

Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Endokrinologische und immunologische Untersuchungen zur lutealen Insuffizienz der Hündin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jenny Uhlmann, geb. Krachudel

Tierärztin aus Berlin

Berlin 2014

Journal-Nr.: 3751

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Katarina Jewgenow
Dritter Gutachter: PD Dr. Sebastian Arlt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

antibodies, autoimmunity, corpus luteum, dogs, ELISA, gene expression,
progesterone, reproduction, surface antigens

Tag der Promotion: 23.01.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-570-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2014

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhalt:

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS UND VERWENDETE EINHEITEN.....	VII
1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT.....	2
2.1 Reproduktionsbiologische Merkmale des caninen Sexualzyklus.....	2
2.2 Endokrinologische Regulation der caninen Lutealphase und Gravidität.....	3
2.2.1 Luteinisierendes Hormon (LH)	3
2.2.2 Progesteron.....	4
2.2.3 Prolaktin	4
2.2.4 Relaxin	6
2.3 Luteolyse und luteale Regression	7
2.4 Embryonale und fetale Fruchtverluste	8
2.5 Luteale Insuffizienz.....	9
2.5.1 Bedeutung in der Hundezucht.....	9
2.5.2 Klinisches Bild und Diagnostik des Hypoluteinismus.....	9
2.5.3 Interpretation der Progesteronkonzentrationen	10
2.5.4 Beeinflussung der Lutealfunktion	11
2.5.5 Zusammenfassung bisheriger Untersuchungen zum Hypoluteinismus der Hündin	12
2.5.6 Gelbkörperinsuffizienz anderer Spezies.....	13
2.6 Immunologische Grundlagen	17
2.6.1 Antigene	17

Inhaltsverzeichnis

2.6.2	B-Zellen und deren Antigen-Antwort	18
2.6.3	Antikörper	19
2.6.4	Zelloberflächenmoleküle (CD-Moleküle)	23
2.6.5	Autoimmunität	25
2.6.6	Immunologische Regulation während der Trächtigkeit	27
3.	MATERIAL UND METHODEN	30
3.1	Versuchsdurchführung	30
3.2	Auswahl der Tiere	30
3.2.1	Einteilung der Gruppen	31
3.2.2	Behandlungsschema	32
3.3	Geräte und Materialien	34
3.3.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	34
3.3.2	Reagenzien	36
3.3.3	Primer	38
3.3.4	Kits	39
3.3.5	Hergestellte Lösungen	39
3.4	Methodik	40
3.4.1	Bestimmung des Ovulationszeitpunkts	40
3.4.2	Gewinnung und Lagerung der Blutproben	41
3.4.3	Ovariohysterektomie	41
3.4.4	Endokrinologische Untersuchungen	43

Inhaltsverzeichnis

3.4.5	Immunologische Untersuchungen.....	45
3.4.6	Molekularbiologische Untersuchungen.....	48
3.5	Statistische Auswertung.....	51
4.	ERGEBNISSE.....	52
4.1	Klinische Befunde.....	52
4.2	Endokrinologische Befunde.....	53
4.2.1	Progesteron.....	53
4.2.2	Prolaktin.....	55
4.2.3	Relaxin.....	57
4.3	Immunologische Untersuchungen.....	60
4.3.1	Optimierung des ELISA.....	60
4.3.2	Reproduzierbarkeit und Spezifität des ELISA.....	63
4.3.3	Anti-Progesteron-IgE.....	65
4.3.4	Anti-Progesteron-IgM.....	66
4.4	Molekularbiologische Untersuchungen.....	69
4.4.1	Genexpression ausgewählter Parameter des Prostaglandin-Systems.....	69
4.4.2	Genexpression immunologischer Oberflächenmoleküle.....	71
5.	DISKUSSION.....	77
5.1	Klinische Befunde und Auswahl der Tiere.....	77
5.2	Endokrinologische Untersuchungen.....	78
5.3	Immunologische Untersuchungen des Serums.....	80

Inhaltsverzeichnis

5.3.1	Entwicklung und Optimierung des ELISA	80
5.3.2	Progesteron-Antikörper	82
5.4	Molekularbiologische Untersuchungen.....	83
5.4.1	Genexpression ausgewählter Parameter des Prostaglandin-Systems.....	83
5.4.2	Genexpression immunologischer Oberflächenmoleküle	85
5.5	Schlussfolgerung und Ausblick	86
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	89
7.	SUMMARY.....	91
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	93
9.	TABELLENVERZEICHNIS	96
10.	LITERATURVERZEICHNIS.....	98
11.	ANHANG	117
12.	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	122
12.1	Publikationen	122
12.2	Vorträge.....	122
12.3	Posterbeiträge	123
13.	DANKSAGUNG	128
14.	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	129

Abkürzungsverzeichnis und verwendete Einheiten

3- β -HSD	3- β -Hydroxysteroiddehydrogenase
AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
APD	Autoimmune Progesterondermatitis
AT	Airedale Terrier
BC	Border Collie
BCR	B-Zell-Rezeptor
bidest	bidestillata
bp	Basenpaare
BS	Berner Sennenhund
BSA	Bovines Serumalbumin
BU	bakteriologische Untersuchung
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CL	Gelbkörper (corpus luteum)
COX-1	Cyclooxygenase 1
COX-2	Cyclooxygenase 2
CV	Variationskoeffizient
d	Tag
DAG	1,2-Diacylglycerol
dest.	destillata
DEPC	Diethyldicarbonat
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSH	Deutscher Schäferhund
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay

Abkürzungsverzeichnis

ELFA	Enzyme-linked Fluorescent Assay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EP ₂	Prostaglandin E ₂ -Rezeptor 2
EP ₄	Prostaglandin E ₂ -Rezeptor 4
et al.	et alii
Fa.	Firma
FasL	Ligand des Fas-Rezeptors, Transmembranprotein
FBS	fetales bovines Serum
fg	Femtogramm
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
H	Hund
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
HWZ	Halbwertszeit
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
J	Jahr
LH	Luteinisierendes Hormon
KM	Körpermasse
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
M	Monat
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major histocompatibility complex)
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase
MPA	Medroxyprogesteronacetat
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
n	Anzahl
n.b.	nicht bestimmt

Abkürzungsverzeichnis

ng	Nanogramm
o.b.B.	ohne besonderen Befund
OD	optische Dichte
OD korrr.	korrigierte optische Dichte
OHE	Ovariohysterektomie
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Zusatz von Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGES	Prostaglandin-E-Synthase
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2 α}
PGFS	Prostaglandin-F _{2 α} -Synthase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
p.o.	per os (oral)
p.ov.	post ovulationem (nach der Ovulation)
PRL	Prolaktin
RIA	Radioimmunoassay
RLX	Relaxin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RR	Rhodesian Ridgeback
RT	Reverse Transkription
RTp	Raumtemperatur
RW	Rottweiler
SD	Standardabweichung
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TBST	TRIS-gepufferte Salzlösung und Tween
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th1-Zellen	T-Helferzellen Typ 1
Th2-Zellen	T-Helferzellen Typ 2
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha

Abkürzungsverzeichnis

T _{reg} -Zellen	regulatorische T-Zellen
U	Enzymeinheit (Unit)
UV	ultraviolett
V	Variationskoeffizient
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZR	Zeitraum

1. Einleitung und Zielsetzung

Die luteale Insuffizienz wird als mögliche Ursache für Trächtigkeitsstörungen von Hündinnen diskutiert, die resorbieren, abortieren oder die Frühgeburten ohne Anzeichen sichtbarer Infektionen aufweisen (Johnston et al., 2001). Häufig treten diese Komplikationen erst ab der zweiten Trächtigkeit im Zusammenhang mit einer individuellen Verkürzung des Läufigkeitsintervalls auf. Eine mögliche Ursache wird in der mangelnden Sekretion der luteotropen Hormone Prolaktin und Relaxin vermutet (Günzel-Apel et al., 2006), was jedoch nicht den Progesteronabfall in der frühen Lutealphase, insbesondere der nicht tragenden Hündin erklärt. Auch konnte gezeigt werden, dass die luteale Insuffizienz des Hundes nicht auf eine Sekretionsstörung des luteinisierenden Hormons LH zurückzuführen ist (Tibold und Thuróczy, 2009).

Funktionsstörungen der Gelbkörper sind auch bei anderen Spezies bekannt. So konnten im Serum von Frauen Antikörper gegen Progesteron und Östrogen nachgewiesen werden, die im Zusammenhang mit der Autoimmunen Progesterodermatitis auftreten. Zudem hat man verschiedene Lymphozytenpopulationen im Corpus luteum nachweisen können, die durch unterschiedliche immunmodulatorische Funktionen die Aufrechterhaltung der Trächtigkeit gewährleisten (Poole und Pate, 2012).

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Hypoluteinismus der Hündin endokrinologisch zu untersuchen und dabei auch immunologische Parameter zu betrachten, die bisher in diesem Zusammenhang noch nicht berücksichtigt wurden. Dazu erfolgte eine Bestimmung der Hormonkonzentrationen von Progesteron, Prolaktin und Relaxin im Serum von luteal insuffizienten Hündinnen und Kontrolltieren zu verschiedenen Zeitpunkten in der frühen Lutealphase. Des Weiteren wurden ein ELISA zur Detektion von caninen Antikörpern gegen Progesteron entwickelt und die Serumproben hinsichtlich ihrer Prävalenz untersucht. In einem weiteren Abschnitt der Studie wurde im Rahmen einer Ovariohysterektomie Gelbkörpergewebe von luteal insuffizienten und Kontrollhündinnen entnommen und die Genexpression ausgewählter Parameter des Prostaglandin-Systems (COX-1, COX-2, PGES) sowie immunologischer Oberflächenmoleküle (CD3, CD4, CD8, CD19 und CD25) bestimmt.

2. Literaturübersicht

2.1 Reproduktionsbiologische Merkmale des caninen Sexualzyklus

Die Hündin wird typischerweise zweimal im gesamten Jahr läufig, wobei Spannweiten von einem bis vier Zyklen rasseabhängig auftreten können (Sokolowski, 1977). Hündinnen weisen, im Gegensatz zu vielen anderen Haussäugetieren, einige reproduktionsbiologische Besonderheiten auf. Zunächst kommt es zum Eintritt der Pubertät zwischen dem 4. und 24. Lebensmonat. Diese große Spannweite ist auf die rassetypischen Unterschiede zurückzuführen (Concannon et al., 1989, Jöchle und Andersen, 1977). Der canine Sexualzyklus wird unterteilt in Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Anöstrus, wobei die Läufigkeit der Hündin dem Proöstrus und Östrus zuzuordnen ist (Jöchle und Andersen, 1977). Während des Proöstrus zeigt die Hündin blutigen Ausfluss, eine geschwollene Vulva und ruft vermehrtes Interesse von Rüden hervor (Concannon et al., 1989). Im Östrus duldet die Hündin die Begattung. Es finden mehrere Ovulationen statt. Eine Besonderheit der Hündin ist zu diesem Zeitpunkt die präovulatorische Luteinisierung der Granulosazellen (Concannon et al., 1977a). Dies führt zu einem Progesteronanstieg vor der Ovulation und wird diagnostisch zur Vorhersage des optimalen Decktermins genutzt (Günzel-Apel, 1997, Bouchard et al., 1991). Der Metöstrus ist charakterisiert durch die luteale Aktivität der Gelbkörper und dauert etwa zwei Monate an (Jöchle und Andersen, 1977). Auch die nicht tragende Hündin durchläuft eine lange Lutealphase mit hohen Progesteronkonzentrationen, die über die gesamte Zeit von den Gelbkörpern produziert werden (Concannon et al., 1989). Der Metöstrus der nicht tragenden Hündin und die Trächtigkeitsspanne des gedeckten Tieres sind ähnlich lang, jedoch führen unterschiedliche Mechanismen zur Rückbildung der Gelbkörper am Ende der Lutealphase (Kowalewski, 2012). Während präpartal von einer Prostaglandin-induzierten Luteolyse auszugehen ist, die infolge der feto-maternalen Kommunikation das Trächtigkeitseende definiert, sind die Mechanismen für die luteale Regression des nicht tragenden Tieres bis heute noch nicht ganz geklärt.

Am Ende des Metöstrus kann es auch bei der nicht tragenden Hündin zu einer Lactatio sine graviditate mit Milcheinschuss und ausgeprägtem Nestbauverhalten kommen (Concannon, 1991, Gobello et al., 2001). Im anschließenden Anöstrus, mit einer Dauer von etwa ein bis drei Monaten, spricht man von „Zyklusruhe“, in der es zur Regeneration des Uterusepithels kommt

(Jöchle und Andersen, 1977). Die Besonderheiten des caninen Sexualzyklus wie Pseudogravidität und Lactatio falsa müssten evolutionär von Vorteil gewesen sein. So wird in einem Wolfsrudel lediglich die Alpha-Wölfin vom Rüden gedeckt, die anderen weiblichen Tiere jedoch können durchaus zyklische Aktivität zeigen. Aus verhaltensbiologischen Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass es oftmals zu einer Synchronisierung der zyklischen Aktivität unter den weiblichen Tieren kommt (Ludwig, 2006). Wenn nun zeitgleich untergeordnete weibliche Rudelmitglieder eine Scheinträchtigkeit mit anschließender Laktation ausprägen, können sie aktiv bei der Aufzucht der Welpen mitwirken und so den Fortbestand des Rudels sichern (Jöchle, 1997, Maisch, 2006).

2.2 Endokrinologische Regulation der caninen Lutealphase und Gravidität

2.2.1 Luteinisierendes Hormon (LH)

Das luteinisierende Hormon (LH) wird nach Stimulation durch das hypothalamische Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) pulsatil aus dem Vorderlappen der Hypophyse sezerniert. Strukturell ist das Polypeptid in eine α - und β -Untereinheit zu unterteilen, wobei letztere für die spezifische Wirkungsvermittlung verantwortlich ist (Mock et al., 1983). Es wird von einer Opioid-vermittelten Regulation ausgegangen. So kann die intravenöse Gabe des Opioid-Antagonisten Naloxon (1,0 mg/ml, i.v.) eine LH-Freisetzung provozieren (Concannon et al., 1989). Zu den Zielorganen des Hormons zählen das Ovar und bei männlichen Tieren der Hoden mit den entsprechenden Funktionen der Endausreifung der Follikel, der Ovulationsinduktion, Gelbkörperanbildung bzw. Unterstützung der Corpora lutea und der Spermienreifung (Rabe et al., 2001). Die Serumkonzentration von LH steigt in nicht tragenden und tragenden Hündinnen zum Ende des Metöstrus/Anöstrus an (Concannon, 2009). Die direkte Wirkung von LH auf die Thekazellen des Ovars führt zu einer vermehrten Synthese von Androgenen, die durch eine membranständige Aromatase in Östrogen umgesetzt werden (Rabe et al., 2001). Ein erhöhter Östrogenspiegel bedingt das Einsetzen des Proöstrus. Des Weiteren kommt es nach anhaltender Stimulierung durch LH zu einer Umwandlung der Granulosa- und Thekazellen in der Follikelwand zu Luteinzellen, die wiederum das Corpus luteum bilden und die Progesteronsynthese gewährleisten (Niswender, 1981). Die Frequenz der pulsatilen Freisetzung ist für die unterschiedlichen Wirkungen am Zielorgan entscheidend.

2.2.2 Progesteron

Das trächtigkeitserhaltende Progesteron ist ein Steroidhormon und wird beim Hund hauptsächlich von den Gelbkörpern der Ovarien gebildet (Steinetz et al., 1989). Ein geringer Teil entsteht jedoch ebenfalls im Zusammenhang mit der Mineralocorticoidsynthese in der Nebennierenrinde (Hill et al., 2005). Die Progesteronkonzentrationen im Serum oder Plasma sind zwischen tragender und nicht tragender Hündin nahezu identisch (Concannon et al., 1975, Jeffcoate und Lindsay, 1998). Lediglich kurz vor der Geburt kommt es bei der tragenden Hündin zu einem eher abrupten Progesteronabfall, verglichen mit dem moderaten Absinken des Progesteronspiegels im nicht graviden Zyklus (Concannon et al., 1975). Die höchsten Progesteronkonzentrationen werden im frühen Metöstrus erreicht und führen zu einem Umbau des Endometriums, um die Einnistung des Embryos zu gewährleisten (Concannon et al., 1989). Der Tonus des Myometriums wird herabgesetzt, somit kann der Uterus, auch aufgrund der besonderen Anordnung der Muskelfasern, während der Trächtigkeit seinen Umfang vervielfachen (Döcke, 1994). Die canine Plazenta ist nicht in der Lage, Progesteron zu synthetisieren, sodass luteotrope Faktoren notwendig sind, um den Gelbkörper über die Spanne der Trächtigkeit aufrechtzuerhalten (Concannon et al., 1977b). Im ersten Drittel der Gravidität synthetisieren die Luteinzellen Progesteron weitgehend autark, jedoch konnte Prostaglandin E eine luteotrope Funktion in diesem Zeitraum zugeordnet werden (Kowalewski et al., 2013). Ab dem 25. bis 30. Tag p.ov. kommt es zu einem Anstieg der Prolaktinkonzentration im Blut (Onclin und Versteegen, 1997, Kooistra und Okkens, 2001). Über membranständige Rezeptoren der Luteinzellen vermittelt Prolaktin eine Steigerung der Progesteronsynthese und ist so der bedeutendste luteotrope Faktor der Hündin (Okkens et al., 1990). In diesem Zusammenhang wird diskutiert, dass Relaxin eine indirekte luteotrope Bedeutung einnimmt, wie es auch vom Weißbüschelaffen bekannt ist (Verhagen, 2002).

2.2.3 Prolaktin

Das Polypeptid Prolaktin wird zu großen Teilen im Vorderlappen der Hypophyse gebildet, aber auch Zellen des Uterus, der Plazenta, des Gehirns und des Immunsystems sind zur Synthese fähig (Voss, 1941). Die hypophysäre Freisetzung erfolgt nach Stimulation durch das hypothalamische Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH) und kann durch den Prolaktin-inhibitory factor (PIF) gehemmt werden. In früheren Publikationen hielt man allein Dopamin für PIF (López et al., 1989, Ben-Jonathan, 1985), mittlerweile konnte man auch Endothelin-1 als Inhibin identifizieren (Gonzalez-Iglesias et al., 2008, Andric et al., 2005). Prolaktin spielt

eine entscheidende Rolle in der Laktation und Unterstützung der Gelbkörperfunktion, ist jedoch auch an einer Vielzahl weiterer Funktionen beteiligt. Mehr als 300 verschiedene Effekte von Prolaktin sind bisher in Wirbeltieren beschrieben. Die Wirkungsorte sind vielfältig und beinhalten die Regulation des Elektrolythaushalts, Wachstum und Entwicklung, Endokrinologie und Stoffwechsel, Gehirn und Verhalten, Reproduktion, Immunregulation und Abwehr (Schedlowski et al., 1996, Bole-Feysot et al., 1998). Prolaktin wirkt durch endokrine, autokrine und parakrine Mechanismen über den Prolaktin-Rezeptor und eine Vielzahl von Cytokin-Rezeptoren.

Zu den wichtigsten reproduktionsbiologischen Funktionen zählen die Stimulation des Wachstums der Milchdrüse und die Laktation. Während der Trächtigkeit kommt es bei der Hündin zu einer langsamen Zunahme der Prolaktinkonzentration, mit einem Maximum zum Zeitpunkt der Geburt (Onclin und Verstegen, 1997). Nach einem kurzen Konzentrationsabfall innerhalb von 24 bis 48 Stunden post partum erreicht die Serumkonzentration Werte von 40 bis 50 ng/ml und bleibt während der Laktation auf hohem Niveau (Kooistra und Okkens, 2001). Wie ist der Prolaktinverlauf der tragenden Hündin normalerweise charakterisiert? Während der Trächtigkeit führt das vermehrt zirkulierende Östrogen zu einem steten Anstieg der Prolaktinkonzentration im Blut, indem die Ansprechbarkeit der laktotrophen Zellen des HVL auf PIF gehemmt werden. Die Anwesenheit von Progesteron und Östrogen verhindert zu diesem Zeitpunkt die direkte Wirkung auf die Milchproduktion (Teschner und Hinrichsen, 2007). Mit der Geburt kommt es zu einem abrupten Abfall von Progesteron und Östrogen, zu einer Stimulation der hypophysären Prolaktinfreisetzung sowie zu einer ungehemmten Wirkung auf die Laktogenese (Peters und Werder, 2001). Die ständige Aktivierung von Mechanorezeptoren an der Zitze durch das Saugen ist notwendig, damit die Signale über die spinalen Nerven zum Hypothalamus gelangen. Dies hat zum einen eine vermehrte Sekretion von Prolaktin aus dem Hypophysenvorderlappen (HVL), aber auch eine Freisetzung von Oxytocin aus dem Hypophysenhinterlappen (HHL) zur Folge, welches für den Milcheinschuss (Ejektion) notwendig ist (Peters und Werder, 2001). Im Gegensatz zu anderen Spezies besitzt Prolaktin in der Hündin eine außerordentlich wichtige luteotrope Funktion in der Trächtigkeit und der Lutealphase der nicht tragenden Hündin. Erhöhte Prolaktinkonzentrationen im Anöstrus der nicht tragenden Hündin können zu einer Lactatio sine graviditate führen und werden im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung des verhältnismäßig langen Interöstrusintervalls gesehen (Concannon et al., 1989). Erhöhte Prolaktinkonzentrationen führen zu einem Abfall von Östrogen in weiblichen bzw. Testosteron in männlichen Individuen.

In diesem Zusammenhang wird Hyperprolaktinämie auch als Ursache für Störungen in der Lutealphase und wiederkehrende spontane Aborte bei der Frau betrachtet (Bussen et al., 1999).

2.2.4 Relaxin

Das Peptidhormon Relaxin ist strukturell der Insulinfamilie zuzuordnen und wird in verschiedenen Geweben der Hündin, hauptsächlich jedoch vom Synzytiotrophoblasten der Plazenta produziert (Steinetz et al., 1989, Klonisch et al., 1999, Stewart et al., 1992). Relaxin konnte in tragenden und laktierenden Tieren gefunden werden. Zu den wichtigsten Funktionen gehören die Unterstützung der Implantation des Embryos und die Umstrukturierung der weichen Geburtswege in Vorbereitung auf die Geburt (Ivell und Einspanier, 2002). In den letzten Jahren konnten in der Humanmedizin darüber hinaus antifibrotische Effekte und eine Regulatorfunktion des Relaxins in der zirkulären Homöostase entdeckt werden, die im Zusammenhang mit chronischer Herzinsuffizienz klinische Relevanz erlangten (Dschietzig und Stangl, 2003). Die höchsten Relaxinkonzentrationen (4-6 ng/ml) werden zwei bis drei Wochen vor der Geburt gemessen. Es bestehen rassespezifische Unterschiede. Verglichen mit Beaglehündinnen weisen beispielsweise Labrador-Retriever-Hündinnen signifikant höhere Relaxinkonzentrationen auf, die auch bis in die Laktation persistieren (Steinetz et al., 1989). Die höchste Gewebekonzentration immunoreaktiven Relaxins konnte zwar in der caninen Plazenta gefunden werden, jedoch ließen erhöhte Hormonkonzentrationen in der Laktation Zweifel aufkommen, dass Relaxin einzig plazentaren Ursprungs ist. Canines Relaxin konnte auch in Ovarien nachgewiesen werden (Steinetz et al., 1989). Interessanterweise wurden ebenfalls erhöhte Relaxinkonzentrationen in der Milch von Hündinnen nach Kaiserschnitt mit Ovariohysterektomie gefunden (Bagnell et al., 2009). So kommt ebenfalls die Milchdrüse als zusätzliche Quelle in Betracht, wie dies auch von anderen Tierarten bekannt ist (Frankshun et al., 2011, Peaker et al., 1989). Die Serumrelaxinbestimmung hat in der Klinik an Bedeutung gewonnen, da sie als Trächtigkeitsnachweis für die Hündin geeignet ist (Einspanier et al., 2002). Allerdings kann man keine erhöhten Relaxinkonzentrationen bis zur dritten oder vierten Trächtigkeitswoche feststellen, sodass die Diagnostik der Frühträchtigkeit stark eingeschränkt ist. Ab dem oben genannten Zeitraum bieten sich Alternativen zur Trächtigkeitserkennung wie die Ultrasonographie an. Dies hat den Vorteil, zeitgleich die Morphologie und Anzahl der Fruchtanlagen beurteilen zu können (Bunck et al., 2002).

2.3 Luteolyse und luteale Regression

Zu den Besonderheiten der caninen Reproduktionsmechanismen gehört die Unterscheidung zwischen der Luteolyse und lutealer Regression. Die Luteolyse der Hündin ante partum ist vergleichbar mit der anderer Spezies (Concannon und Hansel, 1977). Im Gegensatz dazu ist die luteale Regression durch einen Untergang des Corpus luteum in Abwesenheit luteolytischer Mechanismen gekennzeichnet (Okkens et al., 1985, Hoffmann et al., 1992). Die Regression kann ein bis drei Monate andauern, bis Progesteronkonzentrationen von unter 1 ng/ml erreicht sind und der Anöstrus beginnt (Feldman und Nelson, 1987). In der tragenden Hündin hingegen kommt es nach einer langsamen lutealen Regression im letzten Drittel der Trächtigkeit zu einem rapiden Progesteronabfall vor der Geburt (Concannon, 1987). Dieser ist mit einem starken Anstieg von Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) im maternalen Blut assoziiert (Nohr et al., 1993). PGF_{2α} wird beim Hund von den Zellen des Trophoblasten gebildet und erzielt seine luteolytische Wirkung über einen antisteroidogenen und zytotoxischen Mechanismus (Niswender et al., 1994). Zunächst aktiviert PGF_{2α} die Phospholipase-C in den großen Luteinzellen. Die Phospholipase-C hydrolysiert nun Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG). DAG erhöht die Affinität der Proteinkinase C für Kalzium, während IP₃ zu einer Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Depots führt. Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt eine Aktivierung der Proteinkinase C, die zu einer Verminderung der Progesteronproduktion führt. Der zytotoxische Effekt wird durch die Aktivierung einer Kalzium-abhängigen Endonuklease erzielt, welche die Apoptose der Zelle auslöst (Niswender et al., 1994). Des Weiteren führt eine Aktivierung des Endothelin-1 in den Endothelzellen des Corpus luteum zu einer Vasokonstriktion und somit zu einer verminderten Durchblutung des Gelbkörpers (Kowalewski, 2012).

Der Mechanismus der Luteolysin-unabhängigen Gelbkörperregression ist im Vergleich dazu weitaus weniger bekannt. Möglicherweise ist die Ursache in der Regulation der Progesteronsynthese zu finden. Man konnte feststellen, dass Prostaglandin E₂ (PGE₂) als luteotroper Faktor in der frühen Lutealphase neben LH von entscheidender Bedeutung ist und über die PGE₂-Rezeptoren EP2 und EP4 die Expression des StAR-Proteins (Steroidogenic acute regulatory protein) in den Granulosazellen erhöht (Kowalewski et al., 2013). Das StAR-Protein transportiert aktiv Cholesterol durch die Mitochondrienmembran und ist geschwindigkeitsbestimmend für die Steroidsynthese (Manna und Stocco, 2005). Cholesterol wird durch das Enzym Cytochrom P450 im Mitochondrium zu Pregnenolon umgesetzt und

danach aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma transportiert. Am glatten endoplasmatischen Retikulum findet die Umwandlung von Pregnenolon zu Progesteron durch die 3- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase statt (Stocco, 2001). Es konnte in diesem Zusammenhang festgestellt werden, dass die Progesteronkonzentrationen der zyklischen Hündin eng an die Expression des StAR-Proteins gekoppelt sind, d.h., dass die mRNA-Level in der Ausbildungsphase des Gelbkörpers stark anstiegen bzw. entsprechend in der Regression abfielen (Kowalewski und Hoffmann, 2008).

2.4 Embryonale und fetale Fruchtverluste

Die Fruchtverluste der Hündin können zu jedem Zeitpunkt der Trächtigkeit auftreten und werden anhand des Zeitpunkts eingeteilt in 1) embryonaler Tod mit Resorption (bis zum 25. bis 30. Trächtigkeitstag, meist unbemerkt), 2) Abort lebender oder toter Feten, 3) tot geborene Welpen zum Zeitpunkt des physiologischen Geburtstermins oder 4) fetaler Tod, der mit Mumifikation und Verbleiben im maternalen Uterus über den Geburtstermin hinaus einhergeht (Johnston et al., 2001). Ob der Embryo bzw. Fetus resorbiert, abortiert, tot geboren oder mumifiziert übertragen wird, ist abhängig von der Ursache, dem Trächtigkeitsstadium und der feto-maternalen Interaktion. Für den Fruchtverlust kommen sowohl infektiöse als auch nicht infektiöse Ursachen in Betracht. Neben bakteriellen Infektionen wie z.B. mit *E.coli*, *Streptococcus sp.*, *Brucella canis*, *Campylobacter sp.* und *Salmonella sp.* können auch virale Infektionen mit *caninem Herpesvirus*, *caninem Parvovirus Typ 1 und 2* und *caninem Distemper Virus* sowie parasitäre Infektionen mit *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum* zu Trächtigkeitsstörungen führen (Johnston et al., 2001, Verstegen et al., 2008). Zu den nicht infektiösen Ursachen zählen allgemeine Erkrankungen, die zu einer Minderperfusion des Uterus führen, z.B. Herzerkrankungen, Traumata und Neoplasien. Des Weiteren stellen maternale endokrine Dysfunktionen wie Diabetes mellitus, Hypothyreoidismus, Hyperadrenokortizismus und Hypoadrenokortizismus, aber auch chromosomale Anomalien, Entwicklungsstörungen der Fruchtanlagen und bestimmte Medikamente ein erhebliches Risiko für die Trächtigkeit dar (Verstegen et al., 2008, Robertson et al., 1979). Auch bei einer „ungestörten“ Trächtigkeit geht man davon aus, dass zwischen 11 und 13% der Embryonen und Feten resorbiert werden (Andersen und Simpson, 1973).

2.5 Luteale Insuffizienz

2.5.1 Bedeutung in der Hundezucht

Die luteale Insuffizienz ist gekennzeichnet durch einen vorzeitigen Progesteronabfall in der Trächtigkeit. Sie tritt überwiegend bei Hündinnen der Rassen Deutscher Schäferhund, Berner Sennenhund, Neufundländer, Bobtail, Bernhardiner und Rottweiler auf (Rosset et al., 2008, Günzel-Apel et al., 2003). Eine Untersuchung der Tierärztlichen Hochschule in Hannover 1998/1999 konnte zeigen, dass von 57 im Rahmen von klinischen Untersuchungen vorgestellten Deutschen Schäferhündinnen 23% der Tiere verkürzte Zwischenläufigkeitsintervalle mit Fruchtbarkeitsproblemen aufwiesen (Günzel-Apel et al., 2003). Das häufige Auftreten dieser Problematik bei den Deutschen Schäferhündinnen weist auf eine hypothetische genetische Prädisposition hin. Rosset, Mazereau und Buff analysierten in einer retrospektiven Studie 692 Hündinnen der oben genannten Rassen, die im Campus Vétérinaire der Universität Lyon aufgrund vorausgehender Fruchtbarkeitsstörungen im Zeitraum 2003 bis 2008 vorgestellt wurden. 30% der Tiere zeigten einen vorzeitigen Progesteronabfall in der untersuchten Trächtigkeit (Rosset et al., 2008). Dies verdeutlicht die verhältnismäßig hohe Inzidenz als potentielle Ursache in Fällen ungeklärter Infertilität. Durch die Möglichkeit der Substitution von exogenem Progesteron bzw. Gestagen kann die Gravidität aufrechterhalten werden (Root Kustritz, 2001b). Die weitere züchterische Nutzung ist nicht unproblematisch. So führt die Selektion auf spezielle phänotypische Merkmale zu einer reduzierten genetischen Varianz und einem höheren Inzuchtrisiko (Wade, 2011). Die Inzucht als solche führt wiederum zu einer herabgesetzten reproduktiven Fitness (Wildt et al., 1982). Durch die ambitionierten Bestrebungen nach dem idealen Phänotyp befindet sich die Rassehundezucht in einer Zwangslage. Einerseits wird eine Heritabilität des Hypoluteinismus für möglich gehalten, andererseits würde der Ausschluss von Hündinnen mit lutealer Insuffizienz erneut zu einer erheblichen Reduzierung des Genpools führen und andere Erberkrankungen initiieren. Die Bestrebung der Züchter, pauschal Behandlungen durchzuführen, ist dennoch abzulehnen (Günzel-Apel et al., 2003).

2.5.2 Klinisches Bild und Diagnostik des Hypoluteinismus

Vorberichtlich fallen die erkrankten Tiere durch individuell verkürzte Zwischenläufigkeitsintervalle und Störungen in vorherigen Trächtigkeiten auf (Günzel-Apel et al., 2006). Meist verliefen die ersten ein bis zwei Graviditäten unproblematisch, wohingegen die Wurfstärke eine eher abnehmende Tendenz aufweist (Becher et al., 2010). Kommt es zu einem Progesteronabfall

vor dem 35. Trächtigkeitstag (TT), führt dies zum Abort bzw. zur Resorption der Fruchtanlagen (Johnston et al., 2001). Eine Resorption kann unbemerkt noch vor dem 20. TT auftreten, sodass diese Hündinnen in der Ultraschalluntersuchung als „nicht tragend geworden“ beurteilt werden. Lediglich eine Bestimmung der Progesteronkonzentration im Serum kann zu diesem Zeitpunkt Aufschluss über eine abgebrochene Frühträchtigkeit geben (Becher et al., 2010). Um eine erkrankte Hündin als solche zu identifizieren, ist es notwendig, andere Erkrankungen und Infektionen, die einen Progesteronabfall auslösen können, auszuschließen (Johnston et al., 2001). Demnach sind die gründliche Allgemeinuntersuchung, Anamnese (Vorerkrankungen, Auslandsaufenthalt) und gynäkologische Untersuchung für die Diagnosestellung unerlässlich. Des Weiteren sollte im Verdachtsfall endokrinologischer Dysfunktionen eine Blutentnahme mit Überprüfung des Blutbilds und der klinischen Chemie erfolgen. Notwendig ist ebenfalls die bakteriologische Untersuchung zu Beginn der zu nutzenden Läufigkeit (Root Kustritz, 2001b). Sollten die genannten Voruntersuchungen unauffällige Befunde ergeben, erhärtet sich der Verdacht des Hypoluteinismus, belegend jedoch ist erst der erwiesene Progesteronabfall während der Trächtigkeit (Günzel-Apel et al., 2012). Aus diesem Grund sollte der betroffenen Hündin bereits in der frühen Lutealphase (15-20 d p.ov.) Blut für die Progesteronbestimmung entnommen werden (Becher et al., 2010). Auch wenn zu diesem Zeitpunkt noch nicht klar ist, ob die Hündin überhaupt tragend ist, kann ein unbemerkter Progesteronabfall zu einem Verlust der noch nicht darstellbaren Fruchtanlagen führen. Bei einer ausreichenden Progesteronkonzentration empfiehlt sich die regelmäßige Überprüfung alle drei bis fünf Tage, im Falle eines Abfalls der Serumkonzentration auch häufiger (Günzel-Apel et al., 2003).

2.5.3 Interpretation der Progesteronkonzentrationen

Neben verschiedenen Laboren, die eine quantitative Bestimmung der Progesteronkonzentrationen im Serum anbieten, existieren unterschiedliche Schnelltests, die in der Praxis einen Eindruck der lutealen Aktivität vermitteln sollen. Diese Verfahren beruhen auf unterschiedlichen Testsystemen (Radioimmunoassay (RIA), Chemilumineszenz (CL), Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ELFA), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)), die darüber hinaus unterschiedliche Empfindlichkeiten aufweisen. Demnach überrascht es nicht, dass in einer Serumprobe mit verschiedenen methodischen Systemen unterschiedliche Progesteronkonzentrationen gemessen werden (Stricker, 2010, Brugger et al., 2011). In der Literatur wurden Progesteronkonzentrationen von 2 bzw. 5 ng/ml mit dem RIA ermittelt, unter denen die Hündin eine Trächtigkeit aufrechterhalten kann (Concannon und Hansel, 1977, Root Kustritz, 2001b). Jedoch bieten gegenwärtig keine kommerziellen Labore und nur wenige

wissenschaftliche Einrichtungen einen RIA an. Hinsichtlich der Vergleichbarkeit der absoluten Konzentrationen gehen die wissenschaftlichen Untersuchungen auseinander. Die Ergebnisse verschiedener Studien konnten zeigen, dass eine gute Korrelation der Messsysteme im Bereich unter 10 ng/ml vorliegt (Brugger et al., 2011). Für die höheren Konzentrationen werden mit dem ELFA im Vergleich zu CL-Verfahren und RIA höhere absolute Progesteronwerte ermittelt (Brugger et al., 2011, Stricker, 2010). Kommerzielle Nutzer des ELFA arbeiten mit Korrekturfaktoren, um die Werte mit denen des RIA bzw. CL-Verfahrens vergleichbar zu machen (Blendinger et al., 2009). Diese Problematik erschwert die Annahme des absoluten Schwellenwerts aus früheren Untersuchungen. Zusätzlich häufen sich die Beobachtungen in der Praxis, dass auch der starke Abfall von 10 bis 15 ng/ml innerhalb von fünf Tagen in der frühen Lutealphase zu einem Trächtigkeitsverlust führen kann, auch wenn der absolute Wert über 5 ng/ml liegt, weshalb eine Substitution von exogenem Progesteron schon zu diesem Zeitpunkt empfohlen wird (Becher et al., 2010). Demnach ermöglicht die regelmäßige Messung, unter Verwendung desselben Testsystems, einen Überblick über den Konzentrationsverlauf und eine bessere Orientierungsmöglichkeit.

2.5.4 Beeinflussung der Lutealfunktion

Liegt ein frühzeitiger Progesteronabfall vor, ist es notwendig, die Fruchtpullen mittels Ultraschall darzustellen und hinsichtlich ihrer Morphologie zu beurteilen. Sind die Fruchtanlagen intakt und andere Gründe für einen vorzeitigen Progesteronabfall ausgeschlossen worden, empfiehlt sich die sofortige Substitution mit exogenem Progesteron bzw. Gestagen (Root Kustritz, 2001b, Buff, 2004, Günzel-Apel et al., 2012, Gorlinger et al., 2005). Es existiert derzeit kein zugelassenes Progesteron, welches für den veterinärmedizinischen Gebrauch verwendet werden kann. Lediglich Medroxyprogesteronacetat ist als Gestagen zur Zyklusunterdrückung bei Hund und Katze zugelassen und kann als Therapie für die Aufrechterhaltung der Trächtigkeit genutzt werden (Beste, 2008, Gorlinger et al., 2005, Günzel-Apel et al., 2012). Ein großer Nachteil jedoch besteht darin, dass Medroxyprogesteronacetat in der frühen Trächtigkeit zu Missbildungen, insbesondere genitalen Fehlbildungen führt (Romagnoli und Concannon, 2007, Gorlinger et al., 2005). Der gleiche Effekt wird ebenfalls nach Supplementierung mit Altrenogest (Regumate®, Einsatz bei Pferd und Schwein) beobachtet (Eilts, 1992). Demnach wird für die Supplementierung in der frühen Trächtigkeit die Verwendung des humanmedizinischen Progesterons Utrogestan in einer Dosis von 3 x tgl. 5 mg/kg KM empfohlen (Buff, 2004, Rosset et al., 2008). Den meisten Empfehlungen nach erfolgt die Behandlung in dieser Dosis bis zum 53. Trächtigkeitstag und

am 54. und 55. in halber Dosis. Das Medikament wird ab dem 56. TT abgesetzt, um ein Überschreiten der physiologischen Trächtigkeitsdauer zu vermeiden (Buff, 2004).

Eine weitere Möglichkeit des Erhalts der Trächtigkeit ist die Behandlung mit Metoclopramid. Im Grunde handelt es sich bei dieser Behandlung um die Ausnutzung einer Nebenwirkung dieses primär auf den Magen-Darm-Trakt ausgerichteten Medikaments. Metoclopramid besitzt eine agonistische Wirkung zum Prolaktin und kann über membranständige Rezeptoren der Luteinzellen die Progesteronsynthese stimulieren (Andersen et al., 1980). In einigen Fällen gelingt es so, den Progesteronwert zu stabilisieren und die Trächtigkeit zu erhalten.

