (Abb. 5.3 a, b) deutlich zwischen den einzelnen Tieren.

Betrachtet man die individuellen GnRH Titer der Behandlungsgruppe (Abb. 5.2 a, b) so lassen sich deutliche Unterschiede bezüglich der Titerhöhe, der Dauer der maximal erreichten Werte und der mittleren Antikörperlevel nach den jeweiligen Titermaxima über die Zeit der Wiederaufnahme der Hodenfunktion ablesen, die jedoch keinem klaren Muster innerhalb der „Reihung“ der Wiederaufnahmetiere (s. Tab. 5.1) zu entsprechen scheint.

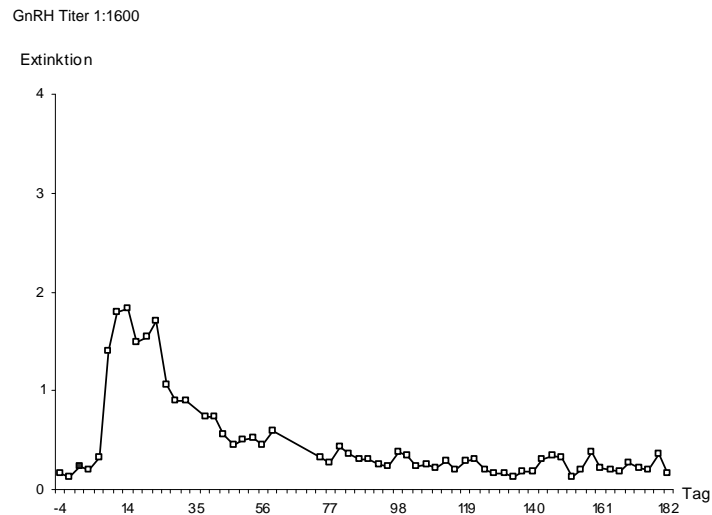
Eber 1 – Vino (Abb. 5.2 a, oben) zeigte eine maximale Titerhöhe mit mittleren Extinktionswerten von 1,55 bis um den Tag 26. Danach wurde lediglich an Tag 35 der Wert von 1,0 überschritten. Bis zum Tag 182 hielt das Tier Werte von 0,37 im Mittel.

Bei Eber 2 – Vico (Abb. 5.2 a, mitte) waren bis um den Tag 53 Werte von 2,22 feststellbar. Am Tag 74 wurde noch einmal eine Extinktion $> 1,0$ erreicht. Bis zum Versuchsende (Tag 182) spielte sich ein Titerlevel bei 0,69 ein.

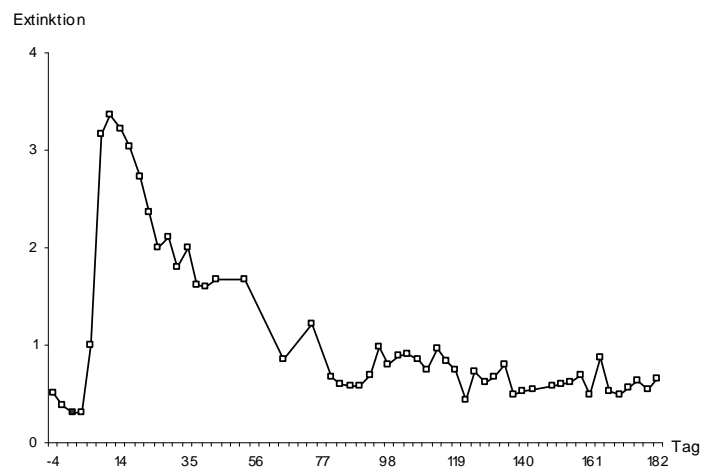
Eber 3 – Vitus (Abb. 5.2 a, unten) hielt wie das erste Wiederaufnahme-Tier Vino bis zum Tag 26 seine maximale Titerhöhe, zeigte jedoch mittlere Extinktionswerte von 2,09 und lag somit genau zwischen den ersten beiden Ebern Vino und Vico.

Eber 4 – Vinur (Abb. 5.2 b, oben) erreichte eine maximale Titerhöhe mit mittleren Extinktionswerten von 2,75 und hielt diese bis um den Tag 44 aufrecht. Danach wurde der Wert von 1,0 nicht mehr überschritten. Bis zum Tag 182 zeigte der Eber Werte von durchschnittlich 0,43.

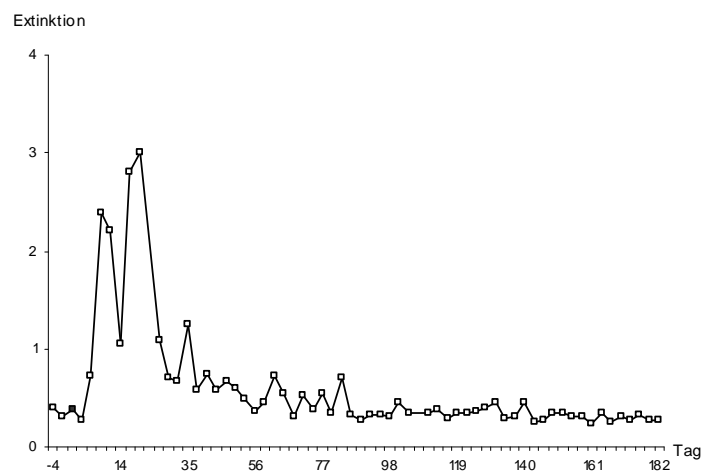
Extinktionswerte von 2,13 waren bis zum Tag 38 beim Eber 5 – Vallenthin (Abb. 5.2 b, mitte) zu verzeichnen. Am Tag 53 wurde erneut der Grenzwert von 1,0 überschritten. Das folgende Titerlevel hielt sich bei Werten um die 0,43 bis zum Tag 182.



Eber 1 - Vino



Eber 2 - Vico

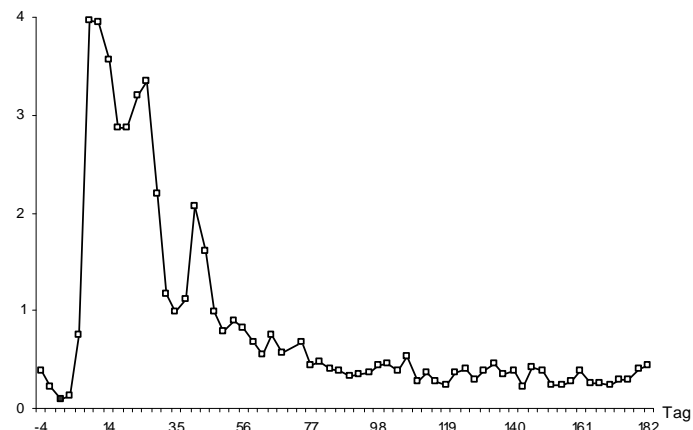


Eber 3 - Vitus

Abb. 5. 2 a Verlauf des Antikörpertiters gegen GnRH in den Ebern 1-3 vier Tage vor der zweiten Immunisierung (Tag 0) bis Tag 182.

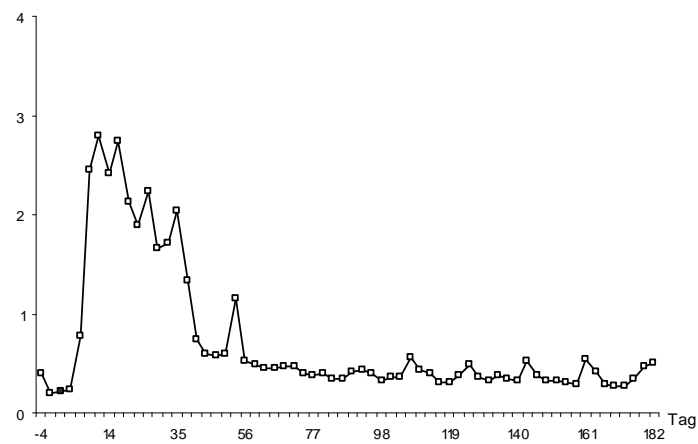
GnRH Titer 1:1600

Extinktion



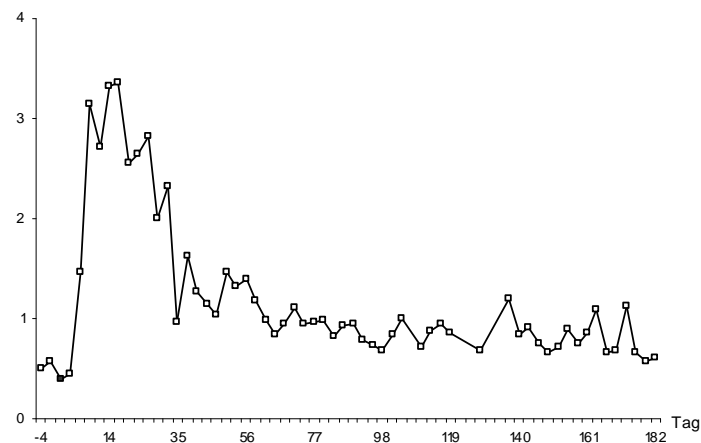
Eber 4 - Vinur

Extinktion



Eber 5 - Vallenthin

Extinktion



Eber 6 - Viktor

Abb. 5.2 b Verlauf des Antikörpertiters gegen GnRH in den Ebern 4-6 vier Tage vor der zweiten Immunisierung (Tag 0) bis Tag 182.

Bis Tag 59 des Versuches hielt Eber 6 – Viktor (Abb. 5.2 b, unten) mit mittleren Extinktionen von 2,02 seine maximalen Antikörperwerte. Nachfolgend wurden an mehreren Tagen Werte $> 1,0$ erreicht (d 71, 104, 137, 164, 173) und der GnRH Titer pendelte sich bis zum Versuchsende (Tag 182) bei Werten um 0,85 ein.

Es konnte also lediglich bei den Ebern 1 und 6 ein Titerverlauf gegen GnRH gefunden werden, der sich in der Zeit bis zur Wiederaufnahme widerspiegelt. Die Tiere dazwischen wiesen kein eindeutiges Muster hierfür auf.

5.1.2. LH

Wie in Kapitel 5.1.1. GnRH-Antikörpertiter beschrieben zeigt sich der Verlauf der LH Konzentrationen gegenläufig zum Titer und anfänglich hohe Werte wurden gefolgt von einem allmählichen Abfall zeitgleich zum Titermaximum um den Tag 5, der sich am Tag 15 stark verdeutlichte (Abb. 5.1).

An Tag 15 wurde das erste 24h Window gefahren. Hiernach bis um den Tag 80 zeigte sich LH kontinuierlich niedrig, um dann langsam wieder anzusteigen. In dieser Phase war der Antikörpertiter stets niedrig.

Wie ebenfalls in Abb. 5.1 dargestellt, fiel die zweite 24h Messung auf das Ende der Hauptanstiegsphase von LH und das dritte 24h Window auf ein LH Level, das vergleichbar zu den unmittelbar vor dem Immunisierungseffekt gemessenen Konzentrationen war.

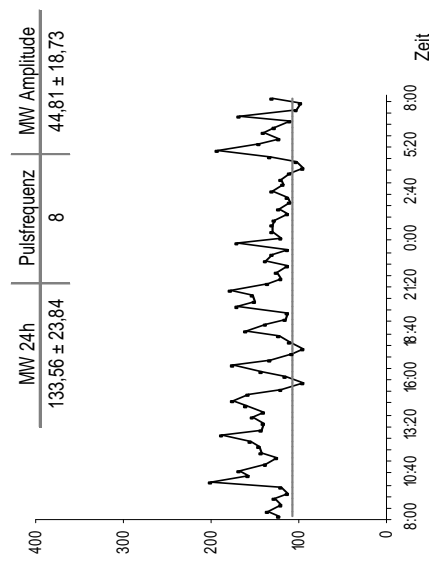
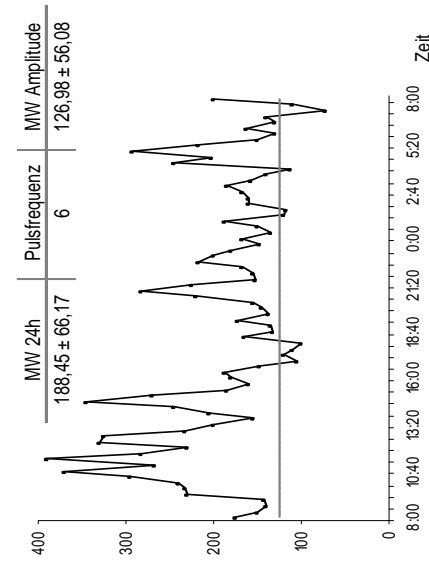
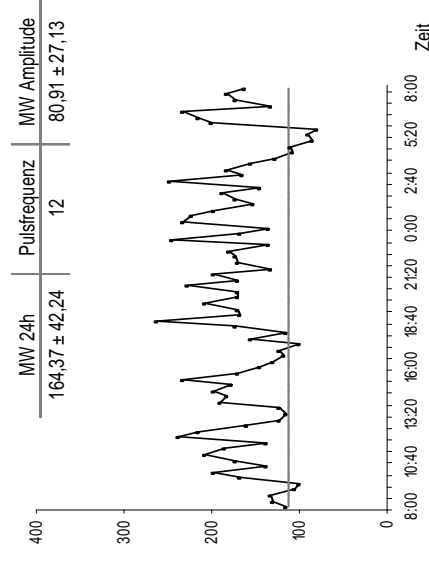
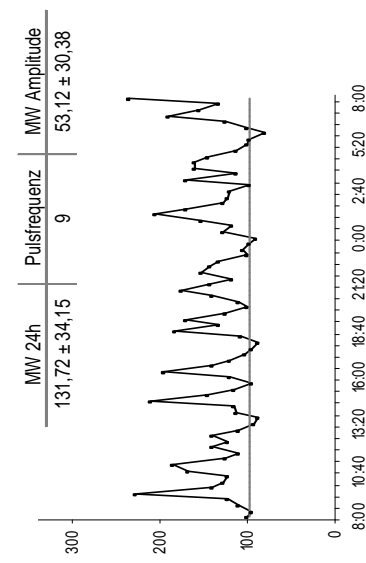
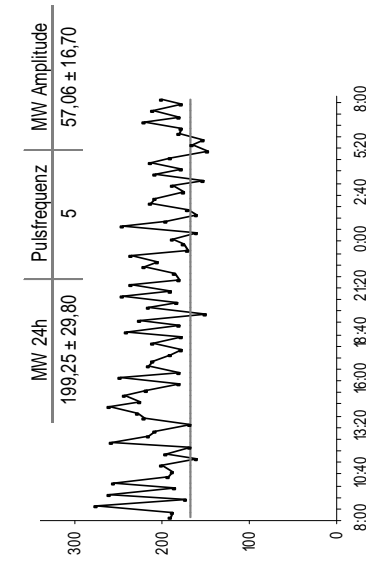
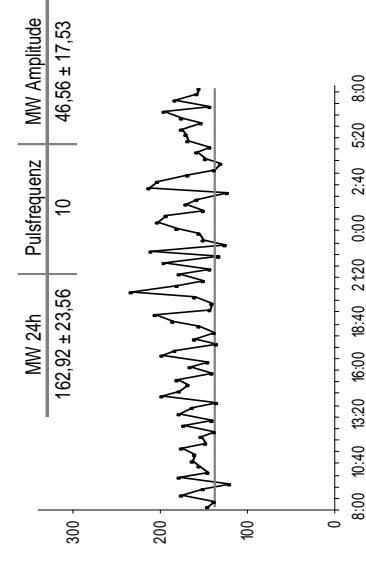
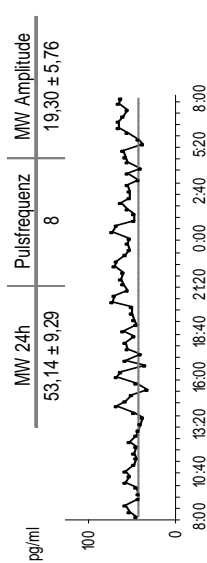
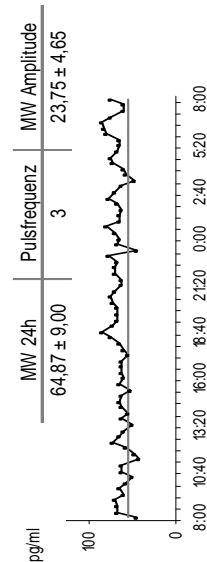
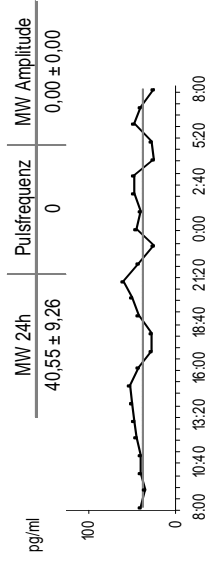
Abb. 5.3 a, b zeigt die tierindividuelle Auswertung der pulsatischen LH Freisetzung während der drei 24h Messungen.

Die durchweg niedrigsten mittleren LH Konzentrationen zeigten alle Eber im ersten 24h Window, als der GnRH Antikörpertiter noch hoch war. Ein Anstieg der LH Konzentrationen war bei allen Tieren im zweiten Window zu verzeichnen. Danach stiegen die mittleren LH Konzentrationen bei nur 2 Ebern weiter an (Eber 4 und 5), welche in Window 2 lediglich einen moderaten Anstieg vorweisen konnten.

Die anderen Tiere erreichten ihr normales LH Level bereits im zweiten Window.

Der Unterschied der mittleren LH Konzentrationen zwischen den 24h Windows spiegelt sich auch in den Veränderungen der mittleren Amplituden wider.

Die Pulsfrequenz lieferte keinen deutlichen Beitrag zu den gesamten Veränderungen der LH Sekretion.

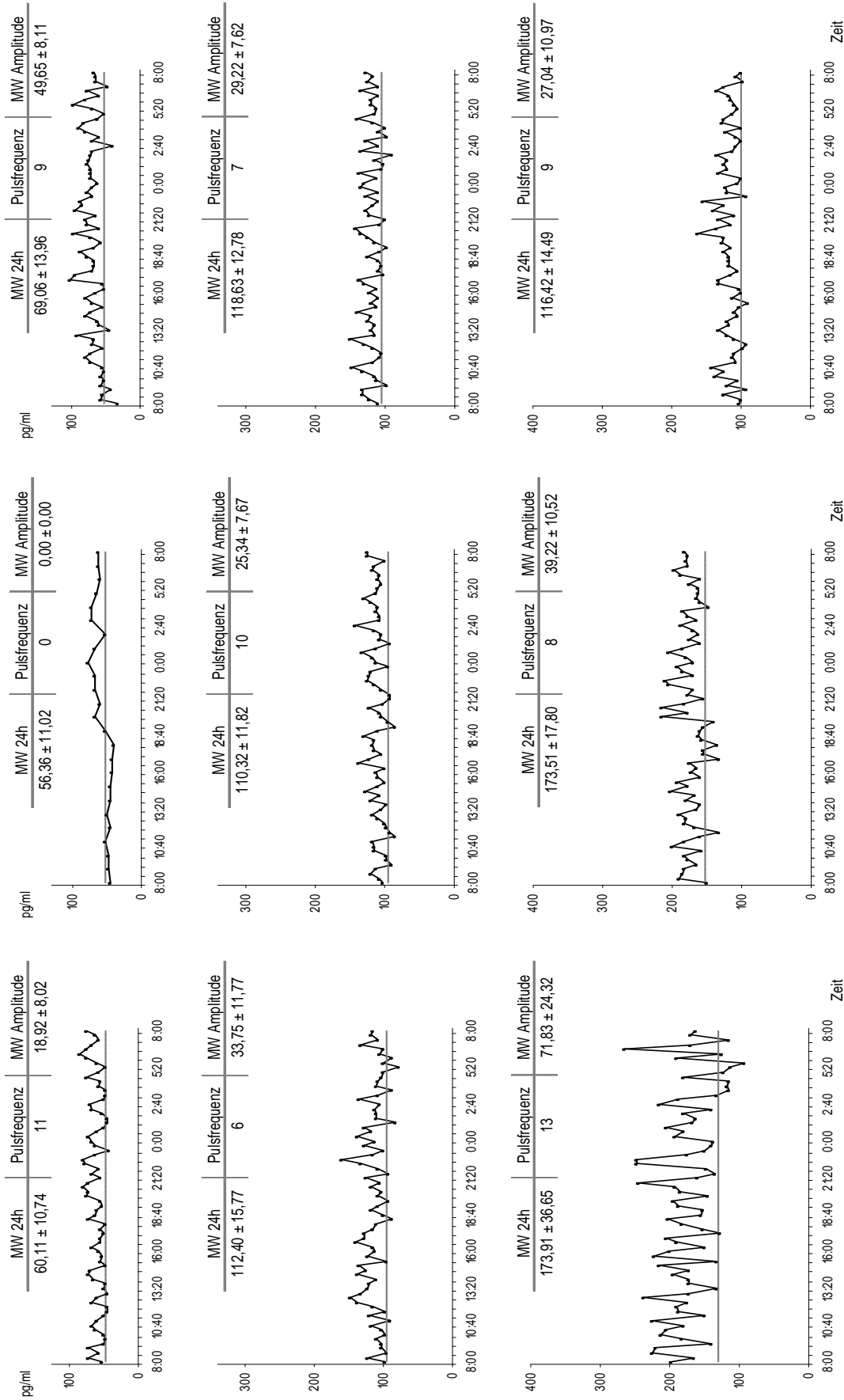


Eber 3 - Vitus

Eber 2 - Vico

Eber 1 - Vito

Abb. 5. 3 a Individuelle Unterschiede in der Pulsatilität von LH in den drei 24h Windows (Vgl. Abb. 5.1) für Eber 1-3. Für jedes Tier ist das erste Window (Tag 15) oben dargestellt, das zweite Window (Tag 119) in der Mitte und das dritte Window (Tag 175) unten. Die genaue Analyse der Pulsatilität wird für das jeweilige Window in einer Tabelle gezeigt. Die horizontale Linie steht für das LH-Basallevel. Die Nummerierung der Tiere entspricht der Reihenfolge der Wiederaufnahme der Leydigzellfunktion (Vgl. Tab. 5.1).



Eber 4 - Vinur

Eber 5 - Vallenthin

Eber 6 - Viktor

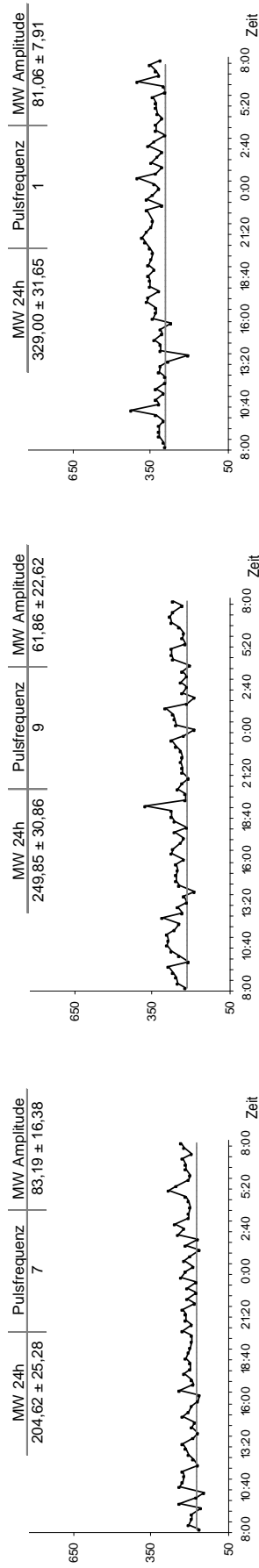
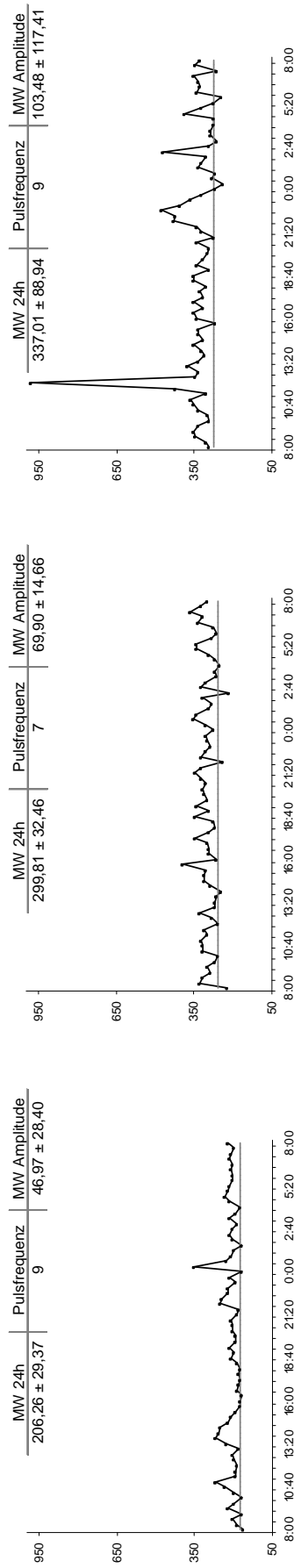
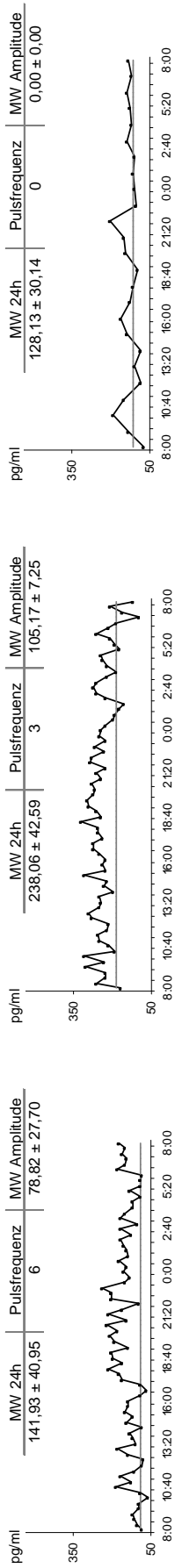
Abb. 5. 3 b Individuelle Unterschiede in der Pulsatilität von LH in den drei 24h Windows (Vgl. Abb. 5. 1) für Eber 4-6. Für jedes Tier ist das erste Window (Tag 15) oben dargestellt, das zweite Window (Tag 119) in der Mitte und das dritte Window (Tag 175) unten. Die genaue Analyse der Pulsatilität wird für das jeweilige Window in einer Tabelle gezeigt. Die horizontale Linie steht für das LH-Basallevel. Die Nummerierung der Tiere entspricht der Reihenfolge der Wiederaufnahme der Leydigzellfunktion (Vgl. Tab. 5. 1).

5.1.3. FSH

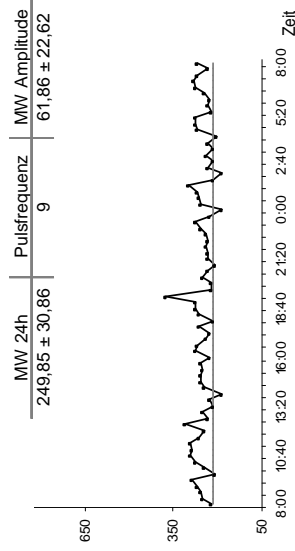
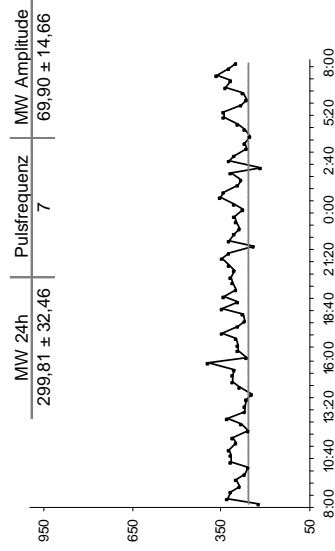
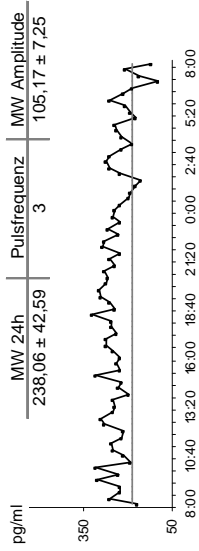
Bei der Auswertung der 24h Windows für FSH (Abb. 5.4 a, b) finden sich durchweg die niedrigsten mittleren FSH Konzentrationen im ersten 24h Window, das zeitlich auf die Phase des höchsten GnRH Antikörpertiters (Tag 15) fällt. Bei Eber 1-3 erhöhen sich die mittleren FSH Konzentrationen im zweiten 24h Window, das zeitlich in die Phase der Wiederaufnahme (Vgl. Tab. 5.1.) der einzelnen Tiere fällt (Tag119). Von Window 2 zu Window 3 fallen die mittleren Hormonkonzentrationen für FSH wieder ab. Bei Eber 4 – Vinur und Eber 5 – Vallenthin erfolgt ebenfalls ein Anstieg der Mittelwerte für FSH über 24h zwischen den ersten beiden Windows, aber auch eine weitere Erhöhung zwischen der zweiten und dritten 24h Messung ist zu verzeichnen. Eber 6 – Viktor zeigt eine deutliche Mittelwertserhöhung von Window 1 zu Window 2, aber einen Werteabfall zu Window 3, das wiederum in die Wiederaufnahmephase der letzten drei Tiere der Behandlungsgruppe fällt (Vgl. Tab. 5.1.).

Bezüglich der pulsatilen Freisetzung von FSH zeigen die Tiere 1-3 eine Erhöhung der Pulsfrequenz zwischen den ersten beiden 24h Messungen, Eber 2 – Vico sogar einen weiteren Anstieg zu Window 3. Eber 4 – Vinur weist zunächst eine Verminderung der Pulsfrequenz auf, die sich dann zwischen den letzten beiden Windows wieder erhöht. Eber 5 – Vallenthin und Eber 6 – Viktor steigern ihre Pulsatilität stets zwischen den 24h Messungen.

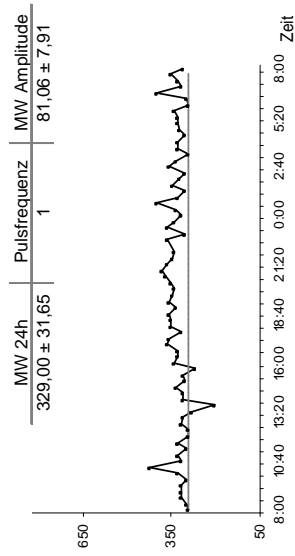
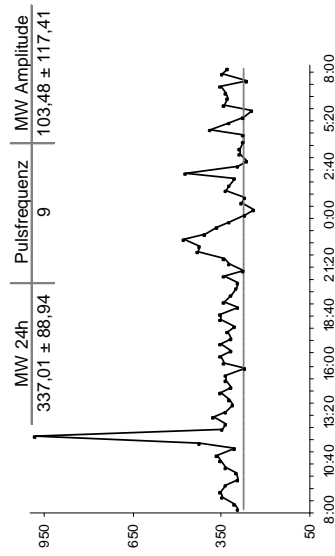
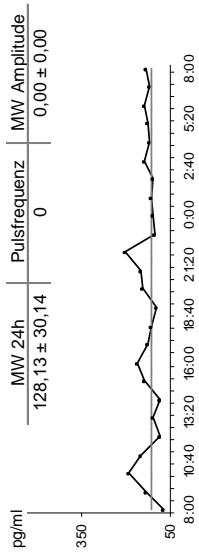
Bei der Betrachtung der mittleren Amplitudenhöhen der FSH Pulse fallen Eber 1 – Vico und Eber 4 – Vinur durch einen Anstieg zwischen den ersten beiden und durch eine Verminderung zwischen den letzten beiden Windows auf. Eber 3 – Vitus und Eber 6 – Viktor verhalten sich genau gegensätzlich. Die Pulsamplituden von Eber 2 – Vico verringern sich zwischen den einzelnen 24h Windows. Eber 5 – Vallenthin fällt durch eine kontinuierliche Erhöhung der Amplituden für FSH auf.



