

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

**Untersuchungen zum Verlauf von Progesteron,
freien und konjugierten Östrogenen
sowie von Relaxin im peripheren Blut von
Norwegischen Waldkatzen im Verlauf
der Trächtigkeit und der Pseudogravidität.**

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

Eingereicht von
Christian Dreker

Gießen 2003

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

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

1. Auflage 2004

© 2004 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 3-938026-06-5

Verlag: DVG Service GmbH
Frankfurter Straße 89
35392 Gießen
Tel. 0641/24466
Fax 0641/25375
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

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

**Untersuchungen zum Verlauf von Progesteron,
freien und konjugierten Östrogenen
sowie von Relaxin im peripheren Blut von
Norwegischen Waldkatzen im Verlauf
der Trächtigkeit und der Pseudogravidität.**

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

Eingereicht von
Christian Dreker

Gießen 2003

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie
der Groß- und Kleintiere mit tierärztlicher Ambulanz
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

**Untersuchungen zum Verlauf von Progesteron,
freien und konjugierten Östrogenen
sowie von Relaxin im peripheren Blut von
Norwegischen Waldkatzen im Verlauf
der Trächtigkeit und der Pseudogravidität.**

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

Eingereicht von
Christian Dreker
Tierarzt aus Menden
Gießen 2003

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

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Eigenbrodt

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2003

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Vorbemerkung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 Östrogene Hormone	3
2.1.1 Definition	3
2.1.2 Struktur	3
2.1.3 Biosynthese	4
2.2 Progesteron	5
2.3 Relaxin	6
2.4 Prolaktin	7
2.5 Placentäres Lactogen	8
3. Das Reproduktionsgeschehen bei der Katze	10
3.1 Geschlechts- und Zuchtreife	10
3.2 Zyklusverlauf bei der nicht trächtigen Katze	10
3.3 Gravidität	16
3.3.1 Frühembryonale Entwicklung und endokrine Regulation	16
3.3.2 Morphologie der Katzenplazenta	19

	Seite	
3.3.3	Embryonale / fetale Verluste	20
3.4	Pseudogravidität	20
4.	Material und Methoden	23
4.1	Versuchsdesign, Versuchstiere und Blutentnahmen	23
4.1.1	Versuchsdesign, Versuchstiere und Tierhaltung	23
4.1.2	Blutentnahmen	25
4.2	Poolen von Plasmaproben zur selektiven Bestimmung von freiem und konjugiertem Estron, Estradiol- 17 β und Estradiol- 17 α	26
4.3	Hormonanalytik	27
4.3.1	Radioimmunologische Bestimmung von Progesteron im Blutplasma	27
4.3.2	Radioimmunologische Bestimmung von Relaxin im Blutplasma	29
4.3.3	Radioimmunologische Bestimmung von Östrogenen	29
4.3.3.1	Bestimmung nach Auftrennung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	29
4.3.3.1.1	Extraktion der freien Östrogene	29
4.3.3.1.2	Extraktion der konjugierten Östrogene	30
4.3.3.1.3	Säulenchromatographische Vorreinigung	30
4.3.3.1.4	Durchführung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	30
4.3.3.1.5	Radioimmunologische Nachweisverfahren	33

	Seite	
4.3.3.2	Radioimmunologische Bestimmung von Estron-, Estradiol- 17 β und der Gesamtöstrogene nach einfacher Plasmaextraktion	35
4.4	Statistische Auswertung	37
4.4.1	Auswertung der Verlaufsprofile für Progesteron	37
4.4.2	Auswertung der Relaxin- und Östrogendaten	37
5.	Materialien und Geräte	38
5.1	Geräte	38
5.2	Enzyme, ^3H -Steroide, Antisera	38
5.2.1	Enzyme	38
5.2.2	^3H - markierte Steroide	38
5.2.3	Antisera	40
5.2.4	Sonstige Reagentien und Chemikalien	43
6.	Ergebnisse	44
6.1	Verlauf der Progesteronkonzentrationen im peripheren Blut während der Gravidität und der Pseudogravidität	44
6.1.1	Vergleich der Kurvenverläufe der Progesteronwerte bei den graviden und den pseudograviden Katzen	46
6.2	Verlauf der Relaxinkonzentrationen im peripheren Blut während der Gravidität und der Pseudogravidität	47
6.3	Ergebnisse der Östrogenbestimmungen	52
6.3.1	Bestimmung von freiem und konjugiertem Estron, Estradiol-17 β und Estradiol-17 α nach chromatographischer Auftrennung gepoolter Plasmaproben	52

	Seite	
6.3.2	Bestimmung von Estron, 17 β -Estradiol und der Gesamtöstrogene nach einfacher Plasmaextraktion	54
6.3.2.1	Freies und konjugiertes Estradiol-17 β	54
6.3.2.2	Freies und konjugiertes Estron	58
6.3.2.3	Freie und konjugierte Gesamtöstrogene (GÖ)	62
7.	Diskussion	66
7.1	Diskussion der Methodik	66
7.2	Diskussion der Ergebnisse	67
7.2.1	Dauer von Gravidität und Pseudogravidität, Progesteron	67
7.2.2	Relaxin	69
7.2.3	Östrogene	69
7.2.3.1	Aspekte zur Frage der Plazenta als Östrogenquelle	71
7.2.3.2	Aspekte zur Qualität der gemessenen Östrogene	73
7.2.3.3	Schlussfolgerungen	73

	Seite
8. Zusammenfassung	74
8. Summary	75
9. Literaturverzeichnis	76
10. Abkürzungen	82
11. Anhang	83

1. Vorbemerkung

Die Norwegische Waldkatze ist trotz im Zunehmen begriffener züchterischer Ambitionen eine weitgehend naturbelassene ursprüngliche Wildform unserer Europäischen Kurzhaarkatze und anderer Katzenrassen. Auf Grund ihres luchsähnlichen Aussehens sowie ihres ausgeglichenen Charakters findet sie in zunehmendem Maße Akzeptanz bei Tierbesitzern und Katzenliebhabern. Ihre Heimat liegt, wie dem Namen zu entnehmen ist, in Norwegen, wo sie über Jahrhunderte als wild lebender Waldbewohner und in Folge als Hof- und Bauernkatze bis zu Beginn der achtziger Jahre von züchterischen Maßnahmen unbeeinflusst geblieben ist.

Der heutige Rassestandard beschreibt das Exterieur der Norwegischen Waldkatzen; eine typvolle Katze dieser Rasse ist geprägt durch einen der europäischen Kurzhaarkatze ähnlichen, jedoch großrahmigeren, kräftigen und langgestreckten, in der Bewegung elegant wirkenden Körperbau auf hohen Gliedmaßen, welche durch eine relativ zu den Vorderextremitäten zu starke Ausprägung der Hinterbeine das Becken gegenüber der Wirbelsäule anheben und höher stellen. Die klimatischen Bedingungen des Heimatlandes werden als Grund für das halblange Fell dieser Tiere genannt. Der Pelz mit stark ausgeprägter Unterwolle ist mit feuchtigkeitsabweisendem, leicht gefettetem und glänzendem Deckhaar ausgestattet. Saisonale Variationen in der Dichte und Länge der Haare sind die Norm. Im Winter entwickeln die Katzen einen starken Backenbart, starke Brust- und Oberschenkelbehaarung sowie einen buschigen Schwanz, der am Körper entlang geführt mindestens bis zum Nacken reichen sollte. Prägnante Haarbüschel im Zwischenzehenspalt sollen das Einsinken der freilebenden Tiere beim Laufen im Schnee verhindern. Ferner sind sie ein wirksamer Schutz vor einem Wärmeverlust im Bereich der Fußballen.

Die Kopfform der Norwegischen Waldkatze ist gemäß Rassestandard gleichseitig dreieckig . Die Ohren sind größer als bei den Europäischen Kurzhaarkatzen und hoch am Kopf aufgestellt. Sie weisen im Idealfall lange, luchs pinselähnliche Haare an ihren Spitzen auf. Über die endokrine Regulation der Fortpflanzung der Katze liegen grundlegende Erkenntnisse vor. Allerdings gibt es keinerlei Hinweise, inwieweit rassespezifische, das heißt domestikationsbedingte Besonderheiten vorliegen. Im Hinblick darauf erschien es interessant, bei einer dem züchterischen Einfluss bisher weitgehend entzogenen Katze, entsprechende Erhebungen anzustellen.

2. Literaturübersicht

2.1 Östrogene Hormone

2.1.1 Definition

Als Östrogene oder als östrogenwirksam werden – unabhängig von ihrer Struktur – solche Stoffe bezeichnet, die an einem geeigneten Versuchstiermodell zur Auslösung von “ Brunstsymptomen “ führen (Bamberg, 1994). Bei den körpereigenen Östrogenen handelt es sich der Struktur nach um Steroide, die vorwiegend im ovariellen und plazentaren Gewebe, aber auch im Hoden, z.B. besonders bei Schwein und Pferd (Raeside et al., 1989 ; Smith und Cox, 1987) , der Nebennierenrinde sowie im Hypothalamus synthetisiert werden. Peripher kann auch aus Androgenen im Fettgewebe eine Umwandlung in Östrogene erfolgen (Short, 1962 ; Bjersing und Carstensen, 1967).

2.1.2 Struktur

Die einzelnen Steroidhormone unterscheiden sich durch die Zahl ihrer C-Atome, Art, Anzahl, Position und Konfiguration ihrer funktionellen Gruppen sowie durch die Anzahl und Stellung der Doppelbindungen in ihrem Ringsystem. Wichtigste körpereigene Östrogene sind das 17 β -Estradiol, Estron sowie die Östrogenmetaboliten 17 α -Estradiol und Estriol.

2. 1. 3 Biosynthese

Vorstufe aller hormonwirksamen Steroide ist das Cholesterin. Es wird entweder mit der Nahrung aufgenommen oder aus Acetyl-CoA in fast allen Körperzellen synthetisiert (Stryer, 1990). Das erste Zwischenprodukt der eigentlichen Steroidhormonsynthese ist das Pregnenolon. Spezische Enzyme bilden aus dieser gemeinsamen Vorstufe organabhängig Corticoide, Gestagene, Androgene und /oder Östrogene. Der Bildung der Östrogene stehen mit dem delta4 - und dem delta5 - Syntheseweg zwei mögliche Entstehungsabläufe zur Verfügung. Die Bildung auf dem delta5 Weg erfolgt über die Zwischenstufen 17α -Hydroxypregnenolon und Dehydroepiandrosteron. Der alternative delta4 -Syntheseweg führt über Progesteron, 17α -Hydroxyprogesteron und Androstendion. Estron und 17β -Estradiol entstehen durch Aromatisierung von Androstendion bzw. Testosteron (Green und Leake, 1987). Die ovarielle Produktion von Androstendion durch Zellen der Theca interna ist die Grundlage für die nachfolgende Synthese der Östrogene mittels des Cytochrom P450-abhängigen Aromatase-Enzymsystemes. Dieser Schritt findet zum größten Teil in den Granulosazellen der Ovarien statt. Das Schema der Biosynthese zeigt die Abb 1.

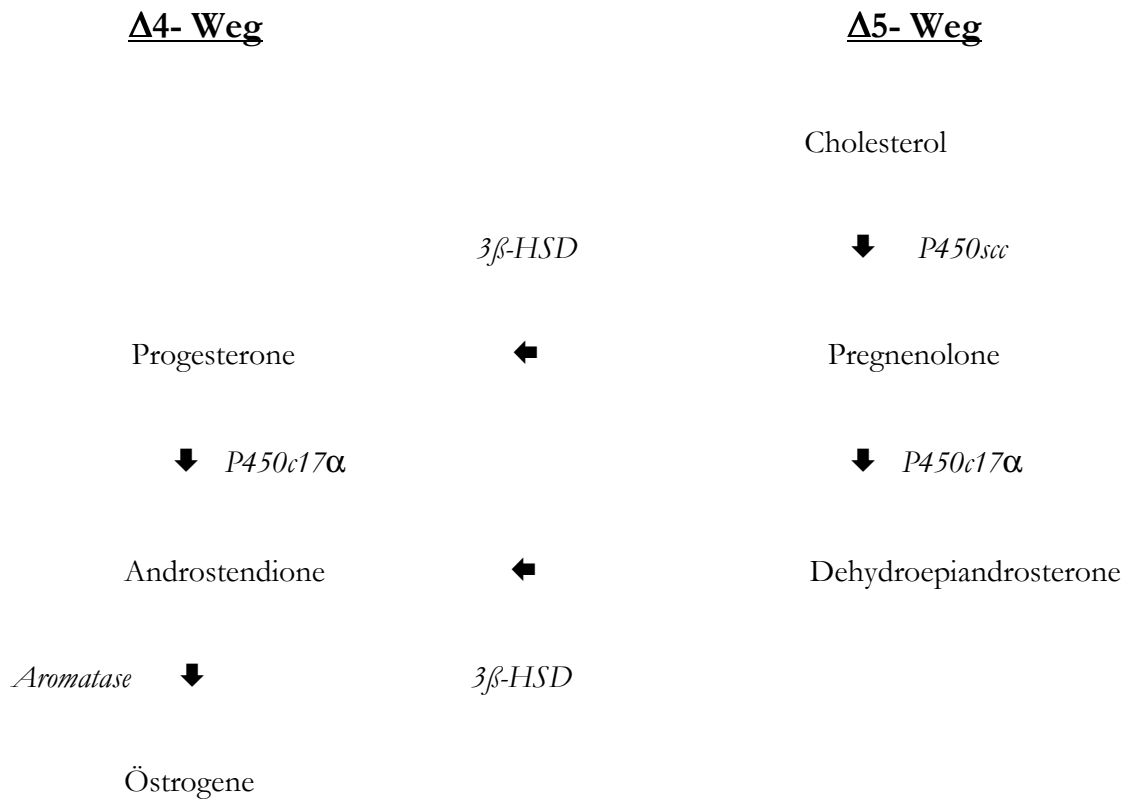


Abb.1 Schema der Östrogenbiosynthese nach Schuler et al. (1994)

2. 2 Progesteron

Progesteron ist das Hormon, welches bei praktisch allen untersuchten Säugetierspezies als endogenes Gestagen für die Aufrechterhaltung der Gravidität erforderlich ist. Seine Wirkung resultiert aus sekretorischen Veränderungen des Endometriumepithels sowie der Ruhigstellung des Myometriums. Seine Bildungsstätte ist neben Gelbkörper und Plazenta auch in geringerem Umfang die Nebennierenrinde (Bamberg, 1994). Hinweise zur Biosynthese finden sich in Abb. 1 (s.o.).

2.3 Relaxin

Bei Relaxin handelt es sich um ein dem Insulin ähnliches Polypeptidhormon mit einem Molekulargewicht von ca. 6000, welches bei den Tierarten Schaf (Wathes et al., 1988), Kaninchen, Pferd, Ratte, Schwein, Katze und Hund nebst Hyänen, Labortieren sowie beim Menschen im Verlauf der Gravidität nachgewiesen werden kann; die Produktion findet vorwiegend in der Plazenta statt. Beim Schwein stammt Relaxin in erster Linie aus den Corpora lutea und wird sowohl bei zyklischen als auch graviden Tieren nachgewiesen (Zaleski und Sherwood, 1996). Relaxin konnte bislang nicht nachgewiesen werden beim Rind und anderen Wiederkäuern, außer dem Schaf (Talamantes und Ogren, 1988). Den beim Menschen zu unterscheidenden Subtypen H1 und H2 (Qin und Garibay-Tupas, 1997) steht nach derzeitigem Kenntnisstand bei den einzelnen Tierarten jeweils nur ein tierartspezifisches Äquivalent gegenüber. Obwohl Relaxin zu den schon lange bekannten hormonalen Wirkstoffen zählt, liegen verhältnismäßig wenig Angaben über dessen biologische Bedeutung vor. Bei der Hyäne bewirkt Relaxin die Größenveränderungen des clitorialen Gewebes während des pubertären Klitoriswachstums und im Zeitraum der Geburt (Steinetz, 1997). Eine gelegentlich postulierte Trächtigkeitserhaltende Funktion beim Hund kann dem Relaxin allerdings nicht attestiert werden (Hoffmann et al., 1999). Bei Schaf, Labortier und Mensch wird im letzten Abschnitt der Gravidität, nicht aber unter der Geburt, die Kontraktilität des Uterus gehemmt (Challis und Olsen, 1988; Bryant-Greenwood, 1982). Der Nachweis, dass Relaxin zusammen mit den Östrogenen und anderen Hormonen die Entwicklung der Milchdrüse vor der Geburt fördert, ist bisher nur beim Schwein erbracht worden (Zaleski und Sherwood, 1996). Auch eine direkte geburtsfördernde Wirkung wurde bisher nur beim Schwein beobachtet (Thorburn et al., 1977). Bei dieser Tierart sind Relaxinrezeptoren in den glatten Muskelzellen und den Epithelien von Zervix, Milchdrüse, Zitze, Haut und Intestinum

gefunden worden (Min und Sherwood, 1996), wie auch in den Leydigzellen des Eberhoden (Min et al., 1998). Allerdings hat Relaxin auch bei der Katze und einigen Labortierarten aufgrund seiner kontraktilitätsfördernden Wirkung auf den Uterus während der Geburt und durch die ausgelöste präpartale Weitstellung des weichen Geburtsweges, dem sogenannten Cervix-Softening, eine Bedeutung für den physiologischen Geburtsablauf (Stewart und Stabenfeld, 1985).

2.4 Prolaktin

Das Prolaktin (PrI) ist ein Polypeptid, welches bei den Wiederkäuern aus 198 und beim Schwein aus 199 Aminosäuren zusammengesetzt ist. Es besitzt als Proteohormon des Hypophysenvorderlappens eine dem Somatotropin ähnliche Struktur und entsteht nach Abspaltung aus einem tierartlich unterschiedlich großem Präkursormolekül (Jöchle, 1997). Seine primäre und spezieübergreifende Funktion liegt in der Steuerung der Milchdrüsenausbildung im Verlauf der Trächtigkeit. Bei Rind und anderen Wiederkäuern ist die Ausbildung des Gesäuges (Mammogenese) und Aufnahme der Milchbildung (Lactogenese) zur Vorbereitung auf die Laktation nicht gekoppelt mit der nachfolgenden Unterhaltung und Aufrechterhaltung der Milchproduktion (Galaktopoese) (Schams et al., 1984). Bei den monogastrischen Säugetieren hingegen ist das Prolaktin neben der Ausbildung der Mamma auch für die spätere Aufrechterhaltung des Milchflusses verantwortlich (Döcke, 1994). Während des Reproduktionszyklus beim Hund ist Prolaktin sowohl während der zweiten Hälfte der Trächtigkeit als auch während der zweiten Hälfte der Pseudogravidität deutlich erhöht (Banks et al., 1983).

Bei der Katze dagegen kann Prolaktin lediglich in der zweiten Hälfte der Gravidität und in der Laktationsphase post partum in höheren Konzentrationen im peripheren Blut gemessen werden, die laktationslose Pseudogravidität verläuft ohne eine Erhöhung des Prolaktinspiegels (Banks et al., 1983). Untersuchungen von Graf (1977) deuten darauf hin, daß Prolaktin bei der Katze nach der Implantation auch eine trächtigkeitsspezifische luteotrophe Funktion erfüllt. Es hemmt die Regression der Corpora lutea und stimuliert die Produktion von Progesteron (Verstegen et al., 1993; Banks und Stabenfeld, 1983). Ferner unterliegt die Prolaktinsekretion bei der Katze einem strengen circadianen Rhythmus mit einem deutlichen Anstieg in der Nacht. Dieser kann durch künstliche Beleuchtung beeinflusst werden (Banks und Stabenfeld, 1983), mit Folgen für die Fertilität. Bei Verkürzung der Hellperiode führt ein daraus resultierender Anstieg des Prolaktins zu einer verminderten ovariellen Aktivität (negative Korrelation), umgekehrt ist ein Absinken des Prolaktinspiegels als Folge einer Verlängerung der Beleuchtungsintervalle gekoppelt mit einem Ansteigen der ovariellen Aktivitäten, gemessen an der Ausbildung von Tertiärfollikeln (Leyva et al., 1989). Diese Beobachtungen weisen die Katze als einen long-day breeder aus, wobei als interner Zeitgeber die Melatoninsekretion des Pinealorgans fungiert (Leyva et al., 1989). Prolaktin weist bei den anderen Haustieren jahreszeitliche Schwankungen mit höheren Basalwerten im Sommer und quantitativ niedrigeren Werten im Winter auf (Jöchle, 1997; Döcke, 1994).

2. 5 Placentäres Lactogen

Placentäres Lactogen ist ein Wachstumshormon mit prolaktinähnlichen Eigenschaften und zählt somit zur Gruppe der somatotrop wirksamen Regelfaktoren. Gesteuert wird vom Placentären Lactogen in erster Linie die lobulo-alveoläre Entwicklung der Milchdrüse während

der Gravidität. Bei Rind und Schaf konnte gezeigt werden, daß es aus dem fetalen Trophoblast (pars cotyledonaria der Plazenta) stammt. Es weist bei Primaten, Labortieren sowie bei den Wiederkäuern Rind, Schaf und Ziege mit einem tierartlich unterschiedlichen MG von 20.000 - 34.000 (Flint, 1983; Talamantes und Ogren, 1988) nachgewiesen worden ist, steht der Nachweis bei Pferd, Hund und der Katze bislang noch aus.

3. Das Reproduktionsgeschehen bei der Katze

3.1 Geschlechts- und Zuchtreife

Die Geschlechtsreife der weiblichen Katze beginnt im Alter von 8 bis 10 Monaten (Jemmet und Evans, 1977) bei einem in der Regel über 2,5 kg liegendem Körpergewicht. Kurzhaarige Rassen erreichen ihre pubertäre Phase zumeist früher als langhaarige Katzen. In extremen Fällen ist die Geschlechtsreife bereits bei vier Monaten alten Katzen zu beobachten. Ein Zusammenhang zwischen dem individuellen Eintrittsalter in die Pubertät und der zu diesem Zeitpunkt saisonalen photoperiodischen Momentansituation ist bei Katzen auf Grund der Art ihrer neuroendokrinen Steuerung des Sexualzyklus (long day breeder, s.Kap. 2.4) gegeben .

