

**DOWNREGULATION DER HYPOPHYSÄREN GnRH-
REZEPTOREN MIT EINEM NEUEN GnRH-IMPLANTAT
BEIM RÜDEN**

CAROLIN LUDWIG

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2008

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

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

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

www.doktorverlag.de

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

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

Downregulation der hypophysären GnRH- Rezeptoren mit einem neuen GnRH-Implantat beim Rüden

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

eingereicht von

Carolin Ludwig

Tierärztin aus Düsseldorf

Gießen 2008

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann
Prof. Dr. S. Kölle

Tag der Disputation: 04.02.2008

Meinen Eltern

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG.....</u>	1
<u>2</u>	<u>LITERATURÜBERSICHT</u>	3
2.1	Endokrine Steuerung der Hodenfunktion	3
2.1.1	Luteinisierendes Hormon (LH)	5
2.1.2	Testosteron	6
2.1.3	Estradiol-17 β	8
2.2	Spermatogenese.....	9
2.3	Indikationen und Möglichkeiten zur Ausschaltung der Hodenfunktion beim Rüden ...	12
2.3.1	Indikationen für die Kastration	12
2.3.2	Chirurgische Kastration	19
2.3.3	Unblutige Kastration	19
2.3.3.1	Irreversible Ausschaltung der Hodenfunktion	19
2.3.3.2	Reversible Ausschaltung der Hodenfunktion	20
<u>3</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	31
3.1	Versuchstiere und Haltung	31
3.2	Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung	32
3.2.1	Versuchsaufbau	32
3.2.2	Versuchsdurchführung	35
3.2.2.1	Verwendete GnRH-Implantate	35
3.2.2.2	Gewinnung der Plasmaproben zur Bestimmung von Testosteron und Estadiol-17 β ..	36
3.2.2.3	Gewinnung der Plasmaproben zur Bestimmung von LH	36
3.2.2.4	Ermittlung der Hoden- und Prostatagröße	37
3.2.2.5	Spermagewinnung und Spermauntersuchung	37
3.3	Hormonanalytik	39
3.3.1	Bestimmung von Testosteron und Estradiol-17 β	39
3.3.2	Bestimmung von LH	43
3.3.2.1	Testprinzip	43
3.3.2.2	Beschichtung der Mikrotiterplatten	43
3.3.2.3	Testdurchführung	43
3.3.2.4	Testauswertung und Zuverlässigkeit	44
3.3.2.5	Testspezifische Substanzen	45
3.3.2.6	Lösungen und Puffer	47
3.4	Statistische Auswertung	49
<u>4</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	53
4.1	Allgemeiner Gesundheitszustand der Tiere	53
4.2	Einsetzen und Entnahme der Implantate	53
4.3	Ergebnisse der Testosteronbestimmungen	54
4.4	Ergebnisse der Estradiol-17β-Bestimmungen	65
4.5	Ergebnisse der LH-Bestimmungen	69
4.6	Erfassung der Hodengröße	75
4.7	Erfassung der Prostatagröße	80
4.8	Ausprägung der zur Samenabgabe führenden Reflexkette	85

4.9	Spermaqualität	87
4.10	Beobachtungen zum allgemeinen Verhalten der Rüden	93
4.11	Wirkungsdauer	93
<u>5</u>	<u>DISKUSSION</u>	94
5.1	Fragestellung	94
5.2	Versuchsaufbau und erfasste Parameter	98
5.3	Methodik	100
5.4	Ergebnisse	102
5.4.1	Der Downregulierung zugrunde liegende Effekte	102
5.4.2	Sonstige Effekte	106
<u>6</u>	<u>Zusammenfassung</u>	107
<u>7</u>	<u>Summary</u>	109
<u>8</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	111

1 Einleitung

Die Kastration des Rüden ist ein in der Kleintierpraxis häufig praktizierter Eingriff. Neben der Unterbindung der Fortpflanzung, ergeben sich eine ganze Reihe an Indikationen. So ist der mit der Kastration verbundene Testosteronentzug ein wichtiger Teil der Therapie von Erkrankungen des männlichen Geschlechtsapparates, wie der benignen Prostatahyperplasie (BPH), intraprostatischer Zysten, der chronischen Prostatitis oder chronischer Orchitiden, aber auch von Testosteron-abhängigen Erkrankungen, wie perianalen Neoplasien (SINOWATZb;c; WILSON u. HAYES 1979).

Weiterhin stellt die Kastration eine unterstützende Maßnahme bei der Therapie von Verhaltensproblemen dar (HOLZMANN 2001; MAARSCHALKERWEERD et al. 1997).

Während sich bei Hodentumoren keine Alternative zur chirurgischen Entfernung der Hoden ergibt, besteht nach § 6 des Tierschutzgesetzes die Verpflichtung, die Notwendigkeit einer operativen Entfernung der Gonaden abzuwägen, mögliche Risiken (z.B. Narkoserisiko) und Nebenwirkungen, wie beispielsweise Verhaltensänderungen, Gewichtszunahme, Fellveränderungen oder Inkontinenz (ANDERSSON u. LINDE-FORSBERG 2001; POWER et al. 1998) in Betracht zu ziehen, und den Tierbesitzer darauf hinzuweisen.

Für Züchter ergibt sich das Problem, dass eine chirurgische Kastration gleichbedeutend mit einem irreversiblen Zuchtausschluss des Tieres ist.

Aus diesen Gegebenheiten stellt sich seit langem die Frage nach einer Alternative zur chirurgischen Kastration.

Eine Solche stellte bisher vor allem die Anwendung von Gestagenen dar, deren Wirkung und auch Nebenwirkungen jedoch nicht unumstritten sind (ENGLAND 1997; KOOISTRA u. OKKENS 2001).

Andere Ansätze zur Unterbindung der Fortpflanzung sind die Immunisierung gegen GnRH (LADD et al. 1994; JUNG et al. 2005), die Anwendung von GnRH-Antagonisten (CORRADA et al. 2006) oder kompetitiver Androgenrezeptorblocker (TSUTSUI et al. 2000).

Im Gegensatz zu diesen Ansätzen kommt der Anwendung des 5 α -Reduktasehemmers „Finasteride“ bei der BPH des Rüden bereits eine gewisse Praxisrelevanz zu (IGUER-OUDA u. VERSTEGEN 1997; SIRINARUMITR et al. 2001), ebenso wie der Anwendung von GnRH-Analoga als Implantate und in einer Dosis, die zur Downregulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren führt (PARAMO et al. 1993, VICKERY et al.1989). Gute Ergebnisse

konnten mit dem Humanarzneimittel Profact depot® (Aventis) erzielt werden, einem Implantat, mit welchem sich eine Downregulation und somit hormonelle Kastration über einen Zeitraum von $233 \pm 28,2$ bzw. $256,9 \pm 66,8$ Tage erreichen ließ (RIESENBECK et al. 2002).

Auch wenn § 56 a AMG die Möglichkeit bietet, im Einzelfall für die Humanmedizin zugelassene Arzneimittel für nicht-lebensmittelliefernde Tiere umzuwidmen, besteht doch die Nachfrage nach einem für die Veterinärmedizin zugelassenen Präparat.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die klinische Prüfung eines neu entwickelten GnRH-Implantates („Gonazon®“, Wirkstoff Azagly-Nafarelin) der Firma Intervet an einem Kollektiv von acht geschlechtsgesunden Beagle-Rüden.

Der Schwerpunkt lag dabei auf der Ermittlung der Testosteron-, Estradiol-17 β - und LH-Konzentration im Plasma während und nach der Behandlung mit „Gonazon®“ und der Feststellung der mittleren Wirkungsdauer des Präparates. Außerdem wurden die Auswirkungen auf die Prostata- und Hodengröße sowie auf die Spermaqualität untersucht und die Reversibilität der Behandlung überprüft.

2 Literaturübersicht

2.1 Endokrine Steuerung der Hodenfunktion

Die Hodenfunktion unterliegt der übergeordneten Steuerung von Hypothalamus und Hypophyse.

Dabei wird vom Hypothalamus pulsatile Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) freigesetzt, ein Dekapeptid, das hauptsächlich im Nucleus infundibularis des Hypothalamus gebildet wird. Über das Hypothalamus-Hypophysen-Pfortadersystem wird es an die Adenohypophyse weitergeleitet, wo es eine ebenfalls pulsatile Freisetzung des luteinisierenden Hormons (LH) und des follikelstimulierenden Hormons (FSH) induziert. Diese beiden Gonadotropine erreichen über das Blut die Gonaden, wo LH die testikuläre Steroidproduktion der Leydig-Zellen anregt, während FSH in den Sertoli-Zellen die ersten Schritte der Spermatogenese stimuliert, die Bildung von Inhibin und androgen-bindender Proteine (DÖCKE 1994a; HOFFMANN 2003).

Die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden –Achse ist einer Autoregulation durch mehrere Feedback-Mechanismen unterworfen (DÖCKE 1994b). Ab einem gewissen Schwellenwert wirken sowohl die Gonadotropine als auch die gonadalen Sexualsteroiden hemmend auf die GnRH-Ausschüttung des Hypothalamus („Negativer Feedback“) und damit auf die LH- und FSH-Freisetzung, so dass sich der Regelkreis der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse schließt. Anders als die Sexualsteroiden, hemmt Inhibin selektiv die FSH-Freisetzung. GnRH ist weiterhin in der Lage, sich in relativ starkem Maße selbst zu regulieren. So führt bereits ein geringer Anstieg der GnRH-Plasmakonzentration zu einer Erhöhung der Anzahl an GnRH-Rezeptoren auf den gonadotropen Zellen (up-regulation), während eine dauerhafte, nicht pulsatile GnRH-Einwirkung, zur Desensibilisierung der Hypophyse und Reduzierung der Rezeptoren führt (down-regulation) (DÖCKE 1994a).

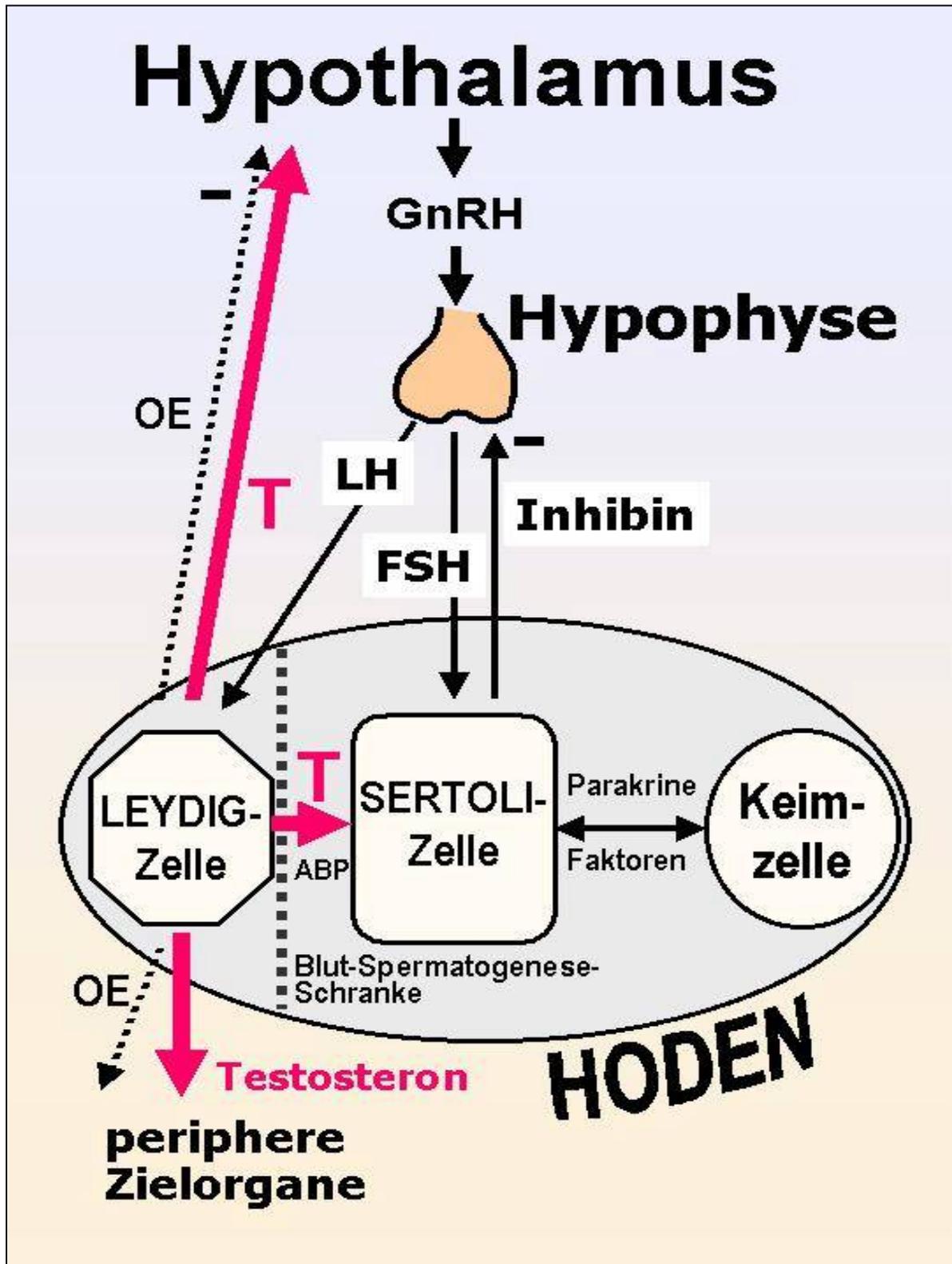


Abb. 1: Endokrine Steuerung der Hodenfunktion
OE: Östrogene

2.1.2 Luteinisierendes Hormon (LH)

Bei LH handelt es sich um ein Glycoprotein, das unter GnRH-Einfluss in den basophilen Zellen der Adenohypophyse gebildet und von dort pulsatil freigesetzt wird. Die Art der Freisetzung von LH lässt vermuten, dass es in den gonadotropen Zellen in zwei Formen vorliegt, nämlich einem „Speicherpool“ und einem „schnell freisetzbarem Pool“. So wurde z.B. beim Bullen nach Gabe hoher GnRH-Dosen eine supraphysiologische LH-Freisetzung beobachtet, wonach eine Refraktärzeit von 48 Stunden eintrat. Bei niedrigeren GnRH-Dosen und einer entsprechenden niedrigeren LH-Freisetzung, trat eine solche Refraktärzeit nicht auf, woraus geschlossen werden kann, dass weiterhin LH aus dem schnell freisetzbaren Pool zur Verfügung stand (SCHAMS et al. 1974; DÖCKE 1994a).

Unter physiologischen Bedingungen reflektiert die pulsatile bzw. episodische Freisetzung von LH somit weitgehend die Frequenz der GnRH-Pulse (DePALATIS et al. 1978; BRINCKMANN 1989; SCHALLENBERGER 1990; GÜNZEL-APEL et al. 1990).

Die beim Beagle-Rüden gemessenen Abstände zwischen den LH-Pulsen lagen bei 15-30 Minuten (GÜNZEL-APEL et al. 1994). Das Sekretionsmuster wies dabei individuelle und altersabhängige Schwankungen auf, zeigte jedoch keine Abhängigkeit von Jahres- und Tageszeit (BRINCKMANN 1989). Weniger deutlich waren die Ergebnisse von KOCH (2004), wo bei einigen Rüden sogar keine Anzeichen für eine Pulsatilität festgestellt werden konnten.

Für die LH-Freisetzung bei der Hündin konnten SCHNEIDER (1992) und HOFFMANN und SCHNEIDER (1993) ein pulsatile Sekretionsmuster zeigen, wobei die Höhe der Sekretion im Verlauf des Zyklus variierte.

Die in der Literatur gemachten Angaben über die Höhe der LH-Konzentrationen im Plasma gesunder und intakter Rüden weisen erhebliche Unterschiede auf. Während DePALATIS et al. (1978) Werte zwischen 0,2 und 12 ng/ml ermittelten, lagen die Konzentrationen bei BRINCKMANN (1989) und GÜNZEL-APEL (1990) zwischen 1,2 und 96 ng/ml, bei OLSON et al. (1992) bei $6,0 \pm 5,2$ ng/ml und bei KOCH (2004) zwischen 1,4 und 14,1 ng/ml. BRINCKMANN (1989) berichtet über eine deutliche Altersabhängigkeit der LH-Freisetzung: so ergaben sich bei Rüden zwischen 7 und 8 Monaten höhere Werte (4,5 – 96 ng/ml) als bei Rüden in einem Alter von 3 bis 4 Jahren (1,2 – 79,4 ng/ml) und 8 Jahren (2,9 – 12,1 ng/ml). Auch KAWAKAMI et al. (1995) berichten über eine Altersabhängigkeit der LH-Konzentrationen, wobei sich jedoch – anders als bei BRINCKMANN (1989) – ein Anstieg

mit zunehmendem Alter ergab. Abweichend davon konnten PETERS et al. (2000) keinen Einfluss des Alters feststellen.

Diese Datenlage ist also widersprüchlich, wobei Methoden-bedingte Effekte sicherlich nicht ausgeschlossen werden können.

Die in den Leydig-Zellen durch LH stimulierte Testosteronfreisetzung zeigt ebenfalls ein pulsatile Sekretionsmuster. Jedem LH-Gipfel kann ein versetzter Testosteron-Peak zugeordnet werden, wobei beim Rüden der Abstand zwischen 15 und 105 Minuten liegt (GÜNZEL-APEL et al. 1990; 1994).

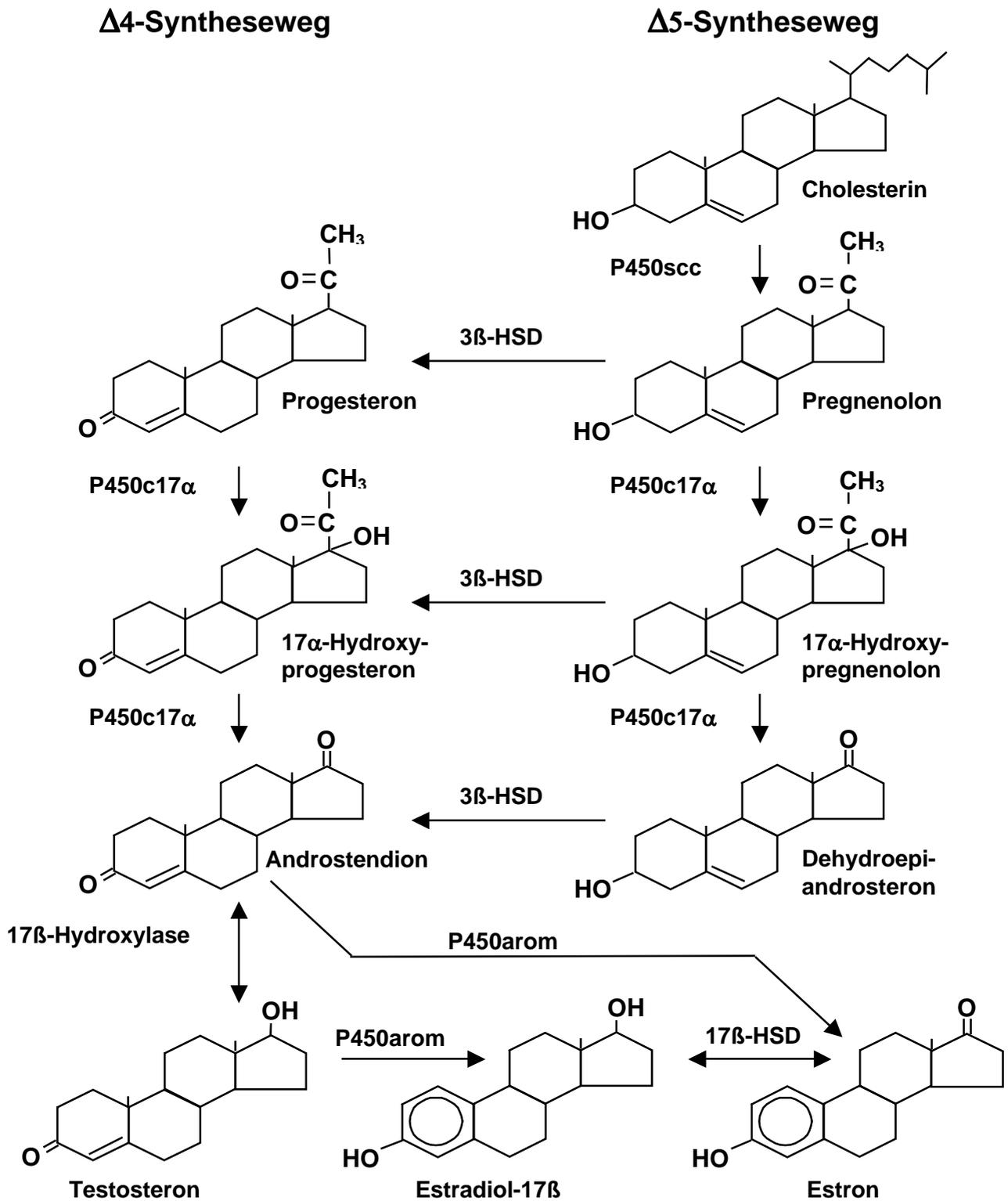
Die Menge des durch LH freigesetzten Testosterons ist abhängig von der Tierart und variiert mit dem Alter (BARTKE et al. 1978). Für den Rüden stellte BRINCKMANN (1989) fest, dass keine Korrelation zwischen der Höhe eines LH-Gipfels und der Quantität der daraus resultierenden Testosteronfreisetzung besteht, da auch ein geringer LH-Anstieg einen deutlichen Testosteronanstieg bewirken kann und ein hoher LH-Peak nicht zwangsläufig einen hohen Testosteronspiegel nach sich zieht.

2.1.3 Testosteron

Die Bildung von Androgenen findet in den Leydig-Zellen der Hoden (BAMBERG 1994a), aber auch zu einem geringen Anteil in der Nebennierenrinde statt (HOLZBAUER u. NEWPORT 1969; THUN u. SCHWARZ-PORSCHKE 1994).

Ausgangssubstanz der Testosteron-Synthese ist Cholesterin. Beim Rüden erfolgt die Synthese primär auf dem Δ^4 -Syntheseweg über die Bildung von Pregnenolon (P5), Progesteron (P4) und Androstendion, aus dem dann das Testosteron entsteht (s. Abb.2).

Speziell für die Prostata beim Rüden, aber auch die akzessorischen Geschlechtsdrüsen beim Eber, konnte gezeigt werden, dass die eigentliche rezeptoraktive Form nicht das Testosteron sondern 5α -Dihydrotestosteron ist, das lokal aufgrund der dort exprimierten 5α -Reduktase-Aktivität entsteht (GLOYNA et al. 1970; RAESIDE et al. 1999). Die Bindung von 5α -Dihydrotestosteron an den Androgenrezeptor ist 2-5 mal stärker als die von Testosteron (BRUCHOVKY u. WILSON 1968; WILBERT et al. 1983; GRINO et al. 1990).



P450scc = Cytochrom P450 side-chain-cleavage
P450c17 α = Cytochrom P450c17 α (17 α -Hydroxylase-C17,20-Lyase)
3 β -HSD = 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase- $\Delta 5/4$ -Isomerase
17 β -HSD = 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase
P450arom = Aromatase

Abb. 2: Schema der Steroidbiosynthese in den Gonaden

Die bei präpubertären Rüden (BRINCKMANN 1989; GÜNZEL-APEL et al. 1990) gemessenen Werte liegen in einem Bereich von 0,2 bis 5,4 ng/ml, bei adulten Rüden wurden - je nach Autor - folgende Konzentrationsbereiche angegeben: 0,1 bis 16,0 ng/ml (BRINCKMANN 1989; GÜNZEL-APEL et al. 1990); 1,29 bis 6,08 ng/ml (RIESENBECK et al. 1999); 1,5 bis 6,5 ng/ml (KOCH 2004).

Über abnehmende Testosteronkonzentrationen auf Werte um 0,96 bis 9,84 ng/ml bei Rüden älter als fünf Jahren berichten BRINCKMANN (1989) und GÜNZEL-APEL et al. (1990).

Obwohl Testosteron im Fett- und auch im Nierengewebe angereichert wird (HOFFMANN u. RATTENBERGER 1976), kommt es nach einer Kastration zu einem raschen Abfall, die Halbwertszeit liegt beim Menschen bei unter 45 Minuten (BIRD et al. 1978; LIN et al. 1994).

Die endokrine Wirkung der gonadalen Androgene besteht hauptsächlich in der Entwicklung und Funktionssteuerung der Geschlechtsorgane sowie der Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale. Androgene sind auch für den Descensus Testis essentiell sowie für die Spermatogenese. Über zentralnervöse Wirkungsmechanismen sind die Androgene ebenfalls an der Ausprägung des männlichen Sexual- und Aggressionsverhaltens beteiligt. Hierbei spielen jedoch auch androgenunabhängige, zentralnervale Effekte eine wesentliche Rolle. So erlischt einerseits die sexuelle Aktivität nicht sofort nach einer Kastration, andererseits lässt sich bei kastrierten Tieren auch durch hohe Androgendosen nur selten Paarungsaktivität auslösen (BAMBERG 1994b).

Neben diesen geschlechtsspezifischen Wirkungen haben Androgene einen Einfluss auf diverse Stoffwechselabläufe und wirken anabol auf beispielsweise Herz und Leber, hemmen den Fettstoffwechsel und stimulieren das Knochenwachstum (BAMBERG 1994b).

2.1.3 Estradiol-17 β

Die Beobachtung, dass Östrogene verantwortlich sind für die Resorption der Tubulusflüssigkeit im Nebenhoden, hat erstmals deren Bedeutung für die männliche Fortpflanzung eindeutig belegt (HESS et al. 1997/2000). Auch eine Bedeutung für die Spermatogenese wird unterstellt, wobei jedoch speziesspezifische Gegebenheiten vorzuliegen scheinen (Übersicht bei MUTEMBEI 2006). Weiterhin üben Östrogene eine wichtige Kontrolle bei der LH- und FSH-Sekretion aus (WINTER et al. 1983).

Ort der Östrogensynthese im Hoden sind insbesondere die Leydig-Zellen. Unstrittiger Beweis dafür ist, dass in diesen Zellen die Expression der Aromatase, des für die Östrogensynthese

verantwortlichen Schlüsselenzyms, bei Hengst, Schafbock und Eber nachgewiesen werden konnte (EISENHAUER et al. 1994, SCHMALZ u. BILINSKA 1998; FRACZEK et al. 2001; MUTEMBEI et al. 2005). Speziell beim Hund sind nach tumoröser Entartung auch die Sertoli-Zellen in der Lage, gewaltige, myelotoxische Östrogenmengen (insbesondere Estradiol-17 β) zu produzieren (COMHAIRE et al. 1974; SHERDING et al. 1981; BRODEY u. MARTIN 1985). Ansonsten scheint die Fähigkeit der Sertoli-Zellen Östrogene zu produzieren auf die pränatale oder unmittelbar postnatale Lebensphase beschränkt zu sein (ROMMERTS et al. 1982).

Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass beim männlichen Tier Östrogene auch durch Synthese in der Nebennierenrinde sowie durch Aromatisierung im Fettgewebe gebildet werden (THUN u. SCHWARTZ-PORSCHKE 1994).

Die Östradiolkonzentrationen im Plasma beim geschlechtsgesunden Rüden sind in der Literatur unterschiedlich angegeben und liegen zwischen 9,5 – 24 pg/ml (COMHAIRE et al. 1974), 2 – 50 pg/ml (SHERDING et al. 1981), 6,5 – 21,9 pg/ml (RIESENBECK et al. 1999) und 16 – 28 pg/ml (PALLA 1994). Im Gegensatz zu der pulsatilen Freisetzung von Testosteron ließ sich für Östradiol kein entsprechendes Sekretionsmuster beobachten (PALLA 1994).

2.2 Spermatogenese

Mit der Geschlechtsreife beginnen in den Samenkanälchen kontinuierlich fortlaufende Samenbildungsprozesse, die sich in drei Phasen, die Spermatogoniogenese, die Spermatozytogenese und die Spermiohistogenese unterteilen lassen.

Zunächst bilden die der Basalmembran anliegenden Stammspermatogonien durch Mitosen weitere Spermatogonien. Diese werden nach ihrer Zellgröße, Verteilung von Eu- und Heterochromatin sowie der Anzahl ihrer Nukleoli in A-, Intermediär- und B-Spermatogonien unterteilt, wobei die Intermediär- und B-Spermatogonien weiter entwickelte Zelltypen darstellen. Durch mitotische Teilung der B-Spermatogonien entstehen die primären Spermatozyten aus denen nach meiotischer Teilung zunächst die sekundären Spermatozyten und dann - nach einer zweiten meiotischen Reifeteilung - die runden Spermatiden entstehen. Während der Spermiohistogenese reifen die Spermatiden letztendlich in vier Phasen zum Spermium, wobei es zur Ausgestaltung der speziesspezifischen Kopf- und Schwanzform kommt. Der größte Teil des Zytoplasmas und der darin enthaltenen Zellorganellen werden

dabei abgeschnürt und von den Sertoli-Zellen phagozytiert. Es ist ein ausdifferenziertes, aber noch nicht befruchtungsfähiges Spermium entstanden (SINOWATZ 2001a; HOFFMANN 2003).

Die Vorgänge von Aufnahme der Teilung durch die A-Spermatogonie bis zur Entwicklung der sekundären Spermatozyten werden als Keimepithelzyklus bezeichnet.

Dessen Dauer ist bei den Haussäugetern unterschiedlich lang und beträgt beim Hund 13,6 Tage, der Gesamtvorgang der Spermatogenese ist nach ca. 61 Tagen abgeschlossen; es wird jedoch auch über eine Dauer von 8 bis 9 Wochen berichtet (FOOTE et al. 1972; IBACH et al. 1976; JOHNSON 1995).

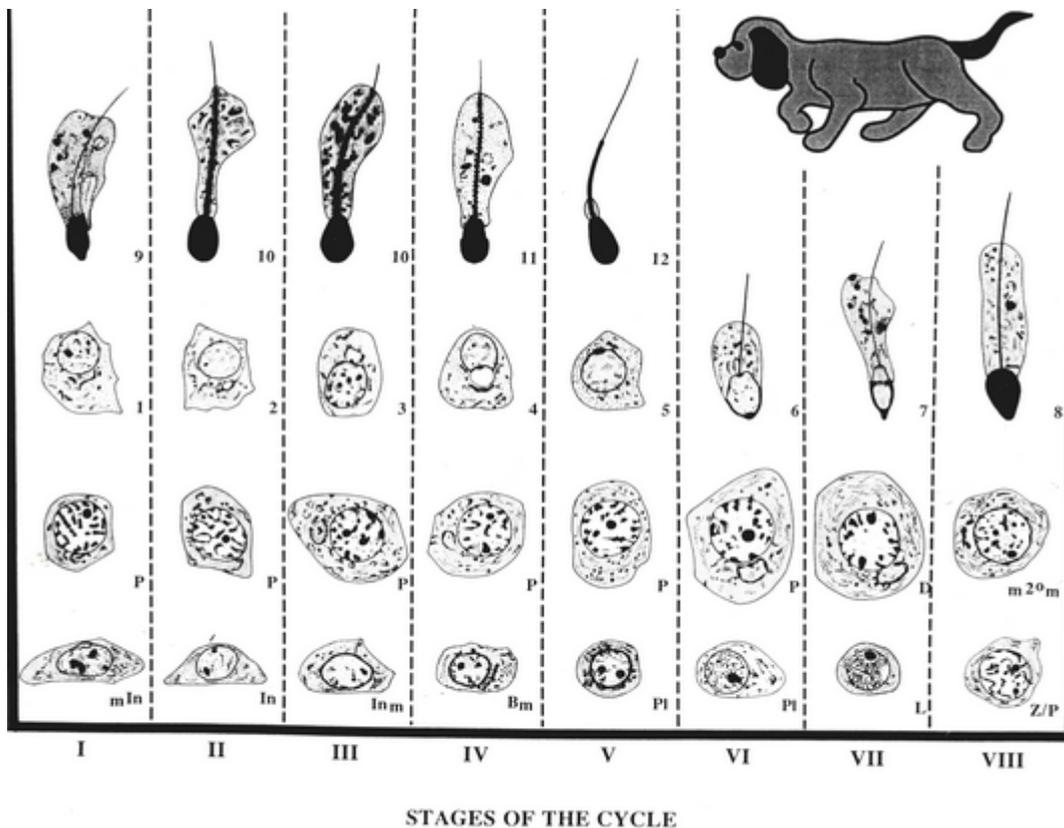


Abb. 3 Keimepithelzyklus beim Rüden (Russell et al. 1990)

Ihre volle Befruchtungsfähigkeit erhalten die Spermien erst während der epididymalen Reifung, wo es zum Ablösen des Zytoplasmatrofens, zu Veränderungen des Akrosoms, der Plasmamembran, des Stoffwechsel sowie zu einer gerichteten Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien kommt (SINOWATZ 2001a).

Die Spermatogenese ist in hohem Maße von den Sertoli-Zellen abhängig. Diese bilden die eigentliche Blut-Hoden Schranke. Sie üben eine Stütz- und Ernährungsfunktion aus, bauen Kontaktstrukturen zu den Keimzellen auf und phagozytieren den bei der Spermiohistogenese abgeschnürten Restkörper der Spermatiden; weiterhin werden für die Entwicklung der Keimzellen wichtige hormonale Stimuli übertragen (SINOWATZ 2001a). Versuche an transgenen Mäusen mit fehlendem Androgenrezeptor in den Sertoli-Zellen zeigten, dass dieser Rezeptor für die Aufrechterhaltung der kompletten Spermatogenese essentiell ist (DE GENDT et al. 2003; CHANG et al. 2003; TSAI et al. 2006).

Die Gonadotropine stellen den wichtigsten endokrinen Regulator der Spermatogenese dar. LH stimuliert in den Leydig-Zellen die Bildung von Testosteron, welches vor allem die meiotische Reifeteilung der primären Spermatozyten sowie die Differenzierung der Spermatiden beeinflusst. Wichtig hierbei ist die Bindung von Testosteron an das von den Sertoli-Zellen unter FSH-Einwirkung gebildete androgenbindende Protein (ABP). Durch Bindung an ABP kommt es zu einer Aufkonzentration von Testosteron, es wird in dieser Form in die Samenkanälchen und den Nebenhoden transportiert und zunächst nicht weiter verstoffwechselt. (DÖCKE 1994a, HOFFMANN 2003).

FSH ist für die Produktion unterschiedlicher, lokal oder zentral wirksamer Peptide, z.B. von Inhibin, verantwortlich. Es hat zudem über die Sertoli-Zellen fördernden Einfluss auf die frühen Stadien der Spermatogenese. So konnten VIGIER et al. (2004) zeigen, dass sich durch Zugabe von FSH und/oder Testosteron zu Keimzellkulturen - im Vergleich zu Zellkulturen ohne Hormonzugabe - die Apoptoserate minderte, eine größere Anzahl runder Spermatiden zu finden war und die Expression keimzellspezifischer Gene gesteigert wurde. Auch PAREEK et al. (2007) konnten einen hemmenden Einfluss von FSH und Testosteron auf die Apoptose der Keimzellen nachweisen.

Bei der hypogonadalen Maus führte die Gabe von Testosteron oder Dihydrotestosteron via Implantat zu einer quantitativ normalen Spermatogenese und fertilen Spermien, obwohl der intratesikuläre Androgenlevel nur gering und FSH im peripheren Blut nicht nachweisbar war (SINGH et al. 1995).

Zur weiteren Bedeutung von FSH für die Spermatogenese liegen unterschiedliche Beobachtungen vor. Transgene Mäuse mit fehlerhaften Rezeptorgenen für FSH sind fertil, weisen jedoch kleinere Hoden und eine geringere Spermienproduktion auf (DIERICH et al. 1998).

SLUKA et al. (2006) zeigten, dass die Anwesenheit von FSH, nicht jedoch die von Testosteron, essenziell für den physiologischen Aufbau der Sertolizell-Verbindungen untereinander ist.

2.3 Indikationen und Möglichkeiten zur Ausschaltung der Hodenfunktion beim Rüden

Die Kastration des Rüden stellt in der Kleintierpraxis eine alltägliche Aufgabe dar und gehört mit zu den am häufigsten durchgeführten chirurgischen Eingriffen (FISCHER 2006). Die Hauptgründe für die Kastration sind neben der Unterbindung der Fortpflanzung die Therapie androgen-abhängiger Erkrankungen, von Hodenerkrankungen und -tumoren sowie Verhaltensstörungen. In der Regel werden Rüden erst nach Abschluss der Pubertät kastriert, die Kastration im präpubertären Alter wird jedoch diskutiert (GÜNZEL-APEL 1998; HOWE et al. 2001; ARNOLD et al. 2006).

