

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Landwirtschaftliche Fakultät

Lehr- und Forschungsschwerpunkt
„Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“

The logo consists of the letters 'U', 'S', and 'L' in a stylized, bold font. The 'U' is green, the 'S' is black, and the 'L' is red. The letters are positioned above two parallel green diagonal lines that extend from the bottom right towards the center.

Forschungsbericht

Nr. 117

Untersuchungen zum Steroidprofil beim Pferd mit Hilfe der GC/MS -
Ein Beitrag zur Interpretation des Steroidprofils in der Dopinganalytik

Verfasser:

Meyer, A. und H. Enbergs

Institut für Physiologie, Biochemie und Hygiene der Tiere

Herausgeber: Lehr- und Forschungsschwerpunkt „Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“, Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Endenicher Allee 15, 53115 Bonn
Tel.: 0228 – 73 2297; Fax.: 0228 – 73 1776
www.usl.uni-bonn.de

Forschungsvorhaben im Auftrag des Ministeriums für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen
Bonn, März 2004

ISSN 1610-2460

Projektleitung: Prof. Dr. H. Enbergs

Projektbearbeiter: Dipl.-Ing. agr. Anja Meyer

Institut für Physiologie, Biochemie und
Hygiene der Tiere
Katzenburgweg 7-9
53115 Bonn

Zitiervorschlag:

MEYER, A. und H. ENBERGS (2004): Untersuchungen zum Steroidprofil beim Pferd mit Hilfe der GC/MS - Ein Beitrag zur Interpretation des Steroidprofils in der Dopinganalytik. Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL, 117, 70 Seiten.

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	
	Verzeichnis der Tabellen	
	Verzeichnis der Abbildungen	
1.	Einleitung	1
1.1.	Problemstellung / Wissensstand	1
1.2.	Zielsetzung	3
2.	Material und Methoden	4
2.1.	Probenmaterial	4
2.2.	Gewinnung, Transport und Lagerung der Harnproben	5
2.3.	Analyse der Harnproben	6
2.3.1.	Herstellung der Eichlösung für endogene Steroide	6
2.3.2.	Probenvorbereitung	7
2.3.3.	Derivatisierung der Steroide	8
2.3.4.	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS)	8
2.3.5.	Bestimmung der Harnflußrate	8
2.4.	Statistische Auswertung der Analysenergebnisse	9
2.5.	Diskussion zur Probengewinnung und Analysenmethodik	9
3.	Ergebnisse	11
3.1.	Qualitativer Nachweis der endogenen Steroide	11
3.2.	Quantitativer Nachweis der endogenen Steroide	12
3.2.1.	Referenzwerte - Definition	12
3.2.2.	Referenzpopulation - Definition	13
3.2.3.	Bestimmung von Referenzwerten für die Konzentrationen endogener Steroide im Harn von Stuten mit unbekanntem Zyklusstadium (Referenzpopulation 1)	14

3.2.3.1.	Bestimmung der Sexualsteroidkonzentrationen	14
3.2.3.2.	Bestimmung der Corticosteroidkonzentrationen	18
3.2.4.	Bestimmung von Referenzwerten für die Konzentrationen endogener Steroide im Harn von Stuten Im Östrus und im Diöstrus (Referenzpopulation 2)	20
3.2.4.1.	Diskussion zur Androgenkonzentration der Referenzpopulationen 1 und 2	23
3.2.4.2.	Diskussion zur Östrogenkonzentration der Referenzpopulationen 1 und 2	26
3.2.4.3.	Diskussion zur Gestagenkonzentration der Referenzpopulationen 1 und 2	27
3.2.5.	Bestimmung von Referenzwerten für die Konzentrationen endogener Steroide im Harn von Stuten mit Virilisierungserscheinungen (Referenzpopulation 3)	28
3.2.5.1.	Vergleich der Steroidprofile virilisierter und nicht virilisierter Stuten	32
3.2.5.1.1.	Diskussion zum Steroidprofil im Harn virilisierter Stuten	37
3.2.6.	Faktorielle Beeinflussung des endogenen Steroidprofils	38
3.2.6.1.	Einflussfaktor Alter	38
3.2.6.1.1.	Diskussion zum Einflussfaktor Alter	43
3.2.6.2.	Einflussfaktor ovarieller Defekt	43
3.2.6.2.1.	Diskussion zum Einflussfaktor ovarieller Defekt	50
3.2.6.3.	Einflussfaktor Virilisierungsstärke	51
3.2.6.3.1.	Diskussion zum Einflussfaktor Virilisierungsstärke	56
3.2.6.4.	Einflussfaktor Fruchtbarkeitsstatus	56
3.2.6.4.1.	Diskussion zum Einflussfaktor Fruchtbarkeitsstatus	61
4.	Zusammenfassung	62
5.	Schlussfolgerungen für die Umsetzung der Ergebnisse in der Praxis	64
6.	Literaturverzeichnis	65

Tabellenverzeichnis

Tab.1	Jahresstatistik 2000/ 2001 – Anzahl der Analyten, durchgeführt im Auftrag der deutschen Pferdesportverbände
Tab.2	Deuterierte interne Standards: Konzentrationen der Arbeitslösungen und resultierende Konzentrationen pro ml Urin
Tab.3	Identifizierte endogene Steroide im Harn von Stuten
Tab.4	Das Konzept der Referenzwerte
Tab.5	Komponenten der biologischen Streuung der Referenzwerte für Parameter des endogenen Steroidprofils
Tab.6	Vergleich des endogenen Steroidprofils virilisierter und nicht virilisierter Warmblutstuten im Östrus
Tab.7	Vergleich des endogenen Steroidprofils virilisierter und nicht virilisierter Warmblutstuten im Diöstrus
Tab.8	Vergleich des endogenen Steroidprofils virilisierter und nicht virilisierter Vollblutstuten im Östrus
Tab.9	Vergleich des endogenen Steroidprofils virilisierter und nicht virilisierter Vollblutstuten im Diöstrus
Tab.10	Vergleich der Steroidprofile virilisierter Warmblutstuten der Altersgruppen 1 und 2 im Östrus
Tab.11	Vergleich der Steroidprofile virilisierter Vollblutstuten der Altersgruppen 1 und 2 im Östrus
Tab.12	Vergleich der Steroidprofile virilisierter Warmblutstuten der Altersgruppen 1 und 2 im Diöstrus
Tab.13	Vergleich der Steroidprofile virilisierter Vollblutstuten der Altersgruppen 1 und 2 im Diöstrus
Tab.14	Ovarielle Defekte bei virilisierten Warm- und Vollblutstuten Konzentration von Östrogenen

Abbildungsverzeichnis

- Abb.1 Schema zum Mechanismus der gesteigerten Androgenproduktion der Nebenniere bei Enzymdefekten der 21 β -Hydroxylase, der 11 β -Hydroxylase sowie der 3 β -Dehydrogenase
- Abb.2 Vergleichende Darstellung des Androgenprofils aus Harnproben zweier Stutenpopulationen (Ref.Pop.1) der Rassen Warmblut und Vollblut
- Abb.3 Vergleichende Darstellung des Östrogenprofils aus Harnproben zweier Stutenpopulationen (Ref.Pop.1) der Rassen Warmblut und Vollblut
- Abb.4 Vergleichende Darstellung des Gestagenprofils aus Harnproben zweier Stutenpopulationen (Ref.Pop.1) der Rassen Warmblut und Vollblut
- Abb.5 Vergleichende Darstellung des Corticosteroidprofils aus Harnproben zweier Stutenpopulationen (Ref.Pop.1) der Rassen Warmblut und Vollblut
- Abb.6 Vergleichende Darstellung des Sexualsteroidprofils aus Harnproben zweier Stutengruppen (Ref.Pop.2) der Rassen Warmblut und Vollblut im Östrus
- Abb.7 Vergleichende Darstellung des Sexualsteroidprofils aus Harnproben zweier Stutengruppen (Ref.Pop.2) der Rassen Warmblut und Vollblut im Diöstrus
- Abb.8 Die Synthese von Östradiol im Ovar der Stute
- Abb.9 Vergleichende Darstellung des endogenen Sexualsteroidprofils aus Harnproben zweier Stutengruppen mit Virilisierungserscheinungen (Ref.Pop.3) der Rassen Warmblut und Vollblut im Östrus
- Abb.10 Vergleichende Darstellung des endogenen Sexualsteroidprofils aus Harnproben zweier Stutengruppen mit Virilisierungserscheinungen (Ref.Pop.3) der Rassen Warmblut und Vollblut im Diöstrus
- Abb.11 Vergleich der Sexualsteroidprofile virilisierter Warmblutstuten im Östrus mit und ohne Tumor
- Abb.12 Vergleich der Sexualsteroidprofile virilisierter Vollblutstuten im Östrus mit und ohne Tumor
- Abb.13 Vergleich der Androgen- und Östrogenprofile virilisierter Warmblutstuten im Diöstrus mit und ohne Tumor
- Abb.14 Vergleich der Gestagenprofile virilisierter Warmblutstuten im Diöstrus mit und ohne Tumor
- Abb.15 Vergleich der Androgen- und Östrogenprofile virilisierter Vollblutstuten im Diöstrus mit und ohne Tumor
- Abb.16 Vergleich der Gestagenprofile virilisierter Vollblutstuten im Diöstrus mit und ohne Tumor
- Abb.17 Vergleich der Steroidprofile virilisierter Warmblutstuten mit VG 1 und VG 2 im Östrus
- Abb.18 Vergleich der Steroidprofile virilisierter Vollblutstuten mit VG 1 und VG 2 im Östrus
- Abb.19 Vergleich der Steroidprofile virilisierter Warmblutstuten mit VG 1 und VG 2 im Diöstrus

- Abb.20 Vergleich der Steroidprofile virilisierter Vollblutstuten mit VG 1 und VG 2 im Diöstrus
- Abb.21 Vergleich der Steroidprofile virilisierter Warmblutstuten mit einer Fruchtbarkeitsrate (FR) =0% oder >0% im Östrus
- Abb.22 Vergleich der Steroidprofile virilisierter Vollblutstuten mit einer Fruchtbarkeitsrate (FR) =0% oder >0% im Östrus
- Abb.23 Vergleich der Steroidprofile virilisierter Warmblutstuten mit einer Fruchtbarkeitsrate (FR) =0% oder >0% im Diöstrus
- Abb.24 Vergleich der Steroidprofile virilisierter Vollblutstuten mit einer Fruchtbarkeitsrate (FR) =0% oder >0% im Diöstrus

1. Einleitung

1.1. Problemstellung / Wissensstand

Die Bestimmung endogener Steroide wurde bislang immer im Hinblick auf einzelne ausgewählte Hormone durchgeführt. So dient sie in der Pferdezucht vor allem der Diagnose und Behandlung von Fruchtbarkeitsstörungen.

Im Rahmen systematischer Dopingkontrollen werden dagegen Analysen mehrerer ausgewählter Steroide durchgeführt. Die Auswahl der Pferde erfolgt in diesen Fällen nach dem Zufallsprinzip oder in einem begründeten Verdachtsfall. Dieser kann sich bereits bei der klinischen Untersuchung ergeben, wenn z.B. Stuten ein hengstartiges Verhalten zeigen.

Nach dem derzeitigen Stand der endokrinologischen Forschung sind jedoch solche Virilisierungssymptome nicht notwendigerweise auf eine Hormonbehandlung zurückzuführen. Sie können auch durch verschiedene endogene Störungen im Steroidstoffwechsel hervorgerufen werden. Hierzu zählen krankhafte organische Veränderungen der Ovarien, wie Ovarhämatoome und Ovarneoplasien, die sich klinisch durch eine maskuline Muskelentwicklung (MEYERS-WALLEN, 1997), anhaltende Rosse oder Azyklie (PIQUETTE, 1990) und endokrinologisch durch erhöhte Testosteronwerte (STABENFELDT, 1979) äußern können.

Weiterhin sind in der Humanmedizin bereits verschiedene erbliche Enzymdefekte bekannt, die unter dem Begriff Adrenogenitales Syndrom (AGS) zusammengefaßt werden (vergl. Abb.1) und ebenfalls zu Virilisierungerscheinungen führen.

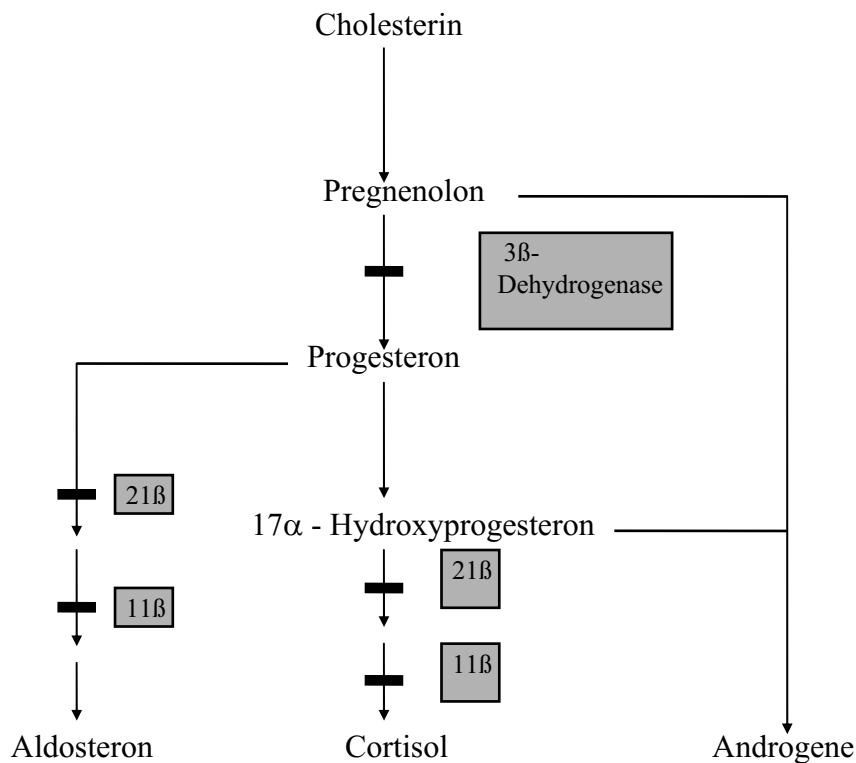


Abb.1 : Schema zum Mechanismus der gesteigerten Androgenproduktion der Nebenniere bei Enzymdefekten der 21 β - Hydroxylase, der 11 β - Hydroxylase sowie der 3 β - Dehydrogenase (GREILING , 1989)

Eine Androgen-Überproduktion wird dabei durch Störungen der Cortison-Biosynthese verursacht, die über eine Entkopplung der negativen adrenal-hypophysären Feedbackregelung zu einem ACTH-abhängigen adrenalen Hyperandrogenismus führen. Ob diese Störungen ursächlich für den bei Stuten auftretenden adrenalen Virilismus (Fertilitätsstörungen, Gebißanomalien, physische und psychische Maskulinisierung) sein könnte, ist bisher noch unklar. Naheliegender wäre ein Defekt der 21 - Hydroxylase, der auch beim Menschen in 95% der Fälle die Ursache für das Auftreten des adrenogenitalen Syndroms ist.

Das Gen für die Steroid-21-Hydroxylase befindet sich in der MHC-Region und ist mit dem C4-Gen gekoppelt. Bisher gibt es jedoch keinen Hinweis auf eine C4- und 21- Hydroxylase Genkopplung bei der Stute (KAY et al. , 1987).

In einem früheren Projekt wurde auf der Basis der Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) ein neues spezifisches Analyseverfahren für den qualitativen und quantitativen Nachweis endogener Steroide in Pferdeurinen mit einer großen Substanzpalette entwickelt und validiert (STROMPEN, 2001), das zur Untersuchung der vorliegenden Fragestellung herangezogen werden kann.

1.2. Zielsetzung

Im Bereich der Dopinganalytik ist die quantitative Bestimmung und die Festlegung von Referenzbereichen und Referenzlimits endogener Steroide gerade in Bezug auf den Aussagewert der durchgeführten Analyse von großer Bedeutung.

Ziel des zu beschreibenden Vorhabens ist es, auf der Basis der in einem Forschungsprojekt von STROMPEN (2001) entwickelten gaschromatographisch- massenspektrometrischen Harnsteroidprofilanalyse konkrete Angaben zu Referenzwerten des endogenen Steroidprofils hinsichtlich ihrer Geschlechtsmerkmale unauffälliger Stuten zu machen. Dabei wird ein rassenspezifischer Vergleich zwischen Warm- und Vollblutstuten angestrebt sowie das jeweilige Zyklusstadium der Stuten berücksichtigt. Desweiteren sollen zum Vergleich Steroidprofile von aufgrund verschiedener endogen verursachter Störungen virilisierter Stuten der gleichen Rassen auf Abweichungen analysiert werden. Als Einflussfaktoren werden Alter, ovarielle Defekte, Virilisierungsstärke und Reproduktionsstatus in die Untersuchung mit einbezogen.

2. Material und Methoden

2.1. Probenmaterial

Das Probenmaterial bestand aus drei unterschiedlichen Probenarten:

1. Zyklusunabhängige anonyme Harnproben von Stuten

Für den ersten Teil der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen standen Urinproben aus der Routine-Dopinganalytik der Jahre 2000 und 2001 zur Verfügung (s.Tabelle 1)

Tab. 1 : Jahresstatistik 2000/01: Anzahl der Harnanalysen, durchgeführt im Auftrag deutscher Pferdesportverbände

Verband	2000	2001
Deutsche Reiterliche Vereinigung	707	469
Direktorium für Vollblutzucht und Rennen	927	1031
National Racing Horse Ass. Germany	14	15

Trotz Anonymität der einzelnen Harnproben können diese nach Geschlecht, Alter und Rasse der zugehörigen Pferde unterteilt und somit verschiedenen Pferdepopulationen zugeordnet werden. Die Referenzpopulationen bestanden aus Stuten der Rassen Vollblut (n=272) und Warmblut (n=260), bei denen eine Beeinflussung des Steroidprofils durch Anabolika, Corticosteroide und Proteohormone (Gonadotropine, ACTH) ausgeschlossen war. Allerdings war die Zyklusphase, in der die Harnproben gewonnen wurden, nicht bekannt.

2. Harnproben, gezielt entnommen im Östrus und Diöstrus der Stuten

Es wurden weiterhin jeweils 20 Harnproben von in der Geschlechtsausprägung unauffälligen Stuten der Rassen Voll- und Warmblut genommen. Davon befanden sich 10 Stuten im Östrus und 10 Stuten im Diöstrus. Um einen möglichst einheitlichen Zeitpunkt der Probenentnahme zu garantieren, wurden neben der Beobachtung der klinischen Rosse Follikelkontrollen durchgeführt. Die Harnproben wurden bei einem Follikeldurchmesser von durchschnittlich 45 mm, also etwa einen Tag vor der Ovulation (GINTHER, 1979), genommen. Bei denselben Stuten wurden dann 10 Tage später, also im Diöstrus, noch einmal Harnproben entnommen.

3. Harnproben von Stuten mit Virilisierungserscheinungen

Die Probengewinnung erfolgte auf verschiedenen Gestüten, bzw. Reitbetrieben, in denen bei Stuten Symptome einer Virilisierung durch den behandelnden Tierarzt diagnostiziert worden waren. Insgesamt wurden Harnproben von 49 Stuten genommen. Die Rassenverteilung war folgende:

- Warmblutstuten: 27
- Vollblutstuten: 22

Mögliche Einflußfaktoren wie Alter, Zuchtjahre, Anzahl der Fohlen der Stuten und die Zyklusphase, während der die Probenentnahme erfolgte, wurden schriftlich festgehalten. Es wurde die jeweilige Fruchtbarkeitsquote bestimmt, die dem Quotienten aus der Anzahl der Fohlen und der Anzahl der Zuchtjahre entspricht. Die Virilisierungssymptome der Stuten wurden untergliedert in tumorbedingte und somatische Symptome ohne bekannte Ursache sowie Abweichungen im Verhalten.

2.2. Gewinnung, Transport und Lagerung der Harnproben

Infolge der Tageszeitabhängigkeit endokrinologischer Meßgrößen wurden die Harnproben nach Möglichkeit am Vormittag (8.00-11.30 h) gewonnen. Hierbei wurden zwei Methoden angewandt:

1. Animierung zur Harnentleerung durch Frischeinstreu in der Box oder im Untersuchungsstand

Vor der Gewinnung der Harnproben wurde die Box der jeweiligen Stute, bzw. der Untersuchungsstand frisch eingestreut, um einen Reflex zur Harnentleerung auszulösen.

2. Induzierte spontane Harnentleerung bei voller Blase durch Akupunktur
(MUXENEDER, 2002)

Bei der Akupunktur wird davon ausgegangen, daß bestimmte Punkte am Körper eine funktionelle Einheit, sogenannte Meridiane, bilden. Die Akupunkturpunkte sind besondere Stellen auf diesen Meridianen, an denen diese einer Reizung oder Einflussnahme von außen besonders zugänglich sind. Für die spontane Harnentleerung stehen vier

verschiedene Akupunkturpunkte zur Verfügung, die in unterschiedlichen Kombinationen miteinander zum Erfolg führen können. Diese sind:

- AP 1 = ventral zwischen Schweifansatz und Anus (Stichtiefe bis zu 3 cm)
- AP 2 = zwischen erstem und zweitem Schwanzwirbel (Stichtiefe bis ca. 1 cm)
- AP 3 = zwischen Kreuzbein und erstem Schwanzwirbel (Stichtiefe bis ca. 1 cm)
- AP 4 = im Spatium lumbosacrale (Lumbalbereich) (Stichtiefe 3-5 cm)

Als Punktekombinationen wurden zur Harngewinnung AP 3+AP 4, AP 2+AP 4 oder AP 2+AP 3 empfohlen (MUXENEDER, 2002).

In der vorliegenden Untersuchung führte jedoch nur die Punktekombination AP 3+AP 4 bei voller Blase der Stuten zum Erfolg. Um eine optimale Blasenfüllung zu erreichen, wurde den Stuten vor allem nach der Arbeit zusätzliches Trinkwasser angeboten. Zur zusätzlichen Stimulierung für eine Harnentleerung wurden die Nadeln nach dem Einstich leicht gedreht. Die Wirkung trat dann nach 10 bis max. 15 min ein.

Aufgrund der meist hohen Aggressivität der Stuten war die Anwendung der Akupunkturmethodik nur bei 10 Tieren möglich. Ein Erfolg bei der Harngewinnung trat jedoch nur in 6 Fällen ein.

Bei längeren Transportwegen wurden die Proben nach der Gewinnung bei -20°C tiefgefroren, auf Trockeneis transportiert und im Gefrierraum des Instituts bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

2.3. Analyse der Harnproben

Die Probenanalyse erfolgte in vier Schritten, die nachfolgend erläutert werden. Zusätzlich wurde als Korrekturfaktor die Harnflussrate bestimmt.

2.3.1. Herstellung der Eichlösung für endogene Steroide

Die Eichlösung wird durch Verdünnen aus Stammlösungen mit einer Konzentration von ca. 1 mg/ml (analytisch genau eingewogen) hergestellt.

Tab. 2: Deuterierte interne Standards: Konzentration der Arbeitslösungen und resultierende Konzentration pro ml Urin

Interner Standard	Arbeitslösung (µg/ml)	Urin (ng/ml)
d5-Androsteron-17β-D-glucuronid	10	40
d4-Etiocholanolon	10	40
d4-Androsteronsulfat	25	100
d3-Testosteron	10	40
d6-Cortisol	40	80

Zur Herstellung der Eichlösung werden 10µl der Arbeitslösung der endogenen Steroide und 10µl der Lösung des internen Standards d3-Testosteron/d4-Etiocholanolon sowie 5µl der Lösung des internen Standards d6-Cortisol in ein Probengefäß gegeben. Es wird im Vakuum zur Trockene eingengt und mit 50µl Silylierungsreagenz (MSTFA/NH₄I/Ethanthiol 1000:2:3 (v:w:v)) versetzt. Danach erfolgt die Derivatisierung bei 60°C für 2 Stunden.