2.5.5 Zusammenfassung bisheriger Untersuchungen zum Hypoluteinismus der Hündin

Zwar ist die luteale Insuffizienz hinlänglich von anderen Spezies bekannt, die ungewöhnlichen und noch nicht ganz aufgeklärten Mechanismen der lutealen Regression beispielsweise lassen jedoch nur Vermutungen hinsichtlich der Ursachen dieser Erkrankung zu. Zunächst untersuchte man verschiedene luteotrope Effekte und konnte feststellen, dass keine Unterschiede in der FSH- bzw. LH-Konzentration bei den erkrankten Hündinnen vorlagen (Tibold und Thuróczy, 2009). Günzel-Apel et al. untersuchten tragende Deutsche Schäferhündinnen (DSH) und konnten zeigen, dass luteal insuffiziente Hündinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedrigere Prolaktin- und Relaxinkonzentrationen aufwiesen (Günzel-Apel et al., 2006). Interessanterweise stellte man ebenfalls fest, dass tragende DSH signifikant niedrigere Prolaktin- und Progesteronkonzentrationen aufwiesen als vergleichbare Beagle-Hündinnen (Günzel-Apel et al., 2009). Der unzureichende luteotrope Effekt stellte eine Erklärung für die Rassedisposition dar, konnte jedoch nicht auf die anderen prädisponierten Rassen (Rottweiler, Berner Sennenhund) übertragen werden. Hier zeigten die erkrankten Tiere im Gegenteil einen Anstieg der Prolaktinkonzentrationen als Folge einer hypophysären Regulation auf den Progesteronabfall (Krachudel et al., 2013). Auch erklären unzureichende Prolaktin- und Relaxinkonzentrationen nicht den frühen Progesteronabfall, der noch vor dem 23. Tag der Trächtigkeit (TT) auftreten kann, da beide Hormone erst ab der Mitte der Trächtigkeit (Prolaktin) bzw. dem 25. TT (Relaxin) ansteigen (Verstegen-Onclin und Verstegen, 2008). Im Verständnis um die canine Lutealphase hat die Aufschlüsselung der Steroidsynthese einen großen Fortschritt dargestellt (Manna und Stocco, 2005, Kowalewski und Hoffmann, 2008). Die Identifizierung der für die Synthese maßgeblichen Enzyme erlaubt in Zukunft möglicherweise einen Hinweis auf die Ursache pathologisch niedriger Progesteronkonzentrationen in luteal insuffizienten Hündinnen.

2.5.6 Gelbkörperinsuffizienz anderer Spezies

2.5.6.1 Gelbkörperinsuffizienz der Frau

Der Corpus-luteum-Insuffizienz liegt in den meisten Fällen eine unzureichende Progesteronsekretion des Gelbkörpers zugrunde, was eine verkürzte Lutealphase bewirkt (Breckwoldt und Keck, 2003). Klinisch führt diese Erkrankung zu Vorblutungen in der Lutealphase des Zyklus, verlängerten Menstruationsblutungen, Polymenorrhö sowie habituellen Aborten und wird in 3,5% der Fälle als Ursache für Sterilität beschrieben (Jones, 1976). Zunächst ist bekannt, dass die Corpora lutea aus verschiedenen Zellen bestehen. So werden steroide Zellen (kleine und große Lutealzellen) von anderen Zelltypen (Endothelzellen, Perizyten, Fibroblasten und Immunzellen) unterschieden. Die großen Lutealzellen stammen von folliculären Granulosazellen ab und reagieren nicht auf die Stimulation von LH bzw. humanem Choriongonadotropin (hCG) (Stocco, 2001). Die Plasmazellmembranen besitzen jedoch Rezeptoren für verschiedene Prostaglandine. Die großen Luteinzellen sezernieren neben Progesteron ebenfalls Östradiol und verschiedene Peptide. Die kleinen Lutealzellen hingegen entwickeln sich aus den folliculären Thekazellen und besitzen LH-Rezeptoren. Nach Stimulation durch LH wird die Sekretion von Progesteron um ein 5- bis 15-faches gesteigert (Stocco, 2001). Während die großen Lutealzellen für die basalen Progesteronkonzentrationen verantwortlich sind, können die kleinen Lutealzellen auf LH-Episoden und insbesondere auf das hCG-Signal des Embryos in der Frühschwangerschaft reagieren (Wuttke, 1993). Man unterscheidet die luteale Insuffizienz der Frau hinsichtlich der Ätiologie in drei Formen (Wuttke, 1993). Ein Teil der Patienten zeigt bei normaler LH-Pulsatilität und normalen basalen Progesteronkonzentrationen eine zu gering ausgebildete oder fehlende Antwortbereitschaft des Corpus luteum auf die LH-Pulse. In diesen Fällen geht man von einem Defekt der kleinen Lutealzellen aus. Ein Defekt der großen Lutealzellen äußert sich andererseits in einer zu niedrigen basalen Progesteronkonzentration, bei physiologischer LH-Pulsatilität und einer normalen Stimulation des Corpus luteum auf die LH-Episoden. Ein anderer Teil der erkrankten Frauen zeigt eine gestörte LH-Pulsatilität. Trotz normaler Follikelreifung und Ovulation wird hier eine gestörte hypothalamische pulsatile Freisetzung des LH-Releasing-Hormons angenommen. Mischformen zwischen diesen drei Formen sind ebenfalls möglich (Wuttke, 1993).

Zu einer gestörten Lutealfunktion kann ebenfalls eine krankhaft erhöhte bzw. erniedrigte Prolaktinkonzentration im Blut führen (Del Pozo et al., 1979, Ando et al., 1992, Bussen et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die luteotrope Wirkung des Prolaktins in dauerhaft

erhöhter Konzentration nicht mehr gegeben ist und die Lutealzellen *in vitro* und *in vivo* die Progesteronsynthese einstellen (McNatty et al., 1974). Die Verabreichung des Dopamin-D2-Agonisten Bromocriptin senkt die Prolaktinkonzentration im Blut und führt in den oben genannten Fällen zu einer signifikanten Verbesserung der Fertilität (Del Pozo et al., 1979).

Autoimmune Progesterondermatitis (APD)

Unter Autoimmuner Progesterondermatitis versteht man eine seltene Erkrankung während der Lutealphase bei Frauen. Zu den klinischen Symptomen zählen Urtikaria, Erythema multiforme, Angioödeme, Asthma, Anaphylaxie und Infertilität (Snyder und Krishnaswamy, 2003). Die Diagnose wird anhand der Reaktion auf intradermale Progesteroninjektionen gestellt (Baptist und Baldwin, 2004). Es können sowohl plötzliche (innerhalb von 30 Minuten) als auch verzögerte Reaktionen (24 bis 48 Stunden später) bei den Patientinnen nach der Injektion auftreten. Dementsprechend sind Überempfindlichkeitsreaktionen von Typ 1 und Typ 4 im Zusammenhang mit der Autoimmunen Progesterondermatitis möglich. Die Arbeitsgruppe von Roby konnte bei erkrankten Frauen signifikant höhere IgE-, IgM- und IgG-Titer gegen Progesteron und Östrogen nachweisen (Roby et al., 2006), wobei nicht alle Frauen mit klinischer Symptomatik auch Auffälligkeiten in den serologischen Untersuchungen zeigten (Baptist und Baldwin, 2004). Die genaue Pathogenese ist bisher unbekannt. Es wird diskutiert, dass die Zugabe exogener Gestagene im Rahmen der Schwangerschaftsverhütung zu einer Aktivierung von Th2-Zellen führt, die wiederum die plasmazellvermittelte Antikörperfreisetzung stimulieren (Roby et al., 2006). Als Auslöser wäre hier die Aufnahme der synthetischen Gestagene durch antigenpräsentierende Zellen (APC) denkbar. Diese Theorie erklärt jedoch nicht die Pathogenese der Frauen, die niemals exogene Gestagene einnahmen und dennoch erkrankten (Snyder und Krishnaswamy, 2003). Zum anderen wird diskutiert, dass die initiale Sensibilisierung mit endogenem 17- α -Hydroxyprogesteron oder Hydrocortison zu einer Kreuzreaktion mit Progesteron führen kann. 17- α -Hydroxyprogesteron zeigt eine ausgeprägtere immunogene Wirkung und liegt in der frühen Schwangerschaft in höheren Konzentrationen vor als Progesteron (Schoenmakers et al., 1992). Eine weitere Studie konnte einen Anstieg der durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMc) vermittelten IFN- γ -Synthese unter Progesteronzusatz *in vitro* feststellen, was für eine Beteiligung von Th1-Zellen spricht (Cristaudo et al., 2007).

Die Therapieansätze reichen von Cortisongaben über Progesteron-Desensibilisierung bis hin zur Ovulationsunterdrückung mit verschiedenen Präparaten (konjugierte Östrogene, GnRH-Agonisten, Antiöstrogen Tamoxifen) und werden aufgrund verschiedenster Nebenwirkungen

und unzureichender Wirksamkeit kontrovers diskutiert (Prieto-Garcia et al., 2011, Baptist und Baldwin, 2004). Lediglich die bilaterale Ovariectomie ist absolut wirksam, sie wird jedoch erst nach Versagen der anderen Therapieansätze empfohlen (Snyder und Krishnaswamy, 2003, Rodenas et al., 1998).

2.5.6.2 Gelbkörperinsuffizienz der Stute

Der embryonale Fruchtverlust der Stute ist auf verschiedenste Ursachen zurückzuführen und wird bei jungen, fertilen Stuten bis zum 14. Trächtigkeitstag auf eine Inzidenz von ca. 9% geschätzt (Ball et al., 1986). Im Gegensatz dazu liegt die Inzidenz des embryonalen Fruchttodes bei älteren, subfertilen Stuten jedoch bei 62 bis 73% (Ball et al., 1989). Neben genetischen Abnormitäten, Hindernissen im Eileiter und krankhaften Veränderungen des Endometriums führt auch eine unzureichende Progesteronsynthese zum embryonalen Tod (Allen et al., 2006, Power, 1991, Ball et al., 1987, Tannus und Thun, 1995, McDowell et al., 1988). Bis zum 40. Trächtigkeitstag stellt das postovulatorische Corpus luteum die einzige Progesteronquelle dar. Für eine erfolgreiche equine Trächtigkeit ist zunächst die maternale Erkennung des Embryos von entscheidender Bedeutung. Der Embryo wandert bis zum 16. Trächtigkeitstag durch den Uterus und verhindert über die Herabregulation endometrialer Oxytocinrezeptoren die Aktivierung der luteolytischen Prostaglandinkaskade (Allen, 2001). Ist dieser Mechanismus gestört, führt die Freisetzung von $\text{PGF}_2\alpha$ aus dem Endometrium zur Luteolyse und somit zu einem Absinken der Progesteronkonzentration (Adams et al., 1987). In solchen Fällen kann die Behandlung mit exogenem Gestagen den frühen Fruchtverlust verhindern (Ball, 2011, Vanderwall und Newcombe, 2007). Da die mangelnde maternale Erkennung Ausdruck eines pathologischen Vorgangs sein kann – hier kommen ein herabgesetzter Uteruston, mangelnder Zervikalschluss, strukturelle Veränderungen im Uterusgewebe sowie eine mangelnde Fixation des Konzeptus in Betracht –, ist die gründliche diagnostische Aufarbeitung von entscheidender Bedeutung (Ball, 2011). Eine rein prophylaktische Behandlung mit exogenen Gestagenen, wie von einigen Züchtern erwünscht, wird nicht empfohlen (Allen, 2001, Vanderwall und Newcombe, 2007).

2.5.6.3 Gelbkörperinsuffizienz des Rindes

Auch beim Rind, insbesondere beim Hochleistungs-Milchrind, führen eine zu geringe Progesteronsekretion und vorzeitige Luteolyse zu Fruchtbarkeitsstörungen. 25% der fehlerhaften Konzeptionen sind auf embryonalen Fruchttod in der Phase der embryonalen Elongation und maternalen Erkennung während der ersten zwei Wochen nach der Besamung zurückzuführen (Bollwein, 2013, Roche, 1986). Neben einer erhöhten metabolischen Clearance der Steroidhormone durch den verstärkten Leberstoffwechsel führt eine geringe Syntheseleistung des Gelbkörpers zu erniedrigten Progesteronkonzentrationen und zum Fruchtverlust in der frühen Trächtigkeit (Sangsritavong et al., 2002). Gelbkörper mit verkürzter Lebensdauer können infolge einer gestörten Follikelentwicklung entstehen. So konnte gezeigt werden, dass diese Follikel eine geringere Anzahl von Granulosazellen aufweisen und weniger FSH- und LH-Rezeptoren auf den Granulosa- und Thekazellen exprimiert werden (Bradent et al., 1989). Man geht davon aus, dass Anbildung, Erhaltung und Regression des Corpus luteum der hormonellen, vaskulären und immunologischen Regulation unterliegen (Shirasuna et al., 2012). Auch beim Rind führt die Freisetzung bzw. die Applikation von exogenem $\text{PGF}_2\alpha$ zu einer Luteolyse. Im Falle einer erfolgreichen Implantation des bovinen Embryos erfolgt die Sekretion von Interferon τ durch die Zellen des Trophoblasten (Imakawa et al., 1987). Interferon τ unterstützt indirekt den Gelbkörper, indem es die pulsatile Freisetzung von uterinem $\text{PGF}_2\alpha$ abschwächt, die normalerweise 16 Tage nach der Ovulation einsetzt (Meyer et al., 1995). Dem vaskulären System werden das Blutgefäß- und Lymphgefäßsystem zugeordnet. Die Regression des ovariellen Blutflusses führt zu einer Hypoxie und induziert die Apoptose von Ovarialzellen (Saikumar et al., 1998, Nishimura et al., 2008). Das lymphatische System stellt wiederum die Route dar, die die Einwanderung von Lymphozyten und Makrophagen aus den benachbarten Lymphknoten gewährleistet. Auch konnten in den ovariellen Lymphgefäßen die höchsten Progesteronkonzentrationen festgestellt werden, verglichen mit uterinen Lymphgefäßen bzw. venösem Plasma aus uterinen und ovariellen Gefäßen (Hein et al., 1988). Nitta et al. haben gezeigt, dass es in der frühen bovinen Trächtigkeit im Corpus luteum zu Umbauprozessen des lymphatischen Gefäßsystems kommt (Nitta et al., 2011). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Zellen des Immunsystems in der Anbildung, Erhaltung und Regression des Corpus luteum von entscheidender Bedeutung sind (Pate et al., 2010).

Bei der lutealen Insuffizienz des Rindes handelt es sich, wie auch bei den anderen beschriebenen Spezies, um ein multifaktorielles Geschehen, da verschiedene physiologische

Prozesse in den Erhalt der Trächtigkeit involviert sind. Diese Tatsache bedingt in der Praxis eine sorgfältige diagnostische Aufarbeitung, unter Berücksichtigung der artspezifischen Unterschiede, um eine sinnvolle Therapie zu gewährleisten.

2.6 Immunologische Grundlagen

2.6.1 Antigene

Die elementarste Funktion des Immunsystems ist die, einfallende Mikroorganismen im Körper zu erkennen und zu eliminieren. Dazu müssen Immunzellen in der Lage sein, die körperfremden Substanzen (Antigene) so schnell wie möglich zu erkennen und eine Immunantwort einzuleiten. Man unterscheidet zwischen mikrobiellem und nicht mikrobiellem Antigen. Zu den mikrobiellen Antigenen zählt man die bakteriellen, viralen, parasitären und pilzassoziierten Oberflächenmoleküle, die jeweils unterschiedliche Reaktionen der Immunantwort auslösen können (Tizard, 1982). Jedoch sind mikrobielle Organismen nicht die einzige Quelle für einfallende Fremdmoleküle im Körper. Zu den nicht mikrobiellen Antigenen zählen Zelloberflächenantigene, beispielsweise Blutgruppenantigene auf Erythrozyten im Spenderblut oder Oberflächenantigene (MHC-Klasse-I-Moleküle) auf kernhaltigen Zellen von transplantierten Organen (Morelli, 2014). Auch Fremdmoleküle wie Pollen, Sporen oder Insektengift können nach Exposition zu starken immunologischen Reaktionen führen. Besonders kleine Moleküle (z.B. Medikamente) können nach Bindung an körpereigene Proteine immunogen wirken und als sogenanntes Hapten agieren. So ist das Antibiotikum Penicillin an sich ein kleines, nicht immunogenes Molekül. Nach Aufnahme bzw. Injektion bindet das Penicillin an das Transportprotein Albumin. Dies führt zur Entstehung der sehr reaktiven Penicilloylgruppe, die nun als Hapten bei einigen Menschen für schwere allergische Reaktionen verantwortlich ist (Solensky, 2003).

In manchem Fall kann es zu einer autoimmunen Antwort gegenüber körpereigenen Bestandteilen kommen. Diese Reaktion ist gegen sogenannte Autoantigene gerichtet und kann Hormone (z.B. Thyreoglobulin), strukturelle Zellbestandteile (Basalmembranen), intrazelluläre Komponenten (mitochondriale Proteine, Nukleinsäuren) oder zelluläre Oberflächenproteine wie Hormonrezeptoren beinhalten (Root-Bernstein, 2007). Auf den Mechanismus der Autoreaktivität wird in Abschnitt 2.6.5 näher eingegangen. Die unterschiedlichen strukturellen Voraussetzungen der Fremdmoleküle führen zu einem unterschiedlich starken Potential, als

Antigen zu wirken (Antigenität). Generell besitzen Moleküle über 1 kDa eine hohe Antigenität, auch erwiesen sich Proteine als sehr wirksam (Dimitrov et al., 2013). Besitzen diese Eiweißmoleküle nun auch noch einen großen Anteil aromatischer Aminosäuren, so potenziert sich ihre Antigenität. Nur Proteine sind in der Lage, auch T-Zellen zu aktivieren, alle anderen Antigene aktivieren ausschließlich B-Zellen (Klein, 1991). Aus diesem Grunde wird im Folgenden hauptsächlich die B-Zell-Aktivierung betrachtet. Die Bindung eines Antigens erfolgt entweder zellulär (B- oder T-Lymphozyten) oder durch gelöste Antikörper an exponierten Regionen auf der Außenseite des Moleküls. Diese immundominanten Bereiche sind häufig Polypeptidschleifen, die nicht in einer besonderen Tertiärstruktur fixiert sind. Im Gegensatz zu gelösten Antikörpern, die dreidimensionale Strukturen erkennen können, sind die T- bzw. B-Zell-Rezeptoren in der Lage, primäre Sequenzen zu identifizieren (Roitt et al., 2005). Beide Rezeptortypen erkennen unterschiedliche Regionen auf dem Antigen, wobei der T-Zell-Rezeptor auf die Anwesenheit einer Antigen-präsentierenden Zelle angewiesen ist (Tizard, 2009).

Nun können sich aus der Bindung eines Antigens an den B- bzw. T-Zellrezeptor drei Möglichkeiten ergeben: Die Lymphozyten können zur Vermehrung (Proliferation), Reaktionslosigkeit (Anergie) oder zum Zelltod (Apoptose) angeregt werden (Janeway und Travers, 1997). Diese Mechanismen werden über verschiedene Zytokine vermittelt und sollen im Folgenden für die Aktivierung von B-Lymphozyten näher beschrieben werden.

2.6.2 B-Zellen und deren Antigen-Antwort

Jede B-Zelle besitzt auf ihrer Oberfläche 200.000 bis 500.000 identische Antigenrezeptoren (Tizard, 2009). Die B-Zell-Rezeptoren (BCR) bestehen aus einer Antigen-bindenden und einer Signal-vermittelnden Komponente (Gauld et al., 2002). Im Gegensatz zu den T-Zell-Rezeptoren (TCR) sind BCR in der Lage, losgelöst von der Zelloberfläche Antigene zu binden. Diese gelösten Rezeptoren werden als Immunglobuline bezeichnet (Roitt et al., 2005). Die Bindung eines Antigens an einen membranständigen BCR führt zu einer Phosphorylierung von zwei Untereinheiten des Rezeptors und zu einer anschließenden Internalisierung des Antigen-Rezeptor-Komplexes in das Zytoplasma (Gold, 2002). Das Antigen wird zu kleinen Peptiden gespalten und an neu synthetisierte Haupthistokompatibilitätskomplexe der Klasse II (Major histocompatibility complex, MHC) gebunden. Dieser Peptid-MHC-Klasse-II-Komplex wird zurück zur Zelloberfläche transportiert und dort präsentiert. Nun sind T-Helferzellen in der Lage, über diesen Komplex mit den B-Zellen eine Bindung (Synapse) einzugehen und aktiviert

zu werden (Finkelman et al., 1992). Je nachdem, welche Art von regulatorischen Peptiden (Zytokine) nun freigesetzt wird, führt dies zu unterschiedlichen Effekten an den B-Zellen (Finkelman und Urban, 1992) (Tab. 1). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zytokine der aktivierten T-Helferzellen zu einer Proliferation von B-Zellen führen und deren Nachkommen (Plasmazellen) zur Differenzierung zu antikörpersezernierenden Zellen angeregt werden (Janeway und Travers, 1997, Bernasconi et al., 2002).

Tabelle 1: Einfluss von Interleukinen auf B-Zellen

Interleukin der T-Helferzellen	Effekt auf B-Zellen
IL-4	stimuliert Wachstum und Proliferation von B-Zellen, steigert die Ausprägung von MHC-Klasse-II-Rezeptoren, beeinflusst Antikörpersynthese, stimuliert IgE-Synthese (Finkelman et al., 1990, Auci et al., 1993)
IL-5	fördert Differenzierung zu Plasmazellen, stimuliert IgG-, IgM- und IgA-Synthese, hemmt IL-4-induzierte IgE-Synthese (Finkelman et al., 1990)
IL-6	fördert Differenzierung zu Plasmazellen, stimuliert IgM- und IgA-Synthese (Finkelman et al., 1990)
IL-13	stimuliert Wachstum und Proliferation von B-Zellen, stimuliert IgE-Synthese (Grünig et al., 1998)

2.6.3 Antikörper

Antikörper sind gelöste B-Zell-Rezeptoren und werden auch als Immunglobuline bezeichnet. Sie sind in allen Körperflüssigkeiten zu finden, die höchste Konzentration liegt jedoch im Serum vor (Tizard, 2009). Zu den Aufgaben der Antikörper zählen einerseits die Bindung des Antigens, andererseits muss die Information der Antigenbindung an das Wirtsgewebe vermittelt werden. Dies erfolgt über die Aktivierung von verschiedenen Zellen des Immunsystems, den phagozytierenden Zellen und des Komplementsystems (Gearhart, 2002). Sie müssen in

verschiedenen Umgebungen den Körper gegen verschiedenste Agenzien verteidigen, daher existieren unterschiedliche Immunglobulinklassen.

2.6.3.1 Aufbau

Antikörper sind Glykoproteine mit zwei identischen, sogenannten leichten (light chain, L) und schweren (heavy chain, H) Polypeptidketten (Janeway und Travers, 1997). Diese sind untereinander mit Disulfidbrücken verbunden und bilden eine Ypsilon-förmige Struktur (Abb. 1). Die leichten und schweren Ketten besitzen variable (V) und konstante (C) Domänen. Die variablen Bereiche einer leichten und schweren Kette bilden das Antigen-bindende Fragment des Immunglobulins (Fab-Teil), welches mit Hilfe von Papain enzymatisch vom kristallisierbaren Fragment (Fc-Teil) abgespalten werden kann (Porter, 1973). Die Variabilität ist notwendig, um möglichst unterschiedliche Antigene binden zu können, und resultiert aus verschiedenen Genen, die für die V-Region kodieren. Verschiedene Mechanismen wie die somatische Mutation während der Ontogenese der B-Zellen und Rekombinationsvorgänge, wobei mehrere Gensegmente rekombiniert und an das Hauptstück des V-Region-Gens angefügt werden, erhöhen die Vielfältigkeit dieser Abschnitte (Roitt et al., 2005, Gearhart, 2002). Antikörper erkennen ein Antigen in seiner gesamten Struktur leichter als dessen chemische Zusammensetzung. Die Bindung zwischen beiden ist die Summe verschiedenster Kräfte (Wasserstoffbrücken, elektrostatische Bindung, Van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Bindungen) und kann unterschiedlich stark sein. So beschreibt die Summe der anziehenden und abstoßenden Kräfte die Affinität eines Antikörpers (Roitt et al., 2005). Wenn nun Antigen A und Antigen B einige gemeinsame Determinanten haben, wird ein Teil der Antikörper gegen A auch mit B reagieren (Kreuzreaktivität) (Cohn, 2005).

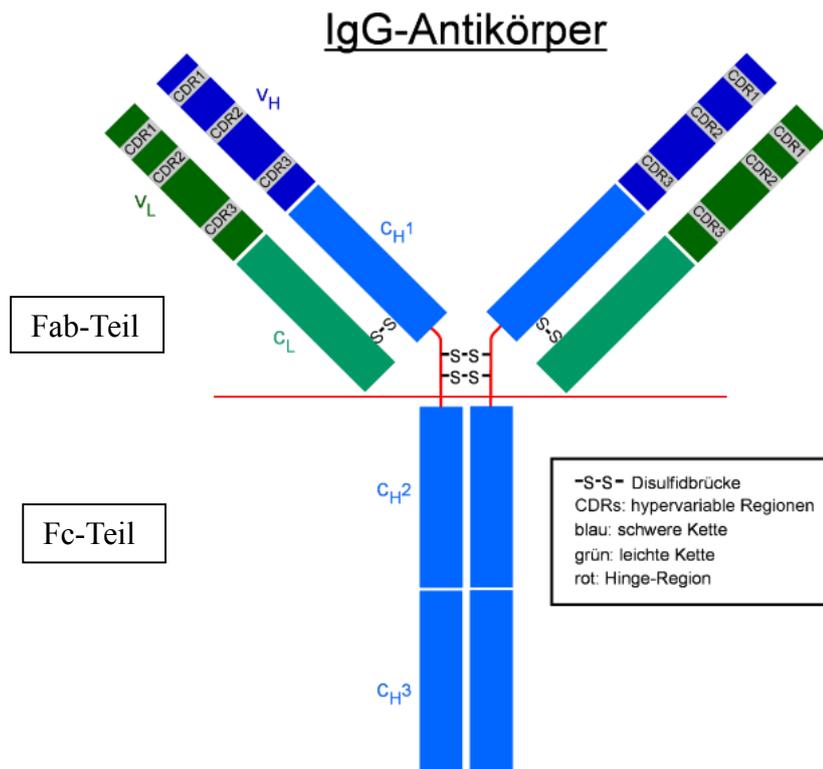


Abbildung 1: Schematischer Aufbau von IgG

Modifiziert nach [http://commons.wikimedia.org/wiki/ File%3A%3AIgGantibody.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File%3A%3AIgGantibody.png), Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von CC-BY-SA-3.0-2.5-2.0-1.0

2.6.3.2 Immunglobulinklassen

Es existieren beim Säugetier fünf verschiedene Formen der schweren Ketten, anhand derer die Immunglobuline in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden können:

IgG (γ -Kette) wird durch Plasmazellen der Milz, der Lymphknoten und des Knochenmarks sezerniert und macht 70 bis 75% des gesamten Immunglobulinpools aus. IgG liegt gleichmäßig intra- und extravasal verteilt vor und hat antitoxische Eigenschaften. Durch seine lange Halbwertszeit (HWZ) von ca. drei Wochen spielt IgG eine wesentliche Rolle in der sekundären Immunantwort (Roitt et al., 2005).

IgM (μ -Kette) wird ebenfalls durch Plasmazellen der Milz, der Lymphknoten und des Knochenmarks sezerniert und repräsentiert 10% des gesamten Immunglobulinpools. Es ist durch seine komplexe pentamere Struktur charakterisiert und kommt aufgrund seiner Größe überwiegend intravaskulär vor. IgM ist im Vergleich zum IgG wesentlich effizienter hinsichtlich der Aktivierung des Komplementsystems, der Neutralisation von Viren und

Agglutination. Es spielt als „früher“ Antikörper mit einer HWZ von ca. fünf Tagen eine entscheidende Rolle in der primären Immunantwort (Tizard, 2009).

IgA (α -Kette) wird von Plasmazellen in Schleimhäuten des Darms, des Atmungstraktes, der harnableitenden Wege, der Haut und Milchdrüse sezerniert. Es liegt häufig als Dimer vor und hat einen Anteil von 5 bis 20% am gesamten Immunglobulinpool. IgA verhindert die Anheftung und Invasion von Mikroorganismen an Schleimhäuten und hat eine HWZ von sieben Tagen (Tizard, 2009).

IgE (ϵ -Kette) wird, ähnlich wie IgA, überwiegend von Plasmazellen in Schleimhäuten sezerniert und ist als Serumprotein nur in Spuren nachweisbar. Daher kann es nicht, wie die anderen Immunglobuline, durch Bindung allein die Antigene neutralisieren. Vielmehr liegt sein Vorteil in der Verstärkung der Sofortreaktion. Nachdem ein Antigen von IgE gebunden wurde, kann das Immunglobulin an Rezeptoren auf der Oberflächenmembran von basophilen Granulozyten und Mastzellen binden. Dies führt zu einer starken Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus den Zellen. Diese akute Entzündung ist wichtig für die lokale Abwehr und tritt bei Parasitosen und Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp auf. Das Monomer hat eine kurze HWZ von zwei Tagen (Roitt et al., 2005).

IgD (δ -Kette) ist ein BCR, der hauptsächlich in gebundener Form auf Membranen zirkulierender B-Lymphozyten zu finden ist. Nur ein sehr geringer Teil wird in das Blut sezerniert, daher hat IgD lediglich einen Anteil von $< 1\%$ am gesamten Immunglobulinpool. Das Monomer hat eine kurze HWZ von ein bis zwei Tagen und unterstützt vermutlich die antigeninduzierte Differenzierung der B-Lymphozyten (Tizard, 2009).

Wie entstehen diese verschiedensten Antikörperklassen nach dem Kontakt eines Antigens mit einer B-Zelle? Der aktivierte B-Lymphozyt exprimiert zunächst IgM-Rezeptoren auf seiner Oberfläche. Kommt es zu einer Bindung des passenden Antigens an den IgM-Rezeptor, durchlaufen die B-Zellen eine Entwicklung, in der konstante Teile der μ -Kette des IgM-Moleküls durch andere konstante Teile (γ -Kette (IgG), α -Kette (IgA) und ϵ -Kette (IgE)) ersetzt werden. Der variable Teil bleibt unverändert erhalten. So ändern die Antikörper ihre Möglichkeiten für Sekundärfunktionen (z.B. Opsonierung von Pathogenen für die Aufnahme von Phagozyten, Neutralisation von Toxinen und die Aktivierung des Komplementsystems), nicht aber ihre Spezifität (Burmester and Pezzutto, 1998).

2.6.4 Zelloberflächenmoleküle (CD-Moleküle)

Neben den bereits erwähnten membranständigen Rezeptoren auf den Lymphozyten spielen noch andere Oberflächenmoleküle eine wichtige und vielfältige Rolle im Zusammenspiel des Immunsystems. Zur Zeit ihrer Entdeckung wurden sie als Differenzierungsantigene bezeichnet (Boyse und Old, 1969) und verschiedenen Entwicklungsstadien bzw. bestimmten Funktionen von Lymphozyten zugeordnet. Der technische Fortschritt und die Entwicklung monoklonaler Antikörper ermöglichte eine genauere Identifizierung dieser Proteine und erlaubte eine Einteilung in verschiedene Gruppen von Oberflächenmolekülen, die entsprechend internationaler Nomenklatur als Cluster of Differentiation (CD) bezeichnet werden (Cobbold und Metcalfe, 1994). Hinsichtlich der aktuellen Fragestellung soll hier im Folgenden nur auf einige ausgewählte Parameter eingegangen werden.

CD3 kommt auf T-Lymphozyten vor und ist Teil des TCR. Der CD-3-Komplex besteht aus fünf Proteinketten, die in drei Dimeren arrangiert sind. Seine Funktion besteht in der Signaltransduktion nach Bindung eines Antigens an den TCR (Kabelitz, 1990).

CD4 kommt bei den meisten Säugetieren nur auf den T-Helferzellen vor, wird beim Hund allerdings auf allen reifen polymorphkernigen Granulozyten (PMN) exprimiert (Moore et al., 1992). CD4 ist ein einzelsträngiges Glykoprotein, welches den Lymphozyten ermöglicht, andere Antigen-präsentierende Zellen zu erkennen. Dies erfolgt über eine Bindung von CD4 an den MHC-Klasse-II-Teil des Antigen-MHC-Klasse-II-Komplexes auf der Antigen-präsentierenden Zelle (Morrison et al., 1994).

CD8 ist ebenfalls vorwiegend auf T-Zellen lokalisiert, liegt allerdings nur bei der zytotoxischen Subpopulation vor. Die beiden Proteinketten sind als Dimer arrangiert und dienen den zytotoxischen T-Zellen zur Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen. MHC-Klasse-I wird auf allen kernhaltigen, körpereigenen Zellen exprimiert. Die CD8⁺-Lymphozyten gehen aufgrund sehr früher immunologischer Prägung und Selektion keine Bindung mit Zellen ein, die ausschließlich eigene MHC-Klasse-I-Muster auf ihrer Oberfläche besitzen (Seder und Le Gros, 1995). Kommt es nun durch virale Infektionen, Mutationen oder gar fremdes Gewebe zu Veränderungen in diesem Muster, bindet das CD8-Dimer an das fremde MHC-Klasse-I-Molekül und aktiviert die T-Zelle, die die veränderte Zelle zerstört (Tizard, 2009).

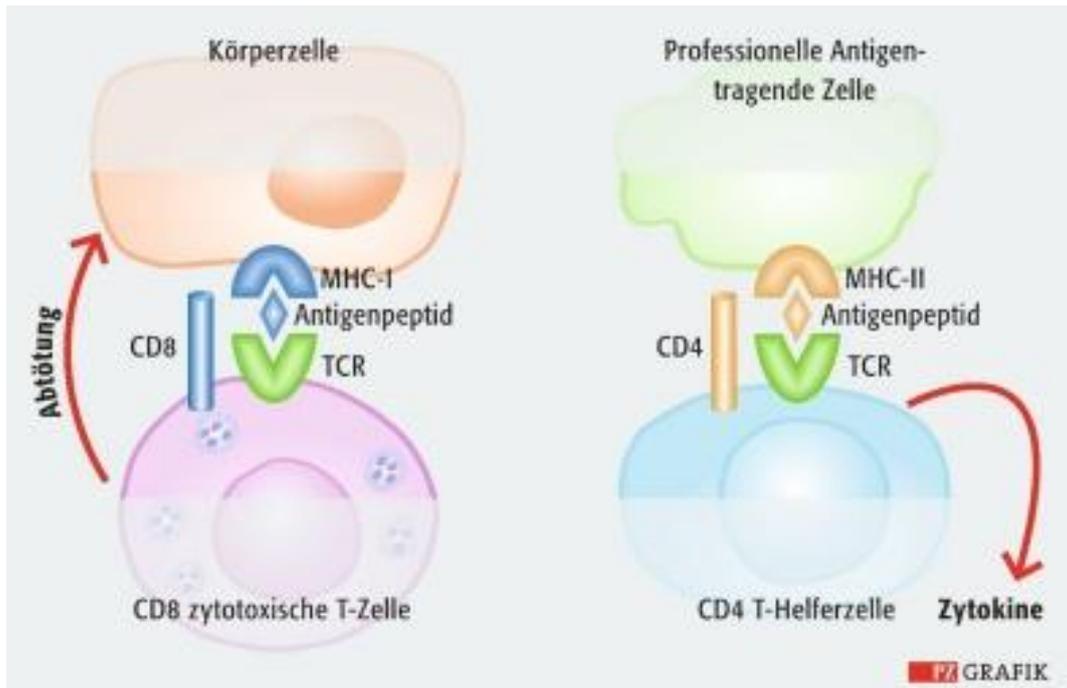


Abbildung 2: Antigenpräsentation über MHC-I- und MHC-II-Proteine

(CD: Cluster of differentiation; MHC: Major histocompatibility complex; TCR: T-Zell-Rezeptor, Antigenrezeptor)

Links: Interaktion des MHC-I-Peptidkomplexes auf Körperzellen mit dem Antigenrezeptor auf zytotoxischen T-Zellen. CD8 ist ein für MHC-I-Moleküle spezifischer Korezeptor.

Rechts: Interaktion des MHC-II-Peptidkomplexes auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen mit dem Antigenrezeptor auf T-Helferzellen. CD4 ist ein für MHC-II-Moleküle spezifischer Korezeptor.

Aus Pharmazeutische Zeitung online 42/2011; Heidi Schooltink: „Freund und Feind erkennen“, mit freundlicher Genehmigung des Govi-Verlags, Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn, Hrsg. Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände, Berlin.

Der CD-19-CD-21-Komplex ist notwendig zur Signalübermittlung auf allen B-Zellen. Die Bindung eines Antigens an den BCR führt über CD21 an CD19 zu einer Transduktion der Information (Tedder et al., 1994). Somit wird der Schwellenwert zur Aktivierung der B-Zelle um das 100-fache gesenkt (Carter und Fearon, 1992). Ferner ist CD19 an der Differenzierung und Homöostase von B-Zellen beteiligt.

CD25 ist assoziiert mit der α -Kette des IL-2-Rezeptors und wird auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen und regulatorischen T-Zellen exprimiert. Regulatorische T-Zellen (früher Suppressor-T-Zellen) haben die Aufgabe, autoimmune Vorgänge zu unterdrücken und so die Selbsttoleranz aufrechtzuerhalten. Neben CD25 exprimieren sie CD4 auf ihrer Oberfläche und vermitteln über die Sekretion von IL-4, IL-10 und TGF β die regulatorischen Effektorfunktionen (Tizard, 2009).

2.6.5 Autoimmunität

Autoimmune Reaktionen sind in zwei Kategorien zu unterteilen. Zum einen können sie aus einer normalen Immunantwort auf ein ungewöhnliches, abnormales Antigen resultieren oder infolge einer abnormalen Immunantwort auf ein gewöhnliches Antigen entstehen (Tizard, 2009). Im ersten Fall kommt es zur Autoimmunität als Antwort auf ein Antigen, das zunächst in Zellen oder Geweben versteckt war oder die infolge einer Kreuzreaktivität zwischen einem infektiösen Agens und Körperbestandteilen entstanden ist (Sinha et al., 1990). Viele Autoantigene finden sich in Geweben, die nicht von zirkulierenden Lymphozyten erreicht werden. So bilden sich beispielsweise erst in der Pubertät Antigene im Hoden aus, also lange nachdem die Lymphozyten hinsichtlich „körperfremd“ und „körpereigen“ geprägt wurden. Kommt es zu Verletzungen des Gewebes und zu einem Übertritt von Proteinen ins Blut, können Antigen-sensible Lymphozyten aktiviert werden und zu autoimmunen Reaktionen gegen das Hodengewebe führen (Draehmpaehl, 1992). In manchen Fällen ist diese Form von Autoimmunität von physiologischer Bedeutung. So müssen rote Blutkörperchen am Ende ihrer Lebenszeit aus dem Blut entfernt werden. Auf dem alternden Erythrozyten wird der Anionentransporter CD233 gespalten und es bildet sich ein neues Epitop (Rinehart et al., 2010). Dieses Epitop wird von IgG-Autoantikörpern gebunden und es kommt zur Phagozytose durch die Makrophagen in der Milz (Bosman et al., 2005).

Die abnormale Immunantwort auf ein gewöhnliches Antigen kann verschiedene Ursachen haben. In manchen Fällen kann es infolge der Infektionsbekämpfung gleichzeitig zu einer Ausprägung von Autoimmunität durch autoreaktive Lymphozyten kommen (Sinha et al., 1990). Normalerweise werden autoreaktive Lymphozyten im Thymus durch FasL-vermittelte Apoptose zerstört. Fehler in diesem Vorgang führen zu einem Überleben der abnormalen Lymphozyten und erhöhen das Risiko, autoimmune Reaktion auszuprägen (Krammer, 1997). Dennoch können in einem solchen Fall von autoimmuner Aktivierung regulatorische T-Zellen die Auswirkungen abmildern. So bilden z.B. Mäuse nach Injektion von Rattenerythrozyten auch Antikörper gegen eigene rote Blutkörperchen aus. Diese transiente autoimmune Reaktion wird schnell von regulatorischen Zellen unter Kontrolle gebracht und dauert nur wenige Tage an. Ist nun bei diesen Mäusen die regulatorische Zellaktivität unterdrückt, können die Autoantikörper persistieren und die eigenen Erythrozyten zerstören (Tizard, 2009).