Nach § 6 des Tierschutzgesetzes ist der Tierarzt verpflichtet, vor jeder Operation deren Notwendigkeit abzuwägen, die Kastration des Rüden muss also begründet sein.

2.3.1 Indikationen für die Kastration

Ausschaltung der Sexualfunktion

Die Unterbindung der Fortpflanzung spielt besonders bei Tierbesitzern, die sowohl Hündinnen als auch Rüden halten, eine große Rolle. Zudem wünschen sich viele Halter einen möglichst unproblematischen Rüden, der sich weder für läufige Hündinnen in der Umgebung interessiert, noch streunt oder ungewollt deckt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Eindämmung der Überpopulation von Hunden, so dass die Kastration von Tierheimtieren in Deutschland üblich ist. Während nach dem Verband für das Deutsche Hundewesen (VDH) in Deutschland nur ca. 5 Millionen Hunde unter in der Regel kontrollierten Bedingungen leben, haben andere Länder, insbesondere in Osteuropa und dem Mittelmeerraum, aber auch die USA, mit einer starken Population an herrenlosen Hunden zu kämpfen, die sich lediglich durch die Unterbindung der Fortpflanzung eingrenzen lässt. Nur so lässt sich die Zahl von schätzungsweise 8 bis 10 Millionen Hunden und Katzen, die in den USA in Tierheimen aufgenommen und zur Hälfte euthanasiert werden, reduzieren (KUTZLER u. WOOD 2006).

Erkrankungen der Prostata

Zu den Erkrankungen der Prostata gehören beim Hund insbesondere die benigne Prostat hyperplasie (BPH), Prostat azysten, die Prostatitis, Prostat aabszesse und das Prostat akarzinom (JONSTON et al. 2000, HOFFMANN et al. 2007).

Die BPH tritt gehäuft bei unkastrierten Rüden über fünf Jahren auf (SINOWATZ 2001b), JOHNSTON et al. (2000) berichten, dass über 80% der männlichen Hunde ab einem gewissen Alter eine BPH aufweisen. Hinsichtlich der Pathogenese der BPH gilt, dass es sich u.a. um einen androgenabhängigen Prozess handelt, bei dem die Wirkung von Dihydrotestosteron (DHT), das durch die Einwirkung von 5 α -Reduktase in der Prostata aus Testosteron entsteht, im Vordergrund steht (JOHNSTON et al. 2000; HOFFMANN et al. 2007).

Bei den betroffenen Hunden kann das Prostatavolumen um den Faktor zwei bis sechs erhöht sein (LAROQUE et al. 1994,1995; KAMOLPATANA 1998), bei Beaglen mit einem Körpergewicht zwischen 7 und 13 kg, die an BPH litten, ermittelten IGUER-OUADA und VERSTEGEN (1997) mittels Ultraschall eine Prostatagröße zwischen 5 und 24 cm³.

Oft verläuft die BPH zunächst symptomlos, das Allgemeinbefinden ist ungestört. Bei längerem Bestehen kann es zu Defäkationsbeschwerden und auch Miktionsproblemen kommen (HOFFMANN et al. 2007). Da rektal oft nur ein Teil der Prostata palpierbar ist, ist die sonographische Untersuchung die sicherste Diagnosemöglichkeit.

Gängige therapeutische Maßnahme bei der BPH ist die chirurgische Kastration; BARSANTI und FINCO (1995) beschreiben, dass sich die Größe der Prostata innerhalb von drei Wochen nach der Kastration um 50%, nach neun Wochen sogar um 70% verringerte.

Prostat azysten lassen sich in intraprostat ische Zysten, die häufig in Zusammenhang mit einer BPH auftauchen, und paraprostat ische Zysten unterteilen. Während die paraprostat ischen Zysten vom Prostat agewebe deutlich abgrenzbar sind und je nach ihrer Größe ein chirurgisches Vorgehen erfordern, befinden sich die intraprostat ischen Zysten innerhalb des Drüsengewebes (s. Abb. 4) und rufen in der Regel keine klinischen Symptome hervor. Bei größeren Zysten (zum Teil bis ca. 10 cm Durchmesser) kann es jedoch zu Symptomen ähnlich einer chronischen Prostatitis oder BPH kommen (SINOWATZ 2001b; JONSTON et al. 2000), als klinisches Leitsymptom zeigt sich „Träufeln“ von blutigem Sekret aus dem Penis, unabhängig vom Urinabsatz (HOFFMANN et al. 2007). Prostat azysten werden häufig ab einem Alter von 8 Jahren diagnostiziert (STOWATER u. LAMB 1989).



Abb. 4: Sonografische Darstellung einer intraprostatistischen Zyste (Pfeil) beim Rüden

Die Kastration stellt die einfachste Therapieform dar, da es dadurch zur Rückbildung kleinerer intraprostatistischer Zysten kommt. Unter Umständen ist zusätzlich eine antibiotische Therapie oder bei größeren Zysten eine Punktion bzw. ein chirurgisches Vorgehen notwendig (SINOWATZ 2001b; HOFFMANN et al. 2007).

Entzündungen der Prostata lassen sich in die akute und die chronische Prostatitis einteilen. Die akute Entzündung wird durch aufsteigende bakterielle Infektionen verursacht, wobei *Escherichia coli* die häufigste Ursache darstellt (JOHNSTON et al. 2000). Die betroffenen Tiere zeigen zum Teil ein hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden, starke Schmerzen beim Kotabsatz, Harndrang, Tröpfeln eines blutig-eitrigem Sekrets aus dem Penis und teilweise Fieberschübe und Erbrechen. Palpatorisch zeigt sich die Prostata vergrößert und schmerzhaft, im Ultraschall hingegen ist sie meist unauffällig (SINOWATZ 2001b; HOFFMANN et al. 2007).

Die chronische Prostatitis geht aus der akuten Form oder auch aus chronischen Harnwegsinfektionen hervor und zeigt sich häufig in Zusammenhang mit Prostatahyperplasie, Zysten und auch Neoplasien (SINOWATZ 2001b). Im Gegensatz zur akuten Prostatitis gibt es jedoch oft keine klinischen Symptome, zum Teil wird über eine herabgesetzte Samenqualität, Infertilität und verringerte Libido berichtet (JOHNSTON et al. 2000). Die Prostata ist bei einer chronischen Entzündung in der Regel nicht schmerzhaft, im Ultraschall

zeigt sich ein inhomogenes Bild, unter Umständen sind auch Prostataabszesse sichtbar (SINOWATZ 2001b).

Zur Behandlung der Prostatitis ist in beiden Fällen eine antibiotische Therapie angezeigt. Trimethoprim-Sulfonamid-Kombinationen und Enrofloxacin gelten als die Mittel der Wahl, wobei eventuell eine Medikation über 3-5 Wochen notwendig ist (YIN u. NOLTE 2001). Bei Prostataabszessen ist zusätzlich ein chirurgischer Eingriff mit Drainage oder Punktion notwendig, da die Antibiose alleine hier nicht zur Heilung führt (BOLAND et al. 2003). Bei Rezidiven oder dem gemeinsamen Auftreten der Prostatitis mit einer Hyperplasie oder Abszessen sollte zur Kastration des Rüden geraten werden.

Neoplastische Veränderungen der Prostata machen nur 0,2 bis 0,6 % aller Tumoren beim Hund aus (BELL et al. 1991). Meist handelt es sich allerdings um maligne Prozesse, wie Adeno- oder Übergangsepithelkarzinome, die sowohl beim intakten als auch kastrierten Hund vorkommen (HOFFMANN et al. 2007). Das mittlere Alter der Tiere liegt bei 10 Jahren (CORNELL et al. 2000). Zum Teil wird auch über ein höheres Risiko bei kastrierten Rüden berichtet: nach BELL et al. (1991), erkrankten diese 2,38 mal so häufig an Prostatakarzinomen, nach SORENMO et al. (2003) sogar 3,9 mal häufiger als intakte Rüden. Im Gegensatz zum Menschen, lässt sich dieser Tumor bei Hunden nicht durch Ausschalten der Androgene (z.B. mittels Antiandrogenen, GnRH-Agonisten/Antagonisten oder Kastration) behandeln bzw. aufhalten. Die Prognose bei Vorhandensein eines Prostatakarzinoms ist generell als infaust zu bezeichnen, Therapiemöglichkeiten sind nicht vielversprechend und bei einem gestörten Allgemeinbefinden des Tieres ist die Euthanasie anzuraten (JONSTON et al. 2000).

Verhaltensstörungen

Verhaltensstörungen beim Rüden stellen heute einen der häufigsten Gründe für die Kastration dar (BERCHTOLD 1993). Meist handelt es sich dabei um „störendes Normalverhalten“, wie beispielsweise Urinmarkieren und um Verhaltensprobleme, die sich aus Erziehungsfehlern ergeben; auch die Hypersexualität wird dazu gerechnet (MAARSCHALKERWEERD et al. 1997). Der Begriff Hypersexualität kennzeichnet verschiedene übersteigerte sexuelle Verhaltensweisen, wie Überreaktionen auf läufige Hündinnen, Masturbieren, Aufreiten an anderen Hunden, Menschen oder Gegenständen, Streunen, aber auch Aggressivität (HOLZMANN 2001). Mitunter kommt es sogar zu relativ drastischen Verhaltensweisen, wie der völligen Futterverweigerung oder Erbrechen im Zusammenhang mit läufigen Hündinnen, Beißen in den Penis bei Erregung (zum Teil mit perforierenden Bissverletzungen), bei kleinen Hunderassen wird eine Verbindung zwischen sexueller Erregung und epileptiformen Anfällen diskutiert (ARBEITER 1994).

FEDDERSEN-PETERSEN (1991) nennt als eine Ursache für gestörtes Verhalten Fehlprägungen aufgrund mangelnder sozialer Kontakte mit Artgenossen und Menschen im Welpenalter sowie sexuelle Isolierung, aber auch die Fehlverständigung zwischen Mensch und Tier und unrealistische Erwartungen und Vorstellungen der Besitzer; aber auch die genetische Disposition wird diskutiert (BERCHTOLD 1993).

Von den so verursachten Verhaltensauffälligkeiten sind jene abzugrenzen, bei denen somatische Erkrankungen die Auslöser von Verhaltensstörungen sind (DÖRING u. ERHARD 2006).

Aggressives Verhalten zeigt eine breite Palette an unterschiedlichen Aggressionsarten. So muss man zwischen Aggression gegen menschliche Familienmitglieder, gegen fremde Menschen, gegen Hunde aus dem gleichen Haushalt, fremde Hunde und Aggression gegen Menschen, die in das Territorium eindringen, unterscheiden (NEILSON et al. 1997).

Neben mangelhafter bzw. fehlerhafter Erziehung (DÖRING u. ERHARD 2006), üben auch die Androgene einen wichtigen Einfluss auf das Sexual- und Aggressionsverhalten männlicher Tiere aus, so dass die Kastration einen therapeutischen Ansatz darstellen kann (JÖCHLE 1998).

In einer Untersuchung von NELSON et al. (1997) an 57 Rüden in einem Alter von über 2 Jahren zeigte sich, dass die Kastration vor allem einen positiven Einfluss auf Markieren, Besteigen und Streunen hatte. Bei 60% der Hunde zeigte sich eine Verbesserung der genannten Probleme um mindestens 50%, bei 25-40% der Hunde sogar um mindestens 90%. Aggressives Verhalten hingegen wurde weniger stark von der Kastration beeinflusst: hier gab

es eine Besserung von nur knapp einem Drittel, wobei sich die Aggressivität gegen fremde Menschen nicht signifikant änderte. Über ähnliche Ergebnisse berichtet MAARSCHALKERWEERD et al. (1997), der 122 Hundebesitzer befragte. Nach ANDERSSEN und LINDE-FORSBERG (2001) zeigten annähernd 80% der Hunde eine Besserung von Verhaltensauffälligkeiten nach Kastration; Aggression gegenüber anderen Rüden wurde hier von den Besitzern als häufigstes Problem genannt: im Hinblick auf diesen Parameter kam es bei 67% der Hunde zu einer Besserung.

In einer Studie an 209 Rüden mit Verhaltensprobleme zeigten 74% der Tiere nach Kastration eine Besserung, z.T. verschwanden die Probleme gänzlich (HEIDENBERGER u. UNSHELM 1990). Dies war besonders bei Hypersexualität der Fall, bei aggressiven Hunden zeigten 49 von 80 ein besseres Verhalten. Zudem wurde festgestellt, dass die Kastration bei männlichen Tieren einen größeren Einfluss auf das Verhalten als bei weiblichen Tieren hatte (HEIDENBERGER u. UNSHELM 1990) und dass das Alter des Tieres sowie die Dauer, seit der das Verhaltensproblem besteht, keinen Einfluss auf den Effekt der Kastration hatte (NEILSON et al. 1997).

Hinsichtlich der oben genannten Untersuchungen stellt die Kastration eine sinnvolle Behandlung bzw. unterstützende Therapie bei Verhaltensstörungen dar, ist jedoch nur in Zusammenhang mit weiteren Maßnahmen sinnvoll. Dazu gehört vor allem eine rechtzeitige und unter Umständen von Fachleuten unterstützte Erziehung, das Optimieren der Familiensituation und Haltungsbedingungen für den Hund, regelmäßige und sinnvolle Beschäftigung und Kontakt zu anderen Hunden. Da ein Aggressionsverhalten sehr komplex und von vielen Faktoren beeinflusst sein kann, ist hier die Prognose vorsichtig zu stellen (HOLZMANN 2001; HEIDENBERGER u. UNSHELM 1990).

Sonstige Indikationen

Weitere Indikationen für die Kastration des Rüden sind Hodentumore und Hodenerkrankungen wie die chronische Orchitis und Epididymitis (HOLZMANN 2001), aber auch perianale Neoplasien (WILSON u. HAYES 1979).

Hodentumore kommen beim Rüden häufiger als bei anderen Spezies vor (PETERS u. VAN SLUIJS 1996) und sind mit einem Anteil von 5 bis 15%, bezogen auf die Gesamtzahl der beim Rüden beobachteten Neoplasien, die zweithäufigste Tumorart männlicher Hunde (JOHNSTON et al. 1991). Vorwiegend sind ältere Hunde betroffen, die häufigsten Hodentumore sind Leydig-Zelltumore, Sertoli-Zelltumore und Seminome (PETERS u. VAN SLUIJS 1996), wobei Kryptorchismus ein prädisponierender Faktor für die Ausbildung von testikulären Neoplasien ist (HOFFMANN et al. 2007); so wird berichtet, dass dies das Risiko einer tumorösen Entartung um den Faktor 14-23 erhöht (PRANGE et al. 1987, DÖCKE 1994a).

Metastasen sind bei Hodentumoren selten, allerdings können Sertoli-Zelltumoren wegen ihrer östrogenbildenden Eigenschaft lebensbedrohlich sein, da Östrogene speziell beim Hund zu einer letalen Knochenmarksdepression (aplastische Anämie) führen (SHERDING et al. 1981; SINOWATZ 2001c).

Bei allen Tumorarten gilt die chirurgische Kastration als das Mittel der Wahl.

Neoplasien der perianalen Drüsen treten besonders beim männlichen Hund auf. Adenome sind dabei 4,5 mal so häufig zu beobachten wie Karzinome. Da diese Adenome hormonabhängig sind, zeigt eine Kastration Therapieerfolg, ohne dass es zu Rezidiven kommt, so dass der Tumor nicht chirurgisch entfernt werden muss (WILSON u. HAYES 1979).

Letztlich soll noch darauf hingewiesen werden, dass – wenn die Zuchtnutzung erhalten werden soll – eine vorübergehende Ausschaltung des Geschlechtstriebes auch bei Verletzungen des Corpus cavernosus penis indiziert ist, um das Blutungsrisiko zu verringern, wie eigene Erfahrungen gezeigt haben.

2.3.2 chirurgische (blutige) Kastration

Die chirurgische Kastration des Rüden ist in der Kleintierpraxis Routine.

Wie bei jedem operativen Eingriff, insbesondere wenn er unter Vollnarkose durchgeführt wird, muss jedoch auch bei der Standard-OP „Kastration“ mit Zwischenfällen und Nebenwirkungen gerechnet werden. Insbesondere bei älteren und/oder Kreislauf-labilen Tieren muss mit Narkosezwischenfällen und Komplikationen wie Exzitationen während der Narkoseeinleitung oder Aufwachphase, Erbrechen des Tieres, Laryngospasmen, Herz- und Kreislaufversagen, Unverträglichkeit des Narkosemittels oder einer Hypothermie gerechnet werden (ALEF u. OECHTERING 1999). Die Tierbesitzer sind auf diese sich aus dem operativen Eingriff ergebenden Risiken grundsätzlich hinzuweisen.

2.3.3 Unblutige Kastration

2.3.3.1 Irreversible Ausschaltung der Hodenfunktion

Im Vordergrund steht hier die chemische Kastration mittels Injektion unterschiedlicher Wirkstoffe, wie zum Beispiel von Zink-Gluconat (TEPSUMETHANON et al. 2005), in den Hoden, Nebenhoden oder Samenstrang . In den USA ist Neutersol® für diese Indikation zugelassen, jedoch zur Zeit nicht im Handel. Als Nebenwirkungen werden Schwellungen und Schmerzen über bis zu zwei Wochen (TALWAR u. NAZ 1981) und, laut Hersteller, auch Hautveränderungen, Erbrechen, Lethargie und Durchfall genannt.

Ein anderer Ansatz ist der Einsatz von hochenergetisch fokussierten Ultraschallwellen auf Hoden oder Nebenhoden, was zur thermischen Zerstörung des Gewebes und Verschluss der spermienableitenden Wege führt (FAHIM et al. 1977, ROBERTS et al. 2002, FRIED et al. 2002) oder auch die Kastration großer Hunde mittels Burdizzo-Zange (ORTEGA-PATCHECO et al. 2006).

2.3.3.2 Reversible Ausschaltung der Hodenfunktion

Gestagene

Eine Alternative zur nicht-chirurgischen Kastration stellte bisher vor allem die Behandlung mit Gestagenen dar.

Progesteron ist das im Vordergrund stehende Hormon der Corpora lutea, es wirkt einmal in Richtung periphere Zielorgane, z.B. Uterus, andermal aber auch negativ-rückkoppelnd in Richtung Hypothalamus/Hypophyse, d.h. die Freisetzung von GnRH aus dem Hypothalamus und damit die von LH und FSH aus dem Hypophysenvorderlappen wird gehemmt und infolge dessen auch die Ovarfunktion. Auch beim Rüden haben Gestagene eine entsprechende negativ rückkoppelnde Wirkung, die sich auch in einer Reduktion der Plasmakonzentration von Testosteron sowie der von Estradiol manifestiert (ENGLAND u. HARVEY 1998).

Diese Wirkung scheint jedoch nur partiell ausgeprägt zu sein; so zeigten WRIGHT et al. (1979), dass die Behandlung von gesunden Rüden mit Medroxyprogesteronacetat (4 mg/kg) als Depot-Präparat über sieben Wochen zwar zu einer Verringerung der peripheren Testosteronkonzentration führte, die Reduktion lag jedoch lediglich bei 58%, weder die Größe und Konsistenz der Hoden, noch die Libido und die Samenqualität des Tieres wurden dadurch beeinflusst. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch BAMBERG-THALÉN u. LINDE-FORSBERG (1992), die nach Gabe von Medroxyprogesteronacetat in verschiedenen Dosierungen zwar eine Reduktion der Prostatagröße und der Testosteronkonzentration im Serum beobachten konnten, die Hodengröße und die Samenqualität wurden hingegen nicht beeinflusst.

Andere Studien zeigten, dass nach oraler Gabe niedriger Dosen Megestrolacetat (2mg/kg) über sieben Tage keine Veränderungen in der Samenqualität auftraten, bei höheren Dosen (4mg/kg) kam es zu geringen Abweichungen der Spermaqualität. Nach der Behandlung mit Medroxyprogesteronacetat in einer Dosis von 20mg/kg kam es innerhalb von drei Tagen zu einem signifikanten Abfall von Spermienmotilität, Morphologie und Volumen (ENGLAND 1997). Aufgrund des schnellen Effektes wird auch eine direkte Wirkung von Gestagenen auf die epididymale Spermienreifung und deren Transport angenommen.

Darüber hinausgehend haben Gestagene in hohen Dosen auch einen sedativen Effekt; weiterhin wird über diverse Nebenwirkungen berichtet. Erwähnt werden - neben den üblichen kastrationsbedingten Wirkungen, wie gesteigerter Appetit, Gewichtszunahme, Fell- und Verhaltensänderungen (Lethargie) - eine Vergrößerung des Gesäuges mit dem Risiko des Entstehens von Mammatumoren, Farbveränderungen und/oder Alopezie an der

Injektionsstelle (ENGLAND u. HARVEY 1998). Bei einer Langzeittherapie mit hohen Dosen wird auch über das Auftreten eines iatrogenen Cushing-Syndroms oder von Diabetes mellitus berichtet (KOOISTRA u. OKKENS 2001; SELMAN et al. 1997).

Ein in Deutschland für den Rüden zugelassenes Präparat ist Delmadinoacetat (Tardastrex®, Pfizer), das jedoch zur Zeit nicht im Handel ist. Anwendungsgebiete sind laut Hersteller BPH, kleine Adenome der Perianaldrüsen, sexuelle Hyperaktivität und androgen-abhängige Angriffslust, wenn eine Kastration nicht erwünscht ist. Als Nebenwirkungen werden Appetitsteigerung, Polyurie und Polydipsie, ungewöhnlich ruhiges Verhalten, Haut- und Haarveränderungen an der Injektionsstelle, verminderter Geschlechtstrieb, Gesäugetumore und ein latenter Diabetes mellitus genannt, Gegenanzeigen sind schwere Leber- und Nierenschäden, Mamatumore, Diabetes mellitus oder eine Langzeittherapie mit Glukokortikoiden. Langzeitanwendungen sind zu vermeiden und Wiederholungsbehandlungen sollten frühestens nach vier Wochen stattfinden. Medroxyprogesteronacetat (Perlutex®, Bayer) ist in Deutschland für Hündinnen zur Läufigkeitsunterdrückung und –Unterbrechung zugelassen; über Erfahrungen mit der Anwendung von Perlutex® beim Rüden wurden in der Literatur keine Angaben gefunden.

Kompetitive Androgen-Rezeptorblocker (Antiandrogene)

Die antagonistische Wirkung dieser Stoffe ergibt sich daraus, dass diese kompetitiv zu Testosteron bzw. Dihydrotestosteron an den Androgenrezeptor binden, wodurch die Transkription partiell oder komplett gehemmt wird. Wie Abb. 5 zeigt, kann dabei zwischen steroidal (Cyproteronacetat, Osateronacetat) und nicht steroidal (Flutamid) Verbindungen unterschieden werden. Bei Cyproteronacetat (Androcur®, Schering) handelt es sich um eine seit langer Zeit in der Humanmedizin zugelassene Verbindung, die neben der kompetitiven Hemmung am Androgenrezeptor auch noch eine gestagene Partialwirkung aufweist und damit die Gonadotropinfreisetzung hemmt (NEUMANN 1983).

Indikationen zur Anwendung von Androcur® beim Menschen sind das fortgeschrittenen Prostatakarzinom, schwerer Akne, Hirsutismus, androgenetische Alopezie, Androgenisierungserscheinungen bei Frauen sowie der Triebdämpfung bei Männern. Beschriebene Nebenwirkungen von Androcur® sind laut Packungsbeilage unter anderem Veränderungen des Körpergewichts, Unruhe, Müdigkeit, eine Hemmung der Spermatogenese und Leberveränderungen, Gegenanzeigen sind Lebererkrankungen, Depressionen und Diabetes mellitus.

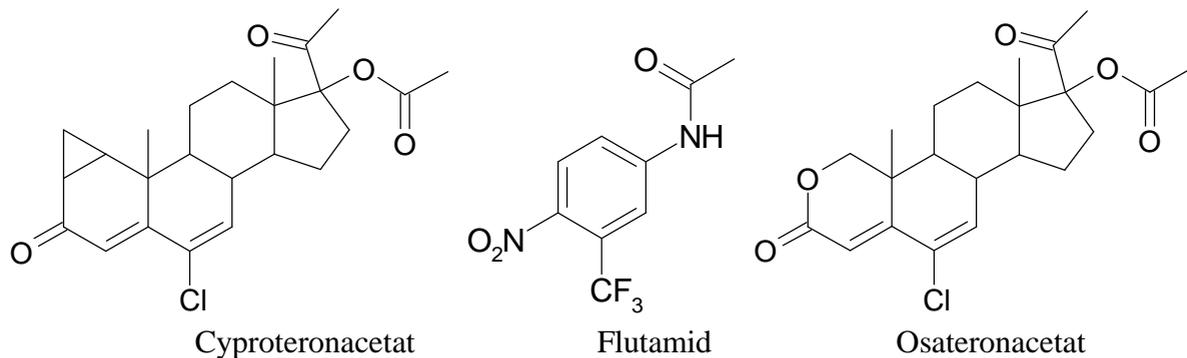


Abb. 5: Strukturformeln von drei Antiandrogenen

Auch in der Veterinärmedizin kam Cyproteronacetat beim Rüden vielfach zum Einsatz; Indikationen waren die BPH, Ausschaltung der Wirkung einer initial erhöhten Testosteronsekretion nach Verabreichung eines GnRH-Implantates zur Downregulation (siehe Kap. 2.3.3.2 Downregulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren) und Beeinflussung des Sexualverhaltens (RIESENBECK et al. 2002; SCHULER, pers. Mitteilung). Auch bei Penisverletzungen kam Androcur® mit dem Ziel einer Erektion und damit einer erhöhten Blutungsgefahr vorzubeugen erfolgreich zum Einsatz (PESCH, pers. Mitteilung, eigene Erfahrungen). Hinsichtlich Nebenwirkungen fanden sich keine Angaben.

Seit 2007 ist Osateronacetat (Ypozane®, Virbac) in der ganzen EU zur Behandlung der benignen Prostatahyperplasie beim Rüden zugelassen.

Bereits 2000/2001 hatten TSUTSUI et al. berichtet, dass es nach Anwendung von Osateronacetat bei Rüden mit BPH zu einer Reduktion der Prostatagröße um im Mittel 63% kam, auch die Testosteronsekretion war signifikant reduziert, die LH-Spiegel sowie die Samenqualität waren hingegen nur geringgradig betroffen.

Flutamid (Hexal; Sandoz; Ratiopharm) ist in der Humanmedizin zur Behandlung des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms zugelassen. Nach Anwendung beim Rüden berichten DOYLE et al. (2004) über eine deutliche Reduzierung der Prostatagröße.

5 α -Reduktase-Hemmer

Die 5 α -Reduktase bewirkt die irreversible Reduktion von Testosteron zu 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) und wird in zahlreichen Geweben expremiert. Die Aktivität der 5 α -Reduktase wird wesentlich von Testosteron beeinflusst. DHT weist eine stärkere Bindung als Testosteron an den Androgenrezeptor der Prostata auf (BAMBERG 1994b) und ist demnach das für Wachstum und Sekretion der Prostata verantwortliche Schlüsselenzym .

Der Einsatz von 5 α -Reduktase-Hemmern bietet somit die Möglichkeit zur Behandlungen der benignen Prostatahyperplasie, ohne dass dabei die Konzentration der übrigen Sexualsteroiden im Blut verändert wird (JONSTON et al. 2000).

Finasteride (ProscarTM, Aventis), ein Typ II 5 α -Reduktase-Hemmer, wird beim Mann zur Behandlung der benignen Prostatahyperplasie ab einem Volumen von 40 cm³ erfolgreich eingesetzt. Als Nebenwirkungen werden vom Hersteller gelegentlich Impotenz, eine verminderte Libido, ein verringertes Ejakulatvolumen und Gynäkomastie sowie selten Überempfindlichkeitsreaktionen angegeben.

Untersuchungen an erwachsenen Beaglen zeigten, dass 1 mg Finasteride pro kg Körpergewicht pro Tag, verabreicht über 21 Wochen, die Prostatagröße um 70% verringerte; die Menge an Prostatasekret nahm ab, was mit einer Zunahme der Spermienkonzentration einherging. Schließlich konnte kein Sperma mehr gewonnen werden, obwohl die Tiere eine normale Libido aufwiesen. Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet und alle Effekte waren 6 – 8 Wochen nach Behandlungsende reversibel (IGUER OUADA u. VERSTEGEN 1997).

Nach Verabreichung von Finasteride in Dosierungen von 0,1, 0,25 und 0,5 mg/kg Körpergewicht und Tag an geschlechts gesunde Rüden über sieben Tage, kam es einheitlich zu einer Verringerung der Serum-Konzentration von DHT um 55%, während die Testosteron-Konzentration unverändert blieb.

Bei Behandlung von fünf an BPH erkrankten Rüden und Anwendung der gleichen Dosierung (0,1-0,5 mg Finasteride/kg KG/Tag), kam es nach 16 Wochen zu einer mittleren Verkleinerung des Prostatavolumens um 43%, die Serum-Konzentration von DHT war um 58% verringert. Bei allen Hunden kam es zu einer Verringerung des Spermavolumens, die Qualität der Samenzellen selbst, die Testosteronkonzentration im Serum sowie Libido und Fertilität waren jedoch nicht beeinträchtigt (KAMOLPATANA et al. 2001); über entsprechende Beobachtungen berichten SIRINARUMITR et al. (2001).

Daraus ergibt sich, dass die Behandlung einer BPH mit dem 5 α -Reduktase-Hemmer Finasteride insbesondere bei Zuchtrüden indiziert ist, da die Fertilität nicht oder nur

geringgradig beeinträchtigt wird. Der Therapieerfolg ist allerdings grundsätzlich reversibel. Nach IGUER-OUDA und VERSTEGEN (1997) erreichte die Prostata 12 Wochen nach Ende der Behandlung mit Finasteride wieder die gleiche Größe wie vor Therapiebeginn.

Immunisierung gegen GnRH

Ein anderer Ansatz zur gezielten Unterdrückung der Fortpflanzung durch Ausschaltung der Gonadenfunktion ist die aktive Immunisierung gegen GnRH, LH oder LH-Rezeptoren.

Als kurzkettiges Peptid wird GnRH vom Immunsystem nicht als fremd erkannt. Es muss daher es an ein weiteres Makromolekül gekoppelt werden, um eine entsprechende Immunantwort auszulösen.

LADD et al. (1994) immunisierte Rüden mit an Tetanus Toxoid konjugiertem GnRH und konnte bei allen Tieren einen signifikanten Abfall der Testosteronkonzentration im Serum auf Werte wie nach einer Kastration und eine Unterdrückung der Spermatogenese feststellen, alle Effekte der Immunisierung waren reversibel.

In anderen Versuchen wurde GnRH an das T-Helferzellen-Epitop p35 aus caninem Staupevirus F Protein oder Rotavirus VP6 Protein der Ziege gebunden und männliche Hunde damit immunisiert (JUNG et al. 2005). Auch hier kam es zu einer Unterdrückung der Spermatogenese. ZENG et al. (2001) benutzten ein an Ovalbumin konjugiertes GnRH-Tandem Dimer zur Vakzinierung von männlichen chinesischen Schweinen. Nach der Immunisierung stellten sich sehr niedrige Serum-Testosteronlevel, meist unterhalb der Nachweisgrenze, niedrige Androstenonwerte im Fettgewebe und ein sehr niedriges Hodengewicht ein.

In Australien, Neuseeland, Südafrika, Mexiko, Brasilien und den Philippinen ist Improvac® (Pfizer GmbH), eine GnRH-Vakzine, als Alternative zur chirurgischen Kastration von Ferkeln zugelassen; die erste Injektion erfolgt in der 8./9. Lebenswoche, eine Boosterung in Woche 21/22.; ca. 40 % der männlichen Tiere werden in Australien so behandelt.

Ein anderer Ansatz ist die Immunisierung gegen LH. LUNNEN et al. (1974) setzten bovines LH zur Vakzinierung von männlichen Beaglen ein und konnten damit eine Atrophie von Hoden, Nebenhoden und Prostata erreichen. 2 – 5 Wochen nach der ersten Impfung ließ sich kein Ejakulat mehr gewinnen und die Testosteronkonzentration war im Vergleich zur Kontrollgruppe (2 – 6 ng/ml) verringert (unter 2 ng/ml). Der Effekt der Immunisierung hielt zum Teil bis zu einem Jahr lang an.

Nach Immunisierung von Hündinnen gegen LH-Rezeptoren ergab sich drei Wochen nach Behandlung ein Abfall der Progesteron-Konzentration im Plasma auf 0-0,5 ng/ml, während sich die Estradiol-17 β -Konzentration nicht veränderte. Über einen Zeitraum von im Mittel 11 Monaten zeigten die Tiere keine Läufigkeit; nach Abnahme des Titors stellte sich wieder ein normales Reproduktionsgeschehen ein (SAXENA et al. 2002). Die Immunisierung gegen hCG führte hingegen nicht zur Beeinflussung des Zyklus bei der Hündin, da anscheinend keine ausreichende Kreuzreaktion zu caninem LH bestand (AL-KAFAWI et al. 1974).

Insgesamt stellt die „Immunkastration“ eine interessante Alternative zur chirurgischen Kastration dar, Arzneimittel zur Anwendung beim Hund stehen zur Zeit jedoch nicht zur Verfügung.

GnRH-Antagonisten

GnRH-Antagonisten binden an den membranständigen GnRH-Rezeptor, ohne dass die nachfolgende Kaskade eingeleitet wird, d.h. die Ausschüttung von LH und FSH unterbleibt.

Ein für die Humanmedizin zugelassener GnRH-Antagonist ist Cetrorelixacetat (Cetrotide®, Serono), das Anwendungsgebiet ist die Verhinderung eines vorzeitigen Eisprungs bei Patientinnen, die sich einer kontrollierten ovariellen Stimulation, gefolgt von einer Eizellentnahme und Techniken der assistierten Reproduktion, unterziehen.

Als Nebenwirkungen werden lokale Reaktionen an der Injektionsstelle, Übelkeit, Kopfschmerzen und in Einzelfällen Überempfindlichkeitsreaktionen, einschließlich anaphylaktischer Reaktionen, genannt. Vorteile gegenüber der Behandlung mit GnRH-Agonisten sind laut Hersteller die schneller eintretende Wirkung, das Ausbleiben eines initial stimulierenden Effekts und die Möglichkeit einer dosisabhängigen Hormonsuppression.

GnRH-Antagonisten wie Cetrorelixacetat, Abarelix und Acyline wurden in Studien auch zur Kontrazeption beim Mann (PAVLOU et al. 1991; HERBST et al. 2002; AMORY 2006) und zur Behandlung des humanen Prostatakarzinoms (DEBRUNYE 2004) eingesetzt.

Bei einigen GnRH-Antagonisten der 1. Generation wird als Nebenwirkung eine signifikante Ausschüttung von Histaminen beschrieben (PADULA 2005), wohingegen die neueren GnRH-Antagonisten der 2. (Cetrorelix) und 3. Generation (Acyline) gut toleriert werden, zudem potenter sind und eine längere Wirkungsdauer aufweisen (VICKERY 1985; HERBST 2003). Zur Anwendung von GnRH-Antagonisten beim Tier, insbesondere beim Hund, gibt es nur wenig Angaben.

Die Gabe von Detirelix, einem Antagonisten der 1. Generation, in einer Dosierung von 4 µg/kg KGW, führte bei Rüden zu einem Absinken der Testosteronkonzentration innerhalb von zwei Stunden, bei höheren Dosen (2 mg/kg KGW) wurde die Spermatogenese unterdrückt (VICKERY et al. 1989).

Nach Verabreichung von Cetrorelixacetat (i.v. oder s.c.) an Rüden in einer Dosis von 0,1 mg/kg Körpergewicht kam es zu einem Absinken der Testosteronkonzentration im Plasma nach 1 – 2 Stunden; bei Ausgangswerten von 0,8 bis 8,1 ng/ml lagen die Werte nach 4 Stunden unter 0,6 ng/ml. Nach 48 Stunden waren die Ausgangswerte wieder die erreicht (SCHWAHN et al. 2000).