Eber 1 - Vino

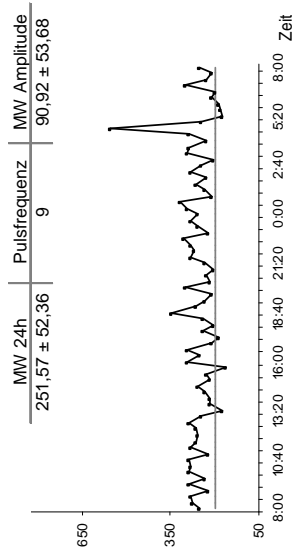
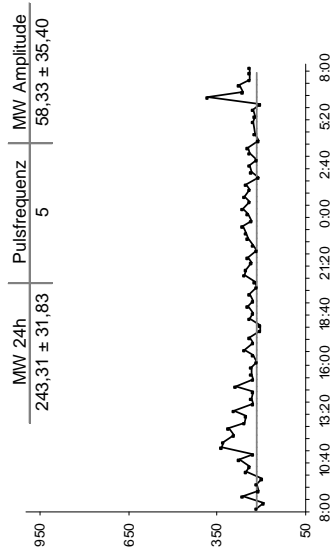
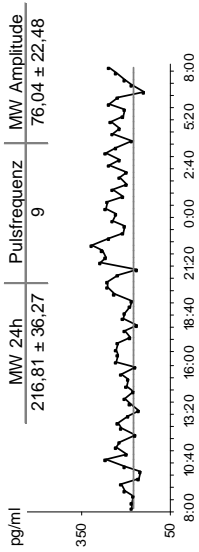


Eber 2 - Vico

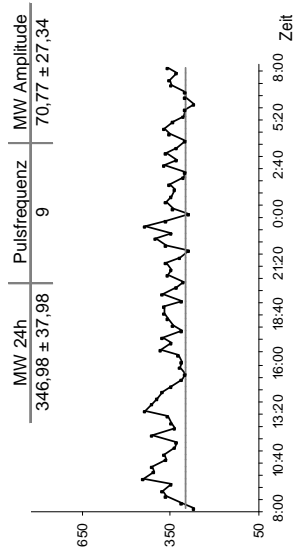
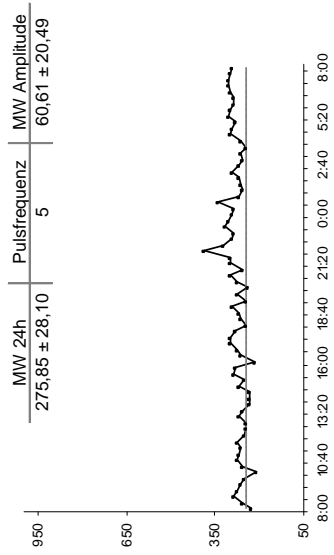
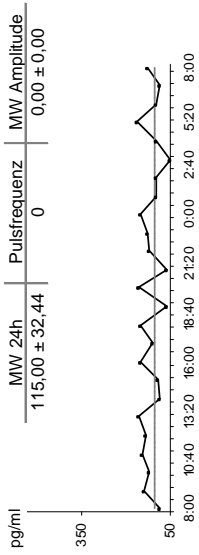


Eber 3 - Vito

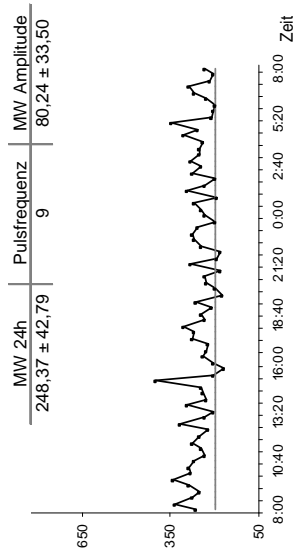
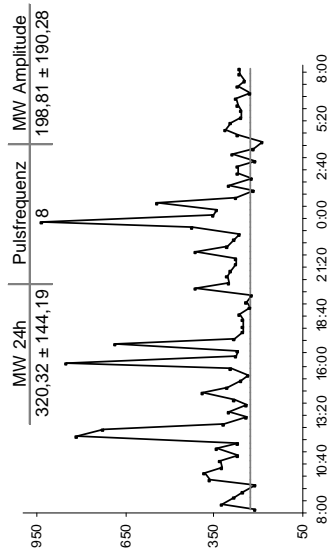
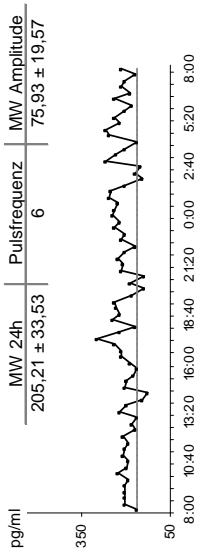
Abb. 5. 4 a Individuelle Unterschiede in der Pulsatilität von FSH in den drei 24h Windows (Vgl. Abb. 5.1) für Eber 1-3. Für jedes Tier ist das erste Window (Tag 15) oben dargestellt, das zweite Window (Tag 119) in der Mitte und das dritte Window (Tag 175) unten. Die genaue Analyse der Pulsatilität wird für das jeweilige Window in einer Tabelle gezeigt. Die horizontale Linie steht für das FSH-Basallevel. Die Nummerierung der Tiere entspricht der Reihenfolge der Wiederaufnahme (Vgl. Tab. 5.1).



Eber 4 - Vinur



Eber 5 - Vallenthin



Eber 6 - Viktor

Abb. 5. 4 b Individuelle Unterschiede in der Pulsatilität von FSH in den drei 24h Windows (Vgl. Abb. 5.1) für Eber 4-6. Für jedes Tier ist das erste Window (Tag 15) oben dargestellt, das zweite Window (Tag 119) in der Mitte und das dritte Window (Tag 175) unten. Die genaue Analyse der Pulsatilität wird für das jeweilige Window in einer Tabelle gezeigt. Die horizontale Linie steht für das FSH-Basallevel. Die Nummerierung der Tiere entspricht der Reihenfolge der Wiederaufnahme (Vgl. Tab. 5.1).

5.1.4. Testosteron

Weil LH das Schlüsselhormon für die Funktion der Leydigzellen ist und somit der Testosteron-Synthese, kann Testosteron als objektiver Parameter für die Wiederaufnahme der Leydigzellfunktion angesehen werden.

Basierend auf den minimalen Testosteronkonzentrationen zwischen Tag 15 und 60, welche Werte von 0,3 ng Testosteron/ml Blutplasma nicht überschritten, wurde 0,5 ng Testosteron/ml Blutplasma als Grenzwert für die Wiederaufnahme der Hodenfunktion definiert.

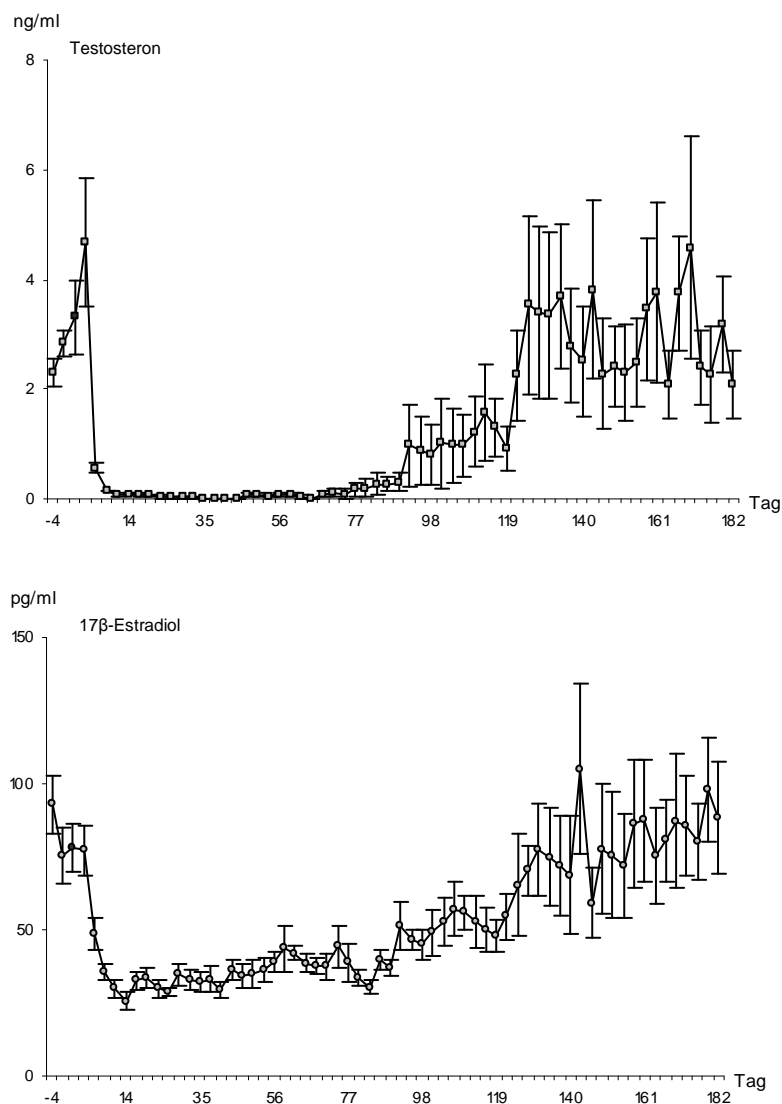


Abb. 5.5 Verlauf der anabolen Hormone Testosteron und 17β-Estradiol von Tag -4 bis Tag 182 in sechs Ebern (MW ± S.E.M.).

Tag 0 = Tag der zweiten Immunisierung.

In Abb 5.5. sind die mittleren Testosteron Konzentrationen dargestellt.

Sie lässt einen plötzlichen Abfall der Testosteron-Konzentrationen nach der zweiten Immunisierung mit dem tiefsten Punkt an Hormonkonzentrationen um den Tag 60 erkennen, gefolgt von einem graduellen Anstieg.

Der extreme Unterschied der Testosteronkonzentrationen ist durch die starken individuellen Muster in der Wiederaufnahme der Hodenfunktion erklärbar (Vgl. Tab. 5.1. und Abb. 5.6 a, b).

Während das Einsetzen des Immunisierungseffektes sehr einheitlich ablief und somit die Testosteronsynthese bei allen Tieren um den Tag 8 blockiert war, unterschied sich die Wiederaufnahme der physiologischen Leydigzellfunktion extrem: ein Tier (Eber 1 – Vino) nahm die Steroidogenese bereits 10 Wochen nach der zweiten Immunisierung wieder auf, aber ein anderes (Eber 6 – Viktor) erst mit 24 Wochen (Vgl. Tab. 5.1). Im Mittel wurde die Hodenfunktion nach 17 Wochen wieder aufgenommen (Testosteron > 0,5 ng/ml Blutplasma).

Wie ebenfalls in Abb. 5.5 dargestellt, zeigte 17 β -Estradiol ein ähnliches Muster der Steroidsynthese – verglichen mit dem Verlauf von Testosteron.

Betrachtet man die individuellen Testosteronkonzentrationen der Behandlungsgruppe (Abb. 5.6 a, b) so lassen sich deutliche Unterschiede bezüglich der Zeitspannen bis zur Wiederaufnahme der Hodenfunktion feststellen.

Eber 1 – Vino (Abb. 5.6 a) hatte an Tag 2 nach der zweiten Immunisierung noch Testosteronwerte von 6,8 ng/ml. Ab Tag 8 war der Immunisierungseffekt deutlich zu erkennen. An Tag 74 nahm er als erstes Tier der Behandlungsgruppe seine Hodenfunktion wieder auf und erreichte am Tag 161 ein Maximum von 12,1 ng Testosteron/ml Blutplasma. Bei den täglichen Messungen der letzten Versuchsetappe (Abb. 5.6 a, oben rechts) waren keine weiteren Maximalwerte zwischen den dreitägigen Messungen zu verzeichnen. An Tag 179 erreichte das Tier einen Testosteronwert von 6,9 ng/ml, der mit jenen vor Eintritt des Immunisierungseffektes (Tag 2) vergleichbar war.

Bei Eber 2 – Vico (Abb. 5.6 a, mitte) war an Tag 2 lediglich ein Testosteronwert von 2,8 ng/ml zu verzeichnen, bevor mit dem Tag 8 die Immunisierung wirksam wurde. 78 Tage nach der Wiederaufnahme (Tag 92) erreichte der Eber sein Maximum von 15,1 ng Testosteron/ml Blutplasma. Bei der Darstellung der täglichen Messun-

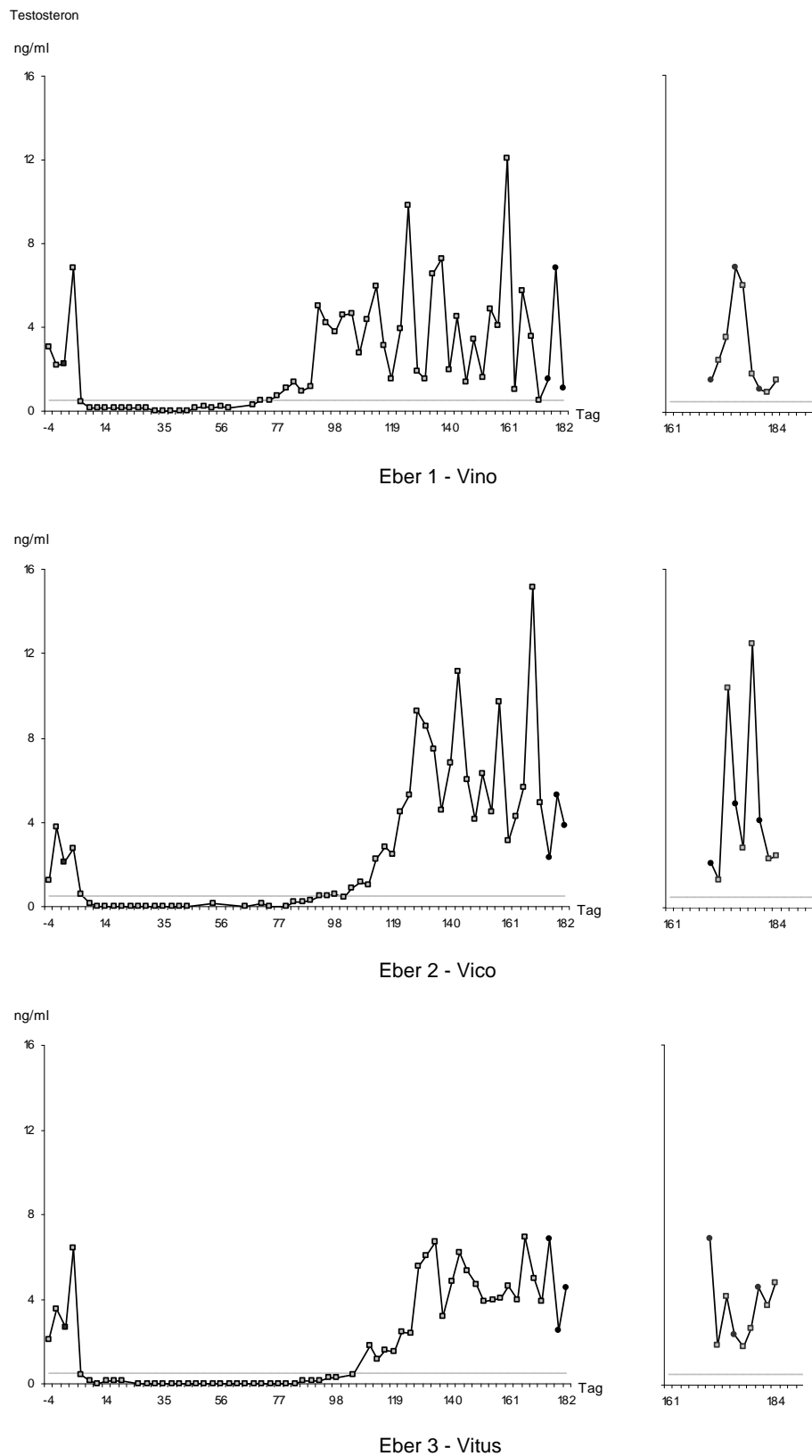


Abb. 5. 6 a Individueller Verlauf von Testosteron in den Ebern 1-3.

Links: Tag -4 bis Tag 182, Werte im dreitägigen Abstand, Tag 0 = Tag der zweiten Immunisierung.

Rechts: Tag 176 bis Tag 184, Werte täglich.

Die horizontale Linie kennzeichnet den Grenzwert von 0,5 ng Testosteron/ml Blutplasma.

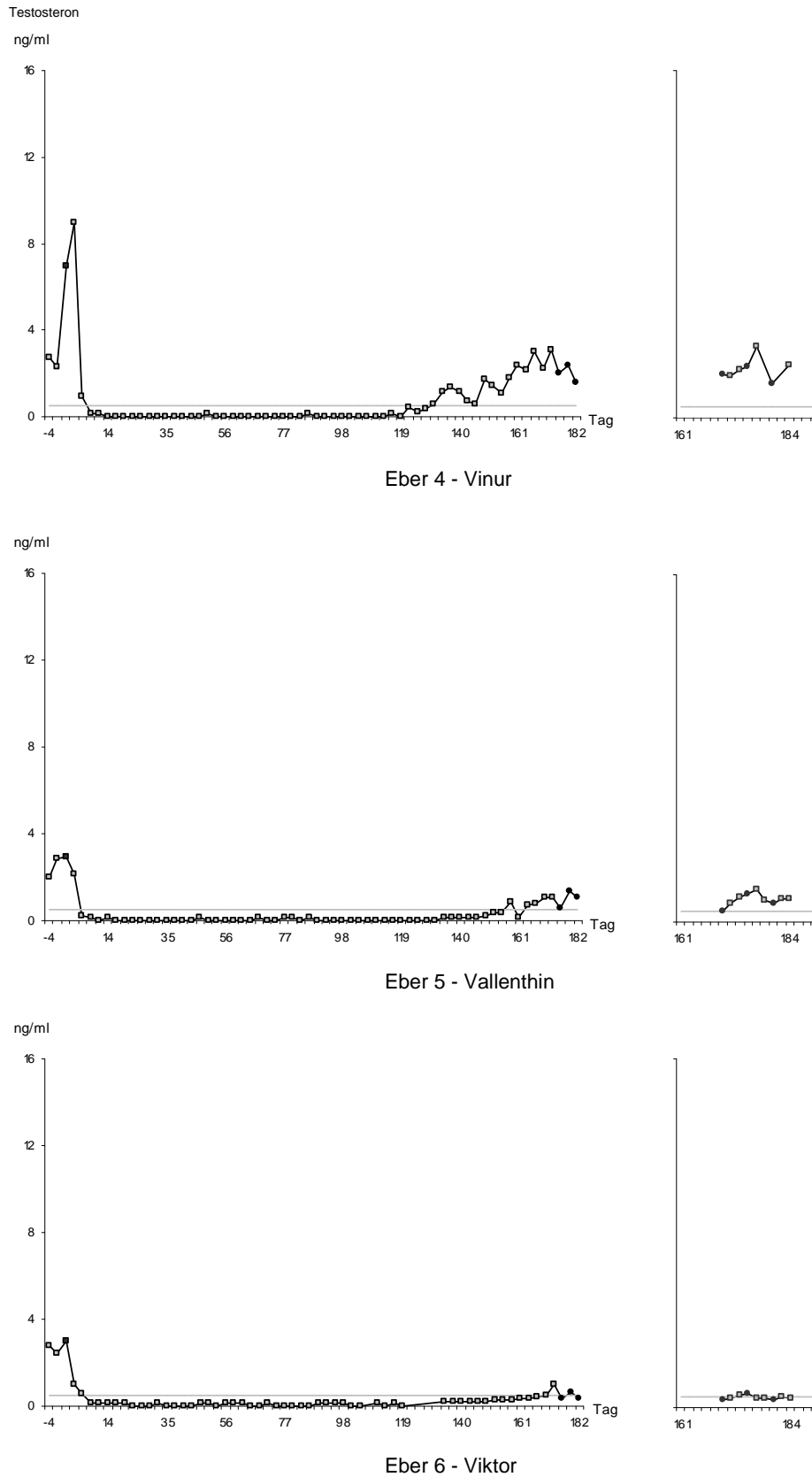


Abb. 5. 6 b Individueller Verlauf von Testosteron in den Ebern 4-6.

Links: Tag -4 bis Tag 182, Werte im dreitägigen Abstand, Tag 0 = Tag der zweiten Immunisierung.

Rechts: Tag 176 bis Tag 184, Werte täglich.

Die horizontale Linie kennzeichnet den Grenzwert von 0,5 ng Testosteron/ml Blutplasma.

gen (Abb. 5.6 a, mitte rechts) zeigen sich weiterhin hohe Testosteronkonzentrationen (Tag 178 10,4 ng/ml; Tag 181 12,4 ng/ml) im Vergleich zum dreitägigen Messintervall. Alle Maximalwerte nach der Wiederaufnahme der Hodenfunktion liegen deutlich über den Werten vor Eintritt des Immunisierungseffektes.

Ein Testosteronmaximum von 6,4 ng/ml an Tag 2 nach der zweiten Immunisierung konnte bei Eber 3 – Vitus (Abb. 5.6 a, unten) gemessen werden. Der Immunisierungseffekt hielt von Tag 5 bis Tag 106 an. In dieser Zeit waren keine Werte > 0,5 ng Testosteron/ml Blutplasma zu verzeichnen. Nach 60 Tagen stieg Testosteron wieder auf Werte vergleichbar Tag 2 an (Tag 167 6,9 ng/ml). Im täglichen Messintervall (Abb. 5.6 a, unten rechts) konnten keine weiteren Maximalwerte gemessen werden (Tag 176 6,9 ng/ml).

Eber 4 – Vinur (Abb. 5.6 b, oben) erreichte an Tag 173 – 42 Tage nach der Wiederaufnahme der Hodenfunktion (Tag 131) – einen Testosteronwert von 3,1 ng/ml, der deutlich unter den Werten vor Eintritt des Immunisierungseffektes (Tag 2 8,9 ng/ml) liegt. Bei der Darstellung der täglichen Messungen (Abb. 5.6 a, oben rechts) erreichte das Tier weitere höhere Testosteronkonzentrationen (Tag 180 3,3 ng/ml; Tag 184 2,4 ng/ml).

Das Maximum von Eber 5 – Vallenthin (Abb. 5.6 b, mitte) nach der Wiederaufnahme der Steroidogenese (Tag 158) lag mit 1,4 ng Testosteron/ml Blutplasma fast um die Hälfte unter dem Wert vor Eintritt des Immunisierungseffektes (Tag 2 2,2 ng/ml). Auch zwischen dem dreitägigen Messintervall (Abb. 5.6 a, mitte rechts) waren keine weiteren Maxima zu verzeichnen (Tag 180 1,5 ng/ml).

Eber 6 – Viktor (Abb. 5.6 b, unten) zeigte vor Eintritt des Immunisierungseffektes das niedrigste Testosteronlevel (Tag 2 1,0 ng/ml), welches er nach der Wiederaufnahme der Leydigzellfunktion (Tag 170) nicht übertreffen konnte (Tag 173 1,0 ng/ml). Auch bei den täglichen Messungen in der letzten Versuchsetappe konnten keine bedeutenden Maxima gemessen werden (Abb. 5.6 a, unten rechts).

5.1.5. Östrogene

Der Verlauf der Estradiolkonzentrationen (Abb. 5.5 unten) ähnelt dem von Testosteron sehr stark, jedoch konnte kein so drastisches Absinken des Basalniveaus beobachtet werden. Am Tag 14 war der tiefste Wert mit 25,1 pg/ml zu verzeichnen. Im Vergleich zum Testosteron war der Wiederanstieg der Östrogenkonzentrationen weniger ausgeprägt: an Tag 74 konnten mit der Wiederaufnahme der Hodenfunktion des Tieres Vino 42,8 pg 17 β -Estradiol/ml Blutplasma gemessen werden, gefolgt von einem leichten Einbruch der Verlaufskurve vor einem weiteren Anstieg der Werte. Die große Streuung der Konzentrationen lässt sich durch die starke Variation in der Wiederaufnahme der Hodenfunktion bei den einzelnen Tieren erklären.

Die Auswertung der tierindividuellen Verlaufskurven von 17 β -Estradiol ergab ähnliche Profile:

Eber 1 – Vino (Abb. 5.7 a, oben) als frühester Eber der Behandlungsgruppe zeigte an Tag 2 eine 17 β -Estradiolkonzentration von 68,2 pg/ml, die weiter abfiel bis zum Tag 14, von da an pendelte sich ein mittleres Basalniveau von 27,3 pg/ml bis zum Tag 56 ein. An Tag 59 – zwei Wochen vor der Wiederaufnahme – wurde ein erster Maximalwert von 75,7 pg/ml gemessen. An Tag 77 folgte ein Werteeinbruch von 32,8 pg/ml mit nachfolgend tiefsten Werten von 19,3 pg/ml am Tag 83. Danach stiegen die Werte wieder stetig an (Tag 92 74,3 pg/ml). Das Maximum der 17 β -Estradiolverlaufskurve fiel auf den Tag 161 mit einem Wert von 176,1 pg/ml – zeitgleich zum Testosteronmaximum (Tag 161 12,1 ng/ml).

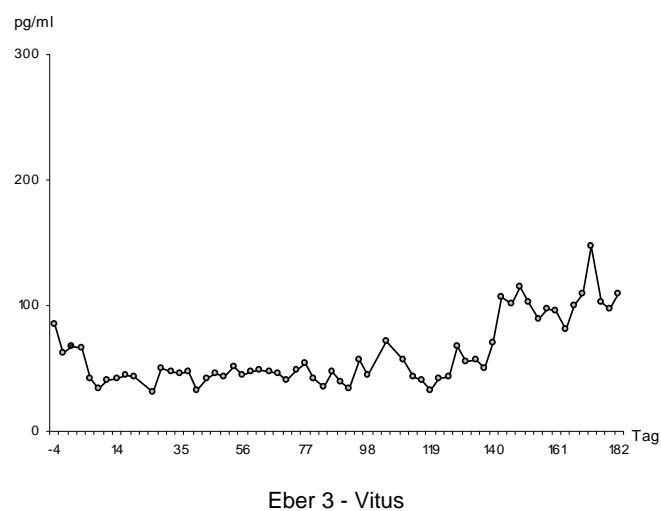
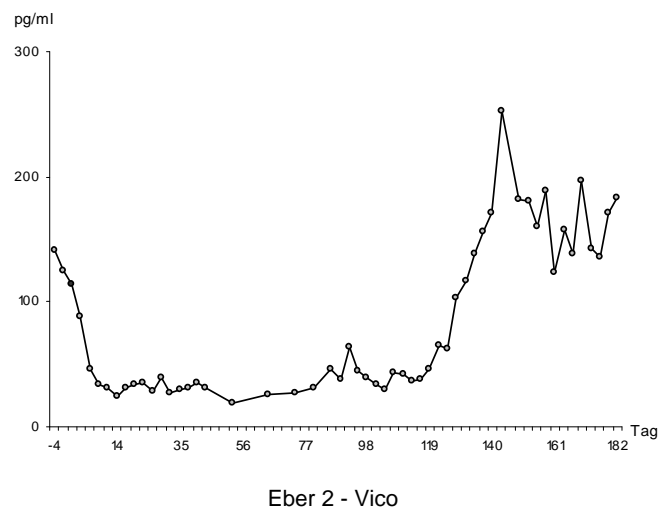
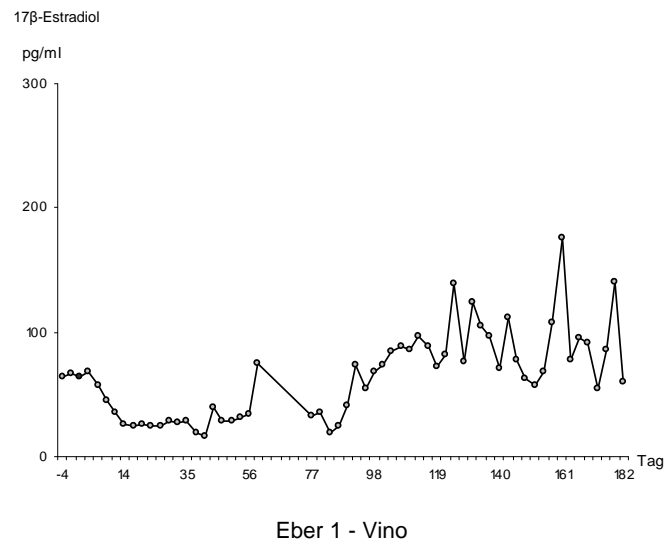


Abb. 5. 7 a Individueller Verlauf von 17 β -Estradiol in den Ebern 1-3 von Tag -4 bis Tag 182.

Tag 0 = Tag der zweiten Immunisierung.