2.3.2. Probenvorbereitung

2,5 ml Pferdeurin werden mit 0,5 ml Natriumphosphatpuffer (0,8; pH 7) versetzt. Der pH-Wert wird mit pH-Indikatorstäbchen gemessen und gegebenenfalls mit NaOH oder HCL auf pH 7 eingestellt. Nach dem Zufügen der internen Standards (d6-Cortisol; d5-Androsteronglucuronid/d4-Etiocjolanolon) werden 75 µl β-Glucuronidase aus E.coli (Boehringer Mannheim GmbH, 127680) zugesetzt. Die Inkubationszeit beträgt 16 Stunden bei 37°C oder 3 Stunden bei 50°C.

Die Überstände der zentrifugierten Hydrolysate werden auf konditionierte Sep-Pak-C18-Kartuschen (Waters) gegeben. Die Durchläufe und die nach dem Waschen mit 2 ml dest. Wasser angefallenen Eluate werden verworfen.

Die Aglycone und originär freien Steroide werden mit 2 ml n-Hexan und 4 ml tert. Butylmethylether (TBME) eluiert. Das Eluat wird mit 1 ml 1M NaOH gewaschen. Nach dem Zentrifugieren wird die organische Phase am Vakuumrotationsverdampfer zur Trockene eingengt.

Die adsorbierten sulfokonjugierten Steroide werden nach Zusatz des internen Standards d3-Testosteron/d4-Androsteronsulfat mit 5 ml des Lösungsmittelgemisches(Solvolyse-Mix)

Methanol/Ethylacetat/H₂SO₄ (20ml/100ml/200µl v:v:v) eluiert. Anschließend wird eine Solvolyse für 90 min bei 55°C durchgeführt. Das Solvolysat wird nach Zusatz von 0,3 ml 1M NaOH am Vakuumrotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wird in 7 ml TBME aufgenommen. Die Lösung wird mit 1 ml 1 M NaOH gewaschen. Nach dem Zentrifugieren wird die organische Phase am Vakuumrotationsverdampfer eingengt.

2.3.3. Derivatisierung der Steroide

Zur Derivatisierung der Steroide wird der getrocknete Rückstand mit 50ml MSTFA/NH₄I/Ethanthiol (1000:2:3; v:w:v) für 2 Stunden bei 60°C erhitzt.

2.3.4. Gaschromatographie – Massenspektrometrie (GC/MS)

Als GC/MS-System wurde eine Direktkopplung von HP 5890 II (GC) und HP5971 A (MS) verwendet. Die Analyse erfolgte dann unter folgenden Bedingungen:

- Säule: HP Ultra-1 Quarzkapillarsäule (17m; 0,2mm i.D.; 0,11µm Filmdicke
- Injektionssystem: Kapillareinspritzblock (3µl Injektionsvolumen; 300°C Inj.temperatur)
- Trägergasfluß: 1 ml/min Helium
- Temperatur der GC/MS-Kopplung: 325°C

Die Identifizierung der Steroide erfolgt im Full-Scan-Modus (Massenbereich: 40-650 amu; Scanzeit: 1,8 Scans/sec). Die einzelnen Steroidmetabolite werden über eine automatische Berechnung der Flächen der betreffenden Peaks quantifiziert. Die quantitativen Analysen werden im ionenselektiven Messmodus SIM („Selected-Ion-Monitoring“) durchgeführt.

2.3.5. Bestimmung der Harnflußrate

Mit dem Konzentrationszustand des Harns ändert sich auch die Konzentration der gemessenen Steroide. Zur Korrektur wurde die Harnflußrate durch die „Kreatinin-Clearance“ bestimmt. Kreatinin ist ein spontan und irreversibel entstehendes Umwandlungsprodukt des Kreatins. Es gilt als besonders wichtiger Metabolit im Blutplasma und wird über die Niere ausgeschieden. Die Ausscheidung ist immer weitgehend konstant. Daher kann Kreatinin als quantitative Bezugsgröße für die Ausscheidung anderer Harnbestandteile herangezogen werden. Die Kreatinin-Clearance wird wie folgt berechnet:

$$\text{Kreatinin-Clearance (ml/min)} = [C_u (\mu\text{mol/l}) * V_u (\text{ml})] \div \text{Urinsammelzeit (min)}$$

C_u = Kreatininkonzentration im Urin

V_u = Urinvolumen der Sammelprobe

2.4. Statistische Auswertung der Analysenergebnisse

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mit Hilfe des PC-Programmes SigmaSTAT® für EXCEL. Die Proben der Stuten wurden nach verschiedenen Gesichtspunkten in Gruppen zusammengefaßt und miteinander verglichen. Danach wurden die Unterschiede auf Signifikanz geprüft (signifikant für alle $p \leq 0,05$, hochsignifikant für alle $p \leq 0,01$).

2.5. Diskussion zur Probengewinnung und Analysenmethodik

Von den bei DREYER – RENDELSMANN (1988) beschriebenen Verfahren zur **Probengewinnung** wurde zunächst das Harnentnahmeverfahren getestet, das auf der Einführung einer frisch geschnittenen Zitronenscheibe in die Vagina der Stute beruht. Durch den so erzeugten mechanischen und chemischen Reiz wird bei voller Blase eine spontane Harnentleerung nach ca. 3-10 Minuten induziert. Die Erfolgsquote wird dabei generell als hoch eingestuft. Diese Methode ist jedoch mit einer unangenehmen Empfindung verbunden. Nach DREYER – RENDELSMANN ist eine solche Harnentnahme bei im Umgang schwierigen Stuten nicht ungefährlich, bzw. unmöglich. Da die hier untersuchten Stuten der Referenzpopulation 3 über ein gesteigertes Aggressionspotential verfügen, wurde diese Methode ebenfalls als nicht ungefährlich für den Probennehmer angesehen, auch bei einer Probengewinnung im Untersuchungsstand. Aus diesem Grund erschien ein Hinweis von MUXENEDER (2002) interessant, den Harn durch Akupunktur zu gewinnen. Von den drei dazu empfohlenen Punktekombinationen führte jedoch nur eine zur spontanen Harnentleerung. Hierbei handelte es sich um die Kombination von AP 3 (Punkt auf den dorsalen Medianen zwischen Kreuzbein und 1. Schwanzwirbel) und AP 4 (Bai Hui, gelegen im Spatium lumbosacrale). Zwar war der Risikofaktor bei der Probenentnahme durch Akupunktur im Vergleich zur Applikation einer Zitronenscheibe geringer, die Anwendung dieser Methode war jedoch aufgrund der Aggressivität der Stuten nur bei 10 Stuten möglich. Ein Erfolg trat dabei allerdings nur in 6 Fällen ein. Die Harnabgabe erfolgte dabei nach 20-30 Minuten. Als effektivste Methode erwies sich die Animierung zur Miktion durch Frischeinstreu in der Box oder im Untersuchungsstand aufgrund eines bedingten Reflexes (BLENDINGER, 1980). Dieser Reflex wird durch auditive, visuelle oder taktile Reize ausgelöst. Es könnte sich dabei jedoch auch um den natürlichen Reflex der Reviermarkierung des Pferdes handeln. Die Harngewinnung war mit einer Dauer von 1-2 Stunden zwar wesentlich zeitaufwendiger, sie führte jedoch immer zum gewünschten Ergebnis.

Das hier angewandte **Analysenverfahren** wurde von STROMPEN (2001) auf der Basis der GC/MS entwickelt und validiert. Auf dieser Grundlage war es möglich, nicht nur einzelne Steroide zu analysieren, wie dies in früheren Untersuchungen hauptsächlich der Fall war (DUMASIA, 1984,1986 ; HOUGHTON, 1988 ; HOLTAN, 1991 ; BONNAIRE, 1994), sondern es konnten insgesamt 22 Steroidhormone erfasst und deren Konzentrationen bestimmt werden. Hier wurde diese Methode erstmalig auch in der klinischen Endokrinologie und zwar im Hinblick auf das Steroidprofil von zyklusgesunden Stuten während des Östrus und im Diöstrus und bei Stuten mit Virilisierungserscheinungen eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Qualitativer Nachweis der endogenen Steroide

In Tabelle 3 sind die identifizierten endogenen Steroide im Harn von Stuten zusammengefasst. Die Tabelle enthält zusätzliche Angaben zur Phase-II-Metabolisierung.

Tab. 3 : Identifizierte endogene Steroide im Harn von Stuten

Steroidklasse	systematischer Name	Trivialname	Konjugation ¹⁾
Androgene:	4-Androsten-17 β -ol-3-on	Testosteron	S / (G) ²⁾
	5 α -Androstan-3 α -ol-17-on	Androsteron	S / G
	5 β -Androstan-3 α -ol-17-on	Etiocholanolon	S / G
	5 α -Androstan-3 β -ol-17-on	Epiandrosteron	S / G
	5 α -Androstan-3 α -ol-11,17-dion	11-Ketoandrosteron	S / (G)
	5 β -Androstan-3 α -ol-11,17-dion	11-Ketoetiocholanolon	S / (G)
	5 α -Androstan-3 β -ol-11,17-dion	11-Ketoepiandrosteron	S / (G)
	5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol	Androstandiol-17 α	G / (S)
	5 α -Androstan-3 β ,17 β -diol	Androstandiol-17 β	S / (G)
	5-Androsten-3 β -ol-17-on	Dehydroepiandrosteron (DHEA)	S / G
	4-Androsten-3,17-dion	Androstendion	S / (G)
	5 α -Androstan-3 α ,11 β -diol-17-on	11-Hydroxyandrosteron	G / (S)
	5 β Androstan-3 α ,11 β -diol-17-on	11-Hydroxyetiocholanolon	G / (S)
	5 α -Androstan-3 β ,11 β -diol-17-on	11-Hydroxyepiandrosteron	S / (G)
Östrogene:	1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-on	Estron	S / (G)
	1,3,5(10)-Estratrien-3,17 α -diol	Estradiol-17 α	S / (G)
	1,3,5(10)-Estratrien-3,17 β -diol	Estradiol-17 β	S / (G)
Gestagene:	5-Pregnen-3 β ,20 α -diol	Pregnendiol-20 α	S / (G)
	5-Pregnen-3 β -20 β -diol	Pregnendiol-20 β	S / (G)
	5 β -Pregnan-3 α ,20 β -diol	Pregnandiol-20 β	S / (G)
	5 α -Pregnan-3 β ,17 α ,20 β -triol	Pregnantriol-20 β	S / (G)
	5 β -Pregnan--3 α ,17 α ,20 α -triol	Pregnantriol-20 α	S / (G)
Corticosteroide:	4-Pregnen-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-dion	Cortisol	F / (G) / (S)
	4-Pregnen-11 β ,17 α ,20 β ,21-tetrol-3-on	20 β -Dihydrocortisol	F / (G) / (S)
	4Pregnen-17 α ,20 β ,21-triol-3,11-dion	20 β -Dihydrocortison	F / (G) / (S)
	4-Pregnen-11 β ,17 α ,20 α ,21-tetrol-3-on	20 α -Dihydrocortisol	F / (G) / (S)
	5 β -Pregnan-3 α ,17 α ,20 α ,21-tetrol-11-on	α -Cortolon	F / (G) / (S)
	5 β -Pregnan-3 α ,17 α ,20 β ,21-tetrol-11-on	β -Cortolon	F / (G) / (S)
	5 β -Pregnan-3 α ,11 β ,17 α 20 α ,21-pentol	α -Cortol	F / (G) / (S)

¹⁾ G=Glucuronide; S=Sulfate; F=Frei ²⁾ ()=untergeordnete Form der Konjugation

3.2. Quantitativer Nachweis der endogenen Steroide

3.2.1 Referenzwerte - Definition

Das Konzept der Referenzwerte beinhaltet eine Theorie für die Bewertung von klinisch-chemischen Analysenergebnissen und beschreibt die Grundsätze und die Methoden für die Auswahl der Referenzpopulation und die Gewinnung von Referenzwerten. Das Konzept der Referenzwerte und die in diesem Zusammenhang bedeutsamen Begriffe sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tab 4: Das Konzept der Referenzwerte

Referenzindividuen	bilden eine
Referenzpopulation	aus der eine
Referenzstichprobe	ausgewählt wird, von der
Referenzwerte	bestimmt werden, aus denen eine
Referenzverteilung	beobachtet wird, mittels derer
Referenzgrenzen	berechnet werden, die
Referenzintervalle	definieren können

Es folgen die Begriffsbestimmungen für die in Tabelle 4 aufgeführten Begriffe:

- Referenzindividuum = Individuum, das nach genau festgelegten Kriterien ausgewählt wird
- Referenzpopulation = besteht aus allen Referenzindividuen
- Referenzstichprobe = passende Anzahl von Referenzindividuen, um eine Referenzpopulation zu repräsentieren
- Referenzwert = Resultat einer Beobachtung oder Messung einer bestimmten Meßgröße bei einem Referenzindividuum
- Referenzverteilung = statistische Verteilung der Referenzwerte
- Referenzgrenze = wird aus der Referenzverteilung bestimmt und für deskriptive Zwecke benutzt
- Referenzintervall = Intervall zwischen zwei Referenzgrenzen und schließt diese mit ein. Das Referenzintervall wird bevorzugt so bestimmt, daß es 95% der Analysenergebnisse der Referenzstichprobe umfaßt. Im Regelfall liegen 2,5% der Ergebnisse oberhalb und 2,5% unterhalb des Referenzintervalls

3.2.2. Referenzpopulation - Definition

Bei der Aufnahme von Referenzindividuen in eine Referenzstichprobe sind Einflußgrößen, die eine biologische Streuung verursachen können, zu berücksichtigen (siehe Tabelle 5).

Tab. 5: Komponenten der biologischen Streuung der Referenzwerte für Parameter des endogenen Steroidprofils

Allgemein	Speziell bei Stuten
Alter	Zyklusphase
Geschlecht	Trächtigkeit
Rasse	Ovarielle Anomalien
Gewicht	
Krankheit	
Einnahme von Arzneimitteln	
Ernährung	
Ort und Bedingungen der Probennahme	
physischer und psychischer Streß	

Einige der in Tabelle 5 aufgeführten Faktoren beeinflussen die Steroidogenese und Steroidexkretion. Für die Steroidkonzentrationsbestimmungen im Harn von Stuten, bei denen das Zyklusstadium nicht bekannt war, wurden anonyme Harnproben, die von der Deutschen Reiterlichen Vereinigung (DRV), bzw. des Direktoriums für Vollblutzucht und -rennen (DVR) und der National Racing Horse Association Germany (NRHAG) eingesandt wurden, verwendet. Eine vollständige Spezifikation war demzufolge hier nicht möglich.

Die **Referenzpopulation 1** wird definiert als:

Warm- und Vollblutstuten, bei denen keine das Steroidprofil beeinflussenden Medikamente verabreicht oder Manipulationen angewendet wurden. Der Gesundheitszustand der Stuten war so gut, daß sie wettkampftauglich waren. Die Urinproben sind nach einem Wettkampf genommen worden. Der genaue Zeitpunkt und Ort der Probennahme, Alter und Gewicht der Stuten sowie deren Zyklusstadium sind unbekannt.

Für die Steroidkonzentrationsbestimmungen im Harn von Stuten, die in der Geschlechtsmerkmalsausprägung unauffällig und deren Zyklusstadien bekannt waren, erfolgte eine gezielte Harnprobenentnahme, bei der einige der oben genannten Faktoren berücksichtigt wurden.

Daraus ergab sich folgende **Referenzpopulation 2** :

Gesunde Warm- und Vollblutstuten im Alter von 7-10 Jahren, die weder tragend noch physischem oder psychischem Streß ausgesetzt waren. Die Probenentnahme erfolgte im gleichen Zeitraum (zwischen 8h und 10.30h) unter vergleichbaren Bedingungen (in der Box oder im Untersuchungsstand).

Auch bei den Stuten, die Virilisierungserscheinungen aufwiesen, war das Zyklusstadium sowie Alter, Rasse, Kondition und Ort / Bedingungen der Probennahme bekannt. Folgende Stuten bilden die **Referenzpopulation 3**:

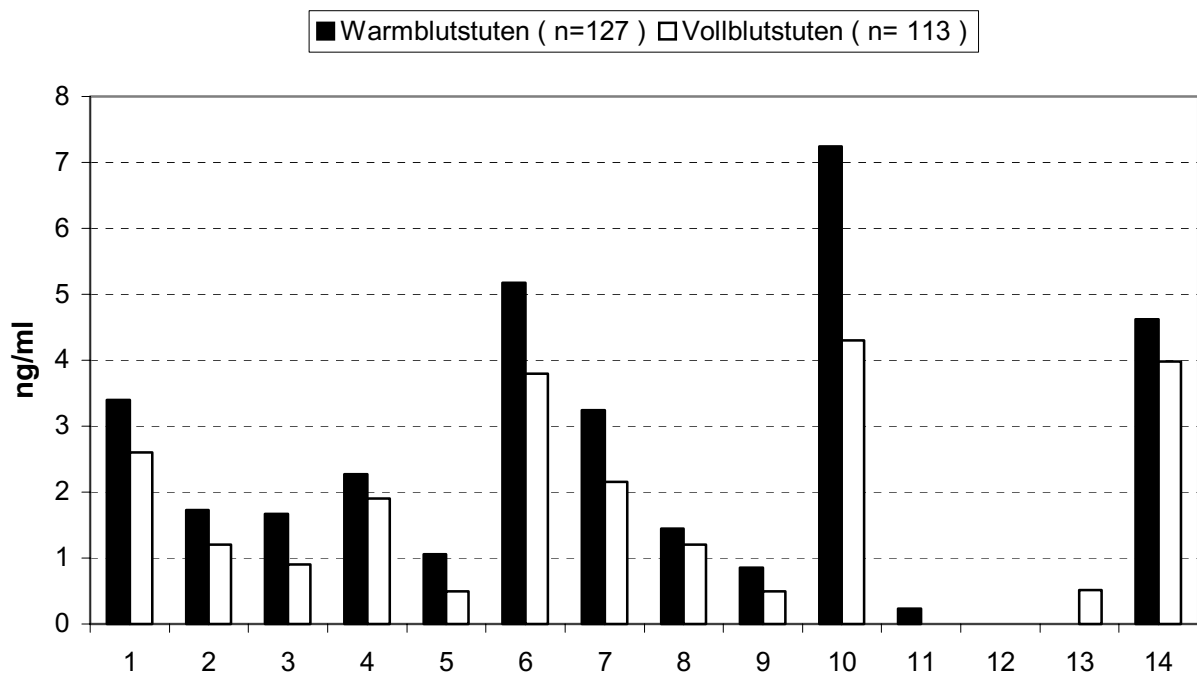
Warmblut- und Vollblutstuten mit Virilisierungserscheinungen unterschiedlichen Grades im Alter von 4-18 Jahren, die weder tragend noch physischem oder psychischem Streß ausgesetzt waren. Auch hier erfolgte die Probenentnahme im gleichen Zeitraum (zwischen 8 und 12 h) unter vergleichbaren Bedingungen (in der Box oder im Untersuchungsstand).

3.2.3. Bestimmung von Referenzwerten für die Konzentrationen endogener Steroide im Harn von Stuten in unbekanntem Zyklusstadium (Referenzpopulation 1)

3.2.3.1. Bestimmung der Sexualsteroidkonzentration im Harn

Nachfolgend sind die Ergebnisse zur Bestimmung der Konzentrationen endogener Steroide im Harn von Warm- und Vollblutstuten aufgelistet. Es wurden Androgene, Östrogene und Gestagene erfasst. Ein Vergleich der Mittelwerte zeigte rassenspezifische Unterschiede. Diese sind nach den Hormongruppen Androgene, Östrogene und Gestagene getrennt in den nachfolgenden Abbildungen graphisch dargestellt.

Abb.2: Vergleichende Darstellung des **Androgenprofils** aus Harnproben zweier Stutengruppen (**Ref.Pop.1**) der Rassen **Warmblut** (n=127) und **Vollblut** (n=113)



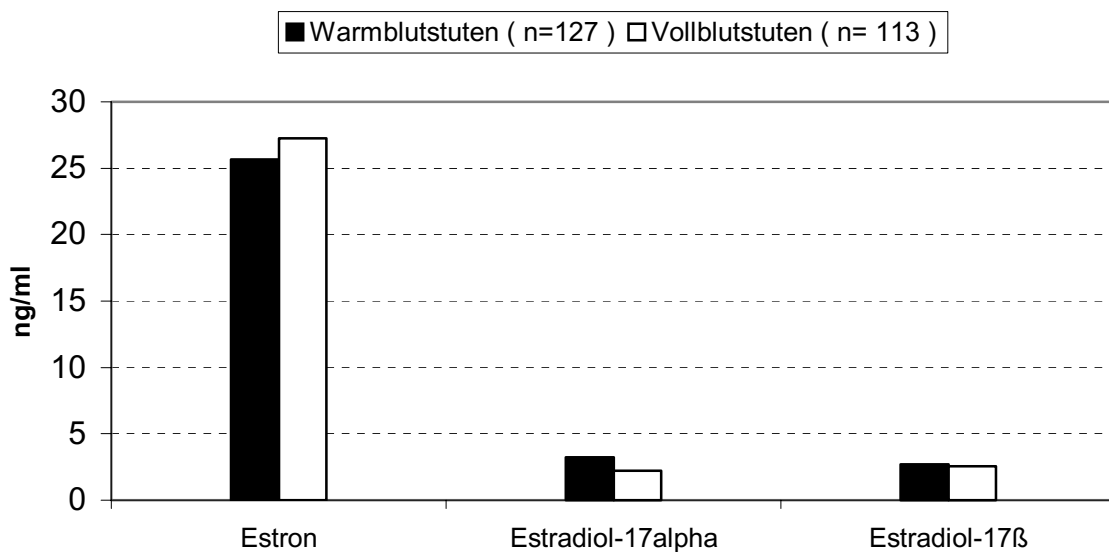
WB	MW	3,4	1,73	1,67	2,27	1,06	5,17	3,24	1,45	0,85	7,24	0,23	0	0	4,62	
	SD	0,31	0,38	0,8	0,49	1,49	0,5	0,75	0,57	0,21	0,4	0,56	0,65	0,45	0,56	
VB	MW	2,6	1,2	0,9	1,9	0,5	3,8	2,16	1,2	0,5	4,3	0	0	0,51	3,98	
	SD	0,25	0,32	0,45	0,22	0,23	0,49	0,26	0,32	0,65	0,47	0,89	0,51	0,85	0,41	
Diff. MW		0,8	0,53	0,77	0,37	0,56	1,37	1,08	0,25	0,35	2,94	0,23	0	0,51	0,64	
Androgenprofil		1= Testo	2= Andro	3= Etio	4= Epiandro	5= 11-Ketoandro	6= 11-Ketoetio	7= 11-Ketoepi	8= Andro17 α	9= Andro17 β	10= DHEA	11= Androstendion	12= 11-Hydandro	13= 11-Hydetio	14= 11-Hydepiandro	

Die **Androgenprofile** der beiden Referenzpopulationen von Warm- und Vollblutstuten zeigen folgende Besonderheiten:

1. Die Gesamtandrogenkonzentration beträgt für Warmblutstuten 32,93 ng/ml und für Vollblutstuten 23,55 ng/ml. Die Werte liegen für Warmblutstuten zwischen 0 und 7,24 ng/ml und für Vollblutstuten zwischen 0 und 4,3 ng/ml.
2. Die Androgenkonzentrationen liegen bei Warmblütern höher als bei Vollblütern.

- Die Unterschiede sind für alle Androgene bis auf Epiandrosteron, Androstandiol-17 α und Androstendion signifikant ($p < 0,05$).
- Einzige Ausnahme ist die Konzentration von 11-Hydroxyandrosteron. Sie liegt im Harn der Vollblutstuten höher. Dieser Unterschied zu den Warmblutstuten war jedoch nur gering und nicht signifikant.