Bei Behandlung von Hündinnen während der ersten drei Tage des Proöstrus mit Acyline (0,11 mg/kg KGW s.c.) kam es zu einem kurzen anovulatorischen Östrus. Drei Wochen nach der Behandlung waren die Tiere wieder im Proöstrus, Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet (Gobello et al. 2005). CORRADA et al. (2006) behandelten Rüden mit 0,33 mg Acyline/kg KGW (s.c.), wonach sich die Spermaqualität stetig verschlechterte und sich nach zwei Wochen ein deutlich verringertes Volumen ($< 0,2 \text{ cm}^3$), eine verringerte Gesamtzahl ($0,5 \times 10^6$) und eine verschlechterte Motilität (30%) zeigten. Zwei Wochen später konnte in den Ejakulaten zudem eine erhöhte Pathomorphologie mit z.T. = 40% Plasmotropfen nachgewiesen werden. Die Veränderungen in der Spermaqualität waren nach Versuchsende voll reversibel.

Weitere verwertbare Erfahrungen zur Anwendung von GnRH-Antagonisten über einen längeren Zeitraum als Alternative zur chirurgischen Kastration beim Rüden liegen bislang noch nicht vor.

Downregulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren

Die Freisetzung von GnRH erfolgt beim Rüden - wie oben bereits dargelegt - pulsatil und unterliegt verschiedenen negativen Feedback-Mechanismen. Für GnRH sind mehrere Isoformen bekannt sind, GnRH I und II. GnRH wird in den GnRH-Neuronen des Hypothalamus gebildet, seine Produktion und Sekretion unterliegt einem komplexen Regulationsschema, bei dem u.a. den positiven und negativen Feedback-Mechanismen der Sexualhormone, insbesondere von Estradiol-17 β , eine entscheidende Rolle zukommt. Speziell für Progesteron gilt, dass dessen negativ-rückkoppelnde Wirkung im Zusammenhang mit der Bildung/Wirkung von endogenen Opioiden gesehen werden muss (HERBISON 2006).

Ein besonderes Phänomen, das mit der Freisetzung bzw. Wirkung von GnRH verbunden ist, ist die in einer „Downregulierung“ mündende „Desensitization“. Es zeigt sich darin, dass im Gegensatz zu einer pulsatilen, die LH-Freisetzung bewirkenden Sekretion von GnRH, gleichbleibend hohe GnRH-Konzentrationen zu einer Suppression der LH-Freisetzung führen. Die dabei zugrunde liegenden Mechanismen sind derzeit noch nicht in toto bekannt und beides, Effekte auf Rezeptorebene sowie der Post-Rezeptorebene wurden postuliert. Als initialer Schritt wird ein Verlust der membranständigen Rezeptoren gesehen, der durch den Verlust der Ca^{2+} -Kanälchen aufrecht erhalten wird (JEONG u. KAISER 2006).

Unterschiedliche Analoga zu GnRH I stehen zum Einsatz in der Human- und Veterinärmedizin zur Verfügung.

Diese synthetischen GnRH Agonisten, wie Buserelin, Deslorelin oder Nafarelin, sind z.T. bis zu 200fach potenter als GnRH selbst (PADULA 2005). Ihr Einsatz erfolgt sowohl in Einzeldosen mit dem Ziel einer kurzfristigen erhöhten Freisetzung von LH und FSH, als auch als Implantat mit dem Ziel der Downregulation (ENGLAND u. HARVEY 1998).

So wird z.B. in der Humanmedizin das Arzneimittel Profact® depot (6,6 mg Buserelinacetat, Aventis) zur Downregulation bei der Indikation „Prostatakarzinomen“ eingesetzt. Mit dem Ziel der kurzfristigen Gonadotropinfreisetzung werden GnRH-Agonisten z.B. als Nasenspray genutzt (Suprecur®, Galenpharma).

Über erste Untersuchungen bei Anwendung eines GnRH-Agonisten zur Downregulation beim Rüden berichteten VICKERY et al. (1984); bei täglicher Injektion von 10 µg/kg des potenten GnRH-Agonisten [6-D-(2-naphthyl)alanine]-LHRH, kam es zunächst innerhalb von 2-4 Stunden zu einem Anstieg von LH, FSH und Testosteron im Plasma, nach 4 Tagen führte die Behandlung jedoch zum Absinken dieser Werte auf Basalniveau. Auch die Hodengröße und die Spermaqualität nahmen unter den Injektionen ab, nach 5 Wochen ließ sich kein Sperma mehr gewinnen. Nach Behandlungsende erwiesen sich alle behandlungs-induzierten Effekte als reversibel, es zeigte sich allerdings, dass dies bei Hunden, die über 42 Tage behandelt worden waren, länger dauerte als bei den nur 10 Tage behandelten.

Die Behandlung von Beagle-Rüden mit 0,5 oder 2,0 µg/kg des GnRH-Agonisten Nafarelinacetat s.c., führte ebenfalls zu einem Abfall der LH- und Testosteronkonzentrationen auf Basalniveau, einer Verringerung des Hoden- und des Prostatavolumens, einer Abnahme der Spermaqualität und schließlich zur Unterdrückung der Spermatogenese, wobei alle Effekte bei den Tieren, die mit 2,0 µg/kg behandelt wurden, schneller eintraten (VICKERY et

al. 1985). PARAMO et al. (1993) berichten über ähnliche Ergebnisse nach Anwendung von Nafarelinacetat in einer Dosis von 50 µg pro Tier und Tag, verabreicht über 22/23 Tage.

Hinsichtlich der Reversibilität der GnRH-induzierten Effekte berichten TREMBLY und BELANGER (1984), dass bei erwachsenen Rüden 26 Wochen nach Ende einer 16 wöchigen Behandlung mit [D-Tryp6] LHRH Ethylamide Hoden und Prostata wieder ihr ursprüngliches Volumen erreicht hatten, nach 4 Monaten zeigten die Tiere wieder eine normale Spermaqualität. Die Werte der testikulären Steroide waren allerdings bei den behandelten Tieren nach Behandlungsende deutlich höher als bei Kontrollgruppen.

In Übereinstimmung damit zeigten DUBE et al. (1987) an Hoden von Rüden, die nach Abschluss einer vier Monate dauernden Behandlung mit [D-Tryp6] LHRH Ethylamide via Kastration gewonnen worden waren, dass die Samenkanälchen nur Typ A und B Spermatogonien, Sertoli-Zellen und wenige primäre Spermatozyten enthielten und die Leydig-Zellen atrophiert waren. Vier Monate nach Behandlungsende wurde bei den dann kastrierten Rüden eine vollständige Reversibilität der genannten Veränderungen beobachtet.

Die tägliche subkutane Injektion von [D-Tryp6, des-Gly-NH₂(10)] GnRH Ethylamide über 23 Monate führte bei präpubertären Rüden und Hündinnen zu einem Abfall der Sexualsteroiden im Plasma und zu einer Verzögerung der sexuellen Entwicklung. 14 Monate nach Ende der Behandlung zeigten die männlichen Tiere eine normale, dem Erwachsenenalter entsprechende Spermatogenese und Prostatafunktion, die weiblichen Tiere eine normale Ovarfunktion. Die Anpaarung von zwei männlichen und zwei weiblichen Tieren war erfolgreich (LACOSTE et al. 1989).

Anstelle täglicher Injektionen verabreichten TRIGG et al. (2001) männlichen als auch weiblichen Hunden ein Deslorelin enthaltendes Implantat. Bei den männlichen Tieren war die Wirkung stark von der Dosis abhängig; eine Menge von > 0,25 mg Deslorelin/kg KGW führte bei 14 von 16 Rüden zur Unterdrückung der Spermatogenese über die Dauer von einem Jahr. Bei Hündinnen konnte der Östrus um bis zu 27 Monate verschoben werden. Alle Effekte waren auch hier reversibel.

Rüden, die mit einem 6 mg Deslorelin-Implantat behandelt wurden, zeigten nach 21 bzw. 27 Tagen Testosteron- und LH-Werte unterhalb der Nachweisgrenze. Nach 14 Wochen war das Hodenvolumen auf 35 % des Ausgangswertes gesunken, nach 6 Wochen konnte kein Sperma mehr gewonnen werden. 44 Wochen nach Einsetzen des Implantates, das nicht entfernt worden war, kam es zu einem Wiederanstieg der Testosteronwerte, nach 51 Wochen war auch LH wieder messbar. Beide Hormone erreichten nach 52 Wochen wieder Ausgangsbereiche, eine normale Spermaqualität wurde nach Woche 60 beobachtet (JUNAIDI et al. 2003).

GnRH-Implantate erwiesen sich auch bei Wildtieren als erfolgreich. Eine Dosis von 6 mg Deslorelin konnte bei männlichen afrikanischen Wildhunden über ca. ein Jahr die Fortpflanzung unterdrücken, bei männlichen Geparden war 21 Wochen nach Implantation kein Testosteron mehr im Plasma messbar (BERTSCHINGER et al. 2002).

In Australien und Neuseeland ist Suprelorin® (Peptech Animal Health), ein 4,7 mg Deslorelin enthaltendes Implantat, zugelassen, der Preis beträgt inklusive der tierärztlichen Leistung 80 Australische \$. Der Hersteller gibt für dieses Implantat eine Wirkungsdauer von mindestens sechs Monaten an, an einem Implantat mit einer Wirkungsdauer von einem Jahr und länger wird laut Homepage von Peptech gearbeitet (Stand Juli 2006).

Der subkutane Einsatz des 4,7 mg Deslorelin enthaltenden Implantates zwischen die Schultern führte bei 98 % der Rüden zu einer Unterdrückung von Testosteron über mindestens 6 Monate. Bei allen Tieren waren die Veränderungen reversibel, auch Hunde, die 4 mal hintereinander mit diesem Implantat behandelt worden waren, zeigten nach Behandlungsende wieder eine normale Steroidogenese. Bei Verabreichung eines 9,4 mg Deslorelin enthaltenden Implantates, zeigten 9 von 10 Rüden eine Erniedrigung der Testosteronkonzentration < 1 ng/ml über 400 Tage, ein Hund zeigte nach 322 Tagen einen über 30 Tage anhaltenden Testosteronanstieg, die Werte fielen danach jedoch wieder ab und blieben über weitere 84 Tage < 1 ng/ml (TRIGG et al. 2004/ 2006).

Ebenfalls gute Resultate konnten mit dem in Deutschland für die Humanmedizin zugelassenen GnRH-Analogon Profact® depot (Aventis), das 6,6 mg Buserelinacetat enthält, erzielt werden. In einer Studie an 7 erwachsenen Rüden zeigte sich, dass es 2-4 Tage nach Implantation zu einem initialen Anstieg von Testosteron und Estradiol 17β um 76,7 und 87 % kam, gefolgt von einem Absinken der Hormonkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze innerhalb von 15 Tagen. Der Effekt der Downregulation hielt für $233 \pm 28,2$ Tage an. Die Behandlung führte zu einer Abnahme der Hodengröße um $57,3 \pm 13,8$ % und der Prostatagröße um $71,2 \pm 7,3$ %. Innerhalb von vier Wochen konnte kein Sperma mehr gewonnen werden, die histologische Untersuchung eines Hodens zeigte 100 Tage nach Implantation eine komplette Unterdrückung der Spermatogenese. Die Effekte des Implantates waren voll reversibel; histologische Untersuchungen an Hoden unbehandelter Tiere und an Hoden 399 und 645 Tage nach Implantation zeigten keine Unterschiede (RIESENBECK et al. 2002; HOFFMANN u. ENGEL 2004).

In einem Modellversuch wurde Profact® depot auch bei kastrierten Hündinnen eingesetzt; eine Suppression der LH-Freisetzung konnte im Mittel über 238 Tage gemessen werden (JÄGER 2006).

In zwei weiterführenden Studien an der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere der Justus-Liebig-Universität zeigte die Behandlung mit Profact® depot sehr gute Ergebnisse. Indikationen für die Kastration waren BPH, Prostatzysten, Prostatitis, Epilepsie, Hypersexualität, Aggressivität, Unruhe, Penisverletzungen, Schleimhautvorfall am Penis und perianalen Tumore, auf die hormonelle Kastration (Downregulation) wurde insbesondere wegen eines Narkose- und Operationsrisikos, aus Angst vor Nebenwirkungen oder einem späteren Zuchtvorhabens zurückgegriffen. Auch die wiederholte Anwendung des Implantates zeigte eine hohe Wirksamkeit (RIESENBECK et al. 2002).

Bis vor kurzem waren in Deutschland bzw. in Europa keine GnRH-Agonisten mit der Indikation „hormonelle Kastration“ zugelassen. Auch wenn § 56 a AMG die Möglichkeit bietet, im Einzelfall für die Humanmedizin zugelassene Arzneimittel für nicht-lebensmittelliefernde Tiere umzuwidmen, war diese Situation unbefriedigend.

Mit Gonazon® wurde erstmals 2006 ein solches Präparat zur Unterdrückung der Gonadenfunktion bei Hündinnen durch langfristige Blockade der Gonadotropinsynthese zugelassen. Die Behandlung mit dem 18,5 mg Azagly-Nafarelin enthaltenden Implantat konnte in einer Studie von RUBION et al. (2006) den Eintritt der Pubertät bei juvenilen Beagle-Hündinnen (Alter $4,88 \pm 0,32$ Monate) ein Jahr lang unterdrücken; durchschnittlich 8 Monate nach Behandlungsende zeigten alle Tiere einen normalen Zyklus.

Der vorliegenden Arbeit liegt die Frage zugrunde, ob und inwieweit dieses Arzneimittel zur Downregulation beim Rüden geeignet ist.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere¹ und Haltung

Die Untersuchungen wurden an acht 5 Jahre alte Beagle-Rüden mit einem Gewicht zwischen 10 und 13 kg durchgeführt.

Die Hunde wurden randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilt und mit folgenden Namen versehen:

Gruppe 1: Jackson, Jeremy, Jonathan und Julien, Gruppe: 2 Eddie, Elias, Elliott und Elvis

Tab. 1: In den Versuch aufgenommene Rüden

Gruppe	Name	Alter (Jahre) ¹	Gewicht (kg) ¹	Gewicht (kg) ²
1	Jackson	5	10	13
1	Jeremy	5	12	12
1	Jonathan	5	10	13
1	Julien	5	13	15
2	Eddie	5	11	12
2	Elias	5	11	13.5
2	Elliott	5	12	13
2	Elvis	5	11	12

¹ zum Zeitpunkt der Implantation ² bei Versuchsende

Alle Hunde wurden vor Versuchsbeginn einer klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen, die keine Auffälligkeiten ergab. Die spezielle andrologische Untersuchung wies die Rüden als klinisch geschlechtsgesund aus, es wurden keine Hinweise auf Störungen der Spermatogenese erhalten.

Die Hunde wurden in Gruppen zu jeweils zwei oder drei Tieren in bedachten Außenzwingern gehalten. Jeder Zwinger war mit einer isolierten Hundehütte mit Platz für bis zu vier Tieren ausgestattet. Wasser stand ad libitum zur Verfügung, gefüttert wurden die Rüden einmal täglich mit einer Mischung aus handelsüblichem Trocken- (400g/Tier/Tag) und Nassfutter (200g/Tier/Tag). Nach Blutabnahmen oder Untersuchungen, bekamen die Beagle außerdem „Hundekuchen“ zugefüttert.

Nach Versuchsende wurden alle Hunde an Privatpersonen abgegeben.

¹ Es handelte sich um ein anzeigepflichtiges Vorhaben gemäß § 8 Abs. 7 in Verbindung mit § 8a Tierschutzgesetz.

Die Genehmigung wurde durch das Regierungspräsidium Giessen mit dem AZ V54-19c20/15c GI 18/15 erteilt.

3.2 Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung

3.2.1 Versuchsaufbau

Ziel der Untersuchungen war es, den postulierten Effekt der „Downregulation“ des GnRH-Implantates „Gonazon[®]“ der Firma Intervet über die Erfassung der Veränderungen der Testosteron-, Estradiol-17 β - und LH-Konzentrationen im peripheren Blutplasma, der Hoden- und Prostatagröße sowie der Spermaqualität darzustellen. Ein weiterer Parameter war die Möglichkeit Samen zu gewinnen.

Über die gesamte Versuchsdauer hinweg wurde zudem der allgemeine Gesundheitszustand der Tiere überprüft sowie die Implantationsstellen adspektorisch und palpatorisch untersucht (siehe Kap. 3.2.2.1). Das Sexualverhalten der Tiere wurde anhand des Verhaltens der Rüden untereinander (z.B. gegenseitiges Bespringen), gegenüber läufigen Hündinnen und auch Menschen (z.B. Hängen am Bein) beobachtet.

Die acht Rüden wurden zwei Gruppen eingeteilt, wobei das GnRH-Implantat bei Gruppe 1 nach sechs Monaten (180 Tagen) und bei Gruppe 2 nach 12 Monaten (365 Tagen), unabhängig von dessen Wirkdauer, entfernt wurde.

Beide Gruppen dienten vor Einsetzen des Implantates zunächst als ihre eigene Kontrollgruppe. Die Tiere wurden nach der Entfernung von „Gonazon[®]“ bzw. nach Ende der Wirkungsdauer über einen festgelegten Zeitraum weiter untersucht (s.u.).

Bei beiden Gruppen ließen sich der Versuch in vier Phasen (Experimental Phases, EP) einteilen:

Gruppe 1

- Versuchsphase I (EP I; Eingewöhnungsphase)

Die Hunde konnten sich zunächst über zwei Wochen an ihre neue Umgebung und die jeweiligen Gruppe gewöhnen. In dieser Phase wurden keine Blutproben genommen, es wurde jedoch von allen Hunden in der zweiten Woche Sperma gewonnen; Voraussetzung für den Verbleib im Versuch war die Feststellung einer Normospermie.

- Versuchsphase II (EP II; Kontrollperiode)

Während dieser dreiwöchigen Kontrollperiode wurde den Hunden zweimal wöchentlich Blut zur Bestimmung von Testosteron und Estradiol-17 β (Montag, Donnerstag) entnommen. In der dritten Woche wurden Montags und Dienstags von jeweils zwei Hunden Blutproben in 20 minütigen Abständen über 6 Stunden zur Bestimmung von LH (LH-Fenster I) entnommen (siehe Kap. 3.2.2.2. und 3.2.2.3).

- Versuchsphase III (EP III; Behandlung mit Gonazon[®])

Den Hunden wurde am Mittwoch der Woche 4 das Implantat eingesetzt (siehe Kap. 3.2.2.1), die Entfernung erfolgte 6 Monate (180 Tage) später.

Um die kurzfristigen Auswirkungen des GnRH-Implantates auf die Veränderungen der Testosteron-Konzentration zu ermitteln, wurden über einen Zeitraum von 48 Stunden vor und 96 Stunden nach Implantation, Blutproben in 12 stündigen Intervallen gewonnen. Danach wurden die Blutentnahmen bis zum Ende der Woche 6 in Intervallen von zweitägigen Abständen fortgesetzt, danach bis Versuchsende in wöchentlichen Abständen.

Zur Bestimmung der LH-Freisetzung unter der Behandlung mit „Gonazon[®]“ wurde in der 11 und der 22 Woche nach Implantation ein LH-Fenster angesetzt.

Während der ganzen Versuchsphase III wurden die Hunde alle zwei Wochen andrologisch untersucht und Sperma von ihnen gewonnen, bis dies nicht mehr möglich war. Weitere Versuche zur Samenentnahme fanden danach alle zwei Monate statt.

- Versuchsphase IV (EP IV; nach Entfernung des Implantates)

Zunächst wurden für diese Phase 12 Wochen Überwachungszeit eingeplant, da damit gerechnet wurde, dass in dieser Zeit sowohl die Testosteronkonzentrationen als auch die Spermaqualität ihre Ausgangswerte wieder erreicht haben sollten.

In dieser Phase wurden den Hunden während des Anstiegs von Testosteron zunächst zweimal, nach Erreichen der Testosteron-Ausgangswerte, einmal wöchentlich Blutproben zur Bestimmung der Testosteron- und Estradiol-17 β -Konzentration entnommen, in den Wochen 4 und 12 fanden Blutentnahmen zur Bestimmung der Verfügbarkeit von LH im Plasma statt (LH-Fenster). Außerdem wurden die Hunde alle zwei Wochen andrologisch untersucht und in den Wochen 4, 8 und 12 Versuche zur Samenentnahme unternommen und das Sperma, soweit verfügbar, untersucht.

Da jedoch drei Rüden nach 12 Wochen noch eine Azoospermie und ein Rüde eine Oligo- und Pathospermie aufwiesen, wurde die Versuchsphase IV verlängert und die Hunde zusätzlich in den Wochen 16 und 20 sowie je - nach Samenqualität - auch noch in den Wochen 24-26 und 29-30 untersucht.

Gruppe 2

- Versuchsphase 1 (EP 1; Eingewöhnungsphase)

Kein Unterschied zu Gruppe 1

- Versuchsphase 2 (EP 2; Kontrollperiode)

Kein Unterschied zu Gruppe 1

- Versuchsphase 3 (EP 3; Behandlung mit Gonazon[®])

Den Hunden wurde am Mittwoch der Woche 4 das Implantat eingesetzt, die Entfernung erfolgte 12 Monate (365 Tage) später.

Die Probenentnahme zur Bestimmung von Testosteron, Estradiol und LH verlief wie bei EP III der Gruppe 1.

Während der Versuchsphase 3 wurden die Hunde alle zwei Wochen andrologisch untersucht und Sperma von ihnen gewonnen, bis dies nicht mehr möglich war. Weitere Versuche zur Samenentnahme fanden danach alle zwei Monate bis zur Entfernung des Implantates bzw. bis zum Ende der Implantatwirkung statt.

Das Erreichen einer Testosteronkonzentration $> 0,5$ ng/ml im Plasma während der Versuchsphase III wurde als Ende der effektiven Downregulation angesehen. Die Hunde gingen von diesem Zeitpunkt an in die Versuchsphase 4 (EP 4) über.

- Versuchsphase 4 (EP 4; nach Entfernung des Implantates bzw. nach Wirkungsende)

Auch hier erfolgte die Behandlung wie bei den Hunden der Gruppe 1, EP IV. Nur ein Hund war 365 Tage nach Einsetzen des Implantates noch downreguliert. Bei den übrigen drei Hunden wurde das Implantat ebenfalls nach 365 Tagen entfernt, obwohl es bereits früher zu einem Wirkungsverlust gekommen war; diese Hunde gingen am Ende der effektiven Downregulierung in die Versuchsphase EP 4 über.

3.2.2. Versuchsdurchführung

3.2.2.1 Verwendete GnRH-Implantate

Die verwendeten elastischen Implantate („Gonazon®“) wurden von der Firma Intervet R&D, Frankreich zur Verfügung gestellt, jedes enthielt 18,5 mg des GnRH-Agonisten Azagly-Nafarelin.

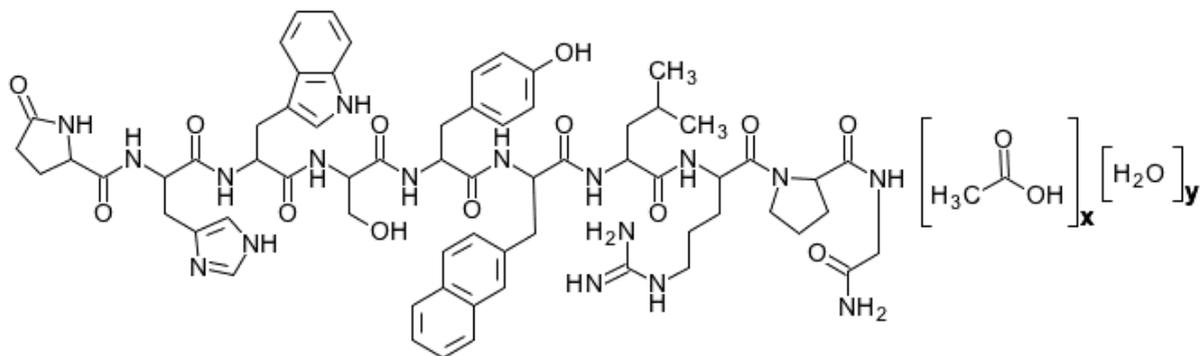


Abb. 6: Strukturformel von Nafarelin

Das Einsetzen von „Gonazon®“ erfolgte nach Rasur und Desinfektion ohne Narkose mit Hilfe eines Applikators subkutan und paraumbilikal. Für die Entfernung nach 180 bzw. 365 Tagen wurde die Implantationsstelle mit 0,5 ml Procasel® 2% lokal betäubt und das Implantat nach einem ca. 1cm großen Hautschnitt freipräpariert und entnommen.



Abb. 7: Applikator zum Einsetzen von Gonazon®



Abb. 8: Entnahme des Implantates nach Desinfektion und Lokalanästhesie

3.2.2.2 Gewinnung der Plasmaproben zur Bestimmung von Testosteron und Estradiol- 17 β

Die Blutproben zur Bestimmung der Testosteron- und Estradiol-17 β Konzentration wurden nach Desinfektion aus der Vena cephalica antebrachii mit einer sterilen Nadel (0.9 x 40 mm) entnommen. Es wurden je Hund 10 ml Blut in beschriftete Lithium-Heparin Röhren aufgefangen und bis zur Zentrifugation bei 1000g und 4°C über acht Minuten, auf Eis gekühlt. Das überstehende Plasma wurde schließlich in beschriftete Kunststoff-Röhren (3,5 ml, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) überführt und die Proben bis zur Bestimmung der Hormonwerte bei -22 bis -30°C gelagert.

3.2.2.3 Gewinnung der Plasmaproben zur Bestimmung von LH

Da LH pulsatil freigesetzt wird, wurden für die Bestimmung der LH-Freisetzung Zeitfenster angesetzt, bei denen in 20 minütigen Intervallen über einen Zeitraum von sechs Stunden Blut entnommen wurde. Den Hunden wurde dafür ein zentraler Venenkatheter (Vygonflex Pur®, Vygon GmbH & Co KG, Aachen), Durchmesser 1.4 mm, in die Vena jugularis externa gelegt.



Abb. 9: Verwendeter Venenkatheter Vygonflex Pur®, Vygon

Jeweils 2 ml Blut wurden mit 5,5 ml Kabevetten® Lithium-Heparin Röhren (KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht) über den Katheter gewonnen, nach jeder Entnahme wurde der Katheter mit isotonischer Kochsalzlösung gespült und mit einem sterilen Mandrin verschlossen, danach wurden die Proben wie in Kap. 3.2.2.2 aufgeführt zentrifugiert und gelagert.

3.2.2.4 Ermittlung der Hoden- und der Prostatagröße

Die Hunde wurden alle zwei Wochen andrologisch untersucht. Neben der Palpation der Hoden und Ermittlung deren Konsistenz, wurden mit einem Zentimetermaß Länge und Breite der einzelnen Hoden ohne Einbeziehung des Skrotums gemessen. Zusätzlich wurden die Hoden mittels Ultraschall längst und quer mit einem linearen 7,5 MHz –Schallkopf auf Auffälligkeiten untersucht.

Die Prostata wurde ebenfalls ultrasonografisch auf Besonderheiten (z.B. Zysten) untersucht und ihre Länge und Breite mit der im Ultraschallgerät integrierten Vermessungseinheit ausgemessen. Genutzt wurde dafür ein 5 MHz-Schallkopf, der lateral des Penis angesetzt wurde. Zum Einsatz kam das Ultraschallgerät SonoAce 990 (Fa. Sonoace GmbH, Marl), die Befunddokumentation fand durch digitale Speicherung mit Hilfe des im Gerät integrierten Computers statt.

3.2.2.5 Spermagewinnung und Spermauntersuchung

Die Hunde wurden, wie routinemäßig in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Justus-Liebig Universität Giessen durchgeführt (HOFFMANN 2003, PESCH et al. 2007), durch manuelle Stimulation (Masturbation) abgesamt und das Sperma nach Möglichkeit fraktioniert (Vorsekret, spermienreiche Fraktion, Nachsekret) in sterile Tulpengläser aufgefangen.



Abb. 10: Spermagewinnung durch manuelle Stimulation

Zur Animation der Rüden wurde zusätzlich eine läufige bzw. mit dem Lockstoff p-methyl-Benzoessäure (GOODWIN et al. 1979; KUTZLER 2005) präparierte Hündin genutzt und auch das Verhalten der Rüden gegenüber der Hündin beobachtet. Zudem wurde auf die Vollständigkeit der Erektion und den Ablauf der Reflexkette geachtet.

Alle Fraktionen wurden einzeln grobsinnlich auf Volumen, Farbe, Konsistenz, Geruch und Beimengungen untersucht. Bei mikroskopischer Untersuchung der spermienreichen Fraktion erfolgte die Erfassung der Vorwärtsbeweglichkeit, Dichte, Gesamtspermienzahl, Anzahl lebender Spermien und Pathomorphologie nach Standardverfahren (RIESENBECK et al. 2001; HOFFMANN 2003; PESCH et al. 2007). In Ergänzung dazu kam zur Erfassung pathomorphologischer Veränderungen auch die Färbung/Fixierung mittels Formolcitrat zur Anwendung, die spezielle Darstellung der Kopfkappen der Spermien erfolgte mittels der Spermac® Färbung (Fa. Stefan Gück, Hamburg). Weiterhin wurde noch über den hypoosmotischen Schwelltests (HOS-Test) auf die Integrität der Plasmamembran geschlossen (RIESENBECK et al. 2001). Der pH-Wert wurde mit Indikatorpapier im Bereich zwischen 6,4 und 8,0 (Merck®) bestimmt.

Der Bereich der Normospermie war nach RIESENBECK et al. (2001) sowie PESCH et al. (2007) wie folgt definiert:

Volumen spermienreiche Fraktion:	0,5-2,0 ml
Vorwärtsbeweglichkeit:	= 75 %
Gesamtzahl Samenzellen:	= $0,3 \times 10^9$
Pathomorphologie:	< 20 %
Kopfkappen-Veränderungen (Spermac®):	= 5 %
HOS-Test (non curled):	= 5 %
pH-Wert:	6,2 – 7,2

3.3 Hormonanalytik

3.3.1 Bestimmung von Testosteron und Estradiol-17 β

Die Konzentrationen von Testosteron und Estradiol-17 β im Plasma wurden mittels Radioimmunassay (RIA) bestimmt.

- **Testosteron**

Das Radioimmunassay zur Bestimmung von Testosteron wurde wie bei RÖCKEN et al. (1995) beschrieben als Kompetitionsassay durchgeführt.

Extraktion: Jeweils 0,1 ml Plasma wurde zunächst zweimal mit 1 ml Toluol extrahiert und die Proben im Vortex-Evaporator niedertrocknet.

Als Kontrollen wurden bei jedem Test parallel dazu mit bestimmt:

- a) Wallach (niedriger Testosterongehalt), b) Hengst (mittlerer Testosterongehalt),
- c) Rüde (hoher Testosterongehalt), d) Reagenzienleerwert.

Die Standardkurve umfasste acht Kurvenpunkte in einen Bereich zwischen 0,06 – 7,4 ng/ml. Als notwendige Bezugsproben wurden die „Totale“ (Gesamtmenge Radioaktivität), „NSB“ (nichtspezifische Bindung) und der B₀ (Bindungsnullwert) in den Test eingebracht.

Demzufolge ergab sich nach Niedertrocknung der Proben folgendes Pipettier- und Inkubationsschema:

Pipettierschema RIA-Testosteron (Angaben in ml)

	Totale	NSB	B0	Standard-Kurvenpunkte	Leerwert	Proben
BSA-Puffer:	0,5	0,5	0,1	-,-	0,1	0,1
Tracer	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Standard-Lösungen:	-,-	-,-	-,-	0,1	-,-	-,-
Antiserum-Verdünnung	-,-	-,-	0,4	0,4	0,4	0,4
Kohlesusp.	-,-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Aqua dest.	0,2	-,-	-,-	-,-	-,-	-,-

Vorinkubation: 20 Minuten im Wärmeschüttelbad bei 37°C

Inkubation: 60 Minuten bei 4°C (Eisbad im Kühlschrank)

Abtrennen des freien Hormons und Messung: Nach Trennung von freiem und gebundenem Testosteron mittels Kohlesuspension (s. Pipetierschema), wurden die Proben zentrifugiert und nach Abheben und Versetzen von 0,6 ml des Überstandes mit Szintillationsflüssigkeit die ^3H -Impulse in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (LS 5000 TD, Fa. Beckmann, München) ermittelt.

Spezielle Reagenzien: Das verwendete Antiserum, Gi-Testosteron-I, in einer Arbeitsverdünnung von 1:50.000, war gegen 4-Androsten-11 α , 17 β -diol-3-on-11-HS: BSA gerichtet und stammte vom Kaninchen. Folgende Kreuzreaktionen wurden gemessen:

Dihydrotestosteron:	47.00 %
Androstendion:	0.84 %
Estradiol-17 β :	0.04 %
Progesteron:	0.02 %
Estron:	< 0.01 %
Cortisol:	< 0.01 %
Dehydroepiandrosteron:	< 0.01 %
Pregnenolon:	< 0.01 %
Estriol:	< 0.01 %

:

Die Assoziationskonstante lag bei 0.312 l/nmol.

Als Tracer wurde ^3H -Testosteron (spez. Aktivität 50 Ci/mmol; NEN Diagnostics) in BSA-Puffer in einer Menge von ca. 7200 cpm/100 μl verwendet.

Die untere Nachweisgrenze des Assays lag bei 0,1 ng/ml, die Intra- und Interassayvariationskoeffizienten lagen bei 8,2 bzw. zwischen 7,8 und 9,0 %.

• **Estradiol-17 β**

Der Radioimmuntest zur Bestimmung von Estradiol-17 β wurde - wie bei NOHR (1993) und HOFFMANN et al. (1994) beschrieben - zur Steigerung der Sensitivität als Sequenztest angesetzt.

Auch in diesem Test wurden zwei Proben mit bekanntem niedrigem und hohem Estradiolgehalt als Kontrollen mitgeführt. Die Standardkurve umfasste einen Bereich von 0,5 – 32 pg/Ansatz. Als notwendige Bezugsproben wurden ebenfalls die „Totale“ (Gesamtmenge Radioaktivität), „NSB“ (nichtspezifische Bindung) und der B₀ (Bindungsnullwert) in den Test eingebracht.

Nach Extraktion von 0,25 ml Plasma im Doppelansatz mit zweimal 2,5 ml Toluol, wurde der Estradiol-Test wie folgt durchgeführt.

Pipettieransatz RIA-Estradiol für die 1. Inkubation (Angaben in ml)

	Totale	NSB	B0	Standard-Kurvenpunkte	Leerwert	Proben
BSA-Puffer:	0,5	-, -	0,1	-, -	0,1	0,1
Standard-Lösungen:	-, -	-, -	-, -	0,1	-, -	-, -
Antiserum-Verdünnung	-, -	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Erste Inkubation

Über Nacht bei 4°C (Eisbad im Kühlschrank)

Zugabe des ³H-Tracers (Angaben in ml)

	Totale	NSB	B0	Standard-Kurvenpunkte	Leerwert	Proben
Tracer	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Zweite Inkubation

45 Minuten bei 4°C (Eisbad im Kühlschrank)

Abtrennung des freien Hormons und Messung

Siehe Testosteron RIA

Das verwendete Antiserum, Gi-E²β-Pool Kaninchen-I, in einer Arbeitsverdünnung von 1:17.000, war gegen 1,3,5(10) Estratriene-3. 17β-diol-6-o-carboxy-methyloxim:BSA gerichtet und stammte vom Kaninchen. Folgende Kreuzreaktionen wurden beobachtet:

Pregnenolon:	< 0,01 %
Cortisol:	< 0,01 %
5α-Dihydro-Testosteron:	< 0,01 %
Androstendion:	< 0,01 %
DHEA:	< 0.01 %
Progesteron:	< 0.01 %
Testosteron:	< 0.01 %
Estriol:	0,68 %
Estron:	1,30 %

Die Assoziationskonstante lag bei $11,19 \times 10^9$ l/Mol.

Als Tracer wurde ³H-Estradiol (spez. Aktivität 105 Ci/mmol; NEN Diagnostics) in BSA-Puffer in einer Menge von ca. 7200 cpm/100 µl verwendet.

Als untere Nachweisgrenze wurden 2 pg/ml ermittelt. Der Intraassayvariationkoeffizient lag bei 16 %, der Interassayvariationkoeffizient zwischen 14,5 und 19 %.