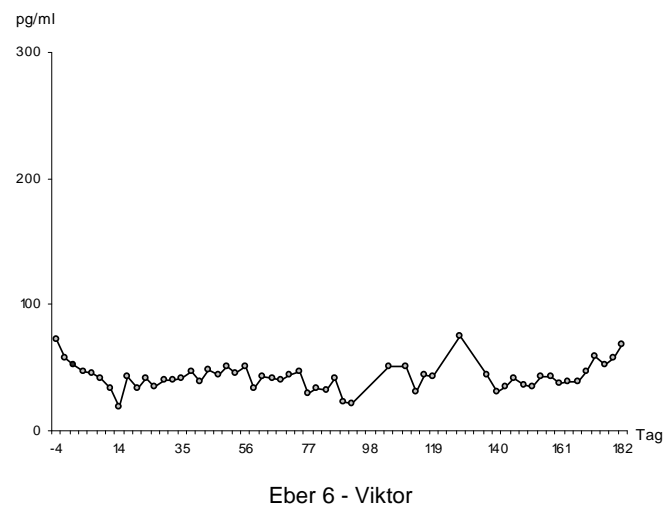
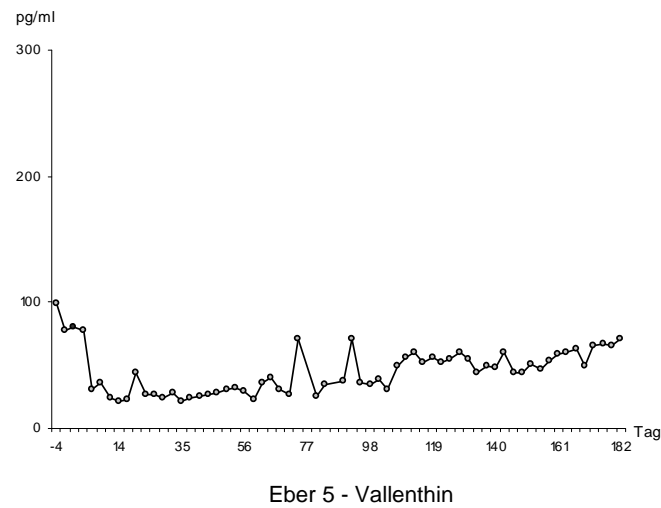
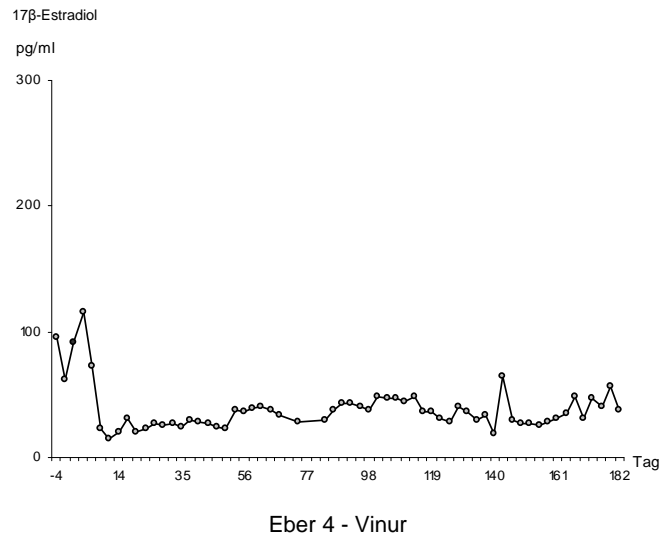


Abb. 5. 7 b Individueller Verlauf von 17 β -Estradiol in den Ebern 4-6 von Tag -4 bis Tag 182.

Tag 0 = Tag der zweiten Immunisierung.

Bei Eber 2 – Vico (Abb. 5.7 a, mitte) konnte ein beispielhafter 17β -Estradiolverlauf mit deutlichem Abfall und Wiederanstieg der Hormonkonzentrationen gemessen werden. Auf 87,9 pg/ml an Tag 2 folgte ein einheitliches Basalniveau mit mittleren 17β -Estradiolkonzentrationen von 31,6 pg/ml (Tag 8 bis Tag 89). Mit der Wiederaufnahme der Hodenfunktion am Tag 92 war ein erster Anstieg zu verzeichnen (64,0pg 17β -Estradiol/ml Blutplasma), gefolgt von einem kleineren Einbruch in der Verlaufskurve. Ab Tag 122 erfolgte dann der kontinuierliche Anstieg. An Tag 143 war das absolute Maximum mit 252,8 pg/ml zu verzeichnen, siebenundzwanzig Tage später zeigte sich ein weiterer Gipfelwert von 196,7 pg/ml zeitgleich zum Testosteronmaximum (Tag 170 15,1 ng/ml).

Einen relativ moderaten Verlauf an 17β -Estradiolkonzentrationen konnte bei Eber 3 – Vitus (Abb. 5.7 a, unten) festgestellt werden. Auf Tag 2 mit 66,5 pg 17β -Estradiol/ml Blutplasma folgte ein recht hohes Basalniveau mit Konzentrationen um 43,9 pg/ml (Tag 5 bis Tag 98). Ein erster Peak war an Tag 104 zu messen (71,3 pg/ml) gefolgt von einem kleinen Werteeinbruch um die Wiederaufnahme bis zum Tag 110 (56,6 pg/ml). Ein zweiter Peak fiel auf den Tag 128 mit einem Wert von 67,0 pg/ml. Ab Tag 140 (70,1 pg/ml) war der kontinuierliche Anstieg der Hormonkonzentrationen zu verzeichnen. Am Tag des Testosterongipfels waren lediglich 100,3 pg 17β -Estradiol/ml Blutplasma zu messen; das Maximum fiel auf den Tag 173 (146,9 pg/ml).

Eber 4 – Vinur (Abb. 5.7 b, oben) lieferte einen sehr klaren Östrogenverlauf mit einem geringen Anstieg unter der Wiederaufnahme der Hodenfunktion. An Tag 2 nach der zweiten Immunisierung konnte ein sehr hoher Wert gemessen werden (116,1 pg/ml), was sich auch in der Testosteronkurve dieses Tieres wiederfindet. Anhand der Verlaufskurve lassen sich vier mittlere Niveaustufen ablesen: Tag 8 bis Tag 50 mit Werten um die 24,5 pg/ml, Tag 53 bis Tag 98 im Mittel bei 37,4 pg/ml, Tag 101 bis Tag 113 stieg auf 47,0 pg/ml und an den Tagen 116 bis 137 fielen die Werte wieder auf 34,0 pg/ml ab. Auf einen Werteeinbruch an Tag 140 (19,5 pg/ml) folgte das Maximum mit 64,8 pg/ml (Tag 143). Hiernach gestaltete sich der kontinuierliche Anstieg gemäßigt. Sechs Tage nach dem Testosteronmaximum (Tag 173 3,1 ng/ml) peakte die Verlaufskurve erneut am Tag 179 mit einem Wert von 56,9 pg/ml.

Bei Eber 5 – Vallenthin (Abb. 5.7 b, mitte) gestaltet sich der Verlauf von 17β -Estradiol recht einheitlich. Auf Tag 2 (77,2 pg/ml) folgt ein Basalniveau mit mittleren Östrogen-

konzentrationen von 28,6 pg/ml (Tag 5 bis Tag 71), das von zwei Maxima unterbrochen wird (Tag 74 71,6 pg/ml; Tag 92 70,3 pg/ml). Ab Tag 107 des Experimentes erhöht sich das Niveau auf im Mittel 52,3 pg/ml (Tag 107 bis Tag 158). Ab Tag 161 (59,5 pg/ml) erfolgte der stetige Anstieg.

Auch Eber 6 – Viktor (Abb. 5.7 b, unten) lieferte eine sehr einheitliche Verlaufskurve von 17 β -Estradiol. Nach der zweiten Immunisierung stellt sich ein mittleres Niveau von 39,0 pg/ml ein (Tag 5 bis Tag 92), welches an Tag 104 mit einem Wert von 51,0 pg/ml angehoben wird, um an Tag 128 in einem einmaligen Werteanstieg auf 75,1 pg/ml zu gipfeln. Danach flaut der Hormonverlauf wieder ab. Am Tag der Wiederaufnahme der Hodenfunktion (Tag 170) erreicht das Tier einen Wert von 46,6 pg/ml. Am Tag 173 – dem Tag des Testosteronpeaks – erhöht sich die Blutplasmakonzentration auf 59,1 pg/ml. Hierauf folgt ein stetiger aber moderater Anstieg des 17 β -Estradiols bis zu 68,3 pg/ml am Tag 182 des Versuches.

5.1.6. Androstenon

Die Konzentrationen von Androstenon im Blutplasma sind in Abb. 5.8 dargestellt. Androstenon zeigte denselben Verlauf wie auch die anderen Hodensteroide: hohe Konzentrationen vor der Inhibierung der Leydigzellfunktion und erneut hohe Konzentrationen nach dem Abfall der GnRH-Antikörpertiter.

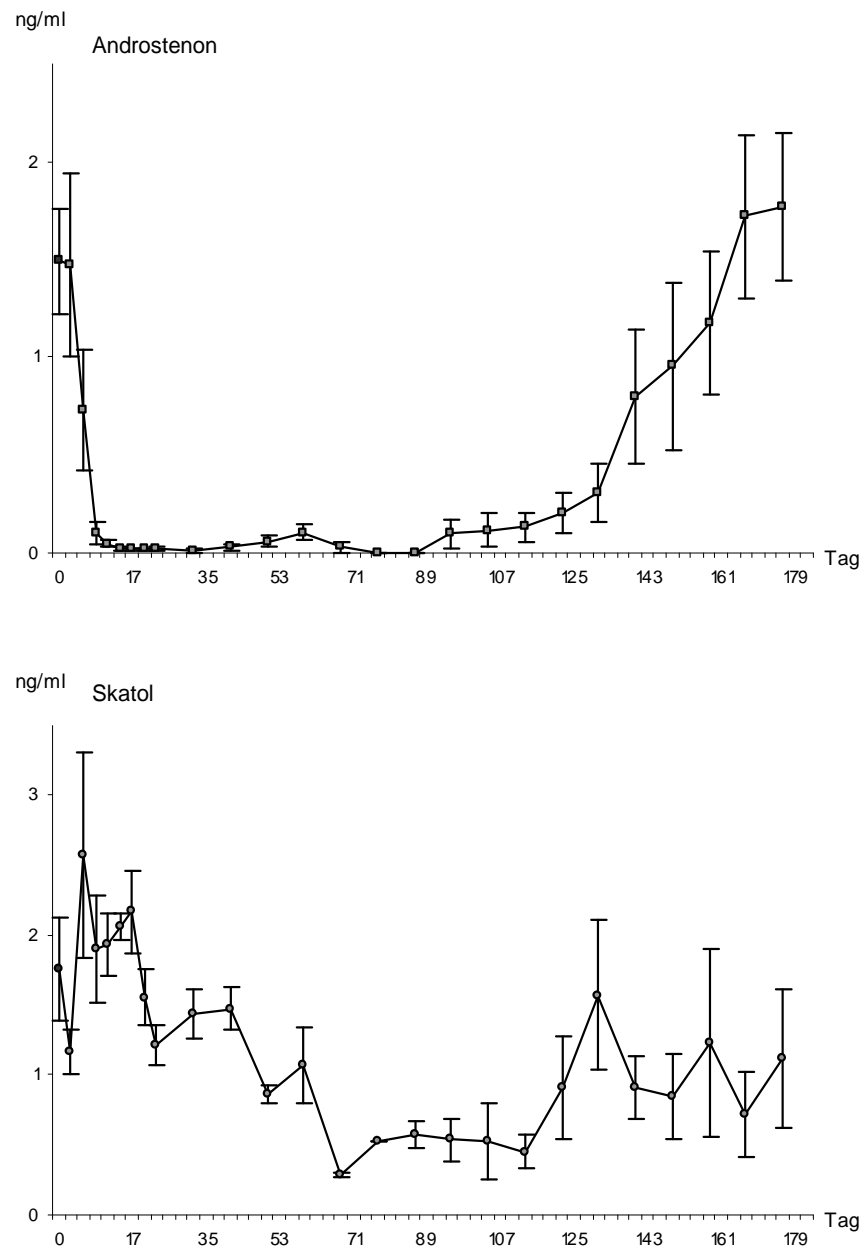


Abb. 5. 8 Verlauf von Androstenon und Skatol im Blutplasma der Behandlungsgruppe (n=6, MW \pm S.E.M.) von Tag 0 (zweite Immunisierung) bis Tag 176.

Im Fettgewebe (Tab. 5.2) konnten Konzentrationen oberhalb des EU Grenzwertes von 0,5 µg Androstenon/g Fett in den drei Ebern gemessen werden, die ihre Hodenfunktion vergleichsweise früh aufgenommen hatten. Sie zeigten auch erhöhte Androstenonkonzentrationen im Blutplasma (Abb. 5.10 a, b). Während die beiden Eber 4 – Vinur und Eber 5 – Vallenthin bereits tendenziell höhere Androstenonkonzentrationen im Blut aufwiesen, bewegte sich der Gehalt an Androstenon im Fettgewebe noch unterhalb des von der EU festgelegten Grenzwertes.

Tab. 5. 2 Konzentrationen von Androstenon und Skatol im Rückenfett am Versuchsende (Tag 184) und im Blutplasma (Tag 158-176).

Eber	Androstenon		Skatol	
	Rückenfett (µg/g)	Blutplasma (ng/ml)	Rückenfett (ng/g)	Blutplasma (ng/ml)
1 Vino	0.58	1.93	21.29	1.46
2 Vico	1.21	2.93	143.01	1.38
3 Vitus	0.62	1.71	5.52	2.16
4 Vinur	0.06	1.26	14.86	0.27
5 Vallenthin	0.06	1.49	4.98	0.38
6 Viktor	0.07	0.00	5.28	0.51

Im Vergleich mit den Androstenonwerten im Rückenfett der intakten Eber A-D der Kontrollgruppe (Abb. 5.9) lässt sich ablesen, dass sich die Eber 1-3 einem physiologischen Eberniveau annähern bzw. ein solches bereits erreicht haben.

Die Kontrollgruppe lag stets über dem EU Grenzwert von 0,5 µg Androstenon/g Fett.

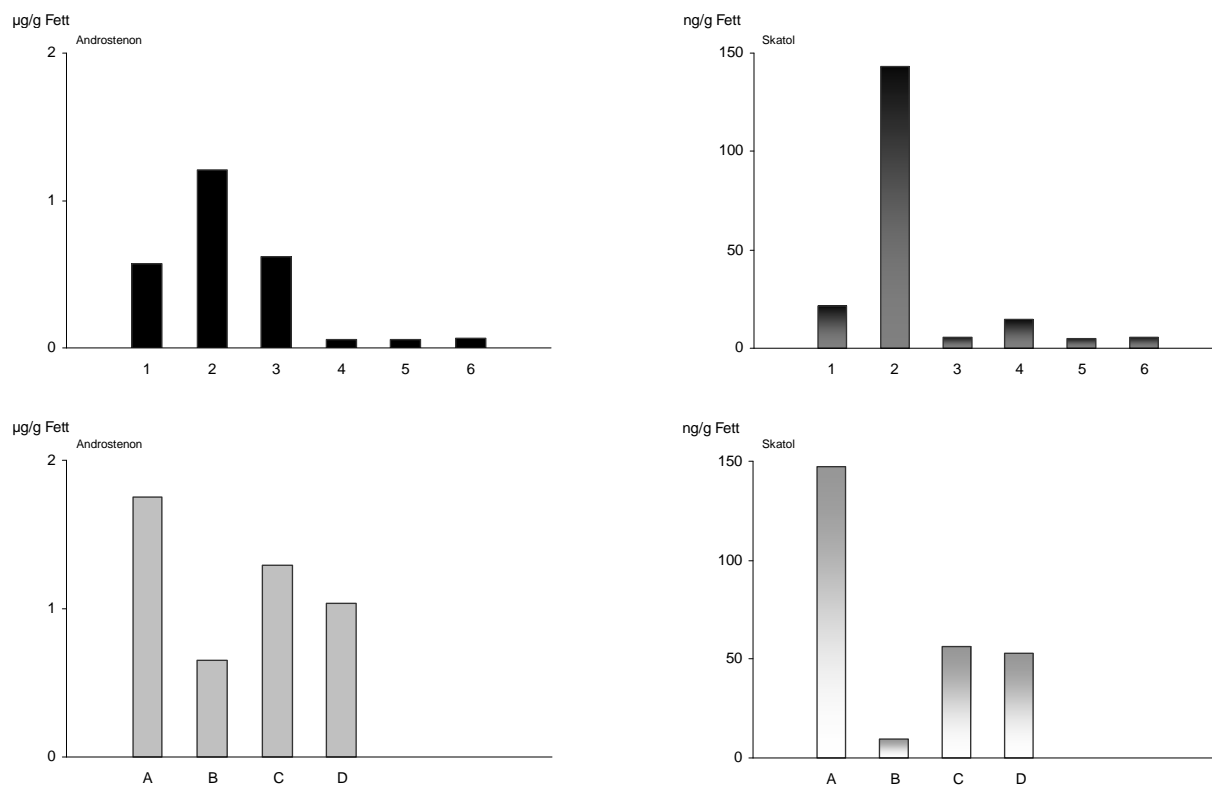


Abb. 5.9 Konzentrationen von Androstenon (links) und Skatol (rechts) im Fettgewebe der Behandlungsgruppe 1-6 (oben) und Kontrollgruppe A-D (unten).

Bezüglich des Verlaufs von Androstenon lässt sich bei der Betrachtung aller Einzel-tierkurven (Abb. 5.10 a, b) bereits auf den ersten Blick erkennen, dass sich das Phe-romon sehr synchron zu Testosteron verhält:

Eber 1 – Vino (Abb. 5.10 a, oben) zeigt einen deutlichen Abfall der Blutplasmakon-zentrationen für Androstenon nach der zweiten Immunisierung und hält niedrige Wer-te bis zum Tag 59 aufrecht. Unter der Wiederaufnahme (Tag 74) lässt sich ein erster Anstieg bis Tag 95 (0,5 ng/ml) erkennen, gefolgt von einem zweiten Anstieg bis Tag 131 mit 0,8 ng/ml. Ab Tag 158 erfolgt ein stetiger deutlicher Anstieg mit einem Peak von 2,6 ng/ml an Tag 176.

Einen sprunghaften Anstieg nach einer sehr einheitlichen Ruhephase lässt Eber 2 – Vico (Abb. 5.10 a, mitte) zwischen Tag 131 (0,1 ng/ml) und Tag 140 (2,4 ng/ml) erkennen. Um die Wiederaufnahme der Hodenfunktion (Tag 92) zeigt das Tier noch niedrige Androstenonwerte (Tag 95 0,02 ng/ml). Das Maximum wurde an Tag 167 mit 3,5 ng/ml erreicht.

Bei Eber 3 – Vitus (Abb. 5.10 a, unten) fällt auf den ersten Blick auf, dass das Tier deutlich niedrigere Konzentrationen des Duftstoffes um die Zeit der zweiten Immunisierung aufweist als nach der Wiederaufnahme (Tag 107). Androstenon unterliegt einem moderaten Anstieg zwischen Tag 95 (0,0 ng/ml) und Tag 113 (0,1 ng/ml), der sich dann stetig fortsetzt bis hin zu einem Maximum an Tag 176 mit 2,0 ng/ml.

Eber 4 – Vinur (Abb. 5.10 b, oben) fällt erneut durch seine maximalen Blutplasmakonzentrationen um die zweite Immunisierung auf (Vgl. Testosteron, 17 β -Estradiol). An Tag 2 erreicht das Tier einen Androstenonwert von 4,0 ng/ml, danach fällt die Kurve deutlich ab, um zwischen Tag 158 (0,1 ng/ml) und Tag 167 (1,6 ng/ml) unter der Wiederaufnahme (Tag 131) wieder sprunghaft anzusteigen. An Tag 176 wird schlussendlich ein Peak von 2,0 ng/ml erreicht und liegt damit um die Hälfte niedriger als die anfangs erreichten Konzentrationen.

Bei Eber 5 – Vallenthin (Abb. 5.10 b, mitte) fallen umgekehrt niedrigere Konzentrationen zum Zeitpunkt der zweiten Immunisierung auf als nach der Wiederaufnahme. Zwischen Tag 131 (0,0 ng/ml) und Tag 140 erfolgt ein sehr gemäßigter Anstieg auf 0,2 ng/ml, gefolgt von einer sprunghaften Werterhöhung zwischen Tag 149 (0,2 ng/ml) und dem Tag der Wiederaufnahme (Tag 158) auf 1,5ng/ml. Einen Maximalwert von 1,7 ng/ml erreichte das Tier neun Tage später (Tag 167).

Eber 6 – Viktor (Abb. 5.10 b, unten) fällt durch das Ausbleiben eines Wiederanstieges der Androstenonkonzentration unter der Wiederaufnahme an Tag 170 auf.

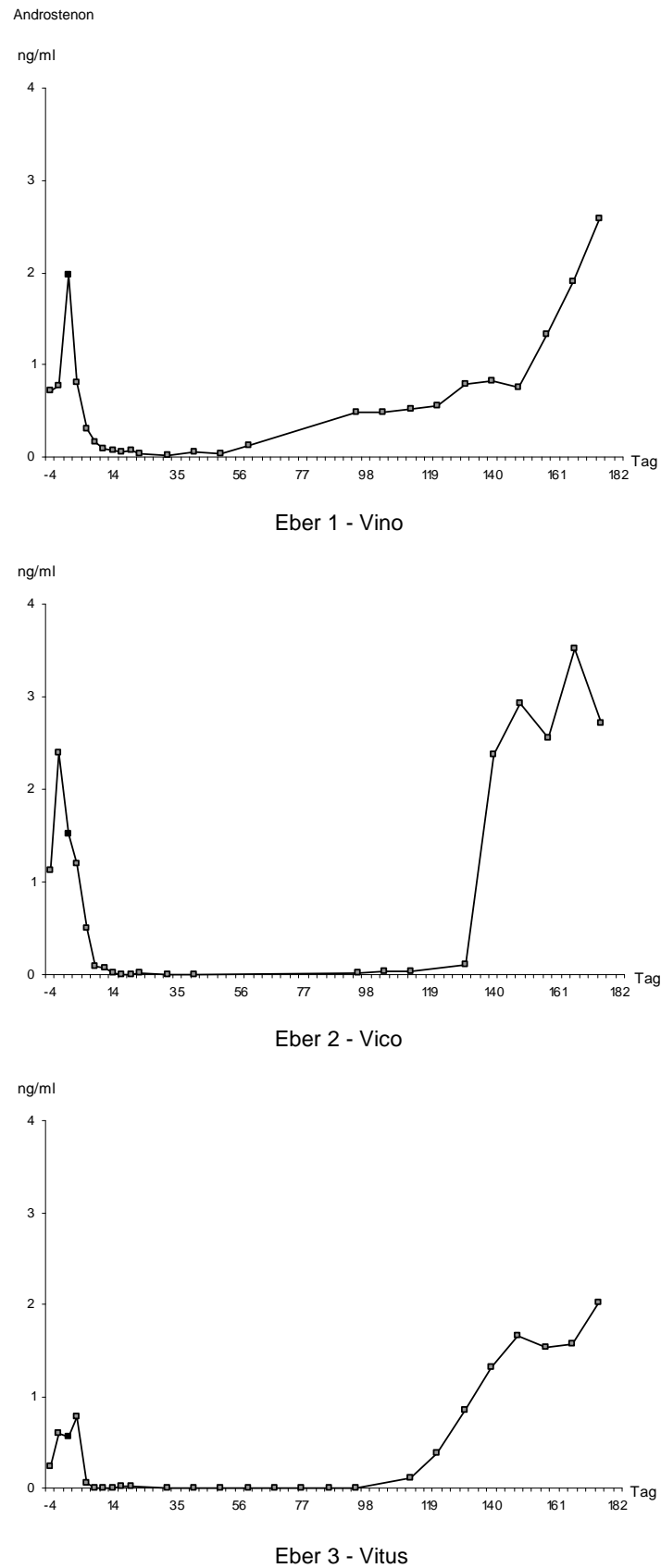
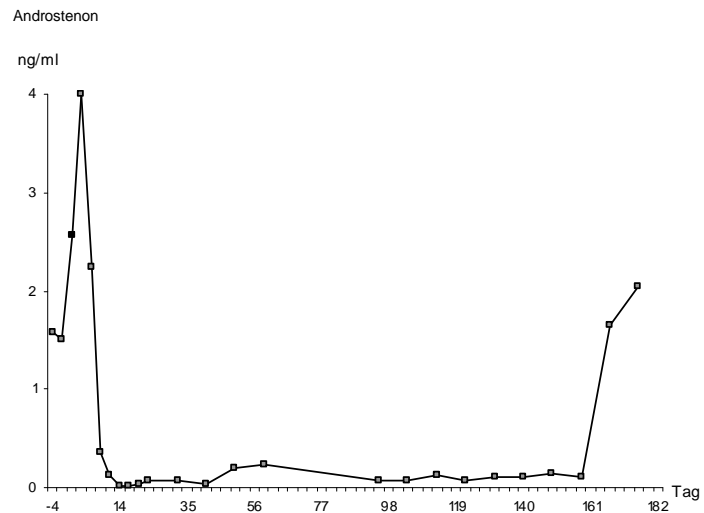
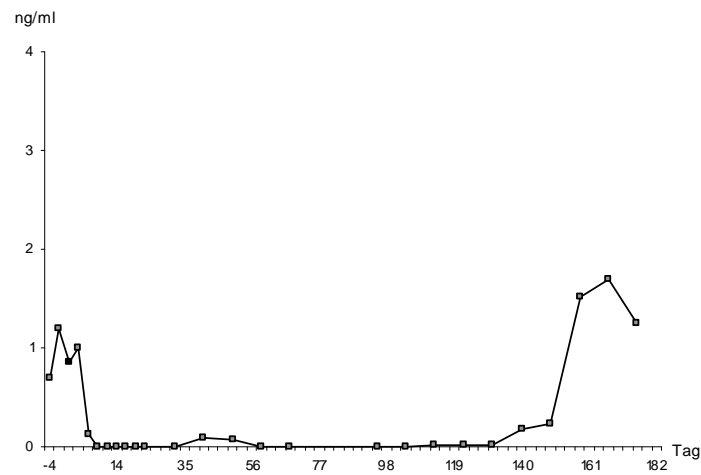


Abb. 5. 10 a Verlauf von Androstenon im Blutplasma der Eber 1-3 von Tag -4 bis Tag 176.

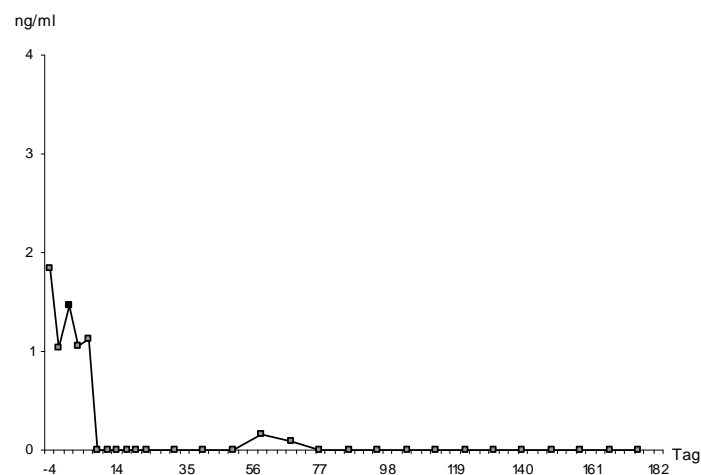
Tag 0 = Tag der zweiten Immunisierung.



Eber 4 - Vinur



Eber 5 - Vallenthin



Eber 6 - Viktor

Abb. 5. 10 b Verlauf von Androstenon im Blutplasma der Eber 4-6 von Tag -4 bis Tag 176.

Tag 0 = Tag der zweiten Immunisierung.

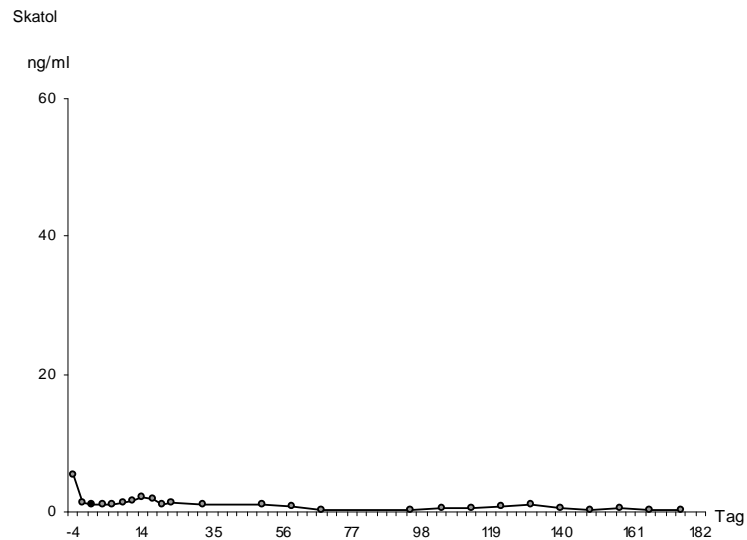
5.1.7. Skatol

Wie aus Abb. 5.8 ersichtlich, tendierte Skatol zu einem vergleichbaren Verlauf wie Androstenon, zeigte aber keinen so offensichtlichen Tiefpunkt unter der Immunisierung, so dass beachtliche Konzentrationen im Blut gefunden wurden, obwohl die Hodenfunktion während des „Tiefpunktes“ ausgeschaltet war.

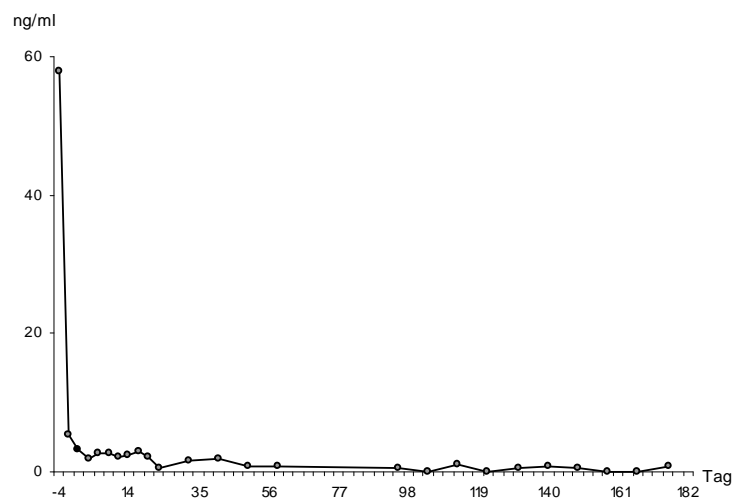
Auch für Skatol konnten erhöhte Konzentrationen sowohl im Fettgewebe als auch im Blutplasma der frühen drei Wiederaufnahmetiere festgestellt werden (Tab. 5.2). Bei Eber 4 – Vinur konnten bei noch niedrigen Blutplasmawerten (0,3 ng/ml) bereits eine erhöhte Fettkonzentration für Skatol gemessen werden. Eber 3 – Vitus weist im Vergleich zu Eber 1 – Vino und Eber 2 – Vico eine höhere Blutplasmakonzentration auf, wobei der Wert für das Fettgewebe deutlich unter den beiden Tieren liegt. Eine Tendenz bezüglich der Reihenfolge der Wiederaufnahme der Hodenfunktion lässt sich für Skatol demnach nicht ableiten. Kein Tier überschritt den Grenzwert von 250 ng Skatol/g Fett für diese Substanz (Tab. 5.2).

Im Vergleich mit den intakten Tieren A-D der Kontrollgruppe (Abb. 5.9, rechts) lässt sich erkennen, dass es keine eindeutigen „Mindestwerte“ für Skatol beim Eber zu geben scheint. Eber B – Isko weist einen deutlich geringeren Skatolfettgehalt auf als Eber 1 – Vino oder Eber 4 – Vinur. Kein Tier der Behandlungsgruppe lieferte zum Zeitpunkt der Euthanasie Skatolwerte im Rückenfett, die vergleichbar mit Eber C – Iven oder Eber D – Iodoc waren. Eber A – Islay und Eber 2 – Vico hatten vergleichbare Fettgewebskonzentrationen für Skatol.