3.2 Zyklusverlauf bei der nicht trächtigen Katze

Die Katze zählt zu den saisonal polyöstrischen Tieren; eine Besonderheit ist, dass die Ovulation nicht spontan sondern induziert erfolgt. Die sexuelle Aktivität setzt mit zunehmender Tageslichtlänge ab Februar ein und hält bis Oktober an. Der in dieser Zeit regelmäßig wiederkehrende Reproduktionszyklus gliedert sich in die Abschnitte Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Interöstrus. In den Wintermonaten tritt eine individualspezifisch unterschiedlich lange Unterbrechung der Zyklusabläufe in Form einer absoluten Azyklie, dem Anöstrus, auf. Dieser ist in seinem Auftreten und seinem Erscheinungsbild mit den Lebensbedingungen der jeweiligen Population eng verknüpft (Stabenfeldt und Shille, 1977). Seine volle Ausprägung ist nur bei der Wildpopulation zu finden, die bei natürlichen Lichtverhältnissen als long-day-breeder in dieser Form auf die verkürzte Tageslichtlänge

reagiert. Bei den unter künstlichen Lichtverhältnissen lebenden Hauskatzen kann diese Azyklie mitunter vollkommen ausbleiben. Kennzeichnend für die jeweiligen Zyklusphasen sind die letztlich dem ovariellen Zyklus zugrundeliegenden hormonalen und funktionellen Abläufe. Für die Katze gilt dabei – ähnlich wie beim Hund (Hoffmann et al., 1992) – dass vom Uterus offensichtlich keine die Luteolyse betreffenden Regelfaktoren abgegeben werden. Der physiologische Zyklus der Katze hat eine Länge von im Mittel 14-21 (Spannweite 4-30) Tagen (Stabenfeldt und Shille, 1977) und gliedert sich wie folgt auf :

Der **Proöstrus** dauert 1 bis 3 Tage, wobei eine mittlere Dauer von 48 Stunden am häufigsten zu beobachten ist (Shille et al., 1979; Günzel und Klug-Simon, 1985). In dieser Phase kommt es an den Ovarien unter dem Einfluß von Follikelstimulierendem Hormon (FSH) zum Heranreifen von zumeist 3-7 Follikeln, die einen mittleren Durchmesser von 2 mm erreichen. Parallel dazu setzt die folliculäre Produktion von 17β - Estradiol ein, wodurch die charakteristische morphologische Veränderung am Genitale der Katze (Vulvaödem, Schleimhauthyperämisierung) sowie Verhaltensänderungen eintreten; die Katze beginnt zu "rollen". Das einsetzende Follikelwachstum ist bereits etwa 48 Stunden vor dem Brunsteintritt mikroskopisch am Ovar zu erkennen (Leiser und Koob, 1993).

Mit einsetzendem **Östrus** wird das Raunzeverhalten intensiviert. Das heißt, über einen Zeitraum von 5 bis 14 Tagen im Frühjahr und eine Zeitspanne von 1-6 Tagen gegen Ende der Fortpflanzungssaison ist das charakteristische Präsentieren der Vulva bei seitlich abgewinkelttem Schwanz und Lordosisreflex nebst Tretbewegungen der Hinterextremitäten zu beobachten. Der während der Duldungsphase mögliche Vollzug des Deckaktes scheint trotz zum Teil kontroverser Angaben auf die Länge des Östrus keinen regulierenden Einfluß auszuüben (Shille et al., 1979).

Zur Induktion der Ovulation bedarf es bei der induziert ovulierenden Katze (Greulich, 1934) eines speziellen Reizes zur Ausschüttung von GnRH und damit von Luteotropem Hormon (LH). Der entsprechende Stimulus hierfür ergibt sich aus der mechanischen vaginalen und zervikalen Reizung während des Deckaktes in Verbindung mit den Friktionsbewegungen des Katers. Für die Höhe der induzierten GnRH-Freisetzung und damit auch für die Höhe der präovulatorischen LH-Freisetzung sind auch Häufigkeit und Intensität des vaginalen Reizes mit verantwortlich (Shille et al., 1979) und somit - zumindest in bestimmtem Umfang - auch für die Zahl der ovulierten Follikel (Roth und Lein., 1995). So wird sogar beschrieben, daß eine einmalige Bedeckung bei der Kätzin nicht in allen Fällen zur Auslösung einer Ovulation ausreicht (Burke, 1986 ; Concannon et al., 1983). Allerdings konnte in anderen Studien nachgewiesen werden, daß eine einmalige Kopulation am dritten Tag des Östrus die gleiche Anzahl von Eisprüngen auszulösen vermag, wie eine viermalige Bedeckung innerhalb der ersten Stunde nach einsetzender Akzeptanz des Katers durch die rollige Kätzin (Wildt et al., 1981). Ferner ist der Sonderfall der spontanen Ovulation bei der Katze beschrieben worden (Gudermuth et al., 1997; Lawler et al., 1993). Auch auf Grund von eigenen Beobachtungen ist aber anzunehmen, daß in diesen Fällen das Verhalten der rolligen Kätzin und das Belecken der ödematisierten Vulva durchaus als induzierende Stimuli einer selbst ausgelösten Ovulation zu deuten sind. Ein meßbarer LH-Anstieg ist bereits fünf Minuten nach der ersten Kopulation zu verzeichnen. Dieser Anstieg ist an einen im Östrus erhöhten Estradiol-17 β Spiegel gebunden, der vom Beginn der folliculären Phase an bis zu deren Ende trotz großer individualspezifischer Schwankungen stets bei Werten über 20 pg/ml Plasma liegt (s. Abb.2 S.15). Der Estradiol-17 β Spiegel weist einen bemerkenswerten und über mehrere Tage anhaltenden Anstieg im mittleren Drittel des Östrus auf und erreicht hierbei Werte bis zu 60 (in Einzelfällen bis zu 200) pg/ml Plasma. Dabei gilt als gesichert, daß auch während des Östrus nicht alle Follikel an

der Estradiol- 17β Sekretion beteiligt sind, die dabei zugrunde liegenden Selektionsmechanismen konnten bisher allerdings noch nicht geklärt werden (Dawson und Friedgood, 1940; Henricks et al., 1972). Im Falle einer Ovulation tritt diese etwa 30-36 Stunden nach dem präovulatorischen LH-Peak auf, welcher etwa 4 Stunden nach der ersten Kopulation mit LH-Werten um etwa 100 ng/ml Serum zu messen ist (Roth et al., 1995). Zum Teil ist der Ovulationszeitpunkt aber auch erst bis zu 52 Stunden nach dem LH-Peak zu verzeichnen (Wildt et al., 1981). Der Progesteronspiegel steigt nach der Ovulation noch während des Östrus rasch an und kann nach 48 Stunden bereits Werte von 20-30 ng/ml erreichen (Shille und Stabenfeld, 1979). Der meßbare Progesteronanstieg kann somit als Nachweis der stattgefundenen Ovulation dienen. Vorwiegend β -adrenerge Neurotransmitter (Adrenalin, Noradrenalin) steuern nach Stimulation der vaginalen und vestibulären Nervenendigungen über die extrinsische Innervation des Ovars, welches mit den entsprechenden Rezeptoren bestückt ist, die Produktion von Progesteron. Die Östrogensekretion in der Brunst ist jedoch autonom und unterliegt nicht dem Einfluß dieses neurovaginalen Reizes (Wheeler et al., 1987).

Während des bis zu zwei Tagen andauernden **Metöstrus** duldet die weibliche Katze zwar weiterhin den Aufstieg des Katers, eine Intromissio penis wird von ihr jedoch nicht länger toleriert. Der Versuch wird mit aggressivem Verhalten beantwortet, eine Konzeption ist daher auf natürlichem Wege zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich.

Der **Interöstrus** als Phase der sexuellen Ruhe nach nicht erfolgtem oder nicht zu einer Ovulation führendem Deckakt beginnt mit dem ersten Tag, an dem die Katze den Aufstieg des Katers nicht mehr duldet und ihre Verhaltensmuster nicht länger dem typischen Erscheinungsbild des Östrus entsprechen (Arbeiter, 1994). Seine Dauer variiert in der Regel zwischen 4 bis 9, manchmal auch bis zu 20 Tagen, jeweils in negativer Korrelation stehend

zur Länge des vorausgegangenen Östrus. Gelbkörper sind auf Grund der nicht aufgetretenen Ovulation in dieser Phase am Ovar nicht zu finden. Vielmehr kommt es zu einer Atresie der zuvor angebildeten Follikel. Bei einem vollständigen Ausbleiben des Interöstrus laufen die Östren kontinuierlich in Folge ab, wobei das Phänomen der sogenannte "Dauerrolligkeit" in Form eines nymphomaneähnlichen Zustandes auftritt, der in Extremfällen bis zu mehreren Monaten andauern und bei den betroffenen Kätzinnen zu schweren, nicht reversiblen Verhaltensstörungen und morphologischen Schäden wie zystische endometriale Hyperplasien, uterine Polypen, Pyometren oder endometriale Atrophien sowie Zystenbildung an den Eierstöcken führen kann (Dow, 1962 ; Lawler et al., 1991).

Der **Anöstrus** ist das Stadium, in dem nach der Fortpflanzungssaison die Reproduktionsaktivitäten der Katzen weitgehend zum Stillstand kommen. Die Ovarien weisen hierbei keine hormonproduzierenden Funktionsgebilde auf, lediglich Primär- und Sekundärfollikel sind zu diagnostizieren. Zur neuen Saison ist ein Wiedereintritt in das zyklische Geschehen mit Aufnahme des Proöstrus zu erwarten.

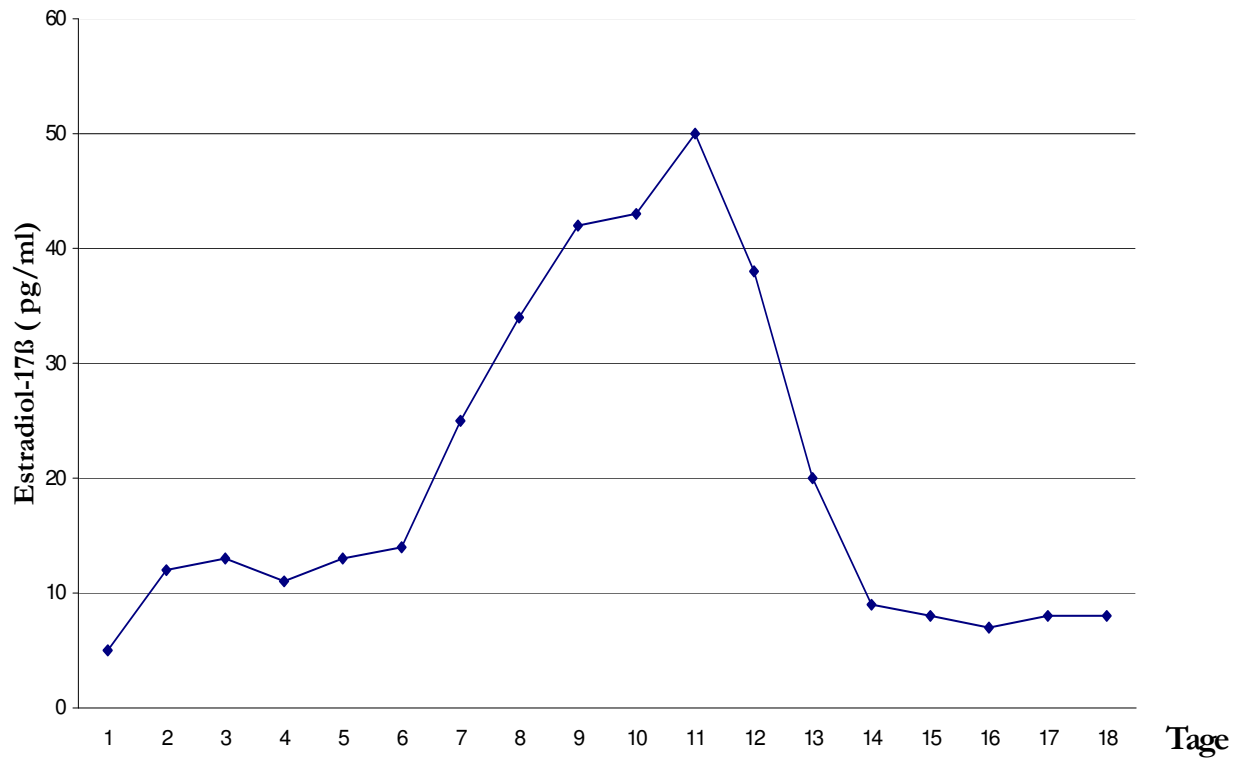


Abb.2 Verlauf der Konzentrationen an Estradiol 17-β im peripheren Blutplasma der Katze während eines anovulatorischen Zyklus (Shille et al. 1979)

3.3 Gravidität

3.3.1 Frühembryonale Entwicklung und endokrine Regulation

Frühembryonale Entwicklung und Implantation: Im Anschluß an die induzierte Ovulation findet bei der Katze die Konzeption 12-64 Stunden nach dem Eisprung statt (Swanson et al., 1995); Ort der Befruchtung ist die Eileiterampulle. Bis zu 124 Stunden post copulationem können die Embryonen im Eileiter verbleiben, wobei sie das Morulastadium erreichen. Der unmittelbar nach der Ovulation zu beobachtende Progesteronanstieg (s.S.10) und der absinkende Östrogenspiegel sind für den beschleunigten Abstieg der Morulae während des insgesamt relativ langsamen Transportes im Isthmus tubae uterinae, ohne nachgewiesenes tube-locking, bei der Katze verantwortlich (Swanson et al., 1995). Erst nach etwa 148 Stunden erreichen die Embryonen als kompakte Morulae oder frühe Blastozysten das jeweilige Horn des Uterus. Die Implantation der Embryonen kann sich durch eine relativ lange transuterine Migrationsphase bis zu längstens 20 Tagen nach der Ovulation hinauszögern (Swanson et al., 1995). Somit ist die Katze in der Lage, die Anzahl der Feten innerhalb der Uterushörner trotz unterschiedlicher Ovulationszahlen ihrer beiden Ovarien auszugleichen (Tsutsui et al.; 1989).

Progesteron: Der Beginn der Gravidität ist durch eine rasch einsetzenden Bildung ovarieller Gelbkörper, die sich aus den ovulierten Follikeln über eine Weiterentwicklung der Corpora haemorrhagica heranbilden, gekennzeichnet. Während der gesamten Dauer der Gravidität von durchschnittlich 63 bis 66 Tagen kommt dem von den Gelbkörpern sezernierten Progesteron eine graviditätserhaltende Bedeutung zu. Der Anstieg im Serum geschieht sehr schnell ab dem 2. Tag nach der ersten Bedeckung, ausgehend von Basalwerten < 1 ng/ml. Obgleich Werte zwischen 5 und 15 ng/ml offensichtlich ausreichen, um die Trächtigkeit aufrecht zu erhalten, liegen die während der Gravidität gemessenen Werte zwischen 45 bis 60 ng/ml (Schmidt et al.,

1983). Höchstwerte finden sich – unbeschadet der hohen individuellen Variabilität - häufig um den 26. Tag der Trächtigkeit, ein Abfall der Progesteronproduktion tritt erst unmittelbar vor dem Beginn der Geburt ein (Schmidt et al., 1983). Dieser Abfall ist nicht an die morphologische Rückbildung der Corpora lutea gebunden, da bei einer laktierenden Katze beim Belassen der Welpen die morphologische Luteolyse erst ab etwa dem 63. Tag post partum einsetzt (Dawson, 1946). Schlüssige Beweise für eine plazentare Progesteronproduktion während der Trächtigkeit, wie sie von Verhage et al., (1976) postuliert wurde, stehen bislang noch aus. Neuere Untersuchungen von Verstegen et al. (1993) zeigen, dass eine eventuelle plazentare Progesteronproduktion nicht zu einer messbaren Erhöhung der Progesteronkonzentration im Blutplasma führt und demnach ohne jede trächtigkeitsrelevante Bedeutung ist

Prolaktin: Dieser Wirkstoff steigt mit dem Beginn der zweiten Hälfte der Gravidität bis zur Geburt deutlich von Basalwerten zwischen 5-10 ng/ml Plasma auf Werte bis zu >70 ng/ml an und ist bei laktierenden Tieren bis zur Entwöhnung der Welpen in ähnlichen und zum Teil noch höheren Konzentrationen (≤ 92 ng/ml) zu finden. Der Anstieg zu diesem Zeitpunkt der Trächtigkeit dient der Aufrechterhaltung der Lutealfunktion und damit der weiteren Bereitstellung von Progesteron. Das heißt, Prolaktin übt bei der Katze, wie auch beim Hund, eine luteotrope Funktion aus (Concannon et al., 1978). Mit Rückgang der Säugefrequenz beginnen die Prolaktinwerte ca. 8 Wochen post partum kontinuierlich abzufallen, ebenso wie nach einer vorzeitigen Entwöhnung, und kehren innerhalb weniger Tage auf Basalwerte zurück (Banks et al., 1983).

Relaxin: Ab dem 20. Tag der Gravidität kann Relaxin im peripheren Blut bei der Katze nachgewiesen werden. Ab dem 35. Tag der Gravidität stellt sich bis zum 50. Tag ein Plateau ein, die Werte liegen bei durchschnittlich 8-9 ng/ml Plasma. Danach ist ein zuerst langsamer

und ab dem 58.Tag ein rapider Abfall der Relaxinwerte zu verzeichnen. Zum Zeitpunkt der Geburt ist Relaxin unter 1 ng/ml Plasma abgesunken. Der Anstieg des Relaxin findet in der Regel zu einem Zeitpunkt statt, an dem das Trächtigkeitserhaltende Progesteron bereits Maximalwerte überschritten hat. Stewart und Stabenfeld (1985) sprechen daher von einem möglichen Synergismus zwischen Progesteron und Relaxin im Hinblick auf die physiologische Aufrechterhaltung der Trächtigkeit bei der Katze. Dagegen spricht allerdings der Nachweis, dass durch Anwendung von Antigestagenen auch in der zweiten Hälfte der Gravidität ein Abort auslösbar ist (Hoffmann und Riesenbeck, 1999).

Estradiol-17 β : Die im Östrus angestiegenen Estradiol-17 β Werte bleiben im peripheren Blut noch für ca. 2-4 Tage nach der Kopulation in höheren Konzentrationen nachweisbar, wobei sich jedoch deutliche individuelle Variationen und auch offensichtliche Schwankungen im Tagesverlauf ergeben (Roth et al., 1995). Ab dem fünften Tag nach der Kopulation liegen die Estradiol-17 β Werte zumeist unter 20 pg/ml, jedoch treten mitunter Spitzenwerte bis zu 50 pg/ml bei solchen graviden Tieren auf, welche während der Gravidität neue Follikel anbauen (Wildt et al., 1981). Ab dem 39. Tag der Gravidität steigen die Estradiol-17 β Werte im Serum wieder meßbar an und werden variabler (Wildt et al., 1981), ab dem neunten Tag vor der Geburt ist ein weiterer Anstieg zu verzeichnen. Als Erklärung hierfür wird eine präpartale Ausschüttung fetaler Hormone, ein bisher allerdings nicht näher charakterisierter Vorgang, propagiert (Schmidt et al., 1983). Auch im Hinblick auf die angewandten Nachweisverfahren lassen sich nur bedingt Aussagen bezüglich der Art der erfassten Östrogene machen, die Abb.3 zeigt den Verlauf von Estradiol-17 β und Progesteron im peripheren Blut einer graviden Katze nach Schmidt et al., (1983).

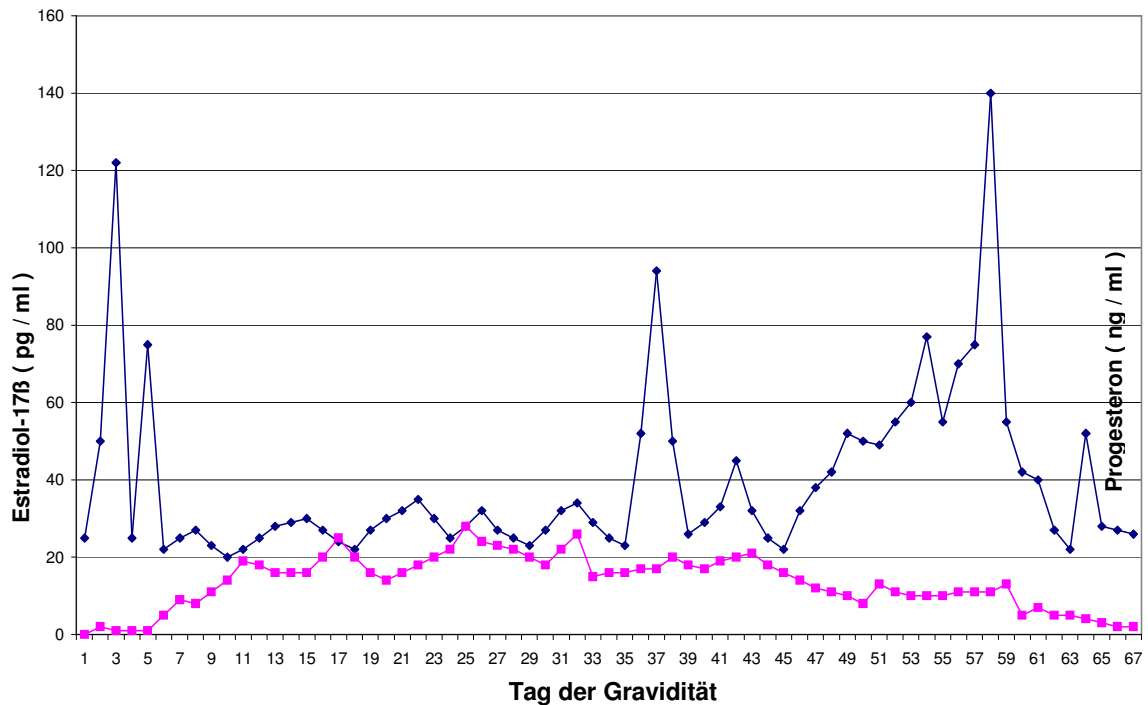


Abb.3 Verlauf der Estradiol-17β (◆) und Progesteron (■) Konzentration im peripheren Blut einer graviden Katze (nach SCHMIDT et al., 1983)

3.3.2 Morphologie der Katzenplazenta

Bei der Plazenta der Katze handelt es sich um eine Placenta zonaria, die aufgrund der Verteilung der Verbindungsstellen und der sich daraus ergebenden ringförmigen Anordnung der fetalen Membran die Bezeichnung Gürtelplazenta erhalten hat. Nur in diesem begrenzten Bereich korrespondieren der choriovitelline und der chorioallantoide Anteil miteinander. Diese Plazenta findet ihre Ausdehnung zwischen zwei kuppelförmigen paraplazentären Polen. Vom Aufbau der Schichten her handelt es sich um eine Plazenta vom endotheliochorialen Typ. Ihr

lamellenförmiger Aufbau wird durch kreuz und quer verlaufende maternal-fetale Blutgefäße überbrückt (Leiser und Koob, 1984). Die Implantation des syncytialen Trophoblasten mit den mütterlichen Kapillaren findet frühestens am 14. Tag im Bereich des zum Teil degenerierten endometrialen Stromas statt, wie bereits oben erwähnt (s.S.16), aber mitunter auch nach längerer Migrationsphase erst am 20. Tag post copulationem. Hierbei entsteht eine morphologisch und funktionell enge Verbindung, welcher bei der Synthese des Relaxins eine wesentliche Rolle zukommt. Somit ist die Relaxinproduktion an das Vorhandensein der Plazenta gekoppelt und daher in der Pseudogravidität nicht möglich.