3.3.3 Bestimmung von LH

3.3.3.1 Testprinzip

Die LH-Bestimmung im Plasma erfolgte als „Solid-Phase-Assay“ mittels eines heterologen, kompetitiven Enzym-Immuno-Assay (EIA) nach dem Prinzip des Sequenztests.

Genutzt wurde canines LH als Standard, biotiniliertes bovines LH als Tracer, ein monoklonaler (Maus), gegen bovines LH gerichteter erster Antikörper und ein zweiter, als „Solid Phase“ dienender anti-Maus IgG Fc-spezifischer Antikörper (STRECKER et al. 1979)

Alle Proben wurden im Doppelansatz bestimmt, die Standardkurve umfasste einen Bereich zwischen 0,2 und 6,4 ng/ml.

3.3.3.2 Beschichtung der Mikrotiterplatten

Zur Beschichtung mit dem 2. Antikörper wurden - wie bei JÄGER (2006) beschrieben - pro Vertiefung 500 ng des zweiten Antikörpers, aufgenommen in 0,1 ml Carbonatpuffer, einpipetiert und die Platten danach über 48 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde der Puffer abgekippt, 0,2 ml Blockpuffer je Vertiefung zugegeben und die Platten nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur dreimal mit 0,2 ml Waschpuffer je Vertiefung gewaschen. Die entleerten Mikrotiterplatten wurden mit Parafilm verschlossen und im Kühlschrank aufbewahrt.

3.3.3.3 Testdurchführung

Die Standardkurve des Testes umfasste folgende Punkte:

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

Die Standardkurvenpunkte und auch alle Gebrauchslösungen wurden, abgesehen von den Puffern, vor jedem Test aus den jeweiligen Stammlösungen frisch angesetzt.

Alle Kurvenpunkte, Proben, NSB (nicht spezifische Bindung) und B₀ (wie Standardpunkte jedoch ohne Zugabe von LH) wurden im Doppelansatz einpipetiert, zusätzlich wurden zwei biologische Kontrollen mit bekannt hohen und niedrigen LH-Wert, ebenfalls im Doppelansatz, eingesetzt.

Als Enzymsystem wurde Streptavidin-POD, als Substrat Phenylendiamin und zum Abstoppen der Reaktion 1 N H₂SO₄ benutzt. Der Sequenztest wurde über drei Tage, mit fünf aufeinander folgenden Inkubationen durchgeführt (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Pipetierschema LH-ELISA

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

¹ Der Waschvorgang beinhaltet jeweils 3 Waschungen mit je 200 µl Waschlösung

3.3.3.4 Testauswertung und Zuverlässigkeit

Die Messung der Extinktion bei 450 nm erfolgte an einem Titertek[®] Multiskan (Fa. Flow Laboratories GmbH, Meckenheim). Die weitere Auswertung geschah im „offline“-Betrieb über das an den Gammacounter (Fa. Bertold, Bad Wildbach) angeschlossene Rechenprogramm, wobei die Standardkurve durch Polynom-Interpolation der einzelnen Standardkurvenpunkte nach statistischer Wichtung der Messergebnisse erstellt wurde.

Abhängig vom berechneten „curve-fit“ als Maß für die Übereinstimmung des mathematischen Modells mit den gemessenen Werten, wurde weiter nach linearer, quadratischer oder kubischer Regression ausgewertet, die Darstellung der Kurve erfolgte im linear-log-Plot.

Die aufgrund der Standardkurven ermittelte untere Nachweisgrenze des Tests lag bei 0,2 ng/ml, die Interassayvariationskoeffizienten lagen zwischen 12,7 und 17,3 %.

3.3.3.5 Testspezifische Substanzen

Mikrotiterplatten F8 maxisorp: Fa. Nunc GmbH & Co, KG, Wiesbaden-Biebrich

Zweiter Antikörper: Goat anti Mouse IgG Fc specific, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Erster Antikörper: 518 B7Mouse anti bovine LH (monoclonal; Dr. Jan Roser, University of California, Davis, CA) verdünnt in Trisma-Basepuffer
(\Rightarrow Stammlösung I in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; aliquotiert zu je 25 μl in Eppendorfgefäßen und bei -20°C gelagert; zur Herstellung der Arbeitslösung wird jeweils ein Eppendorfgefäß auf 2,5 ml aufgefüllt, so dass man eine Arbeitslösung mit der Konzentration 25 $\mu\text{l}/2,5$ ml erhält)

Standard: canines LH AFP 5216B verdünnt mit 0,05 M PO_4 Puffer + 0,5% BSA (lyophilisiert), aliquotiert zu je 50 ng LH/100 μl Puffer in Eppendorfgefäße, gelagert bei -20°C
Zur Herstellung der Stammlösung II: Jeweils 1 Eppendorfgefäß mit Aqua dest. auf 500 μl auffüllen: ergibt eine Konzentration von 1 μg LH/10 ml

- Tracer:** bovines LH: USDA bLH I-1, biotiniert nach dem bei MUTAYOBA et al.(1990) beschriebenen Prinzip; 300 mg bovines LH wurden in 200 µl PBS-Puffer gelöst und mit 45 µg in 10 µl N,N Dimethylformamid gelöstem Biotin-NHS (Sigma) gemischt, vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 0,1 mg Glycin in 100 µl PBS gestoppt. Nach einer Inkubation von 4 Stunden erfolgte die Zugabe von 1 mg BSA in 1 ml PBS. Die Umpufferung erfolgte über eine PD-10-Säule (Pharmacia) in PBS. Das Eluat wurde in PBS verdünnt, zu 100 µl aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.
- Streptavidin-POD:** Biochemica Roche Diagnostics Nr.1089153/001 500U Streptavidin-POD, Imm. 85051321 (Boehringer Mannheim)
- Substrat:** Phenylendiamin (Fa. Merck KgaA, Darmstadt)

3.3.3.6 Lösungen und Puffer

1. Antikörper: 0,6 ng pro Ansatz, aufgenommen in 100 µl Probenpuffer

Standardkurve: Aus der Stammlösung II mit der Konzentration von 1 µg LH/10 ml wird folgende Verdünnungsreihe angesetzt:

Standart 7 (6,4 ng/ml):	51,2 µl Stammlösung II	+	748,8 µl Probenpuffer
Standart 6 (3,2 ng/ml):	400 µl Standart 7	+	400,0 µl Probenpuffer
Standart 5 (2,4 ng/ml):	200 µl Standart 6	+	67,0 µl Probenpuffer
Standart 4 (1,6 ng/ml):	300 µl Standart 6	+	300,0 µl Probenpuffer
Standart 3 (0,8 ng/ml):	300 µl Standart 4	+	300,0 µl Probenpuffer
Standart 2 (0,4 ng/ml):	300 µl Standart 3	+	300,0 µl Probenpuffer
Standart 1 (0,2 ng/ml):	300 µl Standart 2	+	300,0 µl Probenpuffer

Tracer: Der Tracer wird in einer Verdünnung von 1:6000 in Probenpuffer angesetzt.

Für die Bestückung einer Platte werden 1,67 µl bovines LH (UsdA bLH I-1) in 10 ml Probenpuffer benötigt

Streptavidin-POD: Die Streptavidin-POD-Lösung wird in einer Verdünnung von 1:30.000 in Waschpuffer angesetzt.

Substrat:

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

Die Substratlösung wurde erst unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.

Carbonatpuffer:

Na ₂ CO ₃	(MG 106,0)	1,325 g
NaHCO ₃	(MG 84,0)	1,050 g
Thimerosal	(0,02 %)	0,050 g
Aqua dest		ad 250,000 ml

Blockpuffer:

BSA	1,0 g
Carbonatpuffer	ad 10,0 ml

Material und Methoden

Trisma-Base-Puffer:	Trismabase	(MG 121,1; 20 mmol)	2,422 g
	EDTA	(MG 292,3; 15 mmol)	0,438 g
	NaCl	(MG 58,4; 0,3 mmol)	17,530 g
	Aqua dest.		ad 1000,0 ml
	mit 1 N HCL auf pH 7,2 einstellen		
Probenpuffer:	BSA		0,1 g
	Trisma-Base-Puffer		ad 100,00 ml
Waschpuffer:	Tween 20		0,50 ml
	Trisma-Base-Puffer		ad 1000,00 ml
Substratherstellung:			
Puffer 1:	di-Sodium-Hydrogen-Phosphat (MG 177,99)		3,56 g
	Aqua dest.		ad 100,00 ml
Puffer 2:	Citronensäure-Monohydrat (MG 210, 14)		2,10 g
	Aqua dest.		ad 100,00 ml
Substratpuffer :	Puffer 1		12,50 ml
	Puffer 2		12,50 ml
	Aqua dest.		25,00 ml

3.4 Statistische Auswertung

- **Bearbeitung der Testosteron- und Estradiolergebnisse**

Aufgrund der statistischen Verteilung der Hormonwerte (rechtsschiefe Verteilung), wurden diese logarithmisch transformiert und die geometrischen Mittelwerte (\bar{x}_g) sowie die zugehörigen Streufaktoren (SF) ermittelt.

- **Bearbeitung der LH-Ergebnisse**

Um die LH-Freisetzung während der LH-Fenster beschreiben zu können, wurden folgende Parameter bewertet:

a) Basalkonzentration (BC)

Für jeden Hund und jedes LH-Fenster wurde jeweils aus allen ermittelten Hormonwerten der arithmetische Mittelwert (\bar{x}) und die Standardabweichung (SD) berechnet und Werte, die um mehr als zwei Standardabweichungen vom Mittelwert ($> \bar{x} + 2 \text{ SD}$) abwichen, so lange eliminiert, bis sich alle LH-Konzentrationen innerhalb von zwei Standardabweichungen ($< \bar{x} + \text{SD}$) befanden.

Der so ermittelte Wert wurde als Basalkonzentration definiert (SCHALLENBERGER et al. 1985; SCHALLENBERGER 1990).

b) LH-Puls (P)

Da die Halbwertszeit von LH beim Hund mit 15 Minuten angegeben wird (SCHNEIDER 1992), wurden bei Blutentnahmen im 20 minütigen Abstand, Werte, die über dem Mittelwert plus zwei Standardabweichungen ($> \bar{x} + 2 \text{ SD}$) lagen, als LH-Puls angesehen. Gewertet wurden dabei nur Messwerte, bei denen zuvor und danach die LH-Basalkonzentration feststellbar war. Dementsprechend wurden die Werte zu Beginn und zum Ende des sechsständigen LH-Fensters nicht einbezogen und Werte $> \bar{x} + 2 \text{ SD}$, die nebeneinander lagen, als ein Puls angesehen.

c) LH-Maximum (Max.)

Als LH-Maximum wurde der höchste LH-Wert innerhalb eines LH-Fensters definiert.

d) AUC

Die “Area under the curve” (AUC) reflektiert die Verfügbarkeit von LH. Sie ist als Produkt der Summe aller LH-Werte eines Fensters und der Zeit (ng/ml x min) dargestellt.

- **Bearbeitung der Prostata- und Hodengröße**

Zur Bestimmung der Prostata- und der Hodengröße, wurde jeweils aus deren Länge und Breite die Fläche (cm²) berechnet (*Formel: Fläche=Länge x Breite x $\pi/2$*). Aufgrund der Normalverteilung der Werte, wurden die arithmetischen Mittel (\bar{x}) und die jeweilige Standardabweichung ermittelt.

- **Bearbeitung der Ergebnisse der Samenentnahme- und Untersuchung**

Für die Parameter Gesamtvolumen, Vorwärtsbeweglichkeit, Prozentzahl lebender Spermien, Gesamtspermienzahl und Prozentzahl pathologisch veränderter Spermien wurden aufgrund der Normalverteilung die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet.

Die Beobachtungen zum Sexualverhalten der Rüden während der Versuche zur Spermagewinnung wurden einem fünf Punkte Schema zugeordnet:

1. Normales Interesse an der Hündin, normaler Ablauf der Reflexkette, Ejakulatgewinnung möglich
2. Normales Interesse an der Hündin, normaler Ablauf der Reflexkette, Ejakulatgewinnung möglich, aber Azoospermie
3. Normales Interesse an der Hündin, normaler Ablauf der Reflexkette, Aspermie (kein Ejakulat zu gewinnen)
4. Kein Interesse an der Hündin, Erektion durch Masturbation induzierbar, Aspermie (kein Ejakulat zu gewinnen)
5. Kein Interesse an der Hündin, keine Erektion induzierbar, Aspermie (kein Ejakulat zu gewinnen)

- **Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität Giessen“. Zum Einsatz kam das Statistikprogramm BMDP/Dynamic, Release 7.0 (DIXON 1993). Es wurde wie folgt vorgegangen:

a) Auswertung der Daten der ersten 180 Tage

Bis zum Tag 180 nach Implantation wurden alle acht Hunde zu vergleichbaren Zeitpunkten beprobt und daher als eine Gruppe gehandhabt. Die Parameter Testosteron, Estradiol, LH (AUC, BC, Max.) Hoden- und Prostatagröße und Spermavolumen wurden anhand einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor Zeit ausgewertet. Für die übrigen Parameter kam eine deskriptive Statistik zur Anwendung.

b) Auswertung der Daten nach Entfernung des Implantates

Bei fünf Hunden (Tiere Gruppe 1 und Hund Elias, Gruppe 2) hielt die Wirkung des Implantates bis zu dessen Entfernung an. Da bei diesen Hunden alle Blutprobenentnahmen und Untersuchungen in der EP IV/4 zu vergleichbaren Zeitpunkten unternommen wurden, wurde diese Tiere für die Auswertung dieser Versuchsphase als eine Gruppe angesehen und die Variablen wie unter a beschrieben statistisch ausgewertet.

c) Auswertung der Daten nach Wirkungsende

Bei drei Hunden (Eddie, Elliott, Elvis, Gruppe 2) kam es zu einem Anstieg der Testosteronkonzentration vor Entfernung des Implantates nach 12 Monaten. Dabei wurde das Überschreiten von 0,5 ng/ml Testosteron im Plasma als Wirkungsende angesehen und die Rüden von diesem Zeitpunkt an einheitlich beprobt. Auch diese Hunde wurden daher für die Auswertung der Versuchsphase 4 als eine Gruppe angesehen, die weitere Auswertung erfolgte wieder wie unter a angegeben.

d) Spezielle Auswertung während des Testosteronanstiegs in EP IV und EP 4

Um den Testosteronanstieg aller Hunde in den beiden Gruppen auszuwerten, wurden die Messwerte von zu vergleichbaren Zeitpunkten entnommenen Proben einer Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor Zeit unterzogen. Gleichzeitig wurde auf Unterschiede zwischen den Hunden, bei denen das Implantat bis zur Entfernung wirkte und denen, die schon vorher ein Wirkungsende zeigten, untersucht.

e) Bewertung der Reversibilität

Um die Reversibilität der induzierten Behandlungseffekte zu überprüfen, wurden die letzten beiden Testosteron- und $E_2\beta$ -Konzentrationen vor der Behandlung mit „Gonazon®“ sowie die in EP II/2 ermittelten LH-Werte, Prostata- und Hodengrößen sowie Spermaparameter, mit den entsprechenden letzten, in EP IV bzw. EP 4 gewonnenen Ergebnissen mit Hilfe eines unpaarigen t-Tests verglichen.

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeiner Gesundheitsstatus der Tiere

Vor Versuchsbeginn wurde bei allen acht Hunden eine klinische Allgemeinuntersuchung sowie eine spezielle andrologische Untersuchung durchgeführt. Alle Rüden erwiesen sich als allgemein- und geschlechtsgesund, es wurden keine Hinweise auf Störungen der Spermatogenese gefunden.

Abgesehen von oberflächlichen Verletzungen nach anfänglichen Rangordnungskämpfen, blieben die Tiere über den ganzen Versuch hinweg gesund und zeigten keine Auffälligkeiten. Lediglich ein Hund der Gruppe 2 (Eddie) zeigte 7 Wochen nach Implantation einen leichten epileptischen Anfall. Der Hund wurde in der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig Universität Giessen gründlich untersucht, jedoch keine Ursache für den Anfall gefunden. Da beim Beagle eine genetische Disposition für primäre Epilepsie besteht und das Tier während des restlichen Versuchs keinerlei Anfälle mehr zeigte, wurde der beobachtete epileptische Anfall nicht in Zusammenhang mit der Behandlung mit „Gonazon®“ gesehen.

Während der Studie wurden die Rüden regelmäßig mit Drontal plus® (Bayer) entwurmt und mit Nobivac® (Intervet) SHP+LT geimpft.

4.2 Einsetzen und Entnahme der Implantate

Das Einsetzen des Implantats erfolgte ohne Betäubung subkutan in die Nabelregion, was von allen Hunden gut toleriert wurde.

Bei der wöchentlichen Kontrolle der Implantationsstelle wurden keine Auffälligkeiten beobachtet.

Die Entfernung der Implantate fand nach Lokalanästhesie mit jeweils 0,5 ml Procasel® statt. Durch einen 1 cm langen Hautschnitt konnte das Implantat bei fünf Hunden ohne Probleme innerhalb von wenigen Minuten freipräpariert werden. Bei drei Hunden (Elvis, Jonathan, Julien) war die Entfernung schwieriger und dauerte bis zu 10 Minuten, da das Implantat stark mit der Unterhaut verwachsen und in Bindegewebe eingekapselt war; eine Nachdosierung mit Procasel® erwies sich als notwendig.

Der Hautschnitt heilte bei allen Hunden per primam, das Nahtmaterial wurde nach 10 Tagen gezogen.

4.3 Ergebnisse der Testosteronbestimmungen

- **Vor Implantation**

Vor Einsetzen des Implantates wurde von jedem Hund zu 11 unterschiedlichen Zeitpunkten Plasma (siehe Kapitel Versuchsdurchführung) gewonnen. Die gemessenen Konzentrationen für Testosteron lagen zwischen 0,7 und 2,1 ng/ml Plasma, der daraus errechnete geometrische Mittelwert lag bei 1,2 ng/ml (SF 2,8).

- **Während der ersten 180 Tage nach Implantation**

Während der ersten zwei Tage nach der Implantation kam es zu einem signifikanten ($p < 0,0001$) Anstieg der Testosteronkonzentration im Plasma, wobei ein durchschnittliches Maximum [$\bar{x}_g/(SF)$] von 4,6/(1,5) ng/ml erreicht wurde. Im Vergleich zu den Testosteronwerten vor der Behandlung waren die Konzentrationen während dieses initialen Testosteronanstiegs um den Faktor 3,8 erhöht.

Innerhalb von 29 Tagen kam es danach zu einem Abfall auf Werte unterhalb der fiktiven Nachweisgrenze von 0,1 ng/ml Plasma.

Während der ersten 180 Tage nach der Behandlung mit „Gonazon®“ blieben bei allen Hunden ab diesem Zeitpunkt die Testosteronkonzentrationen im Plasma unterhalb der Nachweisgrenze.

Eine Ausnahme bildete lediglich der Hund Jackson (Gruppe 2), bei dem zu zwei Zeitpunkten (Tag 36 und 43 nach Implantation) Testosteron im Plasma nachweisbar war (0,3 und 0,9 ng/ml).

Die mittleren Testosteronkonzentrationen vor Implantation und während der ersten 180 Tage danach sind in Tabelle 3 und Abbildung 11 dargestellt.

Während bei der Gruppe 1 das Implantat nach 180 Tagen entfernt wurde, behielten es die Hunde der Gruppe 2, unabhängig von der Wirkungsdauer, bis zum Tag 365 nach Implantation.

Tab. 3: Mittelwerte (\bar{x} g/SF) der Testosteron- und Estradiol-17 β -Konzentrationen von allen Hunden vor Implantation und bis 180 Tage danach

Datum	Tage	Testosteron ng/ml		Estradiol pg/ml	
		\bar{x} g	SF	\bar{x} g	SF
21.06.04	-23	0.7	4.1	9.2	1.7
25.06.04	-19	0.9	2.1	8.8	1.3
29.06.04	-15	0.9	2.2	7.8	1.6
02.07.04	-12	0.5	2.6	6.1	2.0
07.07.04	-7	1.8	2.7	4.5	1.5
09.07.04	-5	1.0	2.9	9.5	1.3
12.07.2004 ¹	-2	1.5	3.3	8.2	1.3
12.07.2004 ²	-2	2.1	1.5	3.8	1.3
13.07.2004 ¹	-1	1.9	2.8	5.6	1.3
13.07.2004 ²	-1	1.4	2.2	9.3	1.2
14.07.2004 ¹	0	1.6	2.6	14.3	1.3
14.07.2004 ²	0	3.3	1.4	13.2	1.3
15.07.2004 ¹	1	3.4	2.7	6.8	1.7
15.07.2004 ²	1	4.1	1.6	6.4	1.5
16.07.2004 ¹	2	4.6	1.5	16.8	1.4
16.07.2004 ²	2	4.4	1.5	9.9	1.3
17.07.2004 ¹	3	4.1	1.7	14.6	1.4
17.07.2004 ²	3	4.1	1.6	18.2	1.4
18.07.2004 ¹	4	3.4	1.3	10.9	1.3
18.07.2004 ²	4	3.3	1.5	7.1	1.4
20.07.04	6	1.6	2.4	6.0	1.8
22.07.04	8	0.7	3.5	3.0	1.5
24.07.04	10	0.2	3.4	4.4	1.5
30.07.04	16	0.1	1.8	5.4	1.3
06.08.04	22	0.1	1.5	5.8	1.4
13.08.04	29	0.1	1.0	3.1	1.7
29.08.04	36	0.1	1.5	2.6	1.5
27.08.04	43	0.1	2.2	8.0	1.3
03.09.04	50	0.1	1.0	6.0	1.5
10.09.04	57	0.1	1.0	6.8	1.2
17.09.04	64	0.1	1.0	9.2	1.2
24.09.04	71	0.1	1.0	5.7	1.7
01.10.04	78	0.1	1.0	5.5	1.2
08.10.04	85	0.1	1.0	4.7	1.3
15.10.04	92	0.1	1.0	2.6	1.3
22.10.04	99	0.1	1.0	4.2	1.3
29.10.04	106	0.1	1.0	3.5	1.5
05.11.04	113	0.1	1.0	6.5	1.4
12.11.04	120	0.1	1.0	5.8	1.4
19.11.04	127	0.1	1.0	8.0	1.3
26.11.04	134	0.1	1.0	6.5	1.3
03.12.04	142	0.1	1.0	8.9	1.3
10.12.04	149	0.1	1.0	3.7	1.4
17.12.04	156	0.1	1.0	6.4	1.1
23.12.04	163	0.1	1.0	11.3	1.2
01.01.05	170	0.1	1.0	3.8	1.5
07.01.05	177	0.1	1.0	4.4	1.9

¹ = 8a.m., ² = 8 p.m., * = erste Blutprobe nach Implantation

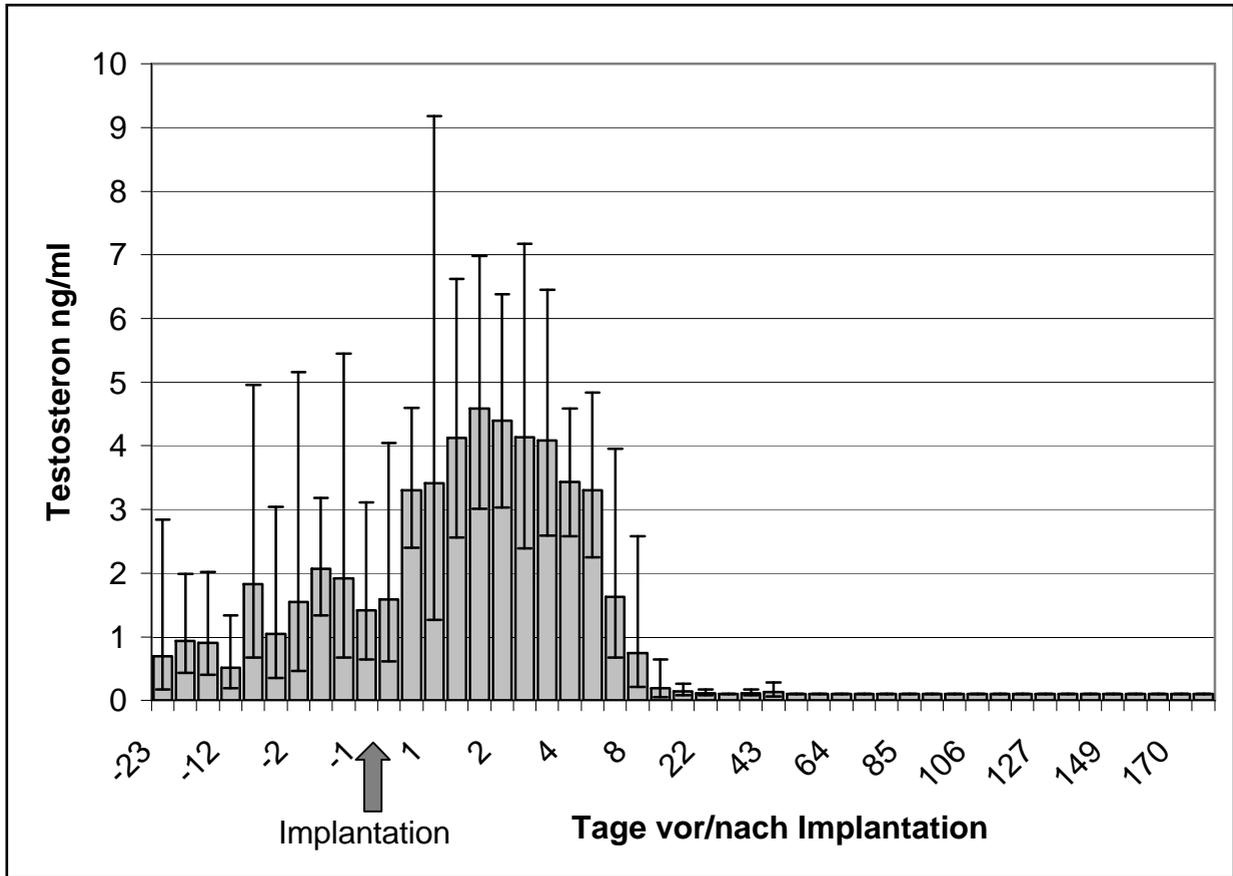


Abb. 11: Mittlere Testosteronkonzentration (\bar{x}_g/SF) vor und während der ersten 180 Tage nach Implantation von allen acht Hunden

- **Nach Entfernung des Implantates bzw. nach Wirkungsverlust**

Die Hunde der Gruppe 1 und der Hund Elias der Gruppe 2 wurden als eine Gruppe zusammengefasst, da bei ihnen die Downregulation bis zur Entfernung des Implantates anhielt und die Probenentnahmen in der vierten Versuchsphase (EP IV und EP 4) zu vergleichbaren Zeitpunkten statt fanden.

Der Hund Elias zeigte zwar einen kurzfristigen Anstieg von Testosteron am Tag 324 (2,8ng/ml), danach kam es jedoch innerhalb von drei Wochen wieder zu einem Abfall unter die Nachweisgrenze und Testosteron konnte bis zur Entfernung des Implantates am Tag 365 nicht mehr im Plasma nachgewiesen werden.

Bei diesen fünf Rüden kam es nach Implantatentfernung zu einem signifikanten Anstieg der Testosteronkonzentration ($p < 0,0001$). Nach sieben Wochen waren mit 1,3/(2,9) ng/ml [\bar{x} g/(SF)] die Ausgangswerte wieder erreicht (s. Tab. 4, Abb. 12). Die Testosteronkonzentrationen im Plasma stiegen bis zur 20. Woche nach Entfernung des Implantates weiter an und erreichten zu diesem Zeitpunkt Werte zwischen 3,8 und 9,8 ng/ml.

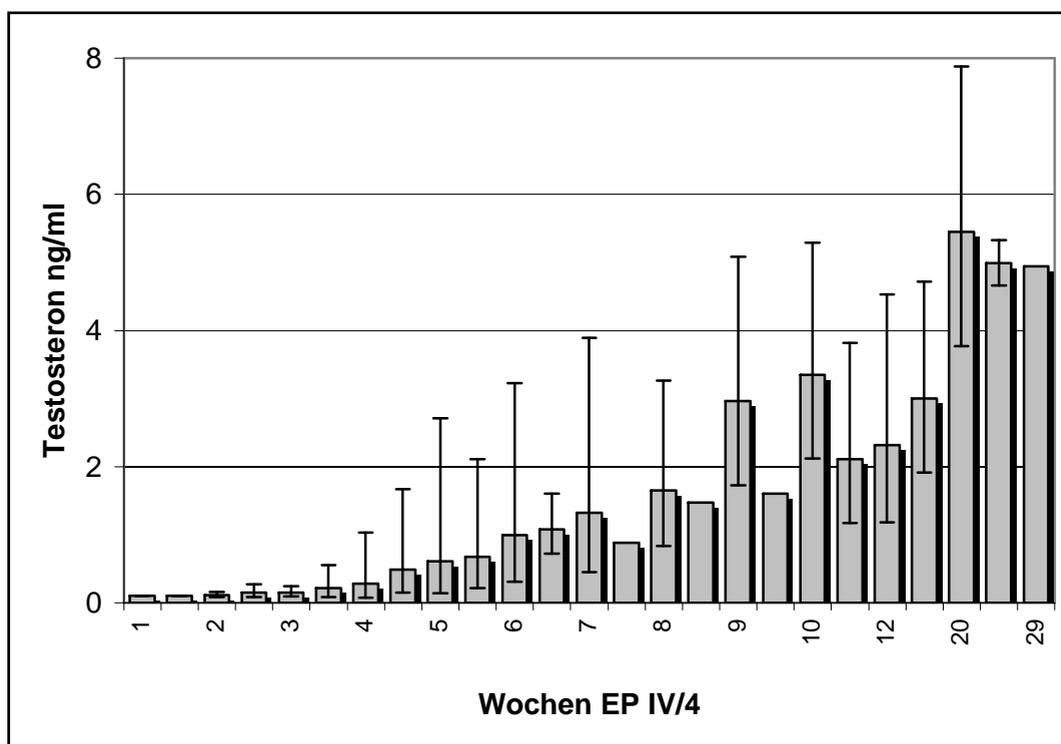


Abb. 12: Testosteronkonzentrationen im Plasma (\bar{x} g/SF) nach Entfernung des Implantates bei den Hunden der Gruppe 1 und Hund Elias, Gruppe 2 (z.T. keine Berechnung des Streufaktors möglich)

Tab. 4: Mittelwerte (\bar{x}_g /SF) der Testosteron- und Estradiol-17 β -Konzentrationen nach Implantatentfernung bei den Hunden der Gruppe 1 und Hund Elias, Gruppe 2

Wochen EP IV/4	Testosteron ng/ml		Estradiol-17 β pg/ml	
	\bar{x}_g	SF	\bar{x}_g	SF
1	0.1	1	7.3	1.4
	0.1	1	3.9	1.5
2	0.1	1.4	5.4	2.1
	0.2	1.8	3.6	2.1
3	0.2	1.6	7.5	1.3
	0.3	2.6	8.3	1.4
4	0.4	3.7	4.7	2.0
	0.5	3.4	8.6	1.4
5	0.7	4.4	6.6	1.1
	0.7	3.1	7.0	1.6
6	1.1	3.3	9.2	1.7
	0.5	1.5	5.1	2.2
7	1.3	2.9	15.4	1.3
	0.9	*	11.0	*
8	1.6	2.0	10.5	1.4
	1.5	*	20.2	*
9	3.0	1.7	17.5	1.2
	1.6	*	12.0	*
10	3.3	1.6	12.8	1.3
11	2.1	1.8	12.7	2.8
12	2.3	2.0	11.0	2.7
16	3.0	1.6	9.8	2.1
20	5.5	1.4	13.2	1.3
24/25	5.0	1.1	13.9	1.2
29	4.9	*	13.1	*

* = keine Berechnung des Streufaktors möglich (< 3 Messwerte)

Bei den zu Gruppe 2 gehörenden Hunden Elvis, Elliott und Eddie kam es zu einem Anstieg der Testosteronkonzentration nach 177, 282 und 296 Tagen. Dabei wurde das Überschreiten eines Wertes von 0,5 ng/ml Testosteron im Plasma als Wirkungsende angesehen, was nach 223 (Elvis), 307 (Elliott) und 324 Tagen (Eddie) der Fall war.

• **Vergleich des Testosteronanstiegs nach Implantatentfernung bzw. Wirkungsende**

Da alle acht Hunde nach dem erfolgten Wiederanstieg von Testosteron auf Werte > 0,5 ng/ml über sechs Wochen zu vergleichbaren Zeitpunkten beprobt wurden, konnten die während dieses Zeitraumes erhaltenen Werte verglichen werden. Zwischen den Tieren, bei denen die Wirkung bis zur Implantatentfernung anhielt (n=5) und denen, bei denen es schon vorher zu einem Wirkungsverlust gekommen war (n=3), zeigte sich im Testosteronanstiegs kein Unterschied (p= 0,3), der Effekt der Zeit war bei allen Tieren hoch signifikant (p < 0,0001) (s. Tab. 5).

Tab. 5: Verlauf der Testosteronwerte (ng/ml) nach Implantatentfernung bzw. Wirkungsverlust

Wochen	Nach Implantatentfernung					Nach Wirkungsverlust			Mittel	
	Jackson ¹	Jeremy ¹	Jonathan ¹	Julien ¹	Elias ²	Eddie ²	Elliott ²	Elvis ²	\bar{X}_g	SF
0	0.3	0.2	0.4	0.2	0.2	0.3	0.3	0.4	0.3	1.6
1 ³	1.1	0.9	0.7	0.5	1.2	0.8	0.9	0.6	0.8	2.1
2	1.7	1.5	1.3	0.5	3	2.8	1.2	0.7	1.4	2.8
3	2	2.4	1.7	1.7	2.7	1.1	1.2	0.6	1.5	1.6
4	4.4	1.4	2.4	2.3	3.3	1.1	1.9	1.9	2.1	1.5
5	1.9	1.2	0.9	2.8	4.5	1.0	4.5	1.4	1.9	1.8

¹ = Gruppe 1, ² = Gruppe 2, ³ = Woche mit dem ersten Wert > 0,5 ng/ml

• **Ergebnisse zur Reversibilität**

Durchschnittlich sieben Wochen nach Implantatentfernung bzw. eine Woche nach Wirkungsverlust, lagen bei alle Hunde die Testosteronkonzentrationen wieder in Höhe der Ausgangswerte vor der Implantation. Danach stiegen die Testosteronwerte bis Woche 20 der Versuchsphasen IV/4 jedoch weiter an, so dass bei allen acht Hunden die Testosteronkonzentrationen in den letzten beiden Blutproben der Versuchsphasen IV/4 mit einer mittleren Konzentration von [\bar{X}_g /(SF)] 4,1/(1,6) ng/ml signifikant (p< 0,001) höher waren als die der letzten beiden Blutproben vor Implantation [1,5/(2,3) ng/ml] (s. Tab. 6).

Tab. 6: Testosteronkonzentrationen und Mittelwerte (\bar{x}_g/SF) der letzten beiden Blutproben vor Implantation und der letzten beiden Blutproben von EP IV und EP 4 von allen acht Hunden

Hund	Testosteron ng/ml			
	Vor Implantation		Ende von EP IV/4	
Jackson	1.3	0.6	5.6	5.4
Jeremy	3.5	5.2	6.7	4.7
Jonathan	2.2	2	5.5	2.8
Julien	0.4	4	6.1	5.2
Elias	3.6	3.5	3.7	4.2
Eddie	0.6	0.5	1.4	6.8
Elliott	1.7	0.6	2.3	2.7
Elvis	1.1	1.5	8.0	10.8
\bar{x}_g	1.5		4.1	
SF	2.3		1.6	

4.4 Ergebnisse der Estradiol-17 β -Bestimmungen

- **Vor Implantation**

Analog zu Testosteron wurde auch Estradiol-17 β in den 11 Plasmaproben, die vor der Behandlung mit „Gonazon®“ (s. Kap. Versuchsdurchführung) gewonnen worden waren, bestimmt. Die Konzentrationen lagen zwischen 2,0 und 20,3 pg/ml Plasma, der daraus errechnete geometrische Mittelwert lag bei 7,4 pg/ml (SF 1,7).