Viele autoimmune Erkrankungen entstehen infolge von Viruserkrankungen. Der genaue Mechanismus ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Man konnte aus Hunden und Menschen mit systemischem Lupus Erythematoses entweder Typ-C-Retroviren oder Paramyxoviren isolieren (Ogasawara et al., 2003, Adelman und Marchalonis, 2002). Als mögliche Mechanismen werden die molekulare Mimikry und die sogenannte „bystander activation“ diskutiert (Fujinami et al., 2006). Unter molekularer Mimikry versteht man den Mechanismus, bei dem B-Lymphozyten, die zum einem an fremde mikrobielle Epitope binden, gleichzeitig jedoch mit Autoantigenen kreuzreagieren. Ohne die Aktivierung durch die T-Helferzellen würde nun nichts geschehen. Kommt es allerdings zeitnah zu einer Infektion mit dem gleichen mikrobiellen Agens, so wird dieses von den T-Helferzellen als „fremd“ erkannt und anschließend auch die selbst-reaktive B-Zelle zur Sekretion der Autoantikörper stimuliert. Bei einer virusvermittelten „bystander activation“ kommt es nach Infektion zu einem starken Entzündungsprozess und zur Ausschüttung verschiedenster Zytokine. Dieser Vorgang reaktiviert ursprünglich ruhende T-Zellen, die nur ein geringes Aktivierungspotential besitzen. Diese T-Zellen attackieren nun folglich Autoantigene, die vorher ignoriert wurden (Fujinami et al., 2006).

Was bedeutet die Autoimmunität in der Hundezucht?

Autoimmune Erkrankungen spielen bei unseren Haustieren eine wichtige Rolle und häufig sind rassetypische Prädispositionen für bestimmte Krankheitsbilder zu beobachten. So neigt der Deutsche Schäferhund zur Ausprägung einer atrophischen lymphozytären Pankreatitis oder zu Analfisteln (Kennedy et al., 2008). Die lymphozytäre Thyreoiditis hingegen kommt bei vielen Rassen vor, gehäuft jedoch bei Beagles und Deutschen Doggen (Tizard, 2009). Hunderassen sind ein Resultat konsequenter phänotypischer Selektion, die vielfach zu Inzucht und einem Verlust genetischer Diversität geführt hat (Wade, 2011). Dies trägt zu zwei Effekten bei. Zum einen können bisher unterdrückte autosomal rezessive Gene exprimiert werden, was in einer Ausprägung von Immundefizienzsyndromen und anderen immunologischen Erkrankungen resultieren kann. Zum anderen führt die eingeschränkte genetische Vielfalt zu einem Verlust des MHC-Polymorphismus (Kennedy et al., 2008) und infolgedessen zu einer reduzierten Resistenz gegenüber infektiösen Agentien. Diese Hunde haben darüber hinaus ein höheres Risiko, autoimmune Reaktionen auszuprägen, da die Variation der Immunantworten stark eingeschränkt ist und es somit auch häufiger zu Reaktionen gegenüber Autoantigenen kommen kann (Tizard, 2009).

2.6.6 Immunologische Regulation während der Trächtigkeit

Im Laufe der Evolution entwickelten sich die Säugetiere zu lebendgebärenden Lebewesen. Die Entwicklung des Fetus im Uterus stellt eine immunologische Herausforderung dar. So kann der Fetus nicht abgestoßen werden, obwohl er fremde MHC-Moleküle auf der Oberfläche seiner Zellen exprimiert. Man kann die feto-plazentare Einheit mit einem erfolgreichen Transplantat, Tumor oder Parasiten vergleichen, die durch eine einzigartige hormonelle Umgebung charakterisiert ist. So spielen zwar in der Trächtigkeit ähnliche immunsupprimierende Mechanismen eine Rolle, die auch die Toleranz eben jenes Transplantats, Tumors oder Parasiten gewährleistet, andererseits kann die Fruchtanlage jederzeit abgestoßen werden, wenn Infektionen und Stress die Mutter beeinträchtigen (Thellin und Heinen, 2003).

Es ist bekannt, dass auch die physiologische Trächtigkeit mit einer erhöhten maternalen Immunantwort einhergeht. In der tragenden Stute z.B. wandern Chorionzellen in das Endometrium ein und bilden zwischen dem 40. und 80. Trächtigkeitstag Schleimhauttrichter (Endometrial Cups), die das luteotrope Hormon equines Choriongonadotropin (eCG bzw. PMSG) synthetisieren und so die Progesteronproduktion und die Trächtigkeit unterstützen (Handler und Aurich, 2009). Die Einwanderung der Chorionzellen jedoch führt zu einer starken immunologischen Reaktion gegenüber den paternalen MHC-Antigenen. Demzufolge sind die Endometrial Cups von einer großen Anzahl von CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen umgeben, die eine Antikörpersynthese gegen das paternale MHC-Klasse-I-Antigen vermitteln (Noronha und Antczak, 2010). Trotzdem wird die Trächtigkeit nicht gestört. Dies zeigt, dass im Laufe der Evolution Säugetiere verschiedene Strategien entwickelten, um eine Gefährdung ihrer Nachkommen durch das eigene Immunsystem zu umgehen.

Ein Grund für die fetale Toleranz liegt in der Tatsache, dass zunächst keine polymorphen MHC-Moleküle auf der Oberfläche von Oozyten und Präimplantationsembryonen exprimiert werden (Roberts et al., 1992). Gleichermäßen sind keine MHC-Klasse-Ia- bzw. -II-Moleküle auf der Oberfläche von Trophoblasten zu finden, die einen engen Kontakt zum maternalen Gewebe gewährleisten. Dies ermöglicht den Zellen einen Schutz vor der Zerstörung durch zytotoxische T-Zellen (Murphy und Tomasi, 1998).

Generell ist die Trächtigkeit durch eine starke Verschiebung zu Gunsten einer Th2-vermittelten Immunantwort der CD4⁺-Lymphozyten gekennzeichnet. Im gleichen Zusammenhang führt dies zu einer Unterdrückung der Th1-Antwort. Man fand heraus, dass CD4-Th1-Zellen mit den

Zytokinen IL-2, TNF α und IFN γ direkt das Trophoblastenwachstum beeinflussen und Makrophagen sowie NK-Zellen aktivieren, die Trophoblastenzellen attackieren (Piccinni, 2006). Zum anderen vermitteln Th1-Zytokine einen Anstieg von Pro-thrombinasen in den Trophoblastenzellen, was zum Sistieren des maternalen Blutflusses in der Plazenta und Thrombosenbildung führt (Thellin und Heinen, 2003). Dieser Mechanismus wird bei Infektionen z.B. mit *Toxoplasma* bzw. *Neospora sp.* aktiviert und führt zum Abort. In der physiologischen Trächtigkeit jedoch hemmen CD4-Th2-Zellen mit ihren Interleukinen IL-4 und IL-10 diesen Mechanismus und gewährleisten den Erhalt der Trächtigkeit, wie auch eine Toleranz gegenüber transplantierten Organen (Piccinni et al., 2000). Interessanterweise zeigen Knock-out-Mäuse mit programmierter Th2-Reaktion auf eine Infektion mit *Leishmania sp.* eine Aufrechterhaltung der Trächtigkeit, im Gegensatz zu den Tieren, die eine Th1-Antwort zeigten (Krishnan et al., 1996).

Auf zellulärer Ebene steigt der Gehalt von CD4+CD25+T_{reg}-Zellen in der Trächtigkeit an und scheint eine wichtige Rolle in der Vermeidung der fetalen Abstoßung zu spielen. CD4+CD25+T_{reg}-Zellen synthetisieren in der Trächtigkeit, wie auch nach Östrogenbehandlung, vermehrt das Protein FoxP3. Dieses Protein blockiert die Th1-Antwort der T-Lymphozyten und unterstützt über diesen Weg die immunologische Regulation (Tizard, 2009). T_{reg}-Zellen sind ebenfalls in der Lage, die Proliferation von B-Zellen, die Immunglobulinproduktion und die zytotoxische Funktion von NK-Zellen zu unterdrücken. Interessanterweise konnten T_{reg}-Zellen im Ovar bzw. im Corpus luteum von Kühen, Mäusen und Frauen gefunden werden (Poole und Pate, 2012, Robertson, 2012). Man erklärt sich das Vorkommen in der Vermeidung einer autoimmunen Reaktion gegen die Zona-pellucida-Proteine der Oozyten. Zum anderen aber scheinen diese regulatorischen Zellen ebenfalls von entscheidender Bedeutung bei der Anbildung und dem Untergang der Gelbkörper zu sein. So schützen sie einerseits das Gewebe vor autoimmunen Reaktionen gegen die Antigene der Oozyten nach der Ovulation, andererseits sind sie nach Umwandlung in Th-17-Zellen in der Lage, durch Luteolyse den Gelbkörper zu zerstören (Robertson, 2012). T_{reg}-Zellen spielen demnach sowohl in der Toleranz fetaler Antigene als auch in der Kontrolle der steroidogenen Funktion von Gelbkörpern eine wichtige Rolle.

Progesteron ist das einzige Hormon, das absolut unverzichtbar für die Aufrechterhaltung der Trächtigkeit von Säugetieren ist und stimuliert die Th-2-vermittelte Immunantwort (Arck et al., 2007). Es zeigt in vivo und in vitro immunsupprimierende Eigenschaften in Konzentrationen, die beispielsweise in der humanen Plazenta vorliegen. Es konnte gezeigt werden, dass

Progesteron reversible Effekte auf Transportfunktionen auf der Membran von T-Lymphozyten und Makrophagen ausübt und so deren Reaktion unterdrückt (Siiteri und Stites, 1982). Im Vergleich zum Cortison besitzt Progesteron schwache systemische Effekte und vermittelt seine immunsupprimierende Wirkung nicht über die klassischen Glukokortikoidrezeptoren. Diese Differenzierung ist von Vorteil, da eine Aktivierung sonst möglicherweise eine Glukokortikoidintoxikation in der Trächtigkeit zur Folge hätte (Stites und Siiteri, 1983). Die immunsupprimierende Wirkung des Progesterons wird lokal vermittelt und erklärt die vielfach höheren Konzentrationen in der Plazenta im Vergleich zur Serumkonzentration (Siiteri und Stites, 1982). Die Plazenta ist jedoch auch Quelle weiterer immunsupprimierender Faktoren wie Östrogen, Choriongonadotropin und spezieller Interferone (IFN). In Säugetieren fungieren diese speziellen Interferone (IFN- ω in Menschen, Pferden und Hunden, IFN- γ und IFN- δ in Schweinen, IFN- τ in Wiederkäuern) des embryonalen Trophoblasten als Signalprotein zwischen Embryo und Mutter während der frühen Entwicklung. Sie unterdrücken ebenfalls die Lymphozytenproliferation. Doch auch der Fetus ist nicht allein von den maternalen Mechanismen zu seinem Schutz abhängig. Manche Isoformen des α -Fetoproteins, des wichtigsten Proteins des fetalen Serums, besitzen eine regulatorische Wirkung auf das Immunsystem (Tizard, 2009). Trotz all der genannten Möglichkeiten, das Immunsystem zu Gunsten der Trächtigkeit zu beeinflussen, kann sie nicht aufrechterhalten werden, wenn die genetischen Differenzen zwischen Mutter und Fetus zu groß sind. Studien zur Untersuchung xenogenetischer Kombination zweier Mausarten konnten zeigen, dass sich die Embryonen bis zur Mitte der Trächtigkeit entwickelten, danach jedoch von maternalen Lymphozyten attackiert wurden. Auch im Falle eines Transfers von Eseelembryonen in den Uterus von Pferdestuten führt dies zu einer Zerstörung durch eine Vielzahl von Lymphozyten (Tizard, 2009).

Die immunologische Herausforderung der Austragung eines genetisch abweichenden Organismus konnte durch eine Vielzahl von ineinandergreifenden Mechanismen gelöst werden. Die Besonderheit liegt in der fein abgestimmten Situation, dass einerseits die Toleranz des Embryos bzw. Fetus in vielfacher Hinsicht gewährleistet wird, auf der anderen Seite jedoch zu jedem Zeitpunkt, aufgrund spezieller interner und externer Umstände, ein Trächtigkeitsabbruch eingeleitet werden kann. Letztlich wird der Kampf um die Entstehung neuen Lebens auch durch immunologische Toleranz und Abstoßung entschieden.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchsdurchführung

Ziel der Untersuchung war es, relevante endokrinologische, immunologische und biochemische Parameter von luteal insuffizienten und gesunden Hündinnen zu bestimmen und zu vergleichen. Dementsprechend wurden der Verlauf der Progesteron-, Prolaktin- und Relaxinkonzentration aus dem Serum luteal insuffizienter und gesunder Hündinnen während der frühen Trächtigkeit und des nicht trächtigen Zyklus bestimmt und verglichen. In Anlehnung an ein Protokoll für humane Serumproben (Roby et al., 2006) wurde ein ELISA zur Detektion von Anti-Progesteron-Antikörpern entwickelt, optimiert und das Serum auf ein Vorhandensein von Antikörpern untersucht. Zudem wurden im Rahmen einer Ovariohysterektomie Gewebeproben der Gelbkörper von sechs Tieren entnommen und die Genexpression ausgewählter Parameter des Prostaglandin-Systems (COX-1, COX-2, PGES) sowie immunologischer Oberflächenmoleküle (CD3, CD4, CD8, CD19 und CD25) mittels Real-Time-PCR untersucht.

3.2 Auswahl der Tiere

In die vorliegende Studie wurden 38 Hündinnen sechs unterschiedlicher Rassen einbezogen, die von September 2010 bis Juli 2011 routinemäßig in der Tierarztpraxis Schönau, Bernau, vorgestellt und behandelt wurden. Sämtliche Untersuchungen wurden im Rahmen klinisch-gynäkologischer Untersuchungen und der Trächtigkeitsüberwachung vorgenommen. Von den 38 Tieren waren 20 Hündinnen verdächtig, in den vorherigen Trächtigkeiten luteale Insuffizienz gezeigt zu haben, 18 Tiere wurden der Kontrollgruppe zugeordnet, was durch die Auswertung der Progesteronkonzentration im Serum bestätigt werden konnte. Hündinnen der Rasse Deutscher Schäferhund sind am häufigsten vertreten ($n = 27$), einbezogen wurden auch Rottweiler ($n = 4$), Berner Sennenhunde ($n = 2$), Airedale Terrier ($n = 2$), Rhodesian Ridgebacks ($n = 2$) und ein Border Collie. Die Besitzer willigten schriftlich in die wissenschaftliche Verwendung der Serumproben und Reproduktionsdaten ihrer Hündinnen ein.

3.2.1 Einteilung der Gruppen

Alle Tiere wurden klinisch-gynäkologisch sowie bakteriologisch untersucht, um mögliche Grunderkrankungen bzw. Infektionen auszuschließen, die ebenfalls einen Progesteronabfall zur Folge haben könnten. Es wurden nur Tiere berücksichtigt, deren Untersuchung keine auffälligen Befunde ergab.

Zunächst wurden die Tiere aufgrund ihrer Anamnese und bisheriger Befunde den hypoluteiden oder Kontrolltieren zugeordnet (Tab. 2). Die Zuordnung einer Hündin in die Erkrankungsgruppe erfolgte, wenn in mindestens einer vorangegangenen Trächtigkeit die Progesteronkonzentration abfiel und dies zu Resorption oder Abort der Fruchtanlagen führte. Dieser Gruppe wurden auch Hündinnen zugeordnet, bei denen trotz erfolgreichen Deckaktes keine Trächtigkeit diagnostiziert werden konnte. Zusätzlich wurden Tiere mit individuell verkürztem Läufigkeitsintervall (2,5 bis 5 Monate) innerhalb der letzten 18 Monate in diese Gruppe aufgenommen. Nachfolgende Trächtigkeiten konnten durch Progesteronsubstitution aufrechterhalten werden. Im Fall einer nicht nachweisbaren Trächtigkeit, während der Ultraschalluntersuchung zu einem frühen Zeitpunkt, wurde nach drei bis vier Tagen eine Nachuntersuchung durchgeführt. Hündinnen der Kontrollgruppe zeigten mindestens zwei physiologische Trächtigkeiten mit rassetypischer Wurfgröße.

Die Tiere wurden zwischen dem 21. und 25. Tag post ovulationem (p.ov.) mittels Ultraschall untersucht und entsprechend in die Gruppe der tragenden bzw. nicht tragenden Hündinnen zugeordnet. Anhand des Vorberichts, der Ergebnisse der Serumprogesteronkonzentrationen sowie Ultraschalluntersuchung wurde folgende Gruppeneinteilung vorgenommen:

Gruppe 1 – luteal insuffizient, tragende Tiere

Gruppe 2 – luteal insuffizient, nicht tragende Tiere

Gruppe 3 – tragende Kontrolltiere

Gruppe 4 – nicht tragende Kontrolltiere

Die Einzeldaten der erkrankten Hündinnen und Kontrolltiere werden in den Tabellen 15 und 16 in Anhang zusammenfassend dargestellt.

3.2.2 Behandlungsschema

Im Fall eines kontinuierlichen, vorzeitigen Progesteronabfalls wurden die betroffenen trächtigen Hündinnen mit mikronisiertem Progesteron (Utrogestan^{®b}, 5 mg/kg KM, 3 x tgl., orale Gabe) behandelt. Die Substitution erfolgte nach Abfall des Progesterons um 20 bis 30 ng/ml innerhalb von fünf Tagen, welcher durch eine zusätzliche Messung 24 Stunden später bestätigt wurde. Die Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt intakte Fruchtanlagen (rundliche Fruchtpullen mit glatter Wand, Feten mit Herzaktion) in der ultrasonographischen Untersuchung. Drei tragende betroffene Hündinnen erhielten Utrogestan[®] ab dem 24. bis 28. Tag p.ov., vier Tiere ab dem 29. bis 33. Tag p.ov. und drei weitere Hündinnen ab dem 36. Tag p.ov. Die Behandlung erfolgte bis zum 53. Tag p.ov. in voller Dosis und wurde danach bis zum 56. Tag p.ov. auf 3 x tgl. 2,5 mg/kg halbiert (Rosset et al., 2008). Weitere Informationen bezüglich Alter, Rasse, Zwischenöstrusintervall, Gebärfähigkeit und Beginn der Progesteronbehandlung der einzelnen Tiere sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Studienpopulation

Gruppe	Hund	Alter (J)	Rasse	Zyklus-abstand (M)	Würfe	behandelt mit oralem Progesteron
1 - hypoluteid, tragend (n = 13) <i>Verlust diagnostizierter Trächtigkeiten bzw. „leer“ bleiben nach erfolgreichem Deckakt</i> und <i>individuelle Verkürzung des Zwischenöstrusintervalls</i> und <i>klinische, gynäkologische und mikrobiologische Untersuchung o.b.B.</i>	2	6	DSH	5	6	nein
	3	8	DSH	5	5	nein
	4	5	DSH	4	0	ab 31.d p.ov.
	5	3	DSH	5	2	ab 24.d p.ov.
	7	6	DSH	6	4	ab 27.d p.ov.
	8	5	DSH	5	4	ab 31.d.p.ov.
	15	4	RW	4	3	ab 31.d p.ov.
	18	7	RR	5	4	ab 24.d p.ov.
	19	4	DSH	6	2	ab 36d.p.ov.
	22	3	DSH	4	2	nein
	26	3	DSH	5	1	ab 36.d p.ov.
	30	3	DSH	4	1	ab 36.d p.ov.
	32	6	DSH	5	5	ab 31.d p.ov.
2 - hypoluteid, nicht tragend (n = 7) <i>Kriterien wie hypoluteide, tragende Gruppe</i>	6	11	DSH	6	9	nein
	14	7	BS	5	4	nein
	17	3	DSH	4	2	nein
	20	6	DSH	6	6	nein
	34	3	DSH	5	3	nein
	35	12	DSH	6	9	nein
	36	8	RR	6	5	nein
3 - Kontrolle, tragend (n = 12) <i>mindestens zwei ungestörte Trächtigkeiten mit angemessener Wurfgröße</i> und <i>konstantes Zwischenöstrusintervall</i>	1	4	DSH	8	3	nein
	10	5	DSH	5	2	nein
	12	6	BC	7	2	nein
	16	4	RW	6	2	nein
	23	3	DSH	6	2	nein
	24	4	DSH	7	2	nein
	25	6	RW	6	2	nein
	27	6	DSH	6	2	nein
	28	9	DSH	6	9	nein
	29	5	DSH	6	5	nein
	31	6	RW	6	2	nein
33	7	BS	6	4	nein	
4 - Kontrolle, nicht tragend (n = 6) <i>Kriterien wie tragende Kontrollgruppe</i>	11	3	AT	8	2	nein
	13	4	AT	8	2	nein
	21	7	DSH	6	2	nein
	37	4	DSH	8	4	nein
	38	10	DSH	6	9	nein
	39	7	DSH	6	2	nein

Die Hündinnen wurden aufgrund ihres Vorberichts und vorausgehender Untersuchungen in vier Gruppen unterteilt (hypoluteid tragend, hypoluteid nicht tragend, Kontrolle tragend, Kontrolle nicht tragend); Abkürzungen: AT, Airedale Terrier; BC, Border Collie; BS, Berner Sennenhund; DSH, Deutscher Schäferhund; o.b.B., ohne besonderen Befund; RR, Rhodesian Ridgeback; RW, Rottweiler.

3.3 Geräte und Materialien

3.3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte/Verbrauchsmaterialien	Typ	Hersteller/Firmensitz
Agarose-Gelkammer		Bio-Rad GmbH, München
Bioanalyzer	Agilent 2100	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
Columbia-Agarplatten	Agarplatten mit Schafblut	Henry Schein VET GmbH, Hamburg
Cryoröhrchen	Cryovial	Carl Roth, Karlsruhe
Datenanalyse Software	Microplate Manager (Version 5.2.)	BioRad GmbH, München
Feinwaage		Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 35	Carl Zeiss Jena, Jena
Homogenisator	Speed Mill 2	Analytik, Jena
Lysis Tube P	Lysing Matrix D, 2ml Tubes	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Microtiter Platte 1	Mikrotestplatte 1550	VEB Polyplast, Halber- stadt
Microtiter Platte 2	Cellstar	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen
Microplate Reader	iMark™BioRad	BioRad Laboratories GmbH, München
Mikrowelle	Microstar MD 6459 MTC	Medion Technologie Center, Mülheim/Ruhr
miniVIDAS®	Multiparameter Immunoanalyser	bioMerieux, Marcy l'Etoile, FRA
Mixer	Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Monitor Narkoseüberwachung	PM-9000 Vet	Eickemeyer, Tuttlingen

Material

Nahtmaterial	Surgicryl, Vicryl	Henry Schein VET GmbH, Hamburg
OP-Material	OP-Abdecktücher, Klemmen	Karl Storz GmbH und Co. KG, Heidelberg
PCR-Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Climatic 761	Knick Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Pipetten	Research	Eppendorf AG, Hamburg
Real-Time-PCR-Cycler	Rotor-Gene 3000	Corbett Research, Mortlake, AUS
Schnellfärbelösung	Haema, Diff-Quick	Eberhard Lehmann GmbH, Berlin
Schüttler	Microplate Shaker	Adolf-Kühner AG, Basel, CH
Serumröhrchen	Probenröhrchen mit Serumgerinnungsaktivator	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Skalpellklingen	Skalpellklingen, Fig. 10	Fa. Aeskulap, Tuttlingen
sterile Einmalkanülen	18 G x 1 ½“ , 2x40mm	Henry Schein Inc., Melville, USA
Spektrophotometer	Nanodrop ND-1000	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Ultrasonographie	Logiq 5, 7,5 MHz Sektorschallkopf	GE Healthcare, München
Vortex Minischüttler	Vibrifix VF 1 Electronic	Janke & Kunkel, Staufen
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus Hanau
Zentrifuge	EBA 20	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge	Varifuge 3.OR	Heraeus, Hanau

3.3.2 Reagenzien

Tabelle 4: Liste der verwendeten Reagenzien

Reagenzien	Typ	Hersteller/Firmensitz
Reagenzien ELISA		
Anti-Dog IgE	polyclonal HRP-conjugated anti-dog (goat)	AbD Serotec, Oxford, UK
Anti-Dog IgG	polyclonal HRP-conjugated anti-dog (sheep)	AbD Serotec, Oxford, UK
Anti-Dog IgG	polyclonal HRP-conjugated anti-dog (goat)	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, USA
Anti-Dog IgM	polyclonal HRP-conjugated anti-dog (goat)	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, USA
Blocking-Lösung 1	ELISA Ultrablock-Lösung	AbD Serotec, Oxford, UK
Blocking-Lösung 2	Roti-Block	Candor Bioscience GmbH, Wangen
Bovines Serumalbumin 1	BSA, Fraktion V	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin 2	BSA, IgG-frei	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Coating-Puffer	ELISA Coating Buffer 5x	AbD Serotec, Oxford, UK
Ethanol	Ethanol 99,8%	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Gelatine	Gelatin from cold water fish skin	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Hydrocortison	Hydrocortisone H4001 \geq 98%	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Progesteron	Progesterone P0130 \geq 99%	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Progesteron-BSA	Progesterone-BSA conjugate (7720-0750)	AbD Serotec, Oxford, UK
Testosteron	Testosteron T1500 \geq 98%	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze

Material

Tween 20		Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
TMB	3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin	Rockland Inc., USA
Östradiol	Estradiol E8875 \geq 98%	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Reagenzien PCR und Gelelektrophorese		
Agarose	Biozyme LE Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
DNase	DNA-Verdau RQ1 RNase- freie DNase (1 U/ μ l)	Promega GmbH, Mannheim
DNA Polymerase	Immolase TM	Bioline GmbH, Luckenwalde
DNA-Marker	50 bp, DNA Größenmarker	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
dNTPs	Desoxyribonukleosid- triphosphate	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Ethidiumbromid	Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Hexamere	pd(N)6 Random Hexamere	Amersham Biosciences, Freiburg
Puffer für Polymerase	Immopuffer (10x)	Bioline GmbH, Luckenwalde
Reaktionspuffer (10x) für DNase	DNase I, RNase-free	Thermo Scientific GmbH, Waltham, USA
Reaktionspuffer (5x) für Reverse Transkriptase	Revert Aid Reverse Transkriptase	Thermo Scientific GmbH, Waltham, USA
Reverse Transkriptase	M-MLV Reverse Transkrip- tase (200 U/ μ l)	Promega GmbH, Mannheim
SensiMix TM	SYBR Low-ROX	Bioline GmbH, Luckenwalde
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer 10x, pH 8,3	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe

3.3.3 Primer

Tabelle 5: Sequenzen der verwendeten PCR-Primer sowie zugehörige Annealing-Temperaturen und Transkriptgrößen

Gen	Primersequenz	Genbank accession no.	Fragmentgröße (bp)	Annealing-Temperatur
canPGES	Forward 5'-TGT ACG TGG TGG CTG TCA TC-3' Reverse 5'-AGA CGA GGA AGT GCA TCT GG-3'	EF 063141.1	237	62 °C
canCOX1	Forward 5'-TTC TGC CCC AGA GTC AGA TG-3' Reverse 5'-TCA GCT GCT GCA CAT ACT CC-3'	NM_ 1323.2	222	61 °C
canCOX2	Forward 5'-GGA CCA GCT TTC ACC AA GG-3' Reverse 5'-ACC AGA CCA AAG ACC TCC TG-3'	AY 4495.1	236	60 °C
canPGFS	Forward 5'-CCT CCG TCC AGA ATT GGT TC-3' Reverse 5'-GCC TGC GGT TAA AGT TGG AC-3'	AY 87597.1	248	52 °C
canGAPDH	Forward 5'-CTG ATG CCC CCA TGT TTG TG-3' Reverse 5'-CAG TGG AAG CAG GGA TGA TG-3'	NM_ 001003142.1	258	58 °C
canCD3	Forward 5'-TCT CTG GAA CCG AGG TAG TG-3' Reverse 5'-CAC ACA CTC TTG CTC TCA GG-3'	NM_00100 3379.1	210	56 °C
canCD4	Forward 5'-TCA TCT CCC AGA GCC AGA AG-3' Reverse 5'-GGG CCT CTT TCA TAG ACA GC-3'	NM_00100 3252.1	240	60 °C
canCD8	Forward 5'-GTG GCT CTA CCA GAG GAA TG-3' Reverse 5'-GGG GCT GAA GTA CAG AAT GG-3'	NM_00100 2935.2	220	59 °C
canCD19	Forward 5'-GAA GGT CAT TGC CCA GTC AG-3' Reverse 5'-CGT TGC CGT ACT GAT TCT GG-3'	XM_ 844833.1	233	61 °C
canCD25	Forward 5'-GTG ATT GTG AGA GGG GCT TC-3' Reverse 5'-TGA AGT GTC TGC CCC ACT AC-3'	AB 501356.1	292	60 °C

3.3.4 Kits

Tabelle 6: Liste der verwendeten Kits

Methode	Produkt	Hersteller/Firmensitz
DNA-Aufreinigung	Invisorb®Spin DNA Extraction Kit	Invitek, Berlin
Prolaktin-ELISA	Canine Prolactin ELISA-Testkit (DEV9944)	Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel
RNA-Extraktion	Invisorb® Spin Cell RNA Mini Kit	Invitek, Berlin

3.3.5 Hergestellte Lösungen

Tabelle 7: Liste der hergestellten Lösungen

Lösung/Puffer	Substanz	Menge/Volumen
DNA-Agarose-Gel 2%	Agarose	2 g
	TAE-Puffer (1x) (in der Mikrowelle auf-kochen)	100 ml
Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 9,6	Natriumcarbonat	1,6 g
	Natriumhydrogencarbonat	2,4 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	14,24 g
	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	2,75 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
PBS-T 0,05%	PBS	1000 ml
	Tween 20	0,5 ml
PCR-H ₂ O	H ₂ O, 20 Minuten bei 121 °C auto-klaviert	100 ml
TAE-Puffer (1x)	TAE-Puffer (10x), pH 8,3	100 ml
	H ₂ O	900 ml

Material

Tris-buffered Saline (TBS)	10x Tris-HCl (0,5 M; pH 7,6)	1 l
	10x Saline	1 l
	H ₂ O	8 l
TBS/BSA 1,5%	TBS	100 ml
	BSA	1,5 g
TBS/BSA 1,5%/Milchpulver 5%	TBS	100 ml
	BSA	1,5 g
	Milchpulver	5g
TBS/Milchpulver 5%	TBS	100 ml
	Milchpulver	5 g
TBS/BSA 1,5%/Tween 0,05%	TBS	100 ml
	BSA	1,5 g
	Tween 20	0,05 ml
TBS-T 0,05%	TBS	1000 ml
	Tween 20	0,5 ml

3.4 Methodik

3.4.1 Bestimmung des Ovulationszeitpunkts

Die Hündinnen wurden mit Beginn der Läufigkeit vorgestellt und in drei- bis viertägigen Abständen bis zum Ovulationszeitpunkt untersucht. Die klinisch-gynäkologische Untersuchung umfasste zunächst eine Allgemeinuntersuchung und anschließende Adspektion und Palpation der Vulva. Diesbezüglich wurden die Gewebekonsistenz, Deckbereitschaft und das vorhandene Sekret bewertet (Günzel-Apel, 1997). In der vaginoskopischen Untersuchung mittels Röhrenspekulum wurde die Vaginalschleimhaut beurteilt und ein Zellabstrich aus dem cranialen Scheidenbereich entnommen, der anschließend auf einem Objektträger in drei Bahnen ausgerollt wurde. Der luftgetrocknete Abstrich wurde angefärbt (Haema, Diff-Quick, Eberhard Lehmann GmbH) und lichtmikroskopisch untersucht. In diesem Untersuchungsschritt erfolgten eine Beurteilung des Ausstrichhintergrunds, der Art und Lage der Epithelzellen sowie die Ermittlung des Prozentsatzes verschiedener Epithelzellen und das Vorhandensein von

neutrophilen Granulozyten (Bouchard et al., 1991). Den Hündinnen wurde während der Vaginoskopie zu Beginn der Läufigkeit zusätzlich eine Tupferprobe für die bakteriologische Untersuchung entnommen. Der Ausstrich erfolgte auf Columbia-Agar. Im Fall eines Wachstums von pathogenen Keimen nach spätestens 48 Stunden (deutliche Hämolyse in der Blutagarkultur sowie hochgradiges Wachstum eines dominanten Bakterientyps) wurde ein Antibiotogramm angefertigt und die Hündin dementsprechend behandelt.

Mit Beginn des Östrus wurde Blut entnommen und der Serumprogesteron Gehalt bestimmt. Die Ovulation wurde bei einem Progesteron Gehalt im Bereich von 4-10 ng/ml ($\bar{\text{O}}$ 6,0 ng/ml) angenommen (Root Kustritz, 2001a, Lévy und Fontbonne, 2007). Die Hündinnen konnten ab 48 Stunden p.ov. gedeckt werden.

3.4.2 Gewinnung und Lagerung der Blutproben

Den Tieren aller Gruppen wurde in folgenden Intervallen regelmäßig Blut für die Hormonbestimmungen entnommen:

Zeitraum 1: 12.-18. Tag p.ov.

Zeitraum 2: 19.-23. Tag p.ov.

Zeitraum 3: 24.-28. Tag p.ov.

Zeitraum 4: 29.-33. Tag p.ov.

Zeitraum 5: 34.-40. Tag p.ov.

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der Vena cephalica unter Verwendung von gerinnungsfördernden Serumröhrchen. Die Proben wurden 30 Minuten bei 4 °C gelagert und anschließend bei 2400 g zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert, aliquotiert und bei -20 °C in Cryoröhrchen eingefroren.

3.4.3 Ovariohysterektomie

Eine Ovariohysterektomie (OHE) wurde an sechs Hunden in der nicht tragenden Lutealphase durchgeführt (siehe Tab. 8). Diese Operation wird routinemäßig in der Tierarztpraxis Schönow durchgeführt und erfolgte bei den Tieren nach der Feststellung einer medizinischen Indikation

(u.a. Trächtigkeitsstörungen und Zyklusabweichungen, die zu einem erhöhten Risiko von Gebärmutterveränderungen führen; Populationskontrolle) auf Wunsch des Besitzers.

Die Allgemeinanästhesie erfolgte über einen Venenzugang mittels Injektionsnarkose. Anschließend wurden die Patienten intubiert. Während der Operation erhielten die Hündinnen intravenös Sterofundin-Vollelektrolytlösung. Die Vitalfunktionen konnten mit einem Narkosemonitor überwacht werden. Nach Reinigung und Desinfektion des OP-Feldes erfolgte die Eröffnung der Bauchhöhle an der Linea alba. Der Schnitt begann caudal des Nabels und wurde bis auf die Höhe des Os pubis geführt. Die Entfernung der Ovarien und des Uterus erfolgte entsprechend den publizierten Protokollen (Suter, 2012). Nach der Entnahme wurden Eierstöcke und Gebärmutter hinsichtlich ihrer makroskopischen Beschaffenheit beurteilt. Danach erfolgte die zügige Gewebepräparation, wobei zwei bis drei Gelbkörper (Corpora lutea) pro Tier entnommen wurden. Die 0,5 x 0,7 cm großen Gewebeproben wurden in trockene Reaktionsgefäße überführt und dann unmittelbar bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gefrierkonserviert. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht der Tiere, an denen eine Ovariohysterektomie durchgeführt wurde.

Tabelle 8: Hündinnen, an denen eine Ovariohysterektomie durchgeführt wurde

Gruppe	Tier	Rasse	Zeitpunkt OHE
2 – luteal insuffizient, nicht tragend	35	DSH	20 d p.ov.
	17	DSH	33 d p.ov.
	36	RR	36 d p.ov.
	33	BS	35 d p.ov.
4 – Kontrolle, nicht tragend	13	AT	33 d p.ov.
	1	DSH	36 d p.ov.

3.4.4 Endokrinologische Untersuchungen

3.4.4.1 Progesteron

Die Progesteronbestimmung fand vor der Serumkonservierung mittels ELFA (miniVIDAS®) statt (Brugger et al., 2011). Das Testprinzip kombiniert eine immunenzymatische Methode, die auf dem Kompetitionsprinzip basiert, mit einer abschließenden Fluoreszenzmessung. Der Festphasenrezeptor des Messsystems ist mit monoklonalen Anti-Progesteron-Maus-Antikörpern beschichtet. Das in der Probe vorhandene Progesteron bindet an den monoklonalen Antikörper. Anschließend wird das Konjugat, ein mit Alkalischer Phosphatase markiertes Progesteronderivat, in den Festphasenrezeptor transferiert. Die freien Bindungsstellen werden mit dem Konjugat gesättigt, ungebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Im letzten Nachweisschritt wird das Substrat (4-Methylumbelliferyl-Phosphat) hinzugegeben. Das Enzymkonjugat katalysiert dessen Hydrolyse in ein fluoreszierendes Produkt (4-Methylumbelliferon), dabei ist die Fluoreszenz der Progesteronkonzentration umgekehrt proportional. Die untere Messgrenze des Tests liegt laut Herstellerangabe bei 0,25 ng/ml, der Variationskoeffizient für den Inter- bzw. Intraassay bei 3,8%.

3.4.4.2 Prolaktin

Die Prolaktinkonzentrationen der Serumproben wurden im Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig, mit einem kommerziell erhältlichen Prolaktin ELISA-Testkit bestimmt.

Die mitgelieferte Mikrotiterplatte war mit monoklonalem Anti-Hundeprolaktin-Antikörper beschichtet. Als Standard zur Herstellung der Eichlösungen dienten hoch aufgereinigtes Hundeprolaktin in einer Serum-Puffer-Matrix sowie ein Standard-/Probenverdünnungspuffer. In die Reaktionsvertiefungen der Mikrotiterplatte wurden 25 µl Eichlösung bzw. Probe und 50 µl Probenpuffer pipettiert. Nach Inkubation des Versuchsansatzes (zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler) wurde die Mikrotiterplatte dekantiert und mit 300 µl Waschpuffer/ Vertiefung gewaschen. Anschließend erfolgten die Zugabe von 200 µl enzym-markiertem Prolaktin-Antikörper (polyklonales Antiserum, markiert mit Meerrettichperoxidase) und eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur über eine Stunde. Nach Dekantieren und nochmaligem Waschen der Platte wurden den Vertiefungen 200 µl Substratlösung zugesetzt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung beendet. Die fotometrische Messung

erfolgte bei 450 nm. Der Messbereich der Eichkurve lag zwischen 2,5 und 80 ng/ml, die untere Nachweisgrenze des Tests bei 0,4 ng/ml und der Inter- und Intraassay-Variationskoeffizient bei 6.9% bzw. 6.0%.

3.4.4.3 Relaxin

Die Relaxinkonzentration im Serum wurden in der bei Einspanier et al. (1999) beschriebenen Vorgehensweise mit einem Enzymimmunoassay (EIA) im Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Leipzig bestimmt.

Das Testprinzip beruht auf einem nicht-kompetitiven Assaysystem, bei dem als Fängerantikörper polyklonales Anti-Relaxin-Antiserum von der Ratte verwendet wurde. Die Detektion von Relaxin im Serum erfolgt nach der Zugabe eines primären Anti-Relaxin-Antikörpers vom Schwein und Biotin-markiertem porzinen Relaxin. Nach der Zugabe von Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin wurde der Umsatz des Substrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin fotometrisch ausgewertet. Dieses Assaysystem wurde für den Hund modifiziert und validiert (Einspanier et al., 2002). Die untere Nachweisgrenze lag bei 0,025 ng/ml und der Inter- und Intraassay-Variationskoeffizient bei 12% bzw. 8,7%.