3. 3. 3 Embryonale / fetale Verluste

Auffallend ist eine Diskrepanz in Höhe von 30 % beim Vergleich der Anzahl vorhandener Corpora lutea und den tatsächlich zu findenden Embryonen. Diese Diskrepanz weist auf eine vergleichsweise hohe embryonale Verlustrate hin, wodurch die Katze - im Vergleich zu anderen Tierarten, wie zum Beispiel dem Pferd, wo die Verlustrate mit nur 8 % angegeben wird - eine Sonderstellung einnimmt. Roth et al., (1995) beschreiben diese frühembryonalen Verluste als vor der Implantation im Stadium der Blastocyste stattfindend.

3.4 Pseudogravidität

Die Pseudogravidität der Katze ist die Folge einer sterilen, ein- oder mehrmaligen Kopulation oder anderer manueller, ovulationsauslösender Genitaltraktreizungen ("Feathering") . Post ovulationem bilden sich Corpora lutea an, deren Funktionalität auf 30 - 40 Tage limitiert ist (Arbeiter, 1994). Unter dem Einfluß dieser Gelbkörper kann – ähnlich wie bei der Hündin aber deutlich seltener - eine Lactatio sine graviditate beobachtet werden, deren Symptomatik bei der Kätzin weniger vom eintretenden Mutterverhalten als von einer Prädisposition zur Fibroadenomatose und Neigung zur Mastitis geprägt wird (Arbeiter, 1994). Nach Verhage et al., (1976) ist der Progesteronspiegel in der Pseudogravidität ab dem 28. Tag signifikant niedriger als in der regulären Trächtigkeit, ein weiterer deutlicher Abfall ist 30-40 Tage nach der Ovulation zu verzeichnen und beruht auf der bei der pseudograviden Katze fehlenden Produktion des luteotrop wirkenden Prolaktins, was auch an der fehlenden Anbildung der Milchdrüse bei der pseudograviden Katze klinisch erkennbar ist (Jöchle, 1993). Mit der einsetzenden Regression der Gelbkörper endet die Pseudogravidität der Katze, ein neuer Sexualzyklus beginnt mit dem Eintritt in den nachfolgenden Proöstrus. Wie Abb.4 zeigt, ergibt sich für den Östrogenverlauf ein ähnliches Bild wie bei der graviden Katze.

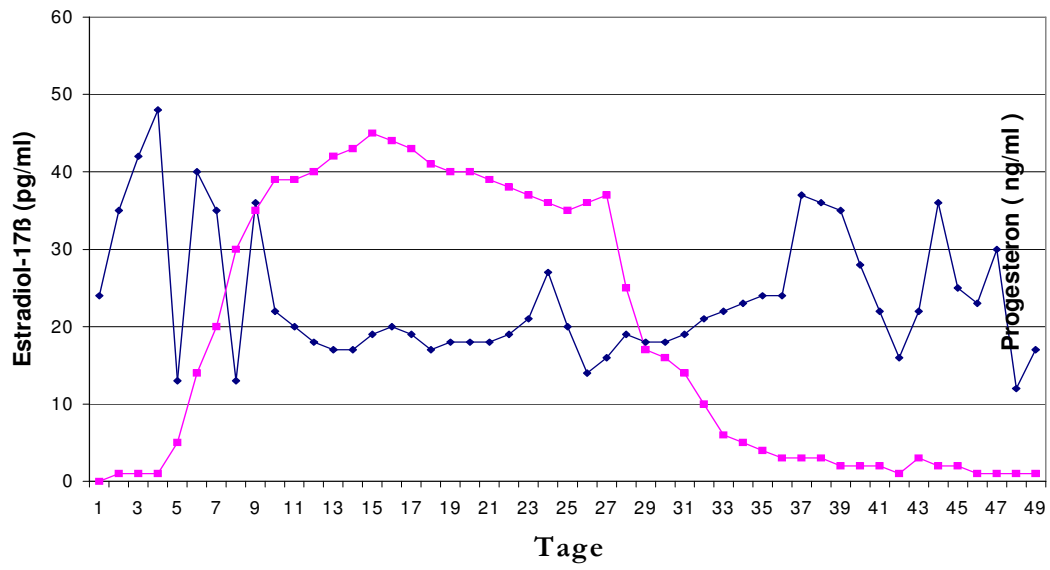


Abb.4 Verlauf der Estradiol-17β (◆) und Progesteron (■) Konzentrationen im peripheren Blut einer pseudograviden Katze; nach SCHMIDT et al. (1983)

4. Material und Methoden

4.1 Versuchsdesign, Versuchstiere und Blutentnahmen

4.1.1 Versuchsdesign, Versuchstiere und Tierhaltung

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, bei jeweils sechs graviden und pseudogriden Katzen den Verlauf der Progesteronkonzentrationen über den gesamten Zeitraum der Gravidität bzw. Pseudogravidität zu erfassen. In Ergänzung dazu wurde bei jeweils drei graviden bzw. pseudogriden Katzen der Verlauf der Relaxinkonzentrationen bestimmt.

Nachdem bisher das Vorkommen von Östrogenen bzw. konjugierten Östrogenen bei der Katze nicht näher spezifiziert wurde, war es ein weiteres Ziel vorliegender Arbeit, gepoolte Plasmaproben gravider und pseudogriden Katzen nach selektiver Auftrennung mittels HPLC auf das Vorkommen von freiem und konjugiertem Estron, Estradiol-17 β und Estradiol-17 α zu untersuchen. In Abhängigkeit von der nach Abschluß dieser Untersuchungen noch verbleibenden Menge an Plasma konnte bei jeweils zwei graviden und pseudogriden Tieren noch vergleichend zu den Ergebnissen nach Auftrennung mittels HPLC der Verlauf bzw. das Vorkommen von freiem und konjugiertem Estron und Estradiol-17 β sowie der freien und konjugierten Gesamtöstrogene nach einfacher Extraktion bestimmt werden (vgl. 6.3.2)

Pseudogravide Tiere: Beim Einsetzen einer physiologischen Rolligkeit wurden willkürlich sechs in die Untersuchung eingehende Kätzinnen mittels Knopfsonde in den ersten beiden Tagen der Raunze im Vestibulum mechanisch gereizt und mittels Noppenhandschuh im Anogenitalbereich stimuliert („Feathering“). Die Intensität und Dauer dieser Stimulation sowie die Intervalle zwischen den Wiederholungen ergaben sich aus der Akzeptanz der Kätzinnen, die Mindestzahl lag jedoch bei jeweils vier Stimulationen pro Tag. Die Tiere hatten während dieser Tage zusätzlich phasenweise sozialen und körperlichen Kontakt zum anwesenden

zuchteigenen Deckkater, ein Coitus wurde jedoch nicht gestattet. Die Dauer der Pseudogravidität, definiert als die Zeitspanne von der letzten Stimulation bis zum Einsetzen der nächsten Rolligkeit lag im Mittel bei 39 ± 6 Tagen (s. Tab 1).

Tab. 1 Dauer der Pseudogravidität bei den einzelnen Tieren in Tage

	Tier 7	Tier 8	Tier 9	Tier 10	Tier 11	Tier 12
Dauer der Pseudo-gravidität in Tagen	36	33	38	45	42	40

Gravide Tiere: Beim Einsetzen einer physiologischen Rolligkeit wurde sechs in die Untersuchung eingehenden Kätzinnen in den ersten beiden Tagen der Raunze der uneingeschränkte soziale und körperliche Kontakt zum ständig anwesenden zuchteigenen Deckkater gestattet. Die Bedeckungen erfolgten ausschließlich im Natursprung ohne weitere Interventionen. Die Häufigkeit und Intensität der Bedeckungen ergab sich aus dem Verhalten der Kätzinnen und des Katers. Im Durchschnitt wurden pro Tier drei Bedeckungen pro Tag beobachtet. Alle sechs Katzen wurden tragend, wie durch eine Untersuchung mittels Ultraschall am 24. Tag nach dem letzten Deckakt verifiziert werden konnte.

Die Trächtigkeitsdauer lag einheitlich bei 64 Tagen, die Wurfgröße bei durchschnittlich $4,5 \pm 1,5$ Welpen pro Wurf.

Die Versuchstiere waren während des gesamten Zeitraumes der Untersuchungen klinisch gesund. Die Routineimpfungen bestanden aus der Immunisierung gegen Katzenschnupfen, Katzenseuche, Leukose und Tollwut. Der Leukose- und FIV- Status der Tiere wurde mehrmals mittels Elisa-SNAP-Test der Firma IDEXX® als negativ bestimmt. Die Ernährung bestand ausschließlich aus Whiskas® (Firma Effem®) Feucht- und Trockenfutter. ¹

Die Haltung der Tiere erfolgte in einem Privathaushalt in einer Gruppe, wobei lediglich der Deckkater zeitweise separat untergebracht worden war.

4. 1. 2 Blutentnahmen

Als Tag 0 wurde der erste Stimulationstag bzw. der Tag der erstmaligen Bedeckung durch den Kater festgelegt. Im Hinblick auf mögliche circadiane Schwankungen erfolgten die Blutentnahmen ausnahmslos zwischen 18.00 Uhr und 19.00 Uhr. Bei den pseudograviden Tieren erstreckte sich der Entnahmezeitraum bis zum Einsetzen der nachfolgenden Raunze, was zwischen 33 und 45 Tagen der Fall war (Durchschnittswert $39 \pm 4,2$ Tage). Bei den graviden Tieren wurde die letzte Entnahme auf den Zeitraum von ein bis zwei Wochen nach der Geburt gelegt. Das ursprünglich festgelegte Protokoll sah Blutentnahmen in 5-tägigen Abständen ab Tag 0 vor. Diese sollten an der wachen, nicht sedierten Katze erfolgen, insbesondere um mögliche Interaktionen eines verabreichten Anaesthetikums mit dem Hormonstoffwechsel und Nebenwirkungen hinsichtlich der Gravidität von Anfang an

¹ Für die Bereitstellung der SNAP-Teste und der Futtermittel sei den Firmen IDEXX und EFFEM herzlich gedankt

ausschließen zu können. Auf Grund der dabei von Fall zu Fall auftretenden mangelnden Kooperationsbereitschaft der Kätzinnen war eine strikte Einhaltung dieses Schemas jedoch nicht möglich, so dass diese Proben dann jeweils zum nächst möglichen Zeitpunkt entnommen werden mußten. Die Blutentnahmen erfolgten durch Punktion der Vena cephalica antebrachii oder der Vena saphena. Etwa fünf Milliliter wurden in heparinisierten Blutröhrchen aufgefangen und unmittelbar nach der Entnahme 10 Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert. Das Plasma wurde mittels Pasteurpipetten abgehebert und bis zur weiteren hormonanalytischen Untersuchung in Polypropylenröhrchen bei -25° C tiefgefroren.

4. 2 Poolen von Plasmaproben zur selektiven Bestimmung von freiem und konjugiertem Estron, Estradiol-17 β und Estradiol-17 α

Für die selektive Messung der freien und konjugierten Östrogene wurden Plasma von graviden bzw. pseudograviden Tieren gepoolt. Ein Pool ergab sich dabei aus jeweils 100 μ l Plasma der sechs Kätzinnen, wobei Pools für die Tage 0, 15, 30, 45 angelegt wurden, bei den graviden Tieren auch noch für den Tag 55.

4.3 Hormonanalytik

4.3.1 Radioimmunologische Bestimmung von Progesteron im Blutplasma

Die Bestimmung von Progesteron mittels Radioimmuntest (RIA) erfolgte im Prinzip nach dem von Hoffmann et al., (1973) beschriebenen Verfahren, eine genauere Methodenbeschreibung findet sich bei Gerres, (1991). Je nach Graviditäts- bzw. Pseudograviditätsstadium und den zu erwartenden Progesteronwerten wurden 25 µl, 50 µl oder 100 µl Plasma dreimal mit je 3 ml Hexan am Rotationsmischer extrahiert. Die wässrige Phase wurde im Trockeneis-Alkohol-Bad für 15-20 Sekunden abgefroren und das Lösungsmittel in RIA-Glasröhrchen (75 x 11,5 mm) dekantiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vortex-Evaporator bei ca. 50°C verdampft und die Proben in BSA-Phosphat-Puffer aufgenommen. Der sich anschließende Radioimmunoassay war als Gleichgewichtstest konzipiert, die Trennung von freiem und gebundenem Progesteron erfolgte mittels Holzkohleadsorption. Neben der Totalaktivität (TA), nichtspezifischer Bindung (NSB) und dem B₀ – Wert, wurden 8 Standardkurvenpunkte angesetzt (40, 80, 160, 320, 640, 1280 und 2560 fmol / 0,1 ml Ansatz). Als Kontrollpunkte dienten der Reagenzienleerwert (Durchführung des Extraktionsganges ohne Plasma) und zwei biologische Kontrollen aus dem unteren und mittleren Bereich der Standardkurve. Alle Bestimmungen erfolgten im Doppelansatz. Die vorgegebene Menge 3H-Progesterons (Tracer) lag bei ca. 13500 cpm (≈ 33750 dpm ≈ 32 pg/ Ansatz). Das Antiserum vom Kaninchen mit der Bezeichnung GI-P4-KIV war gegen 11 α-OH-Progesteron-Hemisuccinat-BSA gerichtet, die Endverdünnung im Inkubationsansatz bei 1:50.000.

Das folgende Schema gibt eine Übersicht über den Ansatz des RIA zur Bestimmung von Progesteron.:

30 Sekunden schütteln „en bloc“, danach

20 Minuten im Wärmeschüttelbad (37°C), danach

1 Stunde Eisbad oder über Nacht bei 4°C, danach

Zugabe der Kohlesuspension zur Trennung von freiem und gebundenem Progesteron, danach

30 Sekunden schütteln „en bloc“, danach

10 Minuten bei 4°C stehen lassen, danach

Zentrifugieren bei 3000 U/min., 4°C, 15 Minuten, danach

Aufnehmen von 600 µl des Überstandes in 3 ml Szintillator, danach

Messung der 3H-Impulse über jeweils 2 Minuten in einem Flüssigkeitsszintillationszähler und Auswertung mittels des integrierten Auswertungsprogrammes

Die Testauswertung erfolgte unter Berücksichtigung von TA, NSB und B0; die Ausgabe war zunächst in ng / ml Plasma, danach erfolgte eine Umrechnung auf nmol / l. Der im Mittel bei 0,13 ng / Ansatz liegende Reagenzienleerwert blieb dabei unberücksichtigt. Die sich für dieses Verfahren ergebenden Werte für den Intra- und Interassayvariationskoeffizienten lagen bei 15,8 % bzw. 8,3 %.

4. 3. 2 Radioimmunologische Bestimmung von Relaxin im Blutplasma

Die Bestimmung von Relaxin wurde dankenswerter Weise von Prof. Dr. G. B. Steinetz (New York University Medical Center, Laboratory for Experimental Medicine and Surgery in Primates, Tuxedo) durchgeführt. Eine ausführliche Methodendarstellung findet sich bei O'Byrne und Steinetz (1976). Die untere Nachweisgrenze wird dabei mit 0,1 ng / ml angegeben.

4. 3. 3 Radioimmunologische Bestimmung von Östrogenen

4.3.3.1 Bestimmung nach Auftrennung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Bestimmung der freien und konjugierten Östrogene mittels HPLC wurde im Prinzip wie bei Pinho, (1995) und Hoffmann et al., (1973) beschrieben vorgegangen; d.h. nach selektiver Extraktion der freien bzw. konjugierten Östrogene erfolgte die Auftrennung mittels HPLC, die danach die getrennte Erfassung von Estron, Estradiol- 17 β und Estradiol- 17 α gestattete. In Abhängigkeit von der „ Art der Extraktion “ war danach die Zuordnung zu ursprünglich „ frei “ bzw. „ konjugiert “ möglich.

4. 3. 3. 1. 1 Extraktion der freien Östrogene

Die Extraktion von 2 x 200 μ l Plasma mit jeweils 3 ml Toluol erfolgte analog zur Extraktion von Progesteron wie in Kapitel 3.1 beschrieben. Nach Niedertrocknung des Extraktes und Rücklösung in 1 ml 80 %- igem Methanol wurden die Proben in gut mit Parafilm verschlossenen Gläsern bis zur Einbringung in die HPLC bei -20°C aufbewahrt. Die

zurückbleibende wässrige Phase enthält- soweit vorhanden- die konjugierten Östrogene und wurde wie unten angegeben weiter aufbereitet.

4. 3. 3. 1. 2 Extraktion der konjugierten Östrogene

Die Extraktion der konjugierten Steroide aus der zurückgebliebenen wässrigen Phase erfolgte nach deren hydrolytischer Spaltung als danach freie Östrogene. Dazu wurde die wässrige Phase zur Einstellung des pH-Wertes mit 70 µl Hydrolysepuffer (pH 4,8) (s.S. 38) versetzt, wonach 25 µl einer β-Glucuronidase-Arylsulfatase Enzympräparation (s.S.33) aus „*Helix pomatia*“ beigegeben wurden. Die sich anschließende Hydrolyse erfolgte über ca. 8 Stunden bei 37° C im Wasserschüttelbad. Die nun folgende Extraktion wurde wie unter 4.3.3.1.1 angegeben durchgeführt.

4. 3. 3. 1. 3 Säulenchromatographische Vorreinigung

Vor Auftrag auf die HPLC wurden die Proben einer Vorreinigung mittels reversed Phase Chromatographie auf C 18-Bakerbond Cartridges unterzogen. Die Proben wurden dazu in 4 ml eines 35% igen Methanol-Wassergemisches aufgenommen und in dieser Form auf die aktivierte und äquilibrierte Säule aufgetragen. Nach Passage des Lösungsmittels wurden die Östrogene mit 1,5 ml 95 %igem Methanol eluiert. Das Eluat wurde eingetrocknet und in 220 µl 20 % igem Acetonitril rückgelöst.

4. 3. 3. 1. 4 Durchführung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Vor jedem Probenauftrag wurde das System über 10 min mit einer 28 %igen wässrigen Acetonitril-Lösung (v/v) bei einer Flußrate von 0,5 ml/min äquilibriert. Danach wurde ein Aliquot von 100µl der in 220 µl einer 20 %igen Acetonitril-Lösung (v/v) rückgelösten Probe

(s.o.) manuell injiziert (Eingabe in Probenschleife). Nach einer Laufzeit von 49 Minuten erfolgte ein Wechsel der mobilen Phase von 28 % igem Acetonitril auf 100 % iges Acetonitril (Stufengradient). Nach weiteren 10 min und erfolgter Elution apolarer Verbindungen (z. B. Progesteron) erfolgte wieder die Umstellung auf 28 % iges Acetonitril als mobile Phase. Durch Einbringung von ^3H -markiertem 17β - Estradiol, 17α - Estradiol, Estron und Progesteron wurde das Elutionsprofil charakterisiert, wobei jeweils 0,5 min - Fraktionen gesammelt wurden.

Wie Abb. 5 (s.S.32) zeigt, ergab sich eine klare Trennung zwischen den drei Östrogenen. Die jeweiligen mittleren Retentionszeiten lagen bei 34 ± 1 , 38 ± 1 und 44 ± 2 Minuten für 17β -Estradiol, 17α -Estradiol bzw. Estron. Nach Einstellung des Fraktionssammlers wurden die den einzelnen Östrogenen entsprechenden Eluate jeweils als komplette Peaks aufgefangen, im Trockenschrank bei 40°C unter Vakuum niedertrocknet und nach Rücklösen der radioimmunologischen Bestimmung zugeführt. Wie Kontrollversuche mit aufgestockten Proben ergaben, wurden die zugesetzten Östrogene im Mittel mit $39 \pm 0,5$ % wiedergefunden.

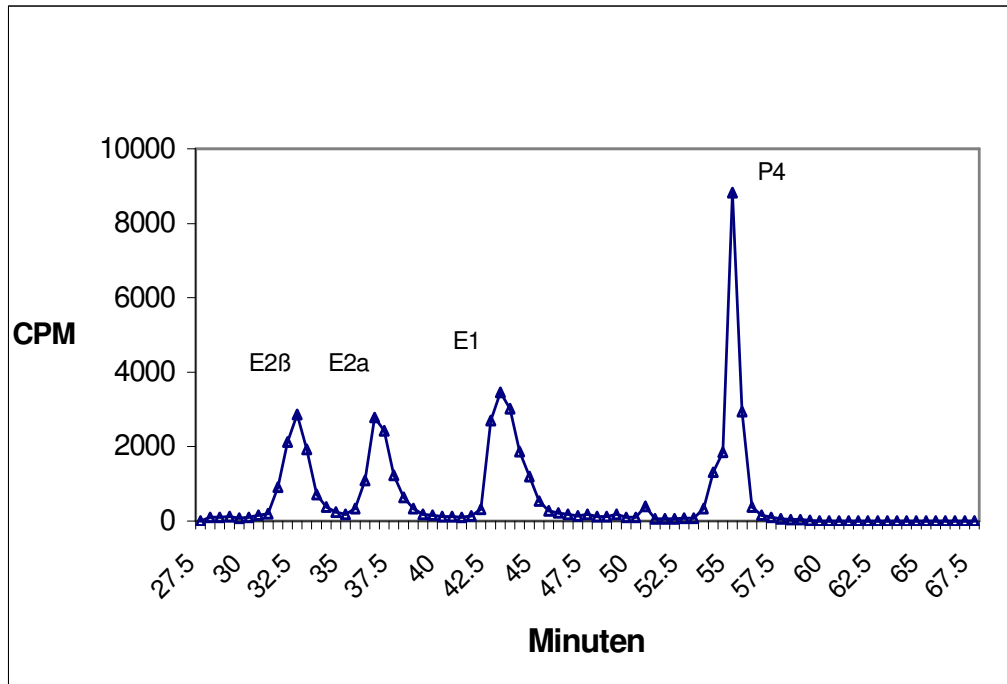


Abb.5 Auftrennung von ^3H - Estron (E1), ^3H - 17α -Estradiol (E2a), ^3H - 17β -Estradiol (E2β) und ^3H Progesteron (P4) in dem etablierten HPLC-System;

Säule : Li Chrosorb, RP 18,5 μm (Merck Cat. 15654)

Vorsäule : Li Chrospher, RP 18,5 μm (Merck Cat. 15654)

Mobile Phase : Stufe 1 : 0-49 min : Acetonitril : H₂O (v:v) = 28:72,

Stufe 2 : 50-58 min : 100% Acetonitril,

Stufe 3 : 59-67min : Acetonitril : H₂O (v:v) = 28:72.