- **Während der ersten 180 Tage nach Implantation**

Der Verlauf von Estradiol im Plasma zeigte während der ersten drei Tage nach der Implantation einen signifikanten ($p < 0,0001$) Anstieg. Die Maximalwerte lagen im Mittel [$\bar{x}_g/(SF)$] bei 18,2/(1,4) pg/ml. Im Vergleich zu den Estradiolwerten vor der Behandlung waren die Konzentrationen während dieses initialen Anstiegs um den Faktor 2,5 erhöht.

Ab Tag 8 nach Implantation sanken die Werte dann deutlich ($p < 0,0001$) ab, für den weiteren Verlauf der Messungen ergab sich ein Mittelwert von [$\bar{x}_g/(SF)$] 5,2/(1,7) pg/ml Plasma ab.

Die Konzentrationen von Estradiol-17 β im Plasma vor Implantation und während der ersten 180 Tage danach sind in Tabelle 3 und Abbildung 13 dargestellt.

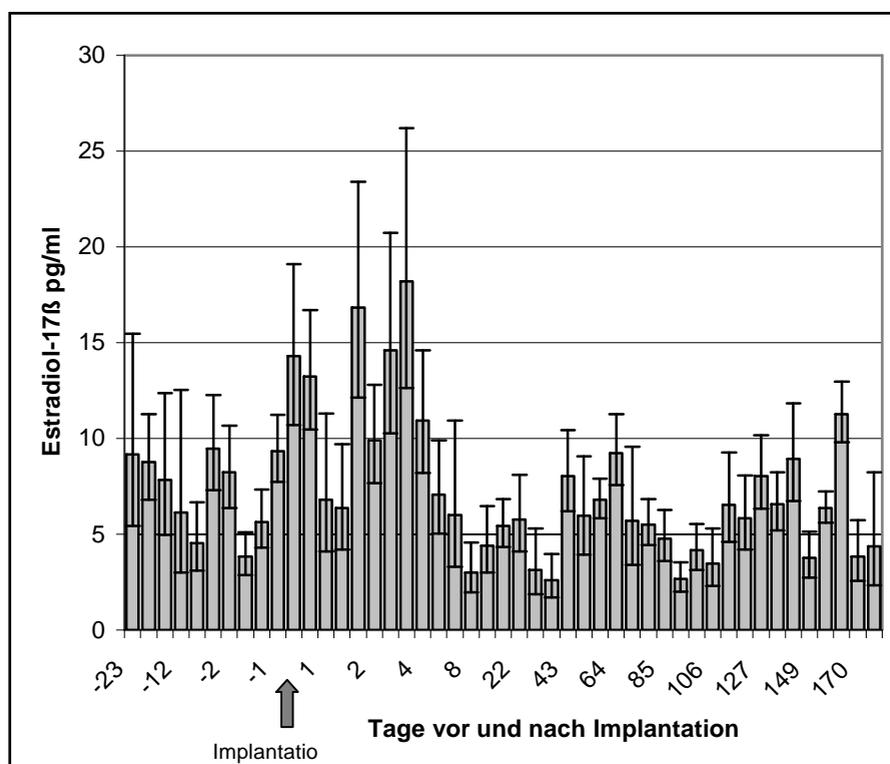


Abb. 13: Mittlere Estradiol-17 β -Konzentrationen (\bar{x}_g/SF) vor und während der ersten 180 Tagen nach Implantation von allen acht Hunden

- Nach Entfernung des Implantats bzw. nach Wirkungsverlust

Nach Implantatentfernung zeigte sich bei den Hunden der Gruppe 1 und Hund Elias, Gruppe 2, ein signifikanten Anstieg der Estradiolkonzentrationen ($p < 0,0001$). Mit 7,5 (1,3) pg/ml [$\bar{x}_g/(SF)$] wurden die Ausgangswerte nach drei Wochen wieder erreicht (s. Tab. 4, Abb. 14).

Ähnlich zum Verlauf der Testosteronkonzentrationen, stiegen auch die Estradiol-17 β -Werte im Plasma weiter an, wobei sich mit Werten von zum Teil > 20 pg/ml in den Wochen 9 bis 12 ein Maximum ergab.

Die Estradiol-17 β -Konzentrationen der drei Hunde der Gruppe 2 (Eddie, Elliott, Elvis), bei denen es vor Implantatentfernung zu einem Wirkungsverlust kam, zeigten einen ähnlichen Verlauf.

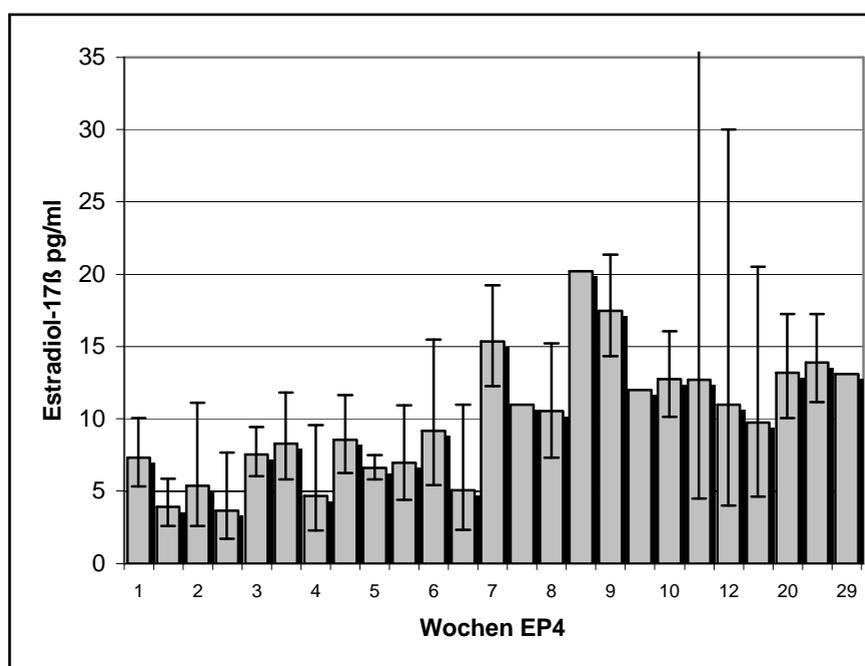


Abb. 14: Estradiol-17 β -Konzentrationen im Plasma ($\bar{x}_g/(SF)$) nach Entfernung des Implantates bei den Hunden der Gruppe 1 und Hund Elias, Gruppe 2 (z.T. keine Berechnung des Streufaktors möglich)

- **Vergleich des Estradiol-Anstiegs nach Implantatentfernung und Wirkungsende**

Die Situation war analog zu der von Testosteron (s. S.63).

Zwischen den Tieren, bei denen die Wirkung bis zur Implantatentfernung anhielt ($n=5$) und denen, bei denen es vorher zu einem Wirkungsverlust gekommen war ($n=3$), zeigte sich bezüglich des Estradiol-Anstiegs kein signifikanter Unterschied ($p= 0,08$), während der Effekt der Zeit auch hier signifikant ($p= 0,03$) war (s. Tab. 7).

Tab. 7: Verlauf der Estradiol-17- β -Werte (pg/ml) nach Implantatentfernung bzw. Wirkungsverlust

Wochen	Nach Implantatentfernung					Nach Wirkungsverlust			Mittel	
	Jackson ¹	Jeremy ¹	Jonathan ¹	Julien ¹	Elias ²	Eddie ²	Elliott ²	Elvis ²	\bar{X}_g	SF
0	14	3.6	15.6	4	5.2	8.8	8.8	7.2	7.4	1.7
1 ³	9.2	10.8	9.2	6	5.6	11.6	5.2	14.4	8.5	1.5
2	12	6.4	16.4	4.4	5.6	2.0	10.4	9.2	7.0	1.9
3	13.2	5.6	10.8	10.4	5.6	11.6	9.2	14.8	9.6	1.4
4	21.6	15.6	16.4	22.0	14	2.0	2.0	7.2	9.1	2.7
5	6.4	12.4	21.2	10.8	17.2	9.0	10.8	7.2	11.0	1.5

¹ = Gruppe 1, ² = Gruppe 2, ³ = Woche mit erstem Testosteronwert > 0,5 ng/ml

• **Ergebnisse zur Reversibilität**

Nach Implantatentfernung bzw. Wirkungsverlust kam es zu einem Anstieg der Estradiolkonzentration auf Werte von zum Teil über 20 pg/ml (s. Tab. 4). Danach zeigte sich ein Abfall der Werte; mit 10,2/(1,9) pg/ml unterschied sich der Mittelwert [\bar{X}_g /(SF)] der letzten beiden Blutproben der vierten Versuchsphase nicht signifikant ($p= 0,9$) von dem Mittelwert der letzten beiden Blutproben vor Implantation [11,5/(1,4) pg/ml] (s. Tab. 8).

Tab. 8: Estradiol-17 β -Konzentrationen und Mittelwerte (\bar{X}_g /SF) der letzten beiden Blutproben vor Implantation und der letzten beiden Blutproben von EP IV/4 von allen acht Hunden

Hund	Estradiol 17 β pg/ml			
	vor Implantation		Ende von EP IV/ 4	
Jackson	11.40	12.20	10.00	12.40
Jeremy	10.7	19.2	16.5	11.6
Jonathan	10.1	14.6	17.2	10.8
Julien	6.9	20.3	16.8	14.8
Elias	11	13.2	26.4	17.0
Eddie	7.5	8.8	6.8	2
Elliott	9.4	18.6	12.0	7.2
Elvis	8.5	11.6	4	6.4
\bar{X}_g	11.5		10.2	
SF	1.4		1.9	

4.5 Ergebnisse der LH-Bestimmungen

Bei den Hunden der Gruppe 1 und Hund Elvis der Gruppe 2 fielen insgesamt 5 LH-Fenster an. Aufgrund der unterschiedlich langen Wirkungsdauer des Implantates bei den Hunden der Gruppe 2, ergaben sich bei den Rüden Eddie und Elliott jeweils noch ein 6., bei Elias ein 6. und 7. zusätzliches LH-Fenster.

- **Vor Implantation**

Die vor der Implantation für die Parameter AUC, Basalkonzentration (BC) und LH-Maximum ermittelten Werte lagen bei allen acht Hunden im Mittel $[\bar{x}_g/(SF)]$ bei 337,6(1,5) ng/ml*min, 1,6/(1,6) ng/ml bzw. 1,7/(1,5) ng/ml (s. Tab.9).

- **Während der ersten 180 Tage nach Implantation**

Nach Einsetzen des Implantates kam es zu einem signifikanten Abfall ($p < 0,0001$) der Parameter AUC, Basalkonzentration (BC) und Maximum (s. Tab. 9; Abb. 15 und 16). So zeigte sich 11 Wochen nach Behandlung eine Verringerung der AUC um 70,6%, nach 11 weiteren Wochen war nochmals ein geringer Abfall auf ca. 26 % der Ausgangswerte zu beobachten. Die Basalkonzentrationen und die Maximalwerte waren bis zur 11. Woche nach der Implantation um 82,4 % und 81,2 % abgefallen, ein weiterer Abfall bis zur 22. Woche wurde nicht beobachtet (s. Abb. 19 und 20)

Es zeigte sich zudem, dass 7 von 8 Hunden einen annähernd gleich verlaufenden Abfall der AUC auf Werte zwischen 76-86 ng/ml*min in der Woche 22 nach Implantation aufwiesen, bei Hund Julien (Gruppe 1) fiel die AUC dagegen nur auf einen Wert von 196 ng/ml*min ab, d.h. auf 54 % des Ausgangswertes (Abb. 20).

Während der Kontrollphase vor der Implantation ließen sich vereinzelte Pulse in der LH-Freisetzung nur bei den Rüden der Gruppe 2 darstellen. Unter der Wirkung des Implantates konnten bei keinem Tier LH-Pulse festgestellt werden, nach Wirkungsende bzw.

Implantatentfernung traten bei 3 Tieren aus Gruppe 1 und 2 Tieren aus Gruppe 2 LH-Pulse auf (Abb. 18-20). Im Hinblick auf die niedrige „Trefferquote“ wurde eine statistische Auswertung nicht durchgeführt.

Tab. 9: Mittelwerte (\bar{x}_g/SF) LH-Freisetzung (AUC, Basalkonzentration und Maximum) vor Behandlung, in den ersten 180 Tagen nach Implantation und während der vierten Versuchsphase

Parameter	LH Fenster	\bar{x}_g	SF
AUC	vor Implantation	337.6	1.5
	11 Wochen n. Impl.	99.1	1.5
	22 Wochen n. Impl.	89.3	1.4
	Woche 4, EP IV/4	148.0	1.5
	Woche 12, EP IV/4	285.4	1.5
BC	vor Implantation	1.6	1.5
	11 Wochen n. Impl.	0.3	1.6
	22 Wochen n. Impl.	0.3	1.6
	Woche 4, EP IV/4	0.6	1.4
	Woche 12, EP IV/4	1.2	1.7
Maximum	vor Implantation	1.7	1.6
	11 Wochen n. Impl.	0.3	1.6
	22 Wochen n. Impl.	0.3	1.6
	Woche 4, EP IV/4	0.7	1.4
	Woche 12, EP IV/4	1.4	1.3

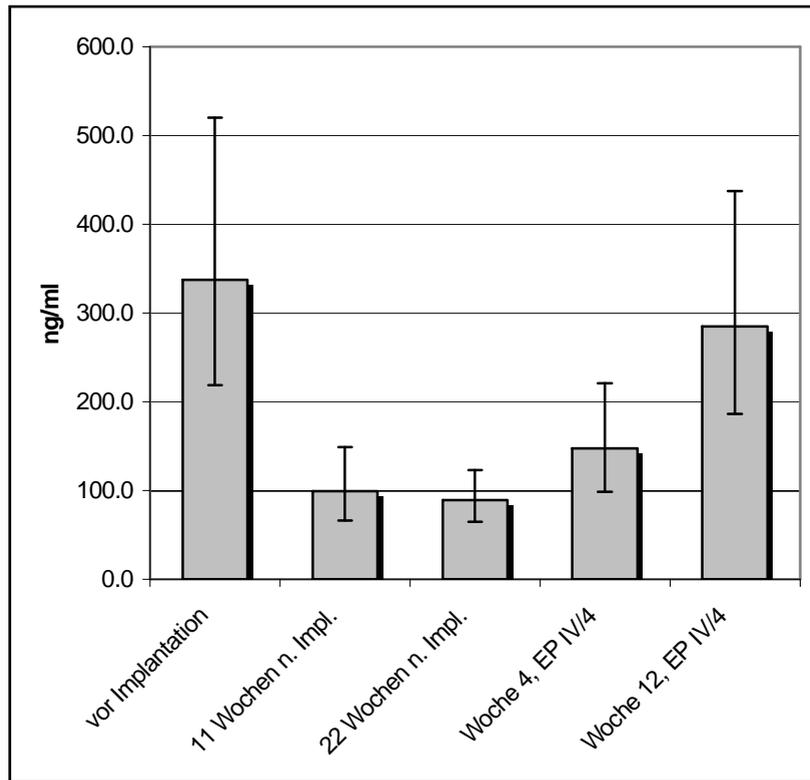


Abb. 15: Mittelwert (\bar{x}_g/SF) AUC (ng/ml*min) von allen Hunden vor Implantation, 11 und 22 Wochen danach sowie in den Wochen 4 und 12 der Versuchsphase IV/4

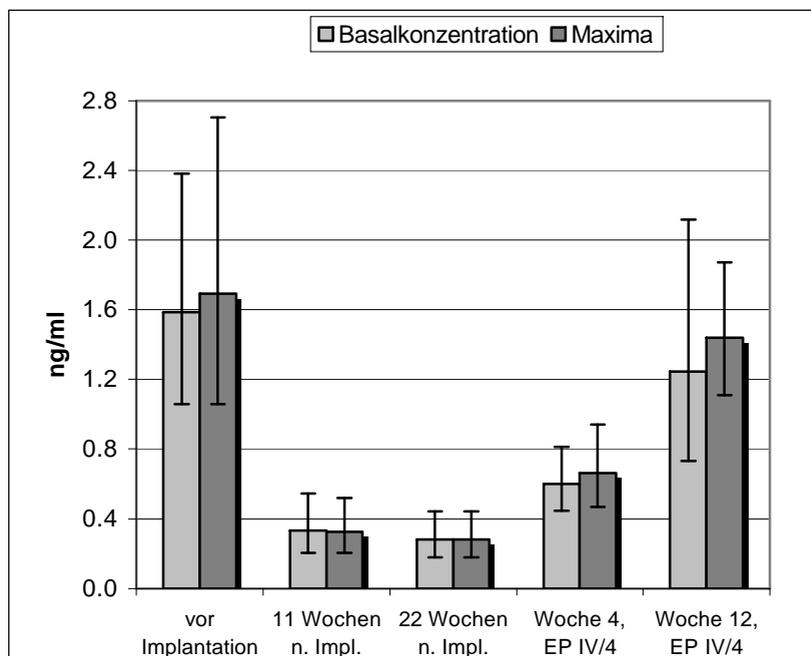


Abb. 16: Mittelwerte (\bar{x}_g/SF) LH-Basalkonzentration und Maxima (ng/ml) von allen Hunden vor Implantation, 11 und 22 Wochen danach sowie in den Wochen 4 und 12 der Versuchsphase IV/4

- **Nach Entfernung des Implantates bzw. nach Wirkungsverlust**

Nach Entfernung des Implantates bzw. nach Ende der Wirkungsdauer, konnte bei allen Hunden ein signifikanten Anstieg ($p < 0,0001$) der Verfügbarkeit von LH in den Wochen 4 und 12 der vierten Versuchsphase festgestellt werden (Abb. 15 und 16). Dabei erreichte die AUC im Mittel $[\bar{x}_g/(SF)]$ 148/(1,5) ng/ml*min in Woche 4 und 310/(1,5) ng/ml*min in Woche 12.

Bei den Hunden Eddie und Elias zeigte sich schon vor der Versuchsphase 4 ein leichter Anstieg der AUC ab Woche 35 nach Implantation (s. Abb. 17).

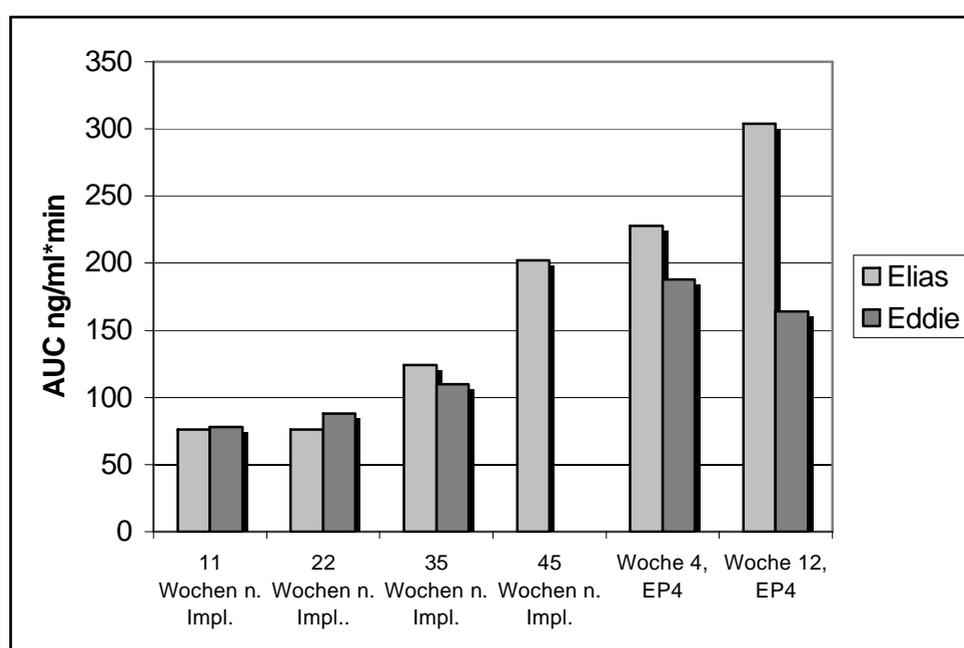


Abb. 17: Anstieg der AUC bei den Hunden Eddie und Elias ab Woche 35 nach Implantation

- **Ergebnisse zur Reversibilität**

Die Werte 11 Wochen nach Implantatentfernung bzw. Wirkungsverlust unterschieden sich im Mittel nicht signifikant ($p < 0,5$) von denen vor Implantation (Tabelle 10).

Da bei dem Rüden Elvis (Gruppe 2) in Woche 12 der Versuchsphase 4 im Vergleich zu den Werten vor Implantation jedoch eine deutlich geringere AUC ermittelt wurde und der Hund bis Versuchsende eine Oligo- und Teratozoospermie zeigte, wurde für diesen Hund ein zusätzliches LH-Fenster, 50 Wochen nach Wirkungsende angesetzt. Die dort ermittelten Werte (AUC 582 ng/ml*min) unterschieden sich nicht von denen vor der Behandlung (AUC 544 ng/ml*min).

In den Abbildungen 18, 19 und 20 ist beispielhaft an zwei Rüden der Gruppe 1 und dem Rüden Elliott, Gruppe 2, der Verlauf der Konzentrationen von LH während der Zeitfenster vor sowie 22 Wochen nach Implantation und in Woche 12 der vierten Versuchsphase dargestellt. Der Effekt der Downregulierung in der 22. Woche ist eindeutig erkennbar, ebenso wie deren Reversibilität.

Tab. 10: Mittelwerte der LH-Parameter (AUC, BC und Maxima) vor Implantation und in Woche 12 der vierten Versuchsphase (letztes LH-Fenster)

Hund	LH vor Implantation			LH Woche 12, EPIV/4		
	AUC	BC	Max.	AUC	BC	Max.
Jackson	498	3.1	2.9	288	1.6	1.8
Jeremy	380	1.5	1.4	626	1.7	5
Jonathan	364	1.4	1.2	302	1.3	1.1
Julien	360	1.2	1.1	346	1.5	1.3
Elias	134	0.75	1	304	1.2	1.2
Eddie	270	1.3	2.1	164	0.7	1
Elliott	346	2.1	2.2	286	1.3	1.2
Elvis	544	2.6	2.7	164	1	1
\bar{X}_g	337	1.6	1.7	285	1.2	1.4
SF	1.5	1.6	1.5	1.5	1.3	1.7

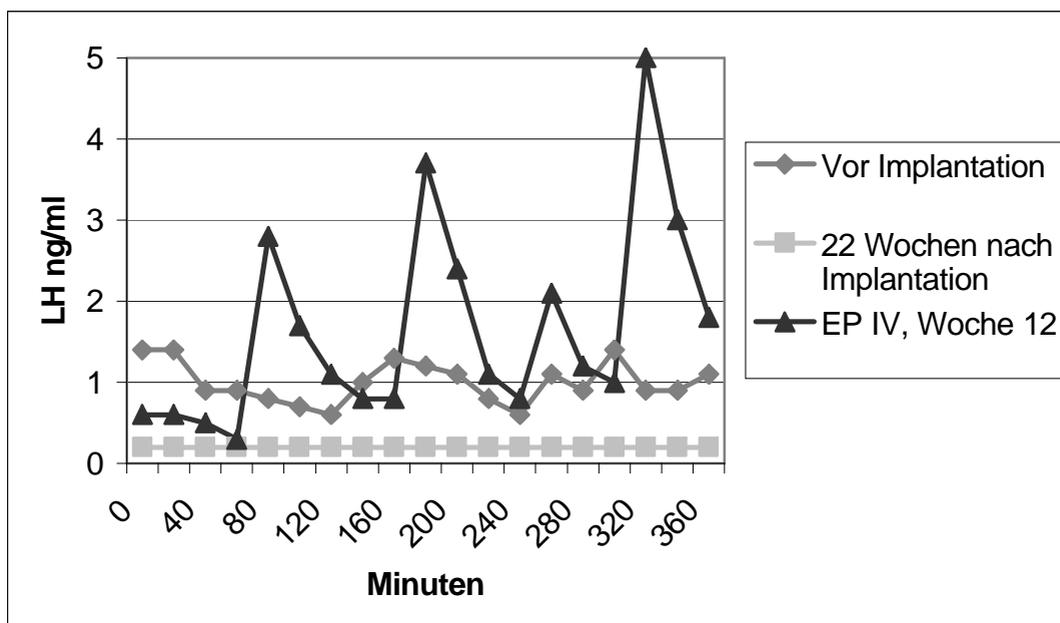


Abb. 18: LH-Konzentration (ng/ml) über drei verschiedene LH-Fenster (vor Implantation, 22 Wochen danach und in Woche 12, EP IV) bei Hund Jeremy, Gruppe 1

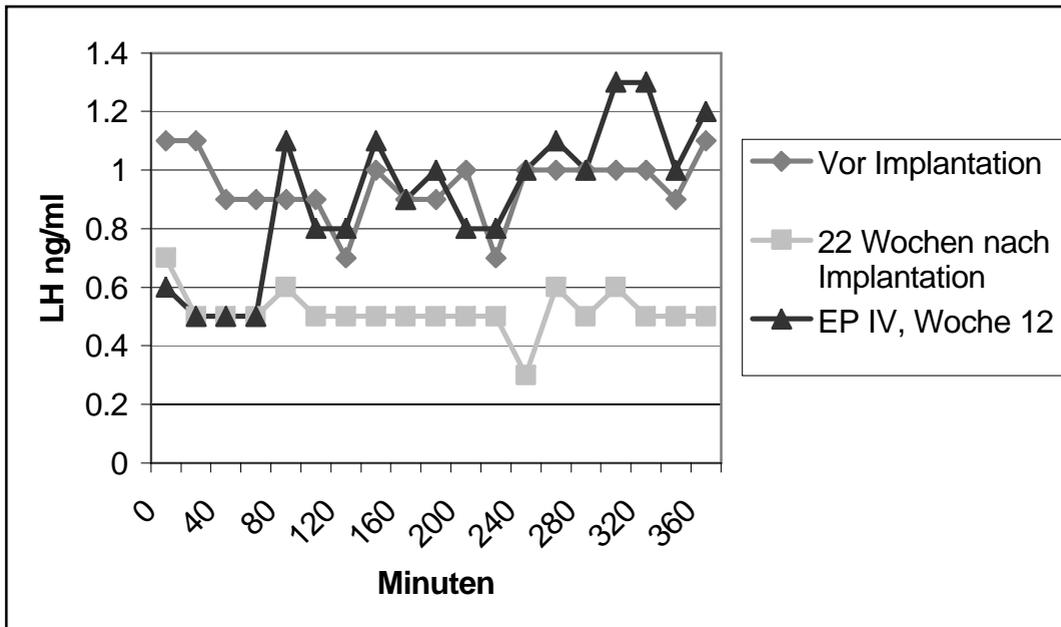


Abb. 19: LH-Konzentration (ng/ml) über drei verschiedene LH-Fenster (vor Implantation, 22 Wochen danach und in Woche 12, EP IV) bei Hund Julien, Gruppe 1

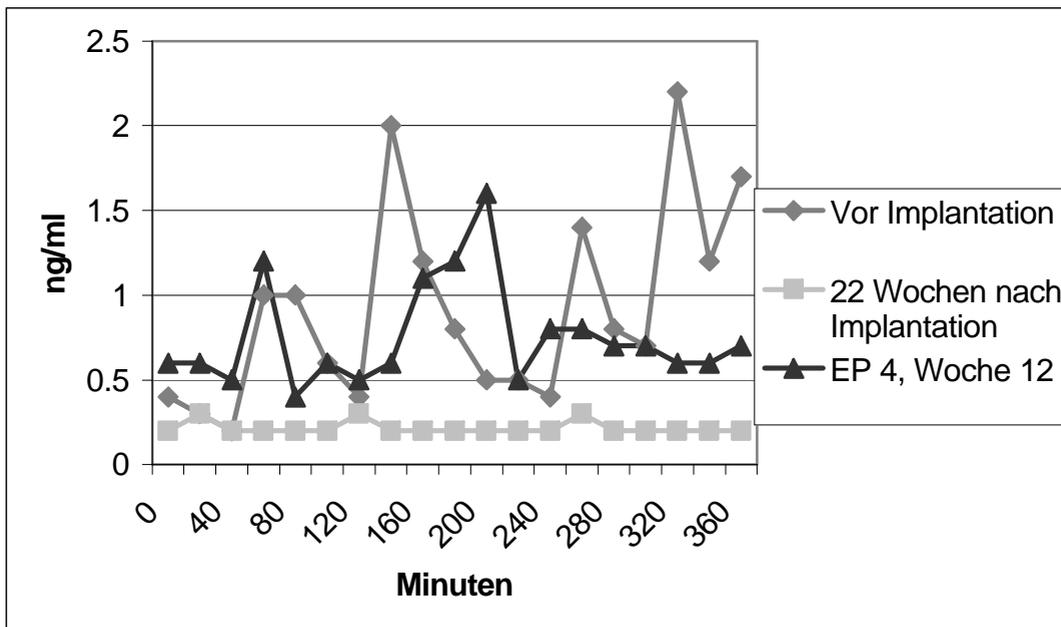


Abb. 20: LH-Konzentration (ng/ml) über drei verschiedene LH-Fenster (vor Implantation, 22 Wochen danach und in Woche 12, EP 4) bei Hund Elliott, Gruppe 2

4.6 Erfassung der Hodengröße

- **Vor Implantation**

Die vor Implantation ermittelte Hodengröße lag im Mittel (\bar{x} / (SD)] bei 35,4 (9,9) cm² (siehe Tab. 13). Die Konsistenz der Hoden war bei allen acht Rüden prall-elastisch, sonografisch zeigten sich die Hoden aller Hunde unauffällig.

- **Während der ersten 180 Tage nach Implantation**

Während der ersten 180 Tage nach der Behandlung nahm die Hodengröße bei allen Hunden signifikant ab ($p < 0,0001$).

Eine Verkleinerung war schon ab der dritten Woche nach Implantation sichtbar, nach 13 (Julien) bis 23 (Jonathan) Wochen wurden Minimalwerte erreicht, die sich bis zur Implantatentfernung bzw. bis zum Wirkungsende nicht mehr veränderten.

Im Durchschnitt kam es zu einer Verkleinerung der Hodengröße um 82% (s. Tab.11; Abb.21).

Tab. 11: Mittelwerte (\bar{x} /SD) Hoden- und Prostatagröße (cm²) bei allen acht Hunden vor Implantation und während der ersten 180 Tage danach (bis Woche 25)

Wochen nach Implantation	Hodengröße		Prostatagröße	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
Vor Implantation	35.4	9.9	10.6	3.1
1	32.6	8.1	11.0	1.8
3	23.5	4.8	7.3	1.5
5	20.6	5.5	5.7	2.3
7	19.7	5.1	5.4	1.3
9	16.5	4.8	5.6	1.7
11	15.3	3.8	5.3	1.3
13	12.2	3.3	5.6	1.6
15	11.5	3.9	5.5	1.8
17	7.6	1.9	5.0	1.3
19	7.1	1.8	6.1	0.8
21	6.6	0.6	5.1	1.4
23	6.4	0.9	4.0	1.3
25	6.4	0.9	4.1	1.0

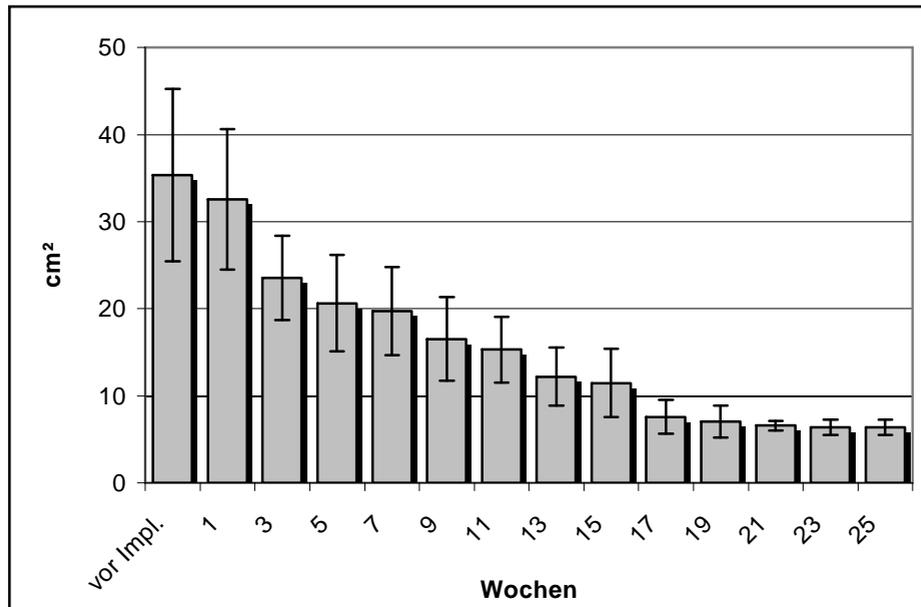


Abb. 21: Mittlere Hodengröße (\bar{x}/SD) von allen 8 Hunden vor Implantation und in den ersten 180 Tagen danach (bis Woche 25)

Die Konsistenz veränderte sich nach durchschnittlich 3 Wochen von prall-elastisch nach weich-elastisch. Palpatorisch und sonografisch wurde ansonsten keine Auffälligkeiten beobachtet (s. Abb. 22).

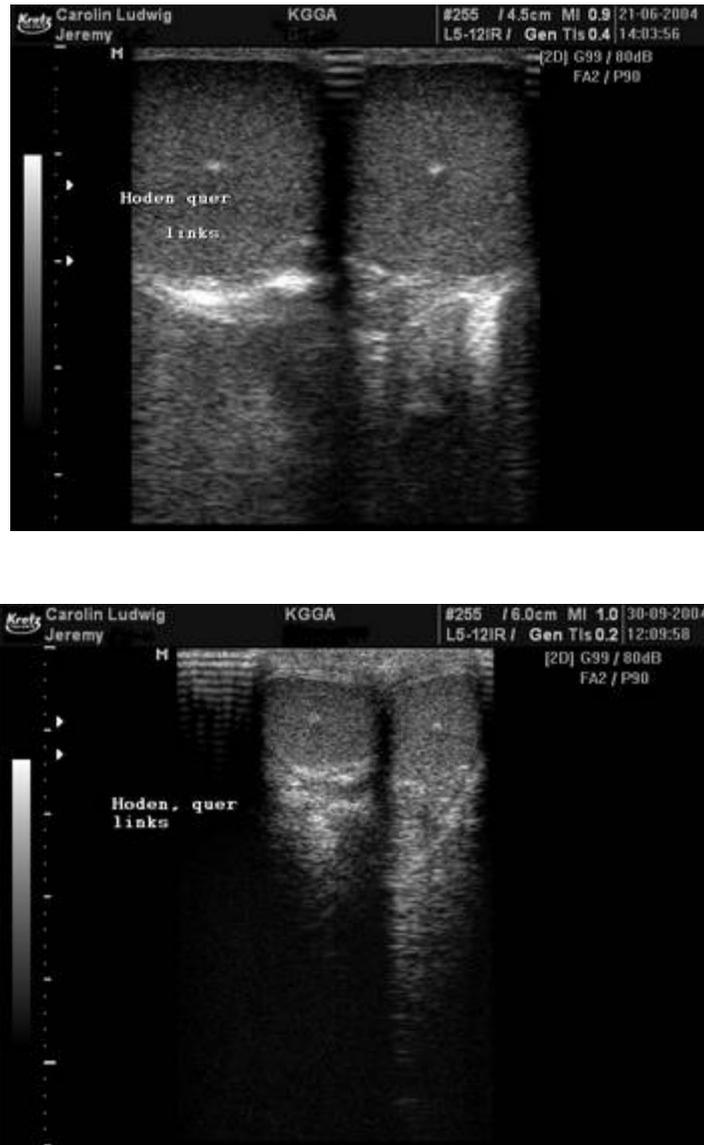


Abb. 22: Sonografische Darstellung beider Hoden im Querschnitt von Hund Jeremy (Gruppe 2), oben vor Implantation und unten 11 Wochen nach Einsetzen des Implantates

- **Nach Entfernung des Implantates bzw. nach Wirkungsverlust**

4 bis 6 Wochen nach Entnahme des Implantates setzte bei den Hunden der Gruppe 1 und bei Hund Elias (Gruppe 2) ein hoch signifikanter ($p < 0,001$) Anstieg der Hodengröße ein. Nach ca. 20 Wochen wurden die Ausgangswerte erreicht, darüber hinausgehend kam es danach zu einer weiteren Vergrößerung der Hoden bis zum Ende der Untersuchungsperiode (s. Tab. 12; Abb. 23).