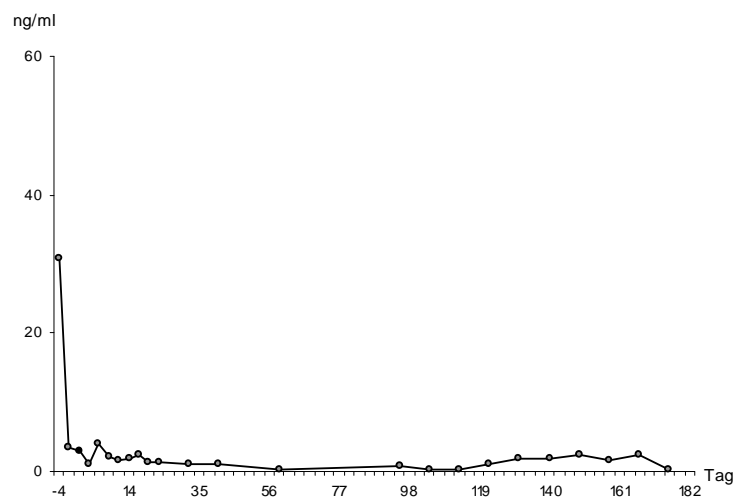
Betrachtet man nun die Einzeltierdarstellung der Skatolverlaufskurve (Abb. 5.11 a, b), welcher eine andere Skala (y-Max 60 ng Skatol/ml Blutplasma) wie der mittleren Verlaufskurve aller Tiere der Behandlungsgruppe (Abb. 5.8, y-Max 3 ng Skatol/ml Blutplasma) zugrunde gelegt wurde, so fällt auf, dass alle Eber mit mehr oder minder hohen Anfangskonzentrationen (Tag -4 4,9 ng/ml bis 57,73 ng/ml) vor der zweiten Immunisierung (Tag 0) um den OP-Termin (Tag -5) starten. Alle Werte, die über den gesamten Versuchszeitraum gemessen werden konnten, liegen weit unter dem Grenzwert von 250 ng Skatol/ml Blutplasma. Unter der Wiederaufnahme der einzelnen Eber konnte keine Werterhöhung festgestellt werden.



Eber 1 - Vino



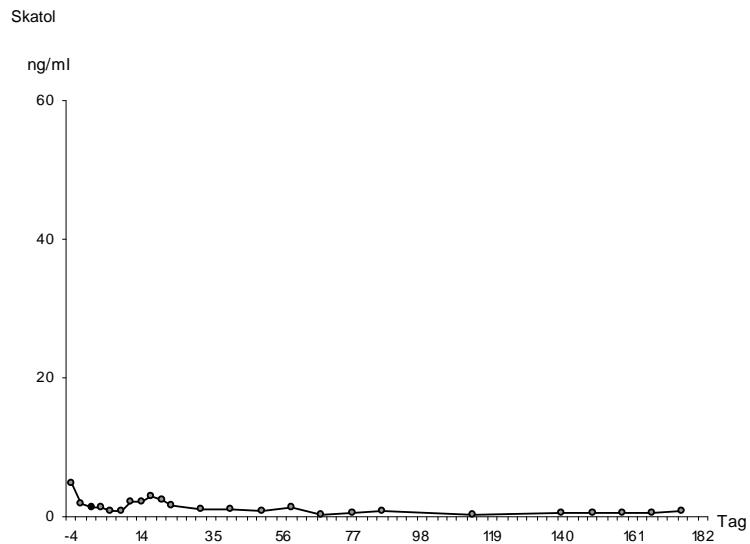
Eber 2 - Vico



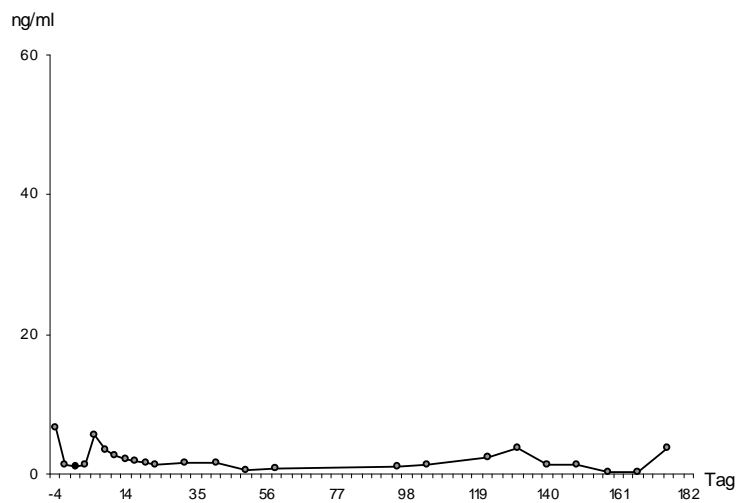
Eber 3 - Vitus

Abb. 5. 11 a Verlauf von Skatol im Blutplasma der Eber 1-3 von Tag -4 bis Tag 176.

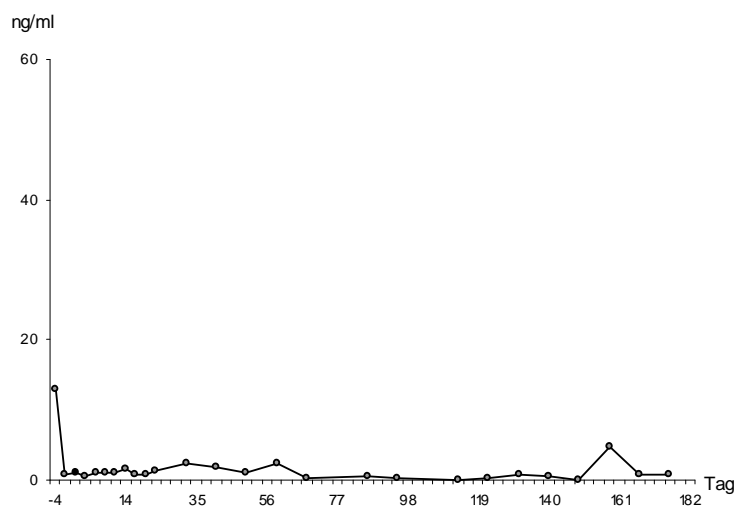
Tag 0 = Tag der zweiten Immunisierung.



Eber 4 - Vinur



Eber 5 - Vallenthin



Eber 6 - Viktor

Abb. 5. 11 b Verlauf von Skatol im Blutplasma der Eber 4-6 von Tag -4 bis Tag 176.

Tag 0 = Tag der zweiten Immunisierung.

5.2. Veränderungen der Hodengröße in vivo

5.2.1. Auswertung der Bandmaßdaten

Alle Tiere der Behandlungsgruppe zeigen unter nachlassendem Immunisierungseffekt und beginnender Wiederaufnahme eine deutliche Größenzunahme beider Hoden (Tab. 5.3, Messungen nach der Wiederaufnahme sind farblich unterlegt; Vgl. auch Abb. 4.4). Zu berücksichtigen ist, dass anhand der Hodengröße keine Aussage über die Wirksamkeit der Immunisierung gegen GnRH getroffen werden kann: so übertrifft Eber 1 – Vino unter der Immunisierung bereits die anderen Tiere bezüglich der Hodenmaße, gleichzeitig erreichten andere Tiere (z.B. Eber 6 – Viktor) unter der Wiederaufnahme lediglich eine Hodengröße vergleichbar der Ausgangsgröße des Tieres Vino.

Eber 1 – Vino übertrifft bezüglich der Längs- und Querdurchmesser der Hoden sogar die Kontrolltiere A-D (Größenzunahme bis zu + 38,3 %). Eber 2 – Vico und Eber 3 – Vitus liegen genau im physiologischen Bereich bezüglich der Hodengröße intakter Eber gleichen Alters, wobei Eber 2 – Vico eine Größenzunahme von bis zu 50 % unter der Wiederaufnahme vorweisen kann. Eber 4-6 liegen noch deutlich unter der Größenspanne der Kontrollgruppe (A-D); die Größenzunahme von Eber 6 – Viktor bewegt sich durchaus bei 30,1 %.

Abb. 5.12 a dient dem optischen Vergleich der Prozesse unter nachlassendem Immunisierungseffekt und der Wiederaufnahme der Hodenfunktion der einzelnen Tiere, zwischen den Tieren und dem Vergleich mit den Kontrollebern (Abb. 5.12 b).

Tab. 5.3 Kontinuierliche Kontrolle des Bandmaßes in mm (längs, quer) beider Hoden im Verlauf des Versuches von der 37. bis 52. Lebenswoche.

Die grau unterlegten Werte (mm) wurden unter der Wiederaufnahme ermittelt.

		Eber 1 - Vino				Eber 2 - Vico				Eber 3 - Vitus			
		links		rechts		links		rechts		links		rechts	
		längs	quer	längs	quer	längs	quer	längs	quer	längs	quer	längs	quer
Behandlungsgruppe LW 37 - 52	Tag												
	76	180	90	180	100	150	65	160	70	140	60	145	55
	103	215	12	215	12	175	90	180	90	170	75	155	80
	132	255	15	260	155	230	120	225	125	210	110	210	100
	153	287	160	270	170	273	132	273	130	255	120	243	110
	167	280	170	280	165	270	125	265	120	265	120	270	120
180	295	170	295	160	285	130	285	130	275	130	260	120	
		Eber 4 - Vinur				Eber 5 - Vallenthin				Eber 6 - Viktor			
		links		rechts		links		rechts		links		rechts	
		längs	quer	längs	quer	längs	quer	längs	quer	längs	quer	längs	quer
Behandlungsgruppe LW 37 - 52	Tag												
	76	120	30	110	30	140	60	145	60	150	60	145	70
	103	130	50	130	50	125	50	130	60	150	65	145	65
	132	130	50	130	55	120	40	130	45	160	65	150	60
	153	156	55	164	60	178	80	170	80	180	70	170	75
	167	174	70	165	65	200	100	192	90	190	73	183	77
180	200	90	200	90	217	110	215	100	205	90	200	75	
		Eber A - Islay				Eber B - Isko							
		links		rechts		links		rechts					
		längs	quer	längs	quer	längs	quer	längs	quer				
Kontrollen LW 52		255	100	260	100	265	100	275	120				
		Eber C - Iven				Eber D - Iodoc							
		links		rechts		links		rechts					
		längs	quer	längs	quer	längs	quer	längs	quer				
Kontrollen LW 52		285	120	300	150	288	110	287	107				



Abb. 5. 12 a Optischer Vergleich der Hodengröße unter der Immunisierung (Tag 39, oben) und nach der Wiederaufnahme der Hodenfunktion (Tag 180, unten).

Die abschließende Hodengröße wurde im Alter von 52 Wochen dokumentiert.



Abb. 5. 12 b Optischer Vergleich der Hodengröße der Kontrolltiere.
Die Hodengröße wurde im Alter von 52 Wochen dokumentiert.

5.2.2. Auswertung der Sonographie

Auch durch die Auswertung der Sonographie – insbesondere der mittleren Durchmesser der Hodenquerschnitte – wird die Größenveränderung belegt (Tab. 5.4, Messungen nach der Wiederaufnahme sind farblich unterlegt).

Eber 1 – Vino übertrifft unter den Auswirkungen der Immunisierung bereits die anderen Tiere bezüglich der Hodendurchmesser, gleichzeitig erreichten andere Tiere (z.B. Eber 6 – Viktor) unter der Wiederaufnahme lediglich eine Hodengröße vergleichbar der Ausgangsgröße des Tieres Vino.

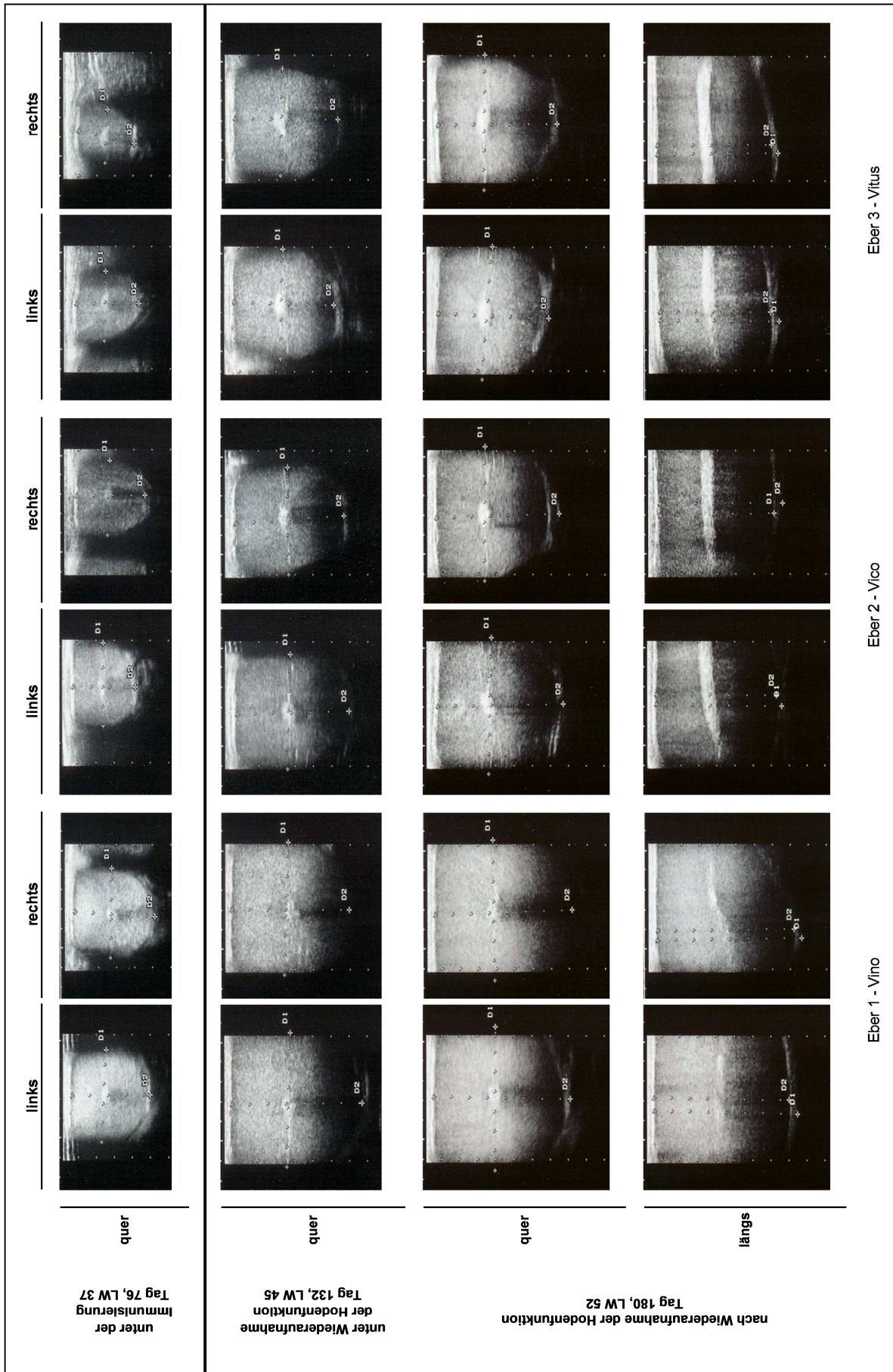
Eber 1 – Vino zeigt im Querdurchmesser der Hoden Endmaße, die wiederum die Kontrollgruppe (A-D) übertreffen (Größenzunahme bis zu + 38,7 %). Eber 2 – Vico (Größenzunahme bis zu + 44,3 %) und Eber 3 – Vitus (Größenzunahme bis zu + 50,9 %) liegen genau im physiologischen Bereich intakter Eber gleichen Alters. Eber 4-6 beginnen sich erst der Größenspanne der Kontrollgruppe (A-D) anzunähern; die Größenzunahme von Eber 6 – Viktor bewegt sich durchaus schon bei 25,2 % unter der beginnenden Wiederaufnahme.

Abb. 5.13 a, b dient der optischen Untermalung der Prozesse unter nachlassendem Immunisierungseffekt und der Wiederaufnahme der Hodenfunktion der einzelnen Tiere und zwischen den Tieren zu drei verschiedenen Zeitpunkten des laufenden Versuches (Vgl. Abb. 4.3). Der Längsschnitt soll die Entwicklung eines ausgeprägten Rete testis veranschaulichen. Der Vergleich mit den Kontrollebern kann mit Abb 5.13 c angestellt werden.

Tab. 5. 4 Kontinuierliche Kontrolle des Hodendurchmessers in mm (längs, quer) beider Hoden im Verlauf des Versuches von der 37. bis 52. Lebenswoche.

Die grau unterlegten Werte (mm) wurden unter der Wiederaufnahme ermittelt.

	Tag	Eber 1 - Vino		Eber 2 - Vico		Eber 3 - Vitus	
		links	rechts	links	rechts	links	rechts
Behandlungsgruppe LW 37 - 52	76	45.6	45.0	38.5	38.2	35.1	29.4
	103	61.4	58.8	43.6	46.1	43.8	39.9
	132	69.8	65.7	59.9	56.9	55.1	55.4
	153	72.3	69.2	63.8	64.1	60.9	60.5
	167	73.3	72.8	65.4	64.1	65.7	63.9
	180	74.3	73.5	69.5	68.2	64.4	67.2
	Tag	Eber 4 - Vinur		Eber 5 - Vallenthin		Eber 6 - Viktor	
		links	rechts	links	rechts	links	rechts
Behandlungsgruppe LW 37 - 52	76	30.5	26.2	32.0	31.5	36.0	34.4
	103	27.3	27.8	29.8	32.4	36.6	34.7
	132	36.4	37.5	36.1	35.7	35.8	40.0
	153	41.2	39.4	43.9	43.2	45.2	42.1
	167	43.6	44.8	50.8	47.9	46.8	44.3
	180	48.8	50.4	56.3	55.2	47.2	46.9
Kontrollen LW 52	Eber A - Islay		Eber B - Isko				
	links	rechts	links	rechts			
Kontrollen LW 52			Eber C - Iven		Eber D - Iodoc		
			links	rechts	links	rechts	
		62.3	59.8	59.7	61.1		
				69.5	67.5	68.2	61.3



Eber 3 - Vitus

Eber 2 - Vico

Eber 1 - Vino

Abb. 5. 13 a Optischer Vergleich der Hodendurchmesser unter der Immunisierung (Tag 76, oben), unter der Wiederaufnahme (Tag 132, mitte) und nach der Wiederaufnahme der Hodenfunktion (Tag 180, unten) der Tiere 1-3. Die abschließende Hodengröße wurde im Alter von 52 Wochen dokumentiert.

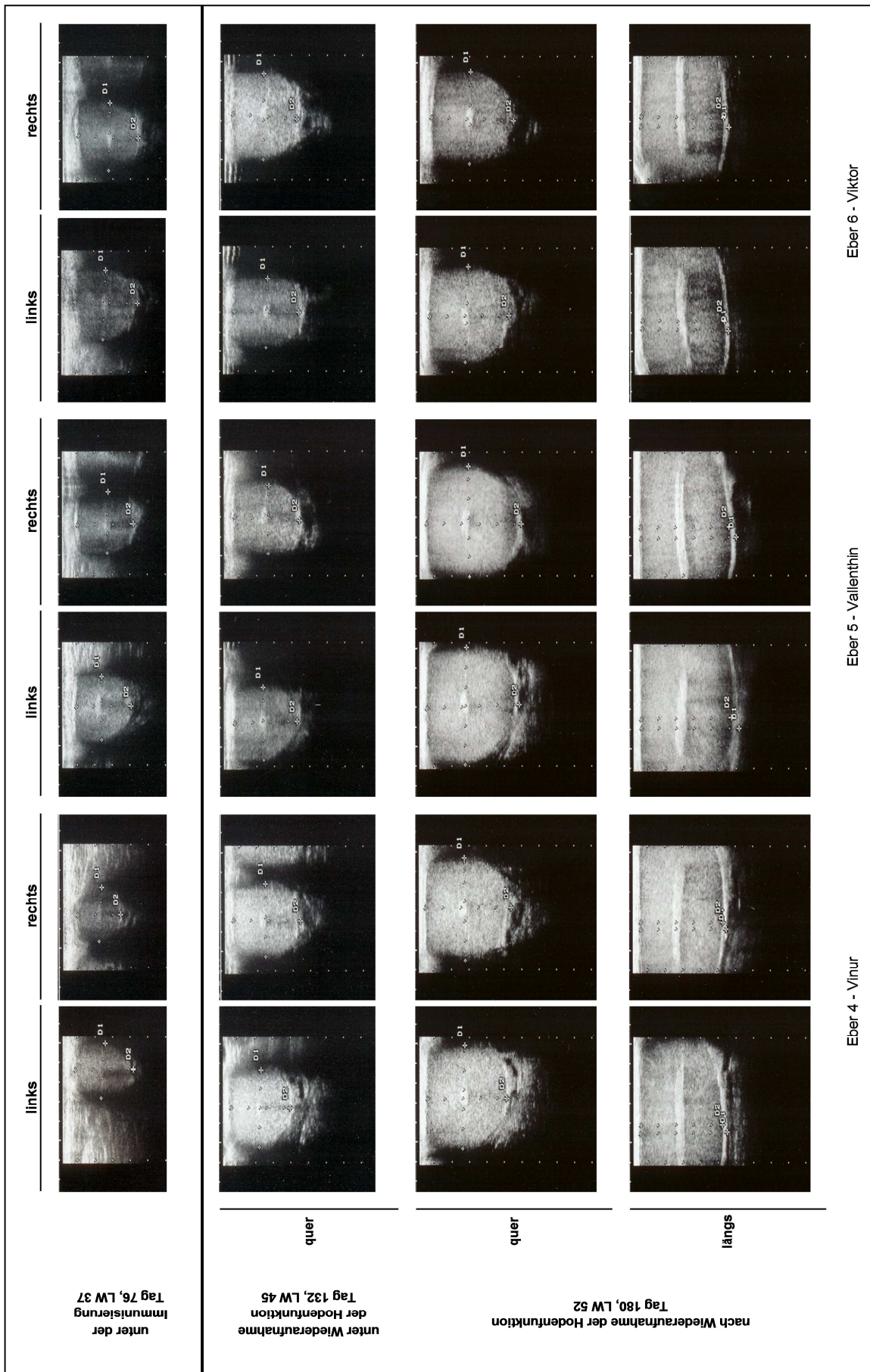


Abb. 5. 13 b Optischer Vergleich der Hodendurchmesser unter der Immunisierung (Tag 76, oben), unter der Wiederaufnahme (Tag 132, mitte) und nach der Wiederaufnahme der Hodenfunktion (Tag 180, unten) der Tiere 4-6. Die abschließende Hodengröße wurde im Alter von 52 Wochen dokumentiert.

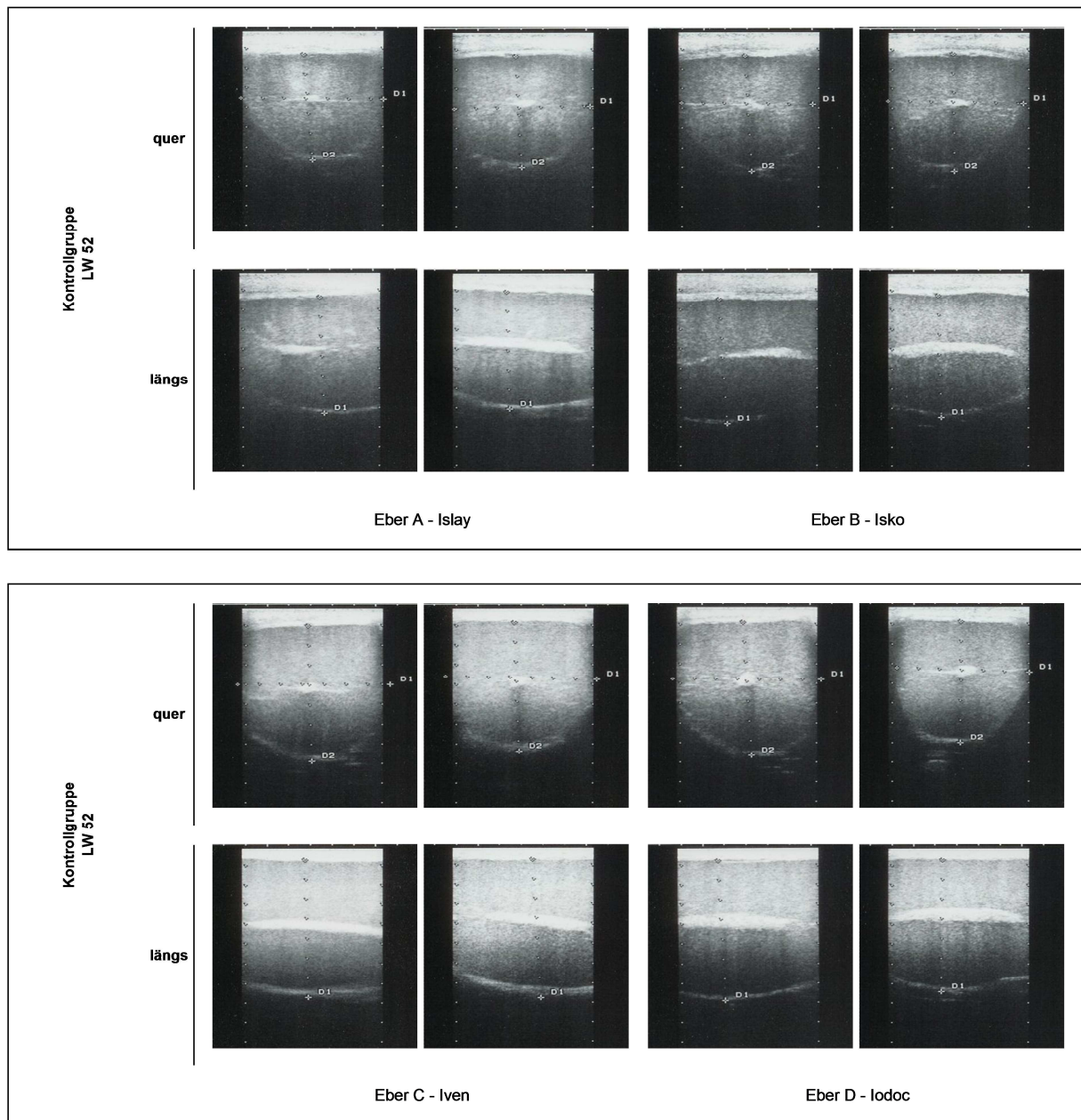


Abb. 5. 13 c Optischer Vergleich der Hodendurchmesser der Kontrolltiere. Die abschließende Hodengröße wurde im Alter von 52 Wochen dokumentiert.

5.3. Veränderungen der Gewebeproben

5.3.1. Ergebnisse der makroskopischen Auswertung der Hoden und akzessorischen Geschlechtsdrüsen

Tierindividuell unterschied sich das Hodengewicht (Tab. 5.5) beträchtlich, wobei offensichtlich wurde, dass das mittlere Hodengewicht der Kontrolleber nur von den

Tab. 5. 5 Gewichte in g beider Hoden und der Geschlechtsdrüsen sowie Testosteronkonzentrationen der einzelnen Eber der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe (MW \pm S.E.M.).

Die Nummerierung der Eber (1-6) entspricht der Reihenfolge der Wiederaufnahme der Leydigzellfunktion.

Eber	Wiederaufnahme (Tag)	Hoden		akzessorische Geschlechtsdrüsen			Testosteron (ng/mL)
		links (g)	rechts (g)	Gl. bulbourethralis (g)	Gl. vesicularis (g)	Gl. prostatica (g)	
1 Vino	74	690	640	185	215	25	1.51
2 Vico	92	510	515	275	340	15	2.47
3 Vitus	107	445	485	185	430	20	4.79
4 Vinur	131	225	230	205	240	10	2.44
5 Vallenthin	158	320	325	80	50	5	1.05
6 Viktor	170	265	240	80	40	10	0.41
Kontrolleber		456.3 \pm 30.1	432.5 \pm 29.7	136.3 \pm 17.5	198.8 \pm 54.0	12.5 \pm 1.3	1.25 \pm 0.32

drei „frühen“ Wiederaufnahmetieren – diejenigen, welche ihre Hodenfunktion als erste wieder aufgenommen hatten – erreicht wurde. Eber 1 und 2 überschritten sogar das Hodengewicht der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu, erreichten Eber 4 bis 6 nur die Hälfte des Hodengewichtes der Kontrolltiere, wobei Eber 5 und 6 auch noch kontinuierlich niedrige Testosteronkonzentrationen aufwiesen.

Umgekehrt wird die tierindividuelle Ausprägung der Testosteronsynthese auch von dem Gewicht der akzessorischen Geschlechtsdrüsen reflektiert. Beide Parameter

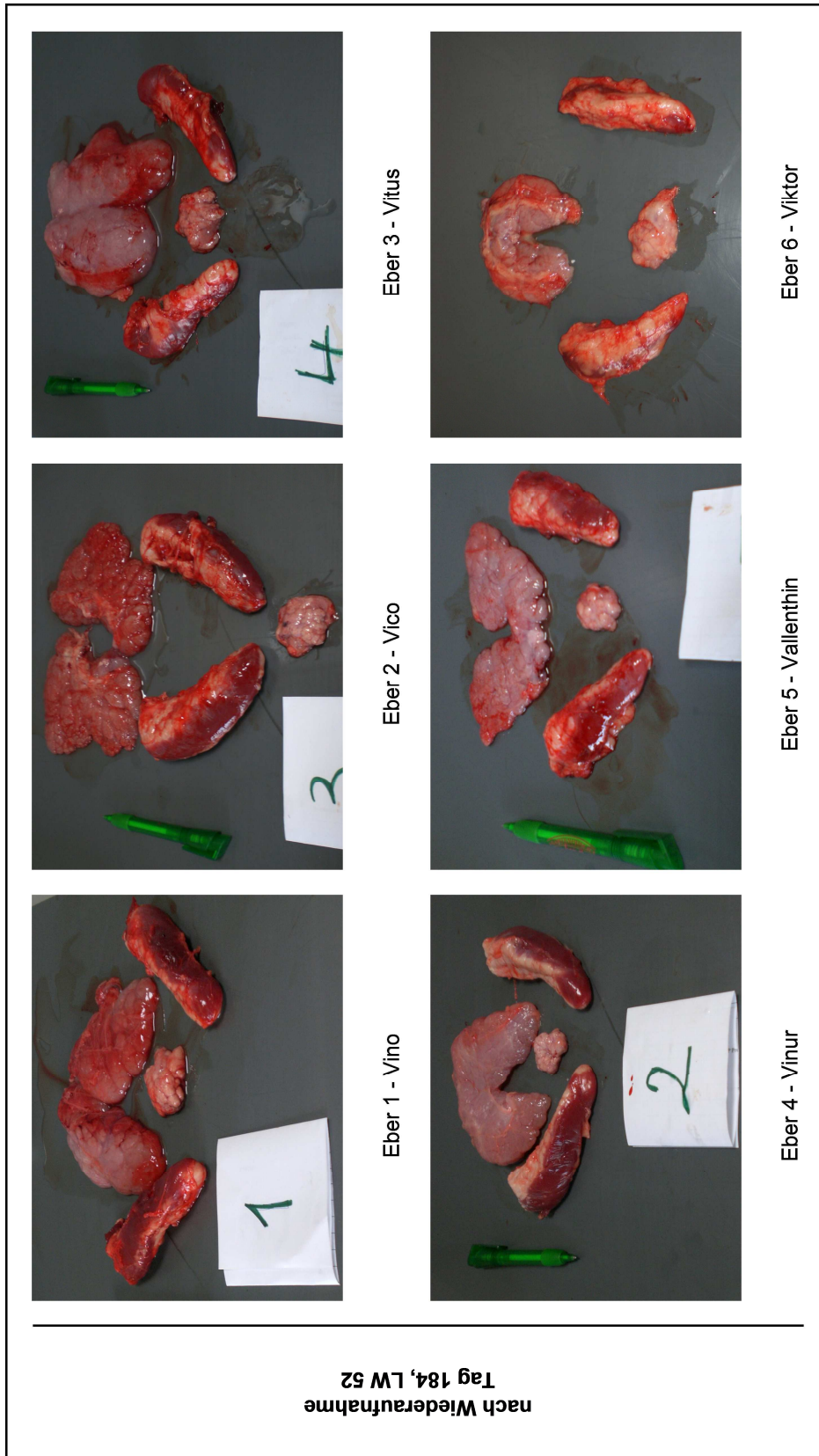


Abb. 5. 14 a Optischer Vergleich der Geschlechtsdrüsen (Tag 184) der Behandlungsgruppe.