Flußrate : 0,5 ml / min

Temperatur : 40,0 ° C

4. 3. 3. 1. 5 Radioimmunologische Nachweisverfahren

Estron : Der radioimmunologische Nachweis von Estron war als Gleichgewichtstest konzipiert und erfolgte wie bei Gentz, (1994) und Hoffmann et al., (1973) beschrieben. Die Trockenrückstände wurden zuerst in 160 µl 0,1 N NaOH aufgenommen (Bildung von Phenolaten), geschüttelt und zur Sicherung der Rücklösung über weitere 10 min. im Wasserbad bei 37°C belassen, wonach die Proben für weitere 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen wurden. Anschließend wurden 20 µl 0,8 N HCL zur Neutralisation und 20 µl konzentrierter Phosphatpuffer (s.5.2.4) zur Korrektur der Ionenstärke und zur Volumenauffüllung auf 200 µl zugegeben. Nach einer weiteren Zugabe von 100 µl BSA-Phosphatpuffer wurden 100 µl der ³H – Tracerlösung (ca. 11000 cpm ³H – Estron) (s.5.2.2) sowie nachfolgend 200 µl der Antiserumverdünnung (s.5.2.3) hinzupipettiert. Der Volumenausgleich bei den TA- und NSB-Ansätzen (s.4.3.1) erfolgte mit BSA- Phosphatpuffer. Die Proben wurden anschließend am Vortex-Mischer kurz geschüttelt, über 20 min im Wärmebad bei 37°C vorinkubiert und nachfolgend mindestens 1 Stunde bei ca. 0°– 4°C im Eiswasserbad belassen. Die Trennung von freiem und antikörper-gebundenem Estron erfolgte durch Adsorption des freien Estron an Holzkohle nach Zugabe von 0,2 ml eisgekühlter Kohlesuspension (s.5.2.4). Danach wurden die Proben kurz geschüttelt, 10 min bei 0°- 4°C im Eiswasserbad belassen und anschließend über 15 min bei 4°C zentrifugiert (1600 g). Lediglich dem TA- Wert wurden statt der Kohlesuspension 0,2 ml destilliertes Wasser zugegeben. Für die Erfassung der ³H-Impulse des antikörper-gebundenen Estron wurden mit Hilfe eines Hamilton-Dilutor-Dispensers 0,6 ml des Überstandes abgehebert und im gleichen Arbeitsschritt mit 3,0 ml Szintilationsflüssigkeit versetzt.

In diesem Test kam das estronspezifische Antiserum Gi-E1 II/XVII vom 28.05.1989 zur Anwendung, die Endverdünnung im Inkubationsansatz lag bei 1 : 115 000. Die Auswertung

des Testes erfolgte anhand von Standardkurven, die einen Bereich von 20 – 3200 fmol/Ansatz abdeckten. Bei der integrierten Testauswertung wurden weiterhin die Totalaktivität (TA), die nicht spezifische Bindung (NSB) und der Bindungsnullwert (B0) berücksichtigt. Für die vorliegenden Untersuchungen ergab die programmierte Auswertung der Standardkurven eine untere Nachweisgrenze (noch von Null zu unterscheiden) im Bereich von 12-13 fmol / Ansatz. Die sich für dieses Verfahren ergebenden Werte für den Intra- und Interassayvariationskoeffizienten lagen bei 8,2 % bzw. 15,7 %.

17 β -Estradiol : Um die Empfindlichkeit zu steigern, kam wie bei Hoffmann et al., (1992) beschrieben ein Sequenztest zur Anwendung. Die Trockenrückstände nach Durchführung der HPLC wurden zunächst in 100 μ l BSA-Phosphatpuffer aufgenommen, wonach 200 μ l der Antiserumverdünnung (s.5.2.3) zugegeben wurde. Nach kurzem Schütteln auf dem Vortex-Mischer erfolgte eine erste Inkubation im Eisbad (0° bis 4°C) über Nacht (mindestens 16 Stunden), wonach 0,1 ml ³H- Tracer (ca. 13000 cpm ³H- Estradiol, s.5.2.2) zupipettiert und die Proben kurz geschüttelt wurden. Die anschließende zweite Inkubation erfolgte über 45 min im Eisbad. Die Trennung von freiem und gebundenem Estradiol sowie die anschließende Messung und Auswertung erfolgten wie für Estron beschrieben. Anders als bei Estron handelte es sich hier beim NSB jedoch um einen funktionellen NSB, d. h. zur Erfassung der nicht spezifischen Bindung war dieser Probe ein Überschuß von 10 ng nicht markierten Estradiols zugesetzt worden. In diesem Test kam das Estradiol- 17 β spezifische Antiserum Gi-E2 β Pool 1 zur Anwendung, die Endverdünnung im Inkubationsansatz lag bei 1:17 000. Für diesen Test ergab die programmierte Auswertung der Standardkurven (Bereich von 2 – 128 fmol / Ansatz) eine untere Nachweisgrenze (noch von Null zu unterscheiden) im Bereich von 5-6 fmol / Ansatz. Die sich für dieses Verfahren ergebenden Werte für den Intra- und Interassayvariationskoeffizienten lagen bei 16,4 % bzw. 31,2 %.

17 α - Estradiol : Die Durchführung des Radioimmunotests entsprach der Bestimmung von Estron. Die Standardkurve deckte einen Bereich von 5 – 1000 pg / Ansatz ab, die programmierte Auswertung ergab eine untere Nachweisgrenze (noch von Null zu unterscheiden) im Bereich von 11 – 12 fmol / Ansatz. Das in diesem Test eingesetzte Antiserum war gegen 17 β - Estradiol-17-Hemisuccinat-BSA gerichtet (s.5.2.3) und wies folglich annähernd gleiche hohe Kreuzreaktionen mit Estron, Estradiol-17 β und Estradiol-17 α auf (Hoffmann, 1977). Auf Grund der vorausgegangenen chromatographischen Auftrennung wurde dadurch die Spezifität der Messung nicht beeinflusst. Die sich für dieses Verfahren ergebenden Werte für den Intra- und Interassayvariationskoeffizienten lagen bei 6,2 % bzw. 6,5 %.

4. 3. 3. 2 Radioimmunologische Bestimmung von Estron, Estradiol- 17 β und der Gesamtöstrogene nach einfacher Plasmaextraktion

Wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, wurden diese Untersuchungen an noch verbliebenen Plasmaproben in Ergänzung zu den Messungen nach Auftrennung mittels HPLC durchgeführt. Im Hinblick auf die Tatsache, daß zahlreiche Messwerte bei dem mittels HPLC aufgetrennten Proben unterhalb der Nachweisgrenze lagen (s. Tab. 5 u. 6), was unter anderem auch mit der Wiederfindung von < 40 % nach der Auftrennung mittels HPLC erklärt werden kann, wurde versucht, um im positiven Bereich liegende Messwerte zu erhalten, die Empfindlichkeit der radioimmunologischen Messung von Estron und der Gesamtöstrogene der von Estradiol-17 β anzupassen, indem für diese beiden ³H-Verbindungen analog zu Estradiol-17 β ebenfalls ein Sequenztest eingerichtet wurde.

Für jeden Test wurden jeweils 100 µl Plasma im Doppelansatz mit 2 x 3 ml Toluol wie oben beschrieben extrahiert (s.Kap.4.3.1, S.27). Nach Niedertrocknung der Extrakte erfolgte die eigentliche Durchführung des RIA wie in Kap. 4.3.3.1.5 für Estradiol-17β beschrieben, lediglich die Verweildauer im Eisbad bei der zweiten Inkubation wurde auf 60 min erhöht.

Zur Bestimmung von **Estron** lag die Antiserumendverdünnung bei 1: 115000, als Tracer wurden ca. 11000 cpm ³H-Estron eingesetzt, die Standardkurve deckte den Bereich von 1 - 256 fmol / Ansatz ab.

Für die Bestimmung der **Gesamtöstrogene** wurde das Antiserum gegen 17β- Estradiol-17-Hemisuccinat-BSA in einer Endverdünnung von 1: 17000 eingesetzt. Als Tracer dienten ca. 13000 cpm ³H-Estron, gemessen wurde gegen Estron als Standard im Bereich von 1- 256 fmol / Ansatz.

Der Ansatz für die radioimmunologische Bestimmung von **Estradiol- 17β** blieb unverändert (s. Kap. 4.3.3.1.5).

Die Wiederfindung und untere Nachweisgrenze (uNG) dieser Assays ergaben sich im Durchschnitt wie folgt :

- | | |
|-------------------|-----------------------------|
| a) Estradiol-17β | Wiederfindung : 70,4 % |
| | Empfindlichkeit : 5,15 fmol |
| b) Estron | Wiederfindung : 92,0 % |
| | Empfindlichkeit : 7,55 fmol |
| c) Gesamtöstrogen | Wiederfindung : 92,7 % |
| | Empfindlichkeit : 7,94 fmol |

4. 4 Statistische Auswertung

Wegen der rechtsschiefen Verteilung der Hormonwerte erfolgte die Berechnung der Mittelwerte als geometrische Mittelwerte (X_g) mit Streufaktor (SF); die Darstellung erfolgte als X_g (SF).

4 .4. 1 Auswertung der Verlaufsprofile für Progesteron

Das Problem, daß nicht von allen Katzen zum jeweils gleichen Zeitpunkt der Gravidität und der Pseudogravidität Blutproben gewonnen werden konnten, wurde dadurch gelöst, daß auf Grund der vorhandenen Werte für jedes Tier Individualprofile erstellt wurden und durch Interpolation fiktive Messwerte zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 und 70 (Tag) erhalten wurden. Der Tag 0 ist hierbei definiert als der erste Tag der Bedeckung bzw. Stimulation (pseudogravide Tiere). Dadurch wurde es möglich, mittels einer 2- faktoriellen Varianzanalyse und Meßwiederholungen im Faktor Zeit auf Wechselwirkung zwischen Zeit und Gruppe zu untersuchen, wobei dies allerdings nur bis zum 50. Tag, dem letzten Tag an dem von beiden Gruppen Werte vorlagen, möglich war. Zur Anwendung kam das Statistikprogrammpaket BMDP / Dynamic , Release 7.0, Programm BMDP 5V (Dixon, 1993) auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

4. 4. 2 Auswertung der Relaxin und Östrogendaten

Die Auswertung erfolgte deskriptiv. Soweit auf Unterschiede untersucht wurde, kam der t-Test nach Student (unpaarig) zur Anwendung.

5. Materialien und Geräte

5.1 Geräte

- Reversed phase Kartuschen; Bakerbond spe octadecyl – C18
(Fa J. T. Baker Inc., Groß Gerau)
- HPLC - Anlage mit :
 - HPLC Pumpe 420 (Fa. Kontron Instruments, Eching)
 - HPLC 360 Autosampler (Fa. Kontron Instruments, Eching)
 - Fraktion Collector Frac- 100 (Pharmacia Fine Chemicals)
- Rotationsmischer (Fa. Heidolph GmbH, Kelheim)
- Vortexevaporator (Fa. Haake Buchler GmbH, Karlsruhe)
- Vortexmischer (Fa. Heidolph GmbH, Kelheim)
- Hamilton-Diluter-Dispenser „Microlab M,, (Fa. Hamilton Bonaduz AG, Darmstadt)
- Flüssigkeitsscintillationszähler – LS 5000 TD (Beckmann, München)

5.2 Enzyme, ³H-Steroide, Antisera

5.2.1 Enzyme

- β -Glucoronidase und Arylsulfatase aus *Helix pomatia* (ca. 5,3 U/ml β -Glucoronidase und 19,4 U/ml Arylsulfatase – Fa. Serva GmbH & Co., Heidelberg)

5.2.2 ³H- markierte Steroide

- ³H-Estron : Spezifische Aktivität: 106 Ci/mmol \sim 3,92 TBq/mmol (Fa. Amersham Buchler GmbH, Braunschweig). Als radioaktiver Tracer wurden im RIA ca. 11.000 cpm \sim 14 pg/100 μ l BSA – Phosphatpuffer verwendet.

- ^3H -17 β -Estradiol : Spezifische Aktivität: 87,0 Ci/mmol \sim 3,22 TBq/mmol
(Fa. Du Pont, Belgien). Als radioaktiver Tracer wurden im RIA ca. 13.000 cpm
 \sim 31 pg/100 μl BSA-Phosphatpuffer verwendet.

- ^3H -Progesteron: Spezifische Aktivität: 97,0 Ci/mmol \sim 3,59 TBq/mmol
(Fa. Du Pont, Belgien). Als radioaktiver Tracer wurden im RIA ca. 13500 cpm
 \sim 32pg/100 μl BSA-Phosphatpuffer verwendet.

5. 2. 3 Antisera

Antiserum gegen Progesteron: Das vom Kaninchen stammende Antiserum Gi-P4-KIV vom 15.09.1986 war gegen 11 α -OH-Progesteron-Hemisuccinat-BSA gerichtet und wies folgende Kreuzreaktionen auf :

Steroid	Kreuzreaktion
Progesteron	100 %
Pregnenolon	0,69 %
17 α -Hydroxy-Progesteron	0,49 %
17 α -Hydroxy-Pregnenolon	< 0,01 %
Estradiol-17 β	< 0,01 %
Estron	< 0,01 %
Androstendion	< 0,01 %
Testosteron	0,37 %
Cortisol	< 0,01 %
DHEA	< 0,01 %

Die Kreuzreaktionen wurden wie von Abraham et al. (1970) angegeben berechnet; in Bezug gesetzt wurde dabei welche Mengen an homologem (x) und heterologem (y) Antigen die relative Bindung des vorgegebenen homologen radioaktiven Tracers um 50 % hemmen.

Dabei gilt die Formel : % Kreuzreaktion = $x/y \times 100$.

Die Assoziationskonstante des Antiserums ergab sich mit $K_a = 2,6 \times 10^9$ 1/Mol .

Antiserum gegen Estron: Das vom Kaninchen stammende Antiserum Estron (Gi-E1 II/XVII) vom 28.05.1989 war gegen Estron-6-Carboxymethyloxim-BSA gerichtet. Es wies folgende Kreuzreaktionen auf :

Steroid	Kreuzreaktion
Estron	100 %
Equilin	28,8 %
Equilenin	7,28 %
Estradiol-17 β	1,94 %
Estradiol- 17 α	1,02 %
Estriol	0,059 %
Androstendion	0,013 %
Progesteron	0,016 %
Testosteron	< 0,01 %

Die Assoziationskonstante des Antiserums ergab sich mit $K_a = 1,6 \times 10^6$ l/Mol

Antiserum gegen 17 β -Estradiol: Das vom Kaninchen stammende Antiserum (Gi-E2 β -Pool 1) war gegen das Antigen 1,3,5,(10) Estratrien-3,17 β -diol-6-Carboxymethyloxim-BSA gerichtet und wurde in einer Endverdünnung von 1 : 17 000 eingesetzt.

Steroid	Kreuzreaktion
17 β - Estradiol	100 %
17 α - Estradiol	0,96 %
Estron	0,90 %
Estriol	0,30 %
Progesteron	< 0,10 %
Cortisol	< 0,10 %

Die Assoziationskonstante des Antiserums ergab sich mit $K_a = 11,9 \times 10^6$ l/Mol

Antiserum zur Erfassung der Gesamtöstrogene: Dieses Antiserum war gegen Estradiol-17 β , 17-Hemisuccinat-BSA gerichtet (Hoffmann, 1977) und wurde in einer Endverdünnung von 1 : 30 000 eingesetzt; es wies annähernd gleiche Kreuzreaktionen zwischen 17 β -Estradiol, 17 α -Estradiol und Estron auf; mit nicht phenolischen Steroiden wurden keine Kreuzreaktionen beobachtet (Hoffmann, 1977).

5. 2. 4 Sonstige Reagentien und Chemikalien

- Estron , 17 β -Estradiol , 17 α -Estradiol und Progesteron (Fa. Paesel, Frankfurt)
- Szintilationsflüssigkeit-Aquasafe 300 plus (Zinsser Analytic, Frankfurt)
- Phosphatpuffer (pH = 7,2)
 - 2,686 g Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄ – Fa. Merck, Darmstadt)
 - 8,336 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄ – Fa. Merck, Darmst.)
 - 0,325 g Natriumazid (NaN₃ – Fa. Merck, Darmstadt)
- BSA - Phosphatpuffer
 - 0,1 g Rinderserum – Albumin (Fa. Sigma, Deisenhofen)
 - 100 ml Phosphatpuffer
- Kohlesuspension
 - 2,5 g Holzkohle (Norit A- Partikelgröße 4 – 7 μ m – Fa. Serva, Hbg.)
 - 0,25 g Dextran 60 (Fa. Serva, Heidelberg)
 - 500 ml Aqua dest.
- Methanol, Acetonitril (HPLC- Qualität) (Fa. Merck, Darmstadt), Toluol, Hexan,
(p.a. Qualität, Fa. Merck, Darmstadt)
- NaOH, HCl, Essigsäure (p. a. Qualität, Fa. Merck, Darmstadt)
- NaCl (Fa. Braun)
- Hydrolysepuffer (pH 4,8)
 - 0,12 ml 1 N NaOH
 - 0,2 ml 1 N CH₃COOH

6. Ergebnisse

6.1 Verlauf der Progesteronkonzentrationen im peripheren Blut während der Gravidität und Pseudogravidität

Die für die einzelnen Tiere durch Interpolation erhaltenen Progesteronwerte sowie die daraus resultierenden Mittelwerte finden sich in den Tabellen 2 und 3 sowie in Abb.6; die tatsächlich erhaltenen Meßwerte sind im Anhang in den Tabellen I und II wiedergegeben.

Tab.2 Durch Interpolation erhaltene und durchschnittliche Progesteronkonzentrationen (mmol/l) im Blutplasma gravider Norwegischer Waldkatzen von Tag 0 bis Tag 70 post copulationem.

Tag der Gravidität	Progesteron Einzelwerte pro Tier						Mittelwert	
	1	2	3	4	5	6	xg	SF
0	UNG ¹	0,1	1,4	UNG	UNG	UNG	2,50	2,7
5	8,9	36,0	31,0	52,0	37,8	46,3	30,9	1,9
10	92,0	76,8	45,1	62,0	70,0	78,1	69,2	1,28
15	106,0	79,7	72,0	74,0	84,0	79,8	81,3	1,15
20	64,5	121,7	88,7	83,8	83,9	84,0	87,1	1,22
25	77,6	99,9	68,0	91,9	83,3	86,2	83,2	1,14
30	92,8	60,0	55,2	63,8	78,3	89,8	72,4	1,24
35	59,6	57,4	56,1	54,0	72,7	87,4	63,1	1,21
40	66,2	78,3	57,3	69,1	68,7	62,0	66,1	1,11
45	49,5	73,1	40,0	46,9	54,9	44,7	50,2	1,23
50	44,8	62,5	34,0	45,7	42,4	39,2	43,7	1,22
55	44,5	53,6	33,3	44,1	30,4	23,0	38,1	1,11
60	40,0	50,0	27,5	37,9	41,2	24,0	36,8	1,16
65	14,0	30,0	10,3	8,0	25,0	6,7	15,7	1,25
70	0,45	4,2	1,0	UNG	0,7	UNG	1,1	2,6

1) UNG : unterhalb der Nachweisgrenze

Tab.3 Durch Interpolation erhaltene und mittlere Progesteronkonzentrationen (nmol/l) im Blutplasma pseudogravidier Norwegischer Waldkatzen von Tag 0 bis Tag 50 post stimulationem.

Tag der Pseudog.	Progesteron Einzelwerte pro Tier						Mittelwert	
	7	8	9	10	11	12	xg	SF
0	UNG ¹	UNG	UNG	UNG	UNG	UNG	-	-
5	23,8	46,5	25,5	55,3	39,4	76,0	40,7	1,57
10	72,8	90,7	96,0	85,6	97,6	112,7	91,2	1,16
15	96,0	110,1	93,7	117,0	105,0	125,5	107,2	1,12
20	136,1	118,5	82,1	137,4	140,5	158,9	125,9	1,26
25	116,7	64,7	57,3	109,0	113,5	91,7	89,1	1,35
30	67,2	44,0	31,2	98,0	104,0	48,7	60,3	1,6
35	28,1	6,1	9,8	86,0	51,0	34,7	25,1	2,73
40	15,0	3,2	6,0	57,7	22,9	12,2	12,9	2,75
45	6,5	1,5	4,3	15,1	5,9	3,4	4,8	2,15
50	0,1	0,6	0,2	1,8	0,8	1,1	0,5	2,99

1) UNG : unterhalb der Nachweisgrenze

Wie Tabelle 2 zeigt, findet bei den graviden Tieren bis zum Tag 10 der Gravidität ein steiler Anstieg des Progesterons statt, der sich bis zum Tag 20 deutlich abflacht. Der höchste mittlere Progesteronwert [Xg • (SF)] ergab sich mit 87,1 (122) nmol/l am 20. Tag der Gravidität. Ab diesem Tage sinken die Progesteronwerte im peripheren Blut bis zum 60. Tag langsam ab, um vor der Geburt rasant auf Basalniveau abzufallen.

Bei den pseudograviden Tieren findet bis zum Tag 20 der Pseudogravidität ein steiler Anstieg des Progesterons statt (s. Tab. 3). An diesem Tag wird zugleich mit einem Mittelwert [Xg • (SF)] von 125,9 (1,26) nmol/l der höchste Wert erreicht. Danach erfolgt ein rascher Abfall bis zum Tag 35, Basalwerte werden zwischen dem 45. und 50. Tag erreicht.