Abb.3: Vergleichende Darstellung des **Östrogenprofils** aus Harnproben zweier Stutengruppen (**Ref.Pop.1**) der Rassen **Warmblut** ($n=127$) und **Vollblut** ($n=113$)



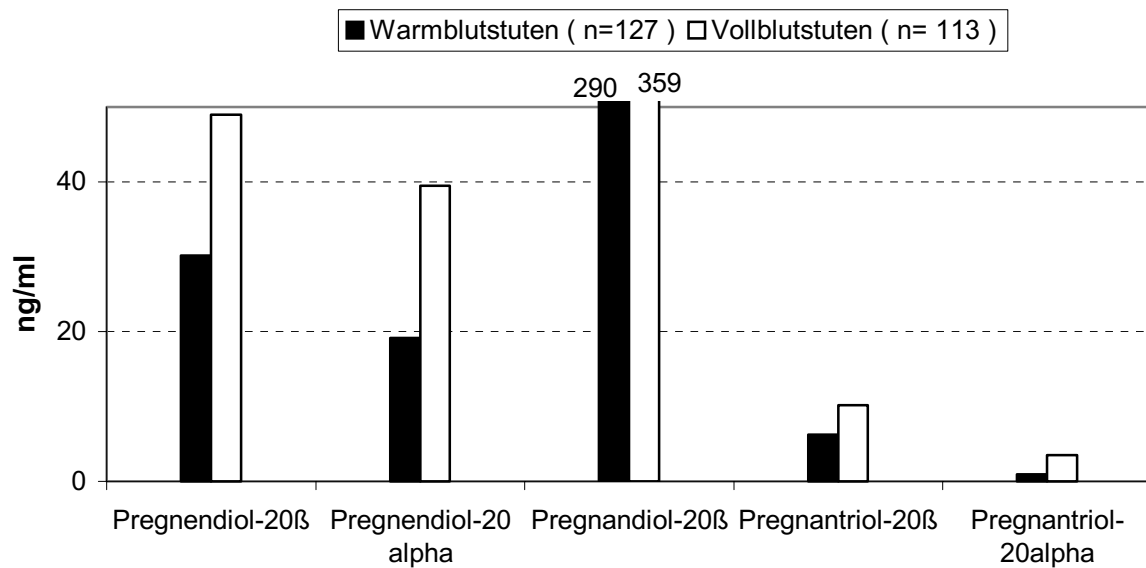
WB	MW	25,66	3,23	2,69
	SD	0,55	3,86	1,1
VB	MW	27,24	2,22	2,58
	SD	1,99	0,94	1,49
Diff. MW		1,58	1,01	0,11
Östrogenprofil		Estron	Estradiol-17 α	Estradiol-17 β

Die **Östrogenkonzentrationen** der beiden Referenzpopulationen ergab folgende Ergebnisse:

- Die Gesamtöstrogenkonzentration beträgt für Warmblutstuten 31,58 ng/ml und für Vollblutstuten 32,04 ng/ml. Die Absolutwerte liegen für Warmblutstuten zwischen 2,69 und 25,66 ng/ml und für Vollblutstuten zwischen 2,22 und 27,24 ng/ml.

2. Die Estronwerte im Harn der Vollblutstuten liegen höher, allerdings nur geringfügig.
3. Die Konzentrationen von Estradiol-17 α und Estradiol-17 β liegen bei den Warmblutstuten höher, jedoch ebenfalls nur geringfügig.
4. Die Unterschiede erwiesen sich nicht als signifikant.

Abb.4: Vergleichende Darstellung des **Gestagenprofils** aus Harnproben zweier Stutengruppen (**Ref.Pop.1**) der Rassen **Warmblut** (n=127) und **Vollblut** (n=113)



WB	MW	30,15	19,12	289,99	6,22	0,97
	SD	0,79	2,41	0,89	2,44	0,77
VB	MW	48,98	39,51	359,21	10,14	3,48
	SD	1,45	2,1	2,77	1,36	2,31
Diff.MW		18,83	20,39	69,22	3,92	2,51
Gestagenprofil		Pregnenndiol-20 β	Pregnenndiol-20 α	Pregnandiol-20 β	Pregnantriol-20 β	Pregnantriol-20 α

Die Analyse **Gestagenkonzentrationen** der beiden Pferderassen brachte folgende Ergebnisse:

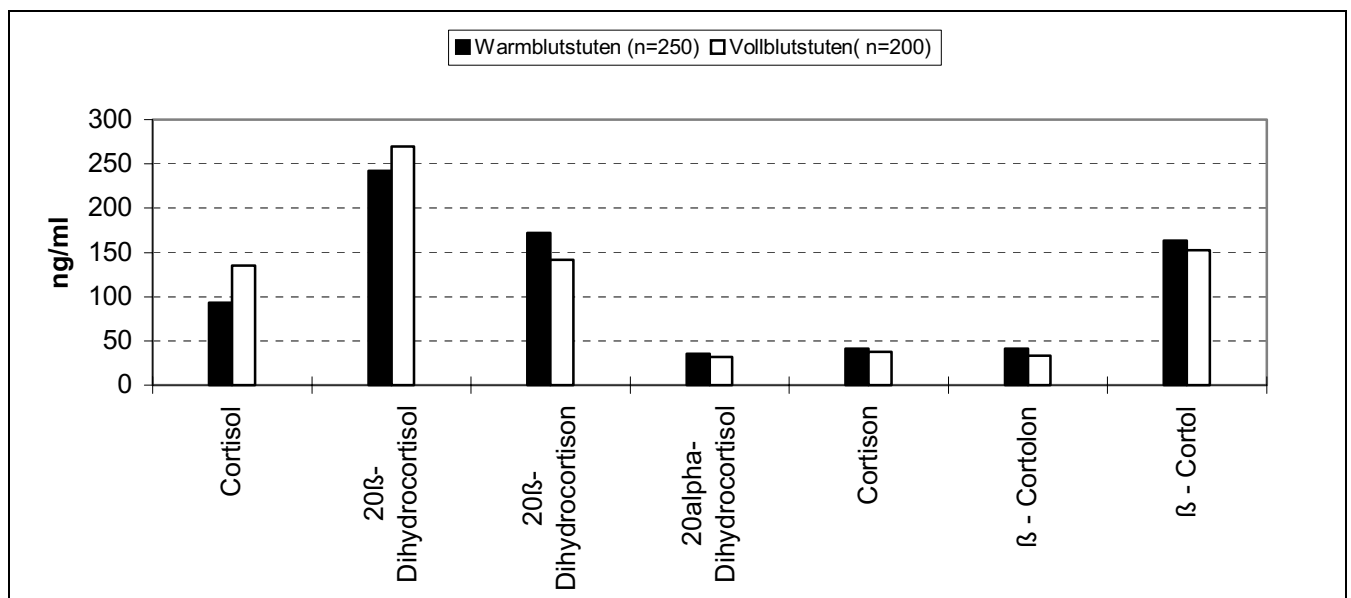
1. Die Gesamtgestagenkonzentration liegt für die Warmblutstuten bei 346,45 ng/ml und für Vollblutstuten bei 461,32 ng/ml. Die Absolutwerte der Warmblutstuten liegen zwischen 0,97 und 289,99 ng/ml und die der Vollblutstuten zwischen 3,48 und 359,21 ng/ml.

2. Die Konzentrationen der analysierten Gestagene sind im Harn der Vollblutstuten beträchtlich höher.
3. Die Unterschiede sind signifikant ($p < 0,05$).

3.2.3.2. Bestimmung der Corticosteroidkonzentrationen

Es wurden die Konzentrationen endogener Corticosteroide im Harn von Warm- und Vollblutstuten der Referenzpopulation 1 erfasst. Die Ergebnisse hierzu sind nachfolgend dargestellt.

Abb.5: Vergleichende Darstellung des **Corticosteroidprofils** aus Harnproben zweier Stutengruppen (**Ref.Pop.1**) der Rassen **Warmblut** (n=250) und **Vollblut** (n=200)



WB	MW	93,55	242,53	172,08	35,41	41,2	41,34	163,36
	SD	3,12	0,62	0,77	1,03	2,68	4,39	5,19
VB	MW	135,5	270	141,4	31,83	37,8	33,22	152,5
	SD	1,83	3,07	3,4	2,4	1,49	1,79	2,5
Diff. MW		41,95	27,47	30,68	3,58	3,4	8,12	10,86
Cortico steroid profil		Cortisol	20β-Dihydrocortisol	20β-Dihydrocortison	20α-Dihydrocortisol	Cortison	β-Cortolon	β-Cortol

Die **Corticosteroidkonzentrationen** im Harn von Warm- und Vollblutstuten zeigt folgende Besonderheiten:

1. Die Gesamtcorticosteroidkonzentration beträgt für Warmblutstuten 789,47 ng/ml und für Vollblutstuten 802,25 ng/ml. Die Absolutwerte liegen zwischen 41,2 und 242,53 ng/ml bei Warmblutstuten und zwischen 31,83 und 270 ng/ml bei Vollblutstuten.
2. Die Konzentrationen von Cortisol und 20 β -Dihydrocortisol liegen bei den Vollblutstuten signifikant höher ($p < 0,05$)
3. Die Konzentrationen der anderen fünf Metaboliten liegen bei den Warmblütern höher. Allerdings waren hier die Unterschiede nicht signifikant.

a) Diskussion zu den Absolutwerten der Sexualsteroid

Die hier ermittelten Sexualsteroidkonzentrationen stellen Referenzwerte Stuten dar, bei denen lediglich die Rasse bekannt ist. Die Absolutwerte der Gestagene zeigen eine im Gegensatz zu denen der Androgene und Östrogene große Unterschiede innerhalb des Gestagenspektrums. Die Konzentration der Gesamtgestagene liegt um das 10fache über den ermittelten Androgen- und Östrogenspiegeln.

b) Diskussion zum Rassenvergleich

Die Konzentrationen von Cortisol und 20 β -Dihydrocortisol liegen im Harn der Vollblutstuten signifikant höher. 20 β -Dihydrocortisol ist der quantitativ wichtigste Metabolit des Cortisols. Dies erklärt dessen auffällig hohe Konzentration bei beiden Rassen.

Die Konzentrationen von Cortisol und 20 β -Dihydrocortison liegen im Harn der Warmblutstuten höher. Bei der Konversion von Cortisol nach Cortison handelt es sich um eine Oxidoreduktion, bei der wesentlich mehr Cortison zu Cortisol umgewandelt wird als umgekehrt (GALLICANO, 1985; IRVINE, 1987). Die im Vergleich niedrigere Cortison-, bzw. 20 β -Dihydrocortisonkonzentration der Vollblüter könnte auf eine stärkere Aktivität der 11 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase als verantwortlichem Enzym verweisen.

c) Diskussion zum Spektrum der Corticosteroide

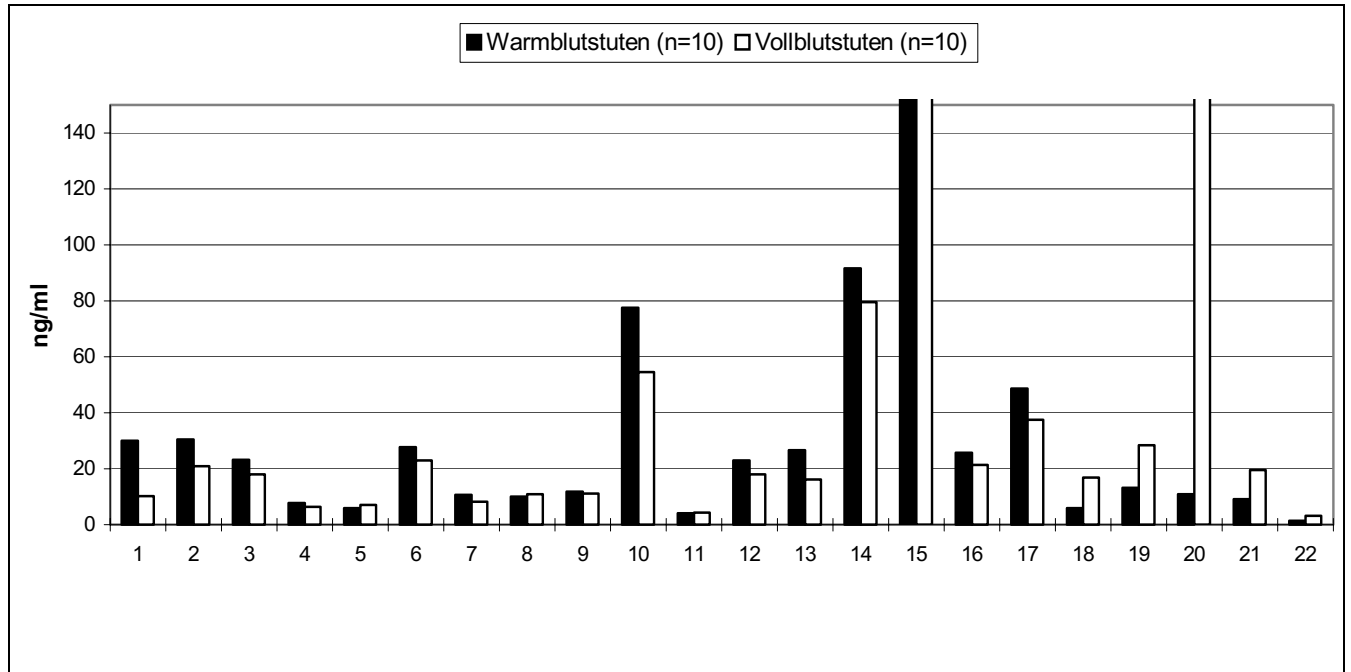
Wie auch für die Sexualsteroider fehlt eine detaillierte Aufschlüsselung der Corticosteroide bislang. Die Konzentrationen von β -Cortolon und β -Cortol wurden erstmals von STROMPEN (2001) gemessen. Vergleicht man die hier ermittelten Cortisolkonzentrationen mit denen früherer Untersuchungen, so liegen diese sowohl für Warmblüter (vergl. POPOT, 1997) und Vollblüter (vergl. GOTZMANN, 1994; POPOT, 1996) auf höherem Niveau. Diese Abweichungen könnten jedoch mit der körperlichen Verfassung der Stuten zum Zeitpunkt der Probennahme zusammenhängen. Zahlreiche Untersuchungen (RALSTON, 1988; SCHULZ, 1994; TOUTAIN, 1995) belegen einen zum Teil erheblichen Anstieg des

Corticosteroidspiegels nach physischer Belastung. Da es sich bei den hier verwendeten Harnproben um anonyme Proben der Referenzpopulation 1 handelt, konnte der physische Zustand der Stuten nicht in die Analyse mit einbezogen werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Proben – da es sich um Dopingproben handelt- während, bzw. kurz nach einer Leistungsprüfung entnommen wurde. Somit ist davon auszugehen, dass sowohl eine physische als auch eine durch Streß verursachte psychische Belastung der Stuten zum Entnahmezeitpunkt bestand.

3.2.4. Bestimmung von Referenzwerten für die Konzentrationen endogener Steroide im Harn von Stuten im Östrus und im Diöstrus (Referenzpopulation 2)

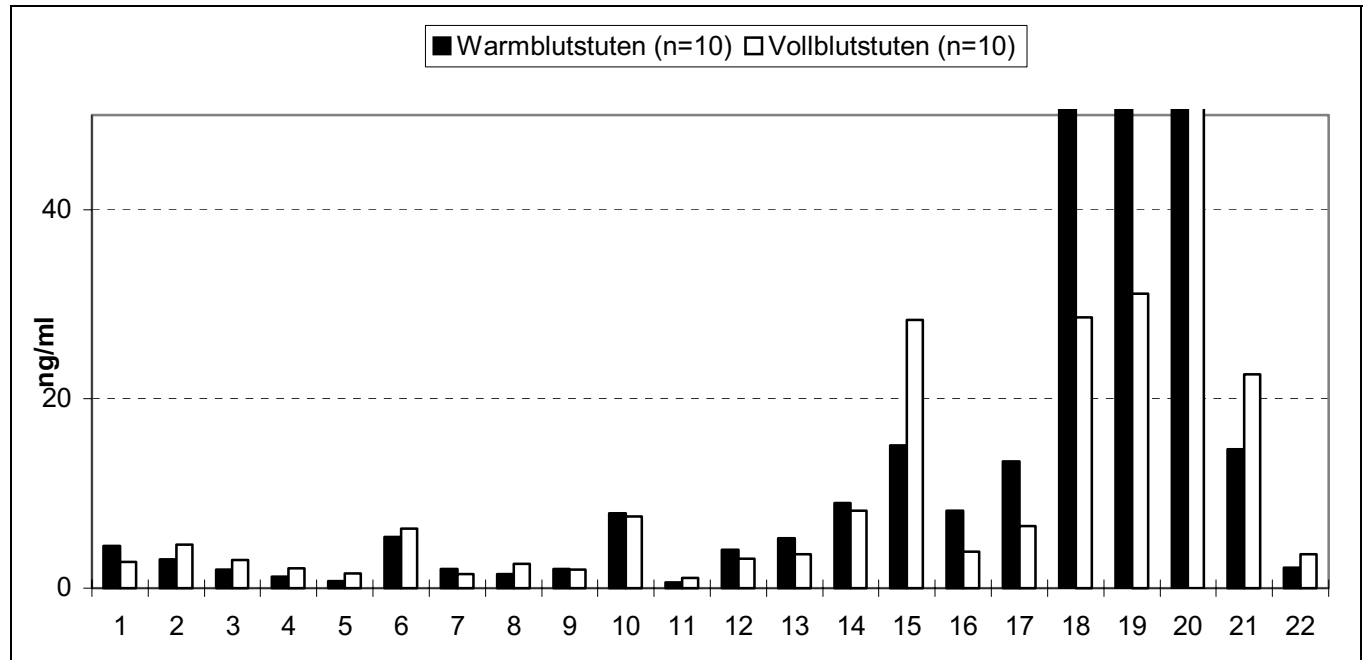
Speziell bei Stuten beeinflußt auch der Zyklusverlauf die Steroidogenese und die Steroidsekretion. So ergab die Harnprobenanalyse bei der Referenzpopulation 2 (vergl. Material und Methoden) gab Aufschluß über die Verschiebung des Steroidprofils in Abhängigkeit vom Zyklusstadium der untersuchten Warm- und Vollblutstuten. Die nachfolgenden Abbildungen 6 und 7 zeigen hierzu die Ergebnisse für die Phasen des Östrus und Diöstrus.

Abb.6: Vergleichende Darstellung des **Sexualsteroidprofils** aus Harnproben zweier Stutengruppen (**Ref.Pop.2**) der Rassen **Warmblut** (n=10) und **Vollblut** (n=10) im **Östrus**



WB	MW	30	30	23	7,7	6	28	11	10	12	78	4	23	27	92	300	26	49	5,8	13	11	9,2	1,4
	SD	3,1	3,6	3,6	1	0,6	2,1	1,5	1,4	1,8	5,9	0,3	2,7	2,8	8,3	14	2,3	3,4	3,4	3,6	7,8	7,1	1,4
VB	MW	10	21	18	6,3	7	23	8,1	11	11	55	4,4	18	16	80	162	22	38	17	29	209	20	3
	SD	1,8	2,9	4,1	0,5	0,8	5,2	1,5	2,1	2,2	9,9	0,5	1,8	2,7	12	51	3,1	5,4	7,7	10	56	14	2
Diff.MW		20	9	5	1,4	1	5	2,9	1	1	23	0,4	5	11	12	138	4	11	11,2	16	198	10,8	1,6
Steroidprofil																							
	1= Testo																						
	2= Andro																						
	3= Etio																						
	4= Epiandro																						
	5= 11-Ketoandro																						
	6= 11-Ketoetio																						
	7= 11-Ketoepi																						
	8= Andro 17α																						
	9= Andro 17β																						
	10= DHEA																						
	11= Androstendion																						
	12= 11-Hydandro																						
	13= 11-Hydetio																						
	14= 11-Hydepiandro																						
	15= Estron																						
	16= Estradiol-17α																						
	17= Estradiol-17β																						
	18= Pregnendiol-10β																						
	19= Pregnendiol-20α																						
	20= Pregnandiol-20β																						
	21= Pregnantriol-20β																						
	22= Pregnantriol-20α																						

Abb. 7: Vergleichende Darstellung des **Sexualsteroidspiegels** aus Harnproben zweier Stutenpopulationen (**Ref.pop.2**) der Rassen **Warmblut** (n=10) und **Vollblut** (n=10) im **Diöstrus**



WB	MW	4,5	3	2	1,2	0,7	5,4	2	1,5	2	7,9	0,6	4	5,3	9	15	8	13	182	162	1079	15	2,1
	SD	2,9	2,1	1,8	0,8	0,8	2,4	0,7	1	1,1	6,6	0,6	2,6	3,9	4,2	3,9	2,4	2,3	11	8,9	243	6	2,1
VB	MW	2,7	4,6	3	2,1	1,6	6,3	1,5	2,6	2	7,6	1,1	3,1	3,6	8,2	28	4	6,6	29	31	353	23	3,6
	SD	2	3,6	2,8	0,9	1,5	4	1,3	2,3	1,4	5,5	0,9	2,5	2,8	9,7	17	3,1	6,2	16	6,2	52	7,2	3,6
	Diff.MW	1,8	1,6	1	0,9	0,9	0,9	0,5	1,1	0	0,3	0,5	0,9	1,7	0,8	13	4	6,4	99	131	726	8	1,5
Steroidprofil																							
	1= Testo																						
	2= Andro																						
	3= Etio																						
	4= Epiandro																						
	5= 11-Ketoandro																						
	6= 11-Ketoetio																						
	7= 11-Ketoepi																						
	8= Andro17 α																						
	9= Andro17 β																						
	10= DHEA																						
	11= Androstendion																						
	12= 11-Hydandro																						
	13= 11-Hydetio																						
	14= 11-Hydepiandro																						
	15= Estron																						
	16= Estradiol-17 α																						
	17= Estradiol-17 β																						
	18= Pregnandiol-10 β																						
	19= Pregnandiol-20 α																						
	20= Pregnandiol-20 β																						
	21= Pregnantriol-20 β																						
	22= Pregnantriol-20 α																						

Ein Vergleich des Steroidprofils hinsichtlich der beiden untersuchten Pferderassen, bzw. der Zyklusphasen ergab:

Im Östrus:

- Im Östrus zeigten sich gegenüber dem Diöstrus signifikant höhere Androgen- und Östrogenkonzentrationen und signifikant niedrigere Gestagenkonzentrationen ($p < 0,05$)
- Der Androgen- und Östrogenspiegel lag bei den Warmblutstuten auf höherem Niveau. Die Unterschiede waren für Testosteron und DHEA signifikant.
- Der Gestagenspiegel lag bei den Vollblutstuten auf einem signifikant höherem Niveau.

Im Diöstrus:

- Im Diöstrus zeigten sich gegenüber dem Östrus signifikant niedrigere Androgen- und Östrogenkonzentrationen und signifikant höhere Gestagenkonzentrationen ($p < 0,05$).
- Der Androgenspiegel lag insgesamt bei beiden Rassen auf gleichem Niveau. Es zeigten sich keine signifikanten rassenspezifischen Unterschiede zwischen den einzelnen Androgenen.
- Innerhalb des Östrogenspiegels lag die Östronkonzentration bei den Vollblutstuten höher als bei den Warmblutstuten. Hingegen zeigten sich höhere Estradiol-17 α - und Estradiol-17 β – Konzentrationen bei den Warmblutstuten. Die Unterschiede sind für alle Östrogene nicht signifikant.
- Innerhalb des Gestagenspiegels lagen die Konzentrationen von Pregnendiol-20 β , Pregnendiol-20 α und Pregnandiol-20 β bei den Warmblutstuten höher. Die Unterschiede sind signifikant ($p < 0,05$). Bei den Vollblutstuten hingegen zeigten sich höhere Pregnantriol-20 β - und Pregnantriol-20 α - Konzentrationen. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

3.2.4.1. Diskussion zur Androgenkonzentration der Referenzpopulationen 1 und 2

Insgesamt konnten in diesem Versuch 14 unterschiedliche Androgene, bzw. Androgenmetaboliten detektiert werden.

a) Zur Abhängigkeit vom Zyklusstadium

In der durchgeführten Untersuchung zeigte sich bei den Stuten der Referenzpopulation 2 eine zyklusabhängige Verschiebung der Androgenkonzentrationen mit hohen Mittelwerten im

Östrus und niedrigen im Diöstrus. Diese Schwankungen reflektieren die Vorgänge am Ovar. Mit der Follikelreifung steigt die Östrogenkonzentration. Nach der Ovulation fällt der Östrogenspiegel erst langsam wieder ab, gemäß der gegenüber anderen Spezies verlängerten Östrogenphase. Während des Diöstrus bewegt sich die Östrogenkonzentration dann auf niedrigem Niveau. Da die Östrogene Metaboliten der Androgene darstellen, zeigen diese die gleichen zyklischen Veränderungen.