Die Größe der Geschlechtsdrüsen wurde im Alter von 52 Wochen dokumentiert.

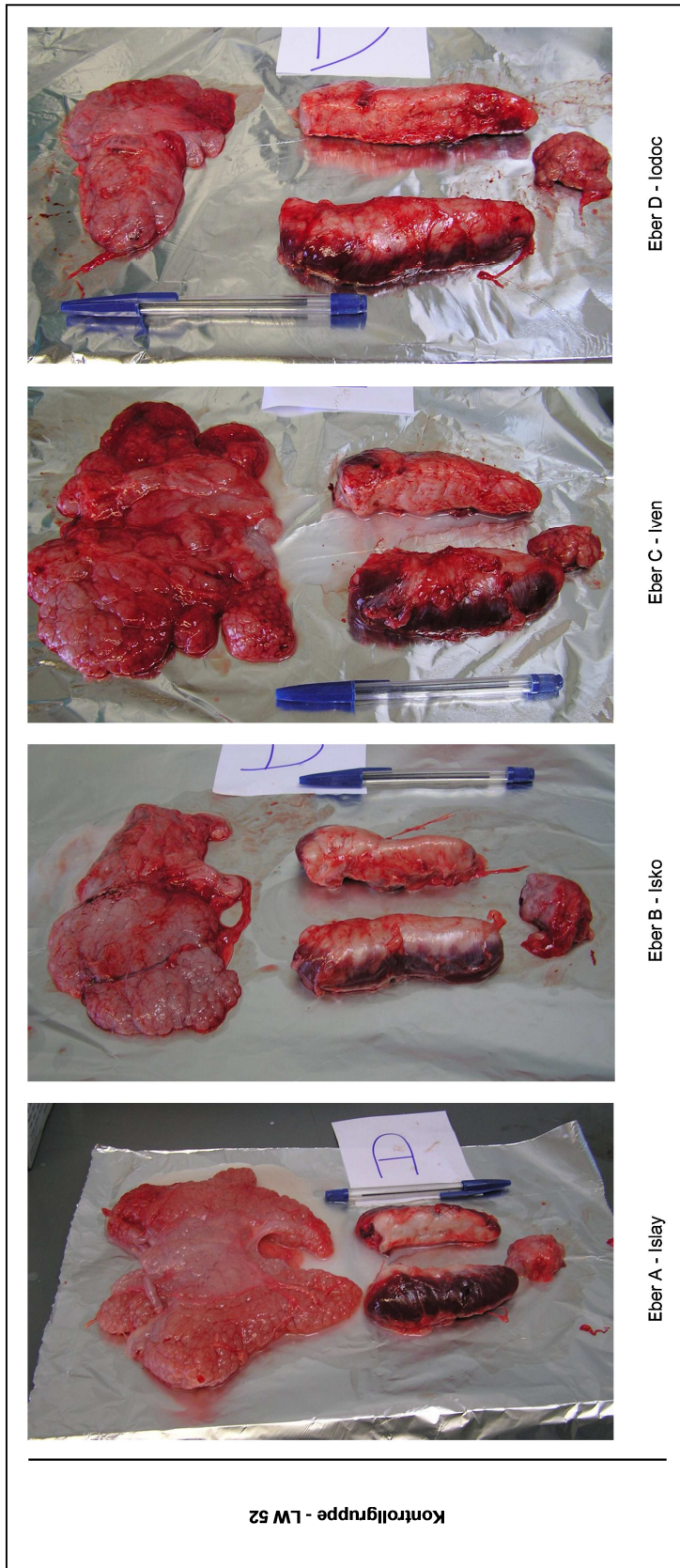


Abb. 5. 14 b Optischer Vergleich der Geschlechtsdrüsen der Kontrollgruppe.
Die Größe der Geschlechtsdrüsen wurde im Alter von 52 Wochen dokumentiert.

zeigten sich verringert bei den Ebern 5 und 6, verglichen zu den anderen Ebern der Behandlungsgruppe sowie mit den Kontrollebern. Eber 1 bis 4 überschritten sogar die mittleren Werte für die Bulbourethral- und Vesiculardrüse der Kontrollen und tendierten auch zu höheren Prostatagewichten.

Abb. 5.14 a, b sollen einen visuellen Vergleich der Geschlechtsdrüsen liefern. Die Größe der akzessorischen Geschlechtsdrüsen wurde anhand des Gewichtes ausgewertet (Tab. 5.5), eine Vermessung der einzelnen Drüsen wurde nicht durchgeführt. Für die anatomische Identifikation Vgl. Abb. 2.3.

5.3.2. Histologische Ergebnisse

5.3.2.1. Morphologische Ergebnisse des Hodengewebes

Tab. 5. 6 Charakterisierung der absoluten und relativen Gesamtfläche an Hodentubuli und Interstitium (MW \pm S.E.M.).

Die relativen Werte beziehen sich auf eine ausgewertete Bezugsfläche von $130 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2$. Die Nummerierung der Eber (1-6) entspricht der Reihenfolge der Wiederaufnahme der Leydigzellfunktion. Für die Kontrollgruppe wird der S.E.M. angegeben.

Eber	Gesamtfläche			
	Tubulusfläche		Interstitiumfläche	
	$\mu\text{m}^2 \times 10^6$	%	$\mu\text{m}^2 \times 10^6$	%
1 Vino	1.01	78.3	0.25	21.7
2 Vico	0.91	72.2	0.35	27.8
3 Vitus	0.98	77.8	0.29	22.2
4 Vinur	0.99	77.8	0.30	22.2
5 Vallenthin	1.05	85.8	0.18	14.2
6 Viktor	0.99	77.4	0.29	22.6
Kontrolleber	1.02 ± 0.02	79.2 ± 1.5	0.27 ± 0.02	20.8 ± 1.5

Die relative Verteilung der Tubuli seminiferi und des Interstitialgewebes zur gesamten Hodenschnittebene wurde in Tabelle 5.6 ausgewertet.

Die Fläche der Tubuli seminiferi zeigte sich sowohl in der Gruppe der vakzinierten Eber als auch im Vergleich zu der Kontrollgruppe ziemlich einheitlich, mit Werten um die $1,01 \mu\text{m}^2 \times 10^6$ pro ausgewerteter Gesamtfläche.

Infolgedessen repräsentierten die Samenkanälchen etwa 80 % der Gewebefläche des Hodens, das Interstitialgewebe die restlichen 20 %.

Demnach wurde die relative Verteilung dieser beiden Kompartimente nicht durch das erhöhte Hodengewicht beeinflusst.

Tab. 5.7 Maße der einzelnen Tubuli seminiferi, der Keimepithelien und der mitotischen Aktivität der einzelnen immunisierten Eber.

Die Nummerierung der Eber (1-6) entspricht der Reihenfolge der Wiederaufnahme der Leydigzellfunktion. Für die Kontrollgruppe wird der S.E.M. angegeben.

Eber	Tubuli seminiferi		Keimepithel		Mitoseaktivität
	Durchmesser (μm)	Fläche ($\mu\text{m}^2 \times 10^4$)	Höhe (μm)	Fläche ($\mu\text{m}^2 \times 10^4$)	Ki-67 positive Spermatogonien
1 Vino	272.5	5.8	81.0	4.9	2033
2 Vico	222.2	3.9	67.0	3.3	1416
3 Vitus	234.1	4.3	69.2	3.6	1182
4 Vinur	207.9	3.4	68.3	3.0	1642
5 Vallenthin	193.9	3.0	64.6	2.6	1194
6 Viktor	197.0	3.1	52.9	2.4	869
Kontrolleber	313.2 ± 19.1	7.9 ± 1.0	103.5 ± 5.0	6.9 ± 0.8	2028 ± 175.5

Im Gegensatz zu den Leydigzellen, tragen die Tubuli weniger zur Hodengröße bei. Geringgradige Unterschiede im Durchmesser und der Fläche der Samenkanälchen (Tab. 5.7) wurden bei den immunisierten Tieren gefunden. Diejenigen Eber, deren Hodenfunktion früher aufgenommen wurde, zeigten leicht erhöhte Maße der Hoden-

tubuli. Die Kontrollgruppe jedoch lag erneut stets darüber. Die gesteigerte Tubuligröße scheint ebenfalls nicht von den Unterschieden in der Sertolizellzahl abhängig zu sein, welche Werte um die 6 Sertolizellen pro Tubulus (ohne große Variationsbreite bei der Behandlungsgruppe) gegen 7,5 Sertolizellen je Tubulus bei der Kontrollgruppe lieferten (*ABERCROMBIE* 1946). Folglich wird die Größe der Samenkanälchen hauptsächlich von der Spermatogeneseaktivität bestimmt, wie es sich anhand der Ausmaße des Keimepithels und noch deutlicher durch die mitotische Aktivität der Spermatogonien ablesen lässt (Vgl. Abb. 5.16).

Zur optischen Untermalung sind in Abb. 5.15 a (oben) einzelne Hodentubuli mit der jeweiligen Keimepithelhöhe exemplarisch dargestellt. Bei Eber 2 – Vico und Eber 6 – Vinur zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Keimepithelhöhe in Abhängigkeit des individuellen Zeitraumes der Wiederaufnahme. Die Gegenüberstellung mit einem intakten Eber D – Iodoc und dem histologischen Bild des immunisierten Ebers Esra (Abb. 5.15 a, unten rechts) verdeutlicht die Spanne zwischen den frühen und späten Wiederaufnahmetieren. Eine Epithelhöhe vergleichbar der in intakten Ebern konnte noch nicht vollständig erreicht werden (Differenz +30 μm min.), während unter anhaltender Immunisierung kein intaktes Keimepithel und keine physiologische Struktur von Hodentubuli gefunden werden konnte (keine Messung).

Veränderungen in den Charakteristika der Leydigzellen mit sich verändernder Hodengröße sind in Tab. 5.8 ausgewertet.

Die Anzahl von Leydigzellen je ausgewerteter Fläche von $10^6 \mu\text{m}^2$ (*ABERCROMBIE* 1946) wird zusätzlich auf die Gesamtgröße des Hodens bezogen.

Die Anzahl der Leydigzellen je Hoden (Tab. 5.8) war in allen immunisierten Ebern im Vergleich zu den Kontrollen erhöht, wobei offensichtlich keine Beziehung zwischen der Zahl der Leydigzellen und der Hodengröße bestand.

Stattdessen zeigte die Größe des Kerns und des Cytoplasmas der Leydigzellen eine Beziehung zur Hodengröße: die Kerngröße der immunisierten Eber zeigte eine verminderte Abhängigkeit, da sich die Kerngröße zwischen Eber 2 und 6 maximal um den Faktor 2 unterschied. Die Kontrolleber jedoch hatten ein mittleres Kernvolumen von $154 \mu\text{m}^3$, was deutlich höher lag als das von Eber 2.

Tab. 5. 8 Charakterisierung des Interstitialgewebes: Gesamtfläche und relative Verteilung der Leydigzellen sowie das jeweilige Kern- und Cytoplasmavolumen.

Die Nummerierung der Eber (1-6) entspricht der Reihenfolge der Wiederaufnahme der Leydigzellfunktion. Für die Kontrollgruppe wird der S.E.M. angegeben.

Eber	Leydigzellzahl		Leydigzellvolumen (μm^3)	
	$\text{n}/\mu\text{m}^2 \times 10^6$	$10^{10}/\text{Hoden}$	Kern	Cytoplasma
1 Vino	3 535	6.6	80.0	579.1
2 Vico	2 417	4.0	125.6	954.7
3 Vitus	2 724	3.8	100.7	678.2
4 Vinur	3 328	3.0	89.7	224.2
5 Vallenthin	4 457	3.9	74.5	168.0
6 Viktor	5 635	5.8	63.9	170.3
Kontrolleber	2493.0 ± 280.9	2.2 ± 0.2	154.2 ± 24.5	1596.9 ± 285.3

Noch deutlicher zeigten sich die Unterschiede im Cytoplasma der Leydigzellen: bei den vakzinierten Ebern wurde maximal ein sechsfacher Unterschied erreicht (wieder Eber 2 zu 6); dann wiederum lag das Cytoplasmavolumen zwischen einem Faktor von 9,5 (Eber 5 und 6) und 1,7 (Eber 2) wenn der Vergleich mit den Kontrolltieren angestellt wurde.

Insgesamt scheint es, dass sowohl die Größe des Kerns als auch die des Cytoplasmas bei den immunisierten Ebern mit dem Grad der Wiederaufnahme der Hodenfunktion verknüpft ist und somit auch mit der Hodengröße. Die Werte der Kontrollgruppe aber liegen noch darüber.

In Abb. 5.15 b lässt sich erkennen, dass das Interstitium des Ebers 2 – Vico sich dem physiologischen Zustand des Ebers D – Iodoc deutlich annähert. Eber 6 – Vinur steht entsprechend seiner erzielten Testosteronsynthese am Anfang der Wiederaufnahme, was sich auch in dem histologischen Status praesens erkennen lässt: die Kerne sind deutlich zu erkennen, das Cytoplasma der Leydigzellen noch geringgradig ausgeprägt. Unter der Immunisierung (unten rechts) kann Eber Esra kein Leydigzellcytoplasma aufweisen, auch die Interstitialfläche ist deutlich geringer angelegt.

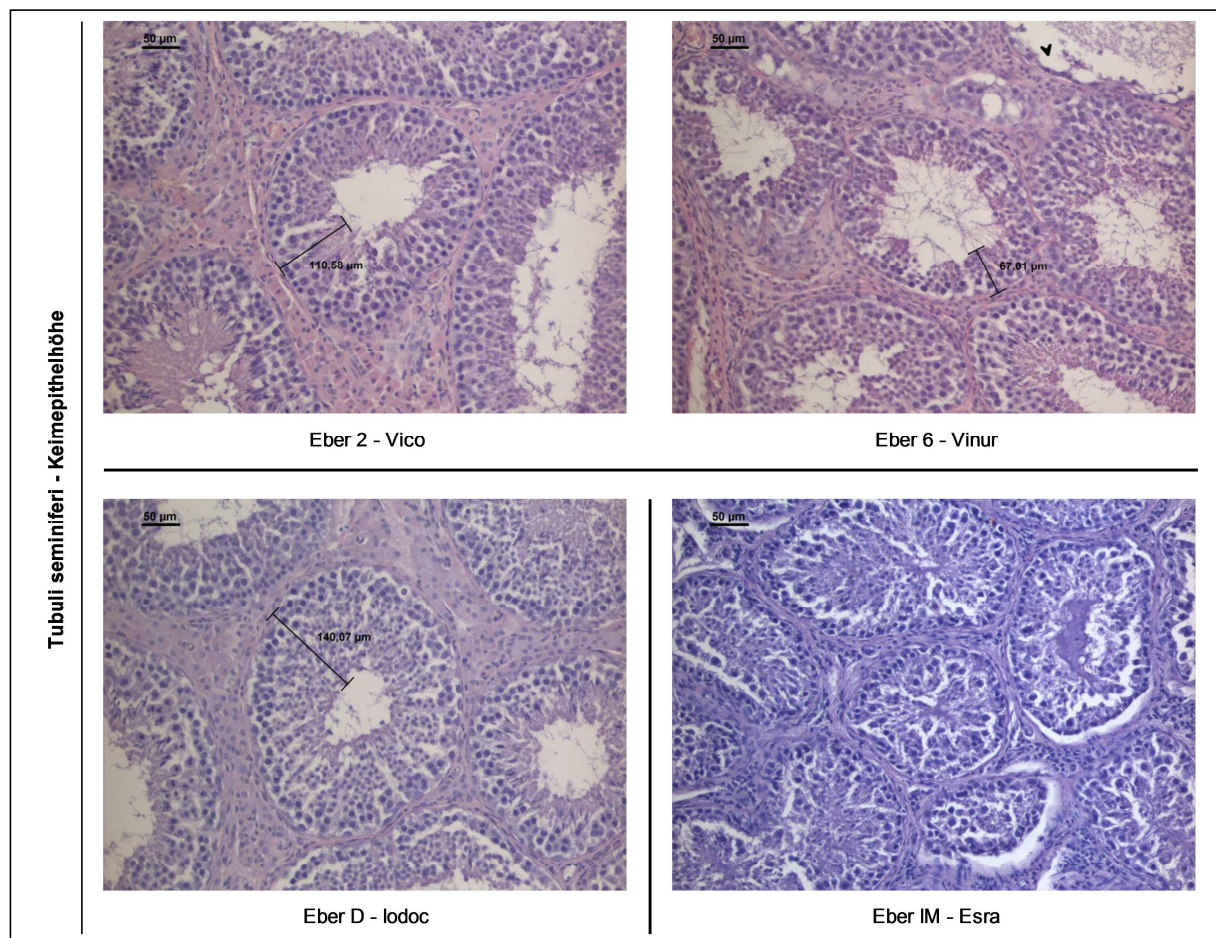


Abb. 5.15 a Beispiele für die Unterschiede in der Keimepithelhöhe in Ebern der Behandlungsgruppe (oben), einem Kontrolltier (unten links) und einem immunisierten Eber (unten rechts).

Eber 2, oben links: 110.58µm; Eber 6, oben rechts: 75.49µm (die Werte unterscheiden sich von Tab. 5.7, welche die Mittelwerte aus 8 Tubuli je Eber zeigt); Eber D, unten links: 140.07µm; Eber IM, unten rechts: rudimentäre Keimepithelhöhe, nicht messbar.

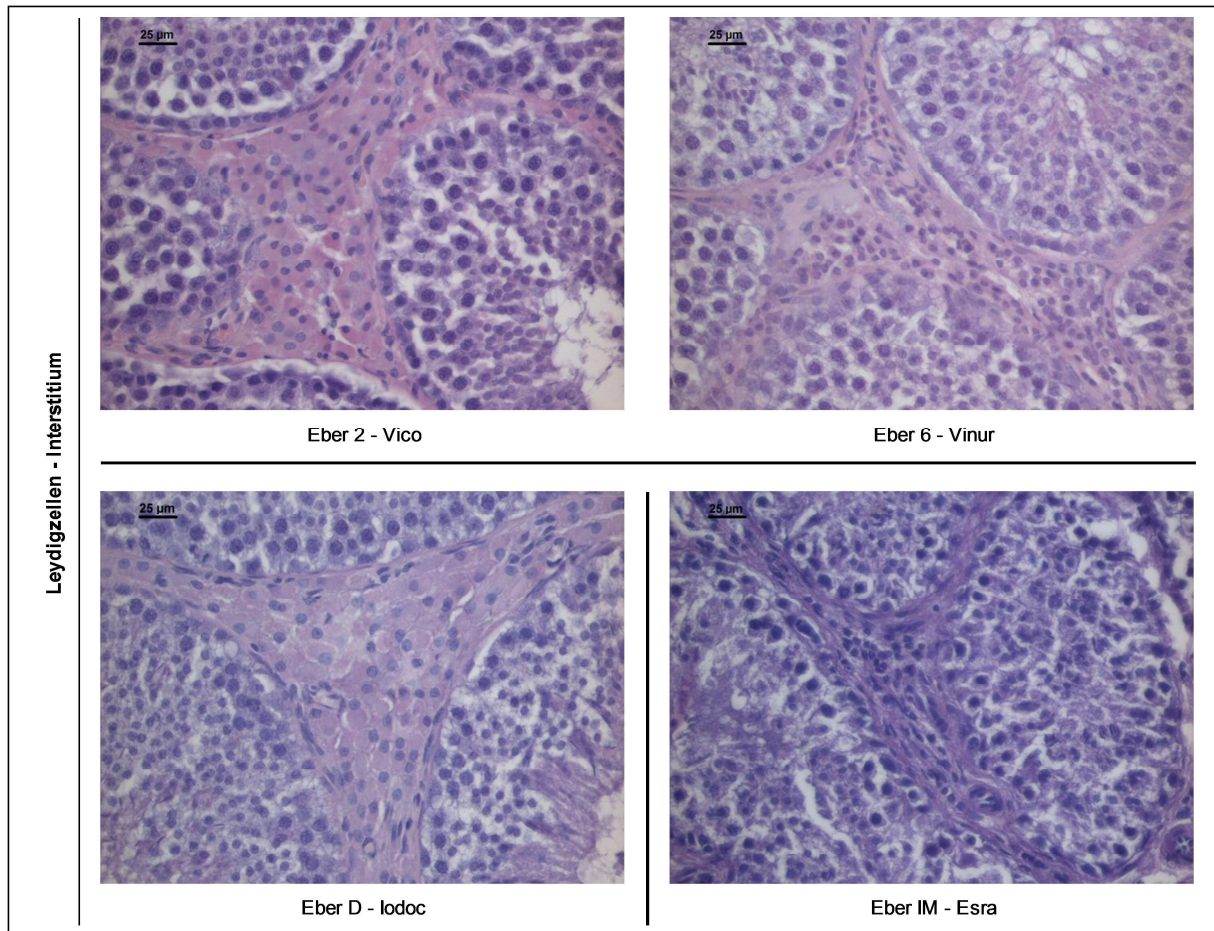


Abb. 5. 15 b Beispiele für die Ausprägung der Leydigzellen im Interstitialgewebe in Ebern der Behandlungsgruppe (oben), einem Kontrolltier (unten links) und einem immunisierten Eber (unten rechts).

5.3.2.2. Auswertung der Spermatogeneseaktivität

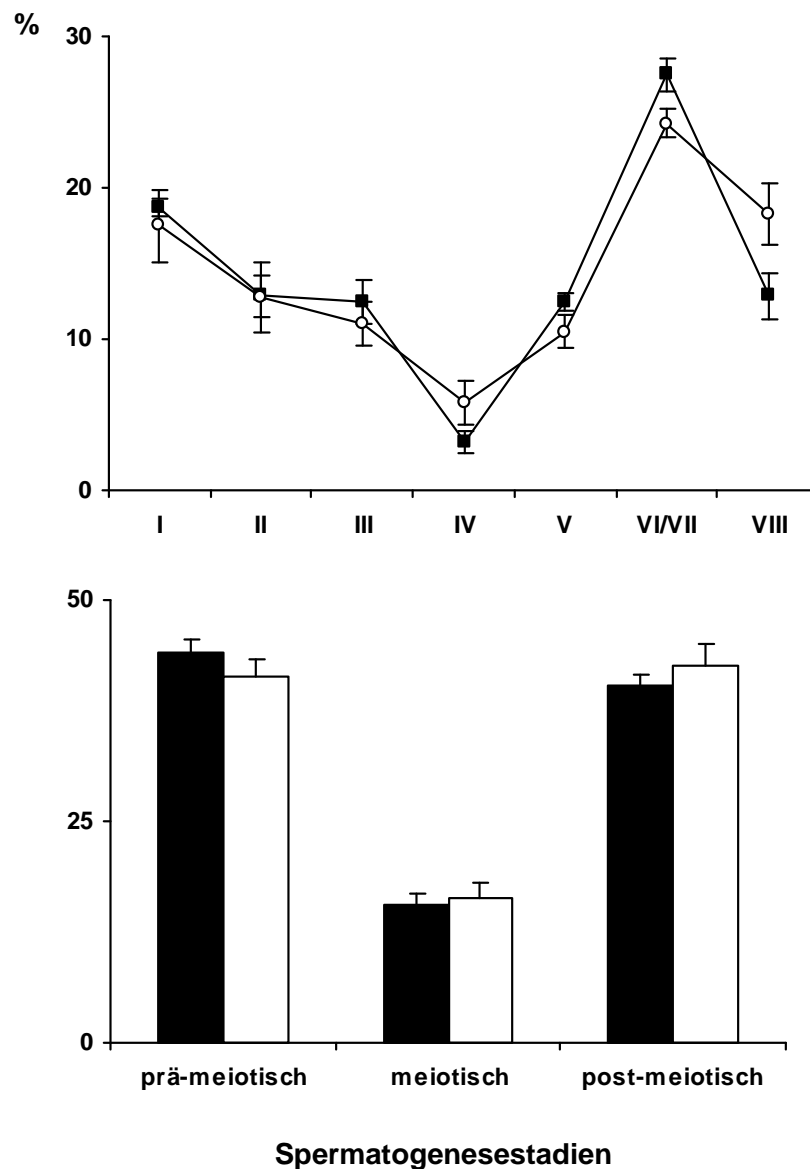


Abb. 5.16 Relative Verteilung der unterschiedlichen Spermatogenesestadien in immunisierten (n = 6, schwarze Balken) und intakten Ebern (n = 4, weiße Balken).

Die acht Stadien der Spermatogenese (SWIERSTRA 1968; oben) wurden zu prämeiotischen (I, II, III), meiotischen (IV, V) und postmeiotischen (VI/VII, VIII) Phasen zusammengefasst (GARCIA-GIL et al. 2002; unten). Die Werte sind als MW \pm SEM gegeben. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren der Behandlungs- und Kontrollgruppe.

Alle Eber hatten Keimepithelien, die alle Stadien der Spermatogenese und alle Typen an spermatogenen Zellen (Abb. 5.15) aufwiesen. Es war eine Tendenz dahingehend erkennbar, dass die weiter fortgeschrittenen Spermatogenesestadien – wie

Stadium IV und VIII – in den immunisierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren unterrepräsentiert waren. Eine weitere Differenzierung innerhalb der behandelten Tiere führte zu keinem signifikanten Unterschied. Bei den prämeiotischen Spermatogenesestadien (I, II, III) tendierten die behandelten Eber dazu die Kontrolltiere zu übertreffen, während sie sich dem „Eberlevel“ im Hinblick auf die meiotischen (IV, V) und postmeiotischen Stadien (VI/VII, VIII) lediglich annäherten.

6. DISKUSSION

6.1. Auswirkungen der Wiederaufnahme auf hormoneller Ebene

Die zeitlichen Beziehungen zwischen zweiter Immunisierung, Anstieg des Titers und die hormonellen Auswirkungen wurden bereits früher für einen Zeitraum von etwa 40 Tagen dargestellt (CLAUS et al. 2007). In dieser früheren Studie, war die Hodenfunktion am Versuchsende noch vollständig unterdrückt.

In der vorliegenden Studie zeigte sich zu Beginn eine vergleichbare „Short time-relationship“ (Vgl. Abb. 5.1), der Versuchsrahmen wurde aber im Vergleich zu der vorangegangenen Studie (CLAUS et al. 2007) bis zu dem Zeitpunkt (182 Tage nach der zweiten Immunisierung) ausgedehnt, an dem alle Eber ihre Hodenfunktion wieder aufgenommen hatten.

Zwei Impfdosen eines Impfstoffes gegen GnRH, welche im Abstand von etwa 4 Wochen den Ebern appliziert wurden, führten zu einer effektiven Antikörperbildung und zu einem Abfall von LH und nachfolgend zu einem Abfall der Hodensteroide. Es wurde gezeigt, dass die zweite Immunisierung zu maximalen Antikörpertitern führte und einem zeitgleichen Abfall von LH innerhalb einer Woche (CLAUS et al. 2007) (Vgl. Abb. 5.1).

Die Dauer der Wiederaufnahme der Hodenfunktion nach der Immunisierung gegen GnRH mit IMPROVAC® (EINARSSON 2006) oder anderen Impfstoffformulierungen (MELOEN et al. 1994, CARATY & BONNEAU 1986) wurde bislang nicht untersucht. Bei anderen Spezies, z.B. bei kryptorchen Hengsten (SCHANBACHER & PRATT 1985) und Mastbullen (ADAMS & ADAMS 1992), dauerte es bis zu einem halben Jahr bis wieder physiologische Hodengrößen erreicht wurden.

In vergleichbarer Weise wurde das Niveau der Gonadotropinsekretion von postmenopausalen Frauen innerhalb von 180 Tagen nach erfolgreicher Immunisierung umgekehrt (GUAL et al. 1997). Verlängerte Zeitraster wurden für Schafböcke (BROWN et al. 1994) und wildlebende Böcke (GODFREY et al. 1996) berichtet, wonach wenige einzelne Schafböcke bis hin zu 80 Wochen oder einzelne Böcke bis hin zu 60 Wochen nach der zweiten Immunisierung noch subnormal große Hoden hatten. Allerdings ist denkbar, dass bei streng saisonalen Schafrassen das Ende des Immunisierungseffektes unmittelbar von einer saisonalen Hemmung der Hodenfunktion gefolgt war.

In der vorliegenden Studie wurde die Testosteronsynthese sehr unterschiedlich wieder aufgenommen: die Zeitspannen zwischen den Tieren lagen breitgefächert bei 10 bis 24 Wochen (entspricht 2,3 – 5,6 Monate) nach der wirkungsentfaltenden zweiten Immunisierung (Vgl. Abb. 5.6 a, b).

Auch *AWONIYI* et al. 1990 fanden eine spontane Reversibilität der Immunisierung gegen LHRH 25 Wochen (entspricht 5,8 Monate) nach der zweiten Immunisierung. Zu beachten bei diesem Ergebnis ist jedoch, dass kein kontinuierlicher Verlauf der LH- oder Testosteronplasmakonzentrationen dokumentiert wurde (in Woche 17 nach der zweiten Immunisierung deutete sich noch keine Wiederaufnahme der Hodenfunktion an). Zudem hatten die Tiere eine dritte Immunisierung 3 Wochen nach der zweiten Boosterinjektion erhalten.