6.1.1 Vergleich der Kurvenverläufe der Progesteronwerte bei den graviden und den pseudograviden Katzen

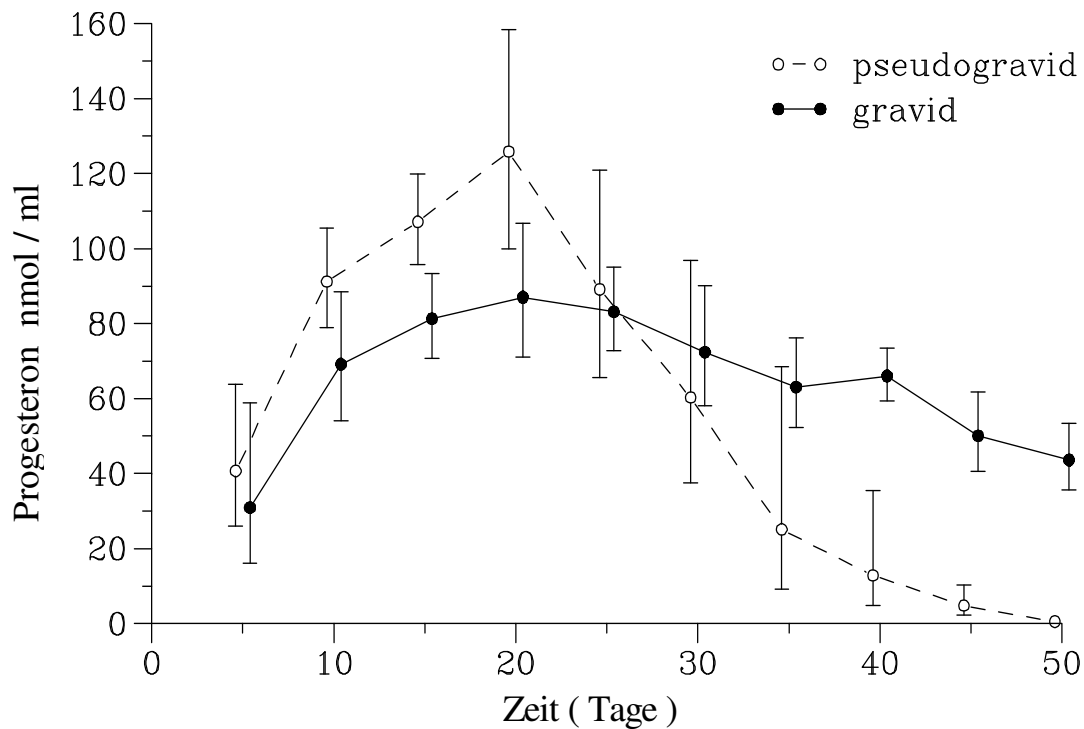


Abb. 6 Mittlerer Verlauf der Progesteronwerte ($xg \cdot SF \pm 1$) in der Gravidität und der Pseudogravidität bei der Norwegischen Waldkatze.

Abbildung 6 zeigt den mittleren Verlauf der Progesteronwerte bei den graviden und pseudograviden Katzen zwischen Tag 5 und Tag 50 der Gravidität bzw. Pseudogravidität. In vorliegender Untersuchung weist die Kurve der pseudograviden Gruppe einen stärkeren und schnelleren Anstieg auf als die Kurve der graviden Tiere. Der höchste Wert wird bei beiden Gruppen am 20. Tag gemessen, er liegt bei den pseudograviden Katzen jedoch um ca. 30 % höher. Am 25. Tag schneidet sich der Verlauf beider Kurven. Deutlich zeigt sich dabei die oben beschriebene Diver-

genz mit einem steilen und nahezu linearen Abfall von Tag 20 auf Tag 35 bei den pseudograviden Tieren, während der sehr allmähliche Abfall bei den graviden Tieren bis zum Tag 50 eine gleich bleibend hohe, plateauartige Progesteronproduktion andeutet. Gemessen bis zum 50. Tag ergab sich eine hohe Signifikanz ($p < 0,01$) für den unterschiedlichen Kurvenverlauf. Auch die zeitlichen Veränderungen der Verlaufskurven sowie die Wechselwirkungen von Zeit und Gruppe waren mit $p < 0,001$ hoch signifikant.

6.2 Verlauf der Relaxinkonzentrationen im peripheren Blut während der Gravidität und Pseudogravidität

Für die Untersuchungen wurden Stichproben aller sechs graviden und pseudograviden Tiere bestimmt, Auswahlkriterium war das Probenvolumen.

Pseudogravidität : Die stichprobenartigen Untersuchungen erfolgten an folgenden Tagen :

Tag 0 : Katze Nr.7; **Tag 3 :** Katze Nr.11; **Tag 4 :** Katze Nr.8 und 12; **Tag 5 :** Katze Nr.7;
Tag 8 : Katze Nr.11; **Tag 9 :** Katze Nr.7 und 10; **Tag 10 :** Katze Nr.12; **Tag 13 :** Katze Nr.7
 und 9; **Tag 15 :** Katze Nr.10,11 und 12; **Tag 18 :** Katze Nr. 9; **Tag 19 :** Katze Nr.8, **Tag 20 :**
 Katze Nr.10 und 11; **Tag 21 :** Katze Nr.12; **Tag 22 :** Katze Nr.7; **Tag 23 :** Katze Nr.8;
Tag 24 : Katze Nr.9; **Tag 25 :** Katze Nr. 10; **Tag 26 :** Katze Nr. 12; **Tag 28 :** Katze Nr.8;
Tag 29 : Katze Nr.9; **Tag 31 :** Katze Nr.10 und 11; **Tag 34 :** Katze Nr.9; **Tag 35 :** Katze Nr.8;
Tag 36 : Katze Nr.10; **Tag 38 :** Katze Nr.7; **Tag 39 :** Katze Nr.8; **Tag 44 :** Katze Nr.8 und 9.

Das Ergebnis der Relaxinbestimmung kann dahingehend zusammengefaßt werden, dass zu allen Zeitpunkten Relaxin nicht nachgewiesen werden konnte.

Gravidität : Die Ergebnisse der Bestimmungen der Relaxinkonzentrationen sind in Tabelle 4 sowie in Abb.7 (Punktwolke) wiedergegeben. Im Hinblick auf die nur deskriptive Auswertung wurde - anders als bei Progesteron - auf eine Interpolation verzichtet und die pro Tag erhaltenen Einzelwerte angegeben. Aus Tabelle 4 und Abb.7 ist erkennbar, daß die Relaxinwerte am Beginn der Gravidität zunächst unterhalb der Nachweisgrenze lagen, erste positive Meßwerte ergaben sich ab dem 20. Graviditätstag, also ungefähr ab dem Zeitpunkt der Implantation. Die Konzentrationen stiegen in den folgenden Tagen steil an und erreichten etwa ab dem 35. Tag bis 45. Tag ihre jeweiligen Spitzenwerte, die aber von Tier zu Tier erhebliche Konzentrationsunterschiede aufwiesen (vgl. z.B. Tier 2[24mg/ml] und Tier 4[89 mg/ml]). Ein Abfall der hohen Konzentrationen trat erst unmittelbar vor dem Partus ein. Lediglich bei einem Tier (Nr. 5) ergaben sich post partum noch positive Meßwerte, allerdings im Grenzbereich der Methode.

Tab. 4 Relaxinkonzentrationen (ng/ ml) im peripheren Plasma bei graviden

Norwegischen Waldkatzen

Tag der	Einzelwerte pro Tier					
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 6
Gravidität 1				UNG ¹	UNG	
2						UNG
3						
4			UNG			
5					UNG	
6				UNG		
7						UNG
8						
9		UNG				
10	UNG					
11			UNG	UNG	UNG	
12						UNG
13						
14		UNG				
15						
16				UNG	UNG	

17			UNG			
18						UNG
19						
20		0,5				
21					9	
22			UNG	17		
23						
24						
25						
26	16			49	24	
27			10			
28						
29						
30				50		
31	33					
32			20		68	52
33						
34						
35	27			83		
36					87	
37						70
38			40			
39						
40	35			89	74	
41		24				50
42			42			
43						
44						
45					55	
46	41		26	91		
47		25				
48						
49						54
50					63	
51			49	66		
52						
53						
54						31
55						
56	47	25	36		74	
57						
58						
59						
60				57		34
61					49	
62			16			
63		24				

Geburt						
postpartialen Phase	1			UNG		UNG
	2					
	3	UNG	UNG			
	4					
	5	UNG		UNG		
	6				70	
	7					
	8					
	9	UNG				
	10					
	11				0,5	
	12					
	13			UNG		
	14					
	15				0,5	
	16					
	17					
	18			UNG		

1) UNG : unterhalb der Nachweisgrenze

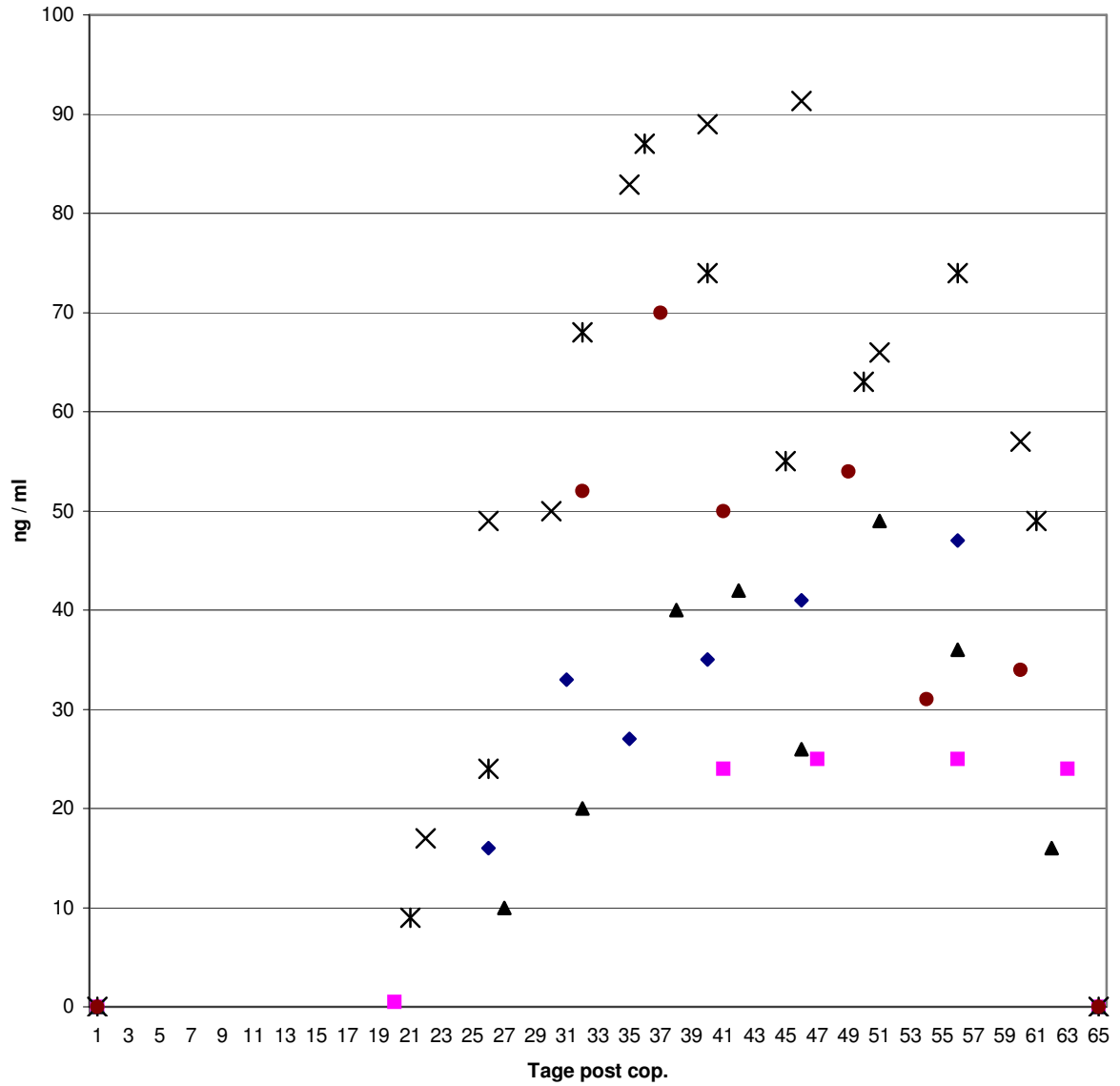


Abb. 7 Verlauf der Relaxinkonzentration im peripheren Blut gravider

Norwegischen Waldkatzen

◇ = Katze Nr. 1, □ = Katze Nr. 2, △ = Katze Nr. 3, x = Katze Nr. 4,

* = Katze Nr. 5, ● = Katze Nr. 6

6.3 Ergebnisse der Östrogenbestimmungen

6.3.1 Bestimmung von freiem und konjugiertem Estron, Estradiol-17 β und Estradiol-17 nach chromatographischer Auftrennung gepoolter Plasmaproben

Bei diesen Untersuchungen mit gepoolten Plasmaproben (s. Kap. 4.2) gravider (Tage 0, 15, 30, 45, 55) und pseudogravider (Tage 0, 15, 30, 45) Katzen erfolgte die Bestimmung von jeweils freiem und konjugiertem Estron, Estradiol-17 β und Estradiol-17 α nach vorausgegangener chromatographischer Auftrennung. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 5 und 6 wiedergegeben und wurden nicht mit den Aufarbeitungsverlusten korrigiert, die bei ca. 60 % lagen (s. Kap. 4.3.3.1.4).

In keiner der Proben konnten während der Pseudogravidität oder Gravidität freies Estradiol-17 β oder Estradiol-17 α nachgewiesen werden. Lediglich freies Estron konnte am Tag 0 (Östrus) in den Proben bei den später gravid gewordenen Katzen nachgewiesen werden.

Während konjugiertes Estradiol-17 β praktisch nicht nachweisbar war, ergaben sich in allen Proben positive Meßwerte für konjugiertes Estradiol-17 α und Estron. Sowohl bei den pseudograviden als auch bei den graviden Tieren ergaben sich mit $p < 0,01$ signifikant höhere Werte für konjugiertes Estradiol-17 α als für konjugiertes Estron. Übereinstimmend ergaben sich bei den pseudograviden und graviden Tieren die niedrigsten Werte an den Tagen 15 und 30. Hinweise auf Unterschiede zwischen den graviden und pseudograviden Katzen ergaben sich nicht.

Tab.5 Vorkommen von freiem (f) und konjugiertem (k) Estron (E1), Estradiol-17 β (E2 β) und Estradiol-17 α (E2 α) in gepoolten Plasmaproben pseudogravidier Norwegischer Waldkatzen. Angaben in nmol/l.

POOL	frei			konj.		
	fE2 β nmol/l	fE2 α nmol/l	fE1 nmol/l	kE2 β mol/l	kE2 α nmol/l	kE1 nmol/l
Tag der Pseudo-gravidität	Untere NG $\leq 0,02$ nmol/l	Untere NG $\leq 0,03$ nmol/l	Untere NG $\leq 0,04$ nmol/l	Untere NG $\leq 0,01$ nmol/l	Untere NG $\leq 0,03$ nmol/l	Untere NG $\leq 0,04$ nmol/l
0	UNG ¹	UNG	UNG	0,04	5,92	2,22
0	UNG	UNG	UNG	0,06	7,84	2,60
15	UNG	UNG	UNG	UNG	2,92	0,67
15	UNG	UNG	UNG	UNG	2,34	0,68
30	UNG	UNG	UNG	UNG	1,23	0,35
30	UNG	UNG	UNG	UNG	2,59	0,94
45	UNG	UNG	UNG	UNG	3,11	0,91
45	UNG	UNG	UNG	UNG	4,13	1,34

1) UNG : untere Nachweisgrenze

Tab.6 Vorkommen von freiem (f) und konjugiertem (k) Estron (E1), Estradiol-17 β (E2 β) und Estradiol-17 α (E2 α) in gepoolten Plasmaproben gravidier Norwegischer Waldkatzen. Angaben in nmol/l.

POOL	frei			konj.		
	fE2 β nmol/l	fE2 α nmol/l	fE1 nmol/l	kE2 β nmol/l	kE2 α nmol/l	kE1 nmol/l
Tag der Gravidität	Untere NG $\leq 0,01$ nmol/l	Untere NG $\leq 0,03$ nmol/l	Untere NG $\leq 0,04$ nmol/l	Untere NG $\leq 0,01$ nmol/l	Untere NG $\leq 0,03$ nmol/l	Untere NG $\leq 0,04$ nmol/l
0	UNG ¹	UNG	0,20	UNG	3,37	1,06
0	UNG	UNG	0,10	UNG	3,12	1,27
15	UNG	UNG	UNG	0,2	0,77	0,37
15	UNG	UNG	UNG	UNG	0,59	0,64
30	UNG	UNG	UNG	UNG	1,00	0,85
30	UNG	UNG	UNG	UNG	3,25	0,78
45	UNG	UNG	UNG	UNG	2,72	1,39
45	UNG	UNG	UNG	UNG	3,60	1,69
55	UNG	UNG	UNG	UNG	4,83	2,42
55	UNG	UNG	UNG	UNG	4,01	1,94

1) UNG : untere Nachweisgrenze

6. 3. 2 Bestimmung von Estron, 17 β - Estradiol und der Gesamtöstrogene nach einfacher Plasmaextraktion

Wie in Kap. 4.1.1 dargestellt, wurden diese Untersuchungen mit den noch verbliebenen Plasmaproben nach vorausgehender chromatographischer Auftrennung der Östrogen-fractionen durchgeführt. Zur Verfügung standen Proben von je zwei graviden und pseudogriden Tieren (Estradiol- 17 β von Tier 1, 2, 7 und 8; Estron von Tier 3, 4, 9 und 10; Gesamtöstrogene von Tier 5, 6, 11 und 12)

6. 3. 2. 1 Freies und konjugiertes Estradiol-17 β

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 7 und 8 wiedergegeben sowie als Graphik (Punktwolke) in den Abbildungen 5a und 5b dargestellt. In jeder Probe ergaben sich sowohl für freies als auch für konjugiertes Estradiol- 17 β positive Meßwerte, wobei sowohl bei den graviden als auch den pseudogriden Tieren die Werte für konjugiertes Estradiol- 17 β signifikant ($p < 0,01$) höher lagen.

Das mittlere Verhältnis von konjugiertem zu freiem Estradiol- 17 β lag bei den graviden Tieren bei $2,42 \pm 0,03$ und bei den pseudogriden Tieren bei $2,89 \pm 0,04$. Der Verlauf von freiem Estradiol- 17 β läßt von Tag 0/1 (Östrus)einen Abfall zum Tag 4/5 erkennen, im weiteren Verlauf der Beobachtungsperiode ergaben sich bei den beiden pseudogriden Tieren keine Hinweise auf sonstige zyklusbezogene Veränderungen; bei den beiden graviden Katzen zeigt sich insbesondere bei konjugiertem Estradiol-17 β ein Abfall parallel zur praepartalen Luteolyse (s. Abb. 5b). Bei Berücksichtigung der zwischen Tag 0 und 50 gewonnenen Proben zeigt sich bei Anwendung des t-Testes, dass bei den pseudogriden Tieren sowohl freies als auch konjugiertes Estradiol-17 β höhere Konzentrationen aufwies($p < 0,1$ bzw. $p < 0,01$).