Vergleicht man die Mittelwerte der Referenzpopulationen mit bekanntem und unbekanntem Zyklusstadium, so entsprechen die Androgenkonzentrationen der Referenzpopulation 1, unter Berücksichtigung des jeweiligen Streubereiches, den Mittelwerten der Stuten, die sich zum Untersuchungszeitpunkt im Diöstrus befanden. Das heißt, die anonym eingesandten Proben dürften somit vor allem von Stuten stammen, die sich zur Zeit der Probenentnahme im Diöstrus befanden. Dies entspricht der Praxis, dass Stuten in der Rossephase nicht zu Leistungsprüfungen herangezogen werden.

b) Zum Rassenvergleich

Die gegenüber den Vollblutstuten signifikant höheren Androgenkonzentrationen der Warmblutstuten dürften mit dem unterschiedlichen Zuchtziel der beiden Rassen zusammenhängen. Während es sich bei der Vollblutzucht um eine reine Leistungszucht handelt, spielt in der Warmblutzucht auch das Exterieur eine große Rolle. Bevorzugt wird hier ein eher maskuliner Typ mit starker Bemuskelung. Hierzu ist endokrinologisch eine verstärkte Androgenproduktion erforderlich, die in der hier durchgeführten Untersuchung durchaus belegt werden konnte.

c) Zum Androgenspektrum

Bei der Betrachtung der einzelnen Androgene fällt zunächst bei den Stuten beider Rassen vor allem der hohe DHEA – Spiegel sowohl bei Voll- als auch bei Warmblutstuten auf. Eine Erklärung bietet der Syntheseweg der Sexualsteroiden. Zwei unterschiedliche Wege kommen in Frage. Der $\Delta 4$ – Weg beinhaltet die Umwandlung der Ausgangssubstanz Pregnenolon über Progesteron und stellt den Hauptbildungsweg der Sexualsteroiden dar (HAY, 1975). Auf dem $\Delta 5$ – Weg hingegen werden diese über DHEA synthetisiert (vergl. Abb.8)

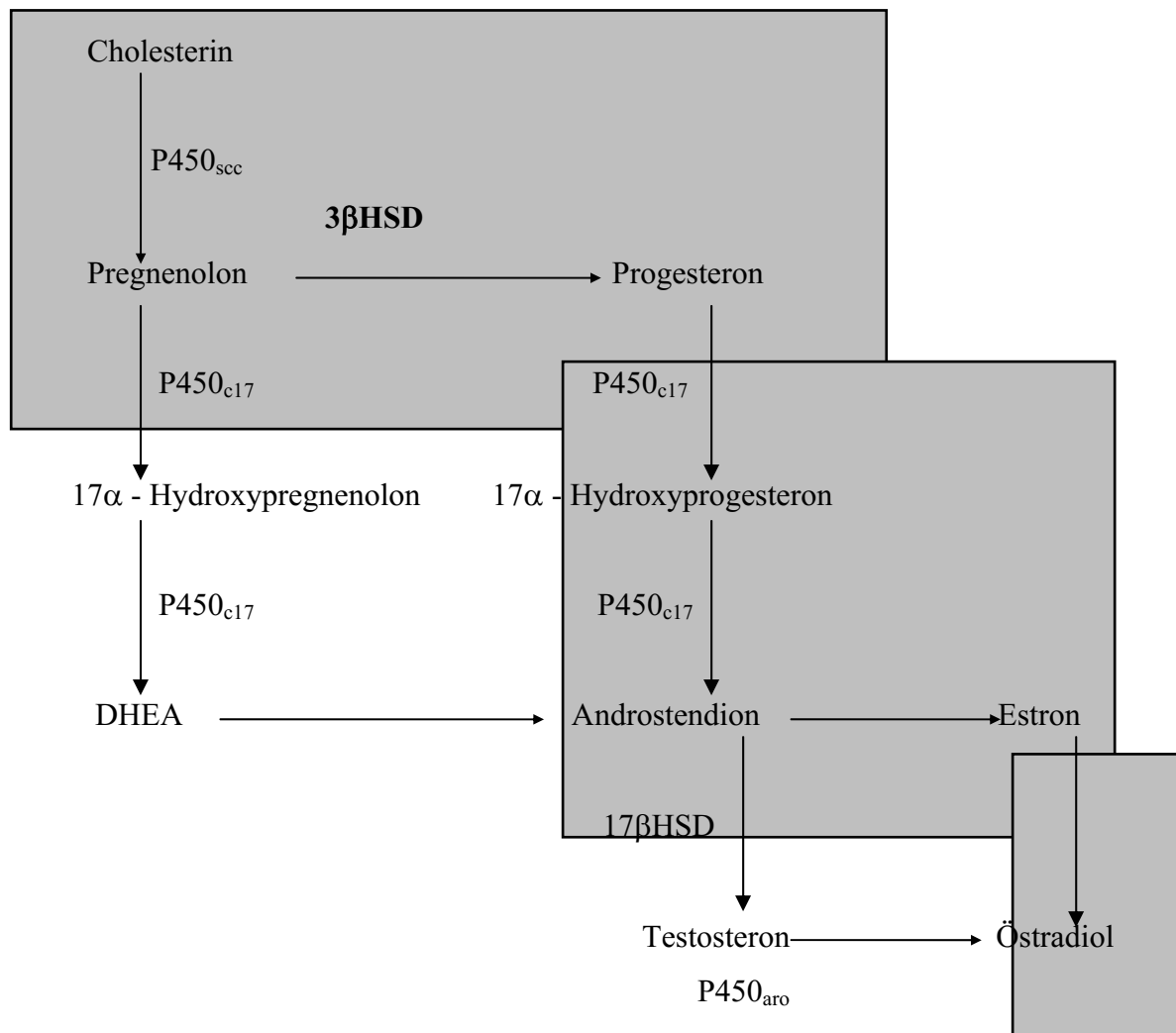


Abb.8 : Die Synthese von Östradiol im Ovar der Stute - Darstellung des Δ 4- Weges

(unterlegt) und des Δ -5 Weges (mod. nach NETT , 1993)

Die wichtigsten Enzyme sind benannt.

Alle Cytochrom P450-abhängigen Enzyme sind mit P-450 bezeichnet, die Indices geben den Angriffspunkt an, z.B. ist P450_{c17} die Cytochrom P450 - abhängige 17 - Hydroxylase.

P450_{scc} steht für Side chain cleavage. β HSD = β -

Hydroxysteroid - Dehydrogenase. P450_{aro} = Aromatase

Die in dieser Untersuchung bei allen Stuten der Referenzpopulationen 1 und 2 ermittelten hohen DHEA – Werte sprechen demnach eher für eine gesteigerte Steroidsynthese auf dem Δ 5 – Weg.

3.2.4.2. Diskussion zur Östrogenkonzentration der Referenzpopulationen 1 und 2

In dieser Untersuchung konnten bei den Stuten der Referenzpopulationen 1 und 2 insgesamt 3 verschiedene Östrogene detektiert werden.

a) Zur Abhängigkeit der Östrogene vom Zyklusstadium

In der durchgeführten Untersuchung zeigte sich bei den Stuten der Referenzpopulation 2 eine zyklusabhängige Verschiebung der Östrogenkonzentrationen mit hohen Mittelwerten im Östrus und niedrigen im Diöstrus. Dies wurde auch schon in zahlreichen früheren Untersuchungen hervorgehoben, wobei jedoch nicht Harn, sondern Blutserum und Blutplasma analysiert wurden (KIENHOLZ, 1986 ; ERALDO, 1973; KIRKPATRICK, 1983). Diese Konzentrationsschwankungen entsprechen denen der detektierten Androgene und reflektieren ebenfalls die Vorgänge am Ovar der Stute. Östrogene werden aus den Androgenen durch die enzymatische Wirkung der Aromatase synthetisiert. Aus diesem Grund entsprechen sich die Konzentrationsverläufe der beiden Sexualsteroidgruppen.

b) Zum Rassenvergleich

Es zeigten sich niedrigere Östrogenkonzentrationen im Harn der Vollblutstuten, die jedoch nicht signifikant waren. Rassenspezifische Unterschiede stellte auch DREYER-RENDELSMANN (1988) in Bezug auf Niveau und Verlauf des Östrogenspiegels im Harn von Trakehner- und Vollblutstuten heraus. Auch in ihrer Untersuchung waren die Östrogenkonzentrationen der Vollblüter signifikant niedriger. Die Ursache könnte – wie auch bei den Androgenen – eine intensive Selektion der Vollblüter auf Leistung und nicht auf Reproduktion sein, die mit einer verminderten Östrogensynthese einhergeht.

c) Zum Östrogenspektrum

Unter den Östrogenen stellt das Östron die weitaus höchsten Konzentrationen, gefolgt von Östradiol-17 β , beides Östrogene, die in ihrer freien Form biologisch aktiv sind (ALLEN, 1987). Weiterhin fallen rassenspezifische Unterschiede in den zyklusbedingten Schwankungen der Östronkonzentration auf. So steigern sich die Östronwerte der Warmblüter im Östrus gegenüber denen im Diöstrus um das 6-fache, die bei den Vollblütern jedoch um das 20fache.

3.2.4.3. Diskussion zur Gestagenkonzentration der Referenzpopulationen 1 und 2

In der vorliegenden Untersuchung wurden insgesamt 5 Gestagene bei den Stuten der Referenzpopulationen 1 und 2 detektiert.

a) Zur Abhängigkeit der Gestagenwerte vom Zyklusstadium

In der vorliegenden Untersuchung wurden im Östrus niedrige und im Diöstrus hohe Gestagenkonzentrationen bestimmt. Dies geht auf die jeweilige Aktivität des Corpus luteum zurück. Diese steigt innerhalb von 24 Stunden nach der Ovulation an und führt am 7. und 8. Tag post ovulationem zu einem Gipfel, der bis zum 15.-16. Tag bestehen bleibt (SQUIRES, 1993). Die Harnproben wurden hier im Diöstrus 10 Tage post ovulationem, also um den Höhepunkt der Corpus-luteum-Aktivität, genommen. Dadurch sind die Gestagenkonzentrationen entsprechend hoch.

Ein Vergleich dieser zyklusabhängigen Mittelwerte mit den für die Referenzpopulation 1 ermittelten lässt hier keine eindeutigen Rückschlüsse auf das unbekannte Zyklusstadium der zugehörigen Stuten zu. Die Höhe der Gestagenkonzentrationen im Harn der Warmblüter weist jedoch auf eine Probenentnahme während des Diöstrus hin.

b) Zum Rassenvergleich

In beiden Referenzpopulationen zeigen sich signifikant höhere Gestagenkonzentrationen im Harn der Warmblutstuten. Dies dürfte mit den unterschiedlichen Zuchtbedingungen beider Rassen zusammenhängen. So folgt die Vollblutzucht seit über zwei Jahrhunderten mit dem Prinzip des „geschlossenen“ Stutbuches einer gewissen Inzucht. Bei jeder Inzucht, insbesondere über einen langen Zeitraum, kann es bei Eigenschaften auf die nicht selektiert wurde, zu einer gewissen Depression kommen. Vollblüter werden in erster auf Renn- und nicht auf Zuchtleistung selektiert. Dabei dürfte endokrinologisch gesehen die Hypophysen-NNR-Achse auf Kosten der Hypophysen-Gonaden-Achse bevorzugt entwickelt worden sein. Hinweise aus der Literatur (RAUSCHELBACH, 1982 ; ENBERGS, 1978) belegen einen vergleichbaren rassespezifischen Unterschied in den Konzentrationen des Progesteron. Die durchweg niedrigeren Progesteronkonzentrationen der Vollblüter entsprechen auch deren höheren Fruchtresorptionsraten von 19% gegenüber denen der Warmblüter von nur 8% (GÜNZEL u. HIMMLER, 1979) .

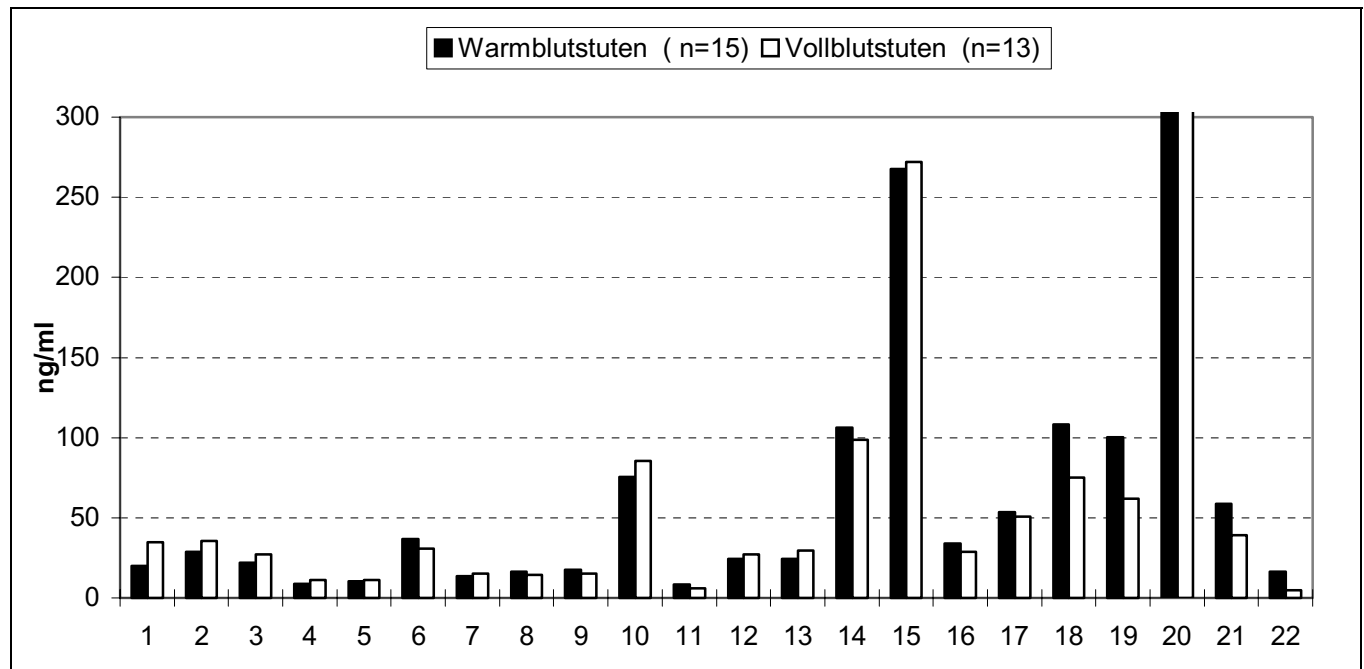
c) Zum Spektrum der Gestagene

Unter den Gestagenen fällt Pregnan-20 β besonders auf. Dies bestätigt die Aussage von AGUILERA (1997), nach der Pregnan-20 β den wichtigsten Metaboliten des Progesterons darstellt, der durch doppelte Reduktion entsteht. Die hohen Pregnan-20 β -Konzentrationen weisen darauf hin, dass dieser Metabolit auch für Stuten das häufigste Umwandlungsprodukt des Progesterons darstellt.

3.2.5. Bestimmung von Referenzwerten für die Konzentrationen endogener Steroide im Harn von Stuten mit Virilisierungserscheinungen (Referenzpopulation 3)

Zum Steroidprofil von Stuten mit Virilisierungserscheinungen wurden bislang keine Untersuchungen durchgeführt. Um diesbezüglich Aussagen machen zu können, wurden Harnproben von solchen Stuten als Referenzpopulation 3 genommen und analysiert. Die Proben der Stuten wurden hierbei nach Rasse und Zyklusstadium unterteilt.

Abb.9: Vergleichende Darstellung des endogenen Steroidprofils aus Harnproben zweier Stutengruppen mit Virilisierungserscheinungen (**Ref.Pop.3**) der Rassen **Warmblut** (n=15) und **Vollblut** (n=13) im **Östrus**



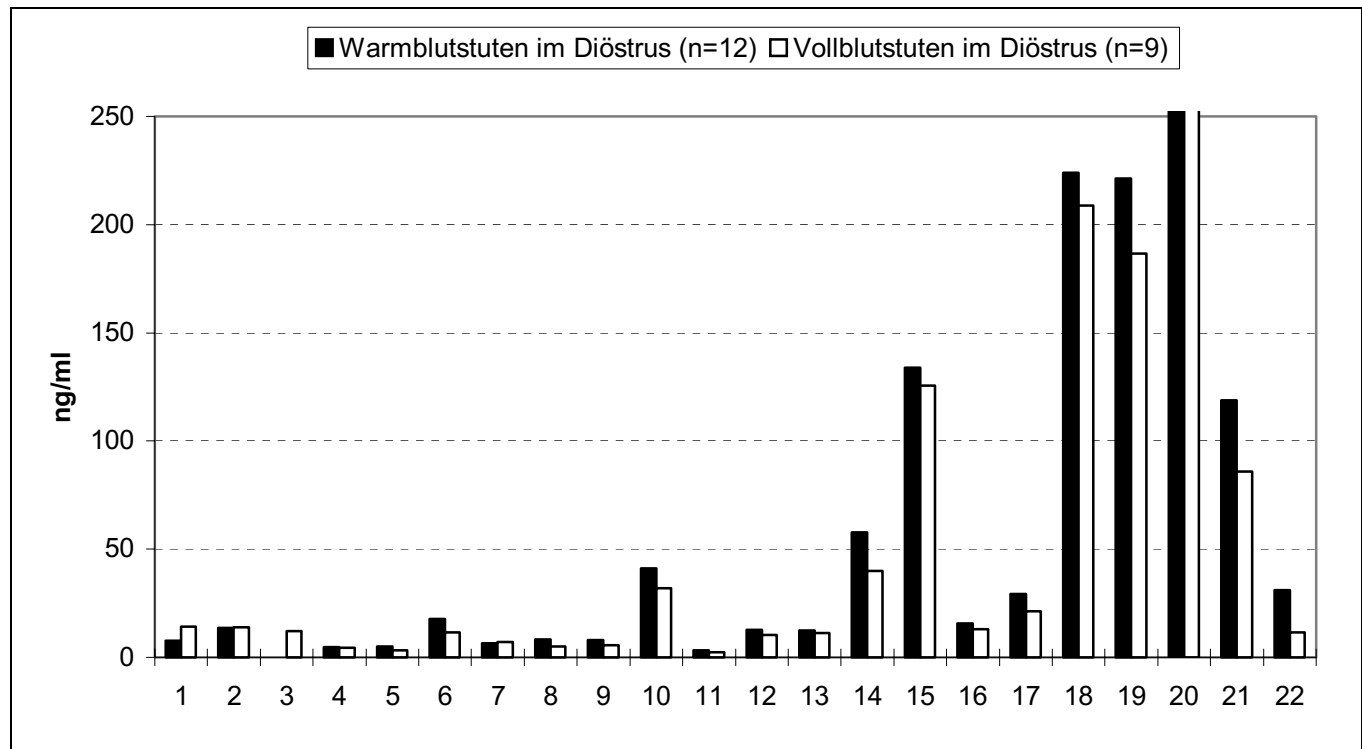
WB	MW	20	29	22	8,7	10	37	13	17	17	76	8,4	25	24	106	268	34	54	108	100	1103	59	16
	SD	10	5,4	4,4	2,7	3,3	8	3,8	4	4,4	20	5,5	4,7	5,5	235	15	9,4	12	79	66	752	34	10
VB	MW	35	35	27	11	11	31	15	14	15	86	6,1	27	29	99	272	29	51	75	62	716	39	4,7
	SD	12	12	10	5,4	6,3	12	6,6	6,3	6,5	32	3,1	9,7	9,7	31	105	10	20	44	37	677	23	3
Diff.MW		15	5	5	2,3	1	6	2	3	2	10	2,3	2	5	7	4	5	3	33	38	387	20	11,5
Steroidprofil		1= Testo	2= Andro	3= Etio	4= Epi	5= 11-Ketoandro	6= 11-Ketoetio	7= 11-Ketoepi	8= Andro 17α	9= Andro 17β	10= DHEA	11= Androstendion	12= 11-Hydandro	13= 11-Hydetio	14= 11-Hydepi	15= Estron	16= Estradiol-17α	17= Estradiol-17β	18= Pregnenndiol-10β	19= Pregnenndiol-20α	20= Pregnandiol-20β	21= Pregnantriol-20β	22= Pregnantriol-20α

Ein Vergleich der Steroidkonzentrationen im Harn der virilisierten Stuten im **Östrus** ergab folgende Ergebnisse:

1. Die Absolutwerte der Steroide liegen für Warmblutstuten bei:
 - a) Androgene: 413,1 ng/ml.
 - b) Östrogene: 356 ng/ml
 - c) Gestagene: 1386 ng/ml

2. Die Absolutwerte der Steroide liegen für Vollblutstuten bei:
 - a) Androgene: 441,1 ng/ml
 - b) Östrogene: 352 ng/ml
 - c) Gestagene: 896,7 ng/ml.
3. Wie bei den in der Geschlechtsmerkmalsausprägung normalen Stuten sind die Androgen- und Östrogenkonzentrationen im Harn der virilisierten Stuten in dieser Zyklusphase erhöht, der Gestagenspiegel erniedrigt.
4. Androgen- und Östrogenspiegel unterscheiden sich bei Warm- und Vollblütern nicht signifikant.
5. Der Gestagenspiegel ist bei den Warmblutstuten signifikant höher als bei den entsprechenden Vollblutstuten.

Abb.10: Vergleichende Darstellung des Steroidprofils aus Harnproben zweier Stutengruppen mit Virilisierungserscheinungen (**Ref.pop.3**) der Rassen **Warmblut** (n=12) und **Vollblut** (n=9) im **Diöstrus**



WB	MW	7,7	14	11	4,8	5	18	6,5	8,2	8,1	41	3,2	13	12	58	134	16	29	224	221	2660	119	31
	SD	4,1	7,5	6,3	2,7	2,4	8,2	2,2	2,6	3,5	19	2,5	6,8	5,7	3	76	10	15	23	30	241	19	5,8
VB	MW	14	14	12	4,6	3,4	11	7,1	4,9	5,7	32	2,5	10	11	40	126	13	21	209	187	2379	86	12
	SD	11	10	10	3	2,3	9	4,4	3,6	3,6	23	1,5	7,1	8	29	92	8,7	12	18	20	228	17	2,9
Diff.MW		6,3	0	1	0,2	1,6	7	0,6	3,3	2,4	9	0,7	3	1	18	8	3	8	15	34	281	33	19
Steroidprofil		1= Testo	2= Andro	3= Etio	4= Epi	5= 11-Ketoandro	6= 11-Ketoetio	7= 11-Ketoepi	8= Andro 17 α	9= Andro 17 β	10= DHEA	11= Androstendion	12= 11-Hydandro	13= 11-Hydetio	14= 11-Hydepi	15= Estron	16= Estradiol-17 α	17= Estradiol-17 β	18= Pregnendiol-10 β	19= Pregnendiol-20 α	20= Pregnandiol-20 β	21= Pregnantriol-20 β	22= Pregnantriol-20 α

Der Vergleich der Sexualsteroidkonzentrationen im Harn der virilisierten Stuten im **Diöstrus** ergibt folgende Ergebnisse:

1. Die Absolutwerte der Steroide liegen für Warmblutstuten bei:
 - a. Androgene: 210,5 ng/ml
 - b. Östrogene: 179 ng/ml
 - c. Gestagene: 3255 ng/ml.
2. Die Absolutwerte der Steroide liegen für Vollblutstuten bei:
 - a. Androgene: 172,2 ng/ml.
 - b. Östrogene: 160 ng/ml
 - c. Gestagene: 2873 ng/ml
3. Wie bei den in der Geschlechtsmerkmalsausprägung normalen Stuten sind die Androgen- und Östrogenkonzentrationen im Harn der virilisierten Stuten im Diöstrus erniedrigt, der Gestagenspiegel dagegen erhöht.
4. Bei den Warmblutstuten ist der Androgenspiegel leicht und die Östrogen- und Gestagenkonzentrationen deutlich erhöht. Die Unterschiede sind jedoch nur für die Gestagene signifikant.

3.2.5.1. Vergleich der endogenen Steroidprofile virilisierter und nicht virilisierter Stuten

In diesem Kapitel werden die ermittelten Konzentrationen der Steroide im Harn der virilisierten Stuten (Referenzpopulation 3) mit denen im Harn von den nicht virilisierten Stuten (Referenzpopulation 2) verglichen. Dabei wurde nach Rasse und Zyklusstadium unterschieden. Die Ergebnisse hierzu sind in den Tabellen 6-9 dargestellt.