Es war zu erwarten, dass ein anfänglich hoch entwickelter Antikörpertiter auch zu einer verspäteten Wiederaufnahme der Hodenfunktion führt, aber diese Annahme konnte nicht belegt werden. Obwohl der Eber mit der geringst entwickelten Titerhöhe zuerst die Steroidogenese wieder aufgenommen hat, waren die zwei Eber mit den höchsten Leveln an Antikörpertitern der zweite und vierte in der Sequenz der Wiederaufnahme der Hodenfunktion (Vgl. Abb. 5.2 a, b und Abb. 5.6 a, b). Gleichmaßen konnte kein Grenzwert des Antikörpertiters für die Wiederaufnahme der Hodenfunktion abgeleitet werden. Demzufolge scheinen für die Wiederaufnahme der Hormonsynthese und damit auch der Androstenoneinlagerung in das Fettgewebe hohe individuelle Unterschiede zu bestehen, die ihrerseits auf individuellen Unterschieden bezüglich der Ansprechbarkeit der Leydigzellen auf LH beruhen könnten, aber auch auf einer individuellen Sensitivität der Hypophyse auf minimale GnRH-Werte zu reagieren. Frühere Studien mit GnRH immunisierten Ebern führten zu Testosteronkonzentrationen um die Nachweisgrenze (*AWONIYI* et al. 1988b), aber ein standardisierter „LH-challenge“ führte zu einem Testosteronanstieg, welcher nur ein Drittel des Anstiegs in nicht-immunisierten Kontrollen betrug. Infolgedessen wird die Ansprechbarkeit der Leydigzellen nicht allein durch das Level der LH-Konzentrationen bestimmt, sondern auch von der Präsenz an LH-Rezeptoren (*MacKINNON* et al. 1978). Daher wird angenommen, dass FSH, welches jedoch nicht durch die Immunisierung gegen GnRH beeinflusst wird (*AWONIYI* et al. 1988a, *AWONIYI* et al. 1988b, *WAGNER & CLAUS* 2004), sich wiederum auf die LH Sensitivität auswirkt (*MacKINNON* et al. 1978). Da unlängst gezeigt wurde, dass die Leydigzellen der Eber ausschließlich LH Rezeptoren exprimieren aber keine FSH Rezeptoren (*CLAUS*, persönliche

Mitteilung), ist es wahrscheinlich, dass die Immunisierung gegen GnRH zu einem Verlust an LH Rezeptoren führt und somit zu einer vorübergehenden Resistenz gegenüber LH, wenn dieses im Zuge der Wiederaufnahme wieder ansteigt. Der tierindividuelle Anstieg von LH wurde detailliert durch die Bestimmung des pulsatilen Freisetzungsmusters von LH in den drei 24h Windows (Vgl. Abb. 5.3 a, b) beschrieben. Es ist bekannt, dass solch ein Anstieg des pulsatilen Sekretionsmusters während der pubertären Entwicklung bei verschiedenen Spezies stattfindet – die menschliche eingeschlossen

(*OERTER et al. 1990*).

Da FSH nicht durch die Immunisierung von Ebern angesprochen wird (*AWONIYI et al. 1988a, AWONIYI et al. 1988b, WAGNER & CLAUS 2004*) (Vgl. Abb. 5.4 a, b), wird angenommen, dass FSH entweder durch ein separates Releasing Hormon reguliert wird oder durch die Sekretion von Activin im Hypothalamus (*PADMANABHAN & McNEILLY 2001*).

Mit der Wiederaufnahme der Leydigzellaktivität, wird auch der anabole Zustand aufgrund der Synthese von Testosteron und 17β -Estradiol wieder aufgenommen (Vgl. Abb. 5.5).

Die Entwicklung der Skatolkonzentrationen im Blutplasma steht nur mäßig mit dem hormonellen Zustand der Eber in Verbindung; es ist bekannt, dass auch Sauen und Kastraten niedrigere Skatolkonzentrationen aufweisen (*LOESEL et al. 2006*) (Vgl. Abb. 5.11 a, b).

Im Gegensatz dazu folgt Androstenon genau dem Verlaufsmuster der anderen Hodensteroide (Vgl. Abb. 5.8). Da erst drei von sechs Ebern begonnen haben Androstenon zu synthetisieren, standen die Konzentrationen des Fettspeichers noch nicht im Gleichgewicht mit den Blutplasmakonzentrationen und überschritten bei keinem Eber den gesetzlich festgelegten Grenzwert von $0,5 \mu\text{g}$ Androstenon/g Fett (Vgl. Tab. 5.2). Dieser Grenzwert entspricht den EU Richtlinien (*EINARSSON 2006*).

Im Hinblick auf die praktische Anwendung der Immunisierung gegen GnRH, wurde gezeigt, dass die Immunantwort für einen hinreichend langen Zeitraum anhält, so dass nicht nur die Elimination von Androstenon aus dem Fettgewebe gesichert ist, sondern auch, dass alle Eber, die das Schlachtendgewicht verzögert erreichen, keine weiteren Immunisierungen benötigen.

6.2. Auswirkungen der Wiederaufnahme auf die Gewebeparameter

Auf Gewebeebene, kann die Impfung zu einem Verlust an Leydigzellplasma um bis zu 90 % führen – und daraus resultierend zu einem Verlust der Reproduktionshormone – während die Anzahl der Leydigzellen konstant bleibt. Zusätzlich, wurde der Durchmesser der Hodentubuli um 30 % vermindert. Die Mitoserate wurde verringert und die Spermatogenezellen um etwa 60 % reduziert - ausgenommen die Typ A Spermatogonien (WAGNER & CLAUS 2004).

Die vorliegende Studie zeigt auch, dass die histologischen Merkmale eine beträchtliche Variationsbreite aufweisen, welche sich nur teilweise durch den GnRH Antikörpertiter oder periphere Steroidkonzentrationen erklären lassen. Deshalb sind weiterführende Untersuchungen zu diesem Phänomen notwendig.

Die Hodenmorphologie zeigte, dass das Hodengewicht in Beziehung zu den Testosteronkonzentrationen steht; aber nur ein Teil dieser Eber, welche früh begannen ihre Hormonproduktion wieder aufzunehmen, haben das Hodengewicht der Kontrolleber erreicht, während die anderen sogar die Kontrollen übertrafen (Vgl. Tab. 5.5 und Abb. 5.12 a, b). Letztere Feststellung könnte mit einem „Rebound-Phänomen“ zusammenhängen, wie es sich auch in der pubertären Entwicklung (ALLRICH et al. 1982) zeigt, wenn die Hodenfunktion in einem wellenartigen Muster optimiert wird bis der reife Zustand erreicht wurde (ALLRICH et al. 1983, WAGNER & CLAUS 2008a).

Im Gegensatz dazu, ist es wohl bekannt, dass das Gewicht der akzessorischen Geschlechtsdrüsen durch gonadale Steroide kontrolliert wird (Vgl. Tab. 5.5 und Abb. 5.14 a, b), Testosteron und 17β -Estradiol bei Ebern eingeschlossen (JOSHI & RAESIDE 1973, CLAUS & HOFFMANN 1980).

Der hauptsächlich bestimmende Faktor für die Hodengröße ist der funktionelle Zustand der Leydigzellen. Es wird als allgemeingültig betrachtet, dass in adulten männlichen Lebewesen, die Anzahl der Leydigzellen konstant ist und daher nicht die Veränderungen in der Hodengröße bedingen, wie sie in der vorliegenden Studie festgestellt wurden (MENDIS-HANDAGAMA & ARIYARATNE 2001).

Stattdessen bestimmen unter anderem die Größe der Kerne und die Menge des Cytoplasmas die Hodengröße (Vgl. Tab. 5.8 und Abb. 5.15 b). Der Anstieg der Hoden-

größe und nachfolgend der funktionelle Zustand der Leydigzellen, wird durch LH angestoßen, wenn der Abfall der GnRH Antikörper, die Sekretion von LH durch die Hypophyse zulässt. Es wurde früher gezeigt, dass beim Eber LH Rezeptoren ausschließlich in den Leydigzellen zu finden sind (PEYRAT et al. 1981).

Folglich agiert LH als ein Stimulus für die Leydigzellvergrößerung, welche zu einem Anstieg der Hodengröße und einem Anstieg der Testosteron- und Estradiolkonzentrationen führt.

Unsere Daten zeigen zusätzlich, dass der Durchmesser der Hodentubuli zur Morphologie des Hodens beiträgt (Vgl. Tab. 5.6 und Tab. 5.7).

Studien an Mäusestämmen, die sich in ihrer Hodengröße unterschieden, führten zu den Schlussfolgerungen, dass die Hodengröße über mindestens zwei autosomale Gene reguliert wird, die ihren Effekt über die Regulation der Sertolizellzahl ausüben (CHUBB 1992).

Wie schon früher beschrieben (LUNSTRA et al. 2003, WAGNER & CLAUS 2008b) spielten auch in unserer Studie mit genetisch einheitlichen Tieren die Sertolizellen keine Rolle bei der Regulation der Hodengröße. Vielmehr erklären der Effekt der hormonellen Regulation der Spermatogenese und die Leydigzellfunktion die Unterschiede der Hodengröße (Vgl. Tab. 5.7 und Tab. 5.8).

WISE et al. 2000 sehen einen Zusammenhang zwischen hohen zirkulierenden FSH Konzentrationen und kleineren Hoden sowie einer geringeren Spermienproduktion. In der vorliegenden Arbeit hatten die Tiere (Eber 5, 6) mit den höheren FSH-Basalleveln und -Pulsen jedoch die kleinsten Hoden.

Die Höhe des Keimepithels zeigte eine geringgradige Abhängigkeit von der Testosteronsekretion und war kleiner in den spät wiederaufnehmenden Tieren der Behandlungsgruppe als in den frühen Tieren (Vgl. Tab. 5.7 und Abb. 5.15 a).

Die Höhe des Keimepithels der Kontrollgruppe überschritt das der Behandlungsgruppe, vermutlich bedingt durch Unterschiede in der mitotischen Aktivität (Vgl. Tab. 5.7). Es wurde gezeigt, dass die mitotische Aktivität sowohl durch die stimulierenden Effekte von Estradiol zum einen über seinen α -Rezeptor – vorhanden in den Typ A und B Spermatogonien bis hin zum mittleren Pachytän-Stadium der Primärspermatozyten – und zum anderen über seinen Östrogenrezeptor, der in den Sertolizellen exprimiert wird, verbessert wird (LEKHOTA et al. 2006); deshalb führt die Östrogensubstitution von GnRH vakzinierten Ebern zu einem Anstieg der mitotischen Aktivität (WAGNER et al. 2006).

6.3. Konsequenzen für die praktische Anwendung

Alles in allem zeigen unsere Daten, dass die Normalisierung der Hodenfunktionen nach dem Einsetzen der Hormonsynthese (Testosteron > 0,5 ng/ml) noch weitere 13 Wochen benötigt bis die Hodenfunktion vergleichbar der physiologischen Hodenfunktion in unbehandelten Kontrollen ist.

Für die praktische Anwendung im Rahmen der Mast männlicher Schweine ist damit die aktive Immunisierung gegen GnRH ein praktikables Verfahren. Die ermittelten zeitlichen Zusammenhänge zwischen der zweiten anamnestischen Vakzinierung und der Hemmung bzw. Wiederaufnahme der Hodenfunktion erlauben es, einen optimalen Zeitpunkt der zweiten Impfung vorzuschlagen.

Er sollte so gewählt werden, dass:

- die Hodenfunktion möglichst spät inhibiert wird. Damit kann die anabole Wirkung der Gonadensteroiden und damit ein Mastvorteil zumindest für einen Teil der Mastphase genutzt werden
- die endokrine Hodenfunktion durch Abklingen des Immunisierungseffektes noch nicht wieder eingesetzt hat und damit noch kein Geschlechtsgeruch auftritt

Vorzuschlagen ist, dass die zweite Impfung frühestens 10 Wochen vor dem angestrebten Schlachttermin durchgeführt wird. Dieser zeitliche Rahmen ergibt sich aus der zweimaligen Vakzinierung der Eber im Abstand von 4 Wochen zuzüglich ca. 14 Tage Titerentwicklung und Testosteronabfall in Verbindung mit ca. 3-4 Wochen „Androstenon-Clearance“ aus dem Fettgewebe.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Traditionell werden männliche Ferkel chirurgisch ohne Schmerzausschaltung kastriert, damit die Schlachttierkörper von Ebern nicht durch den Geschlechtsgeruch Androstenon untauglich werden.

Die aktive Immunisierung gegen GnRH bietet eine schmerzfreie Alternative zur konventionellen Kastration, was die Sekretion von LH und damit nachgeordnet die Steroidogenese in den Leydigzellen unterbindet.

Daten zu den zeitlichen Zusammenhängen zwischen der zweiten Immunisierung und der Wiederaufnahme der Leydigzellfunktion lagen bislang nicht vor.

Sechs katheterisierte Eber erhielten die zweite Immunisierung (IMPROVAC[®]) im Alter von 26 Wochen (Tag 0). Im Blutplasma wurden die Antikörpertiter gegen GnRH, LH, FSH, die Hodensteroide (Testosteron, 17 β -Estradiol, Androstenon) und Skatol bis zu dem Zeitpunkt gemessen, an dem die Testosteronplasmakonzentrationen den Grenzwert von 0,5 ng/ml in allen Ebern überschritten.

In der Versuchswoche 10 fiel der GnRH-Antikörpertiter wieder ab. Die Wiederaufnahme der Hodenfunktion wurde durch die erhöhte pulsatile Freisetzung von LH weiter vorangetrieben, während die Steroidsynthese in den einzelnen Tieren verzögert eintrat und in hohem Maße zwischen den Ebern variierte; von der Entwicklung des initialen Antikörpertiters zeigte sie sich unabhängig.

Ein Hauptgrund für den verspäteten Eintritt der Leydigzellfunktion nach Abfall des Antikörpertiters scheint eine variable Resistenz gegen die Wirksamkeit von LH zu sein.

Zusätzlich wurden die Hoden derselben sechs Eber im Alter von 52 Wochen (26 Wochen nach der zweiten Immunisierung) histologisch untersucht und die Ergebnisse mit 4 intakten Ebern verglichen, welche im selben Alter geschlachtet wurden.

Das Hodengewicht zeigte eine Abhängigkeit von den Testosteronkonzentrationen im Blutplasma. Das Hodengewicht derjenigen Tiere der Behandlungsgruppe, die zuerst ihre Hodenfunktion wieder aufgenommen hatten, übertraf sogar das der Kontrollen, was sich wohl auf ein „Rebound-Phänomen“ zurückführen lässt. Wesentliche Unterschiede im Hodengewicht ergaben sich aufgrund von Unterschieden im Cytoplasmagehalt der Leydigzellen und weniger durch die Größe des Leydigzellkernes. Darüber hinaus war die Höhe des Keimepithels geringgradig abhängig von den Testos-

teronkonzentrationen und trug mittelgradig zu den Unterschieden im Hodengewicht bei.

Insgesamt benötigte die restitutio ad integrum der Hodenfunktion nach der Wiederaufnahme der Steroidogenese weitere 13 Wochen.

8. SUMMARY

Traditionally, male pigs are surgically castrated without anaesthesia to avoid later occurrence of the sex odour androstenone in the carcass.

Active immunization against GnRH is a painless alternative which inhibits LH and thus steroidogenesis in the Leydig cells.

Time between second vaccination and return of Leydig cell function is unknown. Therefore six catheterized boars received the second dose (IMPROVAC®) at 26 weeks of age (day 0). Titre, LH, FSH, testicular steroids (testosterone, 17 β -estradiol, androstenone), and scatoles were determined in blood until testosterone exceeded 0.5 ng/mL again in all boars.

At week 10 the titre was low again. Return of testicular function was preceded by increased pulsatile secretion of LH but onset of steroid synthesis was delayed and highly variable (10-24 weeks) and was not related to the initial antibody titre. A major reason for delayed onset of Leydig cell function apparently is a variable refractoriness against LH.

In addition histological data on testes characteristics of the same six boars at an age of 52 weeks (26 weeks after last immunization) were analyzed and data were compared to another four boars which were not immunized but slaughtered at the same age. Testis weight was related to the concentration of testosterone in blood. In boars, that first returned to testicular function, testis weight even exceeded those in controls probably due to rebound phenomena. Differences in testis weight were mainly due to differences of Leydig cell content of cytoplasm and less to the size of nuclei. Additionally, the height of seminiferous epithelium was slightly dependent on testosterone concentrations and contributed moderately to differences in testis weight. Altogether, normalization of testicular function, even after return to steroidogenesis, requires another 13 weeks.

9. LITERATURVERZEICHNIS

ABERCROMBIE M 1946

Estimation of nuclear population from microtome sections

The Anatomical Record 94, 239-246

ADAMS TE, ADAMS BM 1992

Feedlot performance of steers and bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone

Journal of Animal Science 70, 1691-1698

ADAMS TE, DALEY CA, ADAMS BM, SAKURAI H 1993

Testis function and feedlot performance of bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone: effect of implants containing progesterone and estradiol benzoate

Journal of Animal Science 71, 811-817

ADAMS TE, DALEY CA, ADAMS BM, SAKURAI H 1996

Testis function and feedlot performance of bulls actively immunized against GnRH: effect of age at immunization

Journal of Animal Science 74, 950-954

ALLRICH RD, CHRISTENSON RK, FORD JJ, ZIMMERMAN DR 1982

Pubertal development of the boar: testosterone, estradiol-17 β , cortisol and LH concentrations before and after castration at various ages

Journal of Animal Science 55(5), 1139-1146

ALLRICH RD, CHRISTENSON RK, FORD JJ, ZIMMERMAN DR 1983

Pubertal development of the boar: age-related changes in testicular morphology and in vitro production of testosterone and estradiol-17 β

Biology of Reproduction 28, 902-909

ARIMURA A, SATO H, KUMASAKA T, WOROBEK RB, DEBELJUK L, et al. 1973

Production of antiserum to LH-releasing hormone (LH-RH) associated with gonadal atrophy in rabbits: development of radioimmunoassays for LH-RH
Endocrinology 93, 1092-1103

AUMÜLLER G 1978

Morphologie des Säugerhodens: Leydig-Zellen, Blut-Hoden-Schranke und Rete testis

Physiologie und Pathologie der Hodenfunktion: Arbeitstagung Canstein
Eds. Senge T Thieme Verlag Stuttgart 20-40

AWONIYI CA, CHANDRASHEKAR V, ARTHUR RD, SCHANBACHER BD, AMADOR AG, et al. 1988a

Changes in testicular morphology in boars actively immunized against gonadotropin releasing hormone

Journal of Andrology 9, 160-171

AWONIYI CA, CHANDRASHEKAR V, ARTHUR RD, SCHANBACHER BD, AMADOR AG, et al. 1988b

Pituitary and Leydig cell function in boars actively immunized against gonadotropin-releasing hormone

Journal of Reproduction and Fertility 84, 295-302

AWONIYI CA, CHANDRASHEKAR V, ARTHUR RD, FALVO RE 1990

Spontaneous reversal of immunologically induced sterility in adult boars actively immunized against LHRH

Neuroendocrinology Letters 12 (2), 121-131

BACKSTROEM L, HENRICSON B 1971

Intersexuality in the pig

Acta veterinaria Scandinavica 12, 257-273

BARTON-GADE PA 1987

Meat and fat quality in boars, castrates and gilts

Livestock Production Science 16, 187-196

BAUER 2010

Effects of immunological castration on the regulation of metabolism in boars

Diss. sc. agr., Institut für Tierhaltung und Tierzucht, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie, Universität Hohenheim

BELLOT R, VOGT D 1994

Heritability of susceptibility to cryptorchidism in swine

Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal 2

BERGMANN M 1987

Photoperiod and testicular function in *Phodopus sungorus*.

Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology 105, 1-76

BERNARD DJ, WOODRUFF TK 2001

Inhibin binding protein in rats: alternative transcripts and regulation in the pituitary across the estrous cycle

Molecular Endocrinology 15, 654-667

BERNDTSON WE, IGBOELI G, PARKER WG 1987

The numbers of Sertoli cells in mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis

Biology of Reproduction 37, 60-67

BONNEAU M 1982

Compounds responsible for boar taint, with special emphasis on androstenone: a review.

Livestock Production Science 9, 687-705

BONNEAU M, DUFOUR R, CHOUVET C, ROULET C, MEADUS W, et al. 1994

The effects of immunization against luteinizing hormone releasing hormone on performance, sexual development, and levels of boar taint-related compounds in intact male pigs

Journal of Animal Science 72, 14-20

BRANSCHIED W 1993

Das trojanische Pferd: Eberfleisch

Fleischwirtschaft 74 (3), 361

BROWN BW, MATTNER PE, CARROLL PA, HOLLAND EJ, PAULL DR, et al. 1994

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

Journal of Reproduction and Fertility 101, 15-21

BROWN P, MC NEILLY AS 1999

Transcriptional regulation of pituitary gonadotrophin subunit genes Review

Reviews of Reproduction 4, 117-124

BROOKS RI, PEARSON AM, HOGBERG MG, PESTKA JJ, GRAY JI 1986

A immunological approach for prevention of boar odor in pork

Journal of Animal Science 62, 1279-1289

BRÜSSELER ERKLÄRUNG 2010

Europäische Erklärung über Alternativen zur chirurgischen Kastration bei

Schweinen – European declaration on alternatives to surgical castration of pigs

Hrsg. Europäische Kommission

http://ec.europa.eu/food/animal/welfare/farm/docs/castration_pigs_declaration_en.pdf

BUBENIK GA, MORRIS JM, SCHAMS D, CLAUS R 1982

Photoperiodicity and circannual levels of LH, FSH and testosterone in normal and castrated male, white-tailed deer

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 60, 788-793

CARATY A, BONNEAU M 1986

Immunisation active du porc mâle contre la gonadolibérine effects sur la sécrétion d'hormones gonadotropes et sur la teneur en 5 α -androst-16-ène-3-one du tissu adipeux

Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Series III 303, 673-676

CARREAU S, BOURGUIBA S, LAMBARD S, GALERAUD-DENIS I, GENISSEL C, et al. 2001

Aromatase expression in male germ cells

Steroid Biochemistry and Molecular Biology 79, 203-208

CHEN S, WANG J, YU G, LIU W, PEARCE D 1997

Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation

Journal of Biological Chemistry 272 (22), 14087-14092

CHUBB C 1992

Genes regulating testis size

Biology of Reproduction 47, 29-36

CLARKE I, WALKER J, HENNESSY D, KREEGER J, NAPPIER J, CRANE J 2008

Inherent food safety of a synthetic Gonadotropin-Releasing Factor (GnRF)

Vaccine for the control of boar taint in entire male pigs

Journal of Applied Research in Veterinary Medicine 6(1), 7-14

CLAUS R 1975

Neutralization of pheromones by antisera in pigs

In: Nieschlag E, editor. Immunization with hormones in reproduction research

Amsterdam North Holland Publishing Company, pp. 189-197

CLAUS R 1976

Messung des Ebergeruchsstoffes im Fett von Schweinen mittels eines Radioimmunotests

2. Mitteilung: Zeitlicher Verlauf des Geruchsdepotabbaues nach der Kastration

Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie 93, 38-47

CLAUS R 1978

Der Geschlechtsgeruch des Ebers aus der Sicht des Tierarztes, des Verbrauchers und der Tierproduktion

Wiener tierärztliche Mitschrift 65, 381-388

CLAUS R 1979

Pheromone bei Säugetieren unter besonderer Berücksichtigung des Ebergeruchsstoffes und seiner Beziehung zu anderen Hodensteroiden

Beiheft 10: Fortschritte in der Tierphysiologie und Tierernährung, Paul Parey, Hamburg und Berlin, 1-136

CLAUS R 1983a

Ebermast oder „Reinheitsgebot“ für Schweinefleisch?

Fleischschau und Lebensmittelkontrolle 35, 4-6

CLAUS R 1983b

„Sex in der Luft“ oder: Pheromone steuern das Sexualleben

Münchener medizinische Wochenschrift 125. Jahrgang 36, 767-770

CLAUS 1989/90

Pheromone: Duftstoffe steuern das Sexualleben

in: Studium Generale, Vorträge zum Thema Mensch und Tier, Band VIII, Wintersemester 1989/90, Tierärztliche Hochschule Hannover

CLAUS R 1990

Physiological role of seminal components in the reproductive tract of the female pig

Journal of Reproduction and Fertility 40 (Suppl), 117-131

CLAUS R 1993

Resumée: Vergleichende Wertung der bisherigen Ergebnisse aus dem Gemeinschaftsversuch zur Ebermast

Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung Kulmbach 32 (120), 150-152

CLAUS R, BINGEL A, HOFACKER S, WEILER U 1990a

Twenty-four hour profiles of growth hormone (GH) concentrations in mature female and entire male domestic pigs in comparison to mature wild boars (*sus scrofa* L.)

Livestock Production Science 25, 247-55

CLAUS R, DEHNHARD M, HERZOG A, BERNAL-BARRAGAN H, GIMÉNEZ T 1993

Parallel measurements of indole and skatole (3-methylindole) in feces and blood plasma of pigs by HPLC

Livestock Production Science 34, 115-126

CLAUS R, GIMÉNEZ T 1977

Diurnal rhythm of 5 alpha-androst-16-en-3-one and testosterone in peripheral plasma of boars

Acta Endocrinologica 84, 200-206

CLAUS R, HERBERT E, DEHNHARD M 1997

Comparative determination of the boar taint steroid androstenone in pig adipose tissue by a rapid enzyme immunoassay and an HPLC-method

Archiv für Lebensmittelhygiene 2, 27-30

CLAUS R, HOFFMANN B 1980

Oestrogens, compared to other steroids of testicular origin, in blood plasma of boars

Acta Endocrinologica 94, 404-411

CLAUS R, LACORN M, DANOWSKI K, PEARCE MC, BAUER A 2007

Short term endocrine and metabolic reactions before and after second immunization against GnRH in boars

Vaccine 25, 4689-4696

CLAUS R, LACORN M, OSTERTAG C 2008a

An improved microtitre enzyme immunoassay to measure the boar taint steroid
5 α -androst-16-en-3-one in blood plasma of pigs

Meat Science 80(3), 934-938

CLAUS R, LOESEL D, LACORN M, MENTSCHEL J, SCHENKEL H 2003

Effects of butyrate on apoptosis in the pig colon and its consequences for skatole formation and tissue accumulation

Journal of Animal Science 81, 239-248

CLAUS R, OVER R, DEHNHARD M 1990b

Effect of male odour on LH secretion and the induction of ovulation in seasonally anoestrous goats

Animal Reproduction Science 22, 27-38

CLAUS R, ROTTNER S, RUECKERT C 2008b

Individual return to Leydig cell function after GnRH-immunization of boar

Vaccine 26, 4571-4578

CLAUS R, SCHOPPER D, WAGNER HG 1983

Seasonal effects on steroids in blood plasma and seminal plasma of boars

Journal of Steroid Biochemistry 19, 725-729

CLAUS R, WEILER U 1987

Fortpflanzung beim Schwein: I. Die männliche Reproduktion

VET 9-87, 19-26

CLAUS R, WEILER U 1994

Endocrine regulation of growth and metabolism in the pig: a review.

Livestock Production Science 37, 245-260

CLAUS R, WEILER U, HERZOG A 1994

Physiological aspects of androstenone and skatole formation in the boar: a review with experimental data

Meat Science 38, 289-305

CLERMONT Y 1972

Kinetics of Spermatogenesis in Mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal

Physiological Reviews 52, 198-235

CRANE J 2006

Improvac[®] - Ein neuer Weg zur Kontrolle des Ebergeruchs beim männlichen Schwein

Symposium Proceedings, Improvac[®], eine Alternative zur chirurgischen Kastration, IPVS Congress 16-19 July 2006, Copenhagen

CULIER MD & NEGRO-VILAR A 1986

Evidence that pulsatile Follicle-stimulating hormone secretion is independent of endogenous luteinizing hormone releasing hormone

Endocrinology 118, 609-612

DANIEL MJ, SHENOY EVB, BOX PG 1984

Immunization of pigs against the boar taint steroid androstenone

Journal of Comparative Pathology 94, 319-321

DAXENBERGER A, HAGELEIT M, KRAETZL WD, LANGE IG, CLAUS R, et al.
2001

Suppression of androstenone in entire male pigs by anabolic preparations

Livestock Production Science 69, 139-144

DEHNHARD M, CLAUS R, HILLENBRAND M, HERZOG A 1993

High-performance liquid chromatographic method for the determination of 3-methylindole (skatole) and indole in adipose tissue of pigs

Journal of Chromatography 616, 205-209

DOBROWOLSKI A, HOERETH R, BRANSCHIED W 1993

Der Schlachtkörperwert von Ebern und Börgen und Probleme der Klassifizierung

Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung Kulmbach 32 (120), 109-115

DÜSSELDORFER ERKLÄRUNG 2008

Gemeinsame Erklärung zur Ferkelkastration

Hrsg. Deutscher Bauernverband, Verband der Fleischwirtschaft, Hauptverband des Deutschen Einzelhandels.

<http://media.repro-mayr.de/30/85830.pdf>

DUNSHEA FR, COLANTONI C, HOWARD K, MCCAULY I, JACKSON P, et al. 2001

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

Journal of Animal Science 79, 2524-2535

ECHTERNKAMP SE, TEAGUE HS, PLIMPTON RF, GRIFO AP 1969

Glandular development, hormonal response and boar odour and flavour intensity of untreated and diethylstilbestrol-implanted boars

Journal of Animal Science 28, 653-658

EINARSSON S 2006

Vaccination against GnRH: pros and cons

Acta Veterinaria Scandinavica 48(Suppl. I), 1-4

ELSELY FWH 1968

Bericht über subjektive Versuche und über die Empfindlichkeit verschiedener Personen gegenüber dem natürlichen und dem synthetisch produzierten Ebergeruch

Meeting of the European Association for Animal Production, Commission on Pig Production, Dublin

ERTL G, LUKAS K, HAGELSCHUER H 1972

Versuche zur Desexualisierung von Ebern mit Hilfe von Hormonsubstanzen
Dissertation Humboldt-Universität Berlin, Autorenkollektiv

FACHINFORMATION IMPROVAC[®] ad us. vet. 2007

Stand der Information: 01/2007

Pfizer GmbH, Karlsruhe (Deutschland)

Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie,

Tierarzneimittel Kompendium der Schweiz: www.vetpharm.uzh.ch

FACHINFORMATION ISOFLO[®] ad us. vet. 2009

Stand der Information: 09/2009

Abbott AG, Baar (Schweiz)

Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie,

Tierarzneimittel Kompendium der Schweiz: www.vetpharm.uzh.ch

FALVO RE, CHANDRASHEKAR V, ARTHUR RD, KUENSTLER AR, HASSON T, et al. 1986

Effect of active immunization against LHRH or LH in boars: reproductive consequences and performance traits

Journal of Animal Science 63, 986-994

FINNERTY M, ENRIGHT WJ, MORRISON CA, ROCHE JF 1994

Immunization of bull calves with a GnRH analogue-human serum albumin conjugate: effect of conjugate dose, type of adjuvant and booster interval on immune, endocrine, testicular and growth responses

Journal of Reproduction and Fertility 101, 333-343

FINNERTY M, ENRIGHT WJ, ROCHE JF 1998

Testosterone, LH and FSH episodic secretory patterns in GnRH-immunized bulls

Journal of Reproduction and Fertility 114, 85-94

FLIESS FR, KAISER H, BERGFELD J 1980

Versuche zur Beseitigung des Geschlechtsgeruches durch aktive Immunisierung von wachsenden Ebern mit Androstenon-Eiweißkonjugat

Archiv für experimentelle Veterinärmedizin Leipzig 34, 227-233

FRASER HM, GUNN A 1973

Effects of antibodies to luteinizing hormone-releasing hormone in the male rabbit and on the rat oestrus cycle

Nature (London) 244, 160-161

GARCIA-GIL N, PINART E, SANCHO S, BADIA E, BASSOLS J, et al. 2002

The cycle of the seminiferous epithelium in Landrace boars

Animal Reproduction Science 73, 211-225

GARNER DL 2006

Flow cytometric sexing of mammalian sperm

Theriogenology 65, 943-957

GARZA F Jr, THOMPSON DL Jr, FRENCH DD, WIEST JJ, ST. GEORGE RL, et al. 1986

Active immunization of intact mares against gonadotropin-releasing hormone: differential effects on secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone

Biology of Reproduction 35, 347-352

GARZA F Jr, THOMPSON DL Jr, MITCHELL PS, WIEST JJ 1988

Effects of active immunization against gonadotropin-releasing hormone on gonadotropin secretion after ovariectomy and testosterone propionate administration to mares

Journal of Animal Science 66, 479-486

GERDES J, LEMKE H, WACKER HH, SCHWAB J, STEIN H 1984

Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67

Journal of Immunology 133, 1710-1715

GERRITZEN MA, KLUIVERS-POODT M, REIMERT HGM, HINDLE V, LAMBOOIJ E 2008

Castration of piglets under CO₂-gas anaesthesia

Animal 2, 1666-1673

GIERSING M, LUNDSTROEM K, ANDERSSON A 2000

Social effects and boar taint: Significance for production of slaughter boars (Sus scrofa)

Journal of Animal Science 78, 296-305

GILBERT AN, WYSOCKI CJ 1987

The smell survey. Results.