3.4.5 Immunologische Untersuchungen

3.4.5.1 ELISA-Prinzip

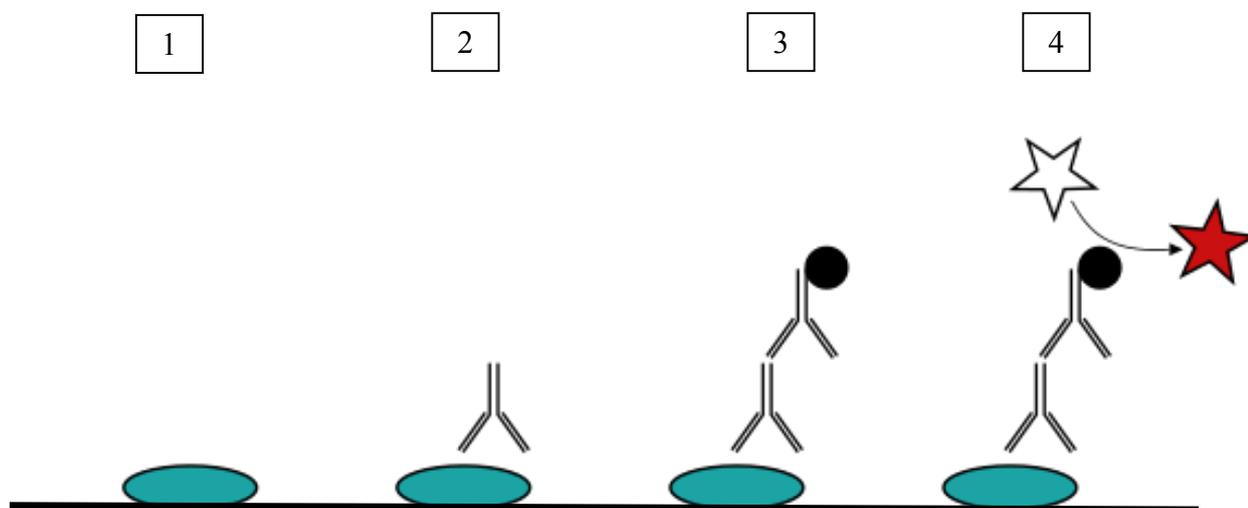


Abbildung 3: Direkter ELISA zum Nachweis von Anti-Progesteron-Antikörpern

-  Progesteron-BSA
-  Anti-Progesteron-Antikörper aus Serum
-  Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Anti-dog-Ig
-   Substrat (TMB) weiß, umgesetzt = rot

Der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) wurde im Institut für Veterinär-Biochemie der Freien Universität Berlin zum Nachweis von caninen Anti-Progesteron-Antikörpern entwickelt. Dem Testprinzip liegt ein direktes Assaysystem zugrunde (siehe Abb. 3). Im ersten Schritt erfolgte die Beschichtung einer Mikrotiterplatte (96 Reaktionsvertiefungen) mit Progesteron-BSA, welches in einem Carbonat-Bicarbonat-Puffer gelöst wurde. In jedem Testdurchlauf wurden parallel Negativkontrollen mitgeführt. Diese Vertiefungen wurden im ersten Schritt dann lediglich mit BSA beschichtet. Die beschichteten Platten wurden bei 4 °C über Nacht inkubiert und danach dreimal mit 200 µl TBST gewaschen (Abb. 3, Schritt 1).

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde danach in jede Vertiefung 100 µl Blocking-Lösung (1 bzw. 2) pipettiert. Die Inkubation der Platten erfolgte für zwei Stunden bei RTp und danach über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag wurden die Reaktionsvertiefungen viermal mit 200 µl PBST gewaschen. Danach wurden 100 µl des verdünnten Kontroll- und Patientenserus jeweils im Doppelansatz aufgetragen und für zwei Stunden bei RTp inkubiert (Abb. 3, Schritt 2). Anschließend wurden

die Platten fünfmal mit PBST gewaschen. Die im Serum vorhandenen Antikörper banden an das fixierte Progesteron-BSA und konnten im nächsten Schritt durch die Zugabe von Sekundäntikörpern markiert werden (Abb. 3, Schritt 3). Diese Sekundäntikörper (IgE, IgM und IgG) waren mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Die Enzymaktivität wurde mit dem chromogenen Substrat TMB bestimmt (Abb. 3, Schritt 4). Die Enzymreaktion wurde nach einer definierten Inkubationszeit mit 50 µl H₂SO₄ (0,2 M) abgestoppt und die Extinktion bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten Reader bestimmt.

3.4.5.2 ELISA – Entwicklung und Optimierung

Zur Gewährleistung der Stabilität und Reproduzierbarkeit des Assays war eine Vielzahl von Versuchsdurchläufen erforderlich, in denen einzelne Komponenten des Systems optimiert wurden. Im Folgenden sollen die einzelnen Optimierungsschritte auch anhand der Abbildung 4 nachvollziehbar dargestellt werden. Ein Serumpool aus 12 luteal insuffizienten Hündinnen, der aliquotiert und bei -20 C° gelagert wurde, diente als studieninterner Standard und wurde in allen Ansätzen mitgeführt.

Beschichtung:

Zunächst erfolgte die Beschichtung verschiedener Reihen einer Mikrotiterplatte (96 Reaktionsvertiefungen) mit 100 µl Progesteron-BSA der Konzentration 10 µg/ml oder 100 µl BSA-Lösung der Konzentration 10 µg/ml für die Negativkontrolle. Sowohl Progesteron-BSA als auch BSA wurden in 0,1 M Carbonat-Bicarbonat-Puffer mit einem pH von 9,6 gelöst (Tab. 7). Im Laufe der Versuchsreihe wurden Mikrotiterplatten verschiedener Firmen miteinander verglichen. Des Weiteren wurden verschiedene BSA-Typen (Albumin Fraktion V, Albumin IgG-frei) in unterschiedlichen Konzentrationen getestet und verschiedene Beschichtungspuffer mit unterschiedlichen pH-Werten miteinander verglichen.

Blockierung:

Hier wurden Lösungen mit verschiedenen BSA-Konzentrationen, mit und ohne Zusatz von Fischgelatine bzw. Milchpulver sowie kommerziell erhältliche Blocking-Lösungen miteinander verglichen (Abb. 4).

Verdünnung:

Sowohl das Serum als auch die Sekundärantikörper wurden mit PBS verdünnt. Das Serum wurde entsprechend für jeden verwendeten Sekundärantikörper in den Verdünnungen 1:2, 1:5, 1:10, 1:50 und 1:100 getestet.

Die Sekundärantikörper wurden in den Verdünnungsstufen 1:10000, 1:50000 und 1:100000 getestet (Abb.4).

Kreuzreaktivität:

Um die Kreuzreaktivität der verwendeten Serumantikörper mit anderen Steroiden zu untersuchen, wurden dem Serum Progesteron, Östradiol, Testosteron und Hydrocortison zugesetzt. Die Mikrotiterplatten wurden wie bereits in Kapitel 3.4.5 beschrieben beschichtet und geblockt. In Anlehnung an das Untersuchungsprotokoll von Roby und Mitarbeiter wurden dem Serum die o.g. Steroidhormone in folgenden Konzentrationen zugesetzt: 0,8 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,02 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,001 mg/ml und im ELISA untersucht. Da die Steroidhormone in Ethanol gelöst werden müssen, wurden die jeweiligen Kontrollansätze mit der entsprechenden Menge Ethanol durchgeführt.

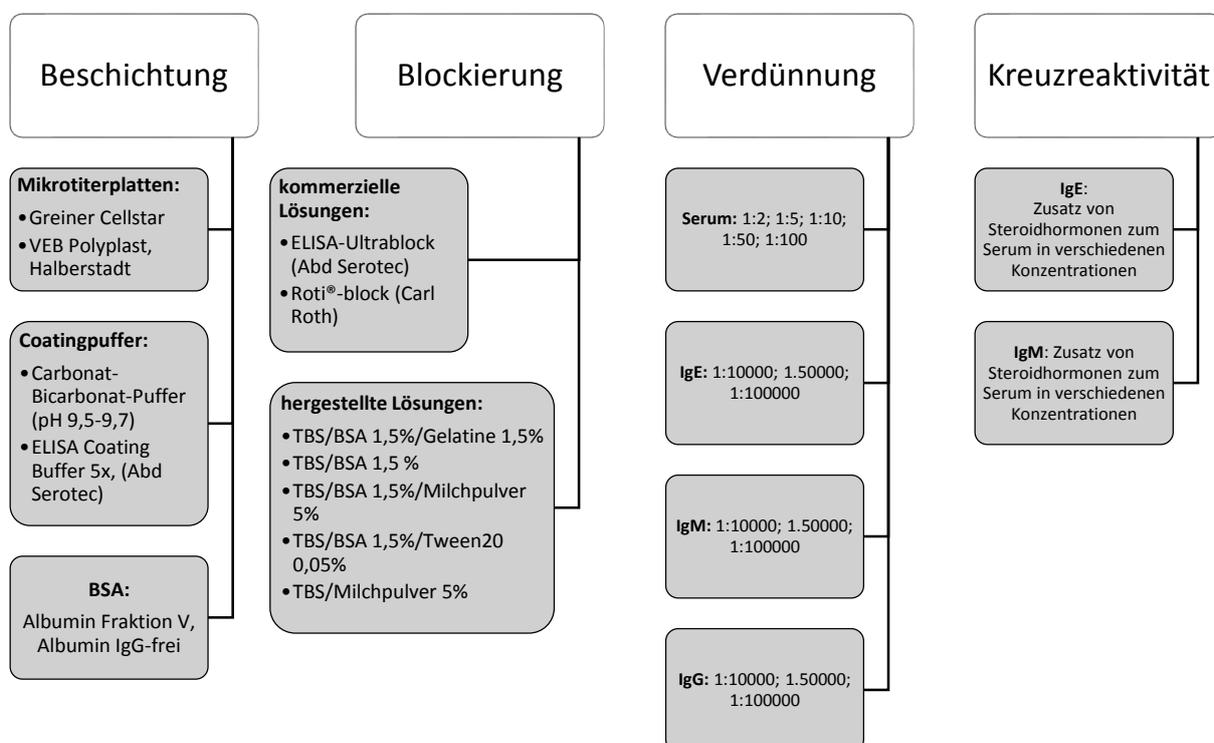


Abbildung 4: ELISA-Entwicklung und Optimierung

3.4.6 Molekularbiologische Untersuchungen

3.4.6.1 RNA-Extraktion und reverse Transkription

Zur RNA-Extraktion der tiefgefrorenen Gelbkörperproben wurde das InviTrap Spin Cell RNA Midi Kit (Invitek, Berlin, Deutschland) entsprechend der Benutzeranweisung verwendet. Die Gewebeprouben wurden mit 700 µl Lyse-Puffer in die ReaktionsgefäÙe gegeben, homogenisiert und für drei Minuten bei 13500 x g zentrifugiert. Das Lysat wurde auf den DNA-Bindungs-Filter des Extraktionskits pipettiert und eine Minute inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für drei Minuten bei 13500 x g. Die Säule mit der abgetrennten DNA wurde verworfen und der Durchfluss mit 700 µl 70%igem Ethanol gemischt. In zwei Schritten wurden dann jeweils 700 µl dieses Gemisches auf den RNA-Bindungs-Filter eines neuen ReaktionsgefäÙes pipettiert, eine Minute inkubiert, ebenfalls für eine Minute bei 9500 x g zentrifugiert und dann der Durchfluss verworfen. Anschließend folgten drei Waschschrirte mit den im Kit enthaltenen Waschpuffern. Nach dem letzten Waschschrirte wurde der Filter fünf Minuten bei 13500 x g zentrifugiert, was der Trocknung des Filters diente. Anschließend wurde der Filter auf ein neues ReaktionsgefäÙ gesteckt und es wurden 30 µl Elutionspuffer direkt auf die Membran des RNA-Filters pipettiert, zwei Minuten inkubiert und dann bei 9500 x g für eine Minute zentrifugiert. Der RNA-Filter wurde entfernt und der Durchfluss (Gesamt-RNA) bei -80 °C gelagert.

Die isolierte Gesamt-RNA wurde danach photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Photometer quantifiziert. Die Qualität der RNA wurde mit dem Agilent 210 0 Bioanalyser (Agilent, Waldbronn, GER) entsprechend den Anweisungen des Herstellers ermittelt.

Die reverse Transkription dient der Umschreibung der einzelsträngigen RNA in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA). Bevor die reverse Transkriptase-Reaktion durchgeführt werden konnte, musste verbliebene genomische DNA in den RNA-Proben durch einen DNase-Verdau entfernt werden. Die einzelsträngige cDNA wurde aus 0,5 µg Gesamt-RNA, unter Verwendung von 200 U Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase und 3,75 µmol Random Hexamere, in einem Gesamtvolumen von 30 µl generiert. Um etwaige Kontaminationen in den folgenden Untersuchungen zu überprüfen, wurden RNA-Proben ohne Zusatz von M-MLV RT als Negativkontrollen mitgeführt. Die gewonnene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.4.6.2 Gradienten-PCR und DNA-Agarosegelelektrophorese

Zunächst wurde die optimale Annealing-Temperatur der einzelnen Primerpaare durch eine Gradienten-PCR ermittelt. Der Temperaturgradient im Heizblock des Cyclers umfasste dabei in zwölf Schritten 52-68,5°C. Für die Gradienten-PCR wurde ein PCR-Reaktionsansatz für 12 Proben mit 60 µl cDNA gemischt und kurz zentrifugiert, bevor je 25 µl davon auf zwölf PCR-Reaktionsgefäße verteilt wurden. Diese wurden dann ebenfalls kurz zentrifugiert und in den auf 94 °C vortemperierten Gradienten-Cycler gestellt. Der erste Schritt bei 94 °C dauerte zehn Minuten und diente der Aktivierung der Hot-Start-DNA-Polymerase. Danach folgten 39 Zyklen bestehend aus jeweils einem Denaturierungsschritt (94 °C für 30 Sekunden) und der Annealing-Reaktion (52-68 °C für eine Minute). Die Extension (zwei Minuten bei 72 °C) beendete die Reaktion.

Zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur und zur Überprüfung der Größe der Amplifikationsprodukte aus der Gradienten-PCR wurden die Produkte in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Diese PCR-Produkte wurden ausgeschnitten, gereinigt, sequenziert und als externe Standardproben für die Real-Time-PCR verwendet. Dazu wurde ein 2%iges Agarosegel hergestellt und mit 1 µl Ethidiumbromid pro 10 ml Agarose versetzt. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gegossen und nach einer Stunde mit einem Tris-Acetat-EDTA(TAE)-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit 5 µl Ladepuffer gemischt und in einem Gesamtvolumen von 10 µl in die Taschen pipettiert. Für die Größenkontrolle wurde zusätzlich ein 50-bp-DNA-Größenmarker aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 60 Minuten bei 80 Volt. Danach wurden die Banden unter einer UV-Lichtquelle sichtbar gemacht. Die ausgeprägtesten Banden sind als PCR-Produkt der am besten geeigneten Annealing-Temperatur zu bewerten (Abbildung 5). Die daraus abgeleiteten optimalen Annealing-Temperaturen für alle untersuchten Primerpaare sind in Tabelle 5 aufgelistet. Unter Anwendung des Invisorb Spin DNA Extraction Kits (Invitex, Berlin), entsprechend den Angaben des Herstellers, wurden aus den Gelstücken die spezifischen PCR-Produkte isoliert, bei OD 260 nm quantifiziert, bei 5 °C gelagert und als Standard in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet.

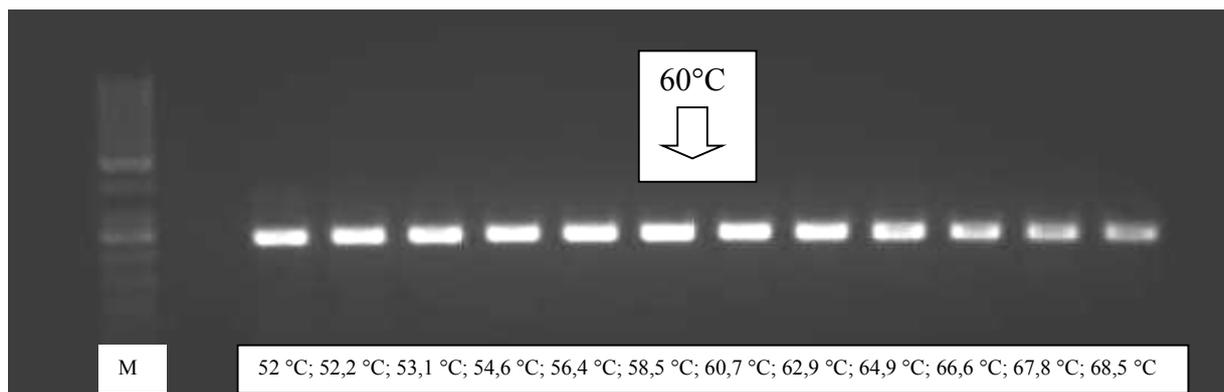


Abbildung 5: Abbildung der spezifischen RT-PCR-Produkte (COX-2) einer Gradienten-PCR mittels eines 2%-DNA-Agarosegels mit Ethidiumbromid zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur
M: DNA-Größenmarker

3.4.6.3 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR wurde unter Verwendung des Farbstoffs SYBR Green I mit dem Rotor-Gene 3000 durchgeführt. Der genutzte Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA und ermöglicht eine quantitative Genexpressionsanalyse. Dafür wurden 1 µl cDNA in einem Ansatz von 10 µl mit 0,2 µl von dem Primer (jeweils vorwärts und rückwärts), 5µl SensiMix und 2,5 µl H₂O verwendet. Eine Verdünnungsreihe mit bestimmten Konzentrationen (1:10³-1:10⁹) der Primerstandards wurde gleichzeitig mit den Proben amplifiziert. Die Menge der gewonnenen mRNA wurde in Relation zu den Standardkurven von der Rotor-Gene-6.0-Software berechnet. Die Negativkontrollen (H₂O und die Proben ohne reverse Transkriptase) zeigten kein Signal. Folgendes Temperaturprogramm wurde gewählt:

Tabelle 9: Temperaturprogramm für die Real-Time-PCR

PCR-Programm	Temperatur	Zeit	Zyklen
Aktivierung der DNA-Polymerase	95 °C	10 min	1 x
Denaturierung	95 °C	15 sec	
Annealing	siehe Tab. 5	20 sec	45 x
Elongation	72 °C	30 sec	
Schmelzkurvenanalyse	50-99 °C	15 sec im ersten Schritt; 5 sec in den weiteren Schritten	1 x

Die Spezifität des jeweiligen PCR-Produkts wurde durch die finale Überprüfung des Schmelzpunkts des PCR-Produkts nachgewiesen. Die Auswertung der Real-Time-PCR erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms Rotor-Gene 6.0. Für die Normalisierung der Genexpressionsdaten wurden die Referenzgene GAPDH und COX-1 verwendet (Kowalewski et al., 2006).

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS® Statistics 20. Eine deskriptive Auswertung (Durchschnittswerte, Standardabweichung) wurde für alle Proben vorgenommen. Zum Vergleich der Hormonkonzentrationen in den Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1= 14-18 d p.ov., 2 = 19-23 d p.ov., 3 = 24-28 d p.ov.; 4 = 29-33 d p.ov.; 5 = 34-40 d p.ov) wurden eine One way ANOVA und ein nachfolgender Post-hoc-Test angewendet. Ein Kruskal-Wallis-Test wurde bei nicht normalverteilten Werten (Prolaktin- und Relaxinkonzentrationen) durchgeführt.

Die Intra-Assay-Reproduzierbarkeit konnte durch den fünffachen Ansatz vier verschiedener Proben in einem Durchlauf ermittelt werden. Die Inter-Assay-Reproduzierbarkeit wurde durch den Doppelansatz einer Probe auf sieben verschiedenen Platten bestimmt. Der Variationskoeffizient ist der Quotient aus der Standardabweichung und dem arithmetischen Mittel der Extinktionen, die durch die photometrische Messung der genannten Platte entstanden sind. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von $< 0,05$ angenommen.

Die Ergebnisse der RT-PCR wurden normalisiert und mit Hilfe des Programms Microsoft Excel bzw. SPSS® Statistics 20 ausgewertet (Durchschnittswerte, Standardabweichung). Die Normalisierung der Quantitätswerte erfolgte mit Hilfe der Referenzgene GAPDH und COX-1. Mittels des Programmes geNorm (Vandesompele et al. 2002) wurde die Expressionsstabilität der Referenzgene (M-Wert) ermittelt und nur solche für die Kalkulierung von Normalisierungsfaktoren herangezogen, die einen M-Wert von $< 1,5$ aufwiesen.

4. Ergebnisse

4.1 Klinische Befunde

Am Ende des untersuchten Trächtigkeitszeitraums wurde die Anzahl der lebend geborenen Welpen ermittelt. Die Einzeldaten der Tiere sind in den Tabellen 15 und 16 im Anhang aufgeführt. Alle Hündinnen warfen ohne Komplikationen zum physiologischen Geburtszeitpunkt ($63 \text{ d p.ov.} \pm 2 \text{ d}$). Wie aus Abbildung 6 hervorgeht, bestand kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der lebend geborenen Welpen zwischen den Kontrollhündinnen der Gruppe 3 ($5,83 \pm 1,99$) und den luteal insuffizienten Tieren der Gruppe 1 ($3,77 \pm 2,92$).

Bei den hypoluteiden Hündinnen 2, 3 und 18 konnten am 23. Trächtigkeitstag jeweils vier bzw. fünf intakte Fruchtanlagen festgestellt werden, die jedoch kurz darauf resorbiert wurden. Diese drei Hündinnen gebaren keine lebenden Welpen. Bei der Hündin 4 aus der gleichen Gruppe konnten zu keinem Zeitpunkt Fruchtanlagen festgestellt werden (Tab. 15, Anhang). Bei neun Tieren der Gruppe 1 sowie bei acht Tieren der Gruppe 3 wurden pathogene Keime im Scheidenabstrich nachgewiesen. Sie wurden entsprechend den Ergebnissen eines Antibiotogramms behandelt (Tab. 20, Anhang).

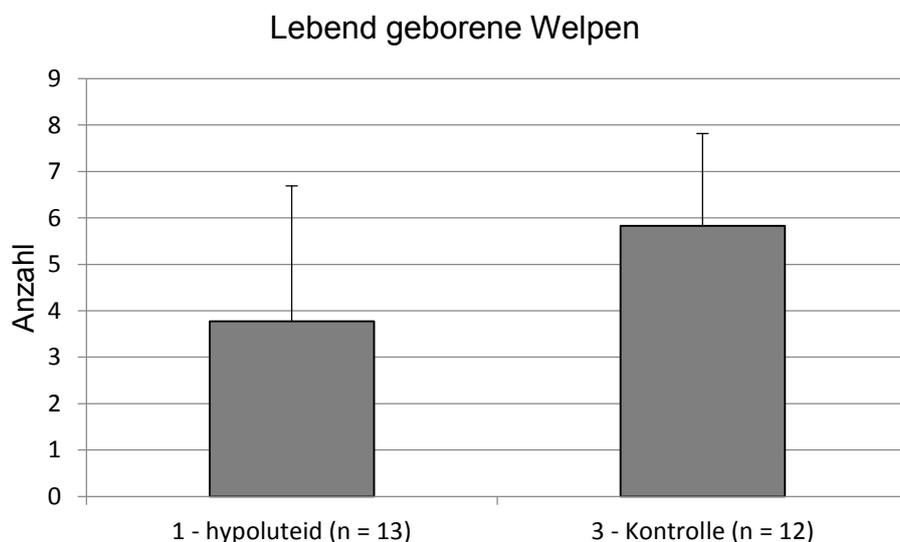


Abbildung 6: Mittlere Anzahl (\pm SD) der lebend geborenen Welpen am Ende des untersuchten Trächtigkeitszeitraums

4.2 Endokrinologische Befunde

Zur Bestimmung der Hormonkonzentrationen im Serum wurde den Hündinnen in fünf Zeiträumen Blut entnommen: Zeitraum 1: 12.-18. Tag p.ov.; Zeitraum 2: 19.-23. Tag p.ov.; Zeitraum 3: 24.-28. Tag p.ov.; Zeitraum 4: 29.-33. Tag p.ov.; Zeitraum 5: 34.-40. Tag p.ov.

4.2.1 Progesteron

Im Folgenden ist der Verlauf der Progesteronkonzentration der Gruppen in den verschiedenen Zeiträumen (ZR) verglichen worden. Der Vergleich der nicht tragenden Tiere (Gruppe 2 und Gruppe 4) zeigt deutliche Unterschiede in den Konzentrationen während der frühen Lutealphase. Verglichen mit der Kontrollgruppe wiesen die luteal insuffizienten Hündinnen in den ersten drei Zeiträumen signifikant niedrigere mittlere Progesteronwerte auf (ZR 1: $28,32 \pm 14,64$ ng/ml vs. $51,03 \pm 8,54$ ng/ml; ZR 2: $24,77 \pm 15,59$ ng/ml vs. $48,53 \pm 14,36$ ng/ml; ZR 3: $20,70 \pm 9,96$ ng/ml vs. $40,96 \pm 11,86$ ng/ml; Abb. 7).

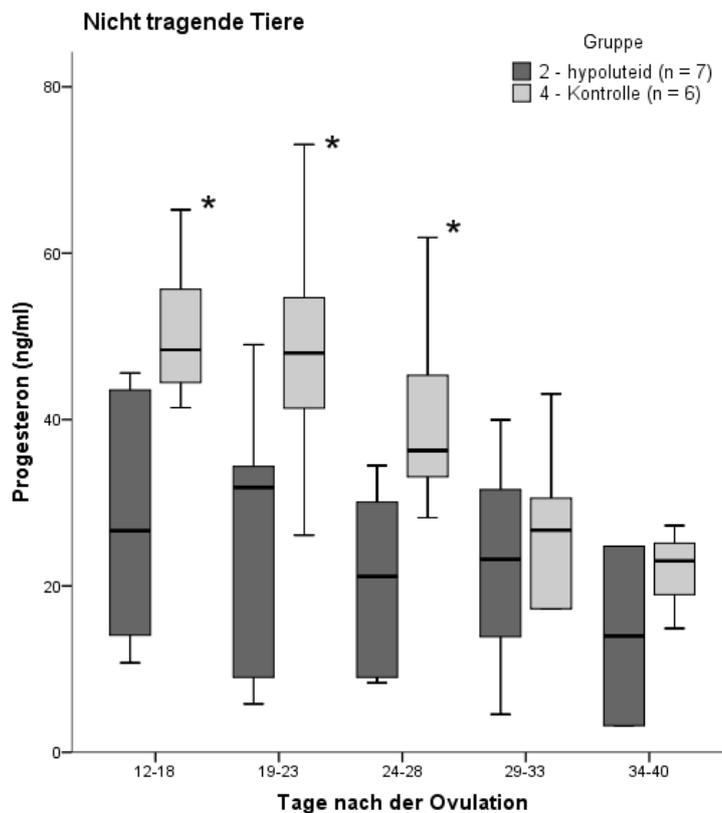


Abbildung 7: Progesteronkonzentrationen (\pm SD) nicht tragender Hündinnen in der Lutealphase. * $P < 0.05$ zwischen Gruppe 2 und Gruppe 4 in den ersten drei Zeiträumen

Ergebnisse

Der Vergleich der tragenden, hypoluteiden Tiere und der Kontrollhündinnen ergibt ein ähnliches Sekretionsmuster in beiden Gruppen (Abb. 8). Erkennbar ist ein Maximum in der frühen Lutealphase (ZR 1: $46,23 \pm 18,20$ ng/ml vs. $44,44 \pm 13,58$ ng/ml). Die tragenden luteal insuffizienten Tiere wurden wie folgt mit oralem Progesteron substituiert: drei Tiere im ZR 3; sieben Tiere im ZR 4 und zehn Tiere im ZR 5. Die Abbildung 8 zeigt ein moderates Absinken auf mittlere Progesteronkonzentrationen von $20,62 \pm 11,20$ ng/ml (Gruppe 1) bzw. $26,86 \pm 8,48$ ng/ml (Gruppe 3) im letzten Zeitraum.

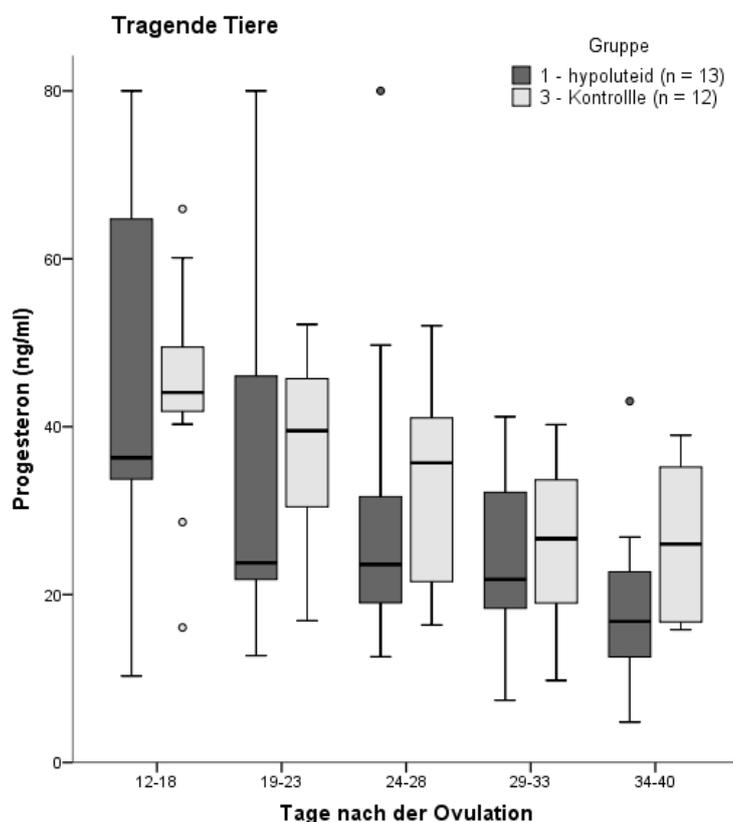


Abbildung 8: Progesteronkonzentrationen (\pm SD) tragender Hündinnen in der Lutealphase

Zwischen den Hündinnen der Rasse „Deutscher Schäferhund“ und den anderen Rassen konnten zu keinem Zeitpunkt der Lutealphase signifikante Unterschiede in den Progesteronkonzentrationen festgestellt werden (Abb.9). Im vierten Zeitraum zeigten die DSH jedoch tendenziell eine niedrigere Progesteronkonzentration verglichen mit den Tieren der anderen Rassen ($P < 0.1$).

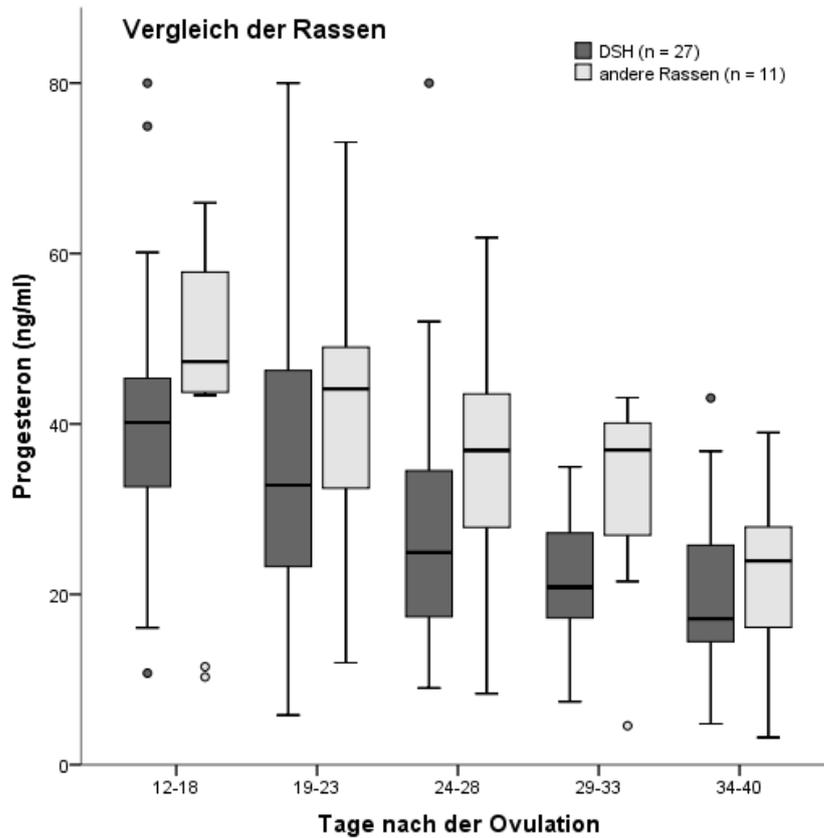


Abbildung 9: Progesteronkonzentrationen (\pm SD) tragender und nicht tragender Deutscher Schäferhündinnen verglichen mit Hündinnen anderer Rassen in der Lutealphase

4.2.2 Prolaktin

Der Vergleich der Prolaktinkonzentrationen in der Lutealphase zeigt große Unterschiede zwischen den Rassen (Abb. 10). Verglichen mit allen anderen einbezogenen Rassen wiesen Hündinnen der Rasse „Deutscher Schäferhund“ zu allen Zeitpunkten signifikant niedrigere mittlere Prolaktinkonzentrationen auf.

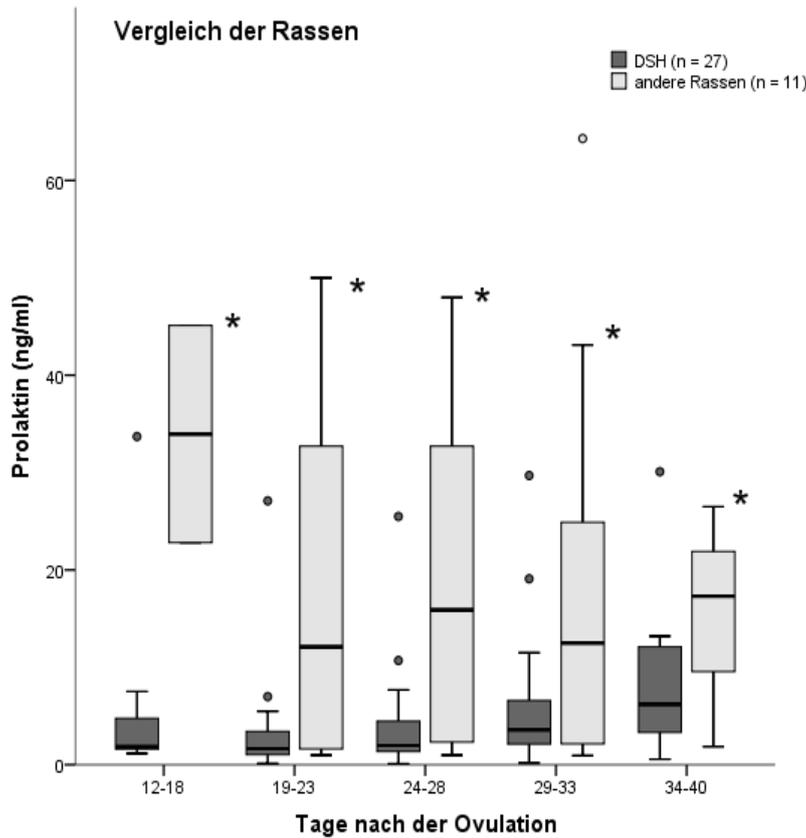


Abbildung 10: Prolaktinkonzentrationen (\pm SD) tragender und nicht tragender Deutscher Schäferhündinnen verglichen mit Hündinnen anderer Rassen in der Lutealphase. * $P < 0.05$ zwischen DSH und Hündinnen anderer Rassen zu den angegebenen Zeiträumen

Aufgrund der rassebedingten Unterschiede wurden im Folgenden die Deutschen Schäferhündinnen separat betrachtet. Ein Vergleich der tragenden Tiere zeigt einen Anstieg der mittleren Prolaktinkonzentration von $1,92 \pm 0,07$ ng/ml (Gruppe 1) bzw. $1,87 \pm 0,11$ ng/ml (Gruppe 3) im Verlauf der Lutealphase auf $9,77 \pm 8,30$ ng/ml (Gruppe 1) bzw. $5,38 \pm 1,76$ ng/ml (Gruppe 3) im letzten ZR (Abb. 11). Verglichen mit den Schäferhündinnen der Kontrollgruppe weisen die luteal insuffizienten Tiere im ZR 3 signifikant höhere mittlere Prolaktinkonzentrationen auf ($6,37 \pm 2,97$ ng/ml vs. $1,60 \pm 1,29$ ng/ml).

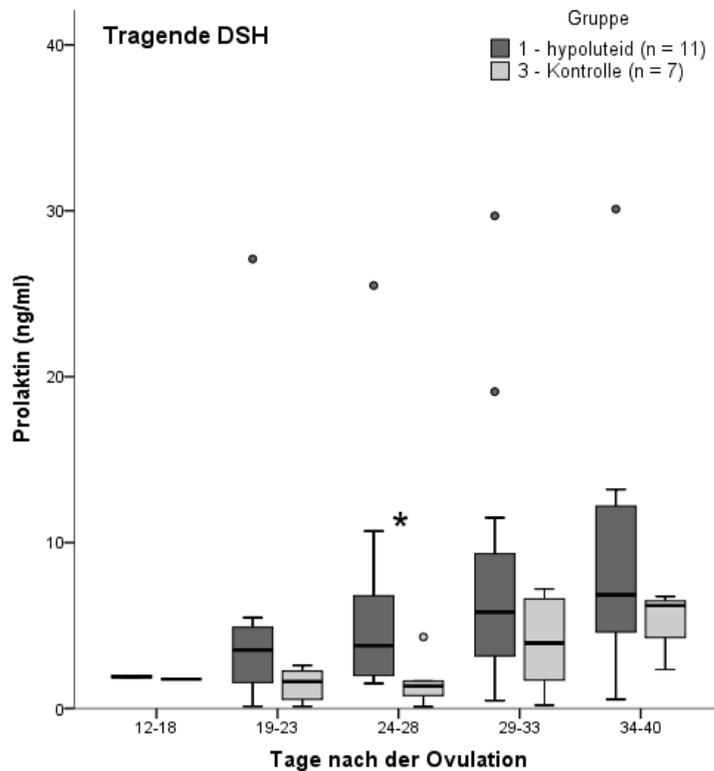


Abbildung 11: Prolaktinkonzentrationen (\pm SD) Deutscher Schäferhündinnen in der Lutealphase. * $P < 0.05$ zwischen DSH der Gruppen 1 und 3 im dritten Zeitraum

Die Betrachtung der Hündinnen anderer Rassen ergab starke Unterschiede zwischen den Einzeltieren. So lagen die Werte der tragenden Hündinnen in den Gruppen 1 ($n = 2$) und 3 ($n = 5$) in einem Messbereich von 1,68 ng/ml bis 59,31 ng/ml. Zwischen den luteal insuffizienten und Kontrolltieren konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

4.2.3 Relaxin

Die Untersuchung der mittleren Relaxinkonzentrationen im Serum der tragenden Hündinnen zeigte einen Anstieg im Verlauf der frühen Lutealphase von $0,66 \pm 0,18$ ng/ml (Gruppe 1) bzw. $0,62 \pm 0,01$ ng/ml (Gruppe 3) im ersten Zeitraum auf $1,91 \pm 0,89$ ng/ml (Gruppe 1) bzw. $2,21 \pm 0,49$ ng/ml (Gruppe 3) in Zeitraum fünf (Abb. 12). Es waren keine signifikanten Unterschiede der Relaxinkonzentrationen zwischen den Gruppen der tragenden Tiere feststellbar. Ebenso konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Rassen festgestellt werden (Abb. 13).