Tab. 7 Verlauf von freiem (f) und konjugiertem (k) Estradiol- 17 β (E2 β ; nmol /l)
im peripheren Blutplasma bei zwei graviden Norwegischen Waldkatzen

Tier 1			Tier 2		
Tag	fE2 β nmol/l	kE2 β nmol/l	Tag	fE2 β nmol/l	kE2 β nmol/l
0	0,089	0,124	2	0,086	0,054
5	0,006	0,042	9	0,020	0,036
11	0,005	0,039	14	0,012	0,024
16	0,001	0,003	20	0,018	0,047
21	0,011	0,033	27	0,014	0,038
26	0,011	0,061	32	0,046	0,078
31	0,005	0,031	41	0,028	0,077
35	0,014	0,058	47	0,052	0,080
40	0,004	0,073	56	0,023	0,088
46	0,008	0,057	63	0,039	0,065
51	0,015	0,068	67	0,003	0,032
56	0,011	0,078	69	0,003	0,000
61	0,015	0,060	73	0,016	0,019
67	0,008	0,043			

Tab. 8 Verlauf von freiem (f) und konjugiertem (k) Estradiol- 17 β (E2 β ; nmol /l)
im peripheren Blutplasma bei zwei pseudogriden Norwegischen
Waldkatzen

Tier 7			Tier 8		
Tag	fE2 β nmol/l	kE2 β nmol/l	Tag	fE2 β nmol/l	kE2 β nmol/l
1	0,148	0,188	5	0,030	0,118
4	0,017	0,123	11	0,043	0,105
9	0,030	0,123	20	0,052	0,126
13	0,026	0,124	27	0,048	0,132
18	0,047	0,158	33	0,049	0,134
24	0,029	0,133			
29	0,020	0,120			
34	0,017	0,107			
38	0,021	0,148			
44	0,034	0,124			
49	0,018	0,190			

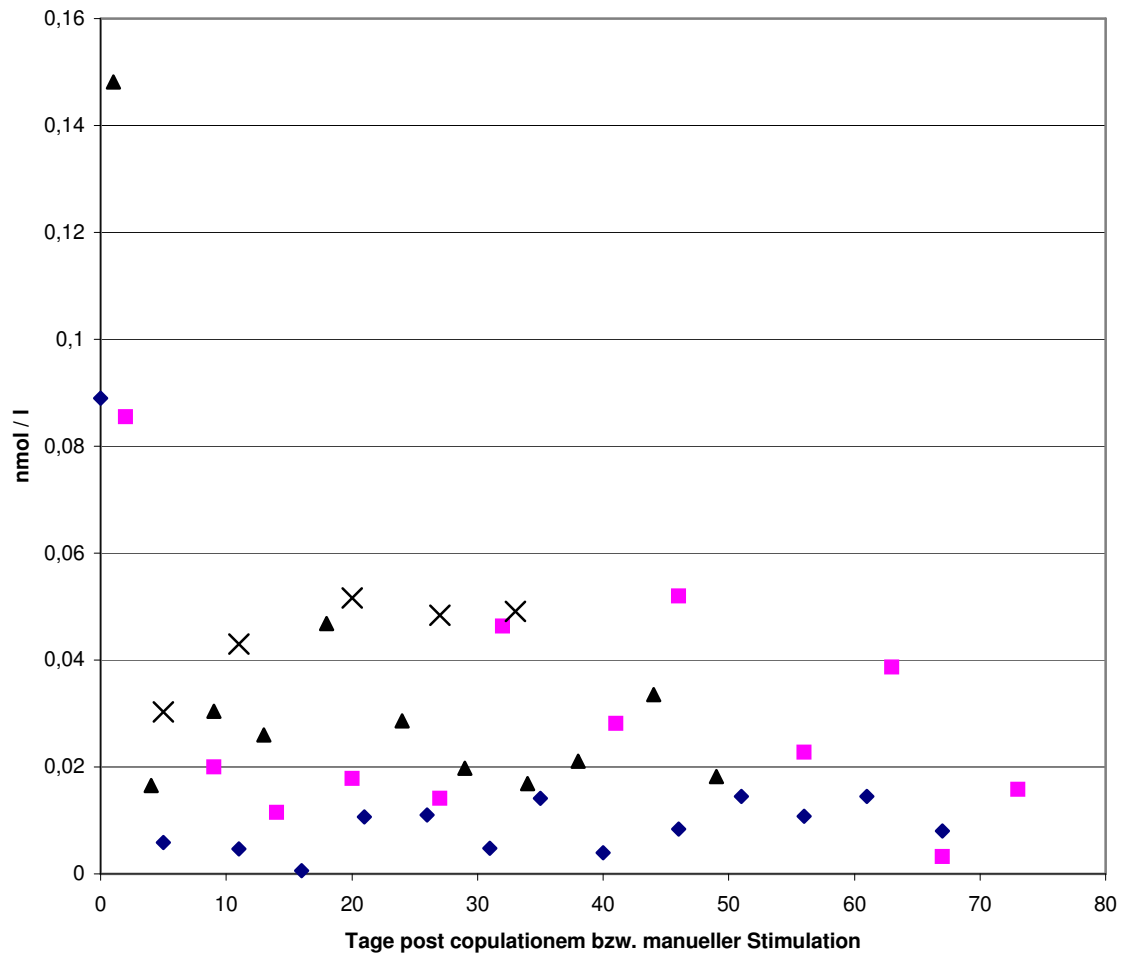


Abb. 5a Verlauf von freiem Estradiol-17 β im peripheren Blut bei jeweils zwei graviden [◆, ■] und pseudogaviden [▲, X] Norwegischen Waldkatzen

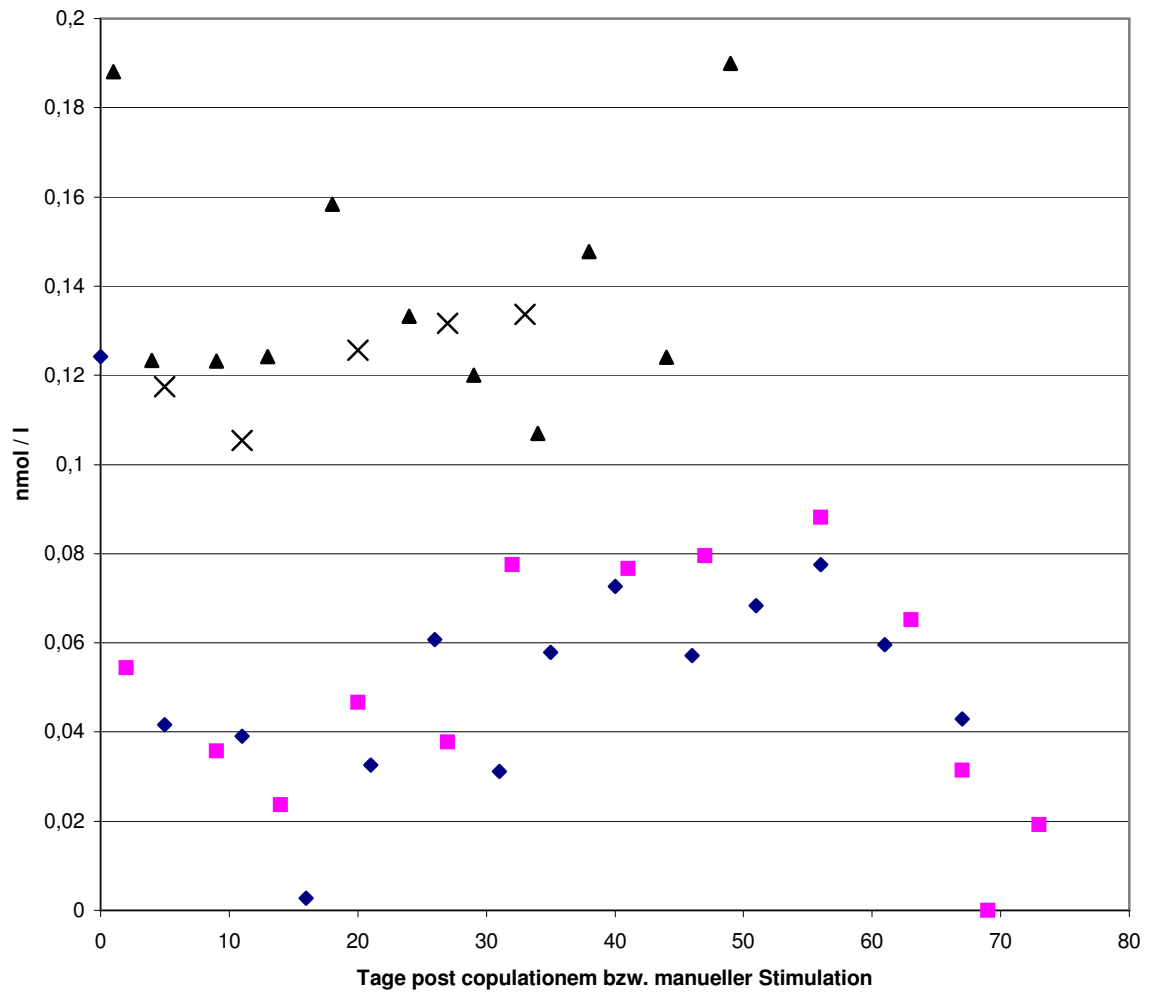


Abb. 5b Verlauf von konjugiertem Estradiol-17 β im peripheren Blut bei jeweils zwei graviden [◆, ■] und pseudograviden [▲, X] Norwegischen Waldkatzen

6.3.2.2 Freies und konjugiertes Estron

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 9 und 10 wiedergegeben, sowie als Graphik (Punktwolke) in den Abbildungen 6a und 6b dargestellt. In jeder Probe ergaben sich sowohl für freies als auch für konjugiertes Estron positive Meßwerte, wobei sowohl bei den graviden als auch den pseudograviden Tieren die Werte für konjugiertes Estron signifikant ($p < 0,01$) höher lagen.

Das mittlere Verhältnis von freiem zu konjugiertem Estron lag bei den graviden Tieren bei $3,77 \pm 0,33$ und bei den pseudograviden Tieren bei $4,21 \pm 0,45$. In dem Beobachtungszeitraum bis zum ca. 40 Tag ergibt sich kein Hinweis auf Unterschiede in der Höhe der Konzentrationen an freiem und konjugiertem Estron bei den graviden und pseudograviden Tieren. Bei den beiden graviden Tieren zeigt sich danach ein Anstieg sowohl für freies Estron als auch konjugiertes Estron bis in die unmittelbare praepartale Phase, wonach ein Abfall erfolgte.

Tab. 9 Verlauf von freiem (f) und konjugiertem (k) Estron (E1 nmol/l) im peripheren Blutplasma bei zwei graviden Norwegischen Waldkatzen

Tier 3			Tier 4		
Tag	fE1 nmol/l	kE1 nmol/l	Tag	fE1 nmol/l	kE1 nmol/l
0	0,203	1,151	2	0,015	0,746
4	0,108	0,502	6	0,035	0,189
11	0,136	0,348	11	0,068	0,402
17	0,119	0,425	16	0,113	0,466
22	0,107	0,365	22	0,078	0,486
27	0,122	0,384	26	0,094	0,381
32	0,174	0,998	30	0,072	0,473
38	0,155	0,762	35	0,162	0,737
42	0,139	0,807	40	0,195	0,833
46	0,187	0,971	46	0,254	0,921
51	0,219	1,505	51	0,308	1,275
56	0,218	1,588	60	0,252	1,368
62	0,135	0,886	66	0,105	0,488
67	0,108	0,899	72	0,028	0,098
76	0,087	0,532	86	0,144	0,465
81	0,067	0,415	91	0,044	0,326

Tab. 10 Verlauf von freiem (f) und konjugiertem (k) Estron (E1 nmol/l) im peripheren Blutplasma bei zwei pseudogriden Norwegischen Waldkatzen

Tier 9			Tier 10		
Tag	fE1 nmol/l	kE1 nmol/l	Tag	fE1 nmol/l	kE1 nmol/l
4	0,159	0,614	3	0,063	0,419
9	0,056	0,235	8	0,085	0,333
15	0,092	0,385	15	0,056	0,368
20	0,060	0,305	20	0,090	0,314
25	0,110	0,2769	26	0,069	0,363
31	0,041	0,292	31	0,117	0,407
36	0,045	0,329	36	0,064	0,311
43	0,110	0,599			

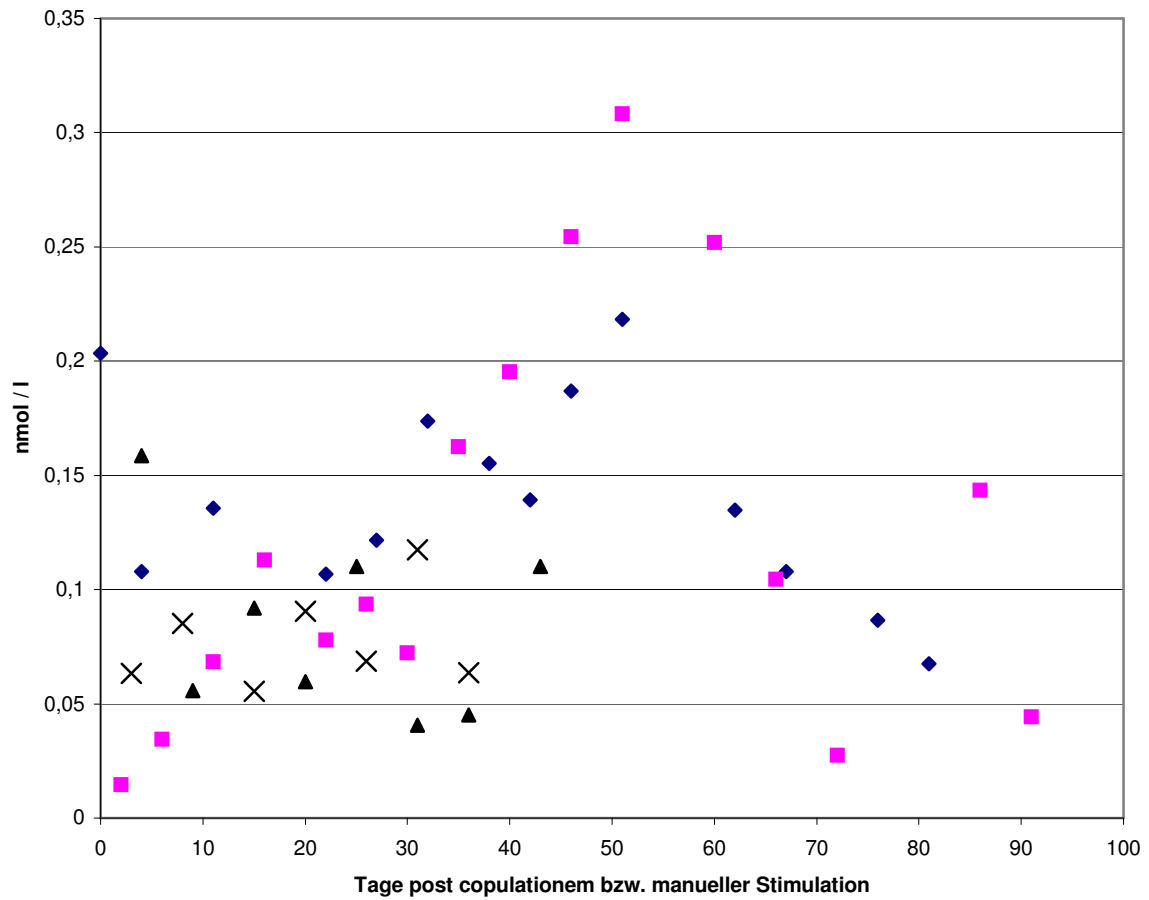


Abb. 6a Verlauf von freiem Estron im peripheren Blut bei jeweils zwei graviden [◆, ■] und pseudograviden [▲, X] Norwegischen Waldkatzen

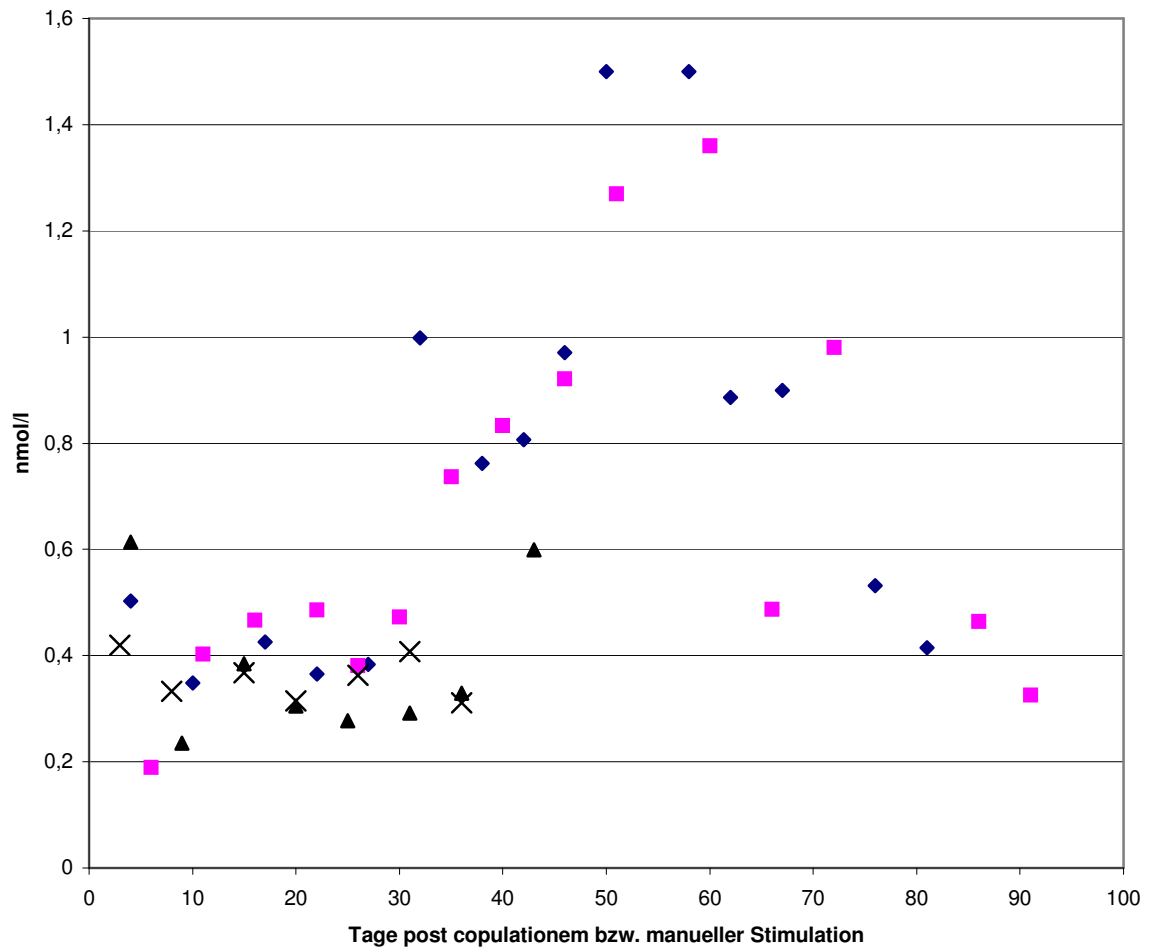


Abb. 6b Verlauf von konjugiertem Estron im peripheren Blut bei jeweils zwei graviden [\blacklozenge , \blacksquare] und pseudograviden [\blacktriangle , \times] Norwegischen Waldkatzen

6.3.2.3 Freie und konjugierte Gesamtöstrogene (GÖ)

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 11 und 12 wiedergegeben, sowie als Graphik (Punktwolke) in Abbildungen 7a und 7b dargestellt. In jeder Probe ergaben sich sowohl für die freien als auch für konjugierten Gesamtöstrogene positive Meßwerte, wobei sowohl bei den graviden als auch den pseudogriden Tieren die Werte für die konjugierten Gesamtöstrogene signifikant ($p < 0,01$) höher lagen. Das mittlere Verhältnis von freien zu konjugierten Gesamtöstrogenen lag bei den graviden Tieren bei $4,36 \pm 0,32$ und bei den pseudogriden Tieren bei $4,55 \pm ,016$. Der Verlauf entspricht weitgehend dem von freiem und konjugiertem Estron.

Tab. 11 Verlauf von freiem (f) und konjugiertem (k) Gesamtöstrogen (GÖ) in nmol/l im peripheren Blutplasma bei zwei graviden Norwegischen Waldkatzen

Tier 5			Tier 6		
Tag	fGÖ nmol/l	kGÖ nmol/l	Tag	fGÖ nmol/l	kGÖ nmol/l
1	0,052	0,829	2	0,062	0,773
5	0,024	0,650	7	0,035	0,635
11	0,023	0,576	12	0,026	0,620
16	0,001	0,599	18	0,036	0,614
21	0,033	0,523	32	0,035	0,843
26	0,022	0,588	37	0,083	1,046
32	0,075	0,794	41	0,077	0,898
36	0,075	0,842	49	0,114	0,997
40	0,179	1,001	54	0,076	0,968
45	0,129	0,098	60	0,064	0,955
50	0,125	1,029			
56	0,108	0,944			
61	0,072	1,090			
70	0,056	0,633			
75	0,067	0,659			
79	0,025	0,544			

Tab. 12 Verlauf von freiem (f) und konjugiertem (k) Gesamtöstrogen (GÖ)
in nmol/l im peripheren Blutplasma bei zwei pseudograviden
Norwegischen Waldkatzen

Tier 11			Tier 12		
Tag	fGÖ nmol/ml	kGÖ nmol/l	Tag	fGÖ nmol/l	kGÖ nmol/l
4	0,079	0,893	1	0,105	0,851
10	0,021	0,492	7	0,021	0,473
15	0,053	0,521	14	0,021	0,652
21	0,049	0,513	20	0,021	0,629
26	0,046	0,581	25	0,021	0,638
			30	0,021	0,650
			35	0,021	0,626
			41	0,021	0,568
			45	0,021	0,651

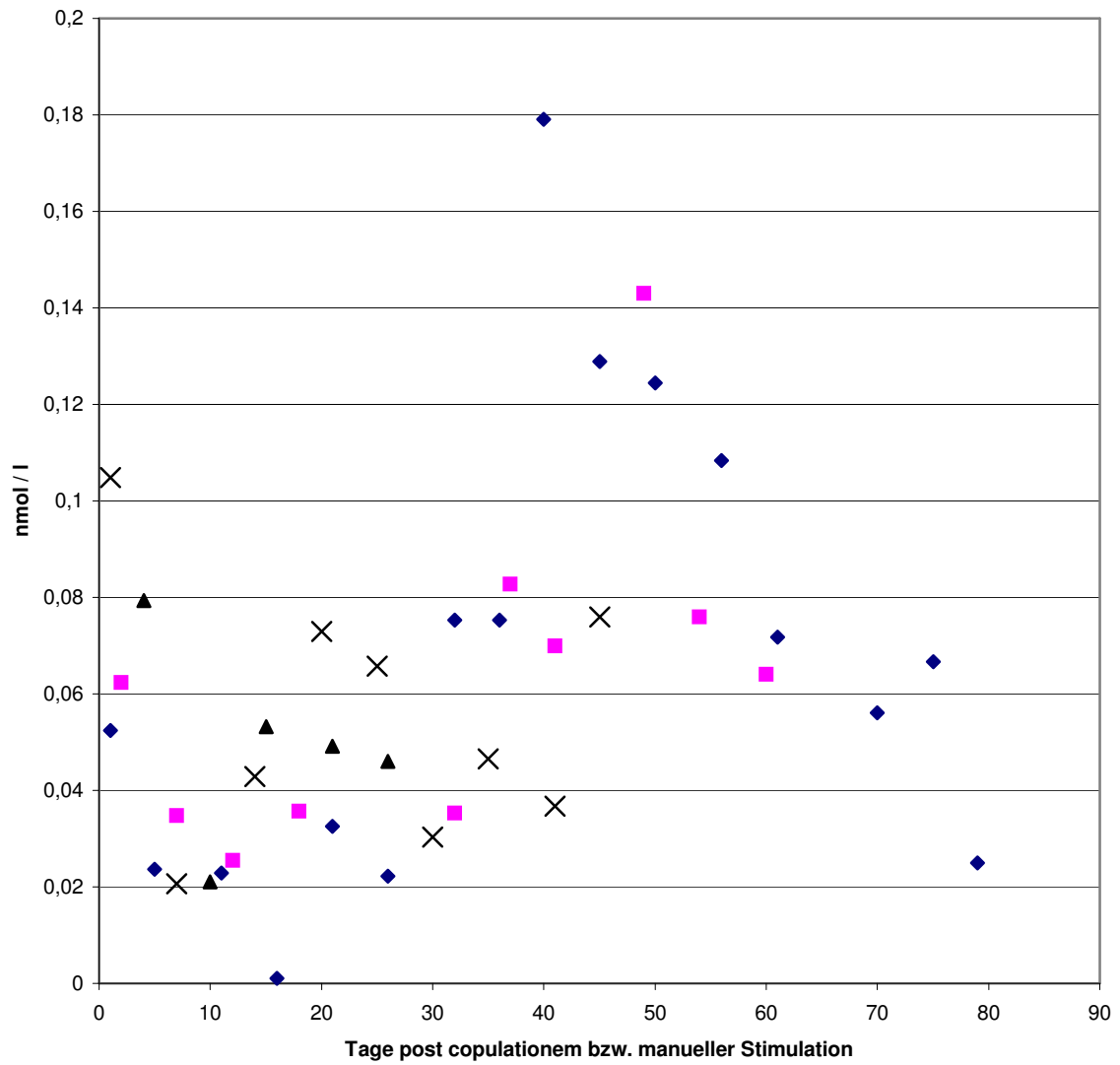


Abb. 7a Verlauf von freien Gesamtöstrogenen im peripheren Blut bei jeweils zwei graviden [◆, ■] und pseudograviden [▲, X] Norwegischen Waldkatzen