Tab. 6: Vergleich der endogenen Steroidprofile virilisierter (VS) und nicht virilisierter (GS) Warmblutstuten (VS) im Östrus

Steroide	Mittelwert (ng/ml) GS (n=10)	SD	Mittelwert (ng/ml) VS(n=15)	SD	Signifikanz (p)
Androgene					
Testosteron	10,29	1,83	19,96	10,06	p<0,001
Androsteron	20,96	2,91	28,85	5,4	p<0,001
Etiocholanolon	17,99	4,17	22,15	4,41	p<0,01
Epiandrosteron	6,26	0,51	8,70	2,71	p<0,05
11-Ketoandrosteron	7,03	0,77	10,35	3,3	p<0,05
11-Ketoetiocholanolon	22,9	5,19	36,91	7,98	p<0,001
11-Ketoepiandrosteron	8,1	1,51	13,52	3,80	p<0,001
Androstandiol-17alpha	10,84	2,14	16,55	4,03	p<0,01
Androstandiol-17β	11,05	2,23	17,41	4,38	p<0,001
DHEA	54,62	9,87	75,53	19,96	p<0,01
Androstendion	4,38	0,46	8,422	5,46	p<0,001
11-Hydroxyandrosteron	17,99	1,75	24,46	4,73	p<0,001
11-Hydroxyetiocholanolon	16,16	2,67	24,36	5,52	p<0,001
11-Hydroxyepiandrosteron	79,59	12,38	106,3	234,6	p<0,001
Östrogene					
Estron	162,28	50,94	267,5	14,46	p<0,001
Estradiol-17alpha	21,35	3,06	33,82	9,4	p<0,001
Estradiol-17β	37,46	5,42	53,72	12,23	p<0,001
Gestagene					
Pregnendiol-20β	16,74	7,69	108,3	78,92	p<0,05
Pregnendiol-20 alpha	28,48	10,35	100,3	65,98	p<0,01
Pregnandiol-20β	208,92	55,91	1103	752,3	p<0,001
Pregnantriol-20β	19,54	14,08	58,54	34,03	p<0,01
Pregnantriol-20alpha	3,09	2,39	16,48	10,16	p<0,01

Ein Vergleich der Sexualsteroidkonzentration im Harn von virilisierten und nicht virilisierten Warmblutstuten im Östrus zeigte folgende Besonderheiten:

1. Der Androgen-, Östrogen- und Gestagenspiegel liegt bei den virilisierten Stuten deutlich höher.
2. Die Unterschiede sind für alle Sexualsteroidkonzentrationen signifikant ($p < 0,05$), zum Teil sogar hochsignifikant ($p < 0,01$).

Tab.7: Vergleich der endogenen Steroidprofile virilisierter (VS) und nicht virilisierter (GS) Warmblutstuten im Diöstrus

	Mittelwert (ng/ml) GS (n=10) Diöstrus	STABW	Mittelwert (ng/ml) VS (n=12) Diöstrus	STABW	Signifikanz (p)
Androgene					
Testosteron	2,74	1,98	7,7	4,09	p<0,01
Androsteron	4,62	3,58	13,71	7,5	p<0,01
Etiocholanolon	2,97	2,75	10,88	6,33	p<0,01
Epiandrosteron	2,07	0,94	4,78	2,69	p<0,01
11-Ketoandrosteron	1,56	1,48	5,02	2,37	p<0,001
11-Ketoetiocholanolon	6,26	3,98	17,78	8,22	p<0,001
11-Ketoepiandrosteron	1,51	1,29	6,48	2,22	p<0,001
Androstandiol-17alpha	2,55	2,3	8,23	2,61	p<0,001
Androstandiol-17β	1,98	1,41	8,13	3,46	p<0,001
DHEA	7,57	5,49	41,04	19,41	p<0,001
Androstendion	1,08	0,85	3,24	2,54	p<0,01
11-Hydroxyandrosteron	3,09	2,49	12,76	6,78	p<0,001
11-Hydroxyetiocholanolon	3,56	2,84	12,37	5,71	p<0,001
11-Hydroxyepiandrosteron	8,21	3,4	57,87	3,03	p<0,001
Östrogene					
Estron	28,34	17,28	133,97	75,89	p<0,01
Estradiol-17alpha	3,88	3,05	15,61	9,99	p<0,01
Estradiol-17β	6,59	6,18	29,42	15,1	p<0,001
Gestagene					
Pregnendiol-20β	28,63	16	224,02	22,45	p<0,001
Pregnendiol-20 alpha	31,1	6,15	221,22	30,18	p<0,001
Pregnandiol-20β	352,9	51,78	2659,6	241,31	p<0,001
Pregnantriol-20β	22,56	7,16	118,72	19,25	p<0,001
Pregnantriol-20alpha	3,56	3,63	31,19	5,77	p<0,001

Auch im Diöstrus sind die Konzentrationen aller Gruppen der Steroide im Harn der virilisierten Stuten gegenüber den nicht virilisierten Stuten deutlich erhöht. Diese Unterschiede erwiesen sich für alle Androgene, Östrogene und Gestagene als hochsignifikant.

Tab. 8: Vergleich der endogenen Steroidprofile virilisierter (VS) und nicht virilisierter (GS)Vollblutstuten im Östrus

	Mittelwert (ng/ml) GS (n=10)	SD	Mittelwert (ng/ml) VS (n=13)	SD	Signifikanz (p)
Androgene					
Testosteron	30,07	3,11	34,77	12,18	n.s.
Androsteron	30,36	3,62	35,4	12,72	n.s.
Etiocholanolon	23,17	3,63	27,22	10,34	n.s.
Epiandrosteron	7,66	1,03	11,2	5,37	n.s.
11-Ketoandrosteron	5,98	0,61	11,14	6,34	n.s.
11-Ketoetiocholanolon	27,82	2,10	30,75	11,83	n.s.
11-Ketoepiandrosteron	10,74	1,44	15,01	6,57	n.s.
Androstadiol-17alpha	10,08	1,37	14,46	6,25	n.s.
Androstadiol-17β	11,77	1,82	15,05	6,5	n.s.
DHEA	77,49	5,94	85,65	32,28	n.s.
Androstendion	3,98	0,3	6,1	3,12	n.s.
11-Hydroxyandrosteron	22,87	2,67	27,21	9,72	n.s.
11-Hydroxyetiocholanolon	26,62	2,76	29,39	9,61	n.s.
11-Hydroxyepiandrosteron	91,57	8,24	98,64	31,2	n.s.
Östrogene					
Estron	299,6	13,67	271,84	105,4	n.s.
Estradiol-17alpha	25,7	2,31	28,62	10,24	n.s.
Estradiol-17β	48,71	3,39	50,57	20,4	n.s.
Gestagene					
Pregnendiol-20β	5,81	3,94	75,01	44,04	0,05
Pregnendiol-20 alpha	13,29	3,62	61,94	37,4	0,01
Pregnandiol-20β	10,96	7,86	716,09	677,16	0,01
Pregnantriol-20β	9,19	7,12	39,2	22,54	0,01
Pregnantriol-20alpha	1,42	1,35	4,65	3,004	0,01

Ein Vergleich der Sexualsteroidkonzentration im Harn von virilisierten und nicht virilisierten Vollblutstuten im Östrus zeigte folgende Besonderheiten:

1. Der Androgen-, Östrogen- und Gestagenspiegel liegt bei den virilisierten Stuten höher.
2. Die Unterschiede sind zwar für Androgene und Östrogene nicht signifikant. Der p-Wert liegt jedoch meist nur knapp über der Signifikanzgrenze.
3. Die Unterschiede sind für alle Gestagene signifikant ($p < 0,05$), zum Teil sogar hochsignifikant ($p < 0,01$).

Tab. 9: Vergleich der endogenen Steroidprofile virilisierter (VS) und nicht virilisierter (GS) Vollblutstuten im Diöstrus

	Mittelwert (ng/ml) GS (n=10) Diöstrus	SD	Mittelwert (ng/ml) VS (n=9) Diöstrus	SD	Signifikanz
Androgene					
Testosteron	4,48	2,91	14,16	10,77	n.s.
Androsteron	3,01	2,12	13,91	10,22	n.s.
Etiocholanolon	1,96	1,78	12,13	10,02	n.s.
Epiandrosteron	1,2	0,78	4,55	3,04	0,05
11-Ketoandrosteron	0,74	0,76	3,36	2,31	0,05
11-Ketoetiocholanolon	5,44	2,41	11,42	8,96	n.s.
11-Ketoepiandrosteron	2,02	0,7	7,05	4,36	0,05
Androstandiol-17alpha	1,47	0,97	4,90	3,56	0,05
Androstandiol-17β	1,99	1,1	5,68	3,58	n.s.
DHEA	7,92	6,55	32,07	22,83	0,05
Androstendion	0,6	0,55	2,51	1,46	0,001
11-Hydroxyandrosteron	4,03	2,45	10,25	7,14	n.s.
11-Hydroxyetiocholanolon	5,27	3,86	11,12	8,05	n.s.
11-Hydroxyepiandrosteron	9	4,17	40,08	28,85	n.s.
Östrogene					
Estron	15,06	3,89	125,7	91,49	n.s.
Estradiol-17alpha	8,19	2,44	13,03	8,69	n.s.
Estradiol-17β	13,38	2,24	21,42	12,29	n.s.
Gestagene					
Pregnendiol-20β	181,51	11,3	208,95	18,22	0,01
Pregnendiol-20 alpha	162,34	8,91	186,55	19,49	0,05
Pregnandiol-20β	1079,3	242,58	2378,66	228,24	0,001
Pregnantriol-20β	14,66	6,004	85,75	16,47	0,001
Pregnantriol-20alpha	2,14	2,12	11,65	2,94	0,001

1. Auch im Diöstrus sind die Konzentrationen aller Sexualsteroiden im Harn bei den virilisierten

Vollblutstuten gegenüber den nicht virilisierten Stuten deutlich erhöht.

2. Die Unterschiede sind für die Androgene Epiandrosteron, 11- Ketoandrosteron, 11- Ketoepiandrosteron, Androstandiol-17α, DHEA und Androstendion und für alle Gestagene signifikant ($p < 0,05$), zum Teil sogar hochsignifikant ($p < 0,01$).

3.2.5.1.1. Diskussion zum Steroidprofil im Harn von Stuten mit

Virilisierungserscheinungen (Referenzpopulation 3)

Die Referenzpopulation 3 bestand aus Stuten, die wegen somatischer oder genitaler Symptome und aufgrund ihres aggressiven Verhaltens als virilisiert eingestuft wurden. Diese Virilisierung gilt in der Literatur als Folge einer hormonellen Störung, bei der die Parameter des endogenen Steroidprofils je nach Krankheitsbild den jeweiligen Referenzbereich übersteigen (GREILING, 1989). Virilisierungserscheinungen gelten vor allem als Ausdruck einer Hyperandrogenisierung. Dies wurde in früheren Untersuchungen bereits in Bezug auf die Testosteronkonzentration festgestellt. So ermittelten BUSCH und KLUG (1999) sowie STABENFELDT (1979) erhöhte Testosteronwerte im Blutplasma virilisierter Stuten. Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen waren jedoch alle Steroidgruppen erhöht. Dies erscheint logisch, da Östrogene biochemisch Metabolite der Androgene und Gestagene darstellen. An der Synthese der Gestagene ist vor allem das Enzym 3 β -Dehydrogenase maßgeblich beteiligt. In der Humanmedizin sind angeborene **Enzymdefekte** der Steroidsynthese als Ursache der Hyperandrogenisierung bereits seit Jahren Gegenstand der endokrinologischen Forschung. Prinzipiell ist ein Defekt jedes an der Steroidsynthese beteiligten Enzyms möglich. Je nach Lokalisation des Enzymdefektes kommt es zu einem Anstau verschiedener Steroidmetaboliten, die nach der Ausscheidung im Harn gemessen werden können. Diese Metaboliten werden, soweit möglich, auf einem alternativen Weg metabolisiert, wodurch es unter anderem zu einer pathologischen Mehrproduktion von Androgenen kommen kann (GREILING, 1989). Ein Enzymdefekt der **3 β -Dehydrogenase** verursacht auch eine verminderte Gestagenproduktion, die hier nicht festgestellt werden konnte. Defekte der **21 β -Hydroxylase** oder der **11 β -Hydroxylase** kämen jedoch als Ursache durchaus infrage. Beide Enzymdefekte hemmen eine Umwandlung der Gestagene in Corticosteroide (speziell in Cortisol und Aldosteron), führen so zu einem Anstieg des Gestagenspiegels und zu einer dadurch bedingten erhöhten Metabolisierung der Gestagene in Androgene und Östrogene. Das Vorliegen eines solchen Enzymdefektes wäre bei den virilisierten Stuten, bei denen keine andere Ursache gefunden werden konnte, also durchaus denkbar. Bei 15 der untersuchten Stuten muß die Erhöhung des Steroidprofils jedoch auf ein Ovarhämatom (n=2) oder einen **Ovarialtumor** zurückgeführt werden. Es wurden Theka-Granulosa-Zelltumore (n=7), Arrhenoblastome (n=4) und Zystadenome (n=2) diagnostiziert. Diese Tumorformen wurden bereits früher beschrieben, wobei in allen Fällen erhöhte Androgenkonzentrationen nachgewiesen wurden (PIQUETTE, 1990; HELD, 1982; HUGHES, 1980).

Die eigenen Ergebnisse bestätigen die Literatur und belegen zudem erhöhte Östrogen- und Gestagenkonzentrationen.

3.2.6. Faktorielle Beeinflussung des endogenen Steroidprofils

Die bisher dargestellten Ergebnisse weisen auf einen erhöhten Steroidspiegel bei Stuten mit Virilisierungserscheinungen hin. In diesem Kapitel wird der Frage nachgegangen, welchen zusätzlichen Einfluß individuelle Eigenschaften auf die Androgen-, Östrogen- und Gestagenkonzentrationen im Harn der Stuten haben. Zu diesem Zweck wurden die Faktoren Alter, ovarielle Defekte, Virilisierungsstärke und Reproduktionsstatus der Stuten untersucht.

3.2.6.1. Einflußfaktor Alter

Es ist bereits bekannt, daß das Alter einen Einfluß auf das Sexualsteroidprofil von Stuten hat (VALENTINE, 1999). Ziel vorliegender Untersuchung war, herauszufinden, ob dies auch auf virilisierte Stuten zutrifft. Sowohl die Vollblut- als auch die Warmblutstuten wurden in zwei verschiedene Altersgruppen untergliedert (AG 1 = 4-9- Jahre ; AG 2 = 10-15 Jahre). Die durchschnittlichen Harnsteroidkonzentrationen beider Altersgruppen wurden im Östrus und im Diöstrus miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen 10-13 zusammengefaßt.

Tab. 10: Vergleich der Steroidprofile virilisierter **Warmblutstuten** der Altersgruppen 4-9 Jahre (AG 1) und 10-15 Jahre (AG 2) im **Östrus**

Steroide (Trivialname)	Mittelwert (ng/ml) AG1 (n=9)	SD	Mittelwert (ng/ml) AG2 (n=4)	SD	Signifikanz (p)
Androgene					
Testosteron	18,08	10,8	20,2	9,9	n.s.
Androsteron	27,3	3,9	29,4	5,8	n.s.
Etiocholanolon	19,84	0,9	23,07	4,8	n.s.
Epiandrosteron	7,06	2,2	9,6	2,5	n.s.
11-Ketoandrosteron	8,9	2,2	11,08	3,5	n.s.
11-Ketoetiocholanolon	32,4	6,2	38,9	7,7	n.s.
11-Ketoepiandrosteron	13,19	4,3	13,6	3,6	n.s.
Androstandiol-17alpha	14,64	1,9	17,4	4,3	n.s.
Androstandiol-17β	16,46	4,2	17,7	4,4	n.s.
DHEA	62,22	21,8	81,2	15,7	n.s.
Androstendion	8,55	6,5	8,4	5	n.s.
11-Hydroxyandrosteron	23,25	4,6	25,3	4,7	n.s.
11-Hydroxyetiocholanolon	24,9	7,6	24,5	4,6	n.s.
11-Hydroxyepiandrosteron	105,9	17,01	191,8	272,9	n.s.
Östrogene					
Estron	258,5	21,2	271,6	46,6	n.s.
Estradiol-17alpha	32,22	9,4	34,4	9,3	n.s.
Estradiol-17β	51,52	5,7	54,9	13,8	n.s.
Gestagene					
Pregnendiol-20β	86,4	85,7	113,9	75,72	n.s.
Pregnendiol-20 alpha	73,22	63,9	109,2	64,3	n.s.
Pregnandiol-20β	724,1	696	1218,8	743,3	n.s.
Pregnantriol-20β	46,94	65,5	65,5	30,6	n.s.
Pregnantriol-20alpha	12	10,3	17,9	9,6	n.s.

Ein Vergleich der durchschnittlichen Steroidkonzentrationen im Harn der Stuten zeigte geringfügig höhere Werte für Androgene, Östrogene und Gestagene bei den älteren Stuten. Die Unterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant.

Tab. 11: Vergleich der Steroidprofile virilisierten **Vollblutstuten** der Altersgruppen 4-9 Jahre (AG 1) und 10-15 Jahre (AG 2) im **Östrus**

Steroide (Trivialname)	Mittelwert (ng/ml) AG1 (n=9)	SD	Mittelwert (ng/ml) AG2 (n=4)	SD	Signifikanz (p)
Androgene					
Testosteron	34,9	15,29	36,92	6,12	n.s.
Androsteron	33,99	13	37,77	4,44	n.s.
Etiocholanolon	26,3	12,59	29,71	10,06	n.s.
Epiandrosteron	10,64	5,4	12,2	6,5	n.s.
11-Ketoandrosteron	9,1	3,91	14,43	8,87	n.s.
11-Ketoetiocholanolon	31,25	11,89	33,24	12,05	n.s.
11-Ketoepiandrosteron	14,85	7,16	17,35	5,62	n.s.
Androstandiol-17alpha	14,54	5,72	16,63	8,29	n.s.
Androstandiol-17β	14,84	5,66	15,62	6,62	n.s.
DHEA	85,22	41,21	87,47	21,31	n.s.
Androstendion	6,98	3,88	5,75	1,71	n.s.
11-Hydroxyandrosteron	25,54	7,01	29,16	6,57	n.s.
11-Hydroxyetiocholanolon	26,7	8,88	35,22	3,753	n.s.
11-Hydroxyepiandrosteron	100,5	34,69	111,12	9,12	n.s.
Östrogene					
Estron	287,16	90,36	279,4	108,09	n.s.
Estradiol-17alpha	29,07	9,78	32,55	12,63	n.s.
Estradiol-17β	50,25	18,82	59,45	22,55	n.s.
Gestagene					
Pregnendiol-20β	72,08	42,44	100,22	17,39	n.s.
Pregnendiol-20 alpha	65,09	40,05	75,45	15,3	n.s.
Pregnandioliol-20β	1066,3	743,8	540,2	430,7	n.s.
Pregnantrioliol-20β	54,34	19,17	33,5	10,23	n.s.
Pregnantrioliol-20alpha	5,76	2,29	4,412	2,54	n.s.

Auch bei den Vollblütern lag die Konzentration der Androgene, Östrogene und Gestagene der älteren Stuten im Östrus geringgradig höher. Ausnahme hier sind Estron, Pregnandioliol-20β, Pregnantrioliol-20β sowie Pregnantrioliol-20α, deren Konzentrationen bei den jüngeren Stuten höher lagen. Die Unterschiede waren auch hier nicht signifikant.

Tab. 12: Vergleich der Steroidprofile virilisierter **Warmblutstuten** der Altersgruppen 4-9 Jahre (AG 1) und 10-15 Jahre (AG 2) im **Diöstrus**

Steroide (Trivialname)	Mittelwert (ng/ml) AG1 (n=7)	SD	Mittelwert (ng/ml) AG2 (n=6)	SD	Signifikanz (p)
Androgene					
Testosteron	7,58	5,19	7,85	2,81	n.s.
Androsteron	14,57	9,83	12,71	4,1	n.s.
Etiocholanolon	11,15	8,54	10,56	2,9	n.s.
Epiandrosteron	4,36	3,7	5,28	0,61	n.s.
11-Ketoandrosteron	5,18	3,2	4,83	1,07	n.s.
11-Ketoetiocholanolon	16,95	11,12	18,74	3,45	n.s.
11-Ketoepiandrosteron	6,05	2,77	6,98	1,46	n.s.
Androstandiol-17alpha	7,95	3,61	8,57	0,74	n.s.
Androstandiol-17β	8,12	4,43	8,14	2,28	n.s.
DHEA	39,48	25,72	42,86	10,14	n.s.
Androstendion	3,22	3,47	3,19	1,02	n.s.
11-Hydroxyandrosteron	12,18	9,12	13,43	3,09	n.s.
11-Hydroxyetiocholanolon	11,83	7,82	13	2,05	n.s.
11-Hydroxyepiandrosteron	57,21	41,85	58,63	10,38	n.s.
Östrogene					
Estron	133,43	99,92	134,6	42,88	n.s.
Estradiol-17alpha	15,65	13,38	15,56	4,98	n.s.
Estradiol-17β	29,92	20,63	28,83	6,01	n.s.
Gestagene					
Pregnendiol-20β	220,11	30,2	228,58	8,27	n.s.
Pregnendiol-20 alpha	212,99	35,57	230,81	21,5	n.s.
Pregnandiol-20β	2647,4	330,38	2673,7	91,26	n.s.
Pregnantriol-20β	115,36	25,18	122,63	9,718	n.s.
Pregnantriol-20alpha	30,91	7,72	31,51	2,86	n.s.

Auch im Diöstrus waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Steroidprofilen von Stuten unterschiedlichen Alters festzustellen. Tendenziell lagen auch hier die Androgen-, Östrogen- und Gestagenkonzentrationen der älteren Stuten auf einem höheren Niveau. Dies galt nicht für Estradiol-17 α , Estradiol-17 β , Androsteron, Etiocholanolon, Epiandrosteron und 11-Ketoandrosteron.

Tab. 13: Vergleich der Steroidprofile virilisierter **Vollblutstuten** der Altersgruppen 4-9 Jahre (AG 1) und 10-15 Jahre (AG 2) im **Diöstrus**

Steroide (Trivialname)	Mittelwert (ng/ml) AG1 (n=4) Diöstrus	SD	Mittelwert (ng/ml) AG2 (n=4) Diöstrus	SD	Signifikanz (p)
Androgene					
Testosteron	19,24	12,55	8,29	8,25	n.s.
Androsteron	16,87	12,24	9,5	8,95	n.s.
Etiocholanolon	16,35	11,23	7,37	9,29	n.s.
Epiandrosteron	4,93	3,09	3,49	3,32	n.s.
11-Ketoandrosteron	4,02	1,92	2,21	2,65	n.s.
11-Ketoetiocholanolon	16,22	10,11	5,53	5,32	n.s.
11-Ketoepiandrosteron	8,02	4,76	5,24	4,33	n.s.
Androstandiol-17alpha	5,82	4,29	3,03	2,22	n.s.
Androstandiol-17β	5,3	3,57	4,85	3,56	n.s.
DHEA	37,3	26,21	23,15	22,08	n.s.
Androstendion	2,43	1,67	2,42	1,66	n.s.
11-Hydroxyandrosteron	12,37	8,2	7,27	6,85	n.s.
11-Hydroxyetiocholanolon	12,97	7,94	7,95	9,09	n.s.
11-Hydroxyepiandrosteron	49,35	31,19	27,25	29,08	n.s.
Östrogene					
Estron	154,55	101,41	87,51	92,29	n.s.
Estradiol-17alpha	14,08	10,3	10,62	8,73	n.s.
Estradiol-17β	24,4	12,26	16	13,02	n.s.
Gestagene					
Pregnendiol-20β	213,62	14,38	199,95	21	n.s.
Pregnendiol-20 alpha	189,97	14,31	180,17	26,31	n.s.
Pregnandiol-20β	2361,25	257,88	2385,75	267,1	n.s.
Pregnantriol-20β	90,95	11,85	77,07	19,54	n.s.
Pregnantriol-20alpha	12,36	3,77	10,27	1,82	n.s.

