

## **5. Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion endogener opioider Systeme für die Regulation der Freisetzung von Luteinisierendem Hormon (LH) und Testosteron bei männlichen Pferden bestimmt und einer möglichen Bedeutung der Jahreszeit sowie dem Einfluß gonadaler Steroide auf die untersuchten endokrinen Mechanismen nachgegangen.

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 20 Hengsten und 10 Wallachen durchgeführt. Die Tiere erhielten 300 mg des Opiatantagonisten Naloxon oder 0,9% NaCl-Lösung als Kontrolle intravenös verabreicht. Naloxon- und Kontrollversuch wurden bei denselben Tieren im Abstand von einer Woche durchgeführt. Blutproben wurden von 60 Minuten vor bis 270 Minuten nach Naloxon oder 0,9% NaCl-Lösung alle 15 Minuten genommen. 210 Minuten nach Versuchsbeginn erhielten alle Tiere 20 µg des Gonadotropin Releasinghormon (GnRH)-Agonisten Buserelin intravenös injiziert, um die Ansprechbarkeit der Hypophyse auf GnRH zu bestimmen. Die Untersuchungen an Hengsten wurden im Mai (n=5), August (n=8) und Dezember (n=7) und an Wallachen im Mai (n=10) durchgeführt. In allen Blutproben wurden die Konzentrationen von LH und Testosteron mittels Radioimmunoassay gemessen, in ausgewählten Proben erfolgte eine zusätzliche Bestimmung von LH mit einem in vitro Bioassay. Dabei wurde die LH-stimulierte Testosteronsekretion muriner Leydigzellen gemessen

Hinsichtlich der basalen Hormonkonzentrationen lagen bei den Hengsten deutliche jahreszeitliche Unterschiede vor. Die basale LH-Sekretion war im Mai und August signifikant höher als im Dezember (Mai  $11,6 \pm 0,6$ , August  $10,7 \pm 0,4$ , Dezember  $9,0 \pm 0,5$  ng/ml) und betrug bei den Wallachen  $10,0 \pm 1,0$  ng/ml. Die basale Ausschüttung von Testosteron bei den Hengsten lag im August ( $0,85 \pm 0,09$  ng/ml) signifikant am höchsten und im Dezember ( $0,27 \pm 0,04$  ng/ml) signifikant am niedrigsten (Mai  $0,68 \pm 0,13$  ng/ml). Die basale Plasmatestosteronkonzentration

on der Wallache lag an der unteren Nachweisgrenze des Radioimmunoassays (0,01 ng/ml).

Injektion von Naloxon führte bei den Hengsten im August und Dezember zu einer signifikanten ( $p < 0,001$ ) Zunahme der LH-Sekretion, der Anstieg der LH-Konzentration im Plasma nach Naloxon im Mai war dagegen nicht signifikant ( $p = 0,06$ ). Bei den im August durchgeführten Untersuchungen nahm die mittlere LH-Konzentration von  $10,3 \pm 0,9$  ng/ml 15 Minuten vor auf ein Maximum von  $13,1 \pm 0,7$  ng/ml 15 Minuten nach Naloxoninjektion zu, im Dezember stieg die mittlere LH-Konzentration von  $8,7 \pm 0,8$  ng/ml 15 Minuten vor auf  $11,2 \pm 0,7$  ng/ml 30 Minuten nach Naloxonapplikation an. Bei Wallachen erfolgte nach Naloxon keine Veränderung der LH-Konzentration und bei den Hengsten bestand eine hochsignifikante Korrelation ( $r = 0,6649$ ,  $p < 0,001$ ) zwischen der basalen Testosteronsekretion und der Höhe des LH-Anstiegs nach Naloxon. Die Hemmung der LH-Sekretion durch endogene Opiode erfolgt also in Abhängigkeit von testikulären Steroidhormonen.

Buserelin führte sowohl bei den Hengsten zu allen Jahreszeiten als auch bei den Wallachen zu einer signifikanten Zunahme der LH-Sekretion. Eine fehlende Ansprechbarkeit der Hypophyse auf GnRH oder eine ungenügende LH-Synthese war demnach nicht Ursache einer fehlenden LH-Reaktion auf Naloxon.