Tab. 12: Mittelwerte (\bar{x}/SD) der Hoden- und Prostatagröße (cm²) vor Implantation und nach Entfernung des Implantates bei den Hunden der Gruppe 1 und Hund Elias, Gruppe 2

Wochen EP IV/4	Hodengröße		Prostatagröße	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
Vor Implantation	34.9	9.3	10.6	4.1
2	6.4	1.1	4.8	1.1
4	7.3	1.3	4.1	0.6
6	10.6	3.4	4.8	0.6
8	15.6	6.8	6.0	2.5
10	22.8	8.7	7.7	3.7
12	24.8	11.1	9.5	2.7
16	27.0	11.8	10.9	3.6
20	30.0	11.6	12.6	5.1
24 bis 26	35.7	14.0	14.8	3.8
29 bis 30	45.9	*	15.6	*

* = keine Berechnung der Standardabweichung möglich (< 3 Messwerte)

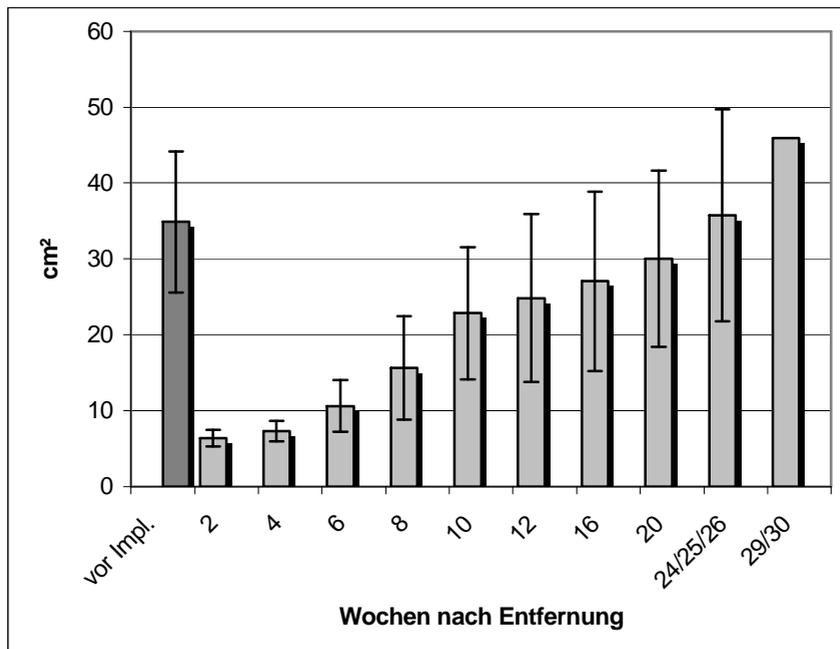


Abb. 23: Mittlere Hodengröße (\bar{x}/SD) vor Implantation und nach Entfernung des Implantates bei den Hunden der Gruppe 1 und Hund Elias, Gruppe 2 (z.T. keine Berechnung der Standardabweichung möglich)

Die Hunde Eddie, Elliott und Elvis (Gruppe 2) zeigten nach Wirkungsende einen ähnlichen Anstieg der Hodengröße.

Zwischen den Hunden bei denen die Wirkung bis zur Implantatentfernung anhielt und denen, die schon vorher einen Wirkungsverlust zeigten, konnte kein Unterschied während des Anstiegs der Hodengröße beobachtet werden (s. Tab. 13).

Da hier nur 4 Untersuchungen direkt verglichen werden konnten, wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Tab. 13: Entwicklung der Hodengrößen (cm²) bei allen acht Hunden, erfasst zu vergleichbaren Zeitpunkten ab dem Erreichen eines Wertes von = 0,5 ng/ml Testosteron im Plasma

Wochen	Nach Implantatentfernung					Nach Wirkungsverlust			Mittel	
	Jackson ¹	Jeremy ¹	Jonathan ¹	Julien ¹	Elias ²	Eddie ²	Elliott ²	Elvis ²	\bar{X}	SD
Vor Impl.	40.8	47.2	25.2	34.4	26.7	47.2	39.6	22	34.1	1.6
0	6.4	6.4	10.6	7.9	6.4	6.4	6.4	6.4	7.5	1.6
2 ³	6.4	6.4	10.6	7.9	9.4	23.0	16.5	9.4	10.2	2.1
4	7.1	11.8	14.1	14.1	15.7	27.5	22.0	14.1	14.7	2.8
6	14.1	11.8	14.1	28.3	27.5	27.5	35.5	14.1	20.0	1.6
8	17.7	18.8		28.3	35.3	27.5	35.5	14.1	24.0	1.5
10	20.6	18.8			42.4	31.4	35.5	18.8	26.5	1.8

¹= Gruppe 1, ²=Gruppe 2, ³= Woche mit erstem Testosteronwert > 0,5 ng/ml

- Ergebnisse zur Reversibilität**

Zwischen den Hodengrößen vor Implantation und zum Zeitpunkt der letzten Untersuchung in der vierten Versuchsphase ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p < 0,4$), die Tendenz zu einem leicht erhöhten Wert ist jedoch erkennbar (s. Tab. 14).

Tab. 14: Mittlere (\bar{X}/SD) Hodengrößen (cm²) vor Implantation und am Ende von EP IV/4

Hund	Hodengröße (cm ²)	
	Vor Implantation	Ende EP IV/4
Jackson	40.8	26.7
Jeremy	47.2	35.3
Jonathan	25.2	31.4
Julien	34.4	56.5
Eddie	47.2	47.1
Elias	26.7	47.1
Elliott	39.6	40.5
Elvis	22	35.4
\bar{X}	35.4	40.0
SD	9.9	9.8

4.7 Erfassung der Prostatagröße

- **Vor Implantation**

Vor der Behandlung mit „Gonazon®“ lag die durchschnittliche Prostatagröße [\bar{x} /(SD)] bei 10,6 (3,1) cm² (s. Tab. 11) , sonografisch wurden keine Auffälligkeiten beobachtet (Abb. 24).

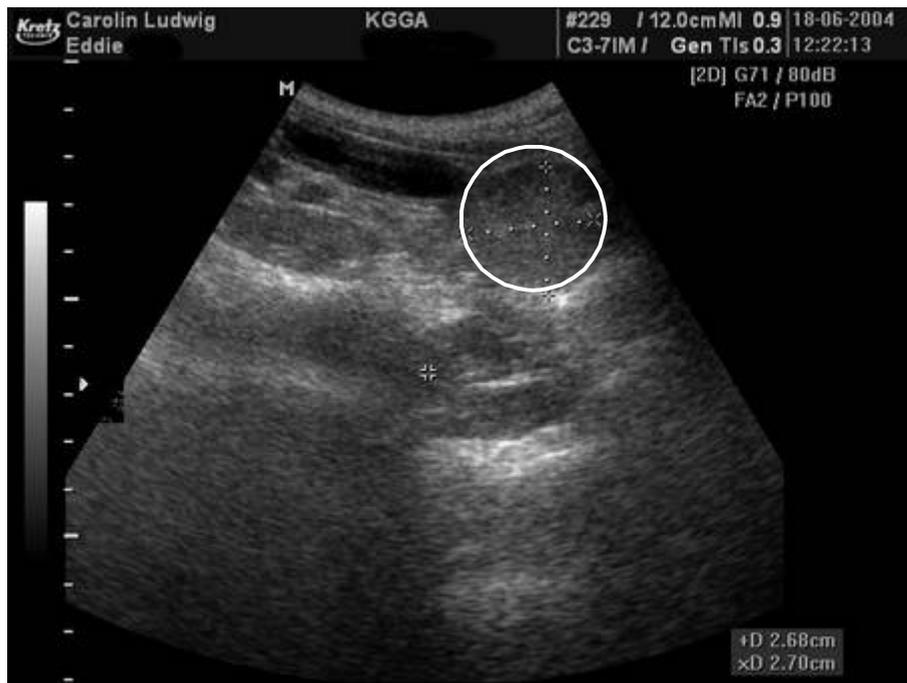


Abb. 24 Sonografische Darstellung der Prostata (längs) bei Hund Eddie (Gruppe 2) vor Implantation (s. Markierung)

- **Während der ersten 180 Tage nach Implantation**

Die Prostatagröße verringerte sich deutlich bei allen acht Hunden innerhalb von drei Wochen nach Implantation. Nach 5 Wochen war keine weitere Verkleinerung mehr zu beobachten, zu diesem Zeitpunkt hatte sich die Größe der Prostata um durchschnittlich 46% verringert (s. Tab. 11; Abb. 25). Die Verkleinerung der Prostata nach Behandlung mit „Gonazon®“ war hoch signifikant ($p < 0,001$).

Bei den sonografischen Untersuchungen wurden auch nach der Behandlung keine Auffälligkeiten beobachtet (s. Abb. 26).

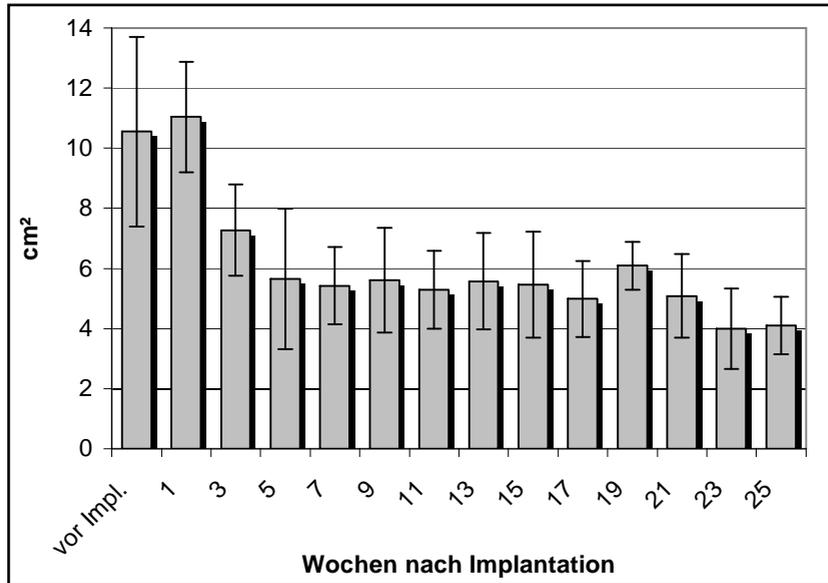


Abb. 25: Mittlere Prostatagröße (\bar{x}/SD) von allen acht Hunden vor Implantation und in den ersten 180 Tagen danach (bis Woche 25)



Abb. 26: Sonografische Darstellung der Prostata (längs) bei Hund Eddie (Gruppe 2) 15 Wochen nach Behandlung mit „Gonazon®“ (s. Markierung)

• **Nach Entfernung des Implantates bzw. nach Wirkungsverlust**

Innerhalb von 8 bis 10 Wochen nach Entfernung des Implantates kam es bei den Hunden der Gruppe 1 und Hund Elias (Gruppe 2) zu einem signifikanten Wiederanstieg ($p < 0,001$) der Prostatagröße, wobei die Ausgangsgröße von durchschnittlich $10,6 \pm 4,1 \text{ cm}^2$ nach 16 Wochen ($10,9 \pm 3,6 \text{ cm}^2$) erreicht wurde (s. Tab. 12; Abb. 27).

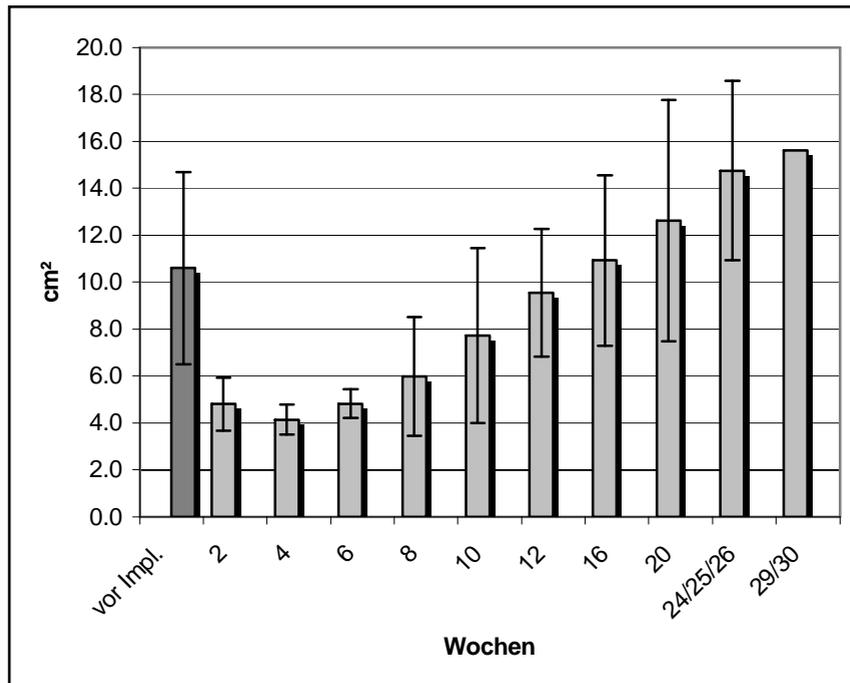


Abb. 27: Mittlere Prostatagröße (\bar{x}/SD) vor Implantation und nach Entfernung des Implantates bei den Hunden der Gruppe 1 und Hund Elias, Gruppe 2 (z.T. war keine Berechnung der Standardabweichung möglich)

Die Hunde Eddie, Elliott und Elvis (Gruppe 2) zeigten nach Wirkungsende eine ähnliche Zunahme der Prostatagröße.

Wie sich aus Tabelle 15 ergibt, bestand kein Unterschied hinsichtlich des Anstiegs der Prostatagröße zwischen den Tieren, bei denen es das Implantat entfernt wurde und denen, die schon früher einen Wirkungsverlust zeigten. Auf eine statistische Auswertung wurde auch hier verzichtet (s.o.).

Tab. 15: Entwicklung der Prostatagröße (cm²) und Mittelwerte (\bar{x} /SD) bei allen Hunden, erfasst zu vergleichbaren Zeitpunkten ab dem Erreichen eines Wertes von = 0,5 ng/ml Testosteron im Plasma

Wochen	Nach Implantatentfernung					Nach Wirkungsverlust			Mittel	
	Jackson ¹	Jeremy ¹	Jonathan ¹	Julien ¹	Elias ²	Eddie ²	Elliott ²	Elvis ²	\bar{X}	SD
Vor Impl.	5.3	16	8	12.2	11.4	11.5	10.6	9.4	10.1	1.6
0	5.1	4.2	4.2	3.2	4.4	5.3	7.2	4.1	4.6	1.6
2 ³	4.9	4.4	3.5	5	3.9	8.8	8.9	5.9	5.4	2.1
4	4.9	4.3	6.2	4.4	5.7	4.5	4.2	5.9	5.0	2.8
6	6.6	5.4	6	5	10	5.9	7.5	7.3	6.6	1.6
8	7.9	5.4		9.4	14.1	6.6	7.6	5	7.6	1.5
10	8.6	10.2			13.5	13.1	9.8	11.8	11.0	1.8

¹=Gruppe 1, ²= Gruppe 2, ³= Woche mit erstem Testosteronwert > 0,5 ng/ml

- **Ergebnisse zur Reversibilität**

Die mittlere Prostatagröße am Ende von EP IV/4 unterschied sich nicht signifikant (p<0,07) von den Ausgangswerten vor der Implantation. Eine Tendenz zu leicht erhöhten Werten ist jedoch erkennbar (s. Tab. 16; Abb. 28).

Tab. 16: Mittelwerte (\bar{x} /SD) der Prostatagrößen (cm²) vor Implantation und am Ende von EP IV/4

Hund	Prostatagröße (cm ²)	
	Vor Implantation	Ende EP IV/4
Jackson	5.3	14.1
Jeremy	16	14.6
Jonathan	8	12.8
Julien	12.2	16.6
Eddie	11.5	12.7
Elias	11.4	9
Elliott	10.6	10.8
Elvis	9.4	19.6
\bar{X}	10.6	13.8
SD	3.1	3.3



Abb. 28: Sonografische Darstellung der Prostata (längs) der Hunde Eddie (oben) und Elvis (unten) zum Ende der Versuchsphase 4
Eddie: Ähnliche Prostatagröße wie vor Implantation
Elvis: Prostata im Vergleich zum Ausgangswert deutlich größer

4.8 Ausprägung der zur Samenabgabe führenden Reflexkette

In Abbildung 29 sind die Beobachtungen zum Verhalten der Rüden während der Versuche zur Samenentnahme und das Ergebnis der Samengewinnung, gemessen an den Parametern Azoospermie und Aspermie, dargestellt.

Untersuchung	Jackson	Jeremy	Jonathan	Julien	Eddie	Elias	Elliott	Elvis
Vor Implantation								
Woche 1 n. Impl.								
Woche 3 n. Impl.								
Woche 5 n. Impl.								
Woche 7 n. Impl.								
Woche 15 n. Impl.								
Woche 25 n. Impl.								
Woche 33 n. Impl.								
Woche 43 n. Impl.								
Woche 51 n. Impl.								
EPIV/4, Woche 4								
EPIV/4, Woche 6								
EPIV/4, Woche 8								
EPIV/4, Woche 10								
EPIV/4, Woche 12								
EPIV/4, Woche 16								
EPIV/4, Woche 20								
EPIV/4, Woche 24-26								
EPIV/4, Woche 29-30								
EPIV/4, Woche 34								

Abb. 29: Beobachtungen während des Versuchs der Samengewinnung bei den Rüden der Gruppe 1 und 2

	Normales Interesse an der Hündin, normaler Ablauf der Reflexkette, Spermagewinnung möglich
	Normales Interesse an der Hündin, normaler Ablauf der Reflexkette, Azoospermie
	Normales Interesse an der Hündin, normaler Ablauf der Reflexkette, Aspermie
	Kein Interesse an der Hündin, normaler Ablauf der Reflexkette, Aspermie
	Kein Interesse an der Hündin, gestörte oder abgebrochene Reflexkette, Aspermie
	Keine Untersuchung

Bei normalem Sexualverhalten wiesen zwei Rüden in der 3. Woche nach der Implantation eine Azoospermie auf. In der 5. Woche konnte nur noch von einem Tier (Elvis) ein Ejakulat gewonnen werden, die übrigen Tiere wiesen eine Aspermie auf, wobei jedoch noch drei Rüden ein mehr oder weniger intaktes Sexualverhalten bei normalem Ablauf der ansonsten zur Ejakulation führenden Reflexkette aufwiesen.

Während der Phase der Downregulation, d.h. bis zu Beginn von EP IV/4 verloren bei bestehender Aspermie die Rüden weitestgehend das Interesse an den ihnen vorgestellten Hündinnen, eine zu einer vollständigen Erektion führende Einleitung der Reflexkette war jedoch bei Julien noch in der 15. Woche nach der Implantation möglich, bei Elvis blieb dieses Reaktionsmuster erhalten.

Nach Wirkungsende stellte sich bei allen Rüden spätestens ab der 16. Woche von EP IV/4 ein normales, zu einer Ejakulation führendes Sexualverhalten ein. Spermien traten im Ejakulat erstmals in der 8. Woche und spätestens in der 16. Woche von EP IV/4 auf; lediglich der Rüde Eddie blieb azoosperm (s.u.).

4.9 Spermaqualität

Bei jeder Spermauntersuchung wurden die Parameter Gesamtvolumen (ml), Vorwärtsbeweglichkeit (%), Anzahl lebender Spermien (%), Gesamtspermienzahl, Pathomorphologie (%) und HOS non curled (%) bewertet.

- **Vor Implantation**

Vor der Behandlung mit „Gonazon®“, lagen die Parameter Volumen, Vorwärtsbeweglichkeit, Gesamtspermienzahl, HOS n.c. sowie Anteil lebender Spermien bei allen acht Rüden im Referenzbereich (siehe Kap. 3.2.2.5). Eine erhöhte Zahl pathomorphologisch veränderter Samenzellen ergab sich bei Julien (39%) und Elliott (28%), die Werte von 24,5 und 23 % bei Eddie und Elvis lagen ebenfalls oberhalb des Referenzbereiches von 20%, aber immer noch im statistischen Streubereich.

- **Während der ersten 180 Tage nach Implantation**

Bei sieben Hunden konnte drei Wochen nach Implantation, bei Hund Elvis fünf Wochen nach Implantation zum letzten Mal Sperma gewonnen werden.

Die Spermaqualität verschlechterte sich nach Einsetzen des Implantates, wobei sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Hunden ergaben.

Einheitlich zeigte sich bei allen Rüden eine zunehmende Verringerung des Volumens der spermienreichen Fraktion, bei den Rüden Julien, Eddie und Elvis war dies mit einer Erhöhung der Spermiengesamtzahl verbunden, bei den übrigen Rüden war dagegen eine sofortige Abnahme zu verzeichnen. Bei zwei Rüden (Jonathan und Elias) wurde eine deutliche Erhöhung der Anzahl pathomorphologisch veränderter Samenzellen beobachtet, bei Jackson und Elliott kam es zu einem hochgradigen Abfall des Anteils lebender Spermatozoen.

Die vor und während der ersten 180 Tage nach Implantation erhaltenen Mittelwerte sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tab. 17: Mittelwerte (\bar{x} /SD) Spermaparameter (Gesamtvolumen, Vorwärtsbeweglichkeit, Anzahl lebender Spermien, Gesamtzahl, Pathomorphologie und HOS n.c.) von allen Hunden vor und während der ersten 180 Tage (25 Wochen) nach Implantation

Parameter	Wochen	\bar{x}	SD				
Gesamtvolumen (ml)	Vor Implantation	7.7	3.9				
	1	4.7	2.9				
	3	2.2	1.9				
	7	0	0				
	15	0	0				
	25	0	0				
Vorwärtsbeweglichkeit (%)	Vor Implantation	78.8	6.4				
	1	83.8	5.2				
	3	55.0	40.7				
	7	/	/				
	15	/	/				
	25	/	/				
Lebende Spermien ¹ (%)	Vor Implantation	81	6.8				
	1	85.9	5.3				
	3	65.7	35.3				
	7	/	/				
	15	/	/				
	25	/	/				
Gesamtzahl (mio.)	Vor Implantation	492.5	171.9				
	1	531.3	303.1				
	3	235.0	211.7				
	7	0	0				
	15	0	0				
	25	0	0				
Pathomorphologie (%)	Vor Implantation	1	2	3	1	2	3
		25.1	22.4	0.4	7.7	6	0.6
	1	28.2	27.7	0.6	10.2	9.7	0.6
	3	36.6	21.0	1.3	35.0	12.7	0.8
	7	/	/	/	/	/	/
	15	/	/	/	/	/	/
HOS non curled (%)	Vor Implantation	8.1	2.2				
	1	4.3	3.9				
	3	4.3	2.7				
	7	/	/				
	15	/	/				
	25	/	/				

/ = keine Untersuchung möglich

1 = Eosin-Ausstrich

2 = Formolcitrat-Färbung

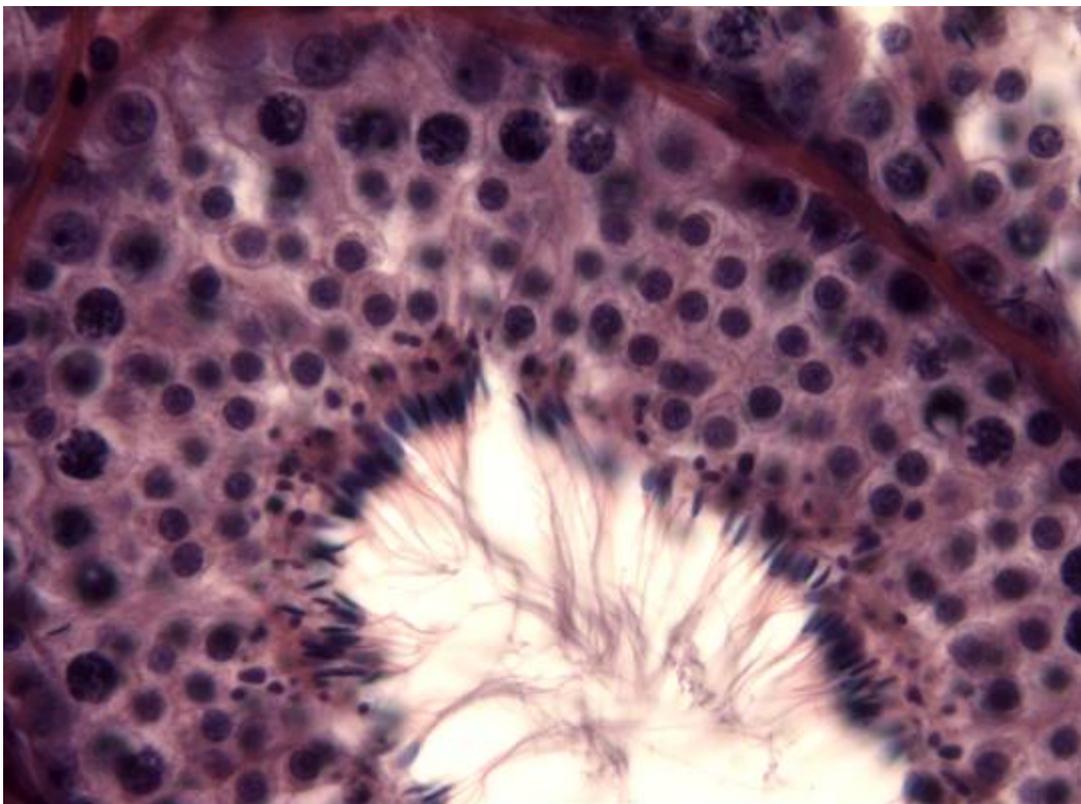
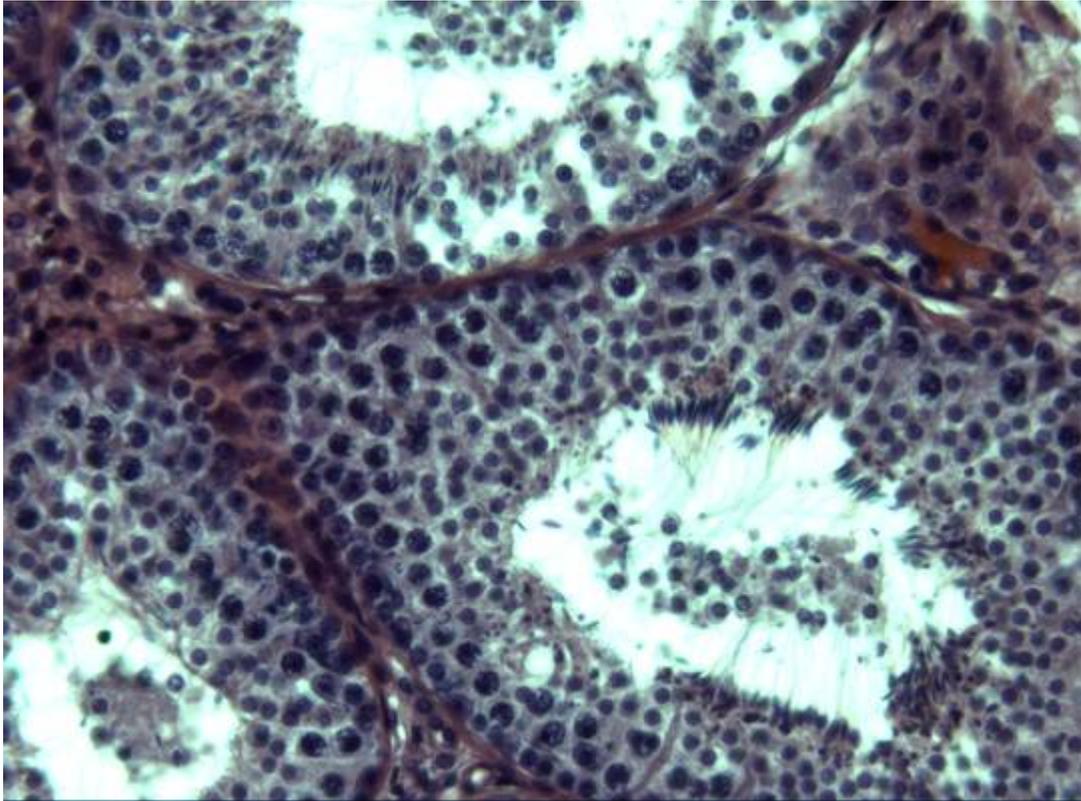
3 = Kopfkappenveränderungen (Spermac®)

- **Nach Entfernung des Implantates bzw. nach Wirkungsverlust; Reversibilität**

8 bis 12 Wochen nach Entfernung des Implantates konnte von den Hunden der Gruppe 1 und Hund Elias (Gruppe 2) wieder Samen gewonnen werden. Das Spermagesamtvolumen stieg während der vierten Versuchsphase signifikant an ($p < 0,001$). Zwischen 24 und 30 Wochen war, bezogen auf alle Parameter, die Ausgangsqualität des Spermias wieder erreicht (s. Tab. 18). Bei diesen fünf Rüden war der Effekt der Downregulierung vollständig reversibel; bezogen auf die Pathomorphologie zeigte sich sogar die Tendenz einer Verbesserung. Auch bei dem Rüden Elliott, bei dem es schon vor Implantatentfernung zu einem Wirkungsverlust kam, waren alle durch die Downregulierung induzierten Effekte voll reversibel, zudem konnte Elliott ca. 7 Monate nach Wirkungsverlust (ungewollt) erfolgreich decken.

Bei Elvis wurde bis Woche 20 der vierten Versuchsphase zunächst ein Anstieg der Gesamtpermienzahl beobachtet, danach zeigte der Hund jedoch eine bis Versuchsende anhaltende Oligo- und Teratozoospermie.

Von Eddie konnte bis Versuchsende kein Samen sondern lediglich Prostatasekret gewonnen werden (Azoospermie). Zur Abklärung wurde dieser Rüde 40 Wochen nach Wirkungsende kastriert und die Hoden histologisch untersucht. In den angefertigten Schnitten konnte kein Hinweis auf eine Störung der Spermatogenese gefunden werden (s. Abb. 31; Kap. 5).



**Abb. 31 Hodenpräparat Hund Eddie (Färbung mit Hämatoxillin),
Kastration 40 Wochen nach Wirkungsende**

Tab. 18: Mittelwerte (\bar{x} /SD) Spermaparameter (Gesamtvolumen, Vorwärtsbeweglichkeit, Anzahl lebender Spermien, Gesamtzahl, Pathomorphologie und HOS n.c.) nach Implantatentfernung (Hunde der Gruppe 1 und Elias, Gruppe 2), Versuchsphase EP IV/4 (Wochen 4-30)

Parameter	EP IV/4 Wochen	\bar{x}	SD
Gesamt- volumen (ml)	vor Implantation	8.0	5.1
	Woche 4	0	0
	Woche 6	0	0
	Woche 8	0	0
	Woche 10	1.4	*
	Woche 12	2.0	*
	Woche 16	4.5	1.2
	Woche 20	5.2	1.7
	Woche 24-26	8.0	6.1
	Woche 29-30	11.0	*
Vorwärts- beweglichkeit (%)	vor Implantation	80.0	7.1
	Woche 4	/	/
	Woche 6	/	/
	Woche 8	/	/
	Woche 10	0	*
	Woche 12	26.0	*
	Woche 16	54.0	41.0
	Woche 20	86.0	5.5
	Woche 24-26	87.5	5.0
	Woche 29-30	85.0	*
Lebende Spermien ¹ (%)	vor Implantation	80.9	8.8
	Woche 4	/	/
	Woche 6	/	/
	Woche 8	/	/
	Woche 10	0	*
	Woche 12	26.0	*
	Woche 16	62.6	37.4
	Woche 20	86.2	6.2
	Woche 24-26	85.0	6.7
	Woche 29-30	87.5	*
Gesamtzahl (mio.)	vor Implantation	568.0	157.6
	Woche 4	0	0
	Woche 6	0	0
	Woche 8	0	0
	Woche 10	0.5	*
	Woche 12	2.8	*
	Woche 16	71.3	88.1
	Woche 20	210.4	216.9
	Woche 24-26	355.0	214.8
	Woche 29-30	438.0	*

Fortsetzung Tab. 18

Parameter	EP IV/4 Wochen	\bar{x}			SD		
		1	2	3	1	2	3
Patho- morphologie (%)	vor Implantation	25.1	22.4	0.4	9.0		0.6
	Woche 4	/	/	/	/	/	/
	Woche 6	/	/	/	/	/	/
	Woche 8	/	/	/	/	/	/
	Woche 10	/	/	/	/	/	/
	Woche 12	78.3	53	0.5	*	*	*
	Woche 16	30.4	33.7	0.3	24.2	32.7	0.5
	Woche 20	26.9	23.6	1.2	9.4	6.3	1.3
	Woche 24-26	18.9	13.8	0.3	5.7	5	0.3
	Woche 29-30	17.0	13	0.3	*	*	*
HOS non curled (%)	vor Implantation	8.1			4.2		
	Woche 4	/			/		
	Woche 6	/			/		
	Woche 8	/			/		
	Woche 10	/			/		
	Woche 12	17			*		
	Woche 16	9.8			10.2		
	Woche 20	5.4			4.5		
	Woche 24-26	3.4			2.4		
	Woche 29-30	1			*		

/ = keine Untersuchung möglich

* = keine Berechnung der Standardabweichung möglich (< 3 Messwerte)

1 = Eosin-Ausstrich

2 = Formolcitrat-Färbung

3 = veränderte Kopfkappen (Spermac®)

4.10 Beobachtungen zum allgemeinen Verhalten der Rüden

Das Verhalten der Tiere konnte insbesondere während der LH-Blutprobenentnahme und bei der täglichen Fütterung und Pflege beobachtet werden.

Zwei Rüden, Elvis und Julien zeigten in den ersten beiden Versuchsphase (EP I/II bzw. EP 1/2), d.h. vor der Implantation, eine ausgeprägte Hypersexualität, mit besonders bei Elvis unermüdlichem Bespringen von sowohl Hündinnen als auch Rüden.

Bei den Hunden Jackson und Jeremy konnte zunächst ein gewisses Dominanz-Verhalten gegenüber den übrigen Hunden beobachtet werden, das sich bei Jackson besonders durch das Verteidigen der Kontaktpersonen gegenüber den anderen Rüden und bei beiden Hunden durch eine schnelle Aggressionsbereitschaft gegenüber den anderen Tieren zeigte.

Das Verhalten der übrigen vier Hunde war unauffällig.

Nach Implantation nahm das hypersexuelle Verhalten bei Elvis und Julien ab und verschwand bei Julien völlig, während Elvis weiterhin ein relativ ausgeprägtes Interesse an Hündinnen behielt.

Die Aggressionsbereitschaft von Jeremy verschwand innerhalb von wenigen Wochen. Auch bei Jackson ging das Dominanzverhalten gegenüber den anderen Rüden zurück, ein reduziertes Dominanzverhalten gegenüber den anderen Rüden in Anwesenheit der Kontaktpersonen blieb jedoch bestehen.

Nach Wirkungsverlust des Implantates kehrte die Hypersexualität bei Elvis wieder zurück, er begann erneut andere Rüden zu bespringen, was mitunter bis zur Ejakulation führte.

Nach Entnahme des Implantates fiel bei Julien wieder ein verstärktes Interesse, auch an nicht läufigen Hündinnen auf.

Das aggressive Verhalten der Hunde Jackson und Jeremy kehrte nach Entfernung des Implantates nicht zurück, der Rüde Jackson zeigte jedoch weiterhin ein ausgeprägtes Dominanzverhalten.

4.11 Wirkungsdauer

Die Wirkungsdauer von „Gonazon®“ wurde anhand der Testosteronkonzentration im Plasma bestimmt.

Die Wirkung des Implantates hielt bei den Rüden der Gruppe 1 bis zu dessen Entfernung an. Bei den Hunden der Gruppe 2 blieb nur ein Hund (Elias) bis zur Entnahme des Implantates nach 365 Tagen downreguliert.

Bei den anderen drei Hunden der Gruppe 2 (Eddie, Elliott, Elvis) kam es zu einem Anstieg der Testosteronkonzentration nach im Mittel $251,7 \pm 74,2$ Tagen nach Implantation.

Das Überschreiten eines Wertes von 0,5 ng/ml Testosteron im Plasma wurde als Wirkungsende angesehen. Demnach war das Ende der Wirkung von „Gonazon®“ nach 223 Tagen (Elvis), 307 Tagen (Elliott) und 324 Tagen (Eddie) erreicht, was eine mittlere Wirkungsdauer von $284,7 \pm 54,1$ Tagen (ca. 9,5 Monaten) bei diesen Hunden ergibt.