National Geographics 172, 514-525

GIRI DK, JAYARAMAN S, NEELARAM GS, JAYASHANKAR R, TALWAR GP 1991

Prostatic hypoplasia in bonnet monkeys following active immunization with semisynthetic anti-LHRH vaccine

Experimental and Molecular Pathology 54, 255-264

GODFREY SI, WALKDEN-BROWN SW, MARTIN GB, SPEIJERS EJ 1996

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

Animal Reproduction Science 44, 41-54

GOUBAU S, SILVERSIDES DW, GONZALEZ A, LAARVELD B, MAPLETOFT RJ,
et al. 1989

Immunization of sheep against modified peptides of gonadotropin releasing
hormone conjugated to carriers

Domestic Animal Endocrinology 6, 339-347

GOWER DB 1972

16-unsaturated C19-steroids: a review of their chemistry, biochemistry and pos-
sible physiological role

Journal of Steroid Biochemistry 3, 45-103

GOWER DB, AHMAD N 1967

Studies on the formation of androst-16-enes from C21 steroids in boar testicular
tissue

Biochemical Journal 105 (3), 41 P

GREGORY SJ, KAISER UB 2004

Regulation of gonadotropins by inhibin and activin

Seminar of Reproductive Medicine 22, 253-267

GRIFFITH NM, PATTERSON RLS 1970

Human olfactory response to 5 α -androst-16-ene-3-one.

Journal of the Science of Food and Agriculture 21, 4-6

GROTH W, CLAUS R 1977

Beziehungen zwischen den Konzentrationen von Testosteron und dem Eberge-
ruchsstoff 5 α -Androst-16-en-3-on im Blut bzw. Fettgewebe und histomorpho-
metrische Befunde im Hoden vom Schwein

Züchtungsblatt Veterinärmedizin (A) 24, 103-121

GUAL C, GARZA-FLORES J, MENJIVAR M, GUTIERREZ-NAJAR A, PAL R,
et al. 1997

Ability of an anti-luteinizing hormone releasing hormone vaccine to inhibit
gonadotropins in postmenopausal women
Fertility and Sterility 67,404-407

HAEUSSLER S, WAGNER A, WELTER H, CLAUS R 2007

Changes of testicular aromatase expression during fetal development in male
pigs (*Sus scrofa*)
Reproduction 133, 323-330

HAGA HA, RANHEIM B 2005

Castration of piglets: the analgesic effects of intratesticular and intrafunicular li-
docaine injection
Veterinary Anaesthesia and Analgesia 32, 1-9

HALL R, GOMEZ-PAN A 1976

The hypothalamic regulatory hormones and the clinical applications
Advances in Clinical Chemistry 18, 173-212

HALL W, MOLITOR TW, JOO HS, PIJOAN C 1989

Comparison of protective immunity and inflammatory responses of pigs follow-
ing immunization with different *Actinobacillus pleuropneumoniae* preparations
with and without adjuvants
Veterinary Immunology and Immunopathology 22, 175-186

HANSSON KE, LUNDSTROEM K, FJELKNER-MODIG S, PERSSON J 1980

The importance of androstenone and skatole for boar taint
Swedish Journal of Agricultural Research 10, 167-73

HAY M, VULIN A, GÉNIN S, SALES P, PRUNIER A 2003

Assessment of pain induced by castration in piglets: behavioral and physiological
responses over the subsequent 5 days
Applied Animal Behaviour Science 82, 201-218

HEINRITZI K, LANGHOFF R, ZANKL A, SCHULZ C, ELICKER S, et al. 2008

Alternativen zur konventionellen Ferkelkastration in Europa – Stand der Forschung.

Praktischer Tierarzt 89 (8), 654-66

HEINRITZI K, ZOELS S, RITZMANN M 2006

Possibilities of pain-reduction in castration of piglets

Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress Copenhagen, 289

HELLWIG EG 2006

Kastration von männlichen Ferkeln nur noch in der ersten Woche ohne Tierarzt zulässig

Nutztierpraxis aktuell (Schweinepraxis), 58-61

HENDERSON CW 1998

Industry news (joint venture) phase I / II trial in prostate cancer patient initiated
Cancer Weekly Plus, 26

HENNESSY D 2006

Improvac[®] - Die Erfahrung

Symposium Proceedings, Improvac[®], eine Alternative zur chirurgischen Kastration, IPVS Congress 16-19 July 2006, Copenhagen

HENNESSY D, NEWBOLD R 2004

Consumer attitudes to a boar taint vaccine, Improvac[®] - A Qualitative study
Proceedings Int Pig Vet Soc, Hamburg, Germany

HERZOG A, HERBERT E, DEHNHARDT M, CLAUS R 1993

Vergleichende Messungen von Androstenon und Skatol in verschiedenen Geweben

28. Kulmbacher Woche, Kulmbach; Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für
Fleischforschung Kulmbach 32 (120), 116-124

HILBE M, JAROS P, EHRENSPERGER F, ZLINSZKY K, JANETT F et al. 2006

Histomorphological and immunohistochemical findings in testes, bulbourethral glands and brain of immunologically castrated male piglets

Schweizer Archiv für Tierheilkunde 11, 599-608

HODGES JK, HEARN JP 1977

Effects of immunisation against luteinising hormone releasing hormone on reproduction of the marmoset monkey *Callithrix jacchus*

Nature 265, 746-748

HOETZEL MJ, CARATY A, MARTIN GB 1997

Effects of nutrition on testicular growth in mature Merino rams actively immunized against GnRH

Journal of Reproduction and Fertility 110, 307-313

HOFFMANN B 2003

Andrologie: Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung

Berlin, Lehmanns Media

HOSKINSON RM, RIGBY RDG, MATTNER PE, HUYNH VL, D'OCCHIO M, et al. 1990

Vaxstrate®: an anti-reproductive vaccine for cattle

Australian Journal of Biotechnology 4, 166-170

HOSMALIN A, CARELLI C, GAILLARD J, LEFRANCIER P, DROBECQ H, et al. 1987

Structural requirements for the induction of „immunological castration“ by linear monomeric LHRH-lys-MDP administered in saline

Clinical Immunology and Immunopathology 45, 447-460

HUXSOLL CC, PRICE EO, ADAMS TE 1998

Testis function, carcass traits, and aggressive behavior of beef bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone

Journal of Animal Science 76, 1760-1766

JAGO JG, COX NR, BASS JJ, MATTHEWS LR 1997

The effect of prepubertal immunization against gonadotropin-releasing hormone on the development of sexual and social behavior of bulls

Journal of Animal Science 75, 2609-2619

JEFFCOATE IA, LUCAS JMS, CRIGHTON DB 1982

Effects of active immunization of ram lambs and bull calves against synthetic luteinizing hormone releasing hormone

Theriogenology 18, 65-77

JÉGOU B, LE GAC- JÉGOU M 1978

Androgen Binding Protein in the seminal plasma of some mammalian species

Journal of Endocrinology 77 267-268

JEYAKUMAR M, MOUDGAL NR 1996

Immunization of male rabbits with sheep luteal receptor to luteinizing hormone results in production of antibodies exhibiting hormone agonistic and antagonistic activities

Journal of Endocrinology 150, 431-443

JEYAKUMAR M, SURESH R, KRISHNAMURTHY HN, MOUDGAL NR 1995

Changes in testicular function following specific deprivation of luteinizing hormone in the adult male rabbit

Journal of Endocrinology 147, 111-120

JOHNSON LA, RATH D, VAZQUEZ JM, MAXWELL WMC, DOBRINSKY JR 2005

Preselection of sex of offspring in swine production: current status of the process and its application

Theriogenology 63, 615-624

JOSHI HS, RAESIDE JI 1973

Synergistic effects of testosterone and oestrogens on accessory sex glands and sexual behaviour of the boar

Journal of Reproduction and Fertility 33, 411-423

KAUFMANN G, SCHUBERT K 1979

Inhibition of 16-androstene biosynthesis in boar testes preparations by known and new steroids

Journal of Steroid Biochemistry 13, 351-358

KAY M, HOUSEMAN R 1975

The influence of sex on meat production

In: Meat (eds. Cole DJA, Lawrie RA) Butterworth London 1975, 85-108

KERDELHUÉ B, CATLIN S, KORDON C, JUTISZ M 1976

Delayed effects of in vivo LHRH immunoneutralization on gonadotropins and prolactin secretion in the female rat

Endocrinology 98, 1539-1549

KLUIVERS-POODT M, HOPSTER H, SPOOLDER HAM 2007

Castration under anaesthesia and/or analgesia in commercial pig production

Animal Science Group Wageningen, Report 85

KOENIG HE, LIEBICH HG 1999

Anatomie der Haussäugetiere – Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis, Band II: Organe, Kreislauf- und Nervensystem, S. 128

Stuttgart, Schattauer Verlagsgesellschaft mbH

KOENIG W 1993

Peptide and proteine hormones: structure, regulation, activity; a reference manual.

VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, New York, Basel, Cambridge

KUMAR TR, LOW MJ 1993

Gonadal steroid hormone regulation of human and mouse follicle stimulating hormone beta-subunit gene expression in vivo
Molecular Endocrinology 7, 898-906

KUPPER T, PAULY C, BURREN C, HOFER A, SPRING P 2008

Alternative Methoden zur konventionellen Ferkelkastration ohne Schmerzausschaltung
Projekt ProSchwein Abschlussbericht, Schweizerische Hochschule für Landwirtschaft SHL Zollikofen

LADD A, TSONG Y-Y, WALFIELD AM, THAU RB 1994

Development of an antifertility vaccine for pets based on active immunization against luteinizing hormone-releasing hormone
Biology of Reproduction 51, 1076-1083

LADD A, TSONG Y-Y, PRABHU G, THAU R 1989

Effects of long-term immunization against LHRH and androgen treatment on gonadal function
Journal of Reproduction and Immunology 15, 85-101

LADD A, TSONG Y-Y, LOK J, THAU RB 1990

Active immunization against LHRH: I. Effects of conjugation site and dose
American Journal of Reproduction and Immunology 22, 56-63

LAGERKVIST CJ, CARLSSON F, VISKE D 2006

Immunocastration of male pigs by immunization against gonadotrophin-releasing hormone as an alternative to surgical castration or no castration: A choice experiment with Swedish consumers
AgBioForum 2006. In Press and personal communication 2006.

LAHRMANN KH, KMIEC M, STECHER R 2006

Die Saugferkelkastration mit der Ketamin/Azaperon-Allgemeinanästhesie tier-
schutzkonform, praktikabel, aber wirtschaftlich?

Praktischer Tierarzt 87, 802-809

LLAMAS MOYA S, BOYLE LA, LYNCH BP, ARKINS S 2008

Effect of surgical castration on the behavioural and acute phase response of 5-
day-old piglets.

Applied Animal Behaviour 111, 133-145

LAURIA A, BORTOLUSSI M, MARINI G, ROLANDI MT 1979

Autoradiographic localization of binding sites for follicle stimulating hormone
(FSH) in the boar testis

Basic Applications in Histochemistry 23 39-43

LEBLOND CP, CLERMONT Y 1952

Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the „Pe-
riodic acid-Fuchsin-Sulfurous Acis“ technique

American Journal of Anatomy 90, 167-215

LEKHOTA O, BREHM R, CLAUS R, WAGNER A, BOHLE RM, et al. 2006

Cellular localization of estrogen receptor alpha (ER α) and beta (ER β) mRNA in
the boar testis

Histochemistry and Cell Biology 125, 259-264

LESSARD M, TAYLO AA, BRAITHWAITE L, WEARY DM 2002

Humoral and cellular immune responses of piglets after castration at different
ages

Canadian Journal of Animal Science 82, 519-526

LINCOLN GA, FRASER HM, FLETCHER TJ 1982

Antler growth in male red deer (*Cervus elaphus*) after active immunization
against LH-RH

Journal of Reproduction and Fertility 66, 703-708

LINCOLN GA, FRASER HM, FLETCHER TJ 1984

Induction of early rutting in male red deer (*Cervus elaphus*) by melatonin and its dependence on LHRH

Journal of Reproduction and Fertility 72, 339-343

LOBLEY GE, CONNELL A, MORRIS B, ANDERSON R, CLAYTON J, et al. 1992

The effect of active immunization against gonadotropin-hormone-releasing-hormone on growth performance and sample joint composition of bulls

Animal Production 55, 193-202

LÖSCHER, UNGEMACH, KROKER 2003

Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren

6., aktualisierte Auflage

Blackwell Verlag GmbH, Berlin, Wien

Parey Buchverlag

LÖSEL D 2006

Versuche zur Verbesserung der sensorischen Fleischqualität beim Schwein durch nutritive Hemmung der Skatolbildung

Diss. sc. agr., Institut für Tierhaltung und Tierzucht, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie, Universität Hohenheim

LOESEL D, LACORN M, BUETTNER D, CLAUS R 2006

Flavour improvement in pork from barrows and gilts via inhibition of intestinal skatole formation with resistant potato starch

Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 5990-5995

LUNSTRA DD, WISE TH, FORD JJ 2003

Sertoli cells in the boar testis: changes during development and compensatory hypertrophy after hemicastration at different ages

Biology of Reproduction 68, 140-150

MALMFORS B, LUNDSTRÖM K 1983

Consumer reactions to boar meat – a review
Livestock Production Science 10 (2), 187-196

MALMFORS B, NILSSON R 1978

Meat quality traits of boars in comparison with castrates and gilts
Swedish Journal of Agricultural Research 8, 209

MANN T 1954

On the presence and role of inositol and certain other substances in the seminal vesicle secretion of the boar
Proceedings of the Royal Society Biological Sciences 142, 21

MANN T 1974

Secretory function on the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction
Journal of Reproduction and Fertility 37, 179-189

MacKINNON PCB, PUIG-DURAN E, LAYNES R 1978

Reflections on the attainment of puberty in the rat: have circadian signals a role to play in its onset?
Journal of Reproduction and Fertility 52,401-412

MARTINEZ EA, VAZQUEZ JM, ROCA J, CUELLO C, GIL MA et al. 2005

An update on reproductive technologies with potential short-term application in pig production
Reproduction in Domestic Animals 40, 300-309

MARX G, HORN T, THIELEBEIN J, KNUBEL B, VON BORELL E 2003

Analysis of pain-related vocalization in young pigs
Journal of Sound and Vibration 266, 687-689

MATTHEWS KR, HOMER DB, PUNTER P, BEÂAGUE M-P, GISPERT M, et al. 2000

An international study on the importance of androstenone and skatole for boar taint: III. Consumer survey in seven European countries
Meat Science 54, 271-283

MAYER M, ROSEN F 1977

Interaction of glucocorticoids and androgens with skeletal muscle.
Metabolism 26 (8), 937-962

McCOARD SA, LUNSTRA DD, WISE, TH, FORD JJ 2001

Specific staining of Sertoli cell nuclei and evaluation of Sertoli cell number and proliferative activity in Meishan and White Composite boars during neonatal period
Biology of Reproduction 64, 689-695

McKENZIE FF, MILLER JC, BAUGUESS LC 1938

The reproductive organs and semen of the boar
Research Bulletin of the Missouri Agricultural Experimental Station, no. 279

McLACHLAN RI, WREFORD NG, DE KRETZER DM, ROBERTSON DM 1995

The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone immunized adult rat
Endocrinology 136, 4035-4043

McLACHLAN RI, WREFORD NG, O'DONNELL L, DE KRETZER DM, ROBERTSON DM 1996

The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH
Journal of Endocrinology 148, 1-9

- MELOEN RH, TURKSTRA JA, LANKHOF H, PUIJK WC, SCHAAPER WM,
et al. 1994
Efficient immunocastration of male piglets by immunoneutralization of GnRH
using a new GnRH-like peptide
Vaccine 12,741-746
- MENDIS-HANDAGAMA CHAMIDRANI SML, ARIYARATNE SIRIL HB 2001
Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis
Biology of Reproduction 65, 660-671
- MENTSCHHEL J, LEISER R, MUELLING C, PFARRER C, CLAUS R 2001
Butyric acid stimulates rumen mucosa development in the calf mainly by a re-
duction of apoptosis
Archives in Animal Nutrition 55, 85-102
- METZ C, CLAUS R 2003
Active immunization of boars against GnRH does not affect growth hormone but
lowers IGF-1 in plasma
Livestock Production Science 81, 129-137
- METZ C, HOHL K, WAIDELICH S, DROCHNER W, CLAUS R 2002
Active immunization of boars against GnRH at an early age: consequences for
testicular function, boar taint accumulation and N-retention
Livestock Production Science 74, 147-157
- MORRISON CA, FISHLEIGH RV, WARD DJ, ROBSON B 1987
Computer aided design and physiological testing of luteinising hormone-
releasing hormone analogue for 'adjuvant free' immunocastration
FEBS Letters 214, 65-70
- MOUDGAL NR, JEYAKUMAR M, KRISHNAMURTHY HN, SUREKHA S, KRISHNA-
MURTHY H et al. 1997
Development of male contraceptive vaccine – a perspective
Human Reproduction Update Vol. 3, No. 4, 335-346

NEUPERT B, CLAUS R, HERBERT E, WEILER U 1995

Einfluss von Geschlecht, Fütterung und Lichtprogrammen auf Mastleistung und Schlachtkörperwert sowie die Androstenon- und Skatolbildung beim Schwein
Züchtungskunde 67, 317-331

NICKEL R, SCHUMMER A, SEIFERLE E 1999

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Band II Eingeweide
Berlin, Parey Buchverlag

OERTER KE, URIARTE MM, ROSE SR, BARNES KM, CUTLER GB 1990

Gonadotropin secretory dynamics during puberty in normal girls and boys
The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 71, 1251-1258

OKWUN OE, IGBOELI G, FORD JJ, LUNSTRA DD, JOHNSON L 1996

Number and function of Sertoli cells, number and yield of spermatogonia, and daily sperm production in three breeds of boar
Journal of Reproduction and Fertility 107, 137-149

OVER R 1992

Physiologische Wirkungen und Arbeiten zur Isolierung der Pheromone von Ziegen- und Schafböcken
Diss. sc. agr., Institut für Tierhaltung und Tierzucht, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie, Universität Hohenheim

PADMANABHAN V, MC NEILLY AS 2001

Is there an FSH-releasing factor?
Reproduction 121, 21-30

PARRILLA I, VAZQUEZ JM, OLIVER-BONET M, NAVARRO J, YELAMOS J,
et al. 2003

Fluorescence in situ hybridization in diluted and flow cytometrically sorted boar spermatozoa using specific DNA direct probes labelled by nick translation
Reproduction 126, 317-325

PARROTT RF, BOOTH WD 1984

Behavioural and morphological effects of 5 α -dihydrotestosterone and oestradiol-17 β in the prepubertally castrated boar

Journal of Reproduction and Fertility 71, 453-461

PATTERSON RLS 1968a

5 α -androst-16-en-3-one: compound responsible for taint in boar fat

Journal of the Science of Food and Agriculture 19, 31-38

PATTERSON RLS 1968b

Identification of a 3 α -hydroxy-5 α -androst-16-en as a musk odour component of boar maxillary salivary gland and its relationship to the sex odour taint in boar meat

Journal of the Science of Food and Agriculture 19, 434-438

PEYRAT JP, MEUSY-DESSOLLE N, GARNIER J 1981

Changes in Leydig cells and luteinizing hormone receptors in porcine testis during postnatal development

Endocrinology 108, 625-631

PRELOG V, RUZICKA L 1944

Untersuchungen über Organextrakte. 5. Mitt.: Über zwei moschusartig riechende Steroide aus Schweinetestes-Extrakten

Helvetica Chimica Acta 27, 61-66

PRUNIER A, HAY M, SERVIÈRE J 2002

Evaluation et prevention de la douleur induite par les interventions de convenue chez le porcelet

Journées de la Recherche Porcine (France) 34, 257-268

PUPPE B, SCHÖN PC, TUCHSCHERER A, MANTEUFFEL G 2005

Castration-induced vocalisation in domestic piglets, *Sus Scrofa*: complex and specific alterations of the vocal quality

Applied Animal Behaviour 95, 67-78

- RABB MH, THOMSON DL, BARRY BE, COLBORN DR, HEHNKE KE, et al. 1990
Effects of active immunization against GnRH on LH, FSH and Prolactin storage, secretion and response to their secretagogues in pony geldings
Journal of Animal Science 68, 3322-3329
- RAESIDE JI, CHRISTIE HL, RENAUD RL 1999
Metabolism of oestrone and oestradiol-17 β to conjugated steroids by the accessory sex glands of the male pig
Journal of Endocrinology 163, 49-53
- RAGO V, MAGGIOLINI M, VIVACQUA A, PALMA A, CARPINO A 2004
Differential Expression of estrogen receptors (ER α /ER β) in testis of mature and immature pigs
The Anatomical Record 281A, 1234-1239
- REID J, DUFOUR JJ, SIRARD MA 1996
Effect of a single injection of a long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist on prepubertal male and female pigs on reproductive organs, growth performance and sensory qualities of pork roasts
Reproduction Nutrition Development 36, 321-332
- RICHTLINIE 96/22/EG DES RATES
vom 29. April 1996
über das Verbot der Verwendung bestimmter Stoffe mit hormonaler bzw. thyreostatischer Wirkung und von β -Agonisten in der tierischen Erzeugung und zur Aufhebung der Richtlinien 81/602/EWG, 88/146/EWG und 88/299/EWG (ABl. L 125 vom 23.5.1996, S. 3)
Geändert durch:
Richtlinie 2003/74/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 (L 262 17 14.10.2003)
Richtlinie 2008/97/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 19. November 2008 (L 318 9 28.11.2008)

RICHTLINIE 2001/93/EG DER KOMMISSION

vom 9. November 2001

zur Änderung der Richtlinie 91/630/EWG über Mindestanforderungen für den Schutz von Schweinen

ROBERTSON IS, WILSON JC, FRASER HM 1979

Immunological castration in male cattle

Veterinary Record 105, 556-557

ROBERTSON IS, WILSON JC, ROWLAND AC, FRASER HM 1981

Further studies on immunological castration in male cattle

Veterinary Record 108, 381-382

ROBERTSON IS, FRASER HM, INNES GM, JONES AS 1982

Effect of immunological castration on sexual and production characteristics in male cattle

Veterinary Record 111, 529-531

ROBIC A, LARZUL C, BONNEAU M 2008

Genetic and metabolic aspects of androstenone and skatole deposition in pig adipose tissue: a review

Genetics, Selection, Evolution 40, 129-143

RODRÍGUEZ P, DALMAU A, RUIZ-DE-LA-TORRE JL, MANTECA X, JENSEN EW et al. 2008

Assessment of unconsciousness during carbon dioxide stunning in pigs

Animal Welfare 17, 341-349

ROMEIS B 1989

Mikroskopische Technik, 17te Auflage, Hrsg. P Böck

Kapitel 5, S. 113-133, Kapitel 8, S. 235-236

Urban und Schwarzenberg, München, Deutschland

SAD S, GUPTA HM, TALWAR GP, RAGHUPATHY R 1991

Carrier-induced suppression of the antibody response to a 'self' hapten
Immunology 74, 223-227

SALACINSKY PR, MCLEAN C, SYKES JE, CLEMENT-JONES VV, LOWRY PJ 1981

Iodination of proteins, glycoproteins and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenyl glycouril (Iodogen)
Analytical Biochemistry 117, 136-146

SCHANBACHER BD 1982

Responses of ram lambs to active immunization against testosterone and luteinizing hormone-releasing hormone
American Journal of Physiology 242, E201-E205

SCHANBACHER BD, PRATT BR 1985

Response of a cryptorchid stallion to vaccination against luteinising hormone releasing hormone
Veterinary Record 116, 74-75

SCHNEIDER F, FALKENBERG H, KUHN G, NURNBERG K, REHFELDT C, et al. 1998

Effects of treating young boars with a GnRH depot formulation on endocrine functions, testis size, boar taint, carcass composition and muscular structure
Animal Reproduction Science 50, 69-80

SCHULZ C 2007

Auswirkungen einer Isofluran-Inhalationsnarkose auf den Kastrationsstress und die postoperativen Schmerzen von Ferkeln
Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität, München

SCHULZ C, RITZMANN M, PALZER A, HEINRITZI K, ZÖLS S 2007a

Auswirkungen einer Isofluran-Inhalationsnarkose auf den postoperativen Kastrationsschmerz von Ferkeln
Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift 120, 177-182

SCHULZ C, RITZMANN M, PALZER A, OTTEN W, HEINRITZI K 2007b

Verlauf der Noradrenalin- und Adrenalin-konzentrationen vor und nach der Kastration von Saugferkeln mit oder ohne Isofluran-Narkose

Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 114, 454-459

SCHWARZENBERGER F, TOOLE GS, CHRISTIE HL, RAESIDE JI 1993

Plasma levels of several androgens and estrogens from birth to puberty in male domestic pigs

Acta Endocrinologica 128, 173-177

SELLIER P, LE ROY P, FOILLOUX MN, GRUAND J, BONNEAU M 2000

Responses to restricted index selection and genetic parameters for fat androstenone level and sexual maturity status of young boars

Livestock Production Science 63, 265-274

SHARPE RM 1989

Follicle-stimulating hormone and spermatogenesis in the adult male

Journal of Endocrinology 121, 405-407

SIDLER X 2006

Alternativen zur heutigen Ferkelkastration

Herbsttagung 2006: "Öffentliches Veterinärwesen - Veterinary Public Health VPH"

www.tvl-avsa.ch/Archiv/2006/Sidler%20Alternativen%20Ferkelkastration.pdf

SINCLAIR PA, SQUIRES EJ, RAESIDE JI, BRITT JH, HEDGPETH VG 2001

The effect of early postnatal treatment with a gonadotropin-releasing hormone agonist on the developmental profiles of testicular steroid hormones in the intact male pig

Journal of Animal Science 79, 1003-1010

SINOWATZ F, SKOLEK-WINNISCH R, LIPP W, MEIERHOFER B 1978

Histotopik von Glykosidasen in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Ebers vor und nach Kastration

Acta Anatomica 102, 84-89

SPRING P, KUPPER T, PAULY C 2009

Pro Schwein: Alternativen zur konventionellen Ferkelkastration

Agrarforschung 16 (1), 16-21

SQUIRES EJ 2006

Possibilities for selection against boar taint

Acta Veterinaria Scandinavica 48, doi:10.1186/1751-0147-48-Si-S8

STEINBERGER E, STEINBERGER A 1972

Testis: basic and clinical aspects

Reproductive Biology, eds. Balin H, Glasser S

Excerpta Medica Amsterdam 4, 144-267

STRAW BE, SHIN S, CALLIHAN D, PETERSEN M 1990

Antibody production and tissue irritation in swine vaccinated with Actinobacillus bacterins containing various adjuvants

Journal of the American Veterinary Medical Association 196, 600-604

SUN YT, WREFORD NG, ROBERTSON DM, DE KRETZER DM 1990

Quantitative Cytological Studies of Spermatogenesis in Intact and Hypophysectomized Rats: Identification of Androgen-Dependent Stages

Endocrinology 127, 1215-1223

SWIERSTRA EE 1968

Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis

The Anatomical Record 161, 171-186

TAJET H, ANDRESEN O, MEUWISSEN T 2005

Estimation of genetic parameters of boar taint; skatole and androstenone and their correlations with sexual maturation. Prevention of Boar Taint in Pig Production

The 19th Symposium of the Nordic Committee for Veterinary Scientific Cooperation, Gardermoen, Norway, 21.-22. November 2005

TALWAR GP 1997

Fertility regulating and immunotherapeutic vaccines reaching human trials stage
Human Reproductive Update 3, 301-310

THOMPSON DL Jr 2000

Immunization against GnRH in male species (comparative aspects)
Animal Reproduction Science 60-61, 459-469

THOMPSON DL Jr, SOUTHERN LL, St GEORGE RL, JONES LS, GARZA F Jr 1985

Active immunization of prepubertal boars against testosterone: testicular and endocrine responses at 14 months of age
Journal of Animal Science 61, 1498-1504

THUN R, GAJEWSKI Z, JANETT F 2006

Castration in male pigs: techniques and animal welfare issues
Journal of Physiology and Pharmacology 57 (8), 189-194

TIERSCHUTZGESETZ

vom 24.07.1972

neugefasst durch Bek. v. 18.5.2006 I 1206, 1313

zuletzt geändert durch Art. 20 G v. 9.12.2010 I 1934

TOENHARDT H, SCHUELKE B, SAJINSKI H, DORST J 1976

Zur Funktion des Testosterons (abgeleitet aus Untersuchungen zur endokrinen und spermiogenen Hodenleistung bei Ratten unter Einfluß verschiedener Nahrungsproteine und Ebern)

Wissenschaftliche Zeitschrift Humboldt Universität (Math. Nat. Reihe, XXV) 5, 655-664

TOWER BB, SIGEL MB, POLAND RE, VAN DER LAAN WP, RUBIN RT 1980

The talc-resin-trichloroacetic acid test for screening radioiodinated polypeptide hormones

Methods of Enzymology 70(A), 322-334

TURKSTRA J, MELOEN R 2006

Active immunization against gonadotropin-releasing hormone, an active tool to block the fertility axis in mammals

Veterinary Sciences Tomorrow,

<http://www.vetscite.org/publish/articles/000062/print.html>

VAZQUEZ JM, MARTÍNEZ EA, ROCA J, LUCAS X, PARRILLA I 2001

Sex-Sorting boar sperm: problems and possibilities

Archiv Tierzucht Dummerstorf 44, Special Issue, 141-144

VERORDNUNG (EU) NR. 37/2010 DER KOMMISSION

vom 22. Dezember 2009

über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs

zuletzt geändert durch:

die Durchführungsverordnungen Nr. 221/2012 und Nr. 222/2012 zur Änderung des Anhangs der Verordnung (EU) Nr. 37/2010 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs in Bezug auf Closantel und Triclabendazol der Kommission

vom 14. März 2012 (ABI. EU L75; 2012; S.7-11)

VOID E 1970

Fleischprodukteigenschaften bei Ebern und Kastraten, IV: Organoleptische und gaschromatografische Untersuchungen wasserdampf-flüchtiger Stoffe des Rückenspecks von Ebern

Meldinger Nordlandbrukshoegskole 49, 1-25

WAGNER A 2005

Steuerungsmechanismen der Spermatogenese beim Eber: Auswirkungen einer GnRH-Immunisierung und anschließender Estradiolinfusion