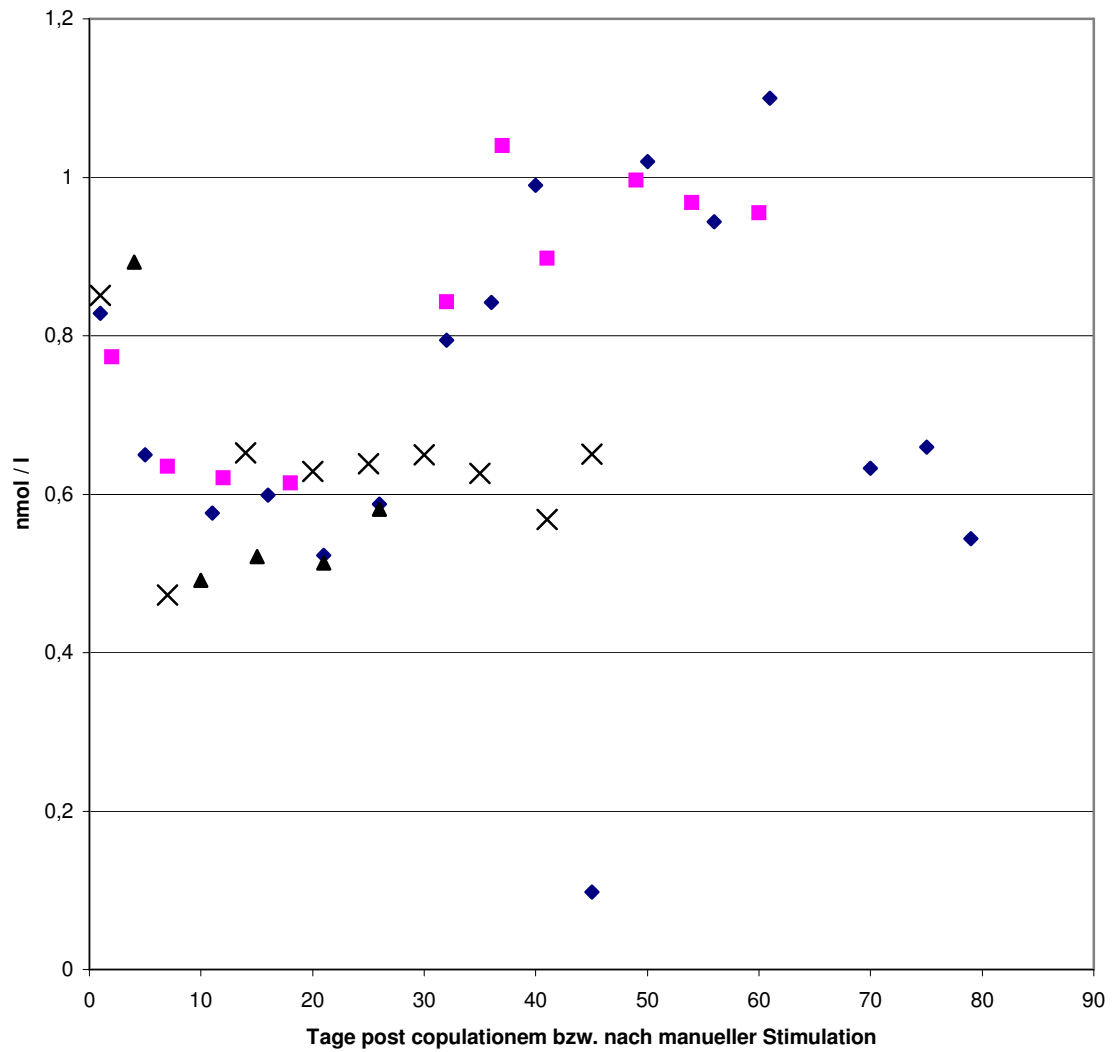


Abb. 7b Verlauf von konjugierten Gesamtöstrogenen im peripheren Blut bei jeweils zwei graviden [♦, ■] und pseudograviden [▲, X] Norwegischen Waldkatzen

7. Diskussion

Mit vorliegenden Untersuchungen zur endokrinen Kontrolle der Gravidität und Pseudogravidität der Norwegischen Waldkatze, einer weitgehend naturbelassenen Wildform der europäischen Hauskatze, sollten zunächst Angaben erhalten werden, inwieweit bei dieser Katze von entsprechenden Gegebenheiten wie bei anderen, stärker domestizierten Katzen ausgegangen werden kann.

Dieser Frage lagen Beobachtungen zugrunde, dass bei anderen Spezies, wie z. B. dem Rind, dem Schaf und dem Pferd, durchaus eine rasseabhängige Graviditätsdauer beschrieben worden ist (Döcke, 1994).

Weiterhin sollten die durchgeführten Untersuchungen zur Erweiterung unseres derzeitigen Kenntnisstandes über eine graviditätsspezifische Östrogenproduktion bei der Katze beitragen, wobei darüberhinausgehend auch die Rolle der Plazenta als „Hormonproduzent“ näher charakterisiert werden sollte. Um diesem Ziel näher zu kommen, wurden die Untersuchungen vergleichend an graviden und pseudograviden Katzen durchgeführt. Allerdings wird die Aussagefähigkeit dieses „Vergleichsmodells“ dadurch limitiert, dass die Pseudogravidität mit einer Dauer von ca. 40 Tagen deutlich kürzer ist als eine Gravidität mit ca. 63 Tagen, und somit bei den ca. 20 letzten Graviditätstagen keine direkte Vergleichsmöglichkeit gegeben ist.

7.1 Diskussion der Methodik

Die Untersuchungen wurden an jeweils sechs graviden und pseudograviden Katzen durchgeführt. Diese Tierzahl wurde zunächst als ausreichend angesehen, um zu statistisch verifizierbaren Daten zu kommen. Allerdings zeigte sich im Verlauf der Untersuchungen, dass mangels ausreichender „Kooperationsbereitschaft“ der Katzen vom ursprünglichen Blutprobenentnahmeprotokoll abgewichen werden musste und auch nicht immer das

gewünschte Blutvolumen entnommen werden konnte. Dadurch konnten die Östrogen- und Relaxinbestimmungen nur stichprobenartig durchgeführt werden, wodurch insbesondere aufgrund der geringen n-Zahl die Anwendung komplexer statistischer Auswertverfahren (z.B. Varianzanalysen) nicht mehr möglich war und eine deskriptive Statistik betrieben werden musste. Lediglich für den Blutparameter Progesteron konnten durch Interpolation fiktive Messwerte für definierte Zeitpunkte erhalten werden, was die Durchführung einer 2-faktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor Zeit gestattete (s.S. 44 ff). Bei Durchführung der Progesteron- und Östrogenanalysen konnte auf im Labor etablierte Verfahren zurückgegriffen werden. Allerdings ergeben sich bei Erfassung der freien und konjugierten Östrogene aufgrund der sehr niedrigen Messwerte zunächst Probleme, die erst nach Anpassung der Methodik (Steigerung der Empfindlichkeit, s.S. 27 ff, Kap. 4.3) gelöst werden konnten.

Die Bestimmung von Relaxin erfolgte extern¹ nach einem in der fachspezifischen, internationalen Literatur beschriebenen Radioimmunotest.

7.2 Diskussion der Ergebnisse

7.2.1 Dauer von Gravidität und Pseudogravidität, Progesteron

Die Dauer von Gravidität und Pseudogravidität lag bei 64 bzw. 39 ± 6 Tagen. Es ergab sich somit kein Unterschied zu den in der Literatur genannten Zahlen, die bei 66 ± 4 bzw. $39 \pm 4,5$ Tagen liegen (Lein und Concannon, 1983; Wildt et al., 1981).

Auch die für den Verlauf von Progesteron bei den graviden und pseudograviden Tieren erstellten Profile (s. Abb. 6) entsprechen den in der Literatur gemachten Angaben (Schmidt et al., 1983), womit die vorliegenden Untersuchungen keine Hinweise auf rasse- oder domestikationsbedingte Abweichungen geben. Auffallend ist, dass in den eigenen

¹ An dieser Stelle sei Herrn Prof. Dr. G. B. Steinetz (New York University Medical Center, Laboratory for Experimental Medicine and Surgery in Primates, Tuxedo) recht herzlich gedankt

Untersuchungen bei den pseudograviden Tieren zunächst höhere Progesteronwerte gemessen wurden als bei den graviden Tieren. Bei der Katze, einer polytoken Tierart, ist zu unterstellen, dass die Höhe der Progesteronmesswerte bei pseudograviden und graviden Tieren zumindest während der ersten 40 Tage nach der Ovulation von der Zahl der angebildeten Corpora lutea abhängt. Die hier vorliegenden Daten lassen auf eine höhere Zahl an Corpora lutea bei den pseudograviden als den graviden Katzen schließen; damit war die manuelle Stimulation (feathering) wirkungsvoller als die Stimulation durch den natürlichen Deckakt.

Die durchgeführten Untersuchungen lassen keine über den gegenwärtigen Kenntnisstand hinausgehenden Schlussfolgerungen nach der Quelle des zwischen dem ca. 40. Graviditätstag bis zum Partus produzierten Progesterons zu. Dieses scheint allerdings eher ovariellen als plazentaren Ursprunges zu sein. So berichten Schmidt et al., (1983) über die Bildung akzessorischer Gelbkörper in diesem Zeitraum, Verhage et al., (1976) sprechen von einer Funktionssteigerung der bereits vorhandenen Corpora lutea, was in Zusammenhang mit dem während der zweiten Graviditätshälfte stattfindenden Prolaktinanstieg gesehen werden kann (Banks et al., 1983).

Für die graviditätsspezifische Versorgung mit Progesteron scheinen demnach bei der Katze, ähnlich wie beim Hund (Arbeiter, 1990), ausschließlich die Corpora lutea verantwortlich zu sein, wobei- wie bei der Ziege (De Montigny, 1982) - ein die Gelbkörperfunktion steigernder Stimulus am Ende des zweiten Drittels der Gravidität erfolgt.

7.2.2 Relaxin

Relaxin konnte nicht bei den pseudograviden Tieren nachgewiesen werden, bei den graviden kam es zu einem steilen Anstieg ab dem ca. 20. Graviditätstag, gefolgt von einem Abfall zum Geburtszeitpunkt. Damit wurden bisher gemachte Beobachtungen bestätigt (Steinetz, 1997) und Relaxin als ein hormoneller Wirkstoff plazentaren Ursprungs ausgewiesen, dessen Produktion offensichtlich zeitgleich mit der Implantation aufgenommen wird.

7.2.3 Östrogene

Über die Sekretion von Östrogenen während der Gravidität und Pseudogravidität liegen bisher nur wenig und unspezifische Daten vor. Nach Abfall der Östrus-bedingten relativ hohen Ausgangskonzentrationen zu Beginn der Gravidität wird über einen erneuten Anstieg ab dem ca. 40. Tag berichtet, wofür die in diesen Zeitraum fallende erneute Follikelanbildung verantwortlich gemacht wird (Wildt et al., 1981). Im Hinblick auf die Komplexität der folliculären Östrogensynthese, die in der Regel an einen unmittelbaren praeovulatorischen Entwicklungszustand gebunden ist (Schwartz, 1982) bedarf die Verifizierung dieser These jedoch weiterer Untersuchungen. Über einen Östrogenanstieg ab dem neunten Tag vor der Geburt berichten Schmidt et al., (1983); die Autoren erklären dies mit einer Ausschüttung fetaler Hormone, ohne dafür weitere Anhaltspunkte vorzulegen.

Insgesamt wird in diesen auf radioimmunologischen Messungen beruhenden Untersuchungen von Estradiol-17 β gesprochen, ohne dafür den analytischen Beleg anzutreten, der im Hinblick auf die kreuzreaktiven Eigenschaften des verwendeten Antikörpers erforderlich wäre.

Nach bisherigem Kenntnisstand kann differenziert werden zwischen Spezies, bei denen eine graviditätsspezifische Östrogenproduktion beobachtet werden kann und solchen, wo dies nicht der Fall ist. Zu letzteren gehört z. B. der Hund, die dort beobachteten im pg- Bereich pro ml liegenden Östrogenkonzentrationen im peripheren Plasma wurden als

lutealen Ursprungs angesehen, der Abfall erfolgt gleichermaßen mit der Luteolyse bei graviden Tieren, in der Plazenta selbst konnten östrogen-wirksame Verbindungen nicht nachgewiesen werden (Hoffmann, 1994). Zur ersten Gruppe gehören Spezies wie das Pferd und die Gruppe der Wiederkäuer. Die hier im Blutplasma messbaren Östrogenkonzentrationen sind plazentaren Ursprungs und können die während des Östrus messbaren Östrogenkonzentrationen ovariellen Ursprungs um mehr als den Faktor 1000 überschreiten (Hoffmann, 1977; Pinho, 1995). Neben diesem quantitativen Unterschied ergibt sich auch ein deutlicher qualitativer Unterschied. Dieser liegt darin, dass während des Östrus der Follikel vor allem Estradiol- 17β sezerniert, während die Plazenta in erster Linie Estron produziert, wobei die biologisch inaktive Form Estronsulfat im Vordergrund steht; als speziesspezifisches Östrogen wird darüber hinausgehend von der Plazenta noch Equilin und Equilenin, in freier und konjugierter Form sezerniert. Ein weiterer speziesspezifischer Unterschied liegt darin, dass beim Pferd die maximale Östrogenproduktion etwa in der Mitte der Gravidität erfolgt, bei den Wiederkäuern dagegen an deren Ende unmittelbar vor der Geburt (Hoffmann, 1977; Pinho, 1995).

Nachdem für die Katze bisher nur Angaben über das Vorkommen von „freiem Estradiol“ vorliegen, war es Ziel vorliegender Untersuchungen, darüber hinausgehend Informationen über konjugierte Östrogene zu erhalten, wobei zwischen Estron, Estradiol- 17β und dem Östrogenmetabolit Estradiol- 17α differenziert werden sollte. Durch Bestimmung freier und konjugierter Gesamtöstrogene sollten zudem eventuell nicht spezifisch erfasste Östrogene erkannt werden.

7.2.3.1 Aspekte zur Frage der Plazenta als Östrogenquelle

Bei Betrachtung der quantitativen Aspekte können die Untersuchungen nach chromatographischer Auftrennung der einzelnen Östrogenfraktionen (s. Kap. 6.3.1) wegen der μl hohen Nachweisverluste von ca. 60 % nicht herangezogen werden.

Die weiteren bei jeweils zwei **graviden Katzen** zur Bestimmung von freiem Estradiol-17 β , Estron sowie der freien Gesamtöstrogene durchgeführte Untersuchungen haben zunächst gezeigt (s. Kap. 6.3.2), dass die im Verlauf der Gravidität messbaren Werte konstant im unteren nmol/l – Bereich verlaufen und die zu Beginn der Gravidität gemessenen Werte nicht (Estradiol-17 β) oder allenfalls geringgradig (Estron, Gesamtöstrogene) überschritten werden. Nachdem die Anfangs der Gravidität gemessenen Östrogenkonzentrationen ovariellen Ursprungs sein müssen, spricht diese Beobachtung nicht für eine zusätzliche plazentare Östrogenproduktion.

Die Werte für konjugierte Östrogene lagen gleichbleibend während der Gravidität um den Faktor 3,1 bis 4,2 höher als die der freien. Dieser Faktor liegt z.B. deutlich niedriger als bei den Spezies Pferd und Rind (Faktor ≥ 10), wo eine plazentare Synthese sulfatierter Östrogene stattfindet (Hoffmann et al., 1996). Demnach sprechen die eigenen Befunde eher nicht für eine Sekretion konjugierter Östrogene, sondern lassen deren Erscheinen mehr auf in der Leber und/oder Niere stattfindende Konjugationsprozesse zurückführen (Shille et al., 1990). Wenngleich die Katze nach Robinson und Williams (1958) nur eine eingeschränkte Fähigkeit zur Glucuronidierung besitzt und lediglich körpereigene Phenolgruppen mangels unzureichender in vivo Glucotransferaseaktivität in diese Form verstoffwechseln kann, so treten doch nachweisbar hydrolysierbare Produkte auf, deren Konjugationsort allerdings noch unklar ist (Longcope et al., 1980). Auch für die konjugierten Östrogene gilt, dass im Verlauf der Gravidität die an den Tagen 0-2 messbaren Konzentrationen nicht (Estradiol-17 β) oder allenfalls geringgradig (Faktor 1,3

Estron; Faktor 3,4 Gesamtöstrogene) überschritten werden. Auch diese Beobachtungen ergeben eher keine Hinweise auf eine plazentare Östrogenproduktion bei der Katze.

Analog zu den graviden Tieren erfolgten Östrogenmessungen bei den **pseudograviden Tieren**. Die Beobachtungsperiode erstreckte sich bis zum ca. 40. Tag (Tag 33-49), d.h. über einen Zeitraum von ca. 20 Tagen wurde damit auch die Phase einer ausgebildeten Plazenta bei den graviden Tieren (Tag 20-40 der Gravidität) abgedeckt. Bei Vergleich der in dem Zeitraum von Tag 0 bis Tag 40 erhaltenen Werte zeigt sich, dass bei den pseudograviden Tieren eher die Tendenz zu höheren Werten besteht. Auch diese Beobachtungen geben keinen Hinweis auf eine plazentare Östrogenproduktion sondern lassen die gemessenen Östrogene eher einem lutealem Ursprung zuordnen, da diese analog zu Progesteron (s. Kap. 7.2.1) bei den pseudograviden Tieren höher lagen.

Bei den durchgeführten Untersuchungen fällt auf, dass bei den graviden Tieren nach ca. dem 40. Tag sowohl für freies als auch konjugiertes Estron und– analog dazu– für die freien und konjugierten Gesamtöstrogene ein Anstieg zu beobachten ist, wobei zum Geburtszeitpunkt ein Abfall erfolgt. Wie oben bereits angesprochen, liegen diese Werte nicht oder nur geringfügig über den Ausgangswerten zu Beginn der Gravidität, sodass sie eher als ovariellen als plazentaren Ursprungs anzusehen sind. Ihr Anstieg könnte mit der ab dem ca. am 40. Tag einsetzenden luteotropen Wirkung von Prolaktin (Banks and Stabenfeld, 1983) erklärt werden, woraus sich die Aufrechterhaltung der Gelbkörperfunktion während der restlichen Dauer der Gravidität ergibt. Da jedoch ein Ausschluß einer plazentaren Östrogensynthese nicht möglich ist, sind weitere Untersuchungen zur Abklärung der Situation notwendig.

7.2.3.2 Aspekte zur Qualität der gemessenen Östrogene

Die durchgeführten Untersuchungen haben eindeutig den Nachweis von konjugiertem Estron und Estradiol- 17 α bei der graviden Katze ergeben (s. Kap. 6.3.1). Damit wurden erstmals Estron und Estradiol- 17 α als Metaboliten des Östrogenstoffwechsels bei der Katze nachgewiesen. Bei diesen nach HPLC- Auftrennung durchgeführten Untersuchungen konnten freie Östrogene praktisch nicht nachgewiesen werden. Dies steht nicht im Widerspruch zu den in Kap. 6.3.2 erhobenen Befunden, die gezeigt haben, dass die Konzentrationen der konjugierten Östrogene im Blutplasma um den Faktor 1,4 - 4,2 höher liegen, sodass die unter der Nachweisgrenze liegenden Werte für freie Östrogene nach Auftrennung mittels HPLC mit den relativ hohen Aufarbeitungsverlusten von ca. 60 % erklärt werden können. Bislang steht für den Östrogenstoffwechsel der Katze lediglich fest, dass eine nicht näher zu klassifizierende Umwandlung stattfindet (Shille, 1990), Einzelheiten zu Absorptionsraten oder Konversionvorgängen bedürfen jedoch weiterer Untersuchungen.

7.2.3.3 Schlussfolgerungen

Die durchgeführten Untersuchungen haben eindeutig gezeigt, dass während der Gravidität bei der Katze sowohl qualitativ als auch quantitativ eine besondere Situation hinsichtlich der Östrogenproduktion besteht. Die Situation bei der Katze ist demnach anders als bei Pferd und Wiederkäuer und entspricht eher der beim Hund. Dies gilt auch deshalb, da die Befunde eher auf eine luteale als plazentare Östrogenproduktion schließen lassen, wie dies bereits für den Hund postuliert worden ist (Hoffmann et al., 1994). Diese Schlussfolgerung bedarf sicherlich weiterführender Untersuchungen, auch im Hinblick auf den Ausschluß einer plazentaren Östrogenproduktion (s.o.); sie steht allerdings in Einklang mit Beobachtungen, die inzwischen bei zahlreichen Spezies auch die Corpora lutea als Östrogene produzierende Organe ausweisen.

8. Zusammenfassung

In zeitlich gestaffelt entnommenen Blutproben 6 gravider und 6 pseudogravider Norwegischer Waldkatzen wurde der Verlauf von freiem und konjugiertem Estradiol-17 β (fE2 β , kE2 β), freiem und konjugierten Estradiol-17 α (fE2 α , kE2 α), freiem und konjugiertem Estron (fE1, kE1), freier und konjugierter Gesamtöstrogene (fGÖ, kGÖ) sowie von Progesteron und Relaxin mittels etablierter radioimmunologischer Verfahren bestimmt. Hierzu wurden unter anderem gepoolte Plasmaproben der Tage 0, 15, 30, 45 und 55 post copulationem verwendet. Die Differenzierung zwischen freien und konjugierten Östrogenen erfolgte mittels enzymatischer Hydrolyse und selektiver Extraktion. Die Differenzierung des Metaboliten E2 α von E2 β und E1 erfolgte in selektierten „Poolproben“ durch Messung nach vorausgehender Auftrennung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie.

