

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, ein Nachweisverfahren für equines Prolaktin zu entwickeln und damit Prolaktinbestimmungen bei Pferden in unterschiedlichen Reproduktionsstadien sowie bei Stuten mit Fruchtbarkeitsstörungen durchzuführen. Dabei wurden ein homologer Radioimmunoassay, in dem ein polyklonales Antiserum verwendet wurde, und ein heterologer Enzymimmunoassay, in dem ein monoklonaler Antikörper eingesetzt wurde, hinsichtlich ihrer Eignung für die Messung von equinem Prolaktin verglichen.

Sowohl das im RIA verwendete polyklonale Antiserum als auch die im EIA eingesetzten monoklonalen Antikörper weisen eine gute Affinität und hohe Spezifität für equines Prolaktin auf. Der Einsatz zunehmender Volumina von Pferdeplasma führte im RIA und EIA zu einem parallel zur Standardkurve liegenden Kurvenverlauf. Im RIA wiesen die meisten der Proben eine Prolaktinkonzentration von etwa 50% der Ausgangsbindung auf und lagen damit in dem für eine gute Differenzierung optimalen Bereich der Standardkurve. Bei der Messung im EIA lagen physiologische Prolaktinkonzentrationen unter 50% der Ausgangsbindung. Die absoluten Werte waren bei der Messung im RIA fast immer höher als die im EIA bestimmten Prolaktinkonzentrationen. Dies könnte dadurch bedingt sein, daß Prolaktin aus mehreren Isoformen besteht, die sich z.T. antigenetisch unterscheiden und daher unterschiedliche Affinitäten zu den verwendeten Antiseren aufweisen. Die mit den beiden Assaysystemen ermittelten Prolaktinkonzentrationen zeigten eine hoch signifikante Korrelation ($r=0,67$; $p<0,001$).

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde die endogene Prolaktinfreisetzung bei Hengsten und Stuten bestimmt und darüberhinaus einer Beteiligung endogener opioider Peptide an der Regulation der Prolaktinfreisetzung nachgegangen. Blutprobenentnahmen erfolgten in 15minütigen Abständen über drei Stunden. Sechzig Minuten nach Versuchsbeginn wurde den Tieren entweder der Opiatantagonist Naloxon (300 mg i.v.) oder 0,9% NaCl-Lösung injiziert.

(1) Untersuchungen an Hengsten erfolgten in den Monaten Mai ($n=5$), August ($n=7$) und Dezember ($n=7$). Die Hengste erhielten im Abstand von einer Woche sowohl Naloxon als auch 0,9% NaCl-Lösung. Hinsichtlich der basalen Prolak-

tinsekretion lagen deutliche jahreszeitliche Unterschiede vor. Im Mai war die basale Prolaktinkonzentration unabhängig von der verwendeten Methodik signifikant höher als im August und Dezember. In allen drei Untersuchungsmonaten erfolgte nach Naloxonapplikation eine vermehrte Prolaktinfreisetzung. Bei der Bestimmung im EIA war die Zunahme der Prolaktinkonzentration nach Naloxon in allen drei Untersuchungsmonaten signifikant ($p < 0,05$) und stieg im Mai von $2,3 \pm 0,4$ auf $3,5 \pm 0,9$ ng/ml, im August von $2,4 \pm 0,6$ auf $4,6 \pm 1,0$ ng/ml und im Dezember von $0,3 \pm 0,1$ auf $0,6 \pm 0,1$ ng/ml an. Im RIA war der Anstieg der Prolaktinkonzentration nur in den Monaten Mai und August signifikant ($p < 0,05$; Mai: von $5,6 \pm 0,6$ auf $12,1 \pm 1,1$ ng/ml; August: von $3,9 \pm 1,0$ auf $9,6 \pm 3,1$ ng/ml). Bei männlichen Pferden sind endogene Opiode also als hemmende Transmitter an der Regulation der Prolaktinausschüttung beteiligt.

(2) Untersuchungen an zyklischen Stuten erfolgten zwischen April und Juni. Die Stuten wurden in jeder Zyklusphase nur einmal in die Versuche einbezogen und in Versuchs- und Kontrollgruppen unterteilt. Naloxon führte unabhängig vom Zyklusstand und unabhängig davon, ob die Stuten sich in der Laktation befanden oder kein Fohlen bei Fuß führten, nicht zu Veränderungen der Prolaktinsekretion.