5 Diskussion

5.1 Fragestellung

Die chirurgische Kastration eines Rüden gehört zu den in der Kleintierpraxis am häufigsten durchgeführten Operationen. Im Vordergrund stehende Gründe sind dabei neben der beabsichtigten Ausschaltung der Fortpflanzungsfähigkeit, Erkrankungen der Prostata und Verhaltensprobleme, wie z.B. ein übersteigertes Sexualverhalten.

Nicht bei einer medizinischen Indikation, jedoch wenn die Fortpflanzungsfähigkeit unterbunden werden soll, insbesondere wenn der Rüde unter kontrollierten Bedingungen gehalten wird, stellen sich Fragen nach § 6 Tierschutzgesetz, in dem die Entfernung von Organen angesprochen wird.

Bei einer chirurgischen Kastration ist weiter zu beachten, dass der Eingriff in Abhängigkeit vom Gesundheitszustand des Tieres mit einem hohen Risiko, z.B. einem Narkoserisiko, verbunden sein kann. Beim Zuchtrüden bedeutet eine chirurgische Kastration den Zuchtausschluss, generell ist weiterhin zu bedenken, dass es grundsätzlich zum Auftreten von Nebenwirkungen, wie Verhaltensänderungen, Gewichtszunahme, Fellveränderungen oder auch Inkontinenz, kommen kann.

Die Frage nach einer Alternative zur chirurgischen Kastration reicht daher weit zurück. In der Veterinärmedizin war über viele Jahre hinweg die Anwendung von Gestagenen (z.B. Tardastrex®, Pfizer) üblich. Bei der benignen Prostatahyperplasie, Hypersexualität aber auch bei gewissen Formen der Aggressivität, konnten mit Gestagenen Erfolge erzielt werden, da Progesteron auch beim männlichen Tier negativ rückkoppelnd wirkt, was zu einer Reduzierung der Testosteronkonzentration im Plasma führt (ENGLAND 1997). Nebenwirkungen einer Gestagenbehandlung können jedoch eine Vergrößerung des Gesäuges mit dem Risiko des Entstehens von Mammatumoren, Fellveränderungen an der Injektionsstelle und bei einer Langzeittherapie mit hohen Dosen auch ein iatrogenes Cushing-Syndrom oder Diabetes mellitus sein (KOOISTRA u. OKKENS 2001; SELMAN 1997).

Alternativen dazu ergaben sich bis vor kurzem lediglich durch Umwidmung von Humanarzneimitteln.

So wird in verschiedenen Studien über die Anwendung von Androgenrezeptorblockern berichtet (TSUTSUI et al. 2000/2001; DOYLE et al. 2004); in neueren Arbeiten wird ebenfalls über gute Erfolge mit 5 α -Reduktasehemmern bei der benignen Prostatahyperplasie

des Rüden berichtet (IGUER OUADA u. VERSTEGEN 1997; KAMOLPATANA 1998; SIRINARUMITR et al. 2001).

Mit Ypozane® (Wirkstoff: Osateronacetat; Virbac) wurde 2007 erstmals ein Androgenrezeptorblocker zur Anwendung beim Hund zugelassen.

Eine spezielle die Veterinärmedizin betreffende Entwicklung kann auch in der Bereitstellung von GnRH-Vakzinen zur Anwendung bei Schweinen, Rindern und Wildtieren gesehen werden.

Für Kleintiere, d.h. speziell für den Hund, gilt, dass in den letzten Jahren mit der Anwendung von GnRH-Agonisten zur Downregulation der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse erste Erfahrungen gewonnen werden konnten. Entsprechende Arzneimittel wurden in der Humanmedizin unter anderem zur Behandlung des Prostatakarzinoms zugelassen.

Die versuchsweise Anwendung derartiger Präparate in der Veterinärmedizin erfolgte zunächst mit dem Ziel der Läufigkeitsunterdrückung der Hündin auf der Basis der hormonellen Kastration. Dabei trat das Problem auf, dass bei geschlechtsreifen Hündinnen die Behandlung praktisch immer mit der Induktion einer Läufigkeit verbunden war (VICKERY et al.1989). Bei Behandlung präpubertärer Tiere trat dieser Effekt nicht auf, es kam zu einem deutlich verzögerten Eintritt der Geschlechtsreife (VICKERY et al.1989; TRIGG et al. 2006; RUBION et al. 2006). Unter Hinweis auf diese Gegebenheiten wurde Gonazon® (Intervet) im Jahre 2006 zur Unterdrückung der Gonadenfunktion bei Hündinnen durch langfristige Blockade der Gonadotropinsynthese zugelassen.

Anders als bei der Hündin, führte die initiale Stimulierung der Hodenfunktion nach Applikation des GnRH-haltigen Implantates bei Rüden zu keinem besonderen Effekt, bereits nach relativ kurzer Zeit konnte eine vollständige hormonelle Kastration erreicht werden.

So berichten RIESENBECK et al. (2002) bei Verabreichung des Humanarzneimittels Profact depot® (Aventis) über eine Wirkungsdauer von durchschnittlich 250 Tagen, eine vollständige Reversibilität der kastrationsbedingten Nebenwirkungen und eine große Akzeptanz seitens der Tierbesitzer, wobei auch Wiederholungsbehandlungen erfolgten.

Bei Gonazon®, das als Wirkstoff 18,5 mg des GnRH-Analogons Azagly-Nafarelin enthält, handelt es sich um ein Implantat, das speziell zur Anwendung beim Hund entwickelt wurde. Es unterscheidet sich von allen bisher – auch für die Humanmedizin – entwickelten Präparaten dadurch, dass das Implantat ggf. entfernt werden kann.

Anders als die bisher verfügbaren Implantate, die kontinuierlich Wirkstoff freisetzen und von der Galenik her so konzipiert sind, dass das Implantat parallel zur Wirkstofffreisetzung allmählich resorbiert wird, bleibt bei Gonazon der Wirkstoffträger erhalten. Dadurch entsteht

die grundsätzliche Möglichkeit, bei einem eventuellen Auftreten unerwünschter Wirkungen, wie Verhaltensänderungen oder Gewichtszunahme, die Behandlung jederzeit abbrechen zu können.

Den eigenen Untersuchungen lag die grundsätzliche Fragestellung zugrunde, in einem Modellversuch die downregulierende Wirkung von Gonazon® beim Rüden zu überprüfen und gleichzeitig Hinweise auf die Entfernbarkeit der Implantate zu erhalten.

5.2 Versuchsaufbau und erfasste Parameter

Für die Versuche standen acht geschlechtsgesunde Beaglerüden zur Verfügung, die nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen mit je vier Hunden aufgeteilt worden waren.

Nach einer Kontrollphase, in der die Tiere als ihre eigene Kontrollgruppe genutzt wurden, bekamen alle Hunde das Implantat am gleichen Tag eingesetzt.

Die Implantationsstelle befand sich paraumbilikal, um ein Wandern des Implantats (wie dies beispielsweise bei in die Halsregionen gesetzten Transponder-Chips der Fall ist) zu verhindern, um damit ein möglichst problemloses Entfernen der Implantate zu ermöglichen.

Bei den Tieren der Gruppe 1 wurde das Implantat nach 180 Tagen wieder entfernt. Neben der Frage, ab wann nach der Implantation von „Gonazon®“ mit dem Erreichen einer effektiven „hormonellen Kastration“ zu rechnen ist, sollte insbesondere die Reversibilität der Effekte bei Entfernung des Implantates zu einem Zeitpunkt, an dem die Rüden noch „downreguliert“ sind, überprüft werden.

Bei den Rüden der Gruppe 2 wurde das Implantat nach 365 Tagen entfernt. Neben der auch Gruppe 1 betreffenden Frage, wann mit einer effektiven hormonellen Kastration zu rechnen ist, sollten in dieser Gruppe Hinweise auf die Wirkungsdauer und die Reversibilität der Effekte nach einem längeren Zeitraum der Downregulation erhalten werden. Dabei wurde davon ausgegangen, dass mit 365 Tagen ein ausreichend langer Zeitraum gewählt worden war.

Die Wirkung des GnRH-Implantates beruht darauf, dass es durch kontinuierliche Freisetzung eines GnRH-Analogons zur Downregulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren kommt.

Dies führt zu einer Hemmung der Freisetzung der Gonadotropine LH und FSH und darüber zu einer Ausschaltung der germinativen und endokrinen Hodenfunktion (DÖCKE 1994a).

Um die LH-Freisetzung vor und unter Implantateinwirkung sowie nach dessen Entfernung bzw. nach Wirkungsverlust zu untersuchen, wurden den Hunden zu definierten Zeitpunkten jeweils über 6 Stunden im 20 minütigen Rhythmus Blut entnommen. Die Etablierung solcher „LH-Fenster“ ergab sich aus der Beobachtung, dass auch bei Rüden die Ausschüttung von LH pulsatil erfolgt (BRINCKMANN 1989) und eine einmalige Messung demnach nur wenig Aussagekraft hat. Dabei wurde um die Proben möglichst schonend für die Tiere zu entnehmen, ein zentraler Venenkatheter gelegt.

Für jeden Hund und jedes LH-Fenster wurde die Verfügbarkeit von LH durch die Parameter „Area under the curve“ (AUC), Basalkonzentration (BC), Maximum und Anzahl der Pulse definiert.

Da infolge einer Hemmung der LH-Ausschüttung zumindest eine partielle Ausschaltung der Hodenfunktion und damit eine Hemmung der Steroidhormonproduktion in den Leydig-Zellen zu erwarten war, wurden den Hunden zudem über den ganzen Versuch hinweg mindestens einmal wöchentlich Blutproben zur Bestimmung von Testosteron und Estradiol-17 β entnommen. Höher frequente Blutentnahmen erfolgten sowohl nach Verabreichung als auch Entfernung des Implantates, um den Verlauf, d.h. Eintritt und Aufhebung der Downregulation näher zu charakterisieren.

Klassisches Zielorgan der androgenen Wirkung ist die Prostata. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen sollte daher auch der Frage nachgegangen werden, ob und inwieweit sich eine verminderte Testosteronproduktion auf die Größe der Prostata auswirkt. Bei allen Rüden wurde daher mittels Sonographie die Größe der Prostata (gemessen als Fläche im Ultraschallbild) alle zwei Wochen ermittelt

Um den Effekt von „Gonazon®“, d.h. der Downregulation, auf die Spermatogenese zu überprüfen, wurden während der Kontrollphase, nach der Implantation und nach Entfernung bzw. Wirkungsende, Versuche zur Samenentnahme unternommen und die Spermaqualität untersucht. Erfasst wurden die Standardparameter Gesamtvolumen, Vorwärtsbeweglichkeit, Anzahl lebender Spermien, Gesamtzahl und Pathomorphologie, für die die entsprechenden Referenzbereiche bekannt sind (RIESENBECK et al. 2001). Zusätzlich wurde auch die

Libido der Tiere durch das Verhalten gegenüber einer läufigen bzw. einer mit einem Lockstoff präparierten Hündin überprüft; als ein weiteres Indiz diente die manuelle Stimulierbarkeit der Rüden während der Versuche zur Spermagewinnung.

Da davon ausgegangen wurde, dass eine Ausschaltung der germinativen und endokrinen Hodenfunktion zu einer Verkleinerung der Hodengröße führt, wurde auch diese während der gesamten Studie in 14-tägigen Intervallen erfasst und als Hodenfläche ($\text{Länge} * \text{Breite}/2 * p$) dargestellt.

5.3 Methodik

Die LH-Konzentration im Plasma wurde mit einem Enzym-Immuno-Assay (EIA) bestimmt. Das Assay wurde zur Steigerung der Sensitivität als Sequenztest angesetzt, als Standard diente canines LH, als Tracer biotiniliertes bovines LH. Die Standardkurve deckte einen Bereich zwischen 0,2 und 6,4 ng/ml ab.

Der heterologe Test ergab gut reproduzierbare Ergebnisse, der Interassayvariationskoeffizient lag zwischen 12,7 und 17,3 %.

Zur Bestimmung der Testosteron- und Estradiol-17 β Konzentration im Plasma wurden etablierte Radioimmunassays eingesetzt (RÖCKEN et al. 1995; Hoffmann et al. 1994).

Die untere Nachweisgrenze für Testosteron ergab sich mit 0,1 ng/ml. Der Intraassayvariationskoeffizient lag bei 8,2 %, der Interassayvariationskoeffizient zwischen 7,8 und 9,0 %. Diese Werte entsprechen den Erwartungen.

Für die Bestimmung von Estradiol-17 β ergab sich – abgeleitet aus dem Reagenzienleerwert - eine untere Nachweisgrenze von 2 pg/ml, der Intraassayvariationskoeffizient lag bei 16 %, der Interassayvariationskoeffizient zwischen 14,5 und 19 %. Auch diese Werte entsprechen den Erwartungen und können im Hinblick auf den sehr niedrigen Messbereich als sehr gut bezeichnet werden.

Die Prostata wurde nach Standardverfahren ultrasonografisch dargestellt und auf Auffälligkeiten untersucht. Die Größe (Länge und Breite) wurde durch Ausmessen mit Hilfe der im Computer des Ultraschallgerätes integrierten Messeinheit bestimmt und die Fläche (cm²) berechnet.

Die Hoden wurden zunächst ebenfalls mittels Ultraschall auf Besonderheiten kontrolliert und dann mit einem Maßband, ohne Einbeziehung der Skrotalhaut, vermessen (Länge und Breite) und die Fläche (cm²) berechnet.

Die Darstellung der Prostata und Ausmessung der beiden Organe erfolgten stets durch die gleiche Person, so dass personenabhängige Variabilitäten ausgeschlossen werden können.

Die Spermaqualität wurde anhand der Parameter Gesamtvolumen (ml), Vorwärtsbeweglichkeit (%), Anzahl lebender Spermien (%), Gesamtzahl und Pathomorphologie (%) bestimmt. Zur Anwendung kamen etablierte Standardverfahren. So

wurde die Vorwärtsbeweglichkeit an einem Nativpräparat mit Deckglas bei 400facher Vergrößerung und 37°C untersucht, der Prozentsatz lebender Spermien und die Pathomorphologie wurden mit Hilfe eines Eosin-Ausstrichs ermittelt; in Ergänzung dazu wurde zur Beurteilung der Pathomorphologie eine Formolcitrat-Färbung angefertigt. Veränderungen der Kopfkappen wurden durch eine Färbung mit Spermac® dargestellt, um auf die Intaktheit der Spermienmembran schließen zu können wurde ein hypoosmotischer Schwelltest (HOS) durchgeführt.

Die Ermittlung der Dichte zur Berechnung der Gesamtzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer.

Bei den Versuchen zur Samengewinnung wurde auch versucht, Anhaltspunkte auf die Libido zu erhalten. Beobachtet wurde das Verhalten gegenüber einer läufigen bzw. mit Lockstoff präparierten Hündin, wobei gleichzeitig die manuelle Stimulation (Masturbation) zur Samengewinnung hinzukam.

Die Bewertung der Beobachtungen und Zuordnung in die jeweilige Kategorie (s. S. 50) erfolgten aufgrund der hier im Klinikbetrieb mit Rüden gemachten allgemeinen Erfahrungen; ein spezielles Punkteschema wurde nicht entwickelt, so dass nur von einem Grobraster gesprochen werden kann.

5.4 Ergebnisse

5.4.1 Der Downregulierung zugrunde liegende Effekte

Alle acht Rüden wiesen während der Kontrollphase einen guten Gesundheitsstatus auf. Die ermittelten Werte für die Parameter LH-, Testosteron- und Estradiol-17 β -Konzentration im Blutplasma sowie Hoden- und Prostatagröße, befanden sich im physiologischen Bereich. Bei keinem der Tiere wurden Hinweise auf eine Störung der Spermatogenese gefunden.

Bei allen acht Rüden kam es nach der Behandlung mit "Gonazon®" zu einer Downregulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren, was sich an einer deutlichen Reduzierung der LH-Freisetzung 11 Wochen nach Implantation zeigte. Bei 7 der 8 Hunde lag die AUC um mehr als 70 % unter den Ausgangswerten, bei einem Hund (Julien) kam es nur zu einer Verringerung um 46 %.

Offensichtlich unabhängig vom beobachteten unterschiedlichen Grad der Minderung der LH-Freisetzung kam es bei allen acht Rüden nach erfolgter Implantation zu einem kontinuierlichen Absinken der Testosteronkonzentrationen; nach durchschnittlich 22 Tagen lagen diese bei allen Tieren unterhalb der Nachweisgrenze von 0,1 ng/ml.

Parallel zu Testosteron sanken auch die Konzentrationen von Estradiol-17 β im Plasma signifikant ab, alle Werte blieben jedoch weiterhin im Messbereich mit einem Mittelwert [\bar{x} g/(SF)] von 5,3/2,2 pg/ml.

Wie bereits von RIESENBECK et al (2002) und VICKERY et al. (1989) beschrieben, kam es während der ersten drei Tage nach Einsetzen des Implantates zunächst zu einem starken Anstieg der Testosteron- und auch der Estradiol-17 β Konzentrationen. Verglichen mit den Ausgangswerten vor der Implantation, waren die Werte für Testosteron bzw. Estradiol-17 β zu diesen Zeitpunkten um den Faktor 3,8 bzw. 2,5 erhöht.

Dieser initiale Anstieg entspricht den Erwartungen und ergibt sich aus der unmittelbaren Freisetzung von Azagly-Nafarelin aus dem Implantat. Die Wirkungsumkehr nach ca. 3 Tagen muss als Indiz für die beginnende Downregulierung angesehen werden, ein Vorgang, der innerhalb von 8 bis 22 Tagen abgeschlossen war. Danach lagen die Werte für Testosteron unterhalb der Nachweisgrenze von 0,1 ng/ml. Auch die Estradiol-17 β -Konzentrationen sanken innerhalb dieser Zeit auf Basalwerte. Eine Downregulation zeigte sich demnach bei allen acht Hunden.

Als Ergebnis der sistierenden oder unterhalb der Nachweisgrenze verlaufenden Testosteronproduktion ergab sich eine Verringerung der Größe der Prostata um 46 % innerhalb von 5 Wochen. Eine weitere Größenabnahme wurde danach nicht mehr beobachtet. Die sonografische Erfassung der Prostata gestattet keine weiteren zellulären Differenzierungen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass insbesondere die epithelialen Anteile mit einer raschen Rückbildung reagiert habe, während die Stromalen Anteile nahezu unverändert bleiben dürften. In den vorliegenden Untersuchungen wies die Prostata mit im Mittel $10,6 (3,1) \text{ cm}^2 [\bar{x}/(SD)]$ bei allen Rüden eine relativ geringe Ausgangsgröße auf. Es ist daher davon auszugehen, dass der Bindegewebige Anteil an der Gesamtprostata relativ hoch ist, was sich daran zeigt, dass die mittlere Größe der Prostata um lediglich ca. 50 % abnahm. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass bei einer größeren Prostata oder deren Hyperplasie, deutlich stärkere Größenabnahmen gemessen werden können. Erste klinische Befunde an Rüden mit einer benignen Prostat hyperplasie scheinen dies zu bestätigen (HOFFMANN et al., unveröffentlichte Ergebnisse).

Festzustellen ist weiterhin, dass der initiale Testosteronanstieg nach der Implantation des Arzneimittels keinen nachweisbaren Effekt auf die Größe der Prostata hatte.

Die Größenabnahme der Prostata ging auch mit einem funktionellen Verlust einher, wie die Abnahme der Ejakulatvolumina bis hin zur Aspermie erkennen lässt. Die damit zunächst einhergehende Erhöhung der Spermienkonzentrationen im Ejakulat bestätigt frühere Befunde (RIESENBECK et al. 2002, HOFFMANN u. ENGEL 2004) und zeigt, dass die epididymale Spermienpassage bei der Downregulation zunächst wenig betroffen zu sein scheint.

Ob die nach 5 – 7 Wochen eintretende Aspermie auf einen mangelnden Spermientransport oder einen bereits eingetretenen Arrest der Spermatogenese zurückzuführen ist, kann derzeit nicht gesagt werden. Unbenommen davon bleibt die Beobachtung, dass die Downregulation zu einem Arrest der Spermatogenese auf Ebene der Spermatogonien führt (RIESENBECK 2002), ein Effekt der zwischenzeitlich auch für Azagly-Nafarelin gezeigt werden konnte (Pesch et al., unveröffentlichte Ergebnisse).

Im Vergleich zur Prostata verringerte sich die Größe der Hoden relativ langsam; 13 bis 17 Wochen nach Implantation war die Hodengröße durchschnittlich um 82 % gesunken und blieb danach praktisch konstant. Diese Reduktion der Hodengröße entspricht der, wie sie z.B. bei saisonalen Wildtieren (Reh, Rothirsch, Nerz) gefunden wurde (SHORT u. MANN 1966; HOCHEREAU-DE REVIERS u. LINCOLN 1978; SUNDQVIST et al. 1988), betroffen waren sowohl tubuläres als auch interstitielles Hodengewebe (HOCHEREAU-DE REVIERS u. LINCOLN 1978).

Wie erwartet hielt bei den Hunden der Gruppe 1 die Downregulation bis zur Implantatentfernung nach 180 Tagen an.

Von den Tieren der Gruppe 2, zeigte nur ein Hund (Elias) eine bis zur Implantatentfernung anhaltende Wirkung, bei den Hunden Eddie, Elliott und Elvis kam es zum Wirkungsverlust nach im Mittel $251,7 \pm 74,2$ Tagen.

Gemessen an den vier Tieren der Gruppe 2 ergibt sich demnach eine höchst unterschiedlich lange Wirkungsdauer der Implantate. Auffallend war weiterhin ein kurzfristiger Anstieg von Testosteron auf Werte im physiologischen Bereich von 0,3 – 0,9 ng/ml (Jackson) bzw. 0,3 – 2,8 ng/ml (Elias) an den Tagen 36 und 43 bzw. 324, 331 und 338 nach der Implantation. Diese Beobachtungen lassen auf eine variierenden Freisetzung des GnRH-Agonisten aus der Implantationsstelle schließen. So zeigte sich bei den Versuchen der Implantatentfernung, dass dies bei einigen Tieren (Elvis, Jonathan, Julien) aufgrund bindegewebiger Verwachsungen relativ schwierig war. Auf ähnliche Beobachtungen wurde bereits früher hingewiesen (OETTEL 1976) und dies mit einer Resorptionsverzögerung und damit einer längeren Wirkdauer interpretiert. Wie sich aus Untersuchungen von JÄGER (2006) ergibt, scheint die Dauer der Downregulation von der Aufrechterhaltung gewisser Mindestspiegel des Wirkstoffes abzuhängen, wie sie sich während der terminalen Phase der Elimination ergeben, da kein Unterschied in der Wirkdauer bei doppelter und dreifacher Dosierung festzustellen war.

Eine Erklärung für das kurzfristige Auftreten physiologischer Testosteronkonzentrationen bei zwei Tieren während der Phase der Downregulation kann nicht gegeben werden. Da mit Änderungen der Wirkstofffreisetzung aus dem Implantat selbst nicht zu rechnen ist, könnten ggf. die sekundären, die Umgebung des Implantates betreffende gewebliche Umbauprozesse dafür verantwortlich sein.

Nach Entfernung des Implantates bzw. Wirkungsende zeigte sich bei allen Hunden ein Anstieg der Testosteron- und Estradiol-17 β -Konzentration, die Ausgangswerte vor der Implantation wurden nach durchschnittlich 7 bzw. 3 Wochen wieder erreicht.

Die Verfügbarkeit von LH lag 11 Wochen nach Entfernung des Implantates bzw. nach Wirkungsende wieder auf dem gleichen Niveau wie vor der Behandlung mit „Gonazon®“. Die Testosteron- und Estradiol-17 β -Konzentrationen stiegen interessanterweise über das Ausgangsniveau hinausgehend weiter an und die Testosteronwerte waren – in Bestätigung früherer Befunde (TREMBLY und BELANGER 1984) - am Ende der Beobachtungsphase signifikant höher als vor der Implantation. Die initiale Ursache für diese erhöhte

Testosteronproduktion ist unbekannt. Da die 11 Wochen nach Implantatentfernung bzw. Wirkungsverlust gemessene Verfügbarkeit von LH dem Ausgangswert entsprach, ist jedoch eher zu vermuten, dass auf testikulärer Ebene eine erhöhte Reaktionsbereitschaft auf gonadotrope Stimuli vorliegt, als eine verstärkte Produktionsleistung des Hypothalamus-Hypophysen-Systems (mehr GnRH und LH).

Auch die Hoden erreichten während der Versuchsphase 4 nach 16 bis 20 Wochen ihre Ausgangsgröße, bei der Prostata war dies bereits nach 8 bis 9 Wochen der Fall, wobei bei drei Hunden (Elvis, Jackson, Julien) die ursprüngliche Größe sogar deutlich überschritten wurde. Dies ist in Übereinstimmung mit den über die Ausgangswerte hinausgehenden Testosteronkonzentrationen und lässt die hohe Androgenempfindlichkeit der Prostata erkennen.

Bei 7 Hunden konnten durchschnittlich ab der 9. Woche nach Entfernung des Implantates bzw. Wirkungsende wieder Samen gewonnen werden, der allerdings noch von minderer Qualität war. Bei 6 dieser 7 Hunde hatte das Sperma ab den Wochen 20 bis 30 der Versuchsphase 4 wieder die Ausgangsqualität erreicht, bzw. zeigte bei den Parametern Vorwärtsbeweglichkeit und Pathomorphologie sogar eine Verbesserung. Bei diesen Tieren war es demnach nicht nur zu einer völligen Rekonstitution der Spermatogenese gekommen sondern es zeigte sich – in Übereinstimmung mit den Testosteronbefunden – auch die Tendenz einer Verbesserung der Spermaqualität. Der Rüde Elliott (Gruppe 2) hatte ca. 7 Monate nach Wirkungsende erfolgreich gedeckt. Damit bestätigt sich die mit anderen GnRH-Analoga gemachte Beobachtung der Reversibilität der Hemmung der Spermatogenese (LACOSTE et al. 1989; TRIGG et al. 2001; JUNAIDI et al. 2003).

Bei dem 7. Hund (Elvis) konnte bis Woche 20 der Versuchsphase 4 ein den anderen Hunden vergleichbarer Anstieg der Gesamtspermienzahl beobachtet werden; diese fiel danach aber wieder ab und der Rüde zeigte bis Versuchsende eine Oligo- und Teratozoospermie. Auf die dabei zugrunde liegenden Ursachen kann – auch mangels weiterführender Untersuchungen – nicht geschlossen werden.

Von Hund Eddie konnte bis Versuchsende nur Seminalplasma (Prostatasekret), gewonnen werden, so dass sich die Diagnose einer Azoospermie ergab. Eine Erklärung bot sich zunächst nicht an, zumal sich alle hormonellen Parameter im Referenzbereich befanden. Dieser Rüde wurde 40 Wochen nach Wirkungsverlust, bei immer noch bestehender Azoospermie kastriert und die Hoden histologisch untersucht. Dabei zeigte sich ein normales mehrschichtiges

Keimepithel (s. Abb. 31). Hinweise auf eine Störung der Spermatogenese ergaben sich nicht. Als eine Ursache der festgestellten Azoospermie wurde daher eine Obstruktion im Bereich der oberen samenableitenden Wege vermutet, da Nebenhodenschwanz- und Kopf klinisch unauffällig waren.

5.4.2. Sonstige Effekte

Das Implantat wurde von den Hunden sehr gut toleriert, unerwünschte Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. Allerdings waren Tierzahl und Behandlungsdauer zu gering, um hier eine abschließende Beurteilung dazu zu gestatten.

Alle Implantate konnten zu den vorgegebenen Zeitpunkten entfernt werden. Bei 5 Rüden war dies nach kleiner Lokalanästhesie innerhalb weniger Minuten problemlos möglich. Bei drei Rüden war das Implantat jedoch nur schwer auffindbar, die Lokalanästhesie musste nachdosiert und ein größeres Areal infiltriert werden. Im Rahmen des Versuchs waren alle Hunde an ein gewisses „Handling“ gewöhnt worden. Bei Fehlen einer solchen Gewöhnung, könnte es ggf. jedoch notwendig werden, parallel zur Lokalanästhesie eine leichte Sedation einzuleiten.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die Behandlung mit „Gonazon®“ bei allen acht Hunden zu einer effektiven Ausschaltung der Hodenfunktion führte, für das Implantat ergab sich eine mittlere Wirkungsdauer von $284,7 \pm 54,1$ Tagen (ca. 9,5 Monate).

„Gonazon“ stellt somit eine interessante Alternative zur chirurgischen Kastration dar, zur Reversibilität der Spermaqualität und der Anwendung des Präparates bei Zuchtrüden sollten weiterführende Studien an einer größeren Tierzahl durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Die Downregulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren durch Anwendung von Implantaten die einen GnRH-Agonisten kontinuierlich freisetzen, bietet eine effektive und reversible Alternative zur chirurgischen Kastration des Rüden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Effekt von Gonazon® (Intervet), einem neuen Implantat, das als Wirkstoff 18,5 mg des GnRH-Agonisten Azagly-Nafarelin enthält, an acht Beagle-Rüden zu ermitteln.

Nach einer Eingewöhnungsphase (1. Versuchsphase) und einer dreiwöchigen Versuchsperiode (2. Versuchsphase), in der die Hunde als ihre eigene Kontrollgruppe dienten, wurde allen Hunden das Implantat am gleichen Tag subkutan, paraumbilikal appliziert; damit begann die 3. Versuchsphase.

Bei 4 Hunden (Gruppe 1) wurde das Implantat nach 180 Tagen wieder entfernt, bei den anderen 4 Rüden (Gruppe 2) nach 365 Tagen. Nach Entfernung des Implantats bzw. nach Wirkungsverlust, ergab sich eine vierte, 20 bis 30 Wochen andauernde Versuchsphase.

Zur Erfassung von Eintritt und Aufhebung der Downregulation, wurden über alle Versuchsphasen hinweg mindestens einmal wöchentlich Blutproben zur Bestimmung der Testosteron- und Estradiol-17 β -Konzentrationen entnommen. Zusätzlich wurden zur Ermittlung der LH-Freisetzung zu bestimmten Zeitfenstern Blutproben in 20 minütigem Abstand über 6 Stunden gewonnen. Weiterhin wurde alle zwei Wochen die Prostata- und Hodengröße ermittelt. Versuche zur Samenentnahme mit nachfolgender Spermauntersuchung wurden in regelmäßigen Abständen durchgeführt.

Nach Implantation sanken bei allen Hunden die Testosteronkonzentrationen innerhalb von 8 bis 22 Tagen unter die Nachweisgrenze von 0,1 ng/ml ab. Im gleichen Zeitraum fielen auch die Estradiol-17 β -Konzentrationen auf Basalwerte. 11 Wochen nach der Implantation war die Verfügbarkeit von LH um ca. 70 % reduziert. Weiterhin zeigte sich eine Verringerung der Hodengröße um durchschnittlich 82 % 13 bis 17 Wochen nach Implantation und die Größe der Prostata nahm innerhalb von 5 Wochen um ca. 46 % ab.

5 bis 7 Wochen nach Implantation konnte von keinem der Rüden mehr Ejakulat gewonnen werden.

Die Rüden der Gruppe 1 waren zum Zeitpunkt der Implantatentfernung nach 180 Tagen noch downreguliert. Von den Tieren der Gruppe 2 war nur ein Hund nach 365 Tagen noch downreguliert, bei den anderen Rüden kam es zu einem Wirkungsverlust nach durchschnittlich $251,7 \pm 74,2$ Tagen.

Sieben bzw. drei Wochen nach der Entfernung bzw. nach Wirkungsverlust, erreichten die Testosteron- und Estradiol-17 β -Konzentrationen bei allen acht Hunden wieder die Ausgangswerte, stiegen danach jedoch noch weiter an, am Ende der 4. Versuchsphase lagen die Testosteronwerte signifikant über den Ausgangswerten.

Die Verfügbarkeit von LH entsprach 11 Wochen nach der Entnahme des Implantates wieder der vor der Behandlung. Nach 16 bis 20 Wochen erreichten auch die Hoden wieder ihre Ausgangsgröße, bei der Prostata war dies bereits nach 8 bis 9 Wochen der Fall, wobei bei drei Hunden die ursprüngliche Größe sogar deutlich überschritten wurde

Bei 6 Rüden hatte die Ejakulatqualität 20 bis 30 Wochen nach Implantatentfernung die Ausgangsqualität wieder erreicht, ein 7. Rüde (Elvis) wies bis zum Ende der vierten Versuchsphase eine Oligo- und Teratozoospermie auf. Der 8. Hund (Eddie) zeigte bis Versuchsende eine Azoospermie. Der Rüde wurde 40 Wochen nach Implantatentfernung kastriert und die Hoden histologisch untersucht, wobei sich keine Hinweise auf eine Störung der Spermatogenese zeigten, so dass eine Obstruktion im Bereich der oberen samenableitenden Wege vermutet wurde.

Die Behandlung mit "Gonazon®" führte bei allen acht Hunden zu einer effektiven Ausschaltung der Hodenfunktion. Für Gonazon® ergab sich eine mittlere Wirkungsdauer von $284,7 \pm 54,1$ Tagen (ca. 9,5 Monate), die Effekte auf die Hormonfreisetzung, Hoden- und Prostatagröße waren bei allen Hunden voll reversibel.

Zur Überprüfung der Reversibilität der Spermaqualität und der Anwendung des Präparates bei Zuchtrüden sollten weiterführende Studien an einer größeren Tierzahl durchgeführt werden.

7 Summary

Downregulation of anterior pituitary GnRH-receptors by application of a slow release GnRH-implant offers an effective and reversible alternative to surgical castration in the male dog.

Aim of the present study was to test the efficacy of a new controlled-release device (Gonazon®, Intervet) containing 18.5 mg of the GnRH-analogue Azagly-Nafarelin in 8 male beagle dogs.

After allowing the dogs to get accustomed to their new environment (1. Experimental Phase) and a three week control period (2. Experimental Phase), where dogs served as their own control group, all dogs were treated with Gonazon®, marking the onset of Experimental Phase 3. To allow for implant removal, implantation was s.c. at the para-umbilical region.

In 4 dogs (group 1) implant removal was after 180 days, in the other 4 dogs (group 2) removal was after 365 days.

Following implant removal or loss of efficacy, dogs entered Experimental Phase 4, which lasted between 20 to 30 weeks.

To monitor onset and loss of downregulation blood samples were collected at least once per week for assay of testosterone- and estradiol-17 β . To characterise availability LH, time windows were set where blood samples were taken in 20 min intervals over 6 hours.

In addition testicular and prostatic size were measured in two week intervals and attempts to obtain an ejaculate were at regular intervals; where possible semen quality was evaluated.

8 to 22 days after implantation testosterone-concentrations had decreased below 0.1 ng/ml.

Similarly estradiol-17 β showed a decrease to basal levels. 11 weeks after implantation, availability of LH was reduced by about 70 %. Testicular size decreased by about 82 % 13 to 17 weeks after implantation and prostatic size decreased by about 46 % after 5 weeks. 5 to 7 weeks after treatment all dogs were aspermic.

All dogs in group 1 were still downregulated at the time of implant removal while in group 2 only one dog stayed downregulated until day 365. The other three dogs showed a loss of efficacy after an average of 251.7 ± 74.2 days.

7 and 3 weeks after implant removal or loss of efficacy, testosterone- and estradiol-17 β -concentrations had returned to pre-treatment values in all 8 dogs. Both hormones showed a further increase and at the end of the 4. Experimental Phase testosterone levels were significantly higher than before treatment.

11 weeks after removal of the implant or loss of efficacy, availability of LH had reached pre-treatment values. Testicular and prostatic size were back to pre-treatment values after 16 to 20 resp. 8 to 9 weeks; in 3 dogs size of the prostatic gland even exceeded pre-treatment values.

In 6 dogs semen quality had reached or was even above pre-treatment levels 20 to 30 weeks after implant removal or loss of efficacy. In one dog (Elvis) recrudescence of spermatogenesis stopped to continue and fell back to a stage of oligozoo- and teratozoospermia after 30 weeks.

The 8th beagle (Eddie) stayed azoospermic and was castrated 40 weeks after implant removal. Histological examination of the testis did not give any hints on a disturbed spermatogenesis; hence an obstruction of efferent ductules was the suspected reason for the azoospermia observed.