Alle drei Östrogene konnten qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden, wobei die konjugierten Formen deutlich überwogen (Verhältnis 1,4 – 4,2). Ein Unterschied im Vorkommen der einzelnen Östrogene während der Trächtigkeit und der Pseudogravidität ließ sich nicht feststellen. Somit ist eine plazentare Synthese von Östrogenen bei der Katze eher unwahrscheinlich, zumal der Anstieg in den letzten 20 Tagen der Gravidität die im Östrus gemessenen Werte nicht übersteigt.

Die Unterschiede hinsichtlich des Auftretens von Progesteron während der Trächtigkeit und der Pseudogravidität waren hochsignifikant ($p < 0,0001$).

Relaxin war ausschließlich bei den graviden Tieren ab dem 25. Tag der Trächtigkeit nachzuweisen. Diese Beobachtungen bestätigen die in der Literatur gemachten Angaben und lassen im Hinblick auf die endokrine Regulation der Gravidität und Pseudogravidität auf keine besondere Situation bei der Norwegischen Waldkatze schließen.

8. Summary

The concentrations of free (f) and conjugated (c) estradiol-17 β (E2 β), estradiol-17 α (E2 α), estrone (E1) and total oestrogens (f and c TE) as well as of progesterone (P) and relaxin (R) were determined in individual and pooled (days 0, 15, 30, 45, 55) blood samples of 6 pregnant and 6 pseudopregnant Norwegian Forest Cats using established radioimmunoassay procedures. Distinction between free and conjugated oestrogens was by means of enzyme hydrolysis and selective extraction, separate measurement of E1, E2 α and E2 β was restricted to the pooled plasma samples and achieved by high performance liquid chromatography.

Qualitative and quantitative measurement of all three oestrogens was possible with the conjugated forms exceeding the free forms by the factor 1.4 to 4.2. No differences in the occurrence of oestrogens in pregnancy and pseudopregnancy became apparent thus a placental oestrogen synthesis in the cat is rather unlikely, also because the oestrogen increase during the last 20 days of pregnancy did not exceed the concentrations determined in oestrus.

The differences in the concentration of progesterone in the pregnant and the pseudopregnant group was highly significant ($p < 0.0001$).

Relaxin could only be detected in pregnant cats from day 25 of pregnancy up to parturition.

These results confirm earlier data and indicate that endocrine regulation of pregnancy and pseudopregnancy in the Norwegian Forest Cat is not different to that of other domestic cats.

9. Literaturverzeichnis

ABRAHAM, G. E.; ODELL; W. D.; EDWARDS, R.; PURDY, J. M. (1970) : Solid-phase radioimmunoassay of estrogens in biological fluids. Steroid Assay by Protein Binding; E. Diczfalusy (ed.); Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 332-346

ADDIEGO, L. A., TSUTSUI, T., STEWART, D.R. (1987) : Determination of the Source of Immunoreactive Relaxin in the Cat. Biol. Reprod., 32, 1165-1169

ARBEITER, K. (1990) : Die Progesteronbestimmung im Blut- ein Verfahren zur Präzisierung der Deckzeit bei der Hündin. Wien. Tierärztl. Mschr. 77, 190-192

ARBEITER, K. (1994) : Anwendung von Hormonen in der Reproduktion von Hund und Katze. in: F. Döcke (Ed), Veterinärmedizinische Endokrinologie 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, 823-841

BAMBERG, E. (1994) : Chemie, Biochemie und Nachweis der Steroidhormone. in : F. Döcke (Ed) Veterinärmedizinische Endokrinologie 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, 31-39, 41-49.

BANKS, D.R.; PAAPE, S.R.; STABENFELDT G.H. (1983) : Prolactin in the cat : I. Pseudopregnancy, Pregnancy and Lactation. Biol. Reprod., 28, 923-932

BANKS, D.R.; STABENFELDT G.H. (1983) : Prolactin in the cat: II. Diurnal Patterns and Photoperiod Effects. Biol. Reprod., 28, 933-939

BJERSING, L.; CARSTENSEN, H. (1967) : Biosynthesis of steroids by granulosa cells of of the porcine ovary in vitro. J. Reprod. Fert. 14 (1967) , 101-102

BRYANT-GREENWOOD, G.D. (1982) : Relaxin as a new hormone. Endocr. Rev, 3 , 62-90

BURKE, Th. J. (1980) : Pharmacological control of estrus in the bitch and queen. in: Current Therapy in Theriogenology, W.B. Saunders, Philadelphia-London-Toronto, 674-677

BURKE, Th. J. (1986) : Small animal Reproduction and Infertility. A clinical Approach to Diagnosis and Treatment. in: Lea & Febiger, Philadelphia 1986

CHALLIS, J.R.G.; OLSEN, D.M. (1988) : Parturition.in: E-Kuobil, J. D. Neill (Hrsgb.)The Physiology of Reproduction, Vol. 2. Raven Press Ltd., New York, 2177-2216

CONCANNON, P.W.; BUTLER, W.R.; HANSEL, W. (1978) : Parturition and lactation in the bitch: Serum progesterone, cortisol and prolactin. Biol. Reprod. 19, 1113-1118

CONCANNON, P.W.; LEIN, D. H. (1983) : Feline reproduction. in : R. W. Kirk (Ed.) : Current Veterinary Therapy VII. W. B. Saunders, Philadelphia-London-Toronto, 932-935

CURRIE, W.B.; THORBURN, G.D. (1977) : The fetal role in timing the initiation of parturition in the goat. in : (new series) J. Knight, M. O'Connor (Eds.), The Fetus and Birth. Ciba Found. Symp. 47, Elsevier Amsterdam, 49-66

DAWSON, A.B. (1946) Postpartum history of the corpus luteum of the cat. Anat. Rec. 95 , 29-51

DAWSON, A.B. & FRIEDGOOD, H.G. (1940) : The time and sequence of preovulatory changes in the cat ovary after mating or mechanical stimulation. Anat. Rec. 76, 411-429

DE MONTIGNY, G. (1982) : Milk fat progesterone concentrations in goats and early pregnancy diagnosis. Theriogenology 17, 423-431

DIXON, W. J. (1993) : BMDP statistical software manual, volume 1 and 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London

DÖCKE, F. (1994) : Endokrinologie der Laktation (Kap. 19). in: F. Döcke (Ed), Veterinärmedizinische Endokrinologie 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, 571-580

DOW, C. (1962) : The cystic hyperplasia-pyometra complex in the cat. Vet. Res. 74,141-147

DUTTON, J.G.; GREIG, C.G. (1957) : Observations on the distribution of glucuronide synthesis in tissues. Bioch. Journ. 66, 52ff

FLINT, A.P. (1983) : Factors controlling placental endocrine function in domestic animals : Fetal Endocrinology and Metabolism. Academic Press, New York, 75-96

GENTZ, F. (1994) : Untersuchungen zur endokrinen Kontrolle der Gravidität der Stute. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

GERRES, S. (1991) : Untersuchungen zur Bedeutung von Progesteron als Regelfaktor bei der Entstehung der Pseudogravidität der Hündin. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

GRAF, K-F.; FRIEDREICH, E.; MATTHES, S. und HASAN, S.H. (1977) : Homologous radioimmunoassay for canine prolactin and its application in various physiological states. J. Endocrinol. 75, 93-103

GREEN, B.; LEAKE, R.E. (1987) : Steroid hormones (Green and Leak Ed.) Information Printing Ltd., Oxford, pp 1-5

GREULICH; W.W. (1934) : Artificially induced ovulation in the cat (*Felis domestica*). Anat. Rec. 58, 217-224

GUDERMUTH, D.F.; NEWTON, P.; DEALS, P.; CONCANNON, P. (1997) : Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and faecal concentrations of progesterone. J. Reprod. Fertil. 51, 177-184

GÜNZEL, A.-R.; KLUG-SIMON, C. (1985) : Zum Fortpflanzungsgeschehen der Katze-korrespondierende ovarielle und vaginalzytologische Befunde. Der praktische Tierarzt 9, 727-735

HARTIALA, K. (1955) : Studies of detoxication mechanisms. III. Glucuronide synthesis of various organs with special reference to the detoxifying capacity of the mucous membrane of the alimentary canal. Ann.Med.Exp.Biol.Fenn. 33, 239-245

HENRICKS, D.M.; DICKEY, J.F.; HILL, J.R.; JOHNSTON, W.E. (1972) : Plasma estrogen and progesterone levels after mating, during late pregnancy and postpartum in cows. Endocrinology 90, 1336-1342

HOFFMANN, B.; KYREIN, H.J.; ENDER, M.L. (1973) : An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma. Horm. Res. 4, 126-133

HOFFMANN, B. (1977) : Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind. Entwicklung von Meßverfahren und physiologische Daten. Zentralbl. Vet. Med. Suppl. 26. Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg

HOFFMANN, B. (1983) : Untersuchungen zur Steroidsynthese in der Plazenta des Rindes. Wien. Tierärztliche Mschr., 70, 224-228

HOFFMANN, B.; HÖVELER, R.; B.; HASAN, S.H. (1992) : Investigations on ovarian and pituitary function in the dog following hysterectomy. J. Reprod. Fert., 96, 837-845

HOFFMANN, B. (1994) : Gravidität, Geburt und Puerperium. in : F. Döcke (Ed.) Veterinärmedizinische Endokrinologie. 3. Aufl. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, 509-541

HOFFMANN, B.; HÖVELER, R.; NOHR, B.; HASAN, S.H. (1994) : Investigations on hormonal changes around parturition in the dog and the occurrence of pregnancy-specific non conjugated oestrogens. Exp. Clin. Endocrinol 102, 185-189

HOFFMANN, B.; GENTZ, F.; FAILING, K. (1996) : Investigations into the course of Progesterone-, Oestrogen- and eCG- concentrations During Normal and Impaired Pregnancy in the Mare. Reprod Dom Anim 31, 717-723

HOFFMANN, B.; RIESENBECK, A. (1999) : Aspects on hormonal control of normal and induced parturition in the dog. Reprod. Dom. Animal 34, 219-226

JEMMET, J.E.; EVANS, J.M. (1977) : A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats. Journ. Small Anim. Pract. 18, 31-37

JÖCHLE, W. (1993) : Fortpflanzungsmanipulation mit Hormonen bei der Katze. Mh. Vet.-Med. 48, 159-166

- JÖCHLE, W. (1997) : Prolactin in the reproduction of the dog and the domestic cat
- LAWLER, D.F.; EVANS, R.H.; REAMERS, T.J. (1991) : Histopathologic features, enviromental factors, and serum estrogen, progesterone, and prolactin values associated with ovarian phase and inflammatory uterine disease in cats. Am. J. Vet. Res. 52, 1747-1753
- LAWLER, D.F.; JOHNSTON, S.D.; HEGSTAD, R.L. (1993) : Ovulation without cervical stimulation in domestic cats. J. Reprod. Fertil.47, 57-61
- LEIN, D.H.; CONCANNON, P.W. (1983) : Infertility and fertility treatments in queen and tomcat. in : R.W. KIRK Current veterinary therapy VII , Philadelphia-London-Toronto, 936-942.
- LEISER, R.; KOOB, B. (1993) : Development and Characteristics of Placentation in a Carnivore, the Domestic Cat. Journ. Exp. Zoology, 266 ,642-656
- LEYVA, H.; MADLEY, T.; STABENFELDT, G.H. (1989) : Effekt of light manipulation on ovarian activity and melatonin and prolactin secretion in the domestic cat. Journ. Reprod. 39, 125-133
- LEYVA, H.; MADLEY, T.; STABENFELDT, G.H. (1989) : Effekt of melatonin on photoperiodic resposes, ovarian secretion of oestrogen, and coital responses in the domestic cat. Journ. Reprod. 39, 135-142
- LINZELL, J.L.; HEAP, R.B. (1968) : Acomparision of progesterone metabolism in the pregnant sheep and goat: sources of production and an estimation of uptake by some target organs. Journ. Endocrinol., 41, 433-438
- LONGCOPE, C.; YESAIR, D.W.; WILLIAMS, K.I.H. (1980) : Comparison of metabolism in dogs of estradiol-17 β following its intravenous and oral administration. Journ. Steroid Biochem. 13, 1047-1055
- MIN, G.; SHERWOOD, O.D. (1996) : Identification of relaxin-binding cells in the cervix, mammary glands, nipples, small intestine and skin of pregnant pigs. Biol. -Reprod., 55 , 1243-1251
- MIN, G.; SHERWOOD, O.D. (1998) : Localisation of specific relaxin-binding cells in the ovary and testis of pigs. Biol. -Reprod., 59, 401-408
- O`BYRNE, E.M.; STEINETZ, B.G. (1976) : Radioimmunoassay of relaxin in sera of various species using an antiserum to porcine relaxin. Proc. Soc. Exp. Med., 152, 272-276
- PINHO, T.G. (1995) : Untersuchungen zum Verlauf freier und konjugierter Östrogene im Blutplasma, Kot und Urin während der Trächtigkeit des Rindes.
Inaugural-Dissertation zum Erlangen des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

- QIN, A.; GARIBAY-TUPAS, P. (1997) : Relaxin in recombination of collagen tissues.
Biol. Repr., 56 (2), 800-820
- RAESIDE, J.I.; RENAUD, R.L. and FRIENDSHIP, R.M. (1989) : Aromatization of 19-norandrogens by porcine Leydig cells. J. Steroid Biochem. 32, 729-735
- ROBINSON, D.; WILLIAMS, R.T. (1958) : Do cats form glucuronides ?
Biochem. Journ. 68, 23-27
- ROTH, T.L.; MUNSON L.; SWANSON, W.F.; WILDT, D.E. (1995) : Histological Characteristics of the Uterine Endometrium and Corpus Luteum during Early Embryogenesis and the Relationship to Embryonic Mortality in the Domestic Cat.
Biol. Reprod. 53, 1012-1021
- SCHAMS, D.; RÜSSE, I.; SCHALLENBERGER, E.; PROKOPP, S. and CHAN, J.S.D. (1984) : The role of steroid hormones, prolactin and placental lactogen on mammary gland development in ewes and heifers. J. Endocrinol. 102, 337-343
- SCHMIDT, P.M.; CHAKRABORTY, P.K.; WILDT, D.E. (1983) : Ovarian activity, circulating hormones and sexual behaviour in the cat. II. Relationships during pregnancy, parturition, lactation and the postpartum estrus. Biol. Reprod. 28, 657-671
- SCHWARTZ, N.B. (1982) : Novel peptides in ovarian follicular fluid: Implications for contraceptive development. Res. Frontiers Fert. Regul. 2, 1-11
- SHILLE, V.M.; LUNDSTROM; K.E. & STABENFELDT, G.H. (1979) Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 β concentrations in plasma: relation to estrous behaviour and cornification of exfoliated vaginal epithelium. Biol. Reprod. 21, 953-963
- SHILLE, V.M.; HAGGERTY, M.A.; SHACKLETON, C. and LASLEY, B.L. (1990) : Metabolites of estradiol in serum, bile, intestine and feces of the domestic cat (*Felis catus*). Theriogenology, Oct. 1990 Vol. 34 NO. 4, 779-794
- SHORT, R.V. (1962) : Steroids in the follicular fluid and the corpus luteum of the mare. A „two-cell type“ theorie of ovarian steroid synthesis. J. Endocrinol. 24, 59-63
- SMITH, S.J.; COX, J.E (1987) : In-vitro biosynthesis of C 18 neutral steroids in horse testes. J. Reprod. Fert. 35, 71 – 78
- STABENFELDT; G.H.; SHILLE, V.M. (1977) : Reproduction in the dog and cat.
Repr. in Domestic Animals 3rd Edition, 499-527
- STEINETZ, B.G. (1997) : Pattern and source of secretion of relaxin in the reproductive cycle of the spotted hyena (*Crocuta crocuta*). Biol Reprod., 56 (5) , 1301-1306
- STRYER, L. (1990) : Biochemie.
Spektrum der Wissenschaft (Stryer, I. Ed.) Verlagsgesellschaft, Heidelberg, 580-585

STEWART, D.R.; STABENFELDT, G.H. (1985) : Relaxin Activity in the Pregnant Cat.
Biol. Reprod., 32, 848-854

SWANSON, W.F.; ROTH, T.L., BROWN, J.L. (1995) : Relationship of circulating steroid hormones, luteal luteinizing hormone receptor and progesterone concentration, and embryonic mortality during early embryogenesis in the domestic cat.
Biol. Reprod., 53, 1022-1029

TALAMANTES, F.; OGREN, L. (1988) : The placenta as an endocrine organ: polypeptides. E. Knobit, J.D. Neill (Hrsgb.) Physiol. Reprod., Vol. 2, Raven Press, New York, 2093-2144

THORBURN, G.D.; CHALLIS, J.R.; CURRIE, W.B. (1977) : Control of parturition in domestic animals. Biol. Reprod. 16, 18-27

TSUTSUI, T.; AMANO, T.; SHIMIZU, T. (1989) : Evidence for transuterine migration of embryos in the domestic cat. Nippon Juigaku Zasshi 51, 613-617

VERHAGE, H.G.; BEAMER, N.B.; BRENNER, R.M. (1976) : Plasma levels of estradiol and progesterone in the cat during polyestrus, pregnancy and pseudopregnancy.
Biol. Reprod. 14, 579-585

VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K.; SILVA, L.D.M.; WOUTERS-BALLMANN, P.; DELAHAUT, P.; ECTORS, F. (1993) : Regulation of progesterone during pregnancy in the cat – studies on the role of corpora lutea, placenta and prolactin secretion.
Journ. Reprod. Fert. 47, 165-173

WATHES, D.C.; REES, J.M.; PORTER, D.G. (1988) : Identification of relaxin in the placenta of the ewe. Journ. Reprod. Fert. 84 , 247-257

WHEELER, A.G.; WALKER, M.; LEAN, J. (1987) : Influence of adrenergic receptors on ovarian progesterone secretion in the pseudopregnant cat and oestradiol secretion in the oestric cat. Journ. Reprod. Fert. 79, 195-205

WILDT, D.E.; CHAN, S.Y.W.; SEAGER, S.W.J.; CHAKRABORTY, P.K. (1981) : Ovarian activity, circulating hormones and sexual behaviour in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating.
Biol. Reprod. 25 , 15-28

ZALESKI, H.M.; SHERWOOD O.D. (1996) : Effects of relaxin on lactatioal performance in ovariectomized gilts. Biol. Reprod., 55, 671-675

10. Abkürzungen

E1 = Estrone

fE1 = Free Estrone

tE1 = Totale Estrone

cE1 = Conjugated Estrone

E2 β = Estradiol -17 β

fE2 β = Free Estradiol -17 β

cE2 β = Conjugated Estradiol-17 β

tE2 β = Total Estradiol -17 β

E2 α = Estradiol -17 α

fE2 α = Free Estradiol -17 α

cE2 α = Conjugated Estradiol -17 α

tE2 α = Total Estradiol -17 α

Oe = Oestrogen

fOe = Free Oestrogen

cOe = Conjugated Oestrogen

tOe = Total Oestrogen

P4 = Progesteron

Relaxin

Anhang

Tab. I
Originalwerte Progesteron der graviden Tiere

	Tier 01	Tier 02	Tier 03	Tier 04	Tier 05	Tier 06
Tag						
0	0	0	1400			0
1				400	760	
2		1864				1440
3						
4			27680			
5	8800				37800	
6				60920		
7						79200
8						
9		76744				
10						
11	102160		48680	62280	74600	
12						71080
13						
14		71544				
15						
16	103600			77000	84760	
17			83880			
18						85960
19						
20		121700				
21	60240				83200	
22			87240	85960		
23						
24						
25						
26	82200			90320	82640	
27		85104	58400			
28						
29						
30				63760		
31	92040					
32		51680	55040		75800	96320
33						
34						
35	59560			54000		
36					71400	
37						88120
38			57560			
39						
40	66200			69120	68680	
41		79984				59440
42			54160			
43						
44						
45					54960	

46	47080		36240	44000		
47		67664				
48						
49						41440
50					42440	
51			33880	45600		
52	44760					
53						
54						26760
55						
56		51624	32200		29520	
57	44440					
58						
59						
60				37920		24080
61					40400	
62	33320		23000			
63		44984				
Geburt						
1						
2				2200		
3	680	4424	1840			
4						
5		4504				
6				0	720	
7						
8						
9		5824				
10						
11					1240	
12			4000			
13						
14				1120		
15					0	
16						
17			4960			
18						
19				1920		

Tab. II
Originalwerte Progesteron der pseudograviden Tiere

	Tier 07	Tier 08	Tier 09	Tier 10	Tier 11	Tier 12
Tage post stim.						
0	0			0	0	
1						8440
2						
3					3240	
4		37160	12024			
5	23840			55240		
6						
7						100880
8					88000	
9	69760	87360	91704			
10						
11				91200		
12						
13	77240	88840				
14						
15			93760		105000	
16						
17						
18	126560	135400				
19						
20		82064	137400	140500		158900
21						
22	136460					
23						
24		70720				
25			57264			91640
26					107500	
27	98920			96280		
28						
29		51360				
30						
31			27264		100840	
32						
33	38960			94480		
34		9320				
35						
36			7184		42680	
37						
38	19760	3960				
39						
40						
41						
42						
43	9920		6784			
44		1600				
45						3400
46						
47	3880					
48						
49		1400				

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders herzlich bei Herrn Prof. Dr. B. Hoffmann für die Überlassung des Themas und die stets gewährte und engagierte Unterstützung bei der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls in besonderer Weise Herrn Wilhelm Damm für seine Hilfe bei labortechnischen Fragestellungen sowie für seine tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung des praktischen Teils dieser Arbeit.

Meiner Kollegin, Frau Barbara Hohmann, danke ich für ihre Unterstützung und der Tatsache, daß mit ihrer Hilfe eine Anfertigung dieser Arbeit, parallel zu meiner Praxistätigkeit bei ihr, überhaupt zu realisieren gewesen ist.

Ganz besonders herzlich danke ich Frau Ines Marion Krempa für die versierte Hilfe bei der Blutentnahme und die Versorgung meiner Katzen.

Last but not least danke ich meinen pelzigen Vierbeinern für ihre Kooperation und der Firma Effem® für die überaus freundliche Spende von Whiskas®-Katzennahrung über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit sowie der Firma IDEXX® für die Bereitstellung von FeLV/FIV Elisa- SNAP-Testsystemen.

ISBN 3-938026-06-5



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel.: 06 41/2 44 66 · Fax: 06 41/2 53 75
e-mail: [Geschaeftsstelle @dvg.net](mailto:Geschaeftsstelle@dvg.net) · Homepage: <http://www.dvg.net>**