(3) Bei saisonal anovulatorischen Stuten im Winter führte Naloxon ($n=5$, Kontrollgruppe $n=4$) zu keiner Veränderung der Prolaktinsekretion. Daß sich bei Stuten kein Hinweis auf eine Beeinflussung der Prolaktinsekretion durch Naloxon ergab, deutet darauf hin, daß die beim Hengst nachgewiesenen opioiden Mechanismen bei Stuten mit physiologischem Fortpflanzungsgeschehen nicht aktiviert sind. Hinsichtlich der opioiden Steuerung der Prolaktinsekretion bestehen beim Pferd offensichtlich deutliche Geschlechtsunterschiede.

(4) Der Vergleich der basalen Prolaktinkonzentrationen bei Stuten zu unterschiedlichen Jahreszeiten ergab mit beiden Meßverfahren signifikante (RIA: $p < 0,001$; EIA: $p < 0,01$) Veränderungen der Prolaktinfreisetzung im Verlauf des Jahres. Die basale, im RIA bestimmte Prolaktinsekretion erreichte im Mai ein Maximum von $10,4 \pm 0,2$ ng/ml, im Februar/März lagen die Konzentrationen mit $1,1 \pm 0,2$ signifikant am niedrigsten. Mit der Prolaktinbestimmung im Enzymimmunoassay ergaben sich in der Tendenz die gleichen jahreszeitlichen Unterschiede wie bei der Bestimmung im RIA.

(5) Zwischen Stuten in unterschiedlichen Reproduktionsstadien (Follikelphase, Gelbkörperphase, Winterazyklie) ließen sich weder mit dem RIA noch mit dem EIA signifikante Unterschiede der basalen Prolaktinkonzentration nachweisen. Faßt man alle laktierenden sowie alle nichtlaktierenden zyklischen Stuten ohne Berücksichtigung des Zyklusstandes zusammen, so ergibt sich ein Mittelwertunterschied, der im RIA den Grenzwert für eine statistische Signifikanz erreicht ($p=0,05$; laktierende Stuten: $8,9 \pm 1,7$; nichtlaktierende Stuten: $5,0 \pm 0,9$ ng/ml) und im EIA unterschreitet ($p<0,01$; laktierende Stuten $3,5 \pm 0,5$; nichtlaktierende Stuten: $1,9 \pm 0,2$ ng/ml).

(6) Bei ovariectomierten Stuten hatte die Substitution von entweder Östradiolbenzoat ($10 \mu\text{g/kg}$; $n=5$), Progesteron ($0,5 \text{ mg/kg}$; $n=5$) oder Progesteron plus Östradiol ($0,5 \text{ mg/kg}$ Progesteron plus $10 \mu\text{g/kg}$ Östradiolbenzoat; $n=10$) über jeweils 8 Tage keinen signifikanten Einfluß auf die basale Prolaktinkonzentration.

(7) Bei Stuten mit ovariell oder hypothalamisch-hypophysär bedingten Fertilitätsstörungen kam es bei 3 von 9 Tieren nach Naloxonapplikation zu einem Anstieg der Plasmaprolaktinkonzentration, d.h. bei diesen Tieren lag eine opioide Hemmung der Prolaktinsekretion vor. Stuten mit Störungen der Fortpflanzungsaktivität unterschieden sich hinsichtlich der Reaktion auf Naloxon also zum Teil von Stuten mit ungestörter Fertilität. Möglicherweise liegt bei solchen Stuten als Ursache oder als Folge der Fruchtbarkeitsstörung zumindest vorübergehend auch eine pathologisch erhöhte Prolaktinsekretion vor.

6. Summary

Frank Burgmann (1994):

Regulation of prolactin release in the horse

Aim of this study was to develop assay techniques for the determination of equine prolactin and to investigate prolactin release in horses of different reproductive states as well as in mares with disturbed fertility. An homologous radioimmunoassay (RIA) with a polyclonal antiserum was compared with an heterologous monoclonal antibody enzyme immunoassay (EIA).