Ergebnisse

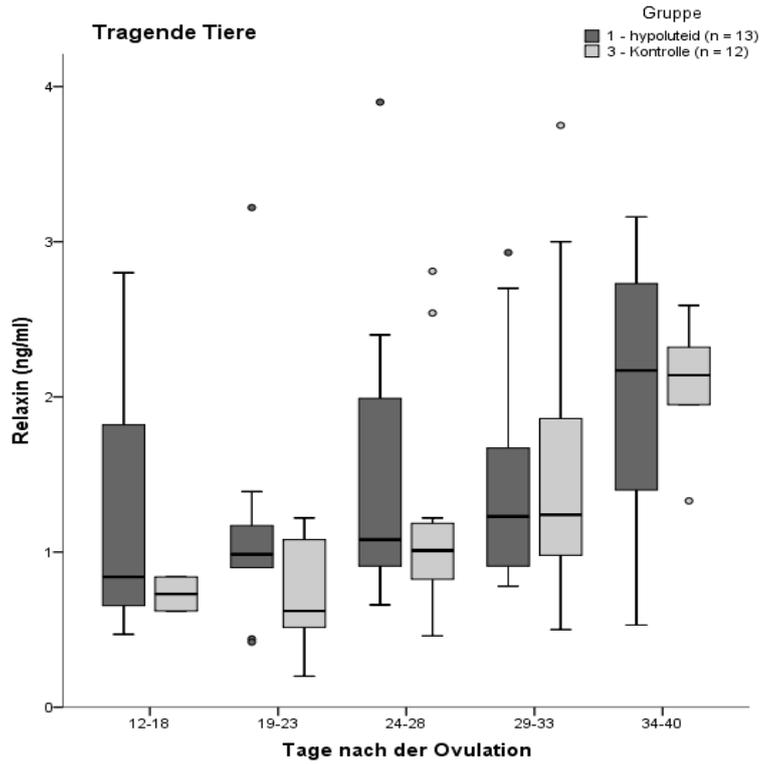


Abbildung 12: Relaxinkonzentrationen (\pm SD) tragender Hündinnen in der Lutealphase

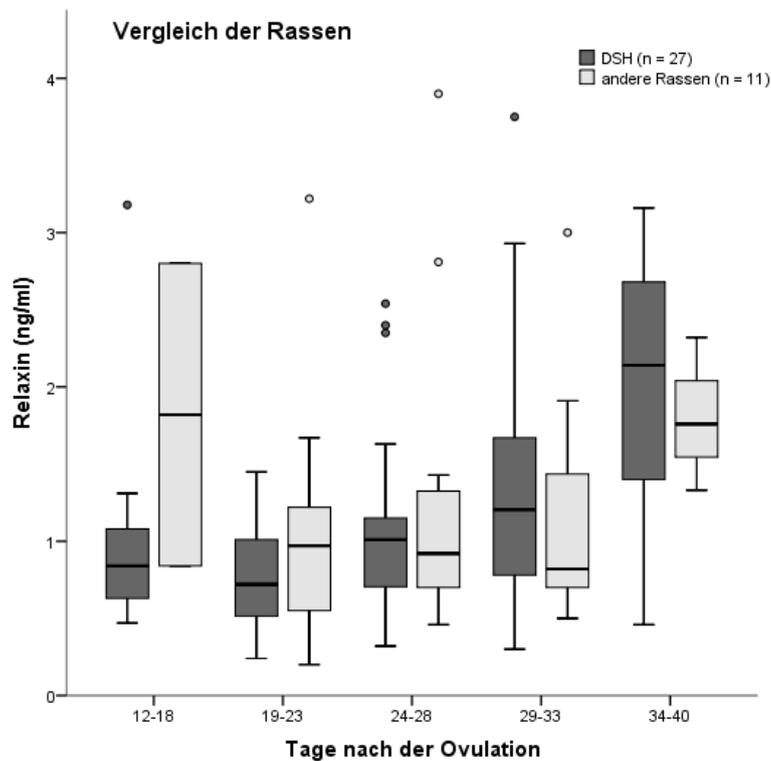


Abbildung 13: Relaxinkonzentrationen (\pm SD) tragender und nicht tragender Deutscher Schäferhündinnen verglichen mit Hündinnen anderer Rassen in der Lutealphase

Ergebnisse

Die tragenden Tiere zeigen signifikant höhere mittlere Relaxinkonzentrationen im Vergleich zu den nicht tragenden Tieren in den Zeiträumen vier und fünf (Abb. 14).

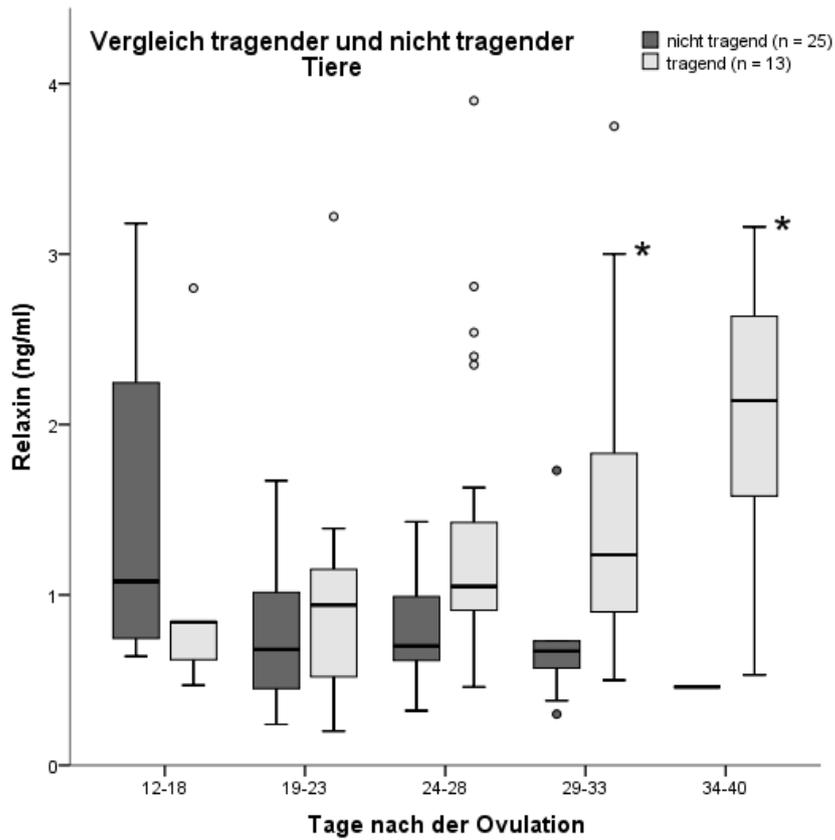


Abbildung 14: Vergleich der Relaxinkonzentrationen (\pm SD) tragender und nicht tragender Hündinnen in der Lutealphase. * $P < 0.05$ zwischen nicht tragenden und tragenden Hündinnen in den Zeiträumen vier und fünf

4.3 Immunologische Untersuchungen

4.3.1 Optimierung des ELISA

4.3.1.1 Beschichtung

Zur Optimierung des Assay-Systems wurden verschiedene Komponenten miteinander verglichen (Abb. 4). Der Vergleich unterschiedlicher Mikrotiterplatten ergab stabilere und besser reproduzierbare Ergebnisse unter Verwendung von Platten der Firma Polypast Halberstadt.

Die Beschichtung der Reaktionsvertiefungen erfolgte mit Progesteron-BSA, das in verschiedenen Coating-Puffern gelöst wurde. Dabei kamen ein kommerziell erhältlicher Coating-Puffer (AbD Serotec, Oxford) sowie ein selbst hergestellter Carbonat-Bicarbonat-Puffer (siehe Tab. 7) mit unterschiedlichen pH-Werten (9,5; 9,6 und 9,7) zur Anwendung. Es wurden sowohl eine positive Poolprobe als auch Negativkontrollen aufgetragen und der ELISA, wie in Kapitel 3.4.5 beschrieben, durchgeführt.

Die Verwendung des Carbonat-Bicarbonat-Puffers mit einem pH-Wert von 9,6 zeigte im Vergleich zu allen anderen Versuchsansätzen im IgE-Titer die höchste korrigierte OD ($0,128 \pm 0,008$, Abb. 23, Anhang). Zwei verschiedene zur Blockierung eingesetzte BSA-Typen wurden ebenfalls in diesem Zusammenhang miteinander verglichen (Albumin Fraktion V und Albumin IgG-frei). Es wurden keine photometrisch messbaren Unterschiede in der Auswertung festgestellt (Ergebnisse nicht dargestellt).

4.3.1.2 Blockierung

Da unspezifische Bindungen der enzymmarkierten Antikörper zu einer störenden Hintergrundaktivität führen können, ist das Abblocken freier Proteinbindungsstellen am Progesteron-BSA beziehungsweise BSA ein essentieller Schritt. Zu diesem Zweck wurden verschiedene kommerzielle und selbst hergestellte Blockierungslösungen eingesetzt. Die photometrische Auswertung ergab die geringsten Hintergrundaktivitäten bei Verwendung des Puffers ELISA-Ultrablock der Firma Abd Serotec sowie bei den hergestellten Lösungen TBS/BSA 1,5%/Gelatine 1,5%, TBS/BSA 1,5% bzw. TBS/MP 5%/Tween 0,05% (Tab. 10). Allerdings wiesen die selbst hergestellten Lösungen nur eine kurze Haltbarkeit (48h) auf, sodass für den weiteren Untersuchungsablauf die kommerzielle Ultrablock-Lösung der Firma Abd Serotec (mit den geringsten Standardabweichungen) verwendet wurde.

Tabelle 10: Vergleich verschiedener Blockierungsreagenzien.

Photometrische Auswertung einer AK-positiven Serumprobe (Verdünnung 1:5) unter Verwendung eines HRP-konjugierten IgE (Verdünnung 1:50000). Angabe der Extinktionen \pm SD

Blockierungsreagenz	Progesteron-BSA (OD 450 nm)	BSA (OD 450 nm)	Differenz (Δ)
Roti-Block, Carl Roth	0,326 \pm 0,028	0,141 \pm 0,007	0,185
Ultrablock, Abd Serotec	0,304 \pm 0,004	0,116 \pm 0,005	0,188
TBS/BSA1,5%/Gelatine	0,372 \pm 0,010	0,152 \pm 0,026	0,220
TBS/BSA1,5%	0,329 \pm 0,039	0,113 \pm 0,003	0,216
TBS/BSA1,5%/Tween 0,05%	0,254 \pm 0,053	0,104 \pm 0,005	0,150
TBS/MP5%/Tween 0,05%	0,470 \pm 0,030	0,280 \pm 0,056	0,262

4.3.1.3 Verdünnungen

Für jeden Sekundärantikörper musste die optimale Verdünnung des Serums und des Antikörpers ermittelt werden. Für diesen Versuch wurde eine positive Poolprobe in den Verdünnungen 1:2 – 1:50 getestet.

Serum:

Die schnelle Farbentwicklung im Versuch mit dem IgM in der Serumverdünnungsstufe 1:2 machte ein sehr frühes Abstoppen der Enzymreaktion nach fünf Minuten notwendig. Die Doppelbestimmungen wiesen hohe Standardabweichungen auf (0,601 \pm 0,173). Die höheren Verdünnungsstufen wurden bei längerer Substratentwicklungszeit verglichen. Bei einer Verdünnung des Serums von 1:10 wurde die höchste korrigierte OD ermittelt (Tab. 11 a). Im Vergleich dazu führte eine Serumverdünnung von 1:20 zwar zu einer kleineren korrigierten OD aber auch zu einer geringeren Standardabweichung (Tab 11 a). Daher wurde diese Verdünnung für den weiteren Untersuchungsablauf verwendet.

Die optimale Serumverdünnung konnte für den sekundären IgE-Antikörper bei 1:5 ermittelt werden (Tab. 11 b). Bei dieser Serumverdünnung wurde die höchste korrigierte OD bei geringer

Ergebnisse

Standardabweichung ermittelt. Die, nach dieser Optimierung, für weitere Untersuchungen verwendeten Serum- und Antikörperverdünnungen sind Tabelle 12 zu entnehmen.

Sekundärantikörper:

Die Verdünnung der Sekundärantikörper wurde mit PBS im Verhältnis 1:10000, 1:50000 und 1:100000 durchgeführt. Die optimale Konzentration wurde für den IgE bei 1:50000 und für den IgM bei 1:100000 ermittelt (Tab. 11 a und 11 b). In einem weiteren Versuch wurde der PBS-Lösung BSA als Trägerprotein zur Stabilisierung in einer Konzentration von 2% zugesetzt und für die Antikörperverdünnung verwendet (Luttmann et al., 2009). Es konnte festgestellt werden, dass der BSA-Zusatz zur Verdünnungslösung sowohl den Hintergrund als auch die Gesamtaktivität erheblich abblockt (Anhang, Tab. 17). Im weiteren Untersuchungsablauf wurde daher auf den Zusatz von BSA in der Verdünnungs-reagenz verzichtet.

Tabelle 11: Photometrische Auswertung des Versuchs zur Ermittlung der optimalen Verdünnung des Serums und der Sekundärantikörper IgM (a) und IgE (b). Angabe der korrigierten OD \pm SD

a) nach 20 Minuten abgestoppt:

IgM	Serum			
	1:5	1:10	1:20	1:50
1:10000	> 2,0	> 2,0	> 2,0	> 2,0
1:50000	> 2,0	0,659 \pm 0,171	0,589 \pm 0,126	0,538 \pm 0,114
1:100000	> 2,0	0,502 \pm 0,103	0,356 \pm 0,046	0,199 \pm 0,031

b) nach 30 Minuten abgestoppt:

IgE	Serum:			
	1:2	1:5	1:10	1:50
1:10000	0,125 \pm 0,052	0,112 \pm 0,021	0,118 \pm 0,020	0,078 \pm 0,006
1:50000	0,106 \pm 0,008	0,121 \pm 0,011	0,096 \pm 0,006	0,052 \pm 0,003
1:100000	0,062 \pm 0,004	0,062 \pm 0,015	0,057 \pm 0,001	0,047 \pm 0,004

Tabelle 12: Eingesetzte Serum- und Antikörperverdünnungen für die verwendeten Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Serumverdünnung	Antikörperverdünnung
HRP-anti-dog-IgM (Bethyl Inc.)	1:20	1:100000
HRP-anti-dog-IgE (Serotec)	1:5	1:50000

4.3.1.4 Austestung weiterer Sekundärantikörper

In diesem Vergleich wurden zwei weitere kommerziell erhältliche HRP-konjugierte Sekundärantikörper getestet (IgG1 und IgG2). In der Auswertung stellte sich heraus, dass trotz der unter Punkt 3.4.5.2 beschriebenen Optimierungsschritte beide Anti-dog-IgG-Antikörper zur Detektion von Anti-Progesteron-Antikörpern nicht geeignet waren ($\Delta OD < 0,07$).

4.3.2 Reproduzierbarkeit und Spezifität des ELISA

Die Intra-Assay-Varianz wurde durch den fünffachen Ansatz von vier verschiedenen Proben in einem Durchlauf für IgE bei 6,3% bzw. 4,9% für IgM (Anhang, Tabelle 19) ermittelt. Die Inter-Assay-Varianz wurde durch den Doppelsatz einer Probe auf sieben verschiedenen Platten bestimmt. Der Variationskoeffizient lag für IgE bei 12,2% bzw. 15,3% für IgM (Anhang, Tabelle 18).

Um die Kreuzreaktionen der verwendeten Serumantikörper mit Steroidhormonen zu untersuchen, wurden dem Serum Progesteron, Östradiol, Testosteron und Hydrocortison in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt.

Generell konnte für beide Antikörper erst eine Kreuzreaktion festgestellt werden, wenn die Steroidhormone in hohen Konzentrationen (0,02 mg/ml bzw. 0,2 mg/ml) zugesetzt wurden, die physiologisch nicht im Serum vorkommen (Laboklin, 2011).

Für den IgM war in den Steroid-Konzentrationen von 0,001 mg/ml – 0,1 mg/ml keine Inhibition der Antigen-Antikörperreaktion feststellbar. Im getesteten Bereich kam es erst ab einer Konzentration von 0,2 mg/ml zu einer Kreuzreaktivität mit einem Maximum bei 0,4 mg/ml.

Unter Verwendung des IgE waren Kreuzreaktionen ab einer Konzentration von 0,02 mg/ml zu beobachten. Die maximale Inhibition der Antigen-Antikörperreaktion im getesteten Bereich lag bei 0,05 mg/ml. Das Ergebnis der photometrischen Messung (OD korr.) der positiven Serumprobe wurde mit 100% angenommen. Der Zusatz von Progesteron, Testosteron, Hydrocortison und Östradiol führte zu einer maximal erreichbaren Inhibition der

Ergebnisse

Antikörperbindung an Progesteron-BSA um 51,7%, 31,3%, 8,7% und 7,8% für den IgM (Abb. 13). Unter der Verwendung des IgE war entsprechend der oben genannten Reihenfolge eine Inhibition um 49,5%, 31,2%, 10,9% bzw. 34,6% feststellbar (Abb. 12). Das Lösungsmittel Ethanol zeigte bei beiden Antikörpern nur einen geringen Einfluss (< 2%).

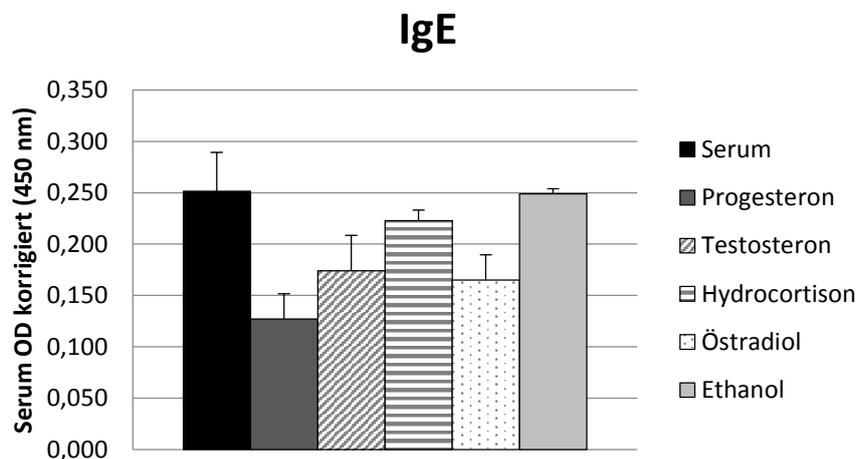


Abbildung 12: Kompetitiver ELISA zur Ermittlung der Kreuzreaktivität von IgE.

Photometrische Auswertung einer Antikörper-positiven Serumprobe für IgE nach Zugabe von Progesteron, Testosteron, Hydrocortison, Östradiol und Ethanol (0,05 mg/ml)

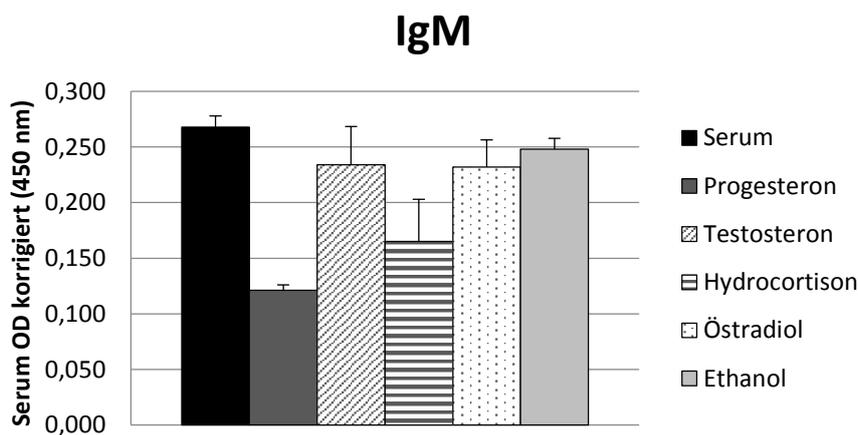


Abbildung 13: Kompetitiver ELISA zur Ermittlung der Kreuzreaktivität von IgM.

Photometrische Auswertung einer Antikörper-positiven Serumprobe für IgM nach Zugabe von Progesteron, Testosteron, Hydrocortison, Östradiol und Ethanol (0,4 mg/ml)

4.3.3 Anti-Progesteron-IgE

Mittels des selbstentwickelten ELISA konnten canine IgE-Anti-Progesteron-Antikörper im Serum von Hündinnen nachgewiesen werden (Abb. 14).

Es wurden 73 Serumproben der Kontrolltiere im ELISA gemessen. Aus der korrigierten OD wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet. Die Summe aus dem arithmetischen Mittel und der einfachen Standardabweichung wurde als Schwellenwert festgelegt (Mülverstedt, 2006). Die Analyse von 73 Blutproben der tragenden und nicht tragenden Kontrolltiere ergab keinen erhöhten Antikörpertiter (OD korr.) über den gesamten Messzeitraum. Unter Berücksichtigung des Mittelwerts dieser Kontrollproben (OD korr. $0,023 \pm 0,030$) und deren Standardabweichung wurde ein Schwellenwert bei einer Extinktion von OD korr. 0,07 festgelegt. Sechs Hündinnen zeigten erhöhte Antikörpertiter, diese lagen während der gesamten Messzeiträume über diesem Schwellenwert (Abb. 14): Hund 36: $0,151 \pm 0,053$; Hund 18: $0,147 \pm 0,016$; Hund 15: $0,113 \pm 0,038$; Hund 16: $0,188 \pm 0,066$; Hund 20: $0,131 \pm 0,028$; Hund 4: $0,237 \pm 0,013$. Diese Werte konnten in einer zweiten Messung bestätigt werden. Fünf dieser Tiere zeigten luteale Insuffizienz, ein Tier ist eine tragende Kontrollhündin (Tab. 13).

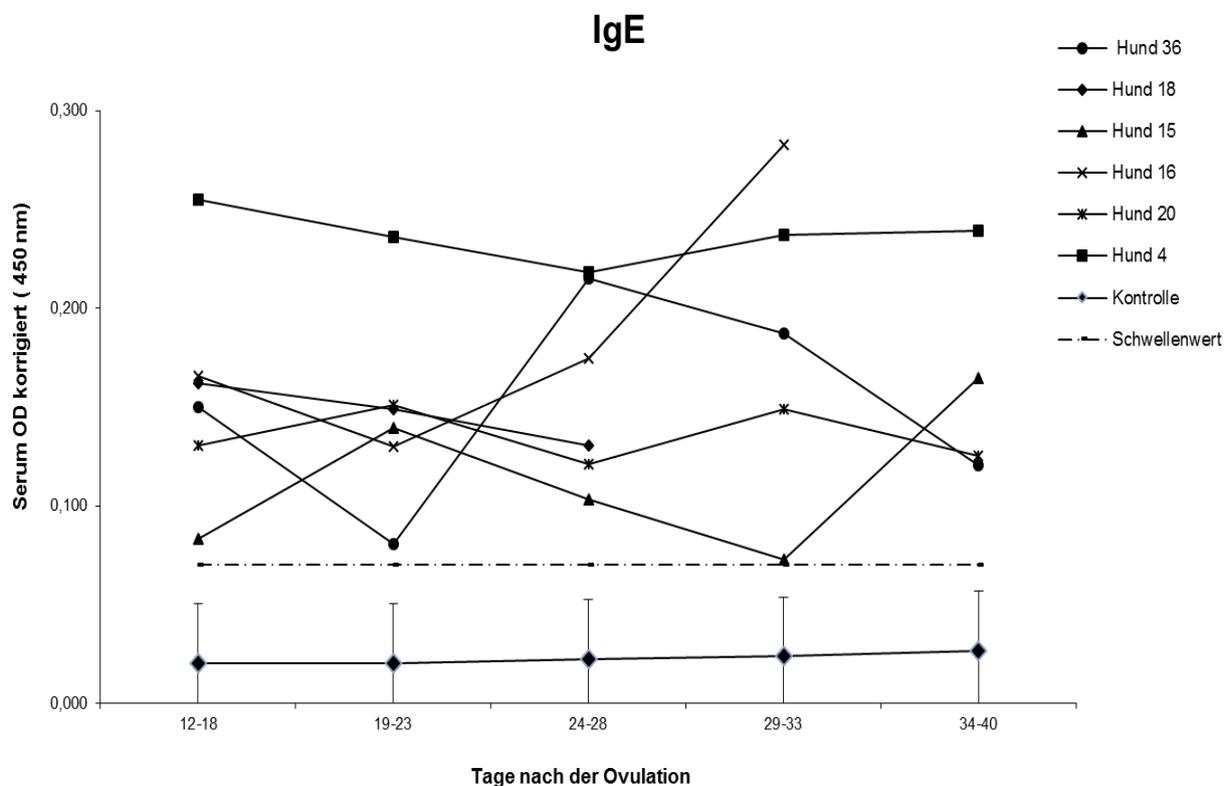


Abbildung 14: IgE-Titerverlauf der positiv getesteten Hündinnen in der Lutealphase.

Unter Berücksichtigung der Mittelwerte der Kontrollproben (n = 73, OD korr. $0,023 \pm 0,030$) und deren Standardabweichung wurde ein Schwellenwert bei einer Extinktion von OD korr. 0,07 festgelegt

Tabelle 13: Übersicht der IgE-positiven Hündinnen; Angabe des MW ± SD über den gesamten Messzeitraum

Gruppe	Tier-Nr.	Rasse	IgE-Titer (OD korr.)
1 = hypoluteid, tragend	18	RW	$0,147 \pm 0,016$
	15	RR	$0,113 \pm 0,038$
	4	DSH	$0,237 \pm 0,013$
2 = hypoluteid, nicht tragend	36	RR	$0,151 \pm 0,053$
	20	DSH	$0,131 \pm 0,028$
3 = Kontrolle, tragend	16	RW	$0,188 \pm 0,066$

4.3.4 Anti-Progesteron-IgM

Für den IgM wurde anhand des Mittelwerts der Kontrollproben und der Standardabweichung ein Schwellenwert von 0,289 berechnet. Im Serum von 14 luteal insuffizienten Hündinnen und Kontrolltieren konnten erhöhte IgM-Antikörper-Konzentrationen nachgewiesen werden (Tab. 14). Es konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den luteal insuffizienten Tieren und Kontrollhunden festgestellt werden. Jedoch zeigten häufiger tragende Hündinnen beider Gruppen einen erhöhten Antikörpertiter im Vergleich zu den nicht tragenden Tieren.

Ergebnisse

Tabelle 14: Übersicht der IgM-positiven Hündinnen; Angabe des MW \pm SD über den gesamten Messzeitraum

Gruppe	Tier-Nr.	Rasse	IgM-Titer (OD korr.)
1 = hypoluteid, tragend	3	DSH	$0,558 \pm 0,145$
	8	DSH	$0,386 \pm 0,011$
	18	RR	$0,313 \pm 0,017$
	19	DSH	$0,316 \pm 0,040$
	26	DSH	$0,316 \pm 0,051$
2 = hypoluteid, nicht tragend	14	BS	$0,464 \pm 0,034$
	17	DSH	$0,323 \pm 0,021$
3 = Kontrolle, tragend	1	DSH	$0,316 \pm 0,010$
	23	DSH	$0,363 \pm 0,061$
	25	RW	$0,467 \pm 0,106$
	27	DSH	$0,312 \pm 0,012$
	28	DSH	$0,398 \pm 0,095$
4 = Kontrolle, nicht tragend	21	DSH	$0,337 \pm 0,049$
	37	DSH	$0,318 \pm 0,016$

Ergebnisse

Zudem konnte bei neun Tieren ein Anstieg des IgM-Antikörpertiters zeitgleich zu einem Abfall der Progesteronkonzentration beobachtet werden (Abb. 15).

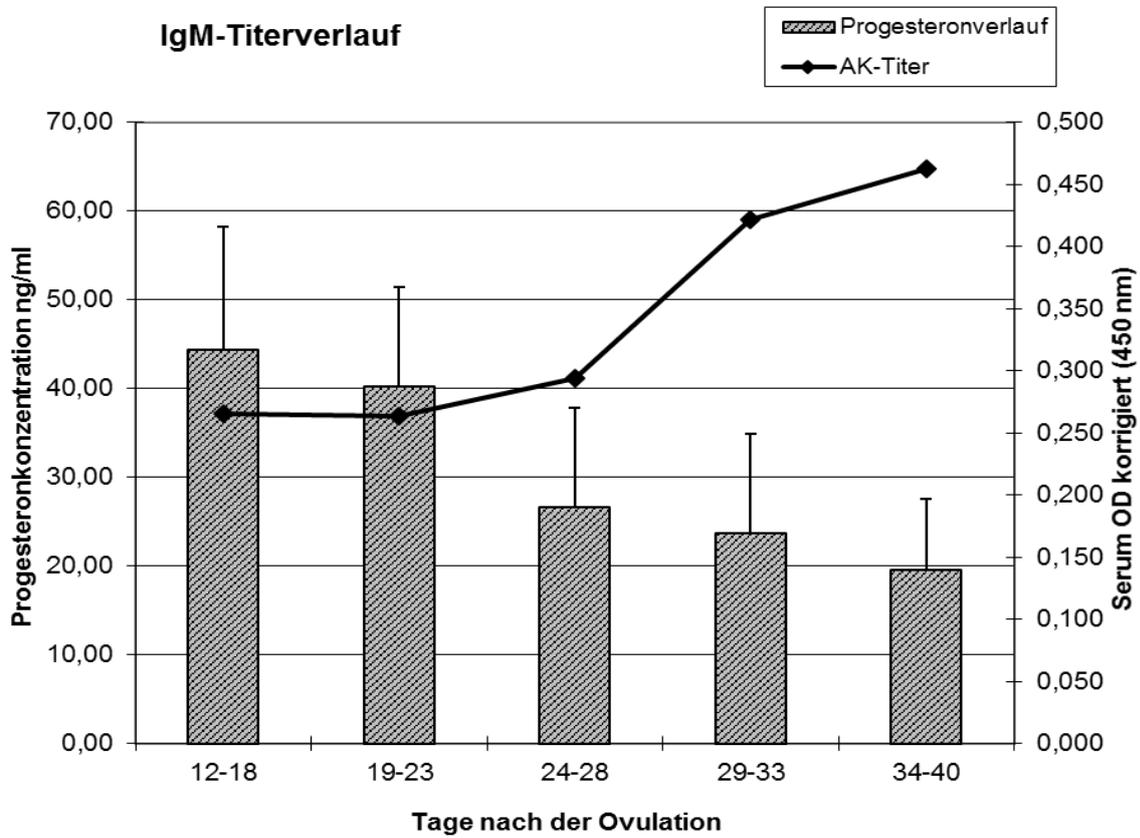


Abbildung 15: IgM-Titerverlauf (MW ± SD) im Verhältnis zur mittleren Progesteronkonzentration von neun Hündinnen

4.4 Molekularbiologische Untersuchungen

Als Grundlage für die Untersuchungen mittels Real-Time-PCR diente Gelbkörpergewebe, das im Rahmen einer Ovariohysterektomie von sechs Hündinnen (hypoluteid n = 4, Kontrolle n = 2) in der nicht tragenden Lutealphase gewonnen wurde. Im Vorfeld wurden spezifische Primer für die unterschiedlichen Gensequenzen erstellt und getestet. Die verschiedenen Primersequenzen, Annealing-Temperaturen und Fragmentgrößen sind in Tabelle 5 des Kapitels 3.3.3 aufgelistet. Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergab eine 100%ige Homologie zu den bekannten caninen mRNA Sequenzen.

Die mRNA von GAPDH und COX-1 wurde konstitutiv in einem Bereich von 14,4-24 fg/μg (GAPDH) bzw. 3,6-10,8 fg/μg (COX-1) Gesamt-RNA exprimiert. Beide Faktoren wiesen M-Werte (geNorm) von < 1,5 auf, daher wurden die in der Real-Time-PCR gemessenen Proben mit diesen Referenzgenen normalisiert.

4.4.1 Genexpression ausgewählter Parameter des Prostaglandin-Systems

Cyclooxygenase 1 (COX-1), Cyclooxygenase 2 (COX-2), Prostaglandin-E-Synthase (PGES)

Die mRNA der Cyclooxygenasen 1 und 2 konnte in allen Gewebeproben der Hündinnen nachgewiesen werden. Die COX-2 mRNA wurde im Bereich von 0,06-3,6 fg/μg Gesamt-RNA exprimiert. Es waren keine Unterschiede zwischen den luteal insuffizienten Hündinnen und Kontrolltieren festzustellen (Abb. 16), die Hündinnen 36 und 33 wiesen jedoch Unterschiede in der Expression der einzelnen Gelbkörper auf.

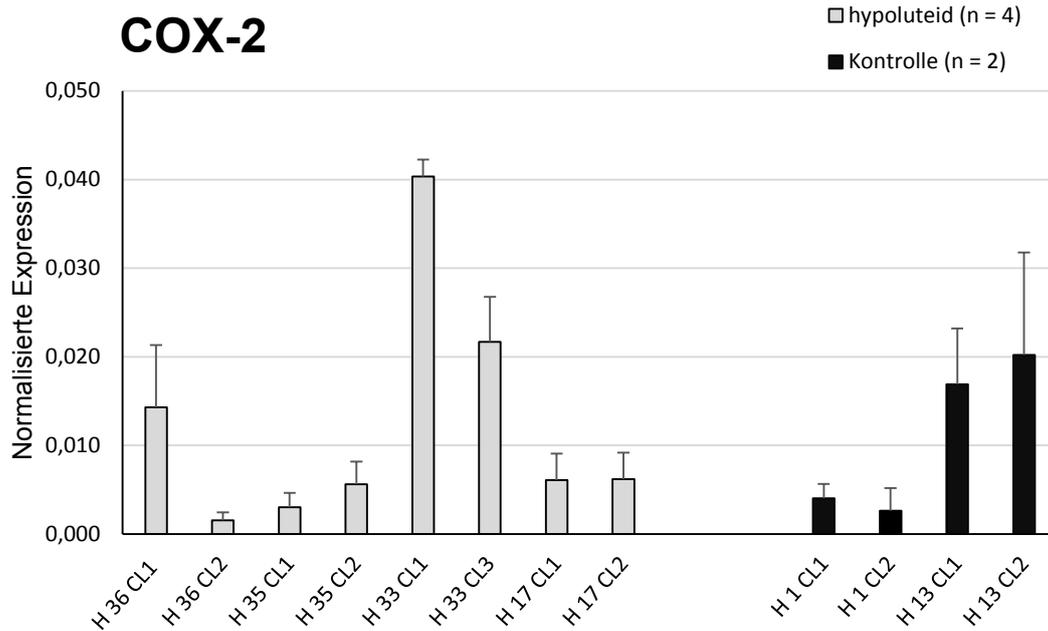


Abbildung 16: Genexpression der mRNA von COX-2 (normalisiert gegen COX-1 und GAPDH) in caninem Gelbkörpergewebe während der frühen Lutealphase, Angabe der MW \pm SD von vier Probenansätzen (zwei Probenansätze der reversen Transkriptase und zwei Probenansätze der Real-Time-PCR) pro Gelbkörper (CL) und Hund (H)

Die mRNA von PGES konnte in allen Gewebeproben nachgewiesen werden. In den Proben der Hündin 33 war der geringste Gehalt an exprimierter PGES mRNA nachzuweisen, die Hündin 17 wies Unterschiede in der Expression der einzelnen Gelbkörper auf. (Abb. 17).

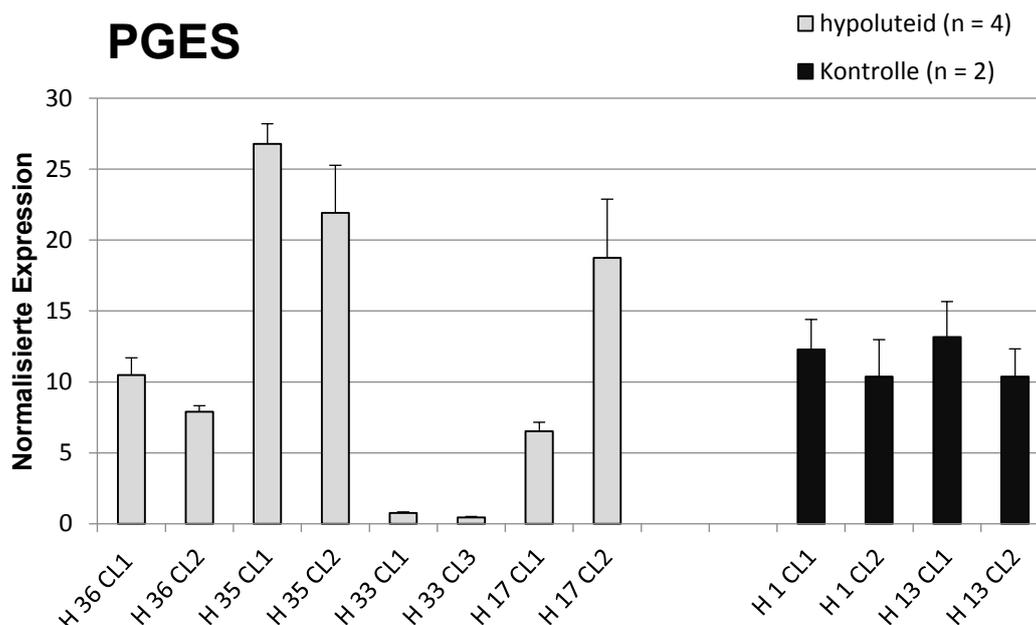


Abbildung 17: Genexpression der mRNA von PGES (normalisiert gegen COX-1 und GAPDH) in caninem Gelbkörpergewebe während der frühen Lutealphase, Angabe der MW ± SD von vier Probenansätzen (zwei Probenansätze der reversen Transkriptase und zwei Probenansätze der Real-Time-PCR) pro Gelbkörper (CL) und Hund (H)

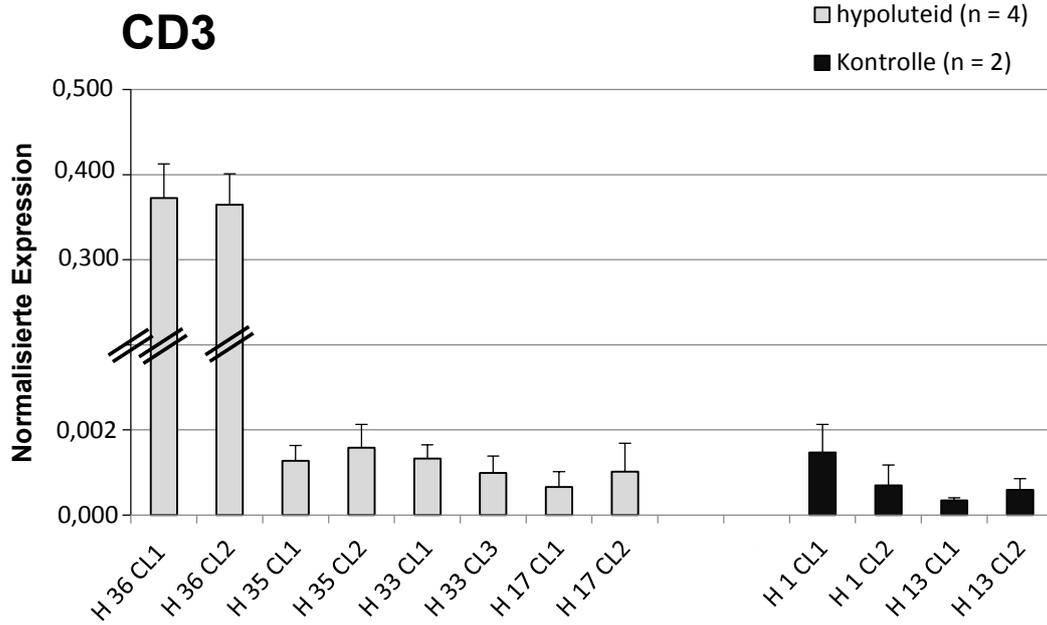
4.4.2 Genexpression immunologischer Oberflächenmoleküle

CD3, CD4, CD8, CD19 und CD25

Die Auswertung der Expressionsprofile der immunologischen Parameter ergab, dass Hündin 36 signifikant größere Mengen an mRNA der Oberflächenmoleküle CD3, CD4, CD8, CD19 und CD25 exprimierte (Abb. 18 – 22). Die mRNA von CD3, CD8 und CD19 wurde in einem Bereich von 1,2-72 fg/μg (Abb. 18, 20 und 21), CD4 in einem Bereich von 12-1008 fg/μg (Abb. 19) und CD25 in einem Bereich von 0,36-222 fg/μg Gesamt-RNA exprimiert (Abb. 22). Es lagen z.T. erhebliche Schwankungen zwischen den einzelnen Gelbkörpern der Hündinnen vor (CD8, CD19, CD25). Die Expression von CD25 war vermehrt im Gelbkörpergewebe der Hündinnen 36, 35 und 17 nachzuweisen (Abb. 22).