Die im Bioassay ermittelte LH-Konzentration lag stets deutlich über den entsprechenden radioimmunologisch ermittelten Werten, so daß sich im Mittel eine B:I-Ratio von 3 ergab. Die basale, also vor der Applikation von Naloxon/0,9% NaCl-Lösung ermittelte B:I-Ratio lag bei den Hengsten im Mai (B:I-Ratio  $5,8 \pm 1,5$ ;  $n = 5$ ) höher als im August (B:I-Ratio  $3,9 \pm 0,9$ ;  $n = 5$ ) und Dezember (B:I-Ratio  $3,0 \pm 1,0$ ;  $n = 5$ ). Höchste Basalwerte für die Bioassay-LH-Konzentration und die B:I-Ratio wurden bei Wallachen gefunden (B:I-Ratio  $15,5 \pm 2,1$ ;  $n = 3$ ). Saisonale Veränderungen der LH-Sekretion beim Hengst treten über die quantitative Freisetzung hinaus also auch hinsichtlich der Bioaktivität und des daraus

resultierenden Verhältnisses von radioimmunologisch bestimmter zu im Bioassay gemessener LH-Konzentration auf.

Die LH-Bioaktivität nach Naloxonapplikation bei Hengsten im Mai veränderte sich nicht signifikant. Buserelin führte dagegen zu einer Zunahme der Bio-LH-Freisetzung ( $p < 0,05$ ) und der B:I-Ratio von  $6,1 \pm 1,4$  auf  $7,0 \pm 1,3$  ( $p < 0,01$ ). Im August lag ein signifikanter Anstieg der LH-Bioaktivität ( $p < 0,05$ ) und eine entsprechende Zunahme der B:I-Ratio von  $3,9 \pm 0,9$  auf  $6,2 \pm 1,5$  ( $p < 0,05$ ) vor. Buserelin bewirkte einen weiteren Anstieg beider Parameter ( $p < 0,05$ ). Im Dezember führte Naloxon ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der B:I-Ratio (von  $3,0 \pm 1,0$  auf  $3,7 \pm 1,1$ ;  $p < 0,05$ ).

Die durch den Opioidantagonisten stimulierte LH-Sekretion führte, in Abhängigkeit von der Jahreszeit, zu einer Zunahme der Testosteronfreisetzung. Dieser Anstieg der Testosteronsekretion war im Mai nur gering und statistisch nicht signifikant. Im August und Dezember erfolgte dagegen eine signifikante Zunahme der Testosteronkonzentration (August: von  $0,9 \pm 0,1$  unmittelbar vor auf  $2,0 \pm 0,5$  ng/ml 150 Minuten nach Naloxon,  $p < 0,001$ ; Dezember: von  $0,3 \pm 0,1$  unmittelbar vor auf  $0,8 \pm 0,2$  ng/ml 150 Minuten nach Naloxon,  $p < 0,05$ ).

Mit den eigenen Untersuchungen wurde erstmalig für den Hengst eine Beteiligung endogener opioider Systeme an der Regulation der Sekretion von LH und Testosteron nachgewiesen. Diese Mechanismen unterliegen jahreszeitlichen Veränderungen. Die Aktivität der die LH- und Testosteronfreisetzung hemmenden opioiden Systeme ist während der Zuchtsaison im Vergleich zur Zeit der Deckruhe reduziert. Außerhalb der Decksaison liegt dagegen eine vermehrte opioide Inhibition der GnRH- oder LH-Sekretion vor. Über diese Mechanismen sind endogene opioide Peptide vermutlich an der Regulation saisonaler Veränderungen der Reproduktionsaktivität des Hengstes beteiligt.

## **6. Summary**

**Ann-Christin Pluschke (1994):**

**Endocrinology of reproduction in the stallion - endogenous opioid regulation of LH and testosterone release.**

**In this study, the role of endogenous opioid systems for the regulation of luteinising hormone (LH) and testosterone release in stallions was investigated. A possible influence of seasonal factors and gonadal steroids was determined.**

**The experiments were performed in 20 stallions and 10 geldings. The animals were injected i.v. with the opioid antagonist naloxone (300 mg) and saline as control. Naloxone and saline experiments were performed in the same animals one week apart. Blood samples were taken from 60 minutes before to 270 minutes after naloxone or saline injections at 15 minute intervals. To determine pituitary responsiveness to GnRH, at 210 minutes after naloxone or saline, all animals were injected with the gonadotrophin releasing hormone (GnRH) agonist buserelin.**

**Experiments were performed in stallions during May (n=5), August (n=8) and December (n=7) and in geldings during May (n=10). In all blood samples LH and testosterone were measured by radioimmunoassay. In selected samples, LH was also determined with an in vitro bioassay, measuring LH stimulated testosterone release of murine leydig cells in culture.**