The polyclonal antiserum used in the RIA as well as the EIA monoclonal antibodies bound to horse prolactin with sufficient affinity and high specificity. Increasing amounts of horse plasma in both assays gave curves in parallel to the respective standard curves. Prolactin concentrations in horse plasma samples were in the range of 50% total binding in the RIA whereas they were below 50% in the EIA. Absolute prolactin values obtained by RIA were nearly always higher than corresponding EIA values. Prolactin consists of several isoforms which can differ partially in their antigenic properties and therefore may bind preferentially to different antibodies, thus explaining differences between RIA and EIA prolactin concentrations. However prolactin concentrations determined with the two assay systems were highly correlated ($r=0.67$; $p<0.001$).

After validation of the assay systems, endogenous prolactin concentrations were determined in stallions and mares and in addition an involvement of endogenous opioids in the regulation of prolactin release was investigated. From the animals, blood samples were withdrawn at 15 minute intervals for three hours. Sixty minutes after taking the first sample, the horses were injected with either the opiate antagonist naloxone (300 mg i.v.) or saline.

(1) Stallions were studied in May ($n=5$), August ($n=7$) and December ($n=7$) and were treated with naloxone and saline one week apart, thus serving as their own controls. Basal prolactin release differed significantly with the season and, irrespective of the assay system, in May was significantly higher than in August or Dezember. At all times of the year naloxone stimulated the release of pro-

lactin. Prolactin secretion determined by EIA was significantly higher after naloxone injection than corresponding values from control experiments at all times of the year ($p < 0,05$). Plasma prolactin concentrations increased from 2.3 ± 0.4 to $3,5 \pm 0.9$ ng/ml in May, 2.4 ± 0.6 to $4,6 \pm 1.0$ ng/ml in August and from 0.3 ± 0.1 to 0.6 ± 0.1 ng/ml in December. The increase in prolactin concentrations determined by RIA was statistically significant only in May and August ($p < 0,05$; May: from 5.6 ± 0.6 to 12.1 ± 1.1 ng/ml; August: from 3.9 ± 1.0 to 9.6 ± 3.1 ng/ml). It can be concluded that in male horses, endogenous opioid systems participate as inhibitory transmitters in the regulation of prolactin secretion.

(2) Experiments in cyclic mares were performed between April and June. Mares were investigated only once and divided into naloxone and control groups. Irrespective of the stage of the oestrous cycle and the presence or absence of a foal, in the mares, naloxone did not cause changes in prolactin release.

(3) Also in seasonally anovulatory mares in winter, naloxone injection ($n=5$, control group $n=4$) was not followed by changes in an increased secretion of prolactin. The opioid regulation of prolactin release that exists in the stallion seems to be absent in mares with physiologic reproductive functions and therefore marked sex differences in the activity of these opioid systems exist in the horse.

(4) Significant differences in plasma prolactin concentrations were found with both assays between mares at different times of the year (RIA: $p < 0.001$; EIA: $p < 0.01$). Spontaneous prolactin release was maximal in May (RIA: 10.4 ± 0.2 ; EIA: 3.6 ± 0.6 ng/ml) and lowest in February/March (RIA: $1,1 \pm 0,2$; EIA: 0.6 ± 0.01 ng/ml).

(5) No differences in basal prolactin release existed between mares in the follicular phase, luteal phase and seasonal anovulatory phase. However, prolactin concentrations were higher in lactating than in non lactating mares (RIA: lactating mares 8.9 ± 1.7 ; non lactating mares 5.0 ± 0.9 ng/ml; $p=0.05$; EIA: lactating mares 3.5 ± 0.5 ; non lactating mares 1.9 ± 0.2 ng/ml; $p < 0.01$), irrespective of the stage of the oestrous cycle.

(6) In ovariectomized mares, replacement of oestradiol benzoate (10 µg/kg; n=5), progesterone (0,5 mg/kg; n=5) or progesterone plus oestradiol (0,5 mg/kg progesterone plus 10 µg/kg oestradiol benzoate; n=10) for 8 days did not affect basal plasma prolactin concentrations.

(7) In 4 out of 9 mares with fertility problems of ovarian or hypothalamic-pituitary origin, plasma prolactin concentrations increased after opioid receptor blockade with naloxone, indicating the presence of an opioid inhibition of prolactin release in these animals. Mares with certain disturbances of reproductive functions therefore differ in their reaction to naloxone from mares with normal fertility. In these mares, also an at least temporary, pathological increase in prolactin secretion cannot be excluded.