Bei den älteren Vollblutstuten liegt der Steroidspiegels auf niedrigerem Niveau als bei den jüngeren. Dies gilt für alle Steroide bis auf Pregnandiol-20β. Allerdings erwiesen sich auch diese Unterschiede als nicht signifikant.

3.2.6.1.1. Diskussion zum Einflussfaktor Alter

In der durchgeführten Untersuchung konnten mit Ausnahme nur unbedeutender Unterschiede in den Androgen-, Östrogen- und Gestagenkonzentrationen bei älteren virilisierten Stuten nachgewiesen werden. Die Unterschiede waren nicht signifikant, weshalb zu diesem Einflussfaktor keine eindeutige Aussage gemacht werden kann. Es gibt Hinweise auf eine Abnahme der Konzentration bestimmter Steroidhormone mit zunehmendem Alter. Hierzu gehört vor allem Pregnenolon (VALENTINE, 1999), das die Ausgangssubstanz für die meisten weiteren Steroide darstellt. Die Pregnenolon - Metaboliten Pregnan diol-20 β , Pregnantriol-20 β und Pregnantriol-20 α liegen in dieser Untersuchung bei höherem Alter ebenfalls in niedrigerer Konzentration vor.

3.2.6.2. Einflußfaktor ovarieller Defekt

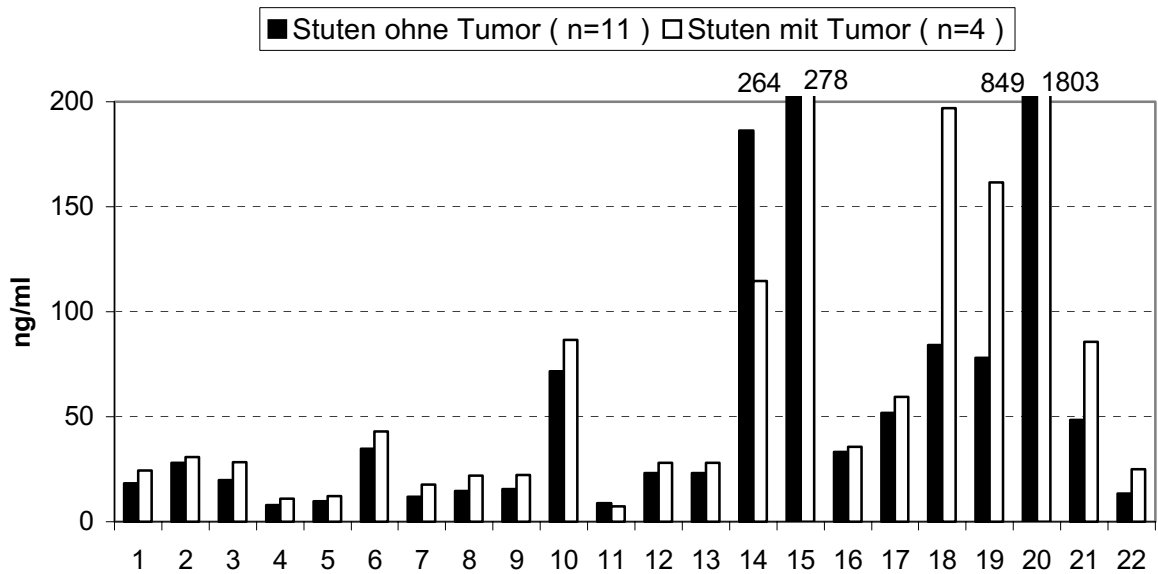
In der Literatur werden Veränderungen des endogenen Steroidprofils als Folge ovarieller Defekte aufgrund eines Tumors beschrieben (MEAGHER, 1977 ; STABENFELDT, 1979). In weiteren Untersuchungen wurden die durchschnittlichen Androgen-, Östrogen- und Gestagenkonzentrationen der virilisierten Stuten, bei denen ein Tumor ausgeschlossen worden war, mit denen der Stuten verglichen, die einen ovariellen Defekt aufwiesen. Dabei wurde zwischen folgenden ovariellen Defekten unterschieden:

Tabelle 14: Ovarielle Defekte bei virilisierten Warm- und Vollblutstuten (n=13)

Ovarieller Defekt	Anzahl der erkrankten Stuten (Warmblut)	Anzahl der erkrankten Stuten (Vollblut)
Theka-Granulosa-Zelltumor	4	3
Arrhenoblastom	4	0
Zystadenom	2	0

Es wurde wieder zwischen östrischen und diöstrischen Stuten unterschieden. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen hierzu die Ergebnisse.

Abb.11: Vergleich der Sexualsteroidprofile virilisierter **Warmblutstuten** im **Östrus** mit und ohne Tumor

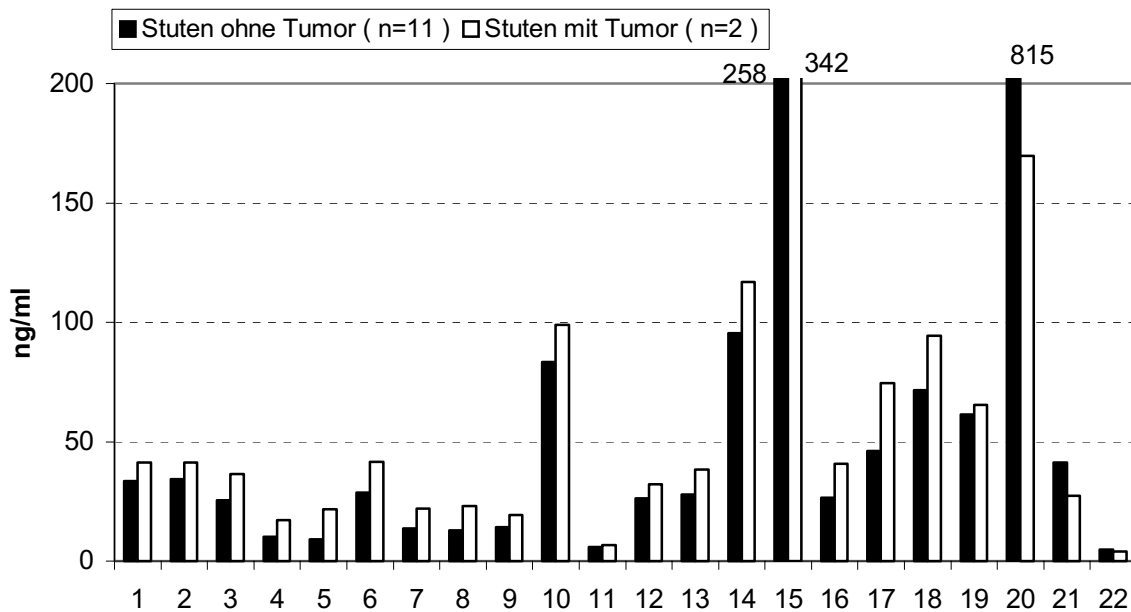


1=Testosteron; 2=Androsteron; 3=Etiocholanolon; 4=Epiandrosteron; 5=11-Ketoandrosteron; 6=11-Ketoetiocholanolon; 7=11-Ketoepiandrosteron; 8=Androstandiol-17 α ; 9=Androstandiol-17 β ; 10=DHEA; 11= Androstendion; 12=11-Hydroxyandrosteron; 13=11-Hydroxyetiocholanolon; 14=11-Hydroxyepiandrosteron; 15=Estron; 16=Estradiol-17 α ; 17=Estradiol-17 β ; 18=Pregnendiol-20 β ; 19=Pregnendiol-20 α ; 20=Pregnandiol-20 β ; 21=Pregnantriol-20 β ; 22=Pregnantriol-20 α

Die Steroidprofile virilisierter Warmblutstuten mit einem Ovarialtumor zeigte im Östrus folgende Besonderheiten:

Die Androgen-, Östrogen- und Gestagenkonzentration war bei diesen Stuten höher als bei denen ohne Tumor. Die Unterschiede erwiesen sich für die Androgene Etiocholanolon, Epiandrosteron, 11- Ketoepiandrosteron, Androstandiol-17 α und Androstandiol-17 β und für alle Gestagene bis auf Pregnantriol-20 β als signifikant.

Abb.12: Vergleich der Sexualsteroidprofile virilisierter **Vollblutstuten** im **Östrus** mit und ohne Tumor



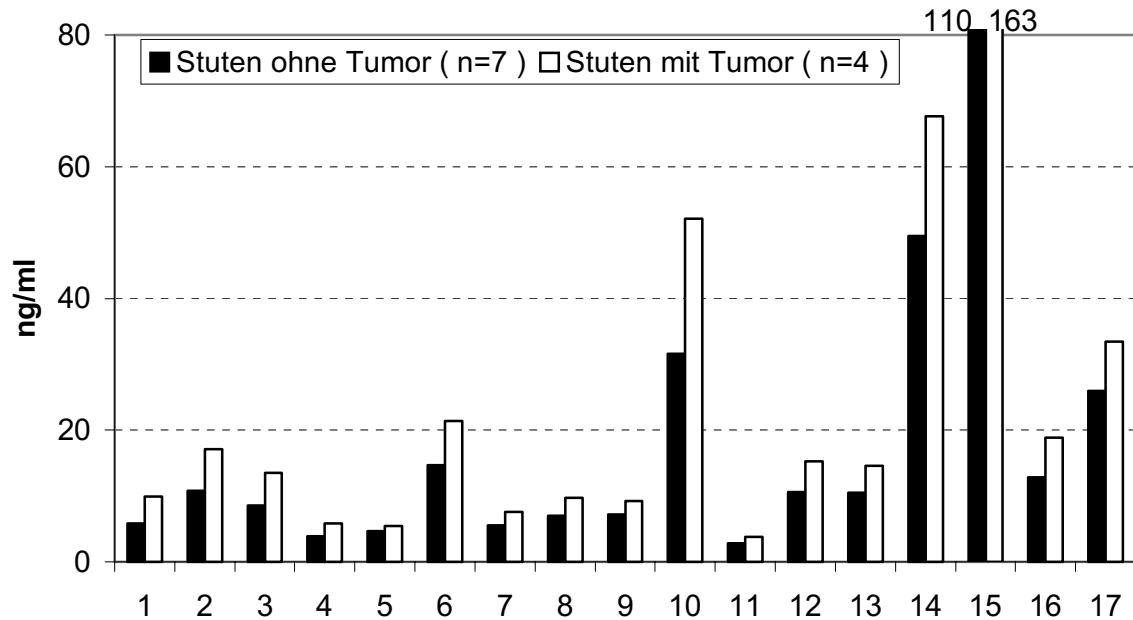
1=Testosteron; 2=Androsteron; 3=Etiocholanolon; 4=Epandrosteron; 5=11-Ketoandrosteron; 6=11-Ketoetiocholanolon; 7=11-Ketoepiandrosteron; 8=Androstandiol-17 α ; 9=Androstandiol-17 β ; 10=DHEA; 11= Androstendion; 12=11-Hydroxyandrosteron; 13=11-Hydroxyetiocholanolon; 14=11-Hydroxyepiandrosteron; 15=Estron; 16=Estradiol-17 α ; 17=Estradiol-17 β ; 18=Pregnendiol-20 β ; 19=Pregnendiol-20 α ; 20=Pregnantriol-20 β ; 21=Pregnantriol-20 α

An dieser Stelle wird auf die geringe Anzahl der Vollblutstuten im Östrus mit einem Tumor hingewiesen. Die Auswertungen geben also lediglich Tendenzen an.

Ein Vergleich der Steroidprofile virilisierter Vollblutstuten mit und ohne Tumor zeigte im Östrus folgende Besonderheiten:

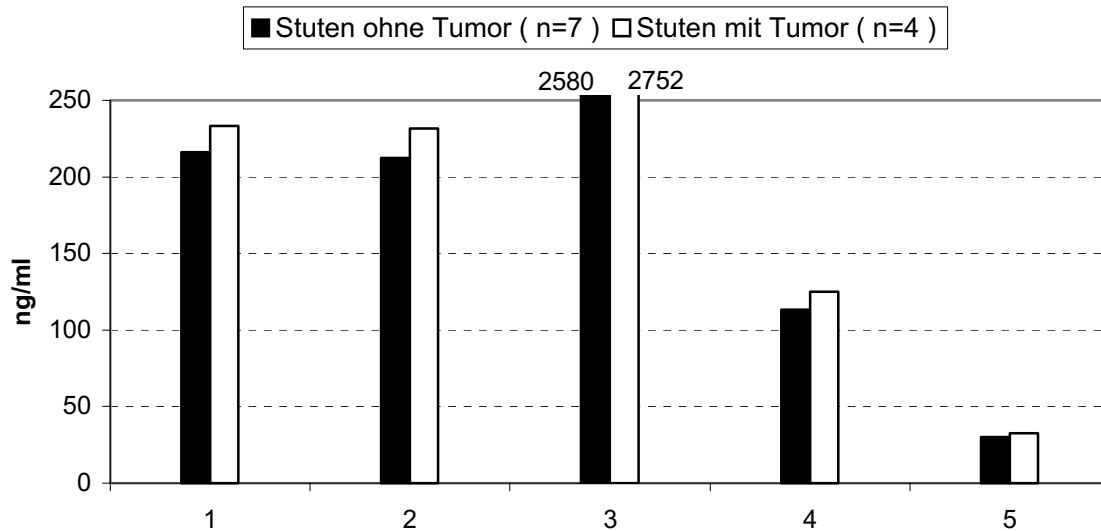
Die Androgen-, Östrogen- und Gestagenkonzentration war bei diesen Stuten höher als bei denen ohne Tumor. Die Unterschiede erwiesen sich für 11- Ketoandrosteron, Pregnenndiol-20 α und Pregnenndiol-20 β als signifikant.

Abb.13: Vergleich der **Androgen- und Östrogenprofils** virilisierter **Warmblustuten** im **Diöstrus** mit und ohne Tumor



1=Testosteron; 2=Androsteron; 3=Etiocholanolon; 4=Epiandrosteron; 5=11-Ketoandrosteron; 6=11-Ketoetiocholanolon; 7=11-Ketoepiandrosteron; 8=Androstandiol-17 α ; 9=Androstandiol-17 β ; 10=DHEA; 11=Androstendion; 12=11-Hydroxyandrosteron; 13=11-Hydroxyetiocholanolon; 14=11-Hydroxyepiandrosteron; 15=Estron; 16=Estradiol-17 α ; 17=Estradiol-17 β

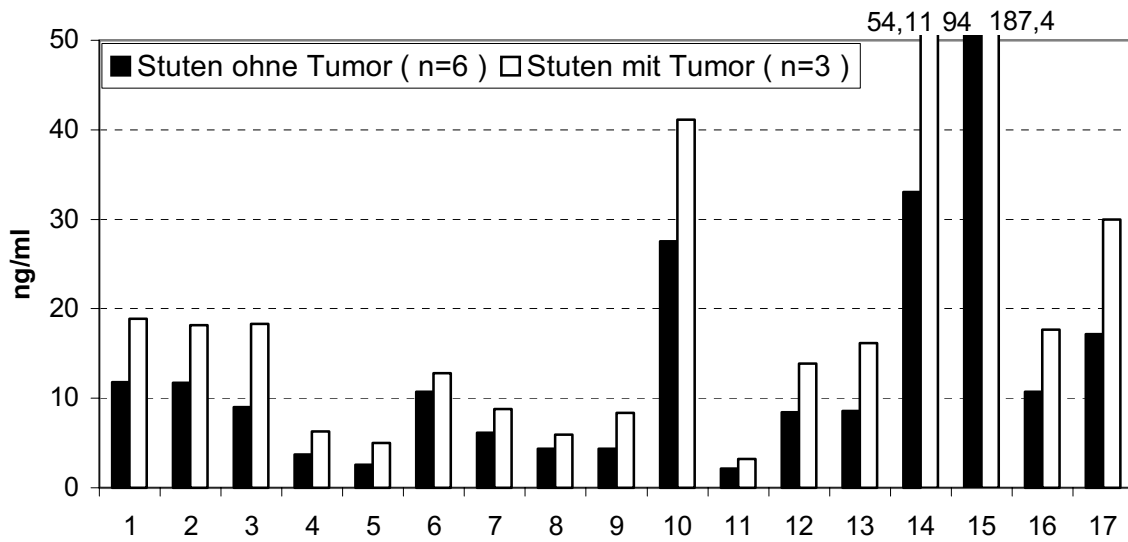
Abb.14: Vergleich des **Gestagenprofils** virilisierter **Warmblutstuten** im **Diöstrus** mit und ohne Tumor



1=Pregnendiol-20 β ; 2=Pregnendiol-20 α ; 3=Pregnandiol-20 β ; 4=Pregnantriol-20 β ; 5=Pregnantriol-20 α

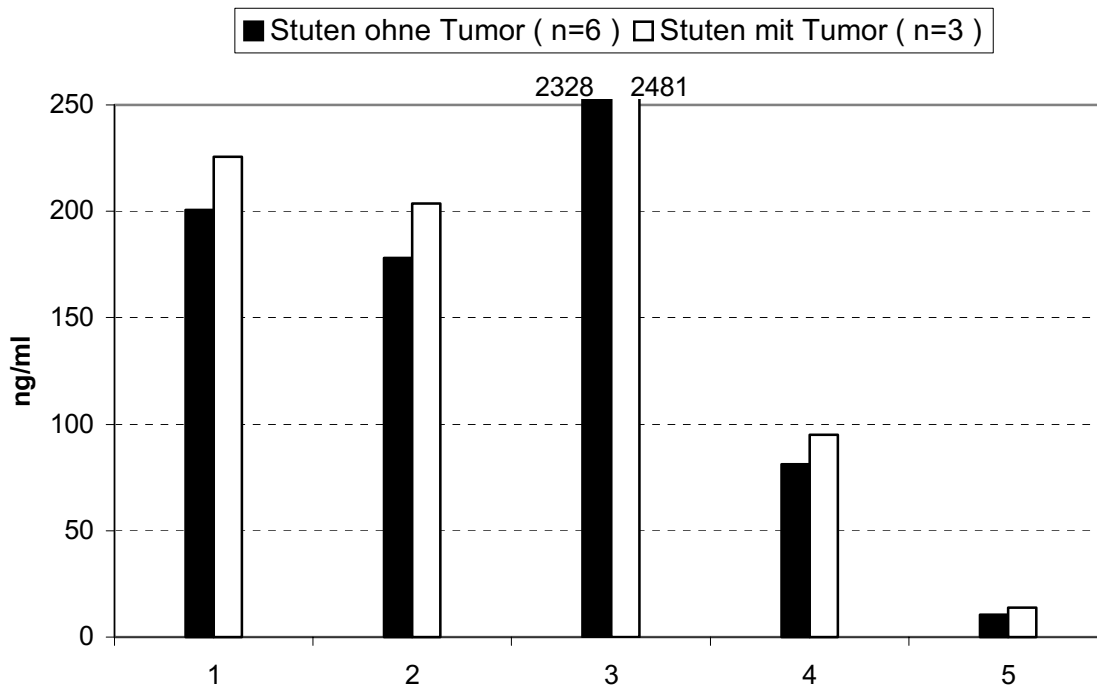
Auch im Diöstrus liegen die Androgen-, Östrogen- und Gestagenkonzentrationen im Harn der Warmblutstuten mit einem Tumor höher. Die Unterschiede sind für Epiandrosteron, Androstandiol-17 β , DHEA, Androstendion, 11-Hydroxyetiocholanolon, 11-Hydroxyepiandrosteron und Pregnendiol-20 β signifikant.

Abb.15: Vergleich der **Androgen- und Östrogenprofils** virilisierter **Vollblustuten** im **Diöstrus** mit und ohne Tumor



1=Testosteron; 2=Androsteron; 3=Etiocholanolon; 4=Epiandrosteron; 5=11-Ketoandrosteron; 6=11-Ketoetiocholanolon; 7=11-Ketoepiandrosteron; 8=Androstandiol-17 α ; 9=Androstandiol-17 β ; 10=DHEA; 11=Androstendion; 12=11-Hydroxyandrosteron; 13=11-Hydroxyetiocholanolon; 14=11-Hydroxyepiandrosteron; 15=Estron; 16=Estradiol-17 α ; 17=Estradiol-17 β

Abb.16: Vergleich des **Gestagenprofils** virilisierter **Vollblutstuten** im **Diöstrus** mit und ohne Tumor



1=Pregnendiol-20 β ; 2=Pregnendiol-20 α ; 3=Pregnandiol-20 β ; 4=Pregnantriol-20 β ; 5=Pregnantriol-20 α

Auch bei den Vollblütern liegt der Androgen-, Östrogen- und Gestagenspiegel bei den Stuten mit Tumor auf einem höheren Niveau. Wie bei den Warmblütern ergab sich ein signifikanter Unterschied nur für Pregnendiol-20 β .

3.2.6.2.1. Diskussion zum Einflussfaktor ovarieller Defekt

Es wurde zwischen **virilisierten Stuten mit einem Tumor (T)** als bekannter Ursache und **virilisierten Stuten ohne bekannte Ursache (o.T.)** unterschieden. Sowohl bei den Warmblut- als auch bei den Vollblutstuten zeigte die T-Gruppe einen höheren Androgen-, Östrogen- und Gestagenspiegel.

In der Literatur wurden organische Veränderungen der Ovarien der Stute als Ursache von Virilisierungserscheinungen bereits analysiert (BUSCH und KLUG, 1999). Ovarielle Defekte werden durch rektale Palpation und – wie in der hier durchgeführten Studie – sonographische Untersuchung diagnostiziert.

Zu den häufigsten **Tumorformen** des Ovars der Stute zählen der Theka- Granulosa-Zelltumor (TGZ), hier fünf Fälle, das Arrhenoblastom, hier bei vier Stuten, und das Zystadenom, hier zweimal vertreten. Alle drei Tumorformen verursachten hier eine Überproduktion von Sexualsteroiden. In der Literatur finden sich Hinweise bei Stuten lediglich mit erhöhten Testosteronwerten bei Vorhandensein eines Theka-Granulosa-Zelltumors (STABENFELDT (1979); BUSCH und KLUG , 1999) .

Die Steroidkonzentrationen überschreiten bei den Stuten mit einem Tumor nicht nur die gesunder Stuten, sondern auch die virilisierten Stuten ohne Tumor.

3.2.6.3. Einflußfaktor Virilisierungsstärke

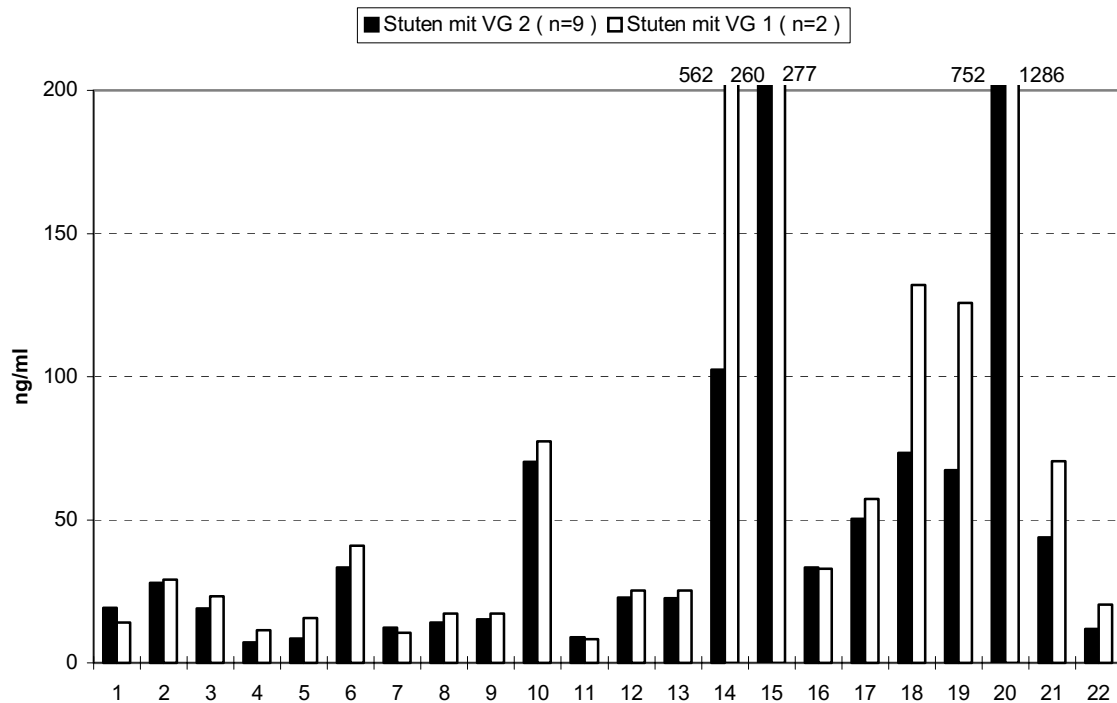
Klinisch äußert sich eine Virilisierung bei Stuten in unterschiedlichen Symptomen, die dem Grad der Virilisierung entsprechen. In der vorliegenden Studie wurden die Symptome der Stuten, bei denen **kein Tumor** diagnostiziert wurde, folgendermaßen untergliedert:

Ausschließlich Abweichungen im Verhalten (n=12) VG 1	Somatische und genitale Symptome in Kombination mit Abweichungen im Verhalten (n=24) VG 2
Anöstrus (n=8) Nymphomanie (n=12) Aggressiv-dominantes Verhalten gegenüber Menschen (n=21) Hengstartiges Gebaren bei anderen Pferden (n=10)	Maskuline Muskelentwicklung (n=15) Ausbildung von Hengstzähnen (n=9) Ovarialzysten (n=5) Azyklie (n=11)

Es sollte überprüft werden, ob die Stärke der Virilisierung mit dem Sexualsteroidprofil der Stuten korreliert. Stuten, die ausschließlich Verhaltensauffälligkeiten zeigten, wurden dem Virilisierungsgrad 1 (VG 1) zugeordnet. Die übrigen Stuten wurden zum VG 2 zusammengefaßt. Die nachfolgenden Abbildungen geben einen Vergleich der Werte bei Stuten mit VG 1 und VG 2. Es erfolgt wieder die Unterteilung nach Rasse und Zyklusstadium.