In conclusion treatment with Gonazon® efficiently induced a long-term blockade of pituitary and gonadal functions in all dogs. Average duration of efficacy was $284,7 \pm 54,1$ days (about 9,5 months). Effects on availability of testosterone, estradiol-17 β and LH and also on testicular and prostatic size were fully reversible.

However, the observations in respect to recrudescence of spermatogenesis warrant further investigations.

8 Literaturverzeichnis

Alef, M., Oechtering, G. (1999)

Narkose

In: Schebitz H. u. Brass, W. (Hrsg.), Operationen an Hund und Katze,
Parey Buchverlag Berlin: pp 71-120

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

Immunization of dogs against human chorionic gonadotroin

Am J Vet Res 35: 261-4

Amory, J.K. (2006)

Male hormonal contraceptives

Minerva Ginecol 58: 215-26

Andersson, A., Linde-Forsberg, C. (2001)

Castration and progestagen treatment of male dogs, part 2

Svensk Veterinär tidning 53: 391-397

Arbeiter, K. (1994)

Anwendung von Hormonen in der Reproduktion von Hund und Katze

In: Döcke, F. (Hrsg.), Veterinärmedizinische Endokrinologie

Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: pp 823-841

Arnold, S., Reicher, I., Huber, M. (2006)

Early Neutering and future health

5th biannual Congress, EVSSAR (Abstract)

Bamberg, E. (1994a)

Biochemie der gonadalen Steroidhormone

In: Döcke, F.(Hrsg.), Veterinärmedizinische Endokrinologie

Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: pp 411-415

Bamberg, E. (1994b)

Wirkungen der Keimdrüsenhormone

In: Döcke, F.(Hrsg.), Veterinärmedizinische Endokrinologie

Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: pp 418-443

Bamberg-Thalén, B., Linde-Forsberg, C. (1992)

The effects of medroxyprogesterone acetate and ethinylestradiol on hemogram, prostate, testes and semen quality in normal dogs

Zentralbl Veterinarmed A 39: 264-70

Barsanti, J.A., Finco, D.R. (1995)

Medical treatment of canine prostatic hyperplasia

In: Bonagura, J.D. (Eds.), Current Veterinary Therapy Small Animal Practice XII.

W.B. Saunders, Philadelphia, PA: pp 1033-1034

Bartke, A., Hafiez, A.A., Bex, F.J., Dalterio, S. (1978)

Hormonal Interactions in Regulation of Androgen Secretion
Biol Reprod 18: 44-54

Bell, F.W., Klausner, J.S., Hayden D.W., Feeney, D.A., Johnston, S.D. (1991)

Clinical and pathologic features of prostatic adenocarcinoma in sexually intact and castrated dog: 31 cases (1970-1987)
J Am Vet Med Assoc 199: 1623-1630

Berchtold, M. (1993)

Andrologie

In: Freudiger, U., Grünbaum, E.-G., Schimke, E. (Hrsg.), Klinik der Hundekrankheiten
Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart: pp 665-675

Bertschinger H.J., Trigg, T.E., Jochle, W., Human, A. (2002)

Induction of contraception in some African wild carnivores by downregulation of LH and FSH secretion using the GnRH analogue deslorelin
Reprod Suppl 60: 41-52

Bird, C.E., Finnis, W., Baroomand, K., Murphy, J., Clark, A.F. (1978)

Kinetics of testosterone metabolism in normal postmenopausal women with breast cancer
Steroids 32: 323-335

Boland, L.E., Hardie, R.J., Gregory, S.P., Lamb, C.R. (2003)

Ultrasound-Guided percutaneous Drainage as the Primary Treatment for Prostatic Abscesses and Cysts in dogs
J Am Anim Hosp Assoc 39: 151-159

Brinckmann, H.-G. (1989)

Untersuchungen der physiologischen LH- und Testosteronrhythmik bei Beagle-Rüden verschiedener Altersgruppen
Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

Brodey R.S., Martin J.E. (1985)

Sertoli cell neoplasms in the dog. The clinicopathological and endocrinological findings in thirty-seven dogs.
J Am Vet Med Assoc 133: 249-257

Bruchovsky, N., Wilson, J.D. (1968)

The intranucler binding of testosterone and 5 α -Androstan-17 β -ol-3-one by Rat Prostate
J Biol Chem 243: 5953-5960

Chang, C., Chen, Y.-T., Yeh, S.-D., Xu, Q., Wang, R.-S., Guillou, F., Lardy, H., Yeh, S. (2004)

Infertility with defectice spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells
Proc Natl Acad Sci USA 101: 6876-6881

Corrada, Y, Spaini, E., de la Sota, P.E., Scodellaro, C. , Fernandez, L., Gobello, C. (2006)

Effect of the GnRH-Anatgonist, Acyline, on canine testicular Parameters
Theriogenology 66: 663-687

Comhaire, F., Mattheeuws, D., Vermeulen, A. (1974)

Testosterone and oestradiol in dogs with testicular tumours
Acta Endocrinologica 77: 408-416

Cornell, K.K., Bostwick, D.G., Cooley, D.M., Hall, G., Harvex, H.J., Hendrick, M.J., Pauli, B.U., Render, J.A., Stoica, G., Sweet, D.C., Waters, D.J. (2000)

Clinical and Pathologic Aspects of Spontaneous Canine Prostate Carcinoma: A Retrospective Analysis of 76 Cases
The Prostate 45: 173-183

Debrunye, F.M. (2004)

Gonadotropin-releasing hormone antagonist in the management of prostate cancer
Rev Urol 6: 25-32

DeGendt, K., Swinnen, J.V., Saunders, P.T.K., Schoonjans, L., Dewerchin, M., Devos, A., Tan, K., Atanassova, N., Claessens, F., Lecureuil, C., Heyns, W., Carmeliet, P., Guillou, F., Sharpe, R.M., Verhoeven, G. (2004)

A sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis
Proc Natl Acad Sci USA 101: 1327-1332

DePalatis, L., Moore, J., Falvo, R.E. (1978)

Plasma concentrations of testosterone and LH in the male dog
J Reprod Fertil 52, 201-207

Dierich, A., Sairam, M.R., Monaco, L., Fimia, G.M., Gansmuller, A., LeMeur, M., Sassone-Corsi. P. (1998)

Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: Targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance
Proc Natl Acad Sci USA 95: 13612-13617

Dixon, W.J. (1993)

„BMDP Statistical offtware Manual, Vol 1 and 2“
University of California Pree, Berkley, Los Angeles, London

Döcke, F. (1994a)

Regulation der Keimdrüsenfunktion
In: Döcke, F. (Hrsg.), Veterinärmedizinische Endokrinologie
Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: pp 446-508

Döcke, F. (1994b)

Hypothalamus-Adenohypophysen-System
In: Döcke, F. (Hrsg.), Veterinärmedizinische Endokrinologie
Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: pp 131-175

Döring, D., Erhard, M.H. (2006)

Tierärztliche Verhaltenstherapie bei Hund und Katze
Tierärztl Prax 34 (K): 367-374

Doyle, F., Sharpe, N., Scott, M.C., Mirro, E., Hartmann, B., Halliwell, W.H. (2004)

Chronic Effects of Flutamide in Male Beagle Dogs
Toxicologic Pathology 32: 343-349

Dube, D. Assaf, A., Pelletier G., Labrie, F. (1987)

Morphological study of the effects of a GnRH agonist on the canine testis after 4 months of treatment and recovery
Acta Endocrin 116: 413-417

Eisenhauer, K.M., McCue, P.M., Nayden, D.K., Osawa, Y., Roser, J.F. (1994)

Localization of aromatase in equine Leydig cells
Domest Anim Endocrinol. 11: 291-298

England, G.C. (1997)

Effect of progestagens and androgens upon spermatogenesis and steroidogenesis in dogs
J Reprod Fertil Suppl. 51: 123-138

England, G.C., Harvey M. (1998)

Pharmalogical Control of Reproduction in the dog and the bitch in:
In: Simpson, England, Harvey (Hrsg.), Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology
Iowa State Press: pp 197-210

Fahim M.S, Fahim, Z., Harman, J., Thompson, I., Montie, J., Hall, D.G. (1977)

Ultrasound as a new method of male contraception
Fertil Steril 28:823-831

Feddersen-Petersen, D. (2001)

Behavior disorders in dogs – a study of their classification
Dtsch Tierärztl Wochenschr 98: 15-19

Fischer, H.K. (2006)

Perioperative Analgesie bei Hund und Katze unter Tierschutzgesichtspunkten
Inaugural-Dissertation, TU Berlin

Fraczek, B., Kotula-Balak, M., Wojtusiak, A., Pierscinskim A., Bilinska, B. (2001)

Cytochtome P450 aromatase in the testis of immature and mature pigs
Reprod Biol 1: 51-59

Fried, N.M., Roberts, W.W., Sinelnikov, Y.D., Wright, E.J., Solomon, S.B. (2002)

Focused ultrasound ablation of the epididymis with use of thermal measurements in a canine model
Fertil Steril 78: 609-613

Foote, R.H., Swierstra, E.E., Hunt, W.L. (1972)

Spermatogenesis in the dog
Anat Rec 173:341-352

Gloyna, R.E., Siiteri, P.K., Wilson, J.D. (1970)

The formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrophic canine prostate and the effect of dihydrotestosterone on prostate growth in the dog
J Clin Invest 49: 1746-53

Gobello, C., Herno, G., Rodriguez, R. (2005)

Use of the GnRH-Antagonist Acyline on estrus cycle interruption in the bitch: a preliminary report
Theriogenology 64:13

Goodwin, M., Gooding, K.M., Regnier, F. (1979)

Sexpheromones in the dog
Science 203: 559-61

Grino, P.B.; Griffin, J.E., Wilson, J.D. (1990)

Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone
Endocrinology 126: 1165-1172

Günzel-Apel, A.-R., Brinckmann H.-G., Hoppen, H.-O. (1990)

Dynamik der LH- und Testosteron-Sekretion bei Beagle-Rüden verschiedener Altersgruppen
Reprod Dom Anim. 25: 78-86

Günzel-Apel, A.-R., Hille, P., Hoppen, H.-O. (1994)

Spontaneous and GnRH-induced pulsatile LH and Testosterone release in pubertal, adult and aging male beagles
Theriogenologie 41: 737-745

Günzel-Apel, A.-R. (1998)

Early castration of dogs and cats from the point of animal welfare
Dtsch Tierärztl Wochenschr. 105: 95-98

Heidenberger, E., Unshelm, J. (1990)

Changes in the behaviour of dogs after castration
Tierärztl Prax 18: 69-75

Herbison, A.E. (2006)

Physiology of the Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network
In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction
3rd Edition, Elsevier Academic Press: pp 1415-1482

Herbst, K.L., Anawalt, B.D., Amory, J.K., Bremner, W.J. (2002)

Acyline: the first study in humans of a potent, new gonadotropin-releasing hormone antagonist
J Clin Endocrinol Metab. 87: 3215-20

Herbst, K.L. (2003)

Gonadotropin-releasing hormone antagonists
Curr Opin Pharmacol 3: 660-666

Hess, R.A., Bunick, D., Lee, K.-H., Bahr, J. Taylor, J.A., Korbach, K.S., Lubahn, D.B. (1997)

A role for oestrogens in the male reproductive system
Nature 390: 509-511

Hess, R.A., Bunick, D., Lubahn, D.B., Zhou, Q., Bouma, J. (2000)

Morphologic Changes in Efferent Ductules and Epididymis in Receptor- α Knockout Mice
J Androl 21: 107-121

Hochereau-de Reviers, M.T., Lincoln, G.A. (1978)

Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*
J Reprod Fertil 54: 209-213

Hoffmann, B., Rattenberger, E. (1976)

Testosterone concentrations in tissue from veal calves bulls and heifers and in milk samples
J Anim Sci 46: 635-641

Hoffmann, B., Schneider, S. (1993)

Secretion of luteinizing hormone during the luteal phase of the oestrus cycle in the dog
Anim Reprod Sci 42: 275-288

Hoffmann, B., Höveler, R., Nohr, B., Hasan, S.H. (1994)

Investigations on hormonal changes around parturition in the dog and occurrence of pregnancy-specific non conjugated oestrogens
Exp Clin Endocrinol. 102: 185-189

Hoffmann, B. (2003)

Andrologie – Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung
Lehmanns Media

Hoffmann, B., Engel, E. (2004)

Downregulation, an effective alternative method to surgical castration in the male dog; indications and results.
WSAVA / FECAVA / HVMS World Congress, Rhodes, 6.-9. Oct. 2004, Scientific Proceedings, Vol. II: 743-746

Hoffmann, B., Gerwing, M., Riesenbeck, A., (2007)

Andrologie
In: E.-G. Grünbaum und E. Schimke (Hrsg.), Klinik der Hundekrankheiten
Enke Verlag Stuttgart: pp 765-781

Holzbauer, M., Newport, H.M. (1969)

Adrenal secretion rates and adrenal tissue concentrations of pregnenolone, progesterone, 11 beta OH-androstenedione and some other steroids in young pigs and dogs
J Physiol. 200: 821-848

Holzmann, A. (2001)

Physiologie und Pathologie der Kopulation
In: W. Busch und A. Holzmann (Hrsg.), Veterinärmedizinische Andrologie
Schattauer Verlag, Stuttgart: pp 409-410

Howe, L.M., Slater, M.R., Boothe, H.W., Hobson, H.P., Holcom, J.L., Spann A.C. (2001)

Long-term outcome of gonadectomy performed at an early age or traditional age in dogs
J Am Vet Med Assoc 218: 217-221

Ibach, B., Weissbach, L., Hilscher, B. (1976)

Stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the dog
Andrologia 8: 297-307

Iguer-Ouada, M., Verstehen JP. (1997)

Effect of finasteride (Proscar MSD) on seminal composition, prostate function and fertility in male dogs.

J Reprod Fertil Suppl 51: 139-49

Jäger, A. (2006)

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

Inaugural-Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, JLU Giessen

Jeong, K.-H., Kaiser, U.B. (2006)

Gonadotropin-Releasing Hormone Regulation of Gonadotropin Biosynthesis and Secretion
In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction

Physiology of the Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network
3rd Edition, Elsevier Academic Press; pp 1636-1703

Jöchle, W. (1998)

Fehlverhalten und Anpassungsprobleme bei Hund und Katze und deren pharmakologische Beeinflussbarkeit

Tierärztliche Praxis (K) 26: 410-421

Johnson, L. (1995)

Efficiency of Spermatogenesis

Microscopy Research and Technique 32: 385-422

Johnston, G.R., Freaney, D.A., Johnston, S.D., O'Brian, T.D. (1991)

Ultrasonographic features of testicular neoplasia in dogs: 16 cases (1980-1988)

J Am Vet Med Assoc 198 (10): 1779-1784

Johnston, S.D., Kamolpatana, K., Root-Kustritz, M.V. u. Johnston G.R. (2000)

Prostatic disorders in the dog

Anim Reprod Sci 60-61: 405-415

Junaidi, A. Williamson, P.E., Cummins, J.M., Martin, G.B., Blackberry, M.A., Trigg, T.E. (2003)

Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue Deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs

Reprod Fertil Dev 15: 317-322

Jung, M.J., Moon, Y.C., Cho, I.H., Yeh, J.Y., Kim, S.E., Chang, W.S., Park, S.Y., Song, C.S., Kim, H.Y., Park, K.K., McOrist, S., Choi, I.S., Lee, J.B. (2005)

Induction of castration by immunization of male dogs with recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-canine distemper virus (CDV) T helper cell epitope p35
J Vet Sci. 6:21-24

Kamolpatana, K., Johnston S.D., Root Kustritz, M.V., Johnston, G.R., Sarkar, D.K., Memon, M.A. (2001)

Effects of finasteride on size of the prostate gland and semen quality in dogs with benign prostatic hypertrophy
J Am vet Med Assoc 218: 1275-80

Kamolpatana, K. (1998)

Effect of finasteride on benign prostatic hypertrophy in dogs
PhD thesis, Graduate School, Washington State University

Kawakami, E., Tsutsui, T., Aito, S., Kakimoto, T. u. Ogasa, A. (1995)

Changes in peripheral plasma luteinizing hormone and testosterone concentrations and semen quality in normal and cryptorchid dogs during sexual maturation
Lab Anim Sci. 45: 258-262

Kawakami, E., Hori, T., Tsutsui, T. (2001)

Relationship between testicular Transferrin and plasma Estradiol-17- β concentrations of dogs with Azoospermia and dogs with Sertoli Cell Tumors
J Vet Med Sci. 63: 579-581

Koch, A. (2004)

Untersuchungen der Prolaktinsekretion im Zusammenhang mit der Freisetzung von LH und Testosteron sowie Thyroxin und Tyrotropin bei Beagle-Rüden
Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

Kooistra, H.S., Okkens A.C. (2001)

Secretion of prolactin and growth hormone in relation to ovarian activity in the dog
Reprod Domest Anim 36: 115-119

Kutzler, M. (2005)

Semen collection in the dog
Theriogenology 64: 747-54

Kutzler, M., Wood, A. (2006)

Non-surgical methods of contraception and sterilization
Theriogenology 66: 514-525

Lacoste, D., Dube, D., Trudel, D., Belanger, A., Labrie, F. (1989)

Normal gonadal function and fertility after 23 months of treatments of prepubertal male and female dogs with the GnRH agonist [D-Tryp6, des-Gly-NH₂(10)]GnRH Ethylamide
J Androl. 10: 456-465

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

Development of an antifertility vaccine for pets based on active immunization against Luteinizing Hormon-Releasing Hormone
Biol Reprod 51: 1076-1083

Laroque, P.A., Prahalada, S., Gordon, L.R., Noblot, S.M., Bagdon, W.J., Duprat, P., Peter, C.P., van Zwieten, M.J. (1994)

Effects of chronic oral administration of a selective 5-alpha-reductase inhibitor, finasteride, on the dog prostate
Prostate 24: 93-100

Laroque, P.A., Prahalada, S., Noblot, S.M., Cohen, S.M., Soper, K., Duprat, P., Peter, C.P., van Zwieten, M.J. (1995)

Quantitative evaluation of glandular and stromal compartments in hyperplastic dog prostates: effect of 5-alpha reductase inhibitors
Prostate 37: 121-128

Lin, B.J., Chen, K.K., Chen, M.T., Chang, L.S. (1994)

The time for serum testosterone to reach castrate level after bilateral orchiectomy or oral estrogen in the management of metastatic prostatic cancer
Urology 43: 834-837

Lunnen, J.E., Faulkner, L.C., Hopwood, M.L., Pickett, B.W. (1974)

Immunization of Dogs with Bovine Luteinizing Hormon²
Biol Reprod 10: 453-460

Maarschalkerweerd, R.J., Endenburg, N., Kirpensteijn, J., Knol, B.W. (1997)

Influence of orchiectomy on canine behaviour
Vet Rec 140: 617-619

Mutayoba, B.M., Meyer, H.H.D., Schams, D. u. Schallenberger, E. (1990)

Development of a sensitive enzyme immunoassay for LH determination in bovine plasma using streptavidin-biotin technique
Acta Endocrinol. (Kph.), 122:227-232

Mutembei, H.M., Pesch, S., Schuler, G., Hoffmann, B. (2005)

Expression of oestrogen receptors alpha and beta and of aromatase in the testis of immature and mature boars
Reprod Domest Anim. 40: 228-236

Mutembei, H.M. (2006)

Expression of estrogen receptors alpha and beta, aromatae, steroid sulfatase and etrogen sulfotransferase in testes of immature and mature boars
Inaugural-Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, JLU Giessen

Neilson, J.C., Eckstein, R.A., Hart, B.L. (1997)

Effects of castration on problem behaviours in male dogs with reference to age and duration of behaviour
J Am Vet Med Assoc 211: 180-182

Neumann, F. (1983)

Pharmacological basis for clinical use of antiandrogens
J Steroid Biochem 19 (1A): 391-402

Nohr, B. (1993)

Untersuchungen zur endokrinen Kontrolle der Geburt bei der Hündin unter Anwendung eines Antigestagens
Inaugural-Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, JLU Giessen

Oettel, G. M. (1976)

Entwicklung und Anwendung Radioimmunologischer Verfahren zur Bestimmung einer anabol wirksamen Substanz (Trenbolonacetat®) und ihres Hauptmetaboliten (Trenbolon) in verschiedenen Geweben und im Plasma vom Rind
Inaugural-Dissertation, Fachbereich f. Landwirtschaft und Gartenbau der Technischen Universität München -Weihenstephan

Olson, P.N., Mulnix, J.A., Nett, T.M. (1992)

Concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the serum of sexually intact and neutered dogs
Am J Vet Res. 53: 762-766

Ortega-Patcheco, A., Bolio-Gonzalez, M.E., Colin-Flores, R.F., Sauri-Arceo, C.H., Gutierrez-Blanco, E., Jimenet-Coello, M., Linde Forsberg, C. (2006)

Evaluation of a Burdizzo castrator for neutering of dogs
Reprod Domest Anim. 41: 227-232

Padula, A.M. (2005)

GnRH analogues – agonists and antagonist
Anim Reprod Sci 88: 155-126

Palla, H. (1994)

Untersuchung zur Physiologie und Pathophysiologie von Östradiol und Androstendion beim männlichen Hund
Dissertation der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Paramo, R.M., Renton, J.P., Ferguson, J.M., Concannon P.W. (1993)

Effects of medroxyprogesteron acetate or gonadotrophin-releasing hormone agonist on supression of spermatogenesis in the dog (Canis familiaris)
J Reprod Fertil Suppl. 47: 387-397

Pareek. T.K., Joshi, A.R., Sanyal, A., Dighe, R.R. (2007)

Insights into male germ cell apaptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists
Apoptosis 12:1085-1100

Pavlou, S.N., Brewer, K., Farley, M.G., Lindner, J., Bastias, M.C., Rogers, B.J., Swift, L.L., Rivier, J.E., Vale, W.W., Conn, P.M. (1991)

Combined administration of a gonadotropin-releasing hormone antagonist and testosterone in men induces reversible azoospermia without loss of libido
J Clin Endocrinol Metab 73: 1360-1369

- Pesch, S., Schuler, G., Wilhelm, E., Hoffmann, B. (2007)**
Samengewinnung, -Konservierung und künstliche Besamung beim Hund
Tierärztl Praxis (K) 35: 81-90
- Peters, M.A., van Sluijs, F.J. (1996)**
Testicular tumors in dogs: a literature review
Tijdchr Diergeneeskd. 121: 36-38
- Peters, M.A., de Jong, F.H., Teerd, K.J., de Rooij, D.G., Dielemann, S.J., van Sluijs, F.J. (2000)**
Ageing, testicular tumors and the pituitary-testis axis in dogs
J Endocrinol. 66: 153-161
- Power, S.C., Eggleton, K.E.; Aaron, A.J., Holt, P.E., Cripps, P.J. (1998)**
Urethral sphincter mechanism incompetence in the male dog: importance of bladder neck position, proximal urethral length and castration
J Small Anim Pract 39: 69-72
- Prange, H., Kosmehl, H., Katenkamp, D. (1987)**
The pathology of testicular tumours in dogs. 2. Morphology and comparative morphologic aspects
Arch. Exp. Veterinarmed. 41: 366-388
- Raeside, J.I., Christie, H.L., Renaud, R.L. (1999)**
Androgen and Estrogen Metabolism in the reproductive tract and accessory sex glands of the domestic boar (*Sus scrofa*)
Biol Reprod 61: 1242-1249
- Riesenbeck, A., Dengler, P., Hoffmann, B. (1999)**
Zum Vorkommen physiologischer und pathologischer Estrogenwerte beim Rüden
Proc. Deut. Vet. Med. Gesellschaft, Fachgruppe Kleintiere
45. Jahrestagung 07.-10.10.1999 Giessen
- Riesenbeck, A., Völger, D., Hoffmann, B. (2001)**
Praxisnahe Bestimmung von Vitalitätsparametern zur Beurteilung von Rüdensperma
Tierarzt Praxis 29 (K):116-120
- Riesenbeck A., Klein, R. u. Hoffmann, B. (2002)**
Downregulation, eine neue, reversible Möglichkeit zur Ausschaltung der Hodenfunktion beim Rüden
Der praktische Tierarzt 83: 512-520
- Roberts, W.W., Wright, E.J., Fried, N.M., Nicol, T., Jarrett, T.W., Kavoussi, L.R., Solomon, S.B. (2002)**
High-intensity focused ultrasound ablation of the epididymis in a canine model: a potential alternative to vasectomy
J Endourol 16: 621-625

Röcken, F.E., Nothelfer, H.-B., Hoffmann, B. (1995)

Testosteronkonzentrationen im peripheren Plasma sowie morphologische Hodenbefunde von Rüden mit einer Perinealhernie
Kleintierpraxis 40: 261-267

Rommerts, F.F., de Jong, F.H., Brinkmann, A.O., van der Molen, H.J. (1982)

Development and cellular localization of rat testicular aromatase activity
J Reprod Fertil 65: 281-288

Rubion, S., Desmoulin, O.O., Rivière-Godet, E., Kinzinger, M., Salavert, F., Rutten, F., Flochlay-Sigognault, A., Driancourt, M.A. (2006)

Treatment with a subcutaneous GnRH agonist containing controlled release device reversibly prevents puberty in bitches
Theriogenology 66: 1651-1654

Russel, L.D., Ettl, R.A., Sinha Hikum, A.P., Clegg, E.D. (1990)

Histopathological Evaluation of the Testis
Cache River Press, Cleerwater

Saxena, B.B., Clavio, A., Singh, M., Rathnam, P., Bukharovich, Y., Reimers, T. Jr., Saxena, A., Perkins, S. (2002)

Modulation of ovarian function in female dogs immunized with bovine luteinizing hormone receptor
Reprod Domest Anim 37: 9-17

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

Gonadotropins and ovarian steroids in cattle. I. Pulsatile changes of concentrations in the jugular vein throughout the oestrus cycle
Acta Endocrinol (Kph.) 108: 312-321

Schallenberger, E. (1990)

Charakterisierung von Sekretionsrhythmen der Gonadotropine und Ovarsterioide während des Brunstzyklus, der Gravidität und post partum beim Rind
Fortschritte der Veterinärmedizin, 40. Beiheft zum Zentralblatt für Veterinärmedizin
Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg

Schams, D., Höfer, F., Schallenberger, E., Hartl, M., Karg, H. (1974)

Pattern of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in bovine blood plasma after injection of a synthetic gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH)
Theriogenology 1: 137-151

Schmalz, B., Bilinska B. (1998)

Immunolocalization of aromatase and estrogen receptors in ram Leydig cells
Ginekol Pol 69: 512-516

Schneider, S. (1992)

Untersuchungen zur Freisetzung von LH während des Zyklus der Hündin
Inaugural-Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, JLU Giessen

- Schwahn, M., Nelamangala V. N., Derendorf, H. (2000)**
Population Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of Cetrorelix, a Novel LH-RH Antagonist, and testosterone in Rats and Dogs
Pharmaceutical Research 17, No. 3
- Sherding, R.G., Wilson G.P., Kociba, G.J. (1981)**
Bone marrow hypoplasia in eight dogs with Sertoli cell tumor
J Am Vet Med Assoc 178: 497-501
- Selman, P.J., Mol, J.A., Rutteman, G.R., van Garderen, E., van den Ingh, T.S., Rijnberk, A. (1997)**
Effects of progestin administration on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and glucose homeostasis in dogs
J Reprod Fertil Suppl 51: 345-54
- Short, R.T., Mann, T. (1966)**
The sexual cycle of a seasonally breeding mammal, the roebuck *Cepreolus capreolus*
J Reprod Fertil 12: 337-351
- Singh, J., O'Neill, C., Handelsman, D.J. (1995)**
Induction of Spermatogenesis by Androgen in Gonadotropin-Deficient (hpg) Mice
Endocrinology 136: 5311-5321
- Sinowatz, F. (2001a)**
Morphologie und Histologie der männlichen Genitalorgane
In: W. Busch und A. Holzmann (Hrsg.), Veterinärmedizinische Andrologie
Schattauer Verlag, Stuttgart: pp 1-22
- Sinowatz, F. (2001b)**
Physiologie und Pathologie der akzessorischen Geschlechtsdrüsen
In: W. Busch und A. Holzmann (Hrsg.), Veterinärmedizinische Andrologie
Schattauer Verlag, Stuttgart: pp 422-423
- Sinowatz, F. (2001c)**
Physiologie und Pathologie von Hoden, Nebenhoden und Skrotum
In: W. Busch und A. Holzmann (Hrsg.), Veterinärmedizinische Andrologie
Schattauer Verlag, Stuttgart: pp 427-429
- Sirinarumitr, K., Johnston, S., Root Kustritz, M.V., Johnston, G.R., Sarkar, D.K., Memon, M.A. (2001)**
Effects of finasteride on size of the prostate gland and semen quality in dogs with benign prostatic hypertrophy
J Am Vet Med Assoc 218: 1275-1280
- Sluka, P., O'Donnell, L., Bartles, J.R., Stanton, P.G. (2006)**
FSH regulates the formation of adherens junctions and ectoplasmic specialisations between rat Sertoli cells in vitro and in vivo
J Endocrin 189: 381-396

- Sorenmo, K.U., Goldschmidt, M., Shofer, F., Goldkamp, C., Ferracone, J. (2003)**
Immunohistochemical characterization of canine prostatic carcinoma and correlation with castration status and castration time
Veterinary and Comparative Oncology 1: 48-56
- Strecker, H., Hachmann, H., Seidel, L. (1979)**
Der Radioimmunassay (RIA), eine hochspezifische, extrem empfindliche quantitative Analyse-methode
Chemikerzeitung, Dr. Alfred Hübing Verlag, Heidelberg, Sonderdruck 103: 53-68
- Stowater J.L., Lamb, C.R. (1989)**
Ultrasonographic features of paraprostatic cysts in nine dogs
Veterinary Radiology, 30: 232-239
- Sundqvist, C., Ellis, L.C., Bartke, A. (1988)**
Reproductive endocrinology of the mink, *Mustela vison*
Endocr Rev 9: 247-266
- Talwar, G.P., Naz, R.K. (1981)**
Immunological control of male fertility
Arch Androl 7: 177-185
- Tepsumethanon, V., Wilde, H., Hemachudha, T. (2005)**
Intratesticular injection of a balanced zinc solution for permanent sterilization of dogs
J Med Assoc Thai 88: 686-689
- Thun, R., Schwartz-Porsche, D. (1994)**
Chemie und Biochemie der Nebennierenrindenhormone in:
In: Döcke, F., Veterinärmedizinische Endokrinologie
Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: pp 309-356
- Tremblay, Y., Belanger, A. (1984)**
Reversible inhibition of gonadal functions by a potent gonadotropin-releasing hormone agonist in adult dog
Contraception 30 (5): 483-497
- Trigg, T.E., Wright, P.J., Armour, A.F., Williamson, P.E., Junaidi, A. Martin, G.B., Doyle, A.G., Walsh, J. (2001)**
Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs
J Reprod Fertil 57: 255-261
- Trigg, T.E., Doyle, A.G., Walsh, J.D., Swangchan-uthai T. (2004)**
Advances in the use of the GnRH Agonist Deslorelin in Control of Reproduction
Proc. 5th international symposium on canine and feline reproduction: 49-51 [abstract]
- Trigg, T.E., Doyle A.G., Walsh, J.D., Swangchan-uthai T. (2006)**
A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction
Theriogenology 66: 1507-1512

Tsai, M.-Y., Yeh, S.-D., Wang, R.-S., Yeh, S., Zhang, C., Lin, H.-Y., Tzeng, C.-R., Chang, C. (2006)

Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells

Proc Natl Acad Sci USA 103: 18975-18980

Tsutsui, T., Hori, T., Shimizu, M., Orita, H., Kawakami, E., Fukuda, S. (2000)

Regression of Prostatic Hypertrophy by Osaterone Acetate in Dogs

J Vet Med Sci 62: 1115-1119

Tsutsui, T., Hori, T., Shimizu, M., Tatsuzawa, C., Kawakami, E. (2001)

Effect of Osaterone Acetate Administration on Prostatic Regression Rate, Peripheral Blood Hormone Levels and Semen Quality in Dogs with Benign Prostatic Hypertrophy

J Vet Med Sci 63: 453-456

Vickery, B.H., McRae, G.I., Briones, W., Worden, A., Seidenberg, R., Schanbacher, B.D., Falvo, R. (1984)

Effects of an LHRH agonist analog upon sexual function in male dogs. Suppression, reversibility, and effect of testosterone replacement

J Androl 5: 28-42

Vickery, B.H. (1985)

Comparisons of the potential utility of LHRH agonists and antagonists for fertility control

J Steroid Biochem 23 (5B): 779-791

Vickery, B.H., McRae, G.I., Briones, W.V., Roberts, B.B., Worden, A.C., Schanbacher, B.D., Falvo, R.E. (1985)

Dose-response studies on male reproductive parameters in dogs with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist

J Androl 6: 53-60

Vickery, B.H., McRae, G.I., Goodpasture, J.C., Sanders, L.M. (1989)

Use of potent LHRH analogues for chronic contraception and pregnancy termination

J Reprod Fertil 39: 175-187

Vigier, M., Weiss, M., Perrard, M.H., Godet, M., Durand, P. (2004)

The effects of FSH and of testosterone on the completion of meiosis and the very early steps of spermiogenesis of the rat: an in vitro study

J Molec Endocrin. 22 : 729-742

Wilbert, D.M.; Griffin, J.E., Wilson, J.D. (1983)

Characterization of the cytosol androgen receptor of the human prostate

J Clin Endocrin Metab 56: 113-120

Wilson, G.P., Hayes H.M. Jr. (1979)

Castration for treatment of perianal gland neoplasms in the dog

J Am Vet Med Assoc 174: 1301-1303

Winter, M., Falvo, R.E., Schanbacher, B.D., Verholtz, S. (1983)

Regulation of gonadotropin secretion in the male dog. Role of estradiol

J Androl 4: 319-323

Wright, P.J., Stelmasiak, T., Black, D., Sykes, D. (1979)

Medroxyprogesterone acetate and reproductive processes in male dogs
Aust Vet J 55: 437-8

Yin, S.A., Nolte, I. (2001)

Erkrankungen der Prostata

In: Yin, S.A. und Nolte, I. (Hrsg.), Praxisleitfaden Hund und Katze,
Schlütersche Verlagsgesellschaft, Hannover: pp 673-676

**Zeng, X.Y., Turkstra, J.A., van der Wiel, D.F., Guo, D.Z., Liu, X.Y., Meloen, R.H.,
Schaaper, W.M., Chen, F.Q., Oonk, H.B., Zhang, X. (2001)**

Active immunization against gonadotrophin-releasing-hormone in Chinese male pigs
Reprod Domest Anim 36: 101-105

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann für die Überlassung des Themas und die geduldige Unterstützung bei der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit.

Meinen Kollegen und Mit-Doktoranden sowie Jürgen Dörr danke ich herzlich für die Unterstützung bei der zeitintensiven Betreuung und Pflege meiner Beagle. Besonders möchte ich mich hier bei Helga Greven bedanken, auf deren Hilfe ich immer zählen konnte, selbst beim Aufbauen neuer Hundehütten.

Desweiteren bedanke ich mich herzlich bei Wilhelm Damm, Sabine Feller und Carmen Schuhmacher für die Einführung in die Hormonanalytik sowie die stets geduldige Hilfe bei meinen zahlreichen RIAs, das tolle Arbeitsklima, die heiteren und oft auch aufmunternden Kaffeepausen in den Inkubationszeiten des nicht immer unproblematischen LH-ELISAs.

Margit Bach danke ich nicht nur besonders herzlich für die Unterstützung bei der Samenuntersuchung, sondern auch für ihre Freundschaft, Tierliebe und ihr immer offenes Ohr.

Außerdem bedanke ich mich bei meinem Kollegen und Tanzpartner Mariusz Kowalewski, meinen ehemaligen Zimmerkollegen Henry Mutembei und Peter Richterich für ihre Freundschaft und ihre guten Ratschläge, die oft über den „Doktoranden-Alltag“ hinausgingen und mir auch in schwierigen Zeiten stets geholfen haben.

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

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie für die Geduld und Unterstützung sowie Alexandra Dingendorf und Nico Erdmann für ihre Freundschaft und Motivation.

Zuletzt möchte ich mich bei der Firma Intervet R&D, Frankreich für die stets gute Zusammenarbeit und Förderung dieser Arbeit ganz herzlich bedanken.

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

Carolin Ludwig



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN 3-8359-5259-5



9 783835 952591