Ergebnisse

a)



b)

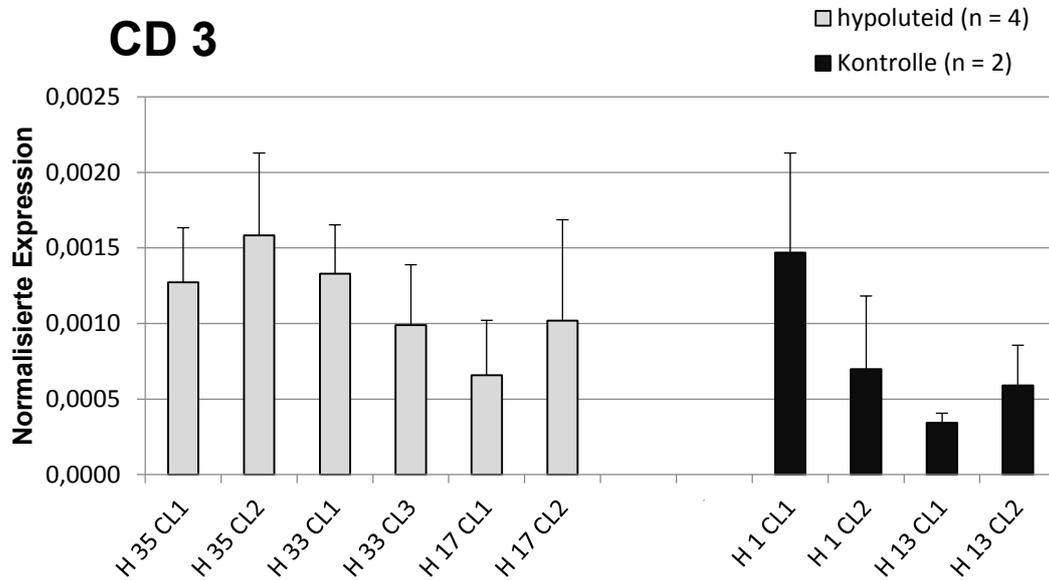
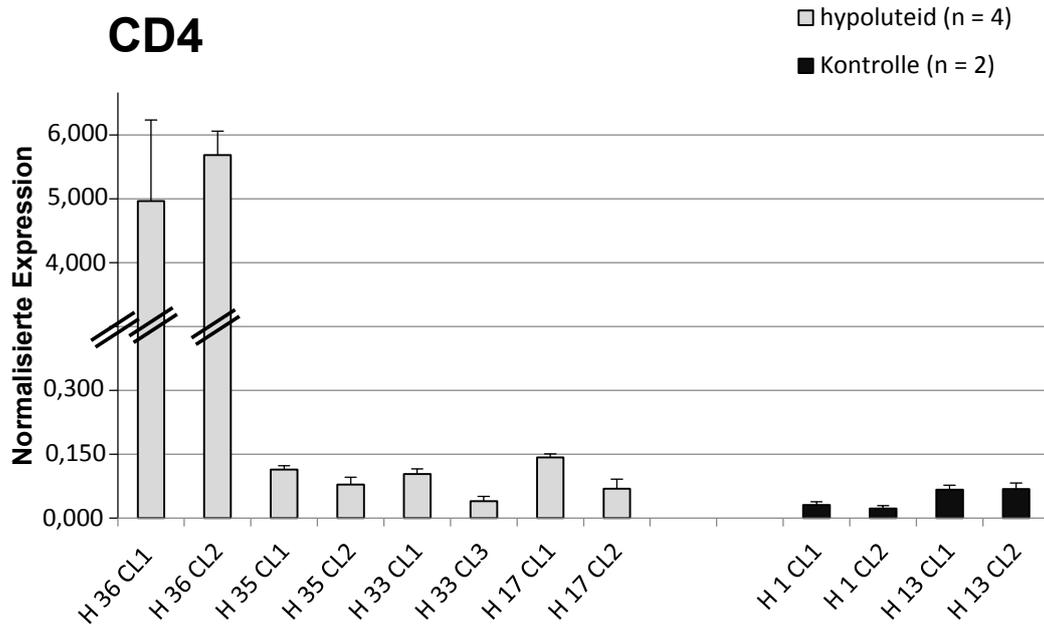


Abbildung 18: Genexpression der mRNA von CD3 (normalisiert gegen COX-1 und GAPDH) in caninem Gelbkörpergewebe während der frühen Lutealphase unter Berücksichtigung aller Tiere (a) bzw. ohne Hündin 36 (b). Angabe der MW \pm SD von vier Probenansätzen (zwei Probenansätze der reversen Transkriptase und zwei Probenansätze der Real-Time-PCR) pro Gelbkörper (CL) und Hund (H)

Ergebnisse

a)



b)

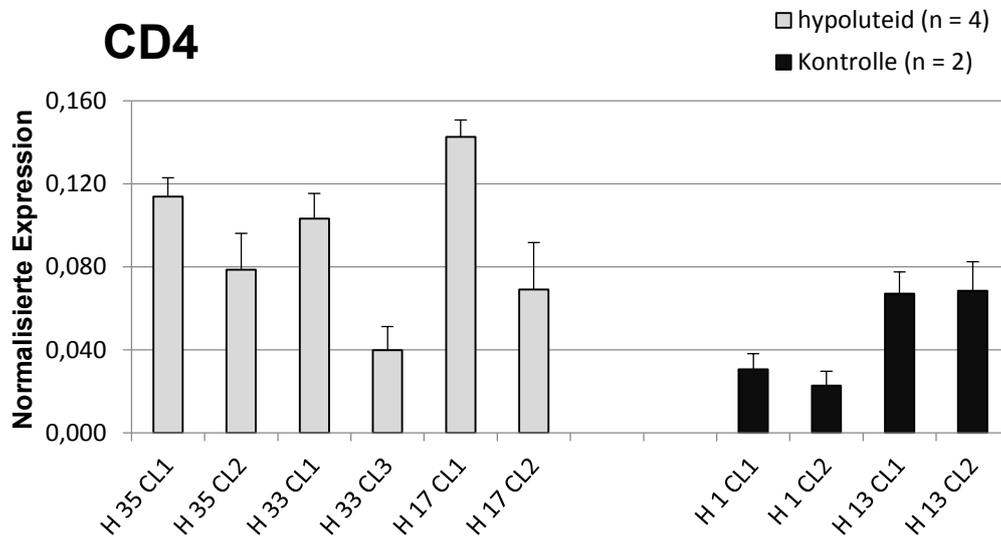


Abbildung 19: Genexpression der mRNA von CD4 (normalisiert gegen COX-1 und GAPDH) in caninem Gelbkörpergewebe während der frühen Lutealphase unter Berücksichtigung aller Tiere (a) bzw. ohne Hündin 36 (b). Angabe der MW \pm SD von vier Probenansätzen (zwei Probenansätze der reversen Transkriptase und zwei Probenansätze der Real-Time-PCR) pro Gelbkörper (CL) und Hund (H)

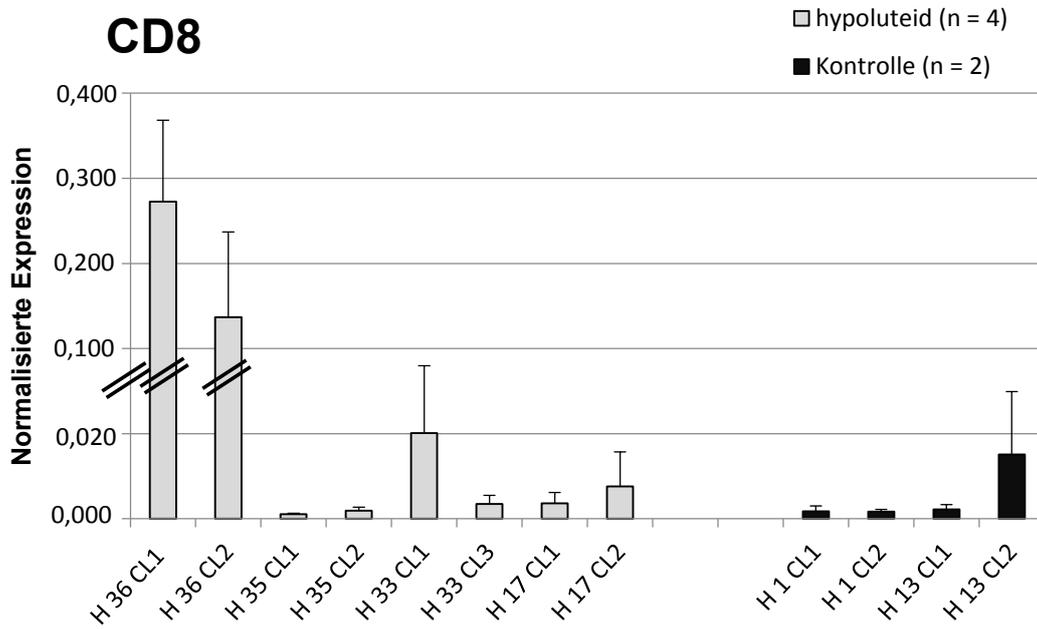
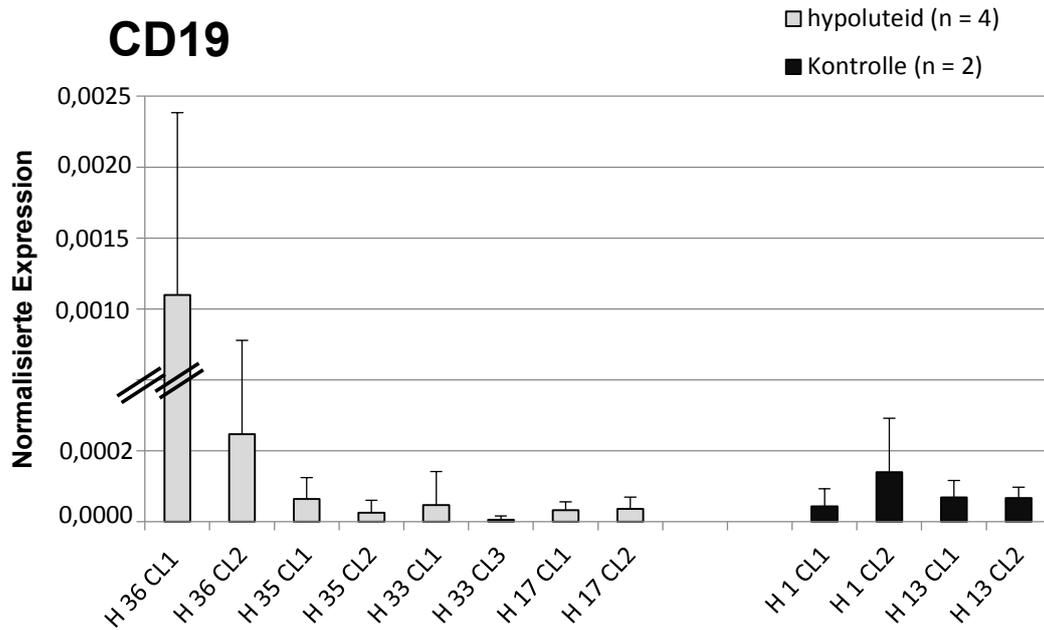


Abbildung 20: Genexpression der mRNA von CD8 (normalisiert gegen COX-1 und GAPDH) in caninem Gelbkörpergewebe während der frühen Lutealphase unter Berücksichtigung aller Tiere. Angabe der MW \pm SD von vier Probenansätzen (zwei Probenansätze der reversen Transkriptase und zwei Probenansätze der Real-Time-PCR) pro Gelbkörper (CL) und Hund (H)

a)



b)

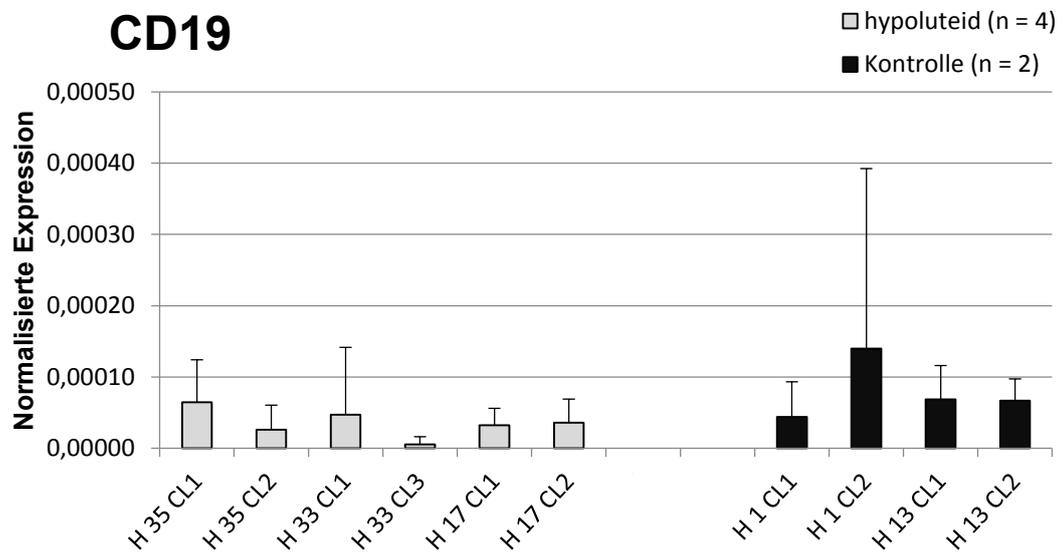


Abbildung 21: Genexpression der mRNA von CD19 (normalisiert gegen COX-1 und GAPDH) in caninem Gelbkörpergewebe während der frühen Lutealphase unter Berücksichtigung aller Tiere (a) bzw. ohne Hündin 36 (b). Angabe der MW \pm SD von vier Probenansätzen (zwei Probenansätze der reversen Transkriptase und zwei Probenansätze der Real-Time-PCR) pro Gelbkörper (CL) und Hund (H)

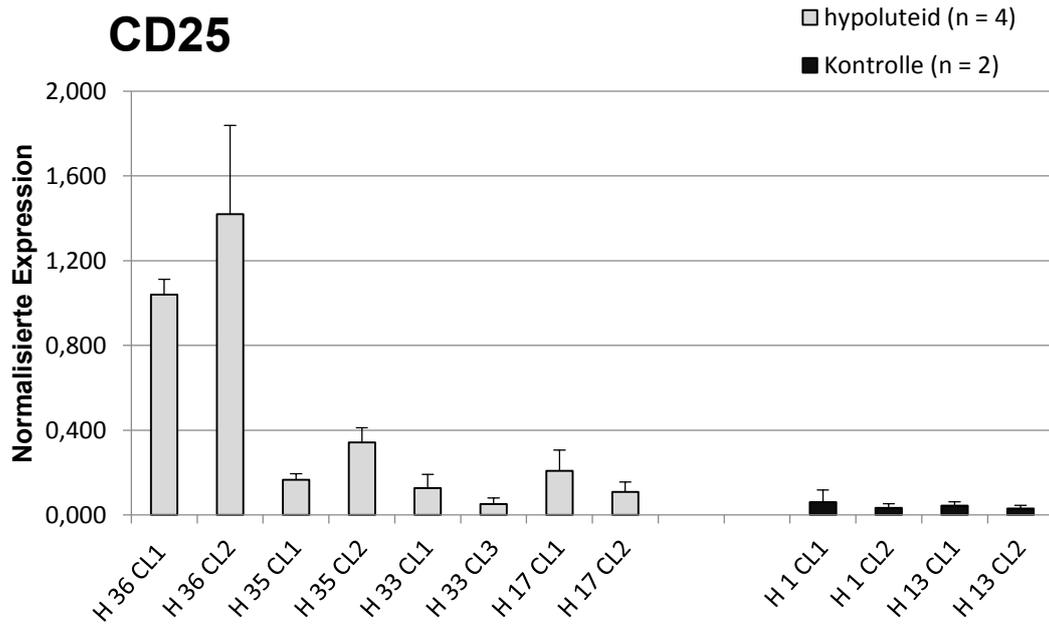


Abbildung 22: Genexpression der mRNA von CD25 (normalisiert gegen COX-1 und GAPDH) in caninem Gelbkörpergewebe während der frühen Lutealphase unter Berücksichtigung aller Tiere. Angabe der MW \pm SD von vier Probenansätzen (zwei Probenansätze der reversen Transkriptase und zwei Probenansätze der Real-Time-PCR) pro Gelbkörper (CL) und Hund (H)

5. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, die Lutealfunktion von tragenden und nicht tragenden Hündinnen zu untersuchen und erstmalig auch einen möglichen immunologischen Einfluss auf die luteale Insuffizienz in Betracht zu ziehen. Zu diesem Zweck erfolgten die serologische Auswertung bestimmter endokrinologischer und immunologischer Parameter sowie die Genexpressionsanalyse einiger ausgesuchter Parameter des Prostaglandin-Systems und immunologischer Oberflächenmoleküle von Gelbkörpergewebe ausgewählter Hündinnen. Die Analyse der genannten Parameter diente als eine erste Orientierung für weiterführende Untersuchungen. Da der Schwerpunkt in dieser Studie auf die Beobachtung möglicher immunologischer Prozesse im Gelbkörper gelegt wurde, erfolgte zunächst keine Bestimmung von Parametern der Steroid-Synthese.

5.1 Klinische Befunde und Auswahl der Tiere

Eine große Herausforderung dieser Studie bestand in der Rekrutierung einer möglichst großen Anzahl von luteal insuffizienten Tieren, was auf die schwierige Diagnosestellung der Erkrankung zurückzuführen ist. Dazu mussten alle Hündinnen umfangreich und mehrfach untersucht sowie zurückliegende Befunde anamnestisch erhoben werden, bevor eine Einteilung in die vorliegenden Gruppen möglich war. Die gewissenhafte Analyse der Trächtigkeitsverläufe im Zusammenhang mit abfallenden Progesteronkonzentrationen lässt zwar den Verdacht der Gelbkörperinsuffizienz zu, jedoch müssen sämtliche andere Ursachen, die zu einer Luteolyse führen können, ausgeschlossen werden (Root Kustritz, 2001b, Becher et al., 2010). Eine weitere Problematik besteht in der Bewertung der Progesteronkonzentration. Aufgrund unterschiedlicher Messsysteme existieren abweichende Grenzwerte. So werden in der Literatur Schwellenwerte von 2-5 ng/ml definiert, mit denen eine Trächtigkeit aufrechterhalten werden kann (Concannon und Hansel, 1977, Root Kustritz, 2001b).

Mittlerweile geht man davon aus, dass auch ein Abfall der Progesteronkonzentration von 10-15 ng/ml innerhalb von fünf Tagen in der frühen Lutealphase zu einem Trächtigkeitsverlust führen kann, auch wenn der absolute Wert über 5 ng/ml liegt (Becher et al., 2010). In der vorliegenden Studie wurden die Progesteronkonzentrationen mit einem ELFA (miniVIDAS, bioMerieux) ermittelt, der im Vergleich zu anderen Messsystemen (RIA, Chemilumineszenz) höhere Hormonkonzentrationen misst (Brugger et al., 2011, Blendinger et al., 2009). Aus diesem Grund wurde neben der Unterschreitung des Schwellenwerts von 5 ng/ml auch bei

einem plötzlichen und anhaltenden Progesteronabfall eine medikamentöse Behandlung der graviden Tiere in zehn Fällen begonnen. Die Substitution von oralem, originärem Progesteron führte zu einer Beeinflussung der gemessenen Progesteronkonzentration im Serum, ermöglichte aber auch einen erfolgreichen Trächtigkeitsverlauf von acht luteal insuffizienten Tieren und war eine Voraussetzung für die Einwilligung der Züchter zur Teilnahme an dieser Studie.

Zwar existiert die Möglichkeit der Substitution mit Medroxyprogesteronacetat, das auch eine ungestörte Beobachtung der Serumprogesteronkonzentration erlaubt (Günzel-Apel et al., 2012), jedoch ist die Behandlung in der frühen Trächtigkeit aufgrund des Risikos von genitalen Fehlbildungen der Feten kontraindiziert (Romagnoli und Concannon, 2007, Görlinger et al., 2005). Zudem scheint das Risiko von Geburtsstörungen auch bei rechtzeitigem Absetzen des Medikaments aufgrund einer verzögerten Elimination aus dem Blutkreislauf zu steigen (Günzel-Apel et al., 2012). Vor diesem Hintergrund wurde die Entscheidung getroffen, das humanmedizinische Progesteron Utrogestan® zu verwenden.

Der Vergleich der Wurfstärke von graviden insuffizienten Hündinnen zeigt erwartungsgemäß eine etwas geringere mittlere Anzahl an Welpen ($3,77 \pm 2,82$) im Vergleich zu den Kontrolltieren ($5,83 \pm 1,99$). Der Zusammenhang von lutealer Insuffizienz und geringer Wurfstärke wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Becher et al., 2010).

5.2 Endokrinologische Untersuchungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie und vergangener Untersuchungen haben gezeigt, dass hinsichtlich der Hormonkonzentrationen rassebedingte Unterschiede vorliegen (Steinetz et al., 1989). Besonders Hündinnen der Rasse Deutscher Schäferhund zeigten allgemein geringere Progesteron-, Prolaktin- und Relaxinkonzentrationen als die Vertreter anderer Rassen (Günzel-Apel et al., 2009).

Auch in dieser Studie ergab die Untersuchung der Prolaktinkonzentrationen einen signifikanten Unterschied zwischen den DSH und Hündinnen anderer Rassen, was jedoch nicht für die Progesteron- und Relaxinkonzentrationen zu beobachten war. Die Besonderheit der rassebedingten Schwankungen wurde in der statistischen Auswertung berücksichtigt, sodass im Falle des Vorliegens von starken Standardabweichungen die Deutschen Schäferhündinnen als gesonderte Gruppe betrachtet wurden.

Die tragenden luteal insuffizienten DSH wiesen im Vergleich zu den Schäferhunden aus der Kontrollgruppe signifikant höhere Prolaktinkonzentrationen auf. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den Beobachtungen, die Günzel-Apel und Mitarbeiter (2006) bei luteal insuffizienten Tieren machten. So wurde vermutet, dass die signifikant niedrigeren Prolaktin- und Relaxingehalte im Blut eine mangelnde luteotrope Unterstützung der Gelbkörper zur Folge haben und daher zu einer verminderten Progesteronsekretion führen könnte. Diese Hypothese kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Vielmehr handelt es sich bei den erhöhten Prolaktinkonzentrationen dieser Untersuchung vermutlich um eine vermehrte hypophysäre Ausschüttung infolge des Progesteronabfalls, wie sie auch physiologisch im Zusammenhang mit der Geburt bzw. Lactatio sine graviditate auftritt.

Die Auswertung der Progesteronkonzentration nicht tragender Tiere ergab signifikant niedrigere Werte der luteal insuffizienten Tiere verglichen mit den Kontrolltieren. Diese Beobachtung war auch für die DSH separat festzustellen.

Der Vergleich der tragenden insuffizienten mit den Kontrolltieren zeigte ein ähnliches Sekretionsmuster in beiden Gruppen. Dies ist auf eine Beeinflussung durch das exogene Progesteron zurückzuführen, welches zu einem künstlichen Anstieg der Progesteronkonzentration im Serum der tragenden insuffizienten Tiere beiträgt.

Das Peptidhormon Relaxin wird ebenfalls als möglicher luteotroper Faktor diskutiert (Verhagen, 2002) und in der Literatur als Marker für die plazentare Integrität beschrieben (Steinetz et al., 1989). In der vorliegenden Studie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der tragenden Tiere festgestellt werden. Erwartungsgemäß zeigten die tragenden Hündinnen jedoch höhere Hormonkonzentrationen als die nicht tragenden Tiere. Dieser Unterschied war ab dem 29. Tag p.ov. signifikant, wobei keine Unterschiede zwischen den Rassen zu beobachten waren.

Tibold und Thuróczy (2009) konnten keine Unterschiede in den LH-Konzentrationen im Serum von luteal insuffizienten und gesunden Hündinnen unterschiedlicher Rassen beobachten. Aus diesem Grund wurde auf die Bestimmung von LH in dieser Studie zunächst verzichtet.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der vorliegenden Studie der Progesteronabfall der erkrankten Hündinnen nicht auf eine mangelnde Sekretion luteotroper Hormone zurückzuführen war.

5.3 Immunologische Untersuchungen des Serums

Neben dem Einfluss luteotroper Hormone auf die Gelbkörperinsuffizienz lag ein weiterer Schwerpunkt dieser Studie in der Untersuchung bestimmter immunologischer Parameter. Antikörper gegen Progesteron und Östrogen konnten bisher im Zusammenhang mit der Autoimmunen Progesterondermatitis und frühzeitiger Fruchtresorption bei der Frau nachgewiesen werden (Roby et al., 2006). Zum ersten Mal sollte das Serum von Hündinnen auf ein Vorkommen von Progesteron-Antikörpern untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein Immunglobulin-spezifischer ELISA entwickelt und optimiert. Der Ablauf des entwickelten Assaysystems erfolgte in Anlehnung an das Protokoll der humanmedizinischen Untersuchung von Roby und Mitarbeitern (2006), welches auf der Bindung potentieller im Serum befindlicher Immunglobuline an immobilisiertes Progesteron-BSA beruht.

5.3.1 Entwicklung und Optimierung des ELISA

Die Entwicklung und Optimierung des Assays erfolgte unter Verwendung von gepooltem Serum aus den Proben der luteal insuffizienten Tiere. Dieser Probenpool wurde in den Untersuchungsdurchläufen auf jeder Platte als studieninterner Standard mitgeführt. Dadurch sollte eine Vergleichbarkeit der Proben auf verschiedenen Platten gewährleistet werden. Dennoch muss festgehalten werden, dass eine absolute Quantifizierung der Ergebnisse durch dieses Verfahren nicht möglich ist. Zu diesem Zweck hätten Antikörper aus dem Blut einer positiven Hündin gereinigt, quantifiziert und in definierten Konzentrationen als Standard auf den Platten mitgeführt werden müssen.

Bei allen Arten von Immunoassays kann der Nachweis des Antikörpers durch Störeffekte beeinflusst werden. Sehr häufig treten Kreuzreaktivitäten, unspezifische Bindungen und Matrixeffekte auf, die durch die Optimierung der Beschichtung und des Blockierens vermindert werden können (Rauch et al., 2005). In der vorliegenden Untersuchung wurde die Mikrotiterplatte zu jeweils einer Hälfte mit Progesteron-BSA bzw. BSA beschichtet. Zwar konnten verschiedene Beschichtungspuffer und BSA-Typen getestet und miteinander verglichen werden, Progesteron-BSA jedoch war nur von einer Firma kommerziell erhältlich. Die eigene Herstellung von Progesteron-BSA ist mit erheblichem Aufwand verbunden, was z.B. eine ausgefeilte Kopplungschemie (Gruppenaktivierung, Spacer, veränderte Immunogenität etc.) erforderlich macht, gefolgt von umfangreicher Validierung und Qualitätssicherung des Konjugats. Aufgrund dessen wurde auf eine Eigensynthese als Alternative verzichtet. Während der Blockierung wurden sieben verschiedene Puffer miteinander verglichen, die zu

sehr unterschiedlichen Ergebnissen führten. So konnten die unspezifischen Bindungen am effektivsten durch die Verwendung von selbst hergestellten Pufferlösungen verhindert werden, jedoch stellte die geringe Haltbarkeit ein Problem dar. Da eine gute Reproduzierbarkeit des Assays anzustreben war, wurde die Nutzung eines kommerziellen Blockierungspuffers bevorzugt.

Die Verwendung eines polyklonalen Sekundärantikörpers kann ebenfalls zu Unspezifität durch Kreuzreaktionen im Assaysystem führen (Rauch et al., 2005). Polyklonale Antikörper entstammen unterschiedlichen B-Zellen und binden an verschiedene Epitope des Zielantigens. Dies erhöht zwar zum einen die Trefferquote, bringt aber den Nachteil mit sich, dass die Antikörper auch mit anderen Epitopen interagieren (Luttmann et al., 2009). Diese Kreuzreaktionen können möglicherweise die Extinktionen verfälschen. Monoklonale Sekundärantikörper hingegen entstammen Klonen einer einzigen B-Zelle und interagieren demnach nur mit einem Epitop des Zielantigens (Janeway und Travers, 1997). Zum Zeitpunkt der Entwicklung und Optimierung des ELISA waren nur polyklonale konjugierte Sekundärantikörper gegen canine Immunglobuline kommerziell erhältlich. Um die Kreuzreaktivität der Serumantikörper mit verschiedenen Steroidhormonen einzuschätzen, wurden Progesteron, Östradiol, Testosteron und Hydrocortison dem Serum zugesetzt. Es konnte festgestellt werden, dass der Zusatz von Steroiden erst in unphysiologisch hohen Konzentrationen zu einer Kreuzreaktivität der Serumantikörper führte, wie es auch in der humanmedizinischen Untersuchung von Roby und Mitarbeitern (2006) beobachtet wurde. Dies betraf auch die Tatsache, dass Progesteron überraschenderweise in hohen Konzentrationen zugesetzt werden musste, um einen Einfluss auf die Antigen-Antikörper-Bindung feststellen zu können. Als Ursache kann möglicherweise eine geringere Affinität von synthetischem Progesteron im Vergleich zu endogenen Progesteronmetaboliten angenommen werden. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, dass diese Metaboliten biologisch aktiv sind und eine hohe immunologische Potenz besitzen (Schoenemakers et al., 1992). In einer anderen Untersuchung wird die Möglichkeit erwähnt, dass die Bindung von Progesteron an Transportproteine, wie Albumin oder Transferrin, im Serum über die Aktivierung von Th2-Zellen eine Antikörpersynthese zur Folge haben könnte (Roby et al., 2006). Ob dieser Komplex gleichzeitig der Bindungsort für die zirkulierenden Antikörper sein könnte, ist nicht bekannt, könnte jedoch aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie angenommen werden, da die Antikörper im Assaysystem bevorzugt an das Progesteron-BSA binden. Es kann vermutet werden, dass hier eine immunologische Reaktion gegen einen Progesteron-Protein-Komplex vorliegt.

5.3.2 Progesteron-Antikörper

In dieser Arbeit ist es erstmalig gelungen, Antikörper gegen Progesteron beim Hund nachzuweisen. Sechs Hündinnen zeigten einen erhöhten IgE-Titer, der während der gesamten Messzeiträume über dem Schwellenwert der ODKorr. lag. Da IgE-Antikörper im zirkulierenden Blutkreislauf der Tiere eine kurze Halbwertszeit von zwei Tagen aufweisen (Tizard, 2009), kann durch die Intervalle der Blutabnahme im fünftägigen Abstand von einer sich ständig erneuernden Antikörperbildung ausgegangen werden. Fünf Tiere sind den luteal insuffizienten Gruppen (1 und 3) zuzuordnen. Demnach könnte bei 20% der erkrankten Tiere die Antikörperproduktion gegen Progesteron als Ursache für die Fruchtbarkeitsprobleme angenommen werden.

Einen erhöhten IgM-Titer hingegen wiesen 14 Tiere auf, die jedoch sowohl unter den erkrankten als auch unter den Kontrolltieren zu finden waren. Demnach kann kein Zusammenhang zwischen der IgM-Sekretion und einer lutealen Insuffizienz festgestellt werden. Auffällig war jedoch, dass 10 der 14 Tiere tragend waren. Zwar ist in der Trächtigkeit aufgrund der Zunahme des Blutvolumens häufig eine Erniedrigung des Gesamtproteingehalts festzustellen, dennoch kommt es physiologisch zu einem Anstieg der α - und β -Globulinfraction im Serum (Boguth, 1954), wie es auch beim Menschen beobachtet wird (Gleiss und Röttger, 1951). Leider liegen nach Kenntnis der Autorin keine neueren Untersuchungen dazu vor. Der erhöhte IgM-Titer könnte demnach entweder auf eine vermehrte immunologische Aktivität in der Gravidität oder auf eine Kreuzreaktivität der Sekundärantikörper mit anderen Proteinen im Serum der tragenden Tiere zurückzuführen sein. Zudem wurde bei neun Tieren zeitgleich zum Abfall der Progesteronkonzentration ein Anstieg des IgM-Titers beobachtet. Dieser mögliche Zusammenhang sollte in weiterführenden Untersuchungen berücksichtigt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Antikörper gegen Progesteron von Hündinnen unterschiedlicher Rassen gebildet werden können. Der in dieser Studie entwickelte IgE-Nachweis ist geeignet, um mögliche Antikörper gegen Progesteron-BSA-Komplexe im Zusammenhang mit lutealer Insuffizienz nachzuweisen. Die im ELISA verwendeten polyklonalen Sekundärantikörper IgG sind zur Detektion von Antikörpern gegen Progesteron im Serum von Hündinnen ungeeignet. Hierzu müssten weitere Sekundärantikörper getestet werden, um das Assay-System weiter zu optimieren und validieren.

5.4 Molekularbiologische Untersuchungen

Bisherige Untersuchungen konnten zeigen, dass das canine Corpus luteum in der Anbildungsphase eine starke Resistenz gegenüber luteolytischen Einflüssen aufweist, was auf ein vermindertes Vorkommen von PGF₂ α -Rezeptoren zurückzuführen ist (Kowalewski et al., 2008b). Andererseits sind aber auch keine Auswirkungen auf die Sekretion des Gelbkörpers durch eine Hypophysektomie in der frühen Lutealphase zu beobachten (Okkens et al., 1986, Concannon et al., 1987). Vielmehr scheinen Prostaglandine in der Anbildungsphase einen luteotropen Effekt auszuüben. Kowalewski et al. konnten zeigen, dass PGE₂ in der frühen Lutealphase eine ähnliche luteotrope Bedeutung wie LH beigemessen werden kann, indem es die Expression des StAR-Proteins in den Granulosazellen erhöht (Kowalewski et al., 2013). Der luteotrope Effekt der hypophysären Hormone LH und Prolaktin gewinnt erst ab dem zweiten Drittel der Lutealphase an Bedeutung (Onclin et al., 1993, Onclin et al., 2000). Eine Besonderheit des caninen Zyklus besteht in der Tatsache der lutealen Regression bzw. Luteolyse trotz Anwesenheit der luteotropen Hormone Prolaktin und LH. Man könnte annehmen, dass vermehrt luteale Prostaglandine in Zusammenhang mit der Regression auftreten. Jedoch konnte gezeigt werden, dass sie eher in der Anbildung und weniger am Ende der Lebensdauer des Corpus luteum eine Rolle spielen (Luz et al., 2006, Kowalewski et al., 2009). Lediglich kurz vor der Geburt wird die luteale Regression durch uteroplazentares PGF₂ α unterbrochen und die präpartale Luteolyse eingeleitet.

Ziel der in dieser Studie durchgeführten molekularbiologischen Untersuchung war es, die Gelbkörper von Hündinnen mit einer gestörten lutealen Funktion hinsichtlich der Expression ausgewählter Parameter des Prostaglandin-Systems zu untersuchen. Darüber hinaus sollte erstmalig die Genexpression von Oberflächenantigenen in caninem Gelbkörpergewebe bestimmt werden. Aufgrund der kleinen Probenanzahl sind die Ergebnisse als explorativ und nicht repräsentativ anzusehen.

5.4.1 Genexpression ausgewählter Parameter des Prostaglandin-Systems

Zur Untersuchung der Genexpression der Enzyme COX-1, COX-2 und PGES wurden die entsprechenden Transkripte im Gelbkörpergewebe von vier luteal insuffizienten sowie zwei Kontrolltieren mittels RT-qPCR bestimmt.

Die hier ausgewählten Cyclooxygenasen 1 und 2 sind wichtige Schlüsselenzyme der Prostaglandin-Synthese. COX-1 wird in den meisten Geweben als konstitutives Enzym

beschrieben (Kniss, 1999, Kowalewski et al., 2006). Jedoch konnte in verschiedenen Spezies und Zellarten bereits nachgewiesen werden, dass COX-1 durch Wachstumsfaktoren, Hormone oder Interleukine induziert werden kann (Morita, 2002). Auch in bovinen Oviduktzellen zeigt die COX-1-mRNA-Expression eine starke Regulation im Zyklusverlauf (Oda et al., 2006). Untersuchungen von Gelbkörpern gesunder Hündinnen zeigten, dass mRNA von COX-1 und COX-2 in allen Phasen des Metöstrus nachgewiesen werden konnte. Während COX-1 am geringsten fünf Tage nach der Ovulation, danach aber konstant in größeren Mengen exprimiert wurde, konnte für die Expression von COX-2 eine eindeutige Zyklusabhängigkeit bestätigt werden. So wird COX-2 am höchsten in der Anbildungsphase der Gelbkörper exprimiert, um ab Tag 15 abzufallen und in geringen Mengen bis zum 65. Tag nach der Ovulation vorzuliegen (Kowalewski et al., 2006). COX-1 und COX-2 konnten ebenfalls im Corpus luteum der sechs untersuchten Tiere nachgewiesen werden, jedoch waren keine Unterschiede zwischen den luteal insuffizienten und Kontrolltieren festzustellen. Es konnten allerdings Abweichungen zwischen den einzelnen Gelbkörpern der erkrankten Tiere 36 und 33 festgestellt werden. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass sich die verschiedenen Corpora lutea eines Tieres ein wenig in ihrem Reifegrad unterscheiden, da die Ovulationen nicht alle zeitgleich stattfinden (Johnston et al., 2001). So könnte die unterschiedliche Expressionsmenge auf strukturelle Umbauprozesse im Funktionskörper hinweisen.

Das luteotrope Prostaglandin PGE_2 wird durch die Prostaglandin-E-Synthase (PGES) aus PGH_2 synthetisiert. Untersuchungen von Gelbkörpern gesunder Hündinnen konnten zeigen, dass die frühe luteale Phase mit einer starken Expression von PGES einhergeht (Kowalewski et al., 2008a). Man nimmt daher an, dass PGE_2 direkt im Corpus luteum synthetisiert wird und über autokrine Mechanismen den luteotropen Effekt ausübt. Die Expression von PGES mRNA konnte ebenfalls in den untersuchten Gewebeproben nachgewiesen werden. Im Vergleich lagen stärkere Schwankungen bei den erkrankten Hündinnen vor und es konnten Abweichungen zwischen den Gelbkörpern der Hündin 17 beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die untersuchten Parameter des Prostaglandin-Systems in gleichem Ausmaß in den Gelbkörpern der untersuchten luteal insuffizienten Hündinnen nachzuweisen waren, wie es bereits in der Literatur für gesunde Tiere beschrieben wurde. In der vorliegenden Studie konnte kein Unterschied zwischen den Tieren der luteal insuffizienten und Kontrollgruppe festgestellt werden. Es ist zu beachten, dass der Nachweis von Gentranskripten im Gewebe nicht mit einer tatsächlichen Enzymaktivität gleichgesetzt werden darf, dennoch kann vermutet werden, dass die luteale Insuffizienz der untersuchten

Hündinnen nicht auf einer Störung des Prostaglandin-Systems beruht. Die Berücksichtigung der unterschiedlichen Gelbkörper eines Tieres ergab stärkere Abweichungen in der Genexpression von COX-2 und PGES bei den erkrankten Tieren, wenngleich hinsichtlich der geringen Anzahl von Tieren die Ergebnisse vorsichtig zu interpretieren sind. Dieser Aspekt sollte in weiterführenden Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Tieren untersucht werden, möglichst in Kombination mit einer histologischen Untersuchung des Gelbkörpergewebes, um strukturelle Unterschiede feststellen zu können. Resultierend aus den Ergebnissen bedeutet dies für das methodische Vorgehen bei der Probenentnahme, dass die einzelnen Corpora lutea eines Tieres vor der Genexpressionsanalyse gepoolt werden müssten und nicht der einzelne Gelbkörper stellvertretend für alle Funktionskörper analysiert werden darf.

5.4.2 Genexpression immunologischer Oberflächenmoleküle

Zur Untersuchung der immunologischen Oberflächenmoleküle erfolgte die Analyse der mRNA-Expression von CD3, CD4, CD8, CD19 und CD25.