Abb.17: Vergleich der Steroidprofile virilisierter **Warmblutstuten** mit VG 1 und VG 2 im

Östrus

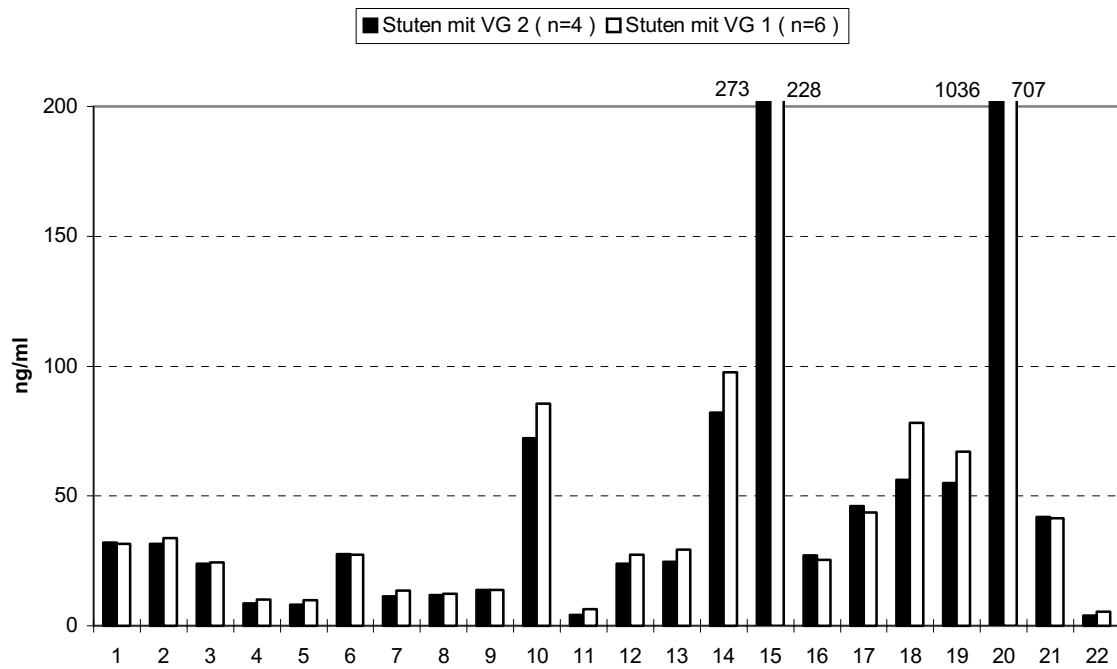


1=Testosteron; 2=Androsteron; 3=Etiocholanolon; 4=Epiandrosteron; 5=11-Ketoandrosteron; 6=11-Ketoetiocholanolon; 7=11-Ketoepiandrosteron; 8=Androstandiol-17 α ; 9=Androstandiol-17 β ; 10=DHEA; 11=Androstendion; 12=11-Hydroxyandrosteron; 13=11-Hydroxyetiocholanolon; 14=11-Hydroxyepiandrosteron; 15=Estron; 16=Estradiol-17 α ; 17=Estadiol-17 β ; 18=Pregnendiol-20 β ; 19=Pregnendiol-20 α ; 20=Pregnandiol-20 β ; 21=Pregnantriol-20 β ; 22=Pregnantriol-20 α

Ein Vergleich der Ergebnisse nach dem Schweregrad der Virilisierung ergab für die Rasse Warmblut im Östrus folgende Besonderheiten:

1. Die Stuten mit VG 1 zeigen einen höheren Androgen-, Östrogen- und Gestagenspiegel im Harn.
2. Die Unterschiede sind für die Androgene Etiocholanolon, Epiandrosteron und 11-Ketoandrosteron signifikant.

Abb.18: Vergleich der Steroidprofile virilisierter **Vollblutstuten** mit VG 1 und VG 2 im **Östrus**

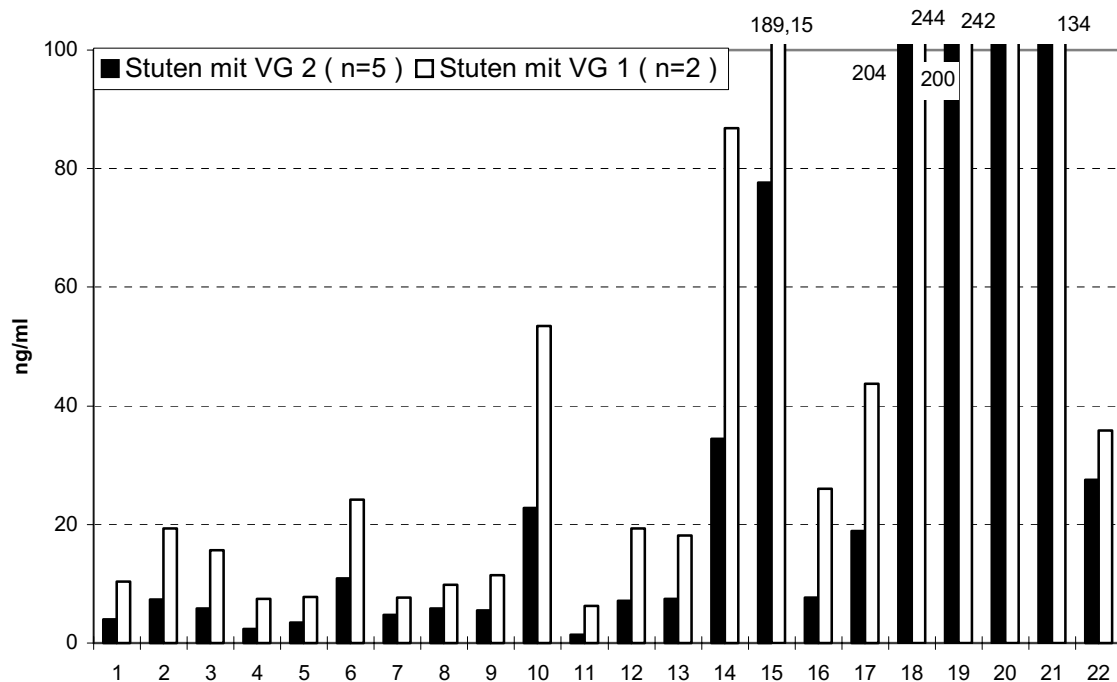


1=Testosteron; 2=Androsteron; 3=Etiocholanolon; 4=Epiandrosteron; 5=11-Ketoandrosteron; 6=11-Ketoetiocholanolon; 7=11-Ketoepiandrosteron; 8=Androstandiol-17 α ; 9=Androstandiol-17 β ; 10=DHEA; 11=Androstendion; 12=11-Hydroxyandrosteron; 13=11-Hydroxyetiocholanolon; 14=11-Hydroxyepiandrosteron; 15=Estron; 16=Estradiol-17 α ; 17=Estradiol-17 β ; 18=Pregnendiol-20 β ; 19=Pregnendiol-20 α ; 20=Pregnandiol-20 β ; 21=Pregnantriol-20 β ; 22=Pregnantriol-20 α

Vollblutstuten mit unterschiedlichem Virilisierungsgrad zeigten im Östrus kaum Unterschiede in den Sexualsteroidkonzentrationen. Der Androgen-, Östrogen- und Gestagenspiegel war leicht erhöht. Signifikante Unterschiede gab es jedoch nicht.

Abb.19: Vergleich der Steroidprofile virilisierter **Warmblutstuten** mit VG 1 und VG 2 im

Diöstrus

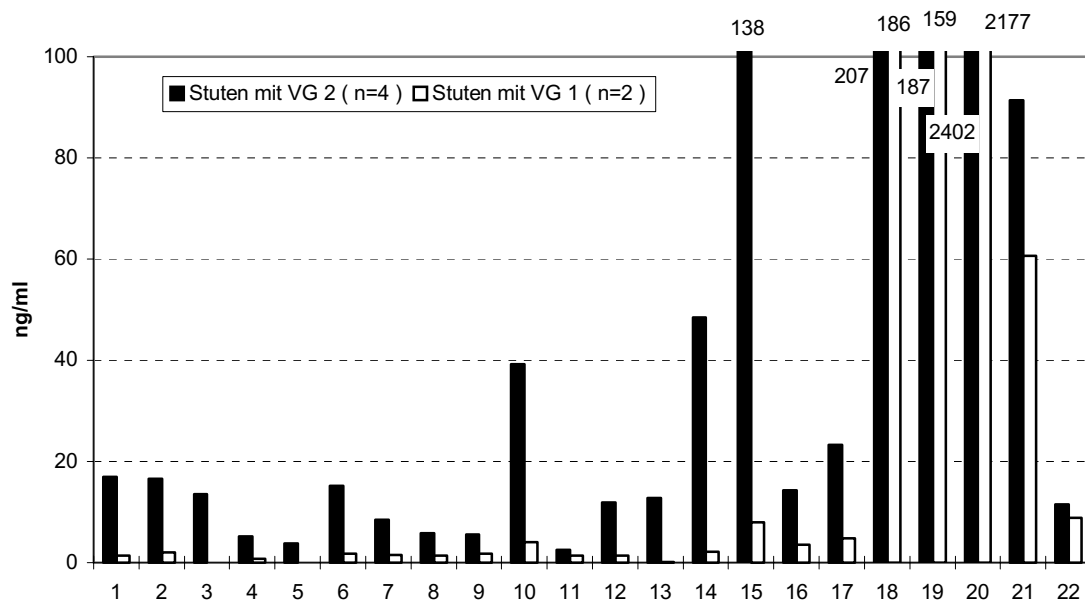


1=Testosteron; 2=Androsteron; 3=Etiocholanolon; 4=Epiandrosteron; 5=11-Ketoandrosteron; 6=11-Ketoetiocholanolon; 7=11-Ketoepiandrosteron; 8=Androstandiol-17 α ; 9=Androstandiol-17 β ; 10=DHEA; 11=Androstendion; 12=11-Hydroxyandrosteron; 13=11-Hydroxyetiocholanolon; 14=11-Hydroxyepiandrosteron; 15=Estron; 16=Estradiol-17 α ; 17=Estardiol-17 β ; 18=Pregnendiol-20 β ; 19=Pregnendiol-20 α ; 20=Pregnandiol-20 β ; 21=Pregnantriol-20 β ; 22=Pregnantriol-20 α

Auch im Diöstrus zeigen sich bei den Warmblutstuten tendenzielle Unterschiede im Sexualsteroidspiegel. Die Konzentrationen der Androgene, Östrogene und Gestagene von Stuten mit VG 1 lagen auf einem höheren Niveau. Signifikanzen konnten jedoch nicht festgestellt werden. An dieser Stelle wird auf die geringe Warmblutstutenzahl mit VG 1 im Diöstrus hingewiesen. Das Untersuchungsergebnis gibt hier nur Auskunft über festgestellte Tendenzen.

Abb.20: Vergleich der Steroidprofile virilisierter **Vollblutstuten** mit VG 1 und VG 2 im

Diöstrus



1=Testosteron; 2=Androsteron; 3=Etiocholanolon; 4=Epiandrosteron; 5=11-Ketoandrosteron; 6=11-Ketoetiocholanolon; 7=11-Ketoepiandrosteron; 8=Androstandiol-17 α ; 9=Androstandiol-17 β ; 10=DHEA; 11=Androstendion; 12=11-Hydroxyandrosteron; 13=11-Hydroxyetiocholanolon; 14=11-Hydroxyepiandrosteron; 15=Estron; 16=Estradiol-17 α ; 17=Estadiol-17 β ; 18=Pregnendiol-20 β ; 19=Pregnendiol-20 α ; 20=Pregnandiol-20 β ; 21=Pregnantriol-20 β ; 22=Pregnantriol-20 α

Der Vergleich der beiden Stutengruppen der Rasse Vollblut im Diöstrus hebt sich von den bisher gezogenen Vergleichen der Virilisierungsstärke ab. Die Harnproben weisen für alle analysierten Steroidhormone höhere Konzentrationen bei den Vollblutstuten mit somatischen Symptomen (VG 2) auf. Für Pregnantriol-20 β erwies sich der Unterschied als signifikant. Jedoch wird auch hier auf die geringe Vollblutstutenzahl mit VG1 im Diöstrus hingewiesen. Das Untersuchungsergebnis gibt in diesem Fall nur eine Tendenz an.

3.2.6.3.1. Diskussion zum Einflussfaktor Virilisierungsstärke

Für diese Untersuchung wurde die Einteilung in Auffälligkeiten im Verhalten (Virilisierungsgrad 1=VG 1) sowie genitale und somatische Symptome (VG 2) gewählt. MEYERS- WALLEEN (1997) stellte fest, dass die klinischen Symptome meist in Kombination auftreten. Diese Aussage wird durch die vorliegende Untersuchung bestätigt, da die Stuten mit somatischen und genitalen Symptomen auch Verhaltensauffälligkeiten zeigten. Es war anzunehmen, dass sich mit dem Grad der klinischen Virilisierung auch das Sexualsteroidprofil verändert. Dies konnte jedoch nach Auswertung der Daten nicht bestätigt werden. Lediglich bei den Vollblütern im Diöstrus lagen die Stuten mit VG 2 hinsichtlich des Sexualsteroidniveaus über den Stuten mit VG 1. In allen übrigen Gruppen war dieser Unterscheid jedoch nicht festzustellen. Es wurden sogar eher höhere Androgen-, Östrogen- und Gestagenkonzentrationen im Harn von Stuten mit VG 1 gemessen. Eine Korrelation zwischen der Stärke der Virilisierung im klinischen Bild und der Stärke der endokrinologischen Abweichung ist somit nicht eindeutig nachweisbar.

3.2.6.4. Einflußfaktor Fruchtbarkeitsrate

Um den Fruchtbarkeitsrate der Stuten vergleichen zu können, wurde als einheitliche Bezugsgröße die Fruchtbarkeitsrate ermittelt. Diese definiert sich über zwei Größen:

1. Jahre der züchterischen Nutzung, d.h. die Zeit, in der die Stuten mit oder ohne Erfolg in der Zucht eingesetzt wurden
2. Anzahl der erbrachten Fohlen in dieser Zeit.

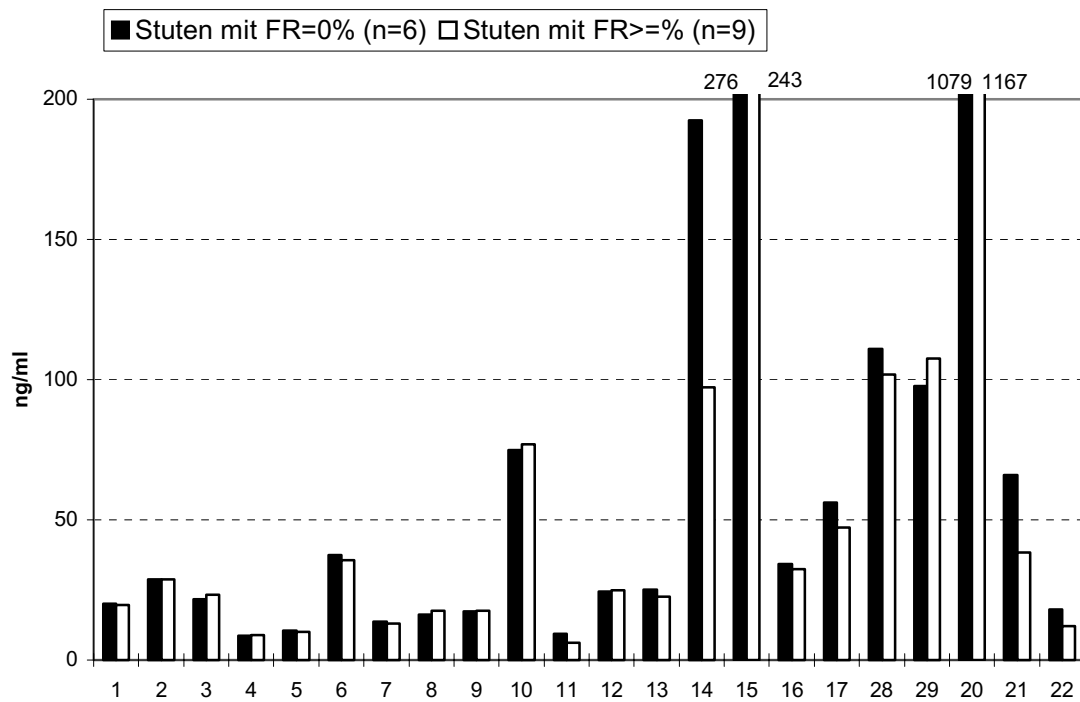
$$\text{Definition: Fruchtbarkeitsrate (\%)} = \frac{(\text{Anzahl der erbrachten Fohlen} * 100)}{\text{Anzahl der Jahre der züchterischen Nutzung}}$$

In der vorliegenden Untersuchung verteilten sich die Fruchtbarkeitsraten wie folgt:

Fruchtbarkeitsrate (%)	0	10-20	21-30	31-40	>40
Stutenanzahl (n)	23	3	11	9	4

Für die Auswertung wurde unterschieden zwischen Stuten mit einer Fruchtbarkeitsrate = 0 % und > 0 %. Die Mittelwerte der Harnsteroidkonzentrationen beider Gruppen wurden sowohl bei östrischen als auch bei diöstrischen Warm- und Vollblutstuten miteinander verglichen.

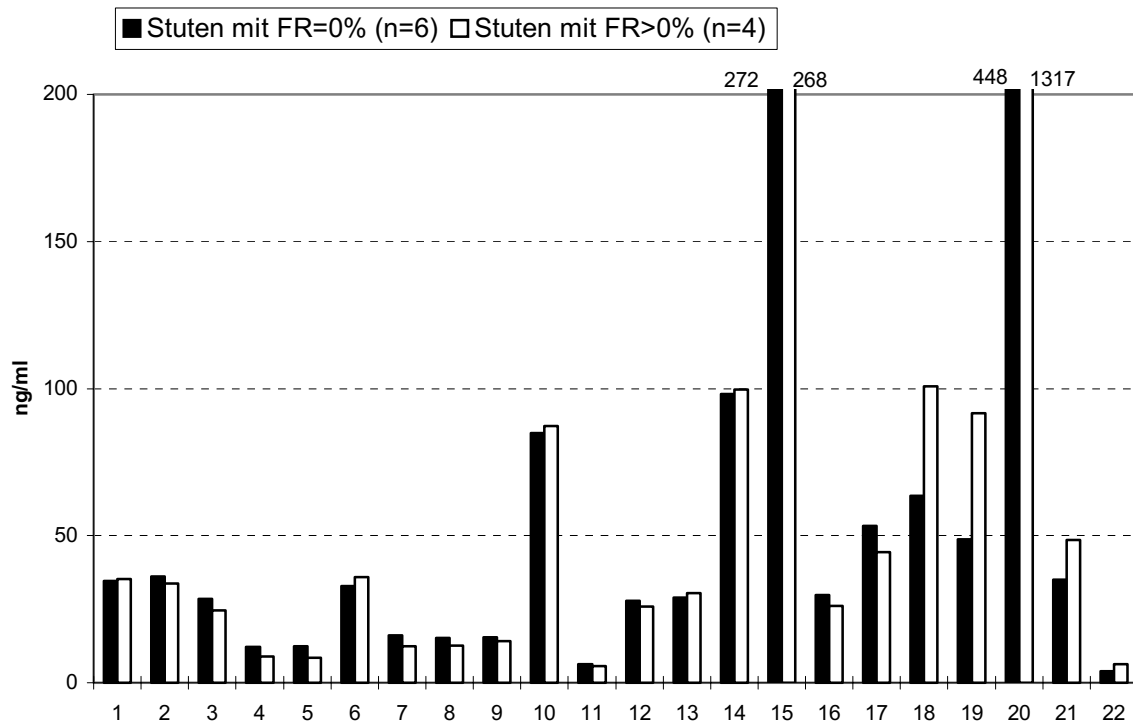
Abb.21: Vergleich der Steroidprofile virilisierter **Warmblutstuten** im **Östrus** mit einer Fruchtbarkeitsrate (FR) = 0 % oder >0 %



1=Testosteron; 2=Androsteron; 3=Etiocholanolon; 4=Epiandrosteron; 5=11-Ketoandrosteron; 6=11-Ketoetiocholanolon; 7=11-Ketoepiandrosteron; 8=Androstandiol-17 α ; 9=Androstandiol-17 β ; 10=DHEA; 11=Androstendion; 12=11-Hydroxyandrosteron; 13=11-Hydroxyetiocholanolon; 14=11-Hydroxyepiandrosteron; 15=Estron; 16=Estradiol-17 α ; 17=Estradiol-17 β ; 18=Pregnendiol-20 β ; 19=Pregnendiol-20 α ; 20=Pregnandiol-20 β ; 21=Pregnantriol-20 β ; 22=Pregnantriol-20 α

Androgen-, Östrogen- und Gestagenspiegel sind bei den Warmblutstuten im Östrus mit einer Fruchtbarkeitsrate = 0% erhöht. Für 11-Hydroxyepiandrosteron, Estron und Pregnantriol-20 β ist der Unterschied signifikant.