Diss. sc. agr., Institut für Tierhaltung und Tierzucht, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie, Universität Hohenheim

WAGNER A, CLAUS R 2004

Involvement of glucocorticoids in testicular involution after active immunization in boars against GnRH

Reproduction 127, 275-283

WAGNER A, CLAUS R 2008a

Aromatase and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 localisation in the testes of pigs from birth to puberty linked to changes of hormone pattern and testicular morphology

Reproduction, Fertility and Development 20, 505-512

WAGNER A, CLAUS R 2008b

The effects of postnatal FSH substitution on Sertoli cell number and the sperm production capacity of the adult boar

Animal Reproduction Science; doi:10.1016/j. anireprosci.2008.01.017

WAGNER A, MESSE N, BERGMANN M, LEKHOTA O, CLAUS R 2006

Effects of estradiolinfusion in GnRH immunized boars on spermatogenesis

Journal of Andrology 27, 880-889

WALKER MP, THOMPSON DL Jr., GODKE RA, HONEY PG 1984

Active immunization of prepubertal bulls against testosterone: Seminal and testicular characteristics after puberty

Theriogenology 22, 269

WALSTRA P 1974

Fattening of young boars: quantification of negative and positive aspects

Livestock Production Science 1, 187-196

WEILER U, CLAUS R, DEHNHARD M, HOFACKER S 1996

Influence of the photoperiod and a light reverse program on metabolically active hormones and food intake in domestic pigs compared with a wild boar

Can. J. Anim. Sci. 76, 531-539

WEILER U, CLAUS R, SCHOEBELEN-COMBES S, BONNEAU M 1998

Influence of age and genotype on endocrine parameters and growth performance: a comparative study in Wild boars, Meishan and Large White boars

Livestock Production Science 54, 21-31

WEILER U, FONT I, FURNOLS M, FISCHER K, KEMMER H, OLIVER MA et al. 2000

Influence of differences in sensitivity of Spanish and German consumers to perceive androstenone on the acceptance of boar meat differing in skatole and androstenone concentrations

Meat Science 54, 297-304

WEILER U, FISCHER K, KEMMER H, DOBROWOLSKI A, CLAUS R 1997

Influence of androstenone sensitivity on consumer reactions to boar meat in *M. Bonneau, K. Lundström, B. Malmfors: Boar taint in entire male pigs*

EAAP Publication 92, 147-151

WILLEKE H, CLAUS R, PIRCHNER F, ALSING A 1980

A selection experiment against 5 α -androst-16-en-3-one, the boar taint steroid, in adipose tissue of boars

Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie 97,86-94

WILLEKE H, CLAUS R, MÜLLER E, PIRCHNER F, KARG H 1987

Selection for high and low level of 5 α -androst-16-en-3-one in boars. I. direct and correlated response of endocrinological traits

Journal of Animal Breeding and Genetics 104,64-73

WILLIAMSON ED, PATTERSON RLS, BUXTON ER, MITCHELL KG, PARTRIDGE JG, et al. 1985

Immunization against 5 α -Androstenone in boars

Livestock Production Science 12, 251-264

WISE T, ZANELLA EL, LUNSTRA DD, FORD JJ 2000

Relationships of gonadotropins, testosterone, and cortisol in response to GnRH and GnRH antagonist in boars selected for high and low follicle-stimulating hormone levels

Journal of Animal Science 78, 1577-1590

XUE JL, DIAL GD, BARTSH S, KERKAERT B, SQUIRES EJ, et al. 1994

Influence of a gonadotropin-releasing hormone agonist on circulating concentrations of luteinizing hormone and testosterone and tissue concentrations of compounds associated with boar taint

Journal of Animal Science 72, 1290-1298

YU WH, KARANTH S, SOWER SA, PARLOW AF, McCANN SM 2000

The similarity of FSH-Releasing Factor to lamprey gonadotropin-releasing hormone III (I-GnRH-III)

Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 224, 87-92

YU WH, KARANTH D, WALCZEWSKA A, SOWER SA, MCCANN SM 1997

A hypothalamic follicle-stimulating hormone-releasing decapeptide in the rat

Proceedings of the National Academy of Science USA 94, 9499-9503

ZAMARATSKAIA G, RYDHMER L, ANDERSSON HK, CHEN G, LOWAGIE S et al.
2008

Long-term effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using ImprovacTM, on hormonal profile and behaviour of male pigs
Animal Reproduction Science 108, 37-48

ZANELLA EL, LUNSTRA DD, WISE TH, KINDER JE, FORD JJ 2000

GnRH antagonist inhibition of gonadotropin and steroid secretion in boars in vivo and steroid production in vitro
Journal of Animal Science 78, 1591-1597

ZEIFANG A 2000

Einfluss des Splitweaning auf die pulsatile LH-Freisetzung und das Wiederingangkommen des Zyklus nach dem Absetzen bei der Sau
Diss. med. vet., Institut für Tierhaltung und Tierzucht, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie, Universität Hohenheim; Gynäkologische und Ambulatorische Tierklinik der tierärztlichen Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München

ZIECIK AJ, ESBENSHADE KL, BRITT HJ 1989

Effects of a gonadotrophin-releasing hormone antagonist on gonadotrophin secretion and gonadal development in neonatal pigs
Journal of Reproduction and Fertility 87, 281-289

ZOELS S, RITZMANN M, HEINRITZI K 2006a

Effect of local anaesthesia in castration of piglets
Tierärztliche Praxis Großtiere 34, 103-106

ZOELS S, RITZMANN M, HEINRITZI K 2006b

Effect of analgesics on castration of male piglets
Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift 119, 193-196

10. ANHANG

ANHANG I: Katheterpflege

Heparinlösung 1 %

1 g	Heparin	Heparin-Natriumsalz, 150IU/mg Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
9 g	NaCl	Natriumchlorid, Merck 6404 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ad 1l Aqua bidest

Heparinlösung 0,4 %

0,4 g	Heparin	Heparin-Natriumsalz, 150IU/mg Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
9 g	NaCl	Natriumchlorid, Merck 6404 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ad 1l Aqua bidest

Gelöst in 1l Flaschen und sterilisiert bei 120°C für 45 min (Zirbus technology GmbH, Bad Grund/Harz, Deutschland).

ANHANG II: Radioimmunologische Bestimmung der Proteohormone

Jodogen-Cup

200 µg Jodogen	1,3,4,6-Tetrachloro-3 α ,6 α -di-phenylglycouril T-0656 Sigma, St. Louis, USA
1 ml Chloroform	Trichlormethan, Rotipuran \geq 99 % p.a. Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland

Daraus entnehmen: 10 µl = 2 µg Jodogen

Haltbarkeit: kurzfristig bei 4 °C dunkel lagern, im mer frisch für die jeweilige Markierung ansetzen

AA-Säule

2 ml	Einmalspritze, steril
etwas	Glaswolle
auffüllen mit	Anionenaustauscher/-harz (BioRad AG 1 X8, 50-100 mesh, Anion-exchange-resin)

Hormon pLH (Aliquotierter Markierungsstandard)

30-50 µg pLH-Standard
Parlow#AFP-11043B
Dr. Parlow, Torrance, California, USA

100 µl 0.5M PBS Puffer

Konzentration: 1 µg pLH/2 µl PBS Puffer

Haltbarkeit: mind. 1 Jahr bei -80 °C

Hormon pFSH (Aliquotierter Markierungsstandard)

20-30 µg pFSH-Standard

Parlow#AFP-10640B

Dr. Parlow, Torrance, California, USA

60 µl 0.5 M PBS Puffer

Konzentration: 1 µg pFSH/2 µl PBS Puffer

Haltbarkeit: mind. 1 Jahr bei -80 °C

Phosphatpuffer (PBS; 0.5 M; pH 7,4)

2,79 g KH_2PO_4 Kaliumdihydrogenphosphat, Merck 4873
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

23,42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ di-Natriumhydrogenphosphat, Merck 6580
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ad 250 ml Aqua bidest Reinstwasseranlage
Institut für Tierhaltung und Tierzucht,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Haltbarkeit: 6 Monate bei 4 °C

Phosphatpuffer (PBS; 0.05 M; pH 7,4)

50 ml 0.5 M PBS

450 ml Aqua bidest Reinstwasseranlage
Institut für Tierhaltung und Tierzucht,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Haltbarkeit: 6 Monate bei 4 °C

Haltbarkeit: mind. 1 Jahr bei -20 °C

1. pLH-Antikörper-Endverdünnung (1:666666 – 100µl, 1:2000000 – Ansatz)

1. Antikörper-Vorverdünnung 1:1000 in pLH Puffer ansetzen

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

1. pFSH-Antikörper-Vorverdünnung (1:1000)

500 µl pFSH-Antiserum
antiFSH (rabbit) 1:5, aliquotiert 15.10.2007
Parlow AFP 2062096
Dr. Parlow, Torrance, California, USA
Lagerung im Ultrafreezer bei -80°C

9500 µl pFSH Puffer

Haltbarkeit: mind. 1 Jahr bei -20 °C

1. pFSH-Antikörper-Endverdünnung (1:150000 – 100µl, 1:450000 – Ansatz)

1. Antikörper-Vorverdünnung 1:1000 in pFSH Puffer ansetzen

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

Tracer ¹²⁵J-LH, Radioaktive Vorlage (RV-Gebrauchslösung)

¹²⁵J-LH [J125] Natrium-iodide gekoppelt an pLH
in RSA 1% ansetzen

Soll: 12000-16000 cpm/100 µl RV-Gebrauchslösung

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

Tracer ¹²⁵J-FSH, Radioaktive Vorlage (RV-Gebrauchslösung)

¹²⁵J-FSH [J125] Natrium-iodide gekoppelt an pFSH
in RSA 1% ansetzen

Soll: 15000-17000cpm/100µl RV-Gebrauchslösung

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

2. Antikörper-Endverdünnung (1:10)

2. Antikörper (Schaf anti Hase)

Pool Emil

Plasma des gegen Kaninchen immunisierten Schafes „Emil“
von 2000, S2-S19, -20°C

Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie
Universität Hohenheim

in RSA 1 % ansetzen

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

NRS-2. Antikörper-Gemisch (1:50)

Normal-Rabbit-Serum (NRS) 1:50

2. Antikörper (Schaf anti Hase) 1:10

NRS Kaninchenplasma, Pool vom 4.12.1991
-20°C

Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Ad restliche 2. Antikörper-Endverdünnung

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

ANHANG III: Radioimmunologische Bestimmung der Steroidhormone

Phosphatpuffer (PBS; 67 mM; pH 7,2)

5,37 g	KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat, Merck 4873 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
16,71 g	Na_2HPO_4	di-Natriumhydrogenphosphat, Merck 6580 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
0,7 g	NaN_3	Natriumazid – sehr giftig, Merck 822335 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ad 2 l Aqua bidest		Reinstwasseranlage Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie, Universität Hohenheim

Haltbarkeit: 6 Monate bei 4 °C

Rinderserumalbuminpuffer (RSA)

5,37 g	KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat, Merck 4873 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
16,71 g	Na_2HPO_4	di-Natriumhydrogenphosphat, Merck 6580 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
0,7 g	NaN_3	Natriumazid – sehr giftig, Merck 822335 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
2 g	RSA	Rinderserumalbumin, Albumin bovine fraction IV Sera electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ad 2 l Aqua bidest		Reinstwasseranlage Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie, Universität Hohenheim

Haltbarkeit: 6 Monate bei 4 °C

Testosteron-3-CMO, Antikörper-Vorverdünnung (1:100)

100 µl T-3-CMO antiTestosteron (rabbit)
vom 15.12.1983, S16-2
Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Ad 10 ml RSA-Puffer

Haltbarkeit: mind. 1 Jahr bei 4 °C

Testosteron-3-CMO, Antikörper-Gebrauchslösung (1:75000 bis 1:77000)

Testosteron-3-CMO Vorverdünnung 1:100 in RSA-Puffer ansetzen

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

17β-Estradiol-6-CMO, Antikörper-Vorverdünnung (1:100)

100 µl E2-6-CMO anti17β-Estradiol (rabbit)
vom 9.1.1984, S12-2
Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Ad 10 ml RSA-Puffer

Haltbarkeit: mind. 1 Jahr bei 4 °C

17β-Estradiol-6-CMO, Antikörper-Gebrauchslösung (1:45000 bis 1:50000)

E2-6-CMO Vorverdünnung 1:100 in RSA-Puffer ansetzen

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

Tracer ^3H -Testosteron, Radioaktive Vorlage (RV-Gebrauchslösung)

[1,2,6,7]- ^3H -Testosteron RV-Stammlösung (Standard), TRK921
73 Ci/mmol
von 01/2006
Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
in Phosphatpuffer ansetzen

Soll: 10000 cpm/100 μl RV-Gebrauchslösung

Haltbarkeit: 3 Monate bei 4 $^{\circ}\text{C}$

Tracer ^3H -17 β -Estradiol, Radioaktive Vorlage (RV-Gebrauchslösung)

[2,4,6,7]- ^3H -Estradiol RV-Stammlösung (Standard), TRK 322
89 Ci/mmol
von 04/2003
Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
in Phosphatpuffer ansetzen

Soll: 10000 cpm/100 μl RV-Gebrauchslösung

Haltbarkeit: 3 Monate bei 4 $^{\circ}\text{C}$

Aktivkohlelösung 5 %

5 g	Aktivkohle	Aktivkohle Norit A Serva electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
0,5 g	Dextran	Dextran 60 Serva electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ad 1 l	Aqua bidest	Reinstwasseranlage Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie, Universität Hohenheim

Haltbarkeit: 3 Monate bei 4 $^{\circ}\text{C}$

ANHANG IV: Enzymimmunologische Bestimmung von GnRH

Beschichtungspuffer (pH 9,6)

1,05 g	NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat, Merck 6329 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ad 250 ml	Aqua bidest	Reinstwasseranlage Institut für Tierhaltung und Tierzucht, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie, Universität Hohenheim

Haltbarkeit: 4 Wochen bei 4 °C

LH-PBS Puffer (pH 7,2)

7,95 g	NaCl	Natriumchlorid, Merck 6404 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
1,78 g	Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	di-Natriumhydrogenphosphat, Merck 6580 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
0,2 g	KCl	Kaliumchlorid, Roth 6781 Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe Deutschland
0,2 g	KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat, Merck 4873 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ad 1 l	Aqua bidest	Reinstwasseranlage Institut für Tierhaltung und Tierzucht, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie, Universität Hohenheim

Haltbarkeit: 4 Wochen bei 4 °C

LH Testpuffer (pH 7,2)

3,51 g	NaCl	Natriumchlorid, Merck 6404 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
1,78 g	Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	di-Natriumhydrogenphosphat, Merck6580 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
1,86 g	EDTA	Titriplex III, Ethylen-dinitrilo-tetra-Essigsäure-di-Natriumsalz-di-Hydrat Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
0,50 g	0,1 % Gelatine	Gelatine Hydrolysate Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
0,01 g	0,002 % Phenolrot	PhenolRed Phenolsulfonphthalein Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
25 µl	20 % Chlorhexidin	Chlorhexidine, 20%ige Lösung Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
250 µl	Tween 20	Tween 20 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ad 500 ml	Aqua bidest	Reinstwasseranlage Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie, Universität Hohenheim

Haltbarkeit: 3 Wochen bei 4 °C

Waschpuffer

100 ml 10 % LH-PBS

500 µl Tween 20 Tween 20

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Ad 1 l Aqua bidest

Reinstwasseranlage

Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung,

Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,

Universität Hohenheim

Haltbarkeit: 1 Tag bei 4 °C

Substratpuffer (pH 5,5)

3,4 g Na-Acetat * 3H₂O Natriumacetat-trihydrat, Merck 6265

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ad 250 ml Aqua bidest

Reinstwasseranlage

Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung,

Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,

Universität Hohenheim

Haltbarkeit: 4 Wochen bei 4 °C

Beschichten der Mikrotiterplatte (96 well)

15,6 ng GnRH GonadotropinReleasingHormone

1 mg/ml, aliquotiert 7.3.2002

100 µl 0.05 M Beschichtungspuffer

10ml 0.05 M Beschichtungspuffer/Platte

1,56µg GnRH/Platte

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

Aliquot: 100 µl/well

Platte in Alufolie packen. 1 h bei Raumtemperatur inkubieren.

Gebrauchslösung des 2. Antikörpers (1:10000)

1,1 µl Polyclonal Rabbit anti Swine Immunoglobulins/HRP

Dako Cytomation REF:P0164, Glostrup, Denmark

Dako GmbH, Hamburg, Deutschland

auf 11 ml LH Testpuffer

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

Aliquot: 100 µl/well

Platte in Alufolie packen. 1 h bei 37 °C auf Wärmeschüttler inkubieren.

0,6 % TMB-Lösung

6 mg TMB 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

1 ml DMSO Dimethylsulfoxid, Merck 802912

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Haltbarkeit: 1 Tag, dunkel stellen

1 % H₂O₂-Lösung (Wasserstoffperoxid-Lösung)

30 µl H₂O₂ 30 % Perhydrol 30%

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

970 µl Aqua bidest Reinstwasseranlage

Institut für Tierhaltung und Tierzucht,

Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,

Universität Hohenheim

Haltbarkeit: 1 Tag, dunkel stellen bei 4 °C

Substratlösung

278 µl 0,6 % TMB-Lösung

70 µl 1 % H₂O₂-Lösung

17 ml Substratpuffer (angewärmt)

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

Aliquot: 150 µl/well

Platte in Alufolie packen. 40min bei 37°C auf Wärme schüttler inkubieren.

H₂SO₄ (Schwefelsäure, 2 M)

40 ml H₂SO₄ Schwefelsäure 96% (konzentriert), Merck 731
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

320 ml Aqua bidest Reinstwasseranlage
Institut für Tierhaltung und Tierzucht,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Aliquot: 50 µl/well

Haltbarkeit: mehrere Monate bei Raumtemperatur, unter Abzug lagern.

ANHANG V: Enzymimmunologische Bestimmung von Androstenon

PBS Puffer (pH 7,2)

1,26 g	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat, Merck 6346 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
6,05 g	Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	di-Natriumphosphat, Merck6580 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
8,50 g	NaCl	Natriumchlorid, Merck 6404 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
50 µl	Chlorhexidin 20 %	Chlorhexidine, 20 %ige Lösung, Sigma C-9394 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Ad 1 l Aqua bidest
Reinstwasseranlage
Institut für Tierhaltung und Tierzüchtung,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Haltbarkeit: 1 Woche bei 4 °C

Testpuffer

0,10 g	RSA 0,1 %	Rinderserumalbumin, Albumin bovine fraction IV Serva electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
--------	-----------	---

Ad 100 ml PBS Puffer

Haltbarkeit: 1 Woche bei 4 °C

Absättigungspuffer

0,32 g	RSA 1%	Rinderserumalbumin, Albumin bovine fraction IV Serva electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
--------	--------	---

Ad 32 ml PBS Puffer

Haltbarkeit: 1 Tag bei 4 °C

Beschichtungspuffer (pH9,6)

1,05 g NaHCO₃ Natriumhydrogencarbonat, Merck 6329
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ad 250 ml Aqua bidest Reinstwasseranlage
Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Haltbarkeit: 2 Wochen bei 4 °C

Waschpuffer

500 µl Tween 80 Tween 80, Merck 822187
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ad 1 l Aqua bidest Reinstwasseranlage
Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

Beschichten der Mikrotiterplatte (1:8000; 96 well)

18,75 µl IgG-Fraktion Hase 5 12.11.1992 AH
affinitätsgereinigt am 23.8.2001 an Protein G
1:10 (im Gefrierschrank aliquotiert gelagert)

15 ml Beschichtungspuffer

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

Aliquot: 150 µl/well

Platte in Plastikfolie über Nacht im Kühlschrank inkubieren.

Tracer Androstenon-HRP-Konjugat-Gebrauchslösung (4 ng/20 µl)

Δ16 HRP-Stammlösung (Standard) 4,904 mg/ml vom 31.7.2000

Lagerung bei -20°C

Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Stammlösung Androstenon 100 µg/ml

1 mg Androstenon
10 ml Methanol

Haltbarkeit: mind. 1 Jahr bei 4 °C

Vorverdünnung: 2 µl Stammlösung
198 µl Testpuffer
Gebrauchslösung: 10,2 µl Vorverdünnung
Ad 2,5 ml Testpuffer

Haltbarkeit: 1 Tag

Aliquot: 20 µl/well

Platte in Alufolie packen. 75min bei 37°C auf Wärme schüttler inkubieren (Einstellung 150).

Substratpuffer (pH 5,5)

2,05 g Na-Acetat * 3H₂O Natriumacetat-trihydrat, Merck 6265
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ad 250 ml Aqua bidest Reinstwasseranlage
Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Haltbarkeit: 2 Wochen bei 4 °C

0,6 % TMB-Lösung

6 mg TMB 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin
AppliChem, Darmstadt, Deutschland
1 ml DMSO Dimethylsulfoxid, Merck 802912
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Haltbarkeit: 1 Tag, dunkel stellen

1 % H₂O₂-Lösung (Wasserstoffperoxid-Lösung)

30 µl H₂O₂ 30 % Perhydrol 30%
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
970 µl Aqua bidest Reinstwasseranlage
Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Haltbarkeit: 1 Tag, dunkel stellen bei 4 °C

Substratlösung

278 µl 0,6 % TMB-Lösung
70 µl 1 % H₂O₂-Lösung
17 ml Substratpuffer (angewärmt)

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

Aliquot: 150 µl/well

Platte in Alufolie packen. 40 min bei 37 °C auf Wär meshüttler inkubieren.

H₂SO₄ (Schwefelsäure, 2 M)

40 ml H₂SO₄ Schwefelsäure 96 % (konzentriert), Merck 731
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

320 ml Aqua bidest Reinstwasseranlage
Institut für Tierhaltung und Tierzucht,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Aliquot: 50 µl/well

Haltbarkeit: mehrere Monate bei Raumtemperatur, unter Abzug lagern

ANHANG VI: Chromatographische Bestimmung von Skatol

Tris Puffer (pH 8,3)

0,788 g	Tris HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Ad 100 ml	Aqua bidest	Reinstwasseranlage Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie, Universität Hohenheim

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

HPLC Eluent A

0,315 ml	$C_2H_4O_2$	Essigsäure 99-100 % Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
275 ml	Aqua bidest	Aqua bidest, zu 55 % Reinstwasseranlage Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie, Universität Hohenheim
150 ml	C_2H_3N	Acetonitril, zu 30 % Th. Geyer GmbH & CoKG, Renningen, Deutschland
75 ml	C_3H_8O	2-Propanol, zu 15 % Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe Deutschland

Mischen und im Ultraschallbad entgasen.

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

HPLC Eluent B

0,63 ml C₂H₄O₂

Essigsäure 99-100 %

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Ad 1 l Acetonitril

Acetonitril

Th. Geyer GmbH & CoKG, Renningen, Deutschland

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

Stammlösung Skatol

1 mg/ml Methanol

Haltbarkeit: 3 Monate bei 4 °C

Stammlösung Indol

1 mg/ml Methanol

Haltbarkeit: 3 Monate bei 4 °C

Vorverdünnung Skatol

10 µg/ml Methanol

10 µl Stammlösung Skatol

10 µl Stammlösung Indol

980 µl Methanol

Haltbarkeit: 1 Tag bei 4 °C

Arbeitslösung Skatol

5 ng/ml Tris Puffer

5 µl Vorverdünnung

Ad 10 ml Tris Puffer

Haltbarkeit: 1 Tag bei 4 °C

Stammlösung 2-Methylindol, Interner Standard

0,2 mg/ml Methanol

Haltbarkeit: 3 Monate bei 4 °C

Arbeitslösung 2-Methylindol, Interner Standard

80 ng/ml Methanol

10 µl Stammlösung

Ad 10 ml Methanol

Haltbarkeit: 1 Tag bei 4 °C

ANHANG VII: Histomorphologische und immunocytochemische Färbungen

Phosphatpuffer (PBS, 0.1 M, pH 7,2)

3,9 g	NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat, Merck 6346 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
12,76 g	Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat, Merck6580 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ad 1 l Aqua bidest

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

Formalinlösung 4 % in 0.1 M Phosphatpuffer

108 ml	CH ₂ O 37 %	Formaldehyd ≥ 37 %, säurefrei Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe Deutschland
--------	------------------------	--

Ad 1 l 0.1 M PBS

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

Ab- bzw. aufsteigende Alkoholreihe

100 % EtOH:	100 % EtOH	Ethanol 100 %, Roth 9065 Roth GmbH & CoKG, Darmstadt, Deutschland
96 % EtOH:	100 % EtOH	Ethanol 100 %, Roth 9065 Roth GmbH & CoKG, Darmstadt, Deutschland
	Aqua bidest	Reinstwasseranlage Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie, Universität Hohenheim
70 % EtOH:	100 % EtOH	Ethanol 100 %, Roth 9065 Roth GmbH & CoKG, Darmstadt, Deutschland
	Aqua bidest	Reinstwasseranlage Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie, Universität Hohenheim

50% EtOH: 100% EtOH Ethanol 100%, Roth 9065
Roth GmbH & CoKG, Darmstadt, Deutschland
Aqua bidest Reinstwasseranlage
Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Paraplast®

Paraplast® Paraffin
Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe Deutschland

Hämatoxylin-Eosin

Hämalaun-Lösung, filtriert

Mayers Hämalaunlösung, Merck 9249
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Eosin-Lösung 0,2 %

Eosin, Merck 1345
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Eisessig

Essigsäureanhydrid, Merck 42
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

GATA-4

Primärantikörper 1:200 mit TBS

GATA-4 (C-20): sc-1237
Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

Sekundärantikörper 1:400 mit TBS

Rabbit anti goat IgG: Biotin
Dako GmbH, Hamburg, Deutschland

AB-Komplex

4,5 µl A/B StreptABComplex/HRP, DAKO 3077
Dako GmbH, Hamburg, Deutschland

500 µl TBS-Lösung

30 min vorher ansetzen, dunkel aufbewahren

Tris balanced solution (TBS Stammlösung)

60,6 g TRIS Ultrapure Tris (hydroxymethyl)-aminomethan, Merck 8382
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

163,6 g NaCl Natriumchlorid, Merck 6404
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ad 2 l Aqua bidest Reinstwasseranlage
Institut für Tierhaltung und Tierzucht,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Gebrauchslösung: pH 7.5, 1:10

Haltbarkeit: 2-3 Tage, bei 4 °C dunkel stellen

Citratpuffer

21,0 g Citronensäure1-hydrat Citronensäuremonohydrat, Merck 244
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ad 1 l Aqua bidest Reinstwasseranlage
Institut für Tierhaltung und Tierzucht,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Gebrauchslösung: pH 6.0, 1:10

Haltbarkeit: 2-3 Tage, bei 4 °C dunkel stellen

Farbentwicklung mit DAB

100 mg	DAB	3,3`-Diaminobenzidin-tetrahydrochloridDihydrat,Fluka 32750 Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
200 ml	TBS-Lösung	
100 µl	H ₂ O ₂	Perhydrol 30% (filtriert) Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

7,4 % H₂O₂-Lösung zum Blockieren der endogenen Peroxidase

14,8 ml	H ₂ O ₂ 30 %	Perhydrol 30 % Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
200 ml	Aqua bidest	Reinstwasseranlage Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie, Universität Hohenheim

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

Lösung zum Blockieren unspezifischer Bindungen

Kaninchenserum	Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie, Universität Hohenheim
----------------	---

TBS

Verdünnung: 1:10

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

Citratpuffer

21,0 g Citronensäure1-hydrat Citronensäuremonohydrat, Merck 244
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ad 1 l Aqua bidest Reinstwasseranlage
Institut für Tierhaltung und Tierzucht,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Gebrauchslösung: pH 6.0, 1:10

Haltbarkeit: 2-3 Tage, bei 4 °C dunkel stellen

7,4 % H₂O₂-Lösung zum Blockieren der endogenen Peroxidase

14,8 ml H₂O₂ 30 % Perhydrol 30 %
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

200 ml Aqua bidest Reinstwasseranlage
Institut für Tierhaltung und Tierzucht,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

Lösung zum Blockieren unspezifischer Bindungen

Ziegenserum Institut für Tierhaltung und Tierzucht,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

TBS

Verdünnung: 1:10

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

Farbentwicklung mit DAB

100 mg DAB 3,3`-Diaminobenzidin-tetrahydrochloridDihydrat,Fluka 32750
Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

200 ml TBS-Lösung

100 µl H₂O₂ Perhydrol 30 % (filtriert)
Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland

Haltbarkeit: keine, immer frisch ansetzen

Negativkontrolle 1:1000 mit TBS

Ziegenserum (non-immune) Institut für Tierhaltung und Tierzüchtung,
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie,
Universität Hohenheim

Depex

DePeX[®] Polystyrol in Xylol + Weichmacher
Serva electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn em. Prof. Dr. Dr. habil. R. Claus und Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner für die wissenschaftliche Betreuung und Annahme als Doktorandin bedanken. Herrn em. Prof. Dr. Dr. habil. R. Claus möchte ich besonders für die Überlassung dieses interessanten, aktuellen und sehr wichtigen Themas, die Zusammenarbeit bei den beiden Publikationen sowie für die Betreuung bei der Fertigstellung dieser Arbeit auch während seines Ruhestandes danken.

Ein Dankeschön geht auch an Frau Priv. Doz. Dr. U. Weiler für die Einweisung ins Isotopenlabor und ihre Unterstützung bei der Verlegung der Venenverweilkatheter.

Danke den Mitarbeitern im Labor, Helga Hägele, Sybille Knöllinger und Carmen Ostertag für die Einweisung in die Untersuchungen und ihre fachlich kompetente Unterstützung.

Danke den Mitarbeitern im Stall, Bill Dunne, Mohamed Mecellem und Claudia Fischinger für die tatkräftige Unterstützung und gute Zusammenarbeit während des Tierversuches.

Danke an Anna Wagner für die vielen fachkundigen Diskussionen.

Danke an Christine Rückert für die sehr unterhaltsamen Stunden im Stall und im Büro.

Danke an Nadine Hennes für die vielen guten Gespräche während unserer gemeinsamen Zeit am Institut.

Die Untersuchungen konnten mit finanzieller Unterstützung der Firma Pfizer Animal Health durchgeführt werden, die auch den Impfstoff zur Verfügung stellte. Hierfür möchte ich mich bei der Firma Pfizer Animal Health bedanken.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern Gudrun und Erich Rottner ohne deren Unterstützung weder das Studium der Tiermedizin noch die Erstellung meiner Doktorarbeit möglich gewesen wären.

Herzlichen Dank auch an Frank Walker für seine stete Geduld, Motivation und immerwährende Unterstützung.

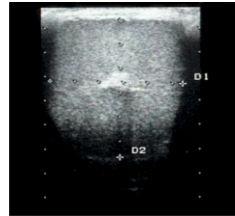
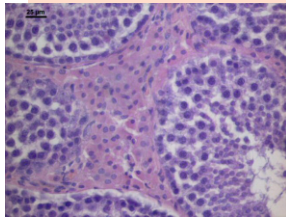
Erklärung

nach § 10 (5) der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität, Gießen

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus -Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Silke Maren Rottner



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5950-7



9 783835 195950 7