Bezüglich der Erfassung der mRNA-Expression der Oberflächenmoleküle CD3, CD4, CD8 und CD25 war zu beobachten, dass die Gewebeproben der Hündin 36 eine deutlich höhere Expression aufwiesen als die Proben der restlichen Tiere. Die luteal insuffiziente Hündin war das einzige Tier mit einem deutlich erhöhten Anti-Progesteron-IgE-Titer und zeigte in der vorausgegangenen untersuchten Trächtigkeit eine Resorption von fünf Fruchtanlagen trotz Progesteronsubstitution und engmaschiger Kontrolle. Bei einigen Tieren konnten ebenfalls Schwankungen in der Expression der einzelnen Gelbkörper beobachtet werden (CD8, CD19 und CD25). Während CD3, CD4 und CD8 vorwiegend auf der Oberfläche von T-Helferzellen bzw. zytotoxischen T-Lymphozyten vorkommen, ist CD25 auf der Oberfläche von regulatorischen T-Zellen (T-Suppressorzellen) zu finden, die die Aufgabe haben, autoimmune Vorgänge zu unterdrücken und so die Selbsttoleranz aufrechtzuerhalten. Neben CD25 exprimieren sie CD4 auf ihrer Oberfläche und vermitteln über die Sekretion von IL-4, IL-10 und TGF β die regulatorischen Effektorfunktionen (Tizard 2009). CD4+CD25+Treg-Zellen wurden bisher im Ovar bzw. im Corpus luteum von Kühen, Mäusen und Frauen gefunden (Poole und Pate, 2012, Robertson, 2012). Man erklärt sich das Vorkommen in der Vermeidung einer autoimmunen Reaktion gegen die Zona-pellucida-Proteine der Oozyten. Zum anderen aber scheinen diese regulatorischen Zellen ebenfalls von entscheidender Bedeutung bei der Anbildung und dem Untergang der Gelbkörper zu sein. So schützen sie einerseits das Gewebe

vor autoimmunen Reaktionen gegen die Antigene der Oozyten nach der Ovulation, andererseits sind sie nach Umwandlung in Th-17-Zellen in der Lage, durch Luteolyse den Gelbkörper zu zerstören (Robertson, 2012). Treg-Zellen spielen demnach sowohl in der Toleranz fetaler Antigene als auch in der Kontrolle der steroidogenen Funktion von Gelbkörpern eine wichtige Rolle.

In der vorliegenden Untersuchung ist es erstmalig gelungen, die Genexpression von CD25 mRNA auch im caninen Corpus luteum nachzuweisen, was auf ein Vorkommen von Treg-Zellen hinweisen könnte. Interessanterweise konnte auch bei den anderen drei Tieren der luteal insuffizienten Gruppe im Vergleich zu den beiden Kontrolltieren tendenziell eine erhöhte Expression von CD25 mRNA festgestellt werden. Dies deutet womöglich auf eine immunologische Gegenregulation von schützenden CD4⁺CD25⁺Treg-Zellen infolge autoimmuner Prozesse im Corpus luteum hin. Zur Untersuchung dieser Hypothese müsste jedoch eine größere Anzahl an Proben erkrankter und Kontrolltiere analysiert werden. In diesem Zusammenhang wäre möglicherweise die Bestimmung der Expression des Proteins FoxP3 interessant, da es von Treg-Zellen in der Trächtigkeit synthetisiert wird und die Th1-Antwort der T-Lymphozyten blockiert und über diesen Weg die immunologische Regulation unterstützt (Tizard, 2009). Die immunhistochemische Darstellung von z.B. CD25-Protein in fixiertem Gewebematerial könnte in diesem Zusammenhang einen weiteren direkten Nachweis von Treg-Zellen im caninen Corpus luteum ermöglichen und deren Vorkommen weiter bestätigen.

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie konnte festgestellt werden, dass der Progesteronabfall der luteal insuffizienten Hündinnen nicht auf eine mangelnde Sekretion der luteotropen Hormone Prolaktin bzw. Relaxin zurückzuführen ist. Auch in dieser Studie konnte ein signifikanter Unterschied in den Prolaktinkonzentrationen von DSH und Hündinnen anderer Rassen festgestellt werden, was jedoch nicht für die Progesteron- und Relaxinkonzentrationen zu beobachten war.

Die immunologische Untersuchung des Serums konnte erstmalig eine Beteiligung immunologischer Prozesse im Zusammenhang mit dem Erkrankungsbild des Hypoluteinismus aufdecken. So ist es gelungen, Antikörper gegen Progesteron-Protein-Komplexe im Serum von Hündinnen unterschiedlicher Rassen nachzuweisen. Der IgE-Nachweis ist geeignet, um

mögliche pathologische Immunreaktionen gegen Progesteron im Zusammenhang mit lutealer Insuffizienz nachzuweisen.

Die untersuchten Parameter des Prostaglandin-Systems konnten in gleichem Ausmaß in den Gelbkörpern der untersuchten luteal insuffizienten Hündinnen nachgewiesen werden, wie es bereits in der Literatur für gesunde Tiere beschrieben wurde. Es konnte kein Unterschied zwischen den luteal insuffizienten Tieren und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Berücksichtigung der unterschiedlichen Gelbkörper eines Tieres ergab stärkere Abweichungen in der Genexpression von COX-2 und PGES bei den erkrankten Tieren, wengleich hinsichtlich der geringen Anzahl von Tieren die Ergebnisse vorsichtig zu interpretieren sind. Dieser Aspekt weist möglicherweise auf strukturelle Unterschiede in den Corpora lutea hin und sollte in Kombination mit histologischen Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Tieren untersucht werden. Trotz Berücksichtigung der Tatsache, dass die Genexpression nicht mit der tatsächlichen Enzymaktivität gleichzusetzen ist, lässt sich vermuten, dass die Ursache für luteale Insuffizienz nicht in einer Störung des Prostaglandin-Systems zu finden ist.

In der vorliegenden Untersuchung ist es zum ersten Mal gelungen, die Genexpression von CD25 mRNA auch im caninen Corpus luteum zu bestätigen, was möglicherweise auf ein Vorkommen von Treg-Zellen hinweist. Die Analyse der Genexpression der immunologischen Oberflächenmoleküle ergab eine deutlich erhöhte Expression von CD3, CD4, CD8 und CD25 bei einem IgE-positiven Tier. Auch im Gelbkörpergewebe der anderen drei luteal insuffizienten Tiere konnte tendenziell eine erhöhte Expression von CD25 mRNA nachgewiesen werden.

Für weiterführende immunologische Untersuchungen sollte der Fokus auf die Herstellung geeigneter Antikörper gelegt werden. Einerseits ist in diesem Zusammenhang die Aufreinigung von Anti-Progesteron-Antikörpern aus dem Blut erkrankter Tiere interessant. Um andererseits eine mögliche Kreuzreaktivität im Assaysystem zu minimieren, sollten zusätzlich Domänen-spezifische monoklonale konjugierte Sekundärantikörper zum Einsatz kommen.

Zur Aufklärung des Mechanismus der Antikörperbildung könnte zusätzlich die zelluläre Immunantwort untersucht werden. Unter Verwendung eines ELISpot-Assays konnte eine vermehrte IFN- γ -Produktion von T-Lymphozyten einer an APD erkrankten Frau nach Provokation durch Progesteron nachgewiesen werden (Cristaudo et al., 2007). In diesem Zusammenhang wäre zu überprüfen, ob das verwendete Untersuchungsprotokoll auch auf canines Probenmaterial anzuwenden ist. Nach Optimierung des ELISA-Systems, insbesondere zum Nachweis von Anti-Progesteron-IgG und -IgM, könnte die Seroprävalenz in prädisponierten Rassepopulationen überprüft werden. Interessant wäre ebenfalls eine

Untersuchung der Seroprävalenz von Antikörpern in anderen Spezies (Pferd, Rind), da hier häufig exogene Gestagene (Altrenogest, Regumate® bzw. Progesteron in der PRID®-Spirale) therapeutisch zur Behandlung einer lutealen Insuffizienz bzw. Zyklusmanipulation verwendet werden und dies als mögliche Ursache für die Antikörperentstehung diskutiert wird (Roby et al., 2006). Zur Überprüfung der Hypothese, dass verstärkte autoreaktive Prozesse im Corpus luteum mit dem Hypoluteinismus in Zusammenhang stehen, sind weitere Untersuchungen des Expressionsprofils von immunologischen Oberflächenmolekülen, aber auch, wie aktuell in der Literatur diskutiert, FoxP3 in Gelbkörpern an einer größeren Anzahl von Tieren notwendig (Robertson, 2012). Dabei sollten insbesondere die serologischen Befunde für die Auswahl der Tiere berücksichtigt werden. Bei einer weiterführenden Transkript-Untersuchung wichtiger lokaler Parameter sollten immer auch unterschiedliche Gelbkörper eines Tieres berücksichtigt und verglichen werden. Bestätigen sich die in dieser Arbeit gefundenen, auffälligen Expressionsunterschiede, muss dies beim methodischen Vorgehen und der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden.

Gewebeuntersuchungen mittels Western-Blot und Immunhistochemie ermöglichen den direkten Proteinnachweis, sodass genauere Aussagen über das Vorkommen von spezifischen Lymphozyten im Gelbkörpergewebe erkrankter und gesunder Hündinnen getroffen werden können.

Die vorliegende Studie zeigt, dass weder eine Sekretionsstörung luteotroper Hormone, noch eine Abweichung der Genexpression des Prostaglandin-Systems mit dem Hypoluteinismus der untersuchten Hündinnen in Zusammenhang gebracht werden konnten. Es wurden jedoch erstmalig bei einem Teil der erkrankten Tiere autoreaktive Prozesse als Ursache lutealer Insuffizienz nachgewiesen. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Studie neue Möglichkeiten in der Methodik der schwierigen Diagnostik des Hypoluteinismus erwarten. Der Nachweis von Anti-Progesteron-Antikörpern aber auch möglicherweise CD25+ Lymphozyten im Vollblut potenziell erkrankter Tiere ermöglichen eine Sicherung der Diagnose und schaffen Klarheit für Tierarzt und Besitzer im Falle ungeklärter Fruchtbarkeitsstörungen. Weitere Untersuchungen zur Optimierung der Tests und zu deren prädiktivem Wert sollten folgen.

6. Zusammenfassung

Endokrinologische und immunologische Untersuchungen zur lutealen Insuffizienz der Hündin

Die luteale Insuffizienz ist charakterisiert durch einen frühzeitigen Abfall des trächtigkeitserhaltenden Hormons Progesteron während der Lutealphase. Die Erkrankung des Hypoluteinismus wird als mögliche Ursache für Trächtigkeitsstörungen von Hündinnen diskutiert, die resorbieren, abortieren oder ihre Welpen zu früh gebären und keinerlei Anzeichen sichtbarer Infektionen aufweisen. Meist treten diese Komplikationen erst ab der zweiten Trächtigkeit in Zusammenhang mit einer individuellen Verkürzung des Läufigkeitsintervalls auf. Die Ursachen dieser Erkrankung sind bisher nicht geklärt. Untersuchungen anderer Spezies weisen jedoch auf einen immunologischen Einfluss in der physiologischen Lutealphase hin.

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Hypoluteinismus der Hündin endokrinologisch zu untersuchen und in diesem Zusammenhang auch immunologische Parameter in diesem Zusammenhang zu berücksichtigen. Dazu erfolgte eine Bestimmung der Hormonkonzentrationen von Progesteron, Prolaktin und Relaxin im Serum von 20 luteal insuffizienten Hündinnen und 18 Kontrolltieren zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten in der frühen Lutealphase. Es wurden tragende und nicht tragende Tiere unterschiedlicher Rassen einbezogen. Zur Detektion von caninen Antikörpern gegen Progesteron wurde ein ELISA entwickelt und optimiert, um die Serumproben hinsichtlich ihrer Prävalenz von Anti-Progesteron-IgE und -IgM zu untersuchen. In einem dritten Untersuchungsabschnitt wurde im Rahmen einer Ovariohysterektomie Gelbkörpergewebe von vier luteal insuffizienten und zwei Kontrollhündinnen entnommen und die Genexpression ausgewählter Parameter des Prostaglandin-Systems sowie immunologischer Oberflächenmoleküle mittels Real-Time-PCR bestimmt.

Es zeigte sich, dass der Progesteronabfall der luteal insuffizienten Hündinnen nicht auf eine mangelnde Sekretion der luteotropen Hormone Prolaktin bzw. Relaxin zurückzuführen war. Durch die Analyse der Genexpression bestimmter Parameter des Prostaglandin-Systems im Gelbkörpergewebe konnte kein Unterschied zwischen den luteal insuffizienten Hündinnen und Kontrolltieren beobachtet werden. Vielmehr konnte erstmalig eine mögliche Beteiligung immunologischer Prozesse im Zusammenhang mit dem Erkrankungsbild des Hypoluteinismus bestätigt werden. Es ist gelungen, Antikörper gegen Progesteron-Protein-Komplexe im Serum

von Hündinnen unterschiedlicher Rassen nachzuweisen. Der IgE-Nachweis ist geeignet, um mögliche Antikörper gegen Progesteron im Zusammenhang mit lutealer Insuffizienz festzustellen.

In der vorliegenden Untersuchung konnte zum ersten Mal die Genexpression von CD25 mRNA auch im caninen Corpus luteum bestätigt werden, was möglicherweise auf ein Vorkommen von regulatorischen T-Zellen hinweist. Die Analyse der Genexpression der immunologischen Oberflächenmoleküle ergab eine deutlich erhöhte Expression von CD3, CD4, CD8 und CD25 bei einem IgE-positiven Tier. Eine tendenziell erhöhte Expression von CD25 mRNA konnte auch bei den anderen drei Tieren der luteal insuffizienten Gruppe im Vergleich zu den beiden Kontrolltieren festgestellt werden. Die Berücksichtigung der unterschiedlichen Gelbkörper in der Untersuchung ergab eine abweichende Genexpression der Parameter COX-2, PGES, CD8, CD19 und CD25 bei einigen Tieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass weder eine Sekretionsstörung luteotroper Hormone, noch eine Abweichung der Genexpression des Prostaglandin-Systems als Ursache für den Hypoluteinismus der untersuchten Tiere bestätigt werden konnte. Erstmalig ist es jedoch gelungen, bei einem Teil der erkrankten Tiere autoreaktive Prozesse in Zusammenhang mit lutealer Insuffizienz nachzuweisen. Die bisherigen Untersuchungen dienen als Grundlage für die Optimierung von Assay-Systemen zur Detektion von Autoimmunreaktionen in Zusammenhang mit Fruchtbarkeitsstörungen und können zu einer verbesserten Diagnostik beitragen.

7. Summary

Luteal insufficiency in the bitch - investigation of endocrine and immunological parameters

Luteal insufficiency is characterized by a premature decrease of serum progesterone concentration and pregnancy loss during the luteal phase. Hypoluteoidism is discussed as a possible cause of pregnancy loss in dogs that resorb, abort, or whelp prematurely without visible infectious or non-infectious abnormalities of the pregnancy. Luteal insufficiency in the bitch usually first occurs during the second pregnancy and is accompanied by individual shortening of the estrous cycle and unnoticed resorption within the early stage of gestation. The reasons for hypoluteoidism still remained unclear. Interestingly, antibodies against progesterone and estrogen were found in the sera of women with autoimmune progesterone dermatitis and lymphocytes could be found in the corpora lutea of different species.

The aim of this study was to investigate the concentration of progesterone, prolactin, and relaxin in hypoluteoid bitches and control animals in the early luteal phase in pregnancy and the nonpregnant-cycle. Moreover, canine antibodies against progesterone were analyzed regarding a possible connection between embryonic loss associated with hormone changes related to a hormone antibody response. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed and optimized in this regard. Serum samples from 20 short-cycling bitches and 18 control animals were examined particularly in regard to the prevalence of IgE and IgM against progesterone. As another part of this investigation, tissue samples from the corpora lutea of four luteal insufficient and two control animals were collected during ovariohysterectomy. The expression of selected parameters of the prostaglandin system and accordingly immunological cell surface molecules was assessed by Real Time PCR.

The results show that the progesterone decline was not associated with a lack of the luteotropic hormones prolactin and relaxin. The expression of the parameters from the prostaglandin system did not differ between the luteal insufficient and control group. Moreover, a possible influence of the immune system on the disturbed luteal function could be demonstrated in this study. Antibodies against progesterone could be detected in the sera of bitches for the first time. The analysis of IgE seems to be most suitable to detect canine anti-progesterone antibodies in connection with luteal insufficiency. Furthermore, the expression of CD25 mRNA could be

Summary

detected also in the canine ovary and may indicate the presence of regulatory T-cells in the corpus luteum. The analysis of the additional immunological cell surface molecules showed a high expression of CD3, CD4, CD8 and CD25 in the bitch with IgE antibodies against progesterone. A higher expression of CD25 in all luteal insufficient bitches could be observed as a general tendency in comparison to the control animals.

The presented data show that neither a disturbed secretion of luteotrophic hormones nor a dysfunction in gene expression of the prostaglandin system were causally related to luteal insufficiency of the examined bitches. However, an autoreactive process could be identified in connection with hypoluteoidism for the first time. This preliminary research may act as a base for optimized assay systems to detect autoimmune reaction in connection with fertility problems and could lead to a reduction in diagnostic errors.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau von IgG	21
Abbildung 2: Antigenpräsentation über MHC-I- und MHC-II-Proteine	24
Abbildung 3: Direkter ELISA zum Nachweis von Anti-Progesteron-Antikörpern	45
Abbildung 4: ELISA-Entwicklung und Optimierung	47
Abbildung 5: Abbildung der spezifischen RT-PCR-Produkte (COX-2) einer Gradienten-PCR mittels eines 2%-DNA-Agarosegels mit Ethidiumbromid zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur.....	50
Abbildung 6: Mittlere Anzahl (\pm SD) der lebend geborenen Welpen am Ende des untersuchten Trächtigkeitszeitraums	52
Abbildung 7: Progesteronkonzentrationen (\pm SD) nicht tragender Hündinnen in der Lutealphase. * $P < 0.05$ zwischen Gruppe 2 und Gruppe 4 in den ersten drei Zeiträumen	53
Abbildung 8: Progesteronkonzentrationen (\pm SD) tragender Hündinnen in der Lutealphase .	54
Abbildung 9: Progesteronkonzentrationen (\pm SD) tragender und nicht tragender Deutscher Schäfer-hündinnen verglichen mit Hündinnen anderer Rassen in der Lutealphase.....	55
Abbildung 10: Prolaktinkonzentrationen (\pm SD) tragender und nicht tragender Deutscher Schäfer-hündinnen verglichen mit Hündinnen anderer Rassen in der Lutealphase. * $P < 0.05$ zwischen DSH und Hündinnen anderer Rassen zu den angegebenen Zeiträumen	56
Abbildung 11: Prolaktinkonzentrationen (\pm SD) Deutscher Schäferhündinnen in der Lutealphase. * $P < 0.05$ zwischen DSH der Gruppen 1 und 3 im dritten Zeitraum.....	57
Abbildung 12: Kompetitiver ELISA zur Ermittlung der Kreuzreaktivität von IgE.	64
Abbildung 13: Kompetitiver ELISA zur Ermittlung der Kreuzreaktivität von IgM.....	64
Abbildung 14: IgE-Titerverlauf der positiv getesteten Hündinnen in der Lutealphase.	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 15: IgM-Titerverlauf (MW \pm SD) im Verhältnis zur mittleren Progesteronkonzentration von neun Hündinnen	68
Abbildung 16: Genexpression der mRNA von COX-2 (normalisiert gegen COX-1 und GAPDH) in caninem Gelbkörpergewebe während der frühen Lutealphase, Angabe der MW \pm SD von vier Probenansätzen (zwei Probenansätze der reversen Transkriptase und zwei Probenansätze der Real-Time-PCR) pro Gelbkörper (CL) und Hund (H).....	70
Abbildung 17: Genexpression der mRNA von PGES (normalisiert gegen COX-1 und GAPDH) in caninem Gelbkörpergewebe während der frühen Lutealphase, Angabe der MW \pm SD von vier Probenansätzen (zwei Probenansätze der reversen Transkriptase und zwei Probenansätze der Real-Time-PCR) pro Gelbkörper (CL) und Hund (H).....	71
Abbildung 18: Genexpression der mRNA von CD3 (normalisiert gegen COX-1 und GAPDH) in caninem Gelbkörpergewebe während der frühen Lutealphase unter Berücksichtigung aller Tiere (a) bzw. ohne Hündin 36 (b). Angabe der MW \pm SD von vier Probenansätzen (zwei Probenansätze der reversen Transkriptase und zwei Probenansätze der Real-Time-PCR) pro Gelbkörper (CL) und Hund (H)	72
Abbildung 19: Genexpression der mRNA von CD4 (normalisiert gegen COX-1 und GAPDH) in caninem Gelbkörpergewebe während der frühen Lutealphase unter Berücksichtigung aller Tiere (a) bzw. ohne Hündin 36 (b). Angabe der MW \pm SD von vier Probenansätzen (zwei Probenansätze der reversen Transkriptase und zwei Probenansätze der Real-Time-PCR) pro Gelbkörper (CL) und Hund (H)	73
Abbildung 20: Genexpression der mRNA von CD8 (normalisiert gegen COX-1 und GAPDH) in caninem Gelbkörpergewebe während der frühen Lutealphase unter Berücksichtigung aller Tiere. Angabe der MW \pm SD von vier Probenansätzen (zwei Probenansätze der reversen Transkriptase und zwei Probenansätze der Real-Time-PCR) pro Gelbkörper (CL) und Hund (H)	74
Abbildung 21: Genexpression der mRNA von CD19 (normalisiert gegen COX-1 und GAPDH) in caninem Gelbkörpergewebe während der frühen Lutealphase unter Berücksichtigung aller Tiere (a) bzw. ohne Hündin 36 (b). Angabe der MW \pm SD von vier Probenansätzen (zwei Probenansätze der reversen Transkriptase und zwei Probenansätze der Real-Time-PCR) pro Gelbkörper (CL) und Hund (H)	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 22: Genexpression der mRNA von CD25 (normalisiert gegen COX-1 und GAPDH) in caninem Gelbkörpergewebe während der frühen Lutealphase unter Berücksichtigung aller Tiere. Angabe der MW \pm SD von vier Probenansätzen (zwei Probenansätze der reversen Transkriptase und zwei Probenansätze der Real-Time-PCR) pro Gelbkörper (CL) und Hund (H)	76
Abbildung 23: Photometrische Auswertung einer positiven Serumprobe unter Verwendung verschiedener Beschichtungspuffer (IgE-Titer, OD korr. 450 nm)	119

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einfluss von Interleukinen auf B-Zellen	19
Tabelle 2: Zusammensetzung der Studienpopulation.....	33
Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien	34
Tabelle 4: Liste der verwendeten Reagenzien.....	36
Tabelle 5: Sequenzen der verwendeten PCR-Primer sowie zugehörige Annealing-Temperaturen und Transkriptgrößen	38
Tabelle 6: Liste der verwendeten Kits	39
Tabelle 7: Liste der hergestellten Lösungen.....	39
Tabelle 8: Hündinnen, an denen eine Ovariohysterektomie durchgeführt wurde	42
Tabelle 9: Temperaturprogramm für die Real-Time-PCR.....	50
Tabelle 10: Vergleich verschiedener Blockierungsreagenzien.....	61
Tabelle 11: Photometrische Auswertung des Versuchs zur Ermittlung der optimalen Verdünnung des Serums und der Sekundärantikörper IgM (a) und IgE (b). Angabe der korrigierten OD \pm SD.....	62
Tabelle 12: Eingesetzte Serum- und Antikörperverdünnungen für die verwendeten Sekundärantikörper	63
Tabelle 13: Übersicht der IgE-positiven Hündinnen; Angabe des MW \pm SD über den gesamten Messzeitraum	66
Tabelle 14: Übersicht der IgM-positiven Hündinnen; Angabe des MW \pm SD über den gesamten Messzeitraum	67
Tabelle 15: Einzeldaten der erkrankten Tiere.....	117
Tabelle 16: Einzeldaten der Kontrolltiere	118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 17: Photometrische Auswertung (IgM-Titer, OD korr. 450 nm) nach Zugabe von BSA zur Antikörperverdünnungslösung	119
Tabelle 18: Berechnung der Inter-Assay-Varianz für IgE und IgM (Angabe in OD korr.)....	120
Tabelle 19: Berechnung der Intra-Assay-Varianz für IgE und IgM (Angabe in OD korr.)....	120
Tabelle 20: Einzeldaten der Studienpopulation unter Berücksichtigung der bakteriologischen Untersuchung	121

10. Literaturverzeichnis

ADAMS, G. P., KASTELIC, J. P., BERGFELT, D. R. & GINTHER, O. J. (1987):
Effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare.

J Reprod Fertil Suppl, 35, 445-454

ADELMAN, M. K. & MARCHALONIS, J. J. (2002):
Endogenous retroviruses in systemic lupus erythematosus: candidate lupus viruses.

Clin Immunol, 102, 107-116

ALLEN, W. R. (2001):
Luteal Deficiency and Embryo Mortality in the Mare.

Reprod Domest Anim, 36, 121-131

ALLEN, W. R., WILSHER, S., MORRIS, L., CROWHURST, J. S., HILLYER, M. H. & NEAL, H. N. (2006):

Laparoscopic application of PGE₂ to re-establish oviducal patency and fertility in infertile mares: a preliminary study.

Equine Vet J, 38, 454-459

ANDERSEN, A. N., HERTZ, J., KJER, J. J., ESKILDSEN, P. C., LARSEN, P. S., SVENSTRUP, B., NIELSEN, J. & ARENDS, J. (1980):

Ovarian and placental hormones during prolactin suppression and stimulation in early human pregnancy.

Clin Endocrinol, 13, 151-155

ANDERSEN, C. A. & SIMPSON, M. E. (1973):
The Ovary and Reproductive Cycle of the dog (Beagle)

Verlag Geron-X Inc., Los Altos, California, USA

ANDO, N., GORAI, I., HIRABUKI, T., ONOSE, R., HIRAHARA, F. & MINAGUCHI, H. (1992):

Prolactin disorders in patients with habitual abortion.

Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi, 44, 650-656

ANDRIC, S. A., ZIVADINOVIC, D., GONZALEZ-IGLESIAS, A. E., LACHOWICZ, A., TOMIĆ, M. & STOJILKOVIC, S. S. (2005):

Endothelin-induced, Long Lasting, and Ca²⁺ Influx-independent Blockade of Intrinsic Secretion in Pituitary Cells by Gz Subunits.

J Biol Chem, 280, 26896-26903

ARCK, P. , HANSEN, P. J. , MULAC JERICJEVIC, B. , PICCINI, M. P. & SZEKERES-BARTHO, J. (2007):

Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress.

Am J Reprod Immunol, 58, 268-279

AUCI, D. L., KLEINER, G. I., CHICE, S. M., DUKOR, P. & DURKIN, H. G. (1993):
Control of IgE responses. III. IL-6 and IFN-alpha are isotype-specific regulators of peak BPO-specific IgE antibody-forming cell responses in mice.
Clin Immunol Immunopathol, 66, 219-224

BAGNELL, C. A., STEINETZ, B. G. & BARTOL, F. F. (2009):
Milk-Borne Relaxin and the Lactocrine Hypothesis for Maternal Programming of Neonatal Tissues.
Ann N Y Acad Sci, 1160, 152-157

BALL, B. A. (2011):
Embryonic death in mares.
In: MCKINNON, A. O., SQUIRES, E. L., VAALA, W. E. & VARNER, D. D. (Hrsg.);
Equine Reproduction. 2. Aufl. Wiley-Blackwell Verlag, West Sussex, UK, 517-527

BALL, B. A., HILLMAN, R. B. & WOODS, G. L. (1987):
Survival of equine embryos transferred to normal and subfertile mares.
Theriogenology, 28, 167-174

BALL, B. A., LITTLE, T. V., HILLMAN, R. B. & WOODS, G. L. (1986):
Pregnancy rates at Days 2 and 14 and estimated embryonic loss rates prior to day 14 in normal and subfertile mares.
Theriogenology, 26, 611-619.

BALL, B. A., LITTLE, T. V., WEBER, J. A. & WOODS, G. L. (1989):
Survival of Day-4 embryos from young, normal mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares.
J Reprod Fertil, 85, 187-194

BAPTIST, A. P. & BALDWIN, J. L. (2004):
Autoimmune progesterone dermatitis in a patient with endometriosis: case report and review of the literature.
Clin Mol Allergy, 2, 10-13

BECHER, A., WEHREND, A. & GOERICKE-PESCH, S. (2010):
Luteale Insuffizienz bei der Hündin – Symptome, Diagnose, Folgen und Therapie. Eine Übersicht der Literatur.
Tierärztl Prax, 38, 389-396

BEN-JONATHAN, N. (1985):
Dopamine: A Prolactin-Inhibiting Hormone.
Endocr Rev, 6, 564-589

BERNASCONI, N. L., TRAGGIAI, E. & LANZAVECCHIA, A. (2002):
Maintenance of Serological Memory by Polyclonal Activation of Human Memory B Cells.
Science, 298, 2199-2202

BESTE, N. (2008):
Untersuchungen zum Einfluss exogener Gestagengaben auf die Lutealphase und Gravidität normozyklischer Hündinnen unter besonderer Berücksichtigung der Hormone Progesteron, Prolaktin und Relaxin. *Dissertation*, Tierärztliche Hochschule Hannover

- BLENDINGER, K., FAILING, K. & LEIDINGER, K. (2009):
Progesteronbestimmung beim Hund - Ein Methodenvergleich.
Arbeitsgruppe Reproduktionsmedizin in der Hundezucht e.V., www.agrh.de
- BOGUTH, W. (1954):
Papiererelektrophoretische Serumuntersuchungen bei Haussäugetieren.
Zentralbl Veterinaermed, 1, 311-329
- BOLE-FEYSOT, C., GOFFIN, V., EDERY, M., BINART, N. & KELLY, P. A. (1998):
Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice.
Endocr Rev, 19, 225-268
- BOLLWEIN, H. (2013):
Low progesterone levels-A cause for low fertility in dairy cattle?
Reprod Biol, 13, 2
- BOSMAN, G. J., WILLEKENS, F. L. & WERRE, J. M. (2005):
Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis?
Cell Physiol Biochem, 16, 1-8
- BOUCHARD, G. F., SOLORZANO, N., CONCANNON, P. W., YOUNGQUIST, R. S. & BIERSCHWAL, C. J. (1991):
Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and ELISA for progesterone.
Theriogenology, 35, 603-611
- BOYSE, E. A. & OLD, L. J. (1969):
Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics.
Ann Rev Genet, 3, 269-290
- BRADENT, T. D., KING, M. E., ODDE, K. G. & NISWENDER, G. D. (1989):
Development of preovulatory follicles expected to form short-lived corpora lutea in beef cows.
J Reprod Fertil, 85, 97-104
- BRECKWOLDT, M. & KECK, C. (2003):
Pathophysiologie der Ovarialfunktion.
In: DUDDENHAUSEN, J. W., SCHNEIDER, H. P. G. & BASTERT, G. (Hrsg.);
Frauenheilkunde und Geburtshilfe. 2 Aufl. Verlag Walter de Gruyter GmbH und Co KG, Berlin, 17-22
- BRUGGER, N., OTZDORFF, C., WALTER, B., HOFFMANN, B. & BRAUN, B. (2011):
Quantitative Determination of Progesterone (P4) in Canine Blood Serum Using an Enzyme-linked Fluorescent Assay.
Reprod Domest Anim, 46, 870-873
- BUFF, S. (2004):
Luteal insufficiency and abortion.
Proceedings of the 4th EVSSAR congress, 2004 Barcelona, Spain. European Veterinary Society for Small Animal Reproduction, www.evssar.org

- BUNCK, C., FROIN, H. & GÜNZEL-APEL, A. (2002):
Erfahrungen mit einem kommerziellen Relaxin-Assay zum Trächtigkeitsnachweis beim Hund.
Kleintierpraxis, 47, 5-10
- BURMESTER, G.-R. & PEZZUTTO, A. (1998):
Taschenatlas der Immunologie. 1. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- BUSSEN, S., SÜTTERLIN, M. & STECK, T. (1999):
Endocrine abnormalities during the follicular phase in women with recurrent spontaneous abortion.
Hum Reprod, 14, 18-20
- CARTER, R. H. & FEARON, D. T. (1992):
CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes.
Science, 256, 105-107
- COBBOLD, S. & METCALFE, S. (1994):
Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: Summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW).
Tissue Antigens, 43, 137-154
- COHN, M. (2005):
Degeneracy, mimicry and crossreactivity in immune recognition.
Moll Immunol, 42, 651-655
- CONCANNON, P. W., HANSEL, W. & VISEK, W. J. (1975):
The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone.
Biol Reprod, 13, 112-121
- CONCANNON, P. W. & HANSEL, W. (1977):
Prostaglandin F₂α induced luteolysis, hypothermia, and abortions in beagle bitches.
Prostaglandins, 13, 533-542
- CONCANNON, P. W., HANSEL, W. & MCENTEE, K. (1977a):
Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch.
Biol Reprod, 17, 604-613
- CONCANNON, P. W., POWERS, M. E., HOLDER, W. & HANSEL, W. (1977b):
Pregnancy and parturition in the bitch.
Biol Reprod, 16, 517-526
- CONCANNON, P. W. (1987):
Reproduction in dog and cat.
In: CUPPS, P. T. (Hrsg.);
Reproduction in Domestic Animals. 3. Aufl. Verlag Academic Press Inc., San Diego, California, USA
- CONCANNON, P. W., WEINSTEIN, P., WHALEY, S. & FRANK, D. (1987a):
Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and by bromocriptine.
J Reprod Fertil, 81, 175-180

- CONCANNON, P. W., MCCANN, J. P. & TEMPLE, M. (1989):
Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog.
J Reprod Fertil Suppl, 39, 3-25
- CONCANNON, P. W. (1991):
Reproduction in the Dog and Cat.
In: PERRY, T. C. (Hrsg.);
Reproduction in Domestic Animals. 4. Aufl. Verlag Academic Press Inc., San Diego, California, USA
- CONCANNON, P. W. (2009):
Endocrinologic Control of Normal Canine Ovarian Function.
Reprod Domest Anim, 44, 3-15
- CRISTAUDO, A., BORDIGNON, V., PALAMARA, F., DE ROCCO, M., PIETRAVALLE, M. & PICARDO, M. (2007):
Progesterone sensitive Interferon-gamma producing cells detected by ELISpot assay in autoimmune progesterone dermatitis.
Clin Exp Dermatol, 32, 439-441
- DEL POZO, E., WYSS, H., TOLLIS, G., ALCANIZ, J., CAMPANA, A. & NAFTOLIN, F. (1979):
Prolactin and deficient luteal function.
Obstet Gynecol, 53, 282-286
- DIMITROV, J. D., PLANCHAIS, C., ROUMENINA, L. T., VASSILEV, T. L., KAVERI, S. V. & LACROIX-DESMAZES, S. (2013):
Antibody polyreactivity in health and disease: statu variabilis.
J Immunol, 191, 993-999
- DÖCKE, F. (1994):
Gravidität, Geburt und Puerperium.
In: F.DÖCKE (Hrsg.);
Veterinärmedizinische Endokrinologie. 3 Aufl. Fischer Verlag, Stuttgart
- DRAEHMPAEHL, D. (1992):
Morphologische und immunologische Untersuchungen zur Oo- und Spermio-genese bei Meerschweinchen, Zwergziegen, Schweinen und Rindern.
Habilitationsschrift, Humboldt Universität Berlin
- DSCHIETZIG, T. & STANGL, K. (2003):
Relaxin: a pregnancy hormone as central player of body fluid and circulation homeostasis.
Cell Mol Life Sci, 60, 688-700
- EILTS, B. E. (1992):
Pregnancy maintenance in the bitch using Regumate.
Proc Annu Meet Soc Theriogenology, 144-147

EINSPANIER, A., NUBBEMEYER, R., SCHLOTE, S., SCHUMACHER, M., IVELL, M.R., FUHRMANN, K. AND MARTEN, A. (1999):

Relaxin in the Marmoset Monkey: Secretion Pattern in the Ovarian Cycle and Early Pregnancy
Biol Reprod, 61, 512-520

EINSPANIER, A., BUNCK, C., SALPIGTIDOU, P., MARTEN, A., FUHRMANN, K., HOPPEN, H. O. & GUNZEL-APEL, A. R. (2002):

Relaxin: an important indicator of canine pregnancy.
Dtsch Tierarztl Wochenschr, 109, 8-12

FELDMAN, D. L. & NELSON, R. W. (1987):

Canine and feline endocrinology and reproduction.

In: FELDMAN, D. L. & NELSON, R. W. (Hrsg.);

Canine and Feline Reproduction. 2. Aufl. Verlag WB Saunders, Philadelphia, London, Toronto

FINKELMAN, F. D., HOLMES, J., KATONA, I. M., URBAN, J. F., JR., BECKMANN, M. P., PARK, L. S., SCHOOLEY, K. A., COFFMAN, R. L., MOSMANN, T. R. & PAUL, W. E. (1990):

Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection.

Annu Rev Immunol, 8, 303-333

FINKELMAN, F. D., LEES, A. & MORRIS, S. C. (1992):

Antigen presentation by B lymphocytes to CD4[±] T lymphocytes in vivo: importance for B lymphocyte and T lymphocyte activation.

Semin Immunol, 4, 247-255

FINKELMAN, F. D. & URBAN, J. F., JR. (1992):

Cytokines: making the right choice.

Parasitol Today, 8, 311-314

FRANKSHUN, A. L., HO, T. Y., REIMER, D. C., CHEN, J., LASANO, S., STEINETZ, B. G., BARTOL, F. F. & BAGNELL, C. A. (2011):

Characterization and biological activity of relaxin in porcine milk.

Reproduction, 141, 373-380

FUJINAMI, R. S., VON HERRATH, M. G., CHRISTEN, U. & WHITTON, J. L. (2006):
Molecular Mimicry, Bystander Activation, or Viral Persistence: Infections and Autoimmune Disease.

Clin Microbiol Rev, 19, 80-94

GAULD, S. B., DAL PORTO, J. M. & CAMBIER, J. C. (2002):

B Cell Antigen Receptor Signaling: Roles in Cell Development and Disease.

Science, 296, 1641-1642

GEARHART, P. J. (2002):

Immunology: the roots of antibody diversity.

Nature, 419, 29-31

GLEISS, J. & RÖTTGER, H. (1951):

Über das Verhalten der Serumproteine von Mutter und Kind in der Schwangerschaft und unter der Geburt.

Arch Gynakol, 181, 109-118

GOBELLO, C., DE LA SOTA, R. L. & GOYA, R. G. (2001):

A Review of Canine Pseudocyesis.

Reprod Domest Anim, 36, 283-288

GOFF, A. K. (2004):

Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle.

Biol Reprod, 71, 11-16

GOLD, M. R. (2002):

To make antibodies or not: signaling by the B-cell antigen receptor.

Trends Pharmacol Sci, 23, 316-324

GONZALEZ-IGLESIAS, A. E., MURANO, T., LI, S., TOMIĆ, M. & STOJILKOVIC, S. S. (2008):

Dopamine Inhibits Basal Prolactin Release in Pituitary Lactotrophs through Pertussis Toxin-Sensitive and -Insensitive Signaling Pathways.

Endocrinol, 149, 1470-1479

GÖRLINGER, S., GALAC, S., KOOISTRA, H. S. & OKKENS, A. C. (2005):

Hypoluteoidism in a bitch.

Theriogenology, 64, 213-219

GRÜNIG, G., WARNOCK, M., WAKIL, A. E., VENKAYYA, R., BROMBACHER, F., RENNICK, D. M., SHEPPARD, D., MOHRS, M., DONALDSON, D. D., LOCKSLEY, R. M. & CORRY, D. B. (1998):

Requirement for IL-13 Independently of IL-4 in Experimental Asthma.

Science, 282, 2261-2263

GÜNZEL-APEL, A.-R. (1997):

Läufigkeitskontrolle und Bestimmung des Bedeckungszeitpunktes.

In: WIESNER, E. (Hrsg.): Handlexikon der Tierärztliche Praxis. Verlag Enke, Stuttgart, Sonderdruck 201, 500a-500h

GÜNZEL-APEL, A. R., ZABEL, S., EINSPANIER, A. & HOPPEN, H. (2003):

Bedeutung, Diagnostik und „Handling“ der Gelbkörperinsuffizienz beim Hund: Züchterwunsch und tierärztliche Verantwortung.

Kongressbericht 49. Jahreskonferenz der Fachgruppe Kleintierkrankheiten der DVG. Leipzig: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft

GÜNZEL-APEL, A. R., ZABEL, S., BUNCK, C. F., DIELEMAN, S. J., EINSPANIER, A. & HOPPEN, H. O. (2006):

Concentrations of progesterone, prolactin and relaxin in the luteal phase and pregnancy in normal and short-cycling German Shepherd dogs.