Abb.22 : Vergleich der Steroidprofile virilisierter **Vollblutstuten** im **Östrus** mit einer Fruchtbarkeitsrate (FR)= 0 % oder >0 %

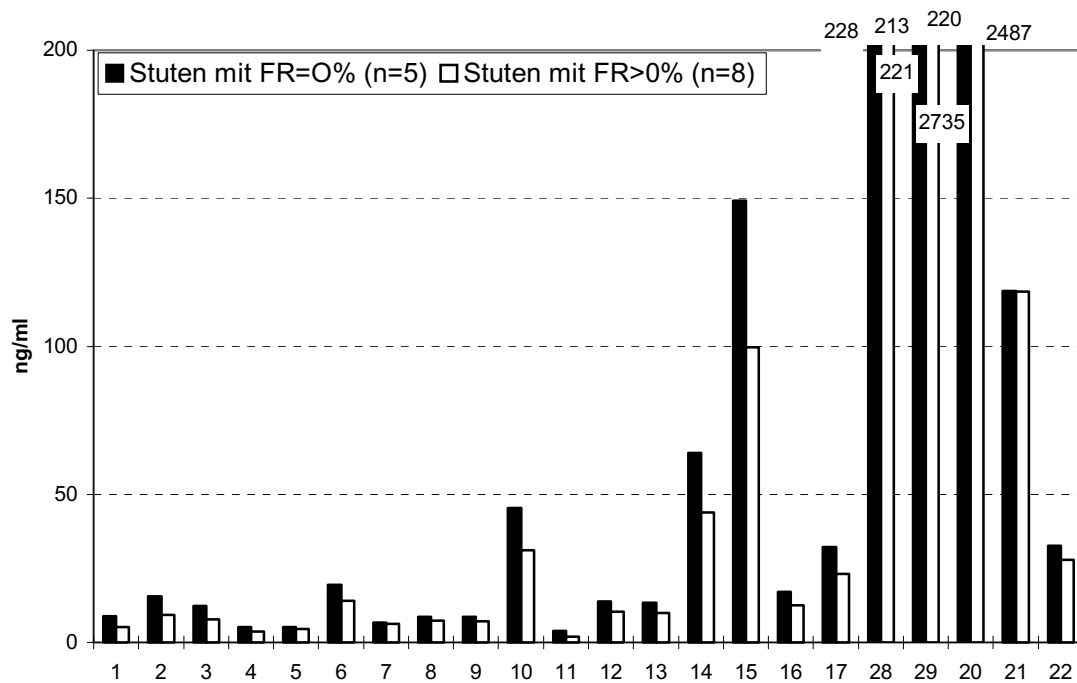


1=Testosteron; 2=Androsteron; 3=Etiocholanolon; 4=Epiandrosteron; 5=11-Ketoandrosteron; 6=11-Ketoetiocholanolon; 7=11-Ketoepiandrosteron; 8=Androstandiol-17α; 9=Androstandiol-17β; 10=DHEA; 11=Androstendion; 12=11-Hydroxyandrosteron; 13=11-Hydroxyetiocholanolon; 14=11-Hydroxyepiandrosteron; 15=Estron; 16=Estradiol-17α; 17=Estardiol-17β; 18=Pregnendiol-20β; 19=Pregnendiol-20α; 20=Pregnandiol-20β; 21=Pregnantriol-20β; 22=Pregnantriol-20α

Bei den Vollblütern brachte ein Vergleich der beiden Gruppen folgende Ergebnisse:

1. Der Androgenspiegel der Stuten mit FR=0% und FR>0% zeigt keine signifikanten Unterschiede.
2. Die Östrogenkonzentration liegt bei den Stuten mit FR=0% tendenziell höher. Signifikanzen konnten nicht herausgestellt werden.
3. Die Gestagenkonzentration ist bei den Stuten mit FR=0% deutlich niedriger. Allerdings sind auch hier die Unterschiede nicht signifikant.

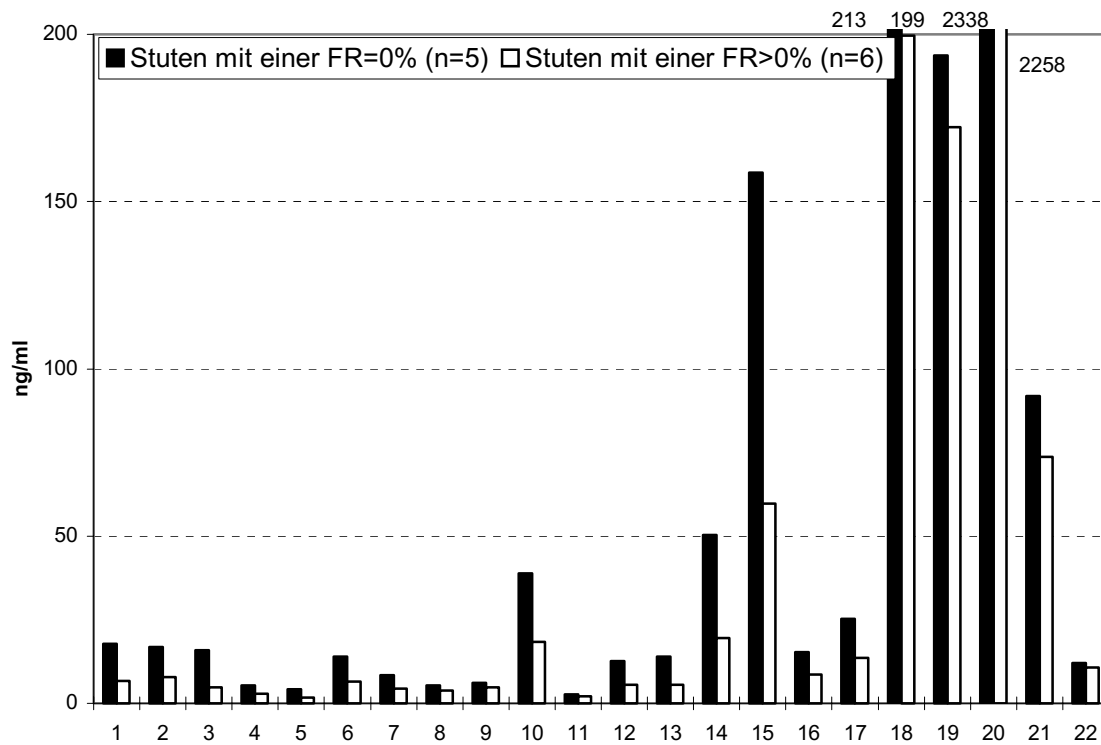
Abb.23: Vergleich der Steroidprofile virilisierter **Warmblutstuten** im **Diöstrus** mit einer Fruchtbarkeitsrate (FR) = 0 % oder >0 %



1=Testosteron; 2=Androsteron; 3=Etiocholanolon; 4=Epiandrosteron; 5=11-Ketoandrosteron; 6=11-Ketoetiocholanolon; 7=11-Ketoepiandrosteron; 8=Androstandiol-17 α ; 9=Androstandiol-17 β ; 10=DHEA; 11=Androstendion; 12=11-Hydroxyandrosteron; 13=11-Hydroxyetiocholanolon; 14=11-Hydroxyepiandrosteron; 15=Estron; 16=Estradiol-17 α ; 17=Estardiol-17 β ; 18=Pregnendiol-20 β ; 19=Pregnendiol-20 α ; 20=Pregnandiol-20 β ; 21=Pregnantriol-20 β ; 22=Pregnantriol-20 α

Die Konzentrationen aller analysierten Androgene, Östrogene und Gestagene liegen bei den Warmblutstuten im Diöstrus mit FR=0% höher. Der Unterschied ist für 11-Hydroxyepiandrosteron und Estron signifikant.

Abb.24 : Vergleich der Steroidprofile virilisierter **Vollblutstuten** im **Diöstrus** mit einer Fruchtbarkeitsrate (FR) = 0 % oder >0 %



1=Testosteron; 2=Androsteron; 3=Etiocholanolon; 4=Epiandrosteron; 5=11-Ketoandrosteron; 6=11-Ketoetiocholanolon; 7=11-Ketoepiandrosteron; 8=Androstandiol-17 α ; 9=Androstandiol-17 β ; 10=DHEA; 11=Androstendion; 12=11-Hydroxyandrosteron; 13=11-Hydroxyetiocholanolon; 14=11-Hydroxyepiandrosteron; 15=Estron; 16=Estradiol-17 α ; 17=Estradiol-17 β ; 18=Pregnenndiol-20 β ; 19=Pregnenndiol-20 α ; 20=Pregnenndiol-20 β ; 21=Pregnantriol-20 β ; 22=Pregnantriol-20 α

Bei den Vollblütern zeigte sich im Diöstrus ebenfalls eine erhöhte Konzentration aller analysierten Sexualhormone. Der Unterschied konnte jedoch nur für Estron als signifikant herausgestellt werden.

3.2.6.4.1. Diskussion zum Einflussfaktor Fruchtbarkeitsstatus

In der hier durchgeführten Untersuchung zeigten **Stuten mit einer FR=0%** unabhängig vom Zyklusstadium einen zum Teil signifikant höheren Androgen-, Östrogen- und Gestagenspiegel als **Stuten mit einer FR>0%**. Diese Ergebnisse lassen sich physiologisch folgendermaßen erklären:

Der hohe Steroidhormonspiegel blockiert die Ausschüttung von FSH und LH. Hierdurch wird die Follikelreifung vermindert und die Ausbildung eines führenden Rossefollikels verhindert. Die Stuten werden entweder nicht rossig oder es kommt eine unklare Dauerrosse zustande. Die vorliegenden Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die Trächtigkeitschancen der Stuten sind um so geringer, je höher der jeweilige Androgen-, Östrogen- und Gestagenspiegel ist.

4. Zusammenfassung

Ziel des Forschungsvorhabens war es, auf der Basis einer gaschromatographisch-massenspektrometrischen Harnsteroidprofilanalyse Angaben zu den Referenzwerten des endogenen Steroidprofils von Stuten zu machen. Es wurden für jedes Steroidprofil 14 Androgene, 3 Östrogene und 5 Gestagene erfasst und deren Konzentration bestimmt.

Dabei wurde außerdem ein rassenspezifischer Vergleich zwischen Warm- und Vollblutstuten angestrebt. Ferner sollten die Steroidprofile virilisierter Stuten im Hinblick auf Abweichungen untersucht werden. Dabei wurden als Einflussfaktoren Alter, ovarieller Defekt, Virilisierungsstärke und Reproduktionsstatus berücksichtigt.

Zur Untersuchung standen Proben von drei verschiedenen Referenzpopulationen zur Verfügung:

1. Zyklusunabhängige Harnproben aus der Routinedopinganalytik von 260 Warmblutstuten und 272 Vollblutstuten (Referenzpopulation 1)
2. Je 20 Harnproben von Warm- und Vollblutstuten, von denen jeweils 10 im Östrus und 10 im Diöstrus genommen wurden (Referenzpopulation 2)
3. Je eine Harnprobe von 28 Warmblutstuten und 20 Vollblutstuten mit Virilisierungserscheinungen und jeweils bekanntem Zyklusstadium (Referenzpopulation 3)

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Probenentnahme:

Als effektivste Methode zur Probenentnahme erwies sich die Animierung zur Harnentleerung durch Frischeinstreu.

Probenanalyse:

Das angewandte Analyseverfahren auf GC/MS – Basis konnte als schnell und hochspezifisch für eine breite Substanzpalette beurteilt werden.

Zum Steroidprofil im Harn von Stuten mit unbekanntem Zyklusstadium (Referenzpopulation 1):

a) Hier wurden folgende Gesamtkonzentrationen der Steroide ermittelt:

- * Androgene Warmblut/Vollblut: 32,93/23,55 ng/ml
- * Östrogene Warmblut/Vollblut: 31,58/32,04 ng/ml
- * Gestagene Warmblut/Vollblut: 345,45/461,32 ng/ml
- * Corticosteroid Warmblut/Vollblut: 789,47/802,25 ng/ml

b) Die gemessenen Androgen- und Östrogenkonzentrationen lagen bei den Warmblutstuten höher als bei den Vollblutstuten. Diese wiesen ihrerseits höhere Gestagen- und Corticosteroidspiegel auf. Die Unterschiede waren für die alle Androgene bis auf Epiandrosteron, Androstandiol-17 α und Androstendion sowie für alle Gestagene signifikant.

Zum Steroidprofil im Harn von Stuten mit bekanntem Zyklusstadium (Referenzpopulation 2):

- a) Die ermittelten Steroidkonzentrationen zeigten eine zyklusabhängige Variation. Im Östrus konnten sowohl bei Warm- als auch bei Vollblutstuten hohe und im Diöstrus niedrige Androgen- und Östrogenspiegel nachgewiesen werden. Umgekehrt lag der Gestagenspiegel im Östrus auf niedrigem und im Diöstrus auf hohem Niveau.
- b) Pregnan-20 β konnte aufgrund seiner hohen Konzentration als häufigstes Umwandlungsprodukt des Progesteron nachgewiesen werden.
- c) Bei den Stuten der Referenzpopulation 1 und 2 zeigten sich hohe DHEA-Konzentrationen, die auf eine gesteigerte Steroidsynthese auf dem Δ 5-Weg schließen lassen.

Zum Steroidprofil im Harn von Stuten mit Virilisierungserscheinungen (Referenzpopulation 3):

- a) Sowohl im Östrus als auch Diöstrus wurden bei den virilisierten Stuten wesentlich höhere Androgen-, Östrogen- und Gestagenkonzentrationen als bei den nicht virilisierten nachgewiesen. Die Unterschiede waren signifikant bis hochsignifikant. Als mögliche Ursache kommen Enzymdefekte der 21 β -Hydroxylase, bzw. der 11 β -Hydroxylase in Betracht.
- b) Für die virilisierten Stuten ergaben sich folgende Referenzwerte (ng/ml):
- Warmblut/Östrus: 413 (Androgene); 355,04 (Östrogen); 1386,62 (Gestagene)
 - Warmblut/Diöstrus: 209,99 (Androgene); 179 (Östrogene); 325,75 (Gestagene)
 - Vollblut/Östrus: 441,99 (Androgene); 351,03 (Östrogene); 896,89 (Gestagene)
 - Vollblut/Diöstrus: 173,19 (Androgene); 160,15 (Östrogene); 2871,56 (Gestagene)

Zu den unterschiedlichen Einflussfaktoren auf das Steroidprofil bei virilisierten Stuten:

- a) **Alter:** Ein signifikanter Einfluß des Alters auf das Steroidprofil war nicht nachweisbar.
- b) **Fruchtbarkeitsstatus:** Bei Stuten mit einer Fruchtbarkeitsrate=0% lagen die Androgen-, Östrogen- und Gestagenkonzentrationen auf einem höherem Niveau als bei den Stuten mit einer Fruchtbarkeitsrate>0%. Dies war sowohl im Östrus als auch im Diöstrus der Fall. Die Unterschiede waren für einzelne Steroide signifikant.
- c) **Ovarialtumor:** Virilisierte Stuten mit einem Ovarialtumor wiesen höhere Androgen-, Östrogen- und Gestagenkonzentrationen auf als virilisierte Stuten ohne Tumor.
- d) **Virilisierungsstärke:** Der Steroidspiegel lag bei den schwach virilisierten Stuten auf einem höheren Niveau als bei den stark virilisierten Stuten. Es konnte nicht nachgewiesen werden, dass eine Korrelation zwischen der Stärke der Virilisierung im klinischen Bild und der Stärke der endokrinologischen Abweichung besteht.

5. Schlussfolgerungen für die Umsetzung der Ergebnisse in der Praxis

Anhand der Ergebnisse für Stuten der Referenzpopulation 2 konnte eine zyklusabhängige Verschiebung der Androgen-, Östrogen- und Gestagenkonzentration belegt werden. Weiterhin fanden sich rassenspezifische Unterschiede zwischen Warmblut- und Vollblutstuten. Eine Erhöhung des Steroidspiegels aufgrund von Störungen des endogenen Steroidstoffwechsels konnte bei den virilisierten Stuten der Referenzpopulation 3 nachgewiesen werden.

Im Rahmen der Dopinganalytik fanden Rasse und Zyklus der Stuten bisher keine Berücksichtigung. Um bei Vorliegen erhöhter Steroidwerte eine Fehlinterpretation im Hinblick auf die Anwendung verbotener Substanzen zu vermeiden, sollten künftig bei einer Probenentnahme beide Merkmale erfasst sowie die Möglichkeit einer enzymatischen Störung in Betracht gezogen werden.

6. Literaturverzeichnis

AGUILERA, R. et al. (1997)

Detection of exogenous hydrocortisone in horse urine by gas chromatography-combustion-carbon isotope ratio mass spectrometry.

J. Chromatogr.B.702 , 85-91

ALLEN, W.R. (1987)

Endogenous hormonal control of the mare's oestrus cycle.

Proc.9th Bain-Fallon Memorial Lectures, Sydney, 6.-9. August 1987, 2-13

BONNAIRE, Y. et al. (1994)

Study of testosterone and metabolites in urine and plasma after administration of a single dose of testosterone hexahydrobenzoate to mares : a new approach.

in: P. Kallings, U. Bondesson, E. Houghton (Eds.):

Proc. 10th int. Conf. Racing Anal. Vet.

Stockholm, R&W Publications , Newmarket , pp. 187 - 194

BUSCH, W. ; KLUG, E. (1999)

Fortpflanzungsstörungen bei der Stute und Krankheiten der weiblichen Geschlechtsorgane.

In: Dietz, O. und Huskamp, B. (Hrsg.) : Handbuch Pferdepraxis.

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart , 567-599

DREYER-RENDELSMANN, C. (1988)

Untersuchungen zur zeitlichen Vorhersage des Eisprungs bei Stuten anhand von Östrogenkonzentrationsbestimmungen aus dem Harn.

Bonn, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Diss., 75-85

DUMASIA, M.C. et al. (1986)

Development of a gas chromatographic-mass spectrometric method using multiple analytes for the confirmatory analysis of anabolic steroids in the horse urine. Detection of testosterone phenylpropionate administrations to equine male castrates.

J. Chromatogr. B 377 , 23-33

DUMASIA, M.C. and HOUGHTON, E. (1984)

Studies related to the metabolism of anabolic steroids in the horse: the phase I and phase II biotransformation of 19-nortestosterone in the equine castrate.

Xenobiotika 14 (8) , 647-655

ENBERGS, H. (1979)

Zur Überwachung der Fruchtbarkeit von Stuten mittels Progesteronbestimmung.

Collegium veterinarium 103-107, Pr.Tierarzt

ENBERGS, H. ; GENTZ, I. (1982)

Ergebnisse aus Progesteronprofilen der Milch von Stuten zum Zeitpunkt der Geburt bis zur Frühträchtigkeit.

Proceedings der VII Veterinär-humanmedizinischen Gemeinschaftstagung 18-20.2.1982, Gießen

ENBERGS, H.; S.KÜPPERS u. H.SOMMER (1977)

Testosteronkonzentration im Serum von Warmbluthengsten unter normalen und Belastungsbedingungen.

Zuchthyg.12, 49-57

ERALDO, S., BONO, G. (1973)

Variations in plasma oestrogen concentrations during the mares oestrous cycle.

Atti.Soc.ital.Sci.Vet. 27, 285-291

GALLICANO, K.D. et al. (1985)

Identification of metabolites of methylprednisolone in equine urine.

Steroids 46 (2,3) , 755-765

GREILING, H.; GRESSNER, A.M. (1989)

Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathochemie.

Schattauer Verlag Stuttgart/New York

GÜNZEL, A.-R. u. V.HIMMLER (1979)

Progesteronkonzentration im Blutserum von Stuten bei Anwendung der intrazervikalen Elektrostimulation während des Zyklus und der Fruchtbarkeitsstörungen.

Dt.Tierärztl.Wochenschr.86, 293-302

GUSMAO, A.L. (1988)

Sexualhormonprofile und Hormonstimulationen bei männlichen Pferden in unterschiedlichen Altersgruppen.

Diss., Chem.Inst.Tierärztl.Hochsch.Hannover

HAY, M.F. , ALLEN, W.R. and LEWIS, I.M. (1975)

The distribution of Δ^5 - 3 β - hydroxysteroid dehydrogenase in the Graafian follicle of mares in oestrus.

J.Reprod.Fertil.Suppl. 23 , 323-327

HELD, J.P. et al. (1989)

Serous cystadenoma in a mare.

J.Am.Vet.Med.Assoc. 181, 496-498

HOLTAN, D.W. et al. (1991)

Plasma progestagens in the mare, fetus and newborn foal.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 44 , 517-528

HOUGHTON, E. et al. (1988)

Some applications of chromatography to steroid analysis in the horse.

Analyst 113 , 1179-1187

HOUGHTON, E. et al. (1990)

The use of stable isotopes and gas chromatography/mass spectrometry in the identification of steroid metabolites in the equine.

Steroids 55 , 433-439

HUGHES,I.A. , WINTER, J.S.D. (1976)

The application of a serum 17-OH-progesterone radioimmunoassay to the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia.

J. Pediat. 88 , 766-773

HUGHES, J.P. and STABENFELDT, G.H. (1980)

The estrous cycle and selected functional and pathologic ovarian abnormalities in the mare.

Vet.Clin.North.Am.Large Anim.Pract.2 , 225-239

IRVINE, C.H.G. and ALEXANDER, S. L. (1987)

Measurement of free Cortisol and the capacity and association constant of cortisol-binding proteins in plasma of foals and adult horses.

J. Reprod. Fert., Suppl.35 , 19-24

KAY, P.H. et al. (1987)

Heterogeneity and linkage of equine C4 and steroid 21-hydroxylase genes.

J.Immunogenet. 14 , 247-253

KIENHOLZ, M. ; GLÖCKNER, G. (1986)

die Bedeutung des 17 β - Östradiols für die Fertilität von Stuten.

Der praktische Tierarzt 4 , 294-298

KIRKPATRICK, J.F., TURNER, J.W. (1983)

Seasonal ovarian function in feral mares. Seasonal patterns of LH progestins and estrogens in feral mares.

J.Equine.vet.Sci. 3, 113-118

KLEMT, P.W. (1986)

Auswirkungen einer Zufütterung von synthetischem β -Karotin auf das postpartale Fruchtbarkeitsgeschehen von Vollblutstuten anhand von Progesteronprofilen aus Milch.

Diss., Inst.Anat.,Phys.u.Hyg., Rh.Fr.-W.-Univers. Bonn

MEINECKE, B.; GIPS, H. (1987)

Progestagen, androgen and oestrogen levels in plasma and ovarian follicular fluid during the oestrous cycle of the mare.

Anim. Reprod.Sci. 12, 255-265

MEYERS- WALLEN, V. N. et al. (1997)

Case report. Sry-negative XX true hermaphroditism in a Pasa Fino horse.

Equine Vet. J. 29 (5) , 404-408

OXENDER, W.D. ; NODEN, P.A. (1976)

Photoperiodic initiation of estrus and ovulation in seasonally anoestrus mares.

VIII th Int.Congr.Anim.Reprod. and A.J. Cracow I, 190

PATTISON, M.L. et al. (1974)

Luteinizing hormone and estradiol in peripheral blood of mares during estrous cycle.

Biol.of Reprod. 11 , 245-250

PIQUETTE, G.N.et al. (1990)

Equine granulosa-theca cell tumors express inhibin α and β A - subunit messenger ribonucleic acids and proteins.

Biol.Reprod.43, 1050-1057

POPOT, M. A. et al. (1996)

New approaches to detect cortisol administration : a preliminary study.

In: D.E. Auer, E. Houghton (Eds.) : Proc. 11th int. Conf. Racing anal. Vet., Queensland, R&W Publications, Newmarket , pp.62-67

RALSTON, J.M. et al. (1988)

Cortisol concentrations in blood and urine of horses.

Aust. Vet. J. 65 (1) , 1-5

RAUSCHELBACH, E. (1982)

Überwachung der Frühträchtigkeit von laktierenden Stuten durch eine regelmäßige Kontrolle des Progesteronspiegels in der Milch.

Diss., Rhein.Friedr.-Wilh.-Univers., Bonn

REIMERS, G. (1985)

Untersuchungen zur Kryptorchismusdiagnose beim Pferd mittels Testosteronstimulation mit gonadotropinwirksamen Substanzen.

Diss.,Tierärztl.Hochsch.Hannover; Univers.Bonn

SCHULZ, R. et al. (1994)

Endogenous cortisol and synthetic glucocorticoids in horse blood.

in: P.Kallings, U. Bondesson, E. Houghton (Eds.) : Proc. 10th int. Conf. Racing Anal. Vet., Stockholm, R.&W. Publications, Newmarket , pp.204-208

STABENFELDT, G.H., HUGHES, J.P. WHEAT, J.D. (1974)

The role of uterus in ovarian control in the mare.

J.Reprod.Fert.37, 343-351

STABENFELDT, G.H. et al.(1979)

Clinical findings, pathological changes and endocrinological secretory patterns in mares with ovarian tumors.

J.Reprod.Fertl.Suppl. 27 , 277-285

STROMPEN, O. (2001)

Untersuchungen zum endogenen Steroidprofil in Pferdeurinen mit Hilfe der Gaschromatographie / Massenspektromie.

Bonn, Rheinische F.-W. Universität, Diss.

TAIT, A.D. et al.. (1985)

The biosynthesis of 3 β -hydroxy-5,7-androstadien-17-on by the horse fetal gonad.

FEBS Letters 182, 107-110

TOUTAIN, P.L. et al. (1995)

Urinary cortisol excretion in the resting and exercising horse.

Equine vet. J., Suppl.18 , 457-462

VALENTINE, G. (1999)

Pregnenolon.

Life Enhancement Magazin, 6/99