**In stallions there were marked seasonal differences in basal hormone concentrations. Basal LH secretion in May and August was significantly higher than in December (May  $11.6 \pm 0.6$ , August  $10.7 \pm 0.4$ , December  $9.0 \pm 0.5$  ng/ml). Mean basal LH values in geldings were  $10.0 \pm 1.0$  ng/ml. Plasma testosterone concentrations in stallions were highest in August ( $0.85 \pm 0.09$  ng/ml) and lowest in December ( $0.27 \pm 0.04$  ng/ml);**

May  $0.68 \pm 0.13$  ng/ml). Basal Testosterone concentration in geldings were at the lower detection limit of the radioimmunoassay (0.01 ng/ml).

Naloxone caused a significant increase in LH release in stallions in August and December ( $p < 0.001$ ), no significant increase was found in May ( $p = 0.06$ ). In August mean plasma LH concentrations increased from  $10.3 \pm 0.9$  ng/ml 15 minutes before to a maximum of  $13.1 \pm 0.7$  ng/ml 15 minutes after injection of naloxone, and in December increased from  $8.7 \pm 0.8$  ng/ml 15 minutes before to  $11.2 \pm 0.7$  ng/ml 30 minutes after naloxone. In geldings, naloxone did not induce any changes in LH release and in stallions a highly significant correlation was observed in the stallions between basal testosterone concentrations and the LH increment after naloxone ( $r = 0.6649$ ,  $p < 0.001$ ). Therefore, activation of an opioid inhibition of LH release seems to depend on the presence of gonadal steroids.

Buserelin caused a significant increase in plasma LH concentrations in stallions irrespective of the season as well as in geldings. This excludes that a reduced pituitary responsiveness to GnRH or an insufficient LH synthesis in the animals was responsible for the lack of an increase in plasma LH concentrations after naloxone.

LH concentrations measured with a bioassay were higher than corresponding values determined by radioimmunoassay and the ratio of bioactive to immunoactive LH (B:I ratio) was at least 3. Basal bio-LH concentrations in stallions were higher in May than in August and December and in geldings higher than in stallions. The corresponding B:I ratio values were  $5.8 \pm 1.5$  (May;  $n = 5$ ),  $3.9 \pm 0.9$  (August;  $n = 5$ ),  $3.0 \pm 1.0$  (December;  $n = 5$ ) and  $15.5 \pm 2.1$  (geldings;  $n = 3$ ). It can be concluded that in stallions, in addition to seasonal changes in quantitative LH secretion also the bioactivity of LH in the circulation undergoes seasonal variations.

Injection of the opioid antagonist naloxone in May did not induce any changes in LH bioactivity in the stallions whereas in the same animals buserelin caused a small but significant rise in the B:I ratio from  $6.1 \pm 1.4$  to  $7.0 \pm 1.3$  ( $p < 0.01$ ). In August naloxone injection was followed by a marked increase in LH-bioactivity ( $p < 0.05$ ) as well as B:I ratio from  $3.9 \pm 0.9$  to  $6.2 \pm 1.5$  ( $p < 0.05$ ). Buserelin injection was followed by a further increase of both parameters. Also in stallions in December, naloxone caused a significant increase in the B:I ratio (from  $3.0 \pm 1.0$  to  $3.7 \pm 1.1$ ;  $p < 0.05$ ).

The naloxone-induced LH release was followed by increasing plasma testosterone concentrations, this rise in testosterone secretion was affected by season and in stallions in May was only small and statistically not significant. In August and December, however, testosterone concentrations increased significantly after injection of naloxone (August: from  $0.9 \pm 0.1$  immediately before to  $2.0 \pm 0.5$  ng/ml 150 minutes after naloxone,  $p < 0.001$ ; December: from  $0.3 \pm 0.1$  immediately before to  $0.8 \pm 0.2$  ng/ml 150 minutes after naloxone,  $p < 0.05$ ).

In this study, an involvement of endogenous opioid systems in the regulation of LH and testosterone secretion in the stallion could be demonstrated for the first time. Opioids have an inhibitory effect on LH and subsequent testosterone release. These mechanisms undergo seasonal changes, their activity is increased during winter and low during the breeding season. Therefore, by affecting LH or GnRH release, endogenous opioids, at least in part, regulate seasonal changes in reproductive activity in the stallion.