Theriogenology, 66, 1431-1435

GÜNZEL-APEL, A. R., BESTE, N., NOTTORF, S., ESCHRICHT, F., HOPPEN, H. O., DIELEMAN, S. & EINSPANIER, A. (2009):

Comparison of selected endocrine parameters during luteal phase and pregnancy in German Shepherd dogs and Beagles.

Reprod Domest Anim, 44:2, 59-64

GÜNZEL-APEL, A. R., URHAUSEN, C., WOLF, K., EINSPANIER, A., OEI, C. & PIECHOTTA, M. (2012):

Serum Progesterone in Pregnant Bitches Supplemented with Progestin Because of Expected or Suspected Luteal Insufficiency.

Reprod Domest Anim, 47, 55-60

HANDLER, J. & AURICH, J.E. (2009):

Physiologie des Sexualzyklus der Stute.

In: AURICH, C. (Hrsg.);

Reproduktionsmedizin beim Pferd. 2. Aufl. Parey MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH und Co. KG, Stuttgart, 15-25

HEIN, W. R., SHELTON, J. N., SIMPSON-MORGAN, M. W., SEAMARK, R. F. & MORRIS, B. (1988):

Flow and composition of lymph from the ovary and uterus of cows during pregnancy.

J Reprod Fertil, 83, 309-323

HILL, K. E., SCOTT-MONCRIEFF, J. C., KOSHKO, M. A., GLICKMAN, L. T., GLICKMAN, N. W., NELSON, R. W., BLEVINS, W. E. & OLIVER, J. W. (2005):

Secretion of sex hormones in dogs with adrenal dysfunction.

J Am Vet Med Assoc, 226, 556-561

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

Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy.

J Reprod Fertil, 96, 837-845

IMAKAWA, K., ANTHONY, R. V., KAZEMI, M., MAROTTI, K. R., POLITES, H. G. & ROBERTS, R. M. (1987):

Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm.

Nature, 330, 377-379

IVELL, R. & EINSPANIER, A. (2002):

Relaxin peptides are new global players.

Trends Endocrinol Metab, 13, 343-348

JANEWAY, C. A. & TRAVERS, P. (1997):

Immunologie, 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

JEFFCOATE, I. A. & LINDSAY, F. E. (1998):

Physiology and endocrinology of the bitch.

In: SIMPSON, G. M., ENGLAND, G. C. W. & HARVEY, M. J. (Hrsg.);

Manual of Small Animal Reproduction. 1. Aufl., Verlag British Small Animal Association, Cheltenham, England

- JÖCHLE, W. (1997):
Prolactin in Canine and Feline Reproduction.
Reproduction in Domestic Animals, 32, 183-193
- JÖCHLE, W. & ANDERSEN, A. C. (1977):
The estrous cycle in the dog: a review.
Theriogenology, 7, 113-140
- JOHNSTON, S. D., KUSTRITZ, M. V. R. & OLSON, P. N. S. (2001):
Pregnancy Loss.
In: RAY KERSEY, D. L. (Hrsg.);
Canine and Feline Theriogenology. 1. Aufl., Verlag W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA
- JONES, G. S. (1976):
The luteal phase defect.
Fertil Steril, 27, 351-356
- KABELITZ, D. (1990):
Do CD2 and CD3-TCR T-cell activation pathways function independently?
Immunol Today, 11, 44-47
- KENNEDY, L. J., O'NEILL, T., HOUSE, A., BARNES, A., KYÖSTILÄ, K., INNES, J., FRETWELL, N., DAY, M. J., CATCHPOLE, B., LOHI, H. & OLLIER, W. E. R. (2008):
Risk of anal furunculosis in German Shepherd dogs is associated with the major histocompatibility complex.
Tissue Antigens, 71, 51-56
- KLEIN, J. (1991):
Immunologie, 1. Aufl. Verlag Wiley VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- KLONISCH, T., HOMBACH-KLONISCH, S., FROEHLICH, C., KAUFFOLD, J., STEGER, K., STEINETZ, B. G. & FISCHER, B. (1999):
Canine preprorelaxin: nucleic acid sequence and localization within the canine placenta.
Biol Reprod, 60, 551-557
- KNISS, D. A. (1999):
Cyclooxygenases in reproductive medicine and biology.
J Soc Gynecol Investig, 6, 285-292
- 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
- KOWALEWSKI, M. P., SCHULER, G., TAUBERT, A., ENGEL, E. & HOFFMANN, B. (2006):
Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus.
Theriogenology, 66, 1423-1430

- KOWALEWSKI, M. P. & HOFFMANN, B. (2008):
Molecular cloning and expression of StAR protein in the canine corpus luteum during dioestrus.
Exp Clin Endocrinol Diabetes, 116, 158-161
- KOWALEWSKI, M. P., MUTEMBEI, H. M. & HOFFMANN, B. (2008a):
Canine prostaglandin E2 synthase (PGES) and its receptors (EP2 and EP4): expression in the corpus luteum during dioestrus.
Anim Reprod Sci, 109, 319-329
- KOWALEWSKI, M. P., MUTEMBEI, H. M. & HOFFMANN, B. (2008b):
Canine prostaglandin F2alpha receptor (FP) and prostaglandin F2alpha synthase (PGFS): molecular cloning and expression in the corpus luteum.
Anim Reprod Sci, 107, 161-175
- KOWALEWSKI, M. P., BECERIKLISOY, H. B., ASLAN, S., AGAOGLU, A. R. & HOFFMANN, B. (2009):
Time related changes in luteal prostaglandin synthesis and steroidogenic capacity during pregnancy, normal and antiprogesterin induced luteolysis in the bitch.
Anim Reprod Sci, 116, 129-138
- KOWALEWSKI, M. P. (2012):
Endocrine and molecular control of luteal and placental function in dogs: a review.
Reprod Domest Anim, 6, 19-24
- KOWALEWSKI, M. P., FOX, B., GRAM, A., BOOS, A. & REICHLER, I. (2013):
Prostaglandin E2 functions as a luteotrophic factor in the dog.
Reproduction, 145, 213-226
- KRACHUDEL, J., BONDZIO, A., EINSPANIER, R., EINSPANIER, A., GOTTSCHALK, J., KUECHENMEISTER, U. & MUENNICH, A. (2013):
Luteal insufficiency in bitches as a consequence of an autoimmune response against progesterone?
Theriogenology, 79, 1278-1283
- KRAMMER, P. H. (1997):
Apoptose im Immunsystem: Mord oder Selbstmord.
Onkologie, 20, 239-243
- KRISHNAN, L., GUILBERT, L. J., WEGMANN, T. G., BELOSEVIC, M. & MOSMANN, T. R. (1996):
T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells.
J Immunol, 156, 653-662
- LABOKLIN GMBH & CO.KG, LABOR FÜR KLINISCHE DIAGNOSTIK (2001):
Referenzwerttabelle.
www.laboklin.de

- LÉVY, X. & FONTBONNE, A. (2007):
Determining the optimal time of mating in bitches: particularities.
Rev Bras Reprod Anim, 31, 128-134
- LÓPEZ, F. J., DOMINGUEZ, J. R., SÁNCHEZ-FRANCO, F. & NEGRO-VILAR, A. (1989):
Role of Dopamine and Vasoactive Intestinal Peptide in the Control of Pulsatile Prolactin Secretion.
Endocrinology, 124, 527-535
- LUDWIG, W. (2006):
Zum Sozialverhalten des Rothundes (*Cuon alpinus* PALLAS, 1811) unter Gehegebedingungen: Strategien von Kohäsion und Suppression.
Dissertation, Universität Kassel
- LUTTMANN, W., BRATKE, K., KÜPPER, M. & MYRTEK, D. (2009):
Antikörper.
In: LUTTMANN, W., BRATKE, K., KÜPPER, M. & MYRTEK, D. (Hrsg.);
Der Experimentator Immunologie. 3. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1-50
- LUZ, M. R., BERTAN, C. M., BINELLI, M. & LOPES, M. D. (2006):
In vitro PGF₂α production by endometrium and corpus luteum explants from pregnant and nonpregnant diestrus bitches and placental explants from pregnant bitches.
Theriogenology, 66, 1442-1447
- MAISCH, H. (2006):
Ist das Fortpflanzungssystem bei Rothunden *Cuon alpinus* die Ursache oder eine Konsequenz des Rudellebens?
Dissertation, Universität Osnabrück
- MANNA, P. R. & STOCCO, D. M. (2005):
Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein expression: functional and physiological consequences.
Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 5, 93-108
- MCDOWELL, K. J., SHARP, D. C., GRUBAUGH, W., THATCHER, W. W. & WILCOX, C. J. (1988):
Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares.
Biol Reprod, 39, 340-348
- MCNATTY, K. P., SAWERS, R. S. & MCNEILLY, A. S. (1974):
A possible role for prolactin in control of steroid secretion by the human Graafian follicle.
Nature, 250, 653-655
- MEYER, M. D., HANSEN, P. J., THATCHER, W. W., DROST, M., BADINGA, L., ROBERTS, R. M., LI, J., OTT, T. L. & BAZER, F. W. (1995):
Extension of corpus luteum lifespan and reduction of uterine secretion of prostaglandin F₂ α of cows in response to recombinant interferon-tau.
J Dairy Sci, 78, 1921-1931

- MOCK, E. J., PAPKOFF, H. & NISWENDER, G. D. (1983):
Internalization of ovine luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin recombinants: differential effects of the alpha- and beta-subunits.
Endocrinology, 113, 265-269
- MOORE, P. F., ROSSITTO, P. V., DANILENKO, D. M., WIELENGA, J. J., RAFF, R. F. & SEVERNS, E. (1992):
Monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T-lymphocyte subsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils.
Tissue Antigens, 40, 75-85
- MORELLI, A. E. (2014):
Dendritic cells of myeloid lineage: the masterminds behind acute allograft rejection.
Curr Opin Organ Transplant, 19, 20-27
- MORITA, I. (2002):
Distinct functions of COX-1 and COX-2.
Prostaglandins Other Lipid Mediat, 69, 165-175
- MORRISON, W. I., HOWARD, C. J., HINSON, C. J., MACHUGH, N. D. & SOPP, P. (1994):
Identification of three distinct allelic forms of bovine CD4.
Immunology, 83, 589-594
- MÜLVERSTEDT, A. J. (2006):
Entwicklung und Validierung eines ELISA zur Beurteilung der Tetanusvakzinierung am Beispiel eines Pferdebestandes in Thüringen.
Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen
- MURPHY, S. P. & TOMASI, T. B. (1998):
Absence of MHC class II antigen expression in trophoblast cells results from a lack of class II transactivator (CIITA) gene expression.
Mol Reprod Dev, 51, 1-12
- NISHIMURA, R., KOMIYAMA, J., TASAKI, Y., ACOSTA, T. J. & OKUDA, K. (2008):
Hypoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum.
Biol Reprod, 78, 529-536
- NISWENDER, G. D. (1981):
Response of the corpus luteum to luteinizing hormone.
Environ Health Perspect, 38, 47-50
- NISWENDER, G. D., JUENGEL, J. L., MCGUIRE, W. J., BELFIORE, C. J. & WILTBANK, M. C. (1994):
Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy.
Biol Reprod, 50, 239-247
- NITTA, A., SHIRASUNA, K., HANEDA, S., MATSUI, M., SHIMIZU, T., MATSUYAMA, S., KIMURA, K., BOLLWEIN, H. & MIYAMOTO, A. (2011):
Possible involvement of IFNT in lymphangiogenesis in the corpus luteum during the maternal recognition period in the cow.
Reproduction, 142, 879-892

- NOHR, B., HOFFMANN, B. & STEINETZ, B. E. (1993):
Investigation of the endocrine control of parturition in the dog by application of an antigestagen.
J Reprod Fertil Suppl, 47, 542-543
- NORONHA, L. E. & ANTCZAK, D. F. (2010):
Maternal immune responses to trophoblast: The contribution of the horse to pregnancy immunology.
Am J Reprod Immunol, 64, 231-244
- ODAU, S., GABLER, C., HOLDER, C. & EINSPANIER, R. (2006):
Differential expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in the bovine oviduct.
J Endocrinol, 191, 263-274
- OGASAWARA, H., OKADA, M., KANEKO, H., HISHIKAWA, T., SEKIGAWA, I. & HASHIMOTO, H. (2003):
Possible role of DNA hypomethylation in the induction of SLE: relationship to the transcription of human endogenous retroviruses.
Clin Exp Rheumatol, 21, 733-738
- OKKENS, A. C., DIELEMAN, S. J., BEVERS, M. M. & WILLEMSE, A. H. (1985):
Evidence for the non-involvement of the uterus in the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog.
Vet Q, 7, 169-173
- OKKENS, A. C., DIELEMAN, S. J., BEVERS, M. M., LUBBERINK, A. A. & WILLEMSE, A. H. (1986):
Influence of hypophysectomy on the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog.
J Reprod Fertil, 77, 187-192
- OKKENS, A. C., BEVERS, M. M., DIELEMAN, S. J. & WILLEMSE, A. H. (1990):
Evidence for prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog.
Vet Q, 12, 193-201
- ONCLIN, K., SILVA, L. D., DONNAY, I. & VERSTEGEN, J. P. (1993):
Luteotrophic action of prolactin in dogs and the effects of a dopamine agonist, cabergoline.
J Reprod Fertil Suppl, 47, 403-409
- ONCLIN, K. & VERSTEGEN, J. P. (1997):
Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant dioestrous beagle bitches.
J Reprod Fertil Suppl, 51, 203-208
- ONCLIN, K., VERSTEGEN, J. P. & CONCANNON, P. W. (2000):
Time-related changes in canine luteal regulation: in vivo effects of LH on progesterone and prolactin during pregnancy.
J Reprod Fertil, 118, 417-424

- PATE, J. L., TOYOKAWA, K., WALUSIMBI, S. & BRZEZICKA, E. (2010):
The interface of the immune and reproductive systems in the ovary: lessons learned from the corpus luteum of domestic animal models.
Am J Reprod Immunol, 64, 275-286
- PEAKER, M., TAYLOR, E., TASHIMA, L., REDMAN, T. L., GREENWOOD, F. C. & BRYANT-GREENWOOD, G. D. (1989):
Relaxin detected by immunocytochemistry and northern analysis in the mammary gland of the guinea pig.
Endocrinology, 125, 693-698
- PETERS, F. & WERDER, K. V. (2001):
Prolaktin und Brustdrüse.
In: LAWROTH, P. P. & ZIEGLER, R. (Hrsg.);
Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel. 1. Aufl. Springer-Verlag, Heidelberg, 29-49
- PICCINNI, M.-P., SCALETTI, C., MAGGI, E. & ROMAGNANI, S. (2000):
Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy.
J Neuroimmunol, 109, 30-33
- PICCINNI, M.-P. (2006):
T cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss.
Reprod Biomed Online, 13, 840-844
- POOLE, D. H. & PATE, J. L. (2012):
Luteal microenvironment directs resident T lymphocyte function in cows.
Biol Reprod, 86:29, 1-10
- PORTER, R. R. (1973):
Structural studies of immunoglobulins.
Science, 180, 713-716
- POWER, M. M. (1991):
The first description of a balanced reciprocal translocation [t(1q;3q)] and its clinical effects in a mare.
Equine Vet J, 23, 146-149
- PRIETO-GARCIA, A., SLOANE, D. E., GARGIULO, A. R., FELDWEG, A. M. & CASTELLS, M. (2011):
Autoimmune progesterone dermatitis: clinical presentation and management with progesterone desensitization for successful in vitro fertilization.
Fertil Steril, 95, 9-13
- RABE, T., HAGEN, C. V. & RUNNEBAUM, B. (2001):
Physiologie der Reproduktion.
In: LAWROTH, P. P. & ZIEGLER, R. (Hrsg.);
Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel. 1. Auflage Springer-Verlag, Heidelberg, 156-159
- RAUCH, P., ZELLMER, A., DANKBAR, N., SPECHT, C. & SPERLING, D. (2005):
Assayoptimierung: Störeffekte bei Immunoassays erkennen und vermeiden.
Laborwelt, 6, 2-7

RINEHART, J., GULCICEK, E. E., JOINER, C. H., LIFTON, R. P. & GALLAGHER, P. G. (2010):

Determinants of erythrocyte hydration.

Curr Opin Hematol, 17, 191-197

ROBERTS, J., TAYLOR, C., MELLING, G., KINGSLAND, C. & JOHNSON, P. (1992):

Expression of the CD46 antigen, and absence of class I MHC antigen, on the human oocyte and preimplantation blastocyst.

Immunology, 75, 202-206

ROBERTSON, R. T., ALLEN, H. L. & BOKELMAN, D. L. (1979):

Aspirin: Teratogenic evaluation in the dog.

Teratology, 20, 313-320

ROBERTSON, S. A. (2012):

Regulatory T cells in the corpus luteum--new players in fertility control?

Biol Reprod, 86:26, 1-4

ROBY, R. R., RICHARDSON, R. H. & VOJDANI, A. (2006):

Hormone allergy.

Am J Reprod Immunol, 55, 307-313

ROCHE, J. F. (1986):

Early Embryo Loss in Cattle.

In: WALL, R., DROST, M. & MORROW, D. A. (Hrsg.);

Current therapy in Theriogenology 2. 2. Aufl. Verlag W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA

RODENAS, J. M., HERRANZ, M. T. & TERCEDOR, J. (1998):

Autoimmune progesterone dermatitis: treatment with oophorectomy.

Br J Dermatol, 139, 508-511

ROITT, I. M., BROSTOFF, J. & MALE, D. K. (2005):

Moleküle, die Antigene erkennen.

In: ROITT, I. M., BROSTOFF, J. & MALE, D. K. (Hrsg.);

Kurzes Lehrbuch der Immunologie. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

ROMAGNOLI, S. & CONCANNON, P. W. (2007):

Clinical use of progestins in bitch and queens: a review.

In: CONCANNON, P.W., ENGLAND, G., VERSTEGEN, J. (Hrsg.);

Recent advances in small animal reproduction. International veterinary information service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA

ROOT-BERNSTEIN, R. (2007):

Antigenic complementarity in the induction of autoimmunity: A general theory and review.

Autoimmun Rev, 6, 272-277

ROOT KUSTRITZ, M. V. (2001a):

Use of Commercial Luteinizing Hormone and Progesterone Assay Kits in Canine Breeding Management.

In: CONCANNON, P.W., ENGLAND, G., VERSTEGEN, J. (Hrsg.);

Recent advances in small animal reproduction. International veterinary information service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA

ROOT KUSTRITZ, M. V. (2001b):

Use of Supplemental Progesterone in Management of Canine Pregnancy.

In: CONCANNON, P.W., ENGLAND, G., VERSTEGEN, J. (Hrsg.);

Recent advances in small animal reproduction. International veterinary information service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA

ROSSET, E., MAZEREAU, C. & BUFF, S. (2008):

Retrospective study of hypoluteoidism in the bitch. About 211 cases (2003-2008).

Vet Agro Supplement. Université de Lyon, www.vetagro-sup.fr

SAIKUMAR, P., DONG, Z., WEINBERG, J. M. & VENKATACHALAM, M. A. (1998):

Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury.

Oncogene, 17, 3341-3349

SANGSRITAVONG, S., COMBS, D. K., SARTORI, R., ARMENTANO, L. E. & WILTBANK, M. C. (2002):

High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle.

J Dairy Sci, 85, 2831-2842

SCHEDLOWSKI, M., TEWES, U. & SCHMOLL, H. J. (1996):

Psychoneuroimmunologie.

In: SCHMOLL, H.-J., HÖFFKEN, K. & POSSINGER, K. (Hrsg.);

Kompodium Internistische Onkologie. 2. Aufl. Springer Verlag, Heidelberg

SCHOENMAKERS, A., VERMORKEN, A., DEGREEF, H. & DOOMS-GOOSSENS, A. (1992):

Corticosteroid or steroid allergy?

Contact Dermatitis, 26, 159-162

SEDER, R. A. & LE GROS, G. G. (1995):

The functional role of CD8± T helper type 2 cells.

J Exp Med, 181, 5-7

SHIRASUNA, K., NITTA, A., SINEENARD, J., SHIMIZU, T., BOLLWEIN, H. & MIYAMOTO, A. (2012):

Vascular and immune regulation of corpus luteum development, maintenance, and regression in the cow.

Domest Anim Endocrinol, 43, 198-211

SIITERI, P. K. & STITES, D. P. (1982):

Immunologic and endocrine interrelationships in pregnancy.

Biol Reprod, 26, 1-14

- SINHA, A. A., LOPEZ, M. T. & MCDEVITT, H. O. (1990):
Autoimmune diseases: the failure of self tolerance.
Science, 248, 1380-1388
- SNYDER, J. L. & KRISHNASWAMY, G. (2003):
Autoimmune progesterone dermatitis and its manifestation as anaphylaxis: a case report and literature review.
Ann Allergy Asthma Immunol, 90, 469-477
- SOKOLOWSKI, J. H. (1977):
Reproductive patterns in the bitch.
Vet Clin North Am, 7, 653-666
- SOLENSKY, R. (2003):
Hypersensitivity reactions to beta-lactam antibiotics.
Clin Rev Allergy Immunol, 24, 201-220
- STEINETZ, B. G., GOLDSMITH, L. T., HARVEY, H. J. & LUST, G. (1989):
Serum relaxin and progesterone concentrations in pregnant, pseudopregnant, and ovariectomized, progestin-treated pregnant bitches: detection of relaxin as a marker of pregnancy.
Am J Vet Res, 50, 68-71
- STEWART, D. R., HENZEL, W. J. & VANDLEN, R. (1992):
Purification and sequence determination of canine relaxin.
J Protein Chem, 11, 247-253
- STITES, D. P. & SIITERI, P. K. (1983):
Steroids as immunosuppressants in pregnancy.
Immunol Rev, 75, 117-138
- STOCCO, D. M. (2001):
StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis.
Annu Rev Physiol, 63, 193-213
- STRICKER, F. (2010):
Untersuchung zum Zusammenhang zwischen verkürztem Läufigkeitsintervall und dem Hypoluteinismus der Zuchthündin und zur Effektivität von Progesteronsubstitutionen.
Dissertation, Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin
- SUTER, P. (2012):
Weiblicher Geschlechtsapparat.
In: SUTER, P., KOHN, B., SCHWARZ G. (Hrsg.): *Praktikum der Hundeklinik*. 11. Aufl. Enke Verlag, Stuttgart, 835-877
- TANNUS, R. J. & THUN, R. (1995):
Influence of endometrial cysts on conception rate of mares.
Zentralbl Veterinarmed A, 42, 275-283

- TEDDER, T. F., ZHOU, L. J. & ENGEL, P. (1994):
The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes.
Immunol Today, 15, 437-442
- TESCHNER, A. & HINRICHSEN, M. (2007):
Gynäkologische Endokrinologie.
In: STAUBNER, M. & WEYERSTAHL, T. (Hrsg.): Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe. 3 Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 78-133
- THELLIN, O. & HEINEN, E. (2003):
Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection.
Toxicology, 185, 179-184
- TIBOLD, A. & THURÓCZY, J. (2009):
Progesterone, oestradiol, FSH and LH concentrations in serum of progesterone-treated pregnant bitches with suspected luteal insufficiency.
Reprod Domest Anim, 44:2, 129-132
- TIZARD, I. R. (1982):
Antigen structure and immunogenicity.
J Am Vet Med Assoc, 181, 978-982
- TIZARD, I. R. (2009):
Veterinary Immunology, 8. Aufl. Verlag Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA
- VANDERWALL, D. K. & NEWCOMBE, J. R. (2007):
Early embryonic loss.
In: SAMPER, J. C., PYCOCK, J. F. & MCKINNON, A. O. (Hrsg.);
Current Therapy in Equine Reproduction. 1. Aufl., Verlag Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, 374-283
- VANDESOMPELE, J., PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., PAEPE, A., SPELEMANN, F. (2002):
Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.
Genome Biol, 3 (7), research 0034
- VERHAGEN, S. M. (2002):
Relaxin: ein luteotropher Faktor im Corpus luteum der mittleren Lutealphase bei *Callithrix jacchus*.
Dissertation, Georg-Augustus-Universität, Göttingen
- VERSTEGEN-ONCLIN, K. & VERSTEGEN, J. (2008):
Endocrinology of pregnancy in the dog: A review.
Theriogenology, 70, 291-299
- VERSTEGEN, J., DHALIWAL, G. & VERSTEGEN-ONCLIN, K. (2008):
Canine and feline pregnancy loss due to viral and non-infectious causes: A review.
Theriogenology, 70, 304-319

VOSS, H. E. (1941):

Prolaktin.

Ergeb Physiol, 44, 96-229

WADE, C. M. (2011):

Inbreeding and genetic diversity in dogs: Results from DNA analysis.

Vet J, 189, 183-188

WILDT, D. E., BAAS, E. J., CHAKRABORTY, P. K., WOLFLE, T. L. & STEWART, A. P. (1982):

Influence of inbreeding on reproductive performance, ejaculate quality and testicular volume in the dog.

Theriogenology, 17, 445-452

WUTTKE, W. (1993):

Verschiedene Formen der Lutealinsuffizienz.

Arch Gynecol Obstet, 254, 121-125

11. Anhang

Tabelle 15: Einzeldaten der erkrankten Tiere

Gruppe	Hund-Nr.	Alter (J)	Rasse	Zyklus- abstand (M)	Würfe	behandelt mit oralem Progesteron	Anzahl Welpen
1 = luteal insuffizient, tragend (n = 13)	2	6	DSH	5	6	nein	4 / resorbiert
	3	8	DSH	5	5	nein	4 / resorbiert
	4	5	DSH	4	0	ab 31. d p.ov.	0
	5	3	DSH	5	2	ab 24. d p.ov.	3
	7	6	DSH	6	4	ab 27. d p.ov.	4
	8	5	DSH	5	4	ab 31. d p.ov.	7
	15	4	RW	4	3	ab 31. d p.ov.	6
	18	7	RR	5	4	ab 24. d p.ov.	5 / resorbiert
	19	4	DSH	6	2	ab 36 d. p.ov.	6
	22	3	DSH	4	2	nein	5
	26	3	DSH	5	1	ab 36. d p.ov.	4
	30	3	DSH	4	1	ab 36. d p.ov.	6
	32	6	DSH	5	5	ab 31. d p.ov.	8
2 = luteal insuffizient, nicht tragend (n = 7)	6	11	DSH	6	9	nein	-
	14	7	BS	5	4	nein	-
	17	3	DSH	4	2	nein	-
	20	6	DSH	6	6	nein	-
	34	3	DSH	5	3	nein	-
	35	12	DSH	6	9	nein	-
	36	8	RR	6	5	nein	-

Abkürzungen: BS, Berner Sennenhund; DSH, Deutscher Schäferhund; RR, Rhodesian Ridgeback; RW, Rottweiler.

Tabelle 16: Einzeldaten der Kontrolltiere

Gruppe	Hund-Nr.	Alter (J)	Rasse	Zyklus- abstand (M)	Würfe	behandelt mit oralem Progesteron	Anzahl Welpen
3 = Kontrolle, tragend (n = 12)	1	4	DSH	8	3	nein	7
	10	5	DSH	5	2	nein	6
	12	6	BC	7	2	nein	1
	16	4	RW	6	2	nein	5
	23	3	DSH	6	2	nein	8
	24	4	DSH	7	2	nein	6
	25	6	RW	6	2	nein	7
	27	6	DSH	6	2	nein	6
	28	9	DSH	6	9	nein	8
	29	5	DSH	6	5	nein	6
	31	6	RW	6	2	nein	4
	33	7	BS	6	4	nein	5
4 = Kontrolle, nicht tragend (n = 6)	11	3	AT	8	2	nein	-
	13	4	AT	8	2	nein	-
	21	7	DSH	6	2	nein	-
	37	4	DSH	8	4	nein	-
	38	10	DSH	6	9	nein	-
	39	7	DSH	6	2	nein	-

Abkürzungen: AT, Airedale Terrier; BC, Border Collie; BS, Berner Sennenhund; DSH, Deutscher Schäferhund; RR, Rhodesian Ridgeback; RW, Rottweiler.

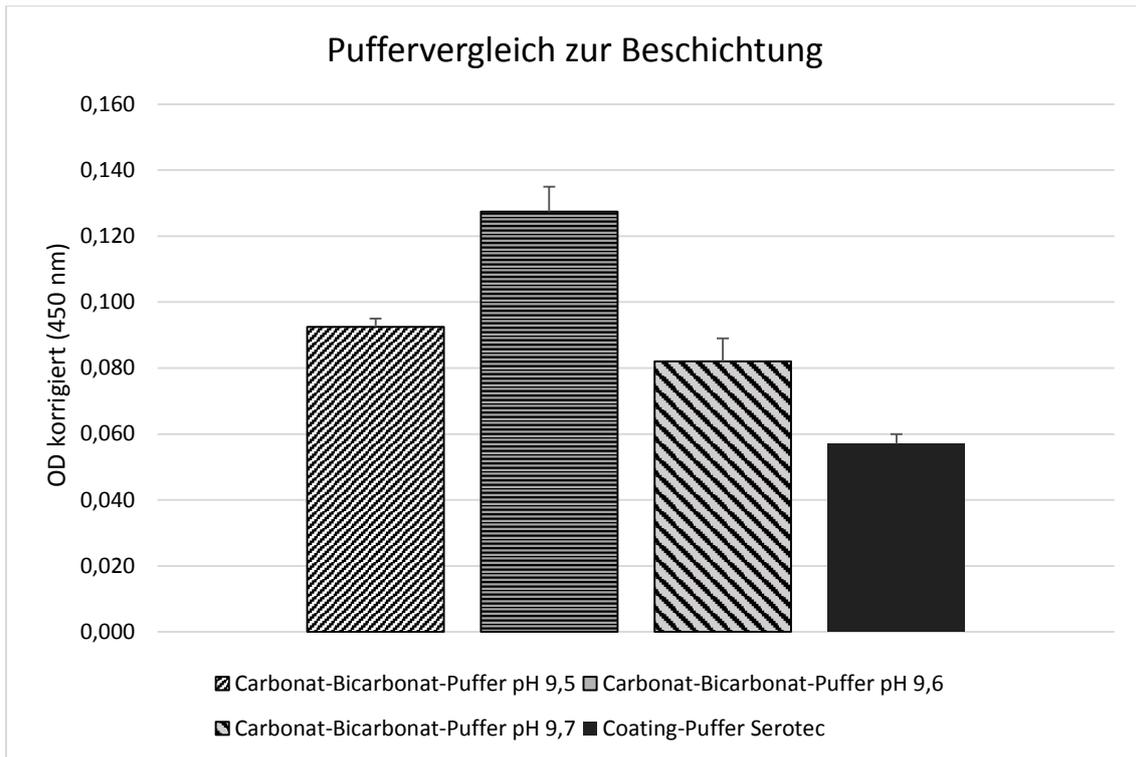


Abbildung 23: Photometrische Auswertung einer positiven Serumprobe unter Verwendung verschiedener Beschichtungspuffer (IgE-Titer, OD korr. 450 nm)

Tabelle 17: Photometrische Auswertung (IgM-Titer, OD korr. 450 nm) nach Zugabe von BSA zur Antikörperverdünnungslösung

	PBS		PBS/BSA 2%	
	Progesteron-BSA	BSA	Progesteron-BSA	BSA
Serum (OD 450 nm)	0,998	0,735	0,623	0,501
OD korr. (Δ)	0,263		0,122	

Anhang

Tabelle 18: Berechnung der Inter-Assay-Varianz für IgE und IgM (Angabe in OD korr.)

Interassay:		
Platte	IgM	IgE
1	0,665	0,331
2	0,626	0,231
3	0,463	0,262
4	0,634	0,269
5	0,490	0,256
6	0,473	0,304
7	0,610	0,261
Mittelwert	0,566	0,273
SD	0,087	0,033
V%	15,304	12,204

Tabelle 19: Berechnung der Intra-Assay-Varianz für IgE und IgM (Angabe in OD korr.)

Intraassay:					
	Ansatz	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
IgE	1	0,317	0,275	0,183	0,452
	2	0,359	0,269	0,177	0,447
	3	0,369	0,281	0,170	0,478
	4	0,380	0,247	0,155	0,412
	5	0,386	0,281	0,157	0,428
	Mittelwert	0,362	0,271	0,168	0,443
	SD	0,027	0,014	0,012	0,022
V%	7,539	5,211	7,268	5,050	
V% im Durchschnitt:		6,267			
IgM	1	1,060	0,095	0,742	0,652
	2	1,053	0,096	0,766	0,577
	3	1,092	0,102	0,793	0,587
	4	1,158	0,116	0,780	0,569
	5	1,107	0,108	0,763	0,592
	Mittelwert	1,094	0,103	0,769	0,595
	SD	0,042	0,009	0,019	0,029
V%	3,853	8,475	2,494	4,938	
V% im Durchschnitt:		4,940			

Tabelle 20: Einzeldaten der Studienpopulation unter Berücksichtigung der bakteriologischen Untersuchung

Gruppe	Hund	Alter (J)	Rasse	BU-Befund	behandelt mit AB
1 - hypoluteid, tragend (n = 13) <i>Verlust diagnostizierter Trächtigkeiten bzw. „leer“ bleiben nach erfolgreichem Deckakt und individuelle Verkürzung des Zwischenöstrusintervalls und klinische, gynäkologische und mikrobiologische Untersuchung o.b.B.</i>	2	6	DSH	positiv	Amoxicillin/Clavulansäure
	3	8	DSH	positiv	Amoxicillin/Clavulansäure
	4	5	DSH	positiv	Amoxicillin/Clavulansäure
	5	3	DSH	positiv	Enrofloxacin
	7	6	DSH	positiv	Amoxicillin/Clavulansäure
	8	5	DSH	positiv	Amoxicillin/Clavulansäure
	15	4	RW	positiv	Enrofloxacin
	18	7	RR	negativ	nein
	19	4	DSH	negativ	nein
	22	3	DSH	negativ	nein
	26	3	DSH	negativ	nein
	30	3	DSH	positiv	Amoxicillin/Clavulansäure
	32	6	DSH	positiv	Enrofloxacin
2 - hypoluteid, nicht tragend (n = 7) <i>Kriterien wie hypoluteide, tragende Gruppe</i>	6	11	DSH	n.b.	nein
	14	7	BS	n.b.	nein
	17	3	DSH	n.b.	nein
	20	6	DSH	n.b.	nein
	34	3	DSH	n.b.	nein
	35	12	DSH	n.b.	nein
	36	8	RR	n.b.	nein
3 - Kontrolle, tragend (n = 12) <i>mindestens zwei ungestörte Trächtigkeiten mit angemessener Wurfgröße und konstantes Zwischenöstrusintervall</i>	1	4	DSH	positiv	Amoxicillin/Clavulansäure
	10	5	DSH	positiv	Amoxicillin/Clavulansäure
	12	6	BC	positiv	Enrofloxacin
	16	4	RW	positiv	Enrofloxacin
	23	3	DSH	positiv	Amoxicillin/Clavulansäure
	24	4	DSH	positiv	Enrofloxacin
	25	6	RW	negativ	nein
	27	6	DSH	negativ	nein
	28	9	DSH	positiv	Amoxicillin/Clavulansäure
	29	5	DSH	positiv	Amoxicillin/Clavulansäure
	31	6	RW	negativ	nein
33	7	BS	positiv	Amoxicillin/Clavulansäure	
4 - Kontrolle, nicht tragend (n = 6) <i>Kriterien wie tragende Kontrollgruppe</i>	11	3	AT	n.b.	nein
	13	4	AT	n.b.	nein
	21	7	DSH	n.b.	nein
	37	4	DSH	n.b.	nein
	38	10	DSH	n.b.	nein
	39	7	DSH	n.b.	nein

12. Publikationsverzeichnis

12.1 Publikationen

J. Krachudel, A. Bondzio, R. Einspanier, A. Einspanier, J. Gottschalk, U. Kuechenmeister and A. Muennich (2013):

Luteal insufficiency in bitches as a consequence of an autoimmune response against progesterone?

Theriogenology, Vol. 79, Issue 9, 1278-83

12.2 Vorträge

J. Krachudel, A. Bondzio, J. Gottschalk, A. Einspanier, U. Kuechenmeister, A. Muennich and R. Einspanier :

Hypoluteoidism in the bitch-investigation of endocrine and immunological parameters

45th Annual Conference of Physiology and Pathology of Reproduction; Berlin,

29.2.- 01.03.2012

Reproduction in Domestic Animals; Volume: 47; Issue: S2; Page: 7

J. Krachudel, A. Bondzio, J. Gottschalk, A. Einspanier, U. Kuechenmeister, A. Muennich and R. Einspanier:

Hypoluteoidism in the bitch-investigation of endocrine and immunological parameters

7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction; Whistler, Canada,

26.-29.06.2012

IVIS-International veterinary Information Service (www.ivis.org); Pages: 124-125

J. Krachudel, A. Bondzio, J. Gottschalk, A. Einspanier, U. Kuechenmeister, A. Muennich, R. Einspanier:

Luteal insufficiency in the bitch as the consequence of endocrinological and immunological disorders?

7.Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar „Biomedical Sciences“ 2012, Berlin

12.3 Posterbeiträge

J. Krachudel, A. Bondzio, U. Kuechenmeister, A. Muennich and R. Einspanier:

Prevalence of anti-progesterone antibodies in luteal insufficient bitches

46th Annual Conference of Physiology and Pathology of Reproduction; Gdansk, Poland,

27.2.-01.03.2013

Reproductive Biology, Volume: 13, Supplement 2; Page: 31

13. Danksagung

Diese Arbeit markiert das Ende eines langen, arbeitsreichen Weges, auf dem mich viele Menschen begleitet haben. Ohne die Anregungen, konstruktive Kritik und praktische Hilfe von diesen besonderen Menschen wäre unser Projekt nicht zu realisieren gewesen.

Zu Beginn existierte nur eine Idee, eine vage Vermutung, die jedoch immer mehr Gestalt annahm und sich zu einer leidenschaftlichen Aufgabe entwickelte. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich besonders bei Dr. Andrea Münnich, die den Funken der Passion entzündete und mit viel Sachverstand den klinischen Teil dieses Projekts konzipierte. Trotz maximaler beruflicher Auslastung stand sie mir als Lektorin während der Publikation und in der Abschlussphase dieser Arbeit zur Seite. In gleichem Atemzug möchte ich Dr. Uwe Küchenmeister danken, der zwar in erster Linie als geduldiger Arbeitgeber für Lohn und Brot der Autorin sorgte, darüber hinaus aber auch durch seine finanzielle Zuwendung die Realisierung des Projekts gewährleistete.

Im Zuge der Umsetzung unserer Idee möchte ich besonders Prof. Dr. Ralf Einspanier für seine Risikobereitschaft, dieses Projekt zu betreuen, danken. Seine zahlreichen, wertvollen Anregungen beeinflussten maßgeblich das Fortkommen des Projekts in der ein oder anderen festgefahrenen Situation.

Die Entwicklung eines ELISA geht mit vielen Höhen und Tiefen einher. Daher möchte ich mich insbesondere ganz herzlich bei Dr. Angelika Bondzio bedanken, die mit viel Engagement, Perfektion und unermüdlicher Geduld die Planung und Durchführung der ELISA-Entwicklung betreute. Auch als Lektorin für die Publikation und in der Abschlussphase dieser Arbeit war ihre Hilfe für mich von unschätzbarem Wert. Vielen Dank ebenfalls an Ulla Scholz und Petra Schulze, die mir im Labor helfend zur Seite standen.

Im Zusammenhang mit den PCR-Untersuchungen der Gelbkörperproben danke ich herzlich Dr. Christoph Gabler und Christoph Holder, die mich mit viel Geduld in diese Methode einwiesen und mich mit Rat und Tat begleiteten.

Darüber hinaus möchte ich gern Dr. Onno Burfeind und Sebastian Warnholz für die Unterstützung in der statistischen Auswertung der Ergebnisse sowie Cornelia Schöntube für das hilfreiche Lektorat danken.

Zuletzt genannt, aber nicht weniger wichtig war die Unterstützung durch meine Familie. Da die parallele Ausübung von Beruf und Dissertation zu ständiger Zeitnot führte, danke ich ganz besonders Erik und Sophie für die Geduld, die sie mir entgegengebracht haben. Auch meinen Eltern und Großeltern danke ich für die vielfältige Unterstützung, die sie uns zukommen ließen.

14. Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 22.08.2014

Jenny Uhlmann