

Das Anti-Müller-Hormon beim weiblichen Kaninchen und seine
Serumkonzentrationen im Verhältnis zu Kastrationsstatus,
Scheinträchtigkeit und Follikelanzahl

von Florian Johannes Böhmer

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Das Anti-Müller-Hormon beim weiblichen Kaninchen und seine
Serumkonzentrationen im Verhältnis zu Kastrationsstatus,
Scheinträchtigkeit und Follikelanzahl

von

Florian Johannes Böhmer

aus München

München 2023

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Chirurgie der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Mitbetreuung durch:

Dr. Beate Walter

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Wolfram Petzl

Tag der Promotion: 11. Februar 2023

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung.....	1
II. Literaturübersicht.....	3
1. Die Geschlechtsorgane des weiblichen Kaninchens.....	3
1.1. Anatomie der weiblichen Geschlechtsorgane des Kaninchens.....	3
1.1.1. Ovarien und Tuba uterina.....	3
1.1.2. Uterus und Cervix.....	5
1.1.3. Vagina und Vestibulum vaginae.....	6
1.1.4. Vulva und Klitoris.....	7
1.2. Histologie der weiblichen Geschlechtsorgane des Kaninchens.....	8
1.2.1. Ovarien und Tuba uterina.....	8
1.2.2. Uterus und Cervix.....	14
1.2.3. Vagina und Vestibulum vaginae.....	15
1.2.4. Vulva.....	15
1.3. Sexualphysiologie des weiblichen Kaninchens.....	16
1.3.1. Eintritt der Geschlechtsreife.....	16
1.3.2. Reproduktionszyklus.....	16
1.3.3. Ovulation.....	18
1.3.4. Gravidität.....	19
1.3.5. Pseudogravidität.....	19
2. Das Anti-Müller-Hormon (AMH).....	21
2.1. Entwicklung der Nachweismethoden für AMH.....	24
2.2. Einflüsse auf die AMH-Konzentrationen im Blutserum.....	26
2.2.1. Einfluss des Assays.....	26
2.2.2. Einfluss des Alters.....	27
2.2.3. Einfluss des Reproduktionszyklus.....	28
2.2.4. Einfluss der Spezies und der Rasse.....	30
2.2.5. Einfluss der Blutprobe.....	31
2.2.6. Weitere Einflüsse.....	31
3. Die klinische Relevanz von AMH.....	33
3.1. AMH in der Humanmedizin.....	33
3.2. AMH in der Veterinärmedizin.....	36
3.2.1. AMH als Fruchtbarkeitsmarker und Indikator der Follikelreserven.....	36

3.2.2.	AMH als Marker des Kastrationsstatus	39
3.2.3.	AMH als Marker des Ovarrest-Syndroms.....	42
3.2.4.	AMH als Marker bei Kryptorchismus.....	43
3.2.5.	AMH als Marker kongenitaler sexueller Fehlbildungen.....	43
3.2.6.	AMH als Marker neoplastischer Erkrankungen.....	43
III.	Publikation	47
IV.	Diskussion	57
V.	Zusammenfassung	65
VI.	Summary.....	67
VII.	Literaturverzeichnis	69
VIII.	Danksagung	101

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMH	Anti-Müller-Hormon
BMI	Body-Mass-Index
BMPs	Bone morphogenetic proteins
E2	Östradiol-17 β
eCG	Equines Choriongonadotropin
CLIA	Chemilumineszenz-Immunoassay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GDFs	Growth and differentiation factors
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormone
I.E.	Internationale Einheiten
ICSI	Intracytoplasmic-Sperm-Injection
ir-INH	Immunoreaktives-Inhibin
IVF	In-vitro-Fertilisation
kDa	Kilodalton
LH	Luteinisierendes Hormon
Lig.	Ligamentum
MIF	Müllerian-Inhibiting-Factor
MIS	Müllerian-Inhibiting-Substance
μm	Mikrometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
OPU	Ovum-Pick-Up
ORS	Ovarrest-Syndrom, Ovarian-Remnant-Syndrome
PGF2 α	Prostaglandin F2 α
TGF- β	Transforming-Growth-Factor- β

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Zwei Eierstöcke mit mehreren Ovarialfollikeln.....	4
Abb. 2:	Eierstock mit mehreren Gelbkörpern und Ovarialfollikeln.....	4
Abb. 3:	Schematische Darstellung der Uterusformen.....	6
Abb. 4:	Entwicklungsstadien der Ovarialfollikel.....	9
Abb. 5:	Schematische Darstellung eines Primordial- und Primärfollikels.....	10
Abb. 6:	Schematische Darstellung eines Sekundär- und Tertiärfollikels.....	11
Abb. 7:	Vulva eines deckbereiten bzw. bedingt deckbereiten Kaninchens.....	17
Abb. 8:	Wirkung des AMH im postnatalen Ovar.....	23
Abb. 9:	Testprinzip des AMH-Assays.....	26

I. Einleitung

Das Anti-Müller-Hormon (AMH) ist ein von den Sertolizellen der Hoden sezerniertes Glykoprotein, das für die fetale Geschlechtsdifferenzierung durch Regression der Müller'schen Gänge verantwortlich ist (Jost et al., 1953; Donahoe et al., 1977). Die Müller'schen Gänge bilden die embryonalen Anlagen des Genitaltraktes weiblicher Säugetiere. Ohne die Hemmung durch AMH entwickeln sich aus den Müller'schen Gängen die Eileiter, der Uterus, die Zervix und der kraniale Teil der Vagina (Jost et al., 1953; Cate et al., 1986; Schnorr & Kressin, 2006). AMH wird postnatal auch in den Granulosazellen der Ovarien exprimiert, insbesondere von kleinen, wachsenden Follikeln geschlechtsreifer Weibchen (Vigier et al., 1984; Lee et al., 2003). Dort besitzt AMH eine wichtige Rolle in der ovariellen Follikelrekrutierung, indem es die Entwicklung von Primordialfollikeln zu Primärfollikeln inhibiert und die Ansprechbarkeit wachsender Follikel auf das Follikelstimulierende Hormon (FSH) vermindert. Auf diese Weise hemmt AMH die gleichzeitige Entwicklung zu vieler Follikel und verhindert einen frühzeitigen Verbrauch ovarieller Follikelreserven (Durlinger et al., 2002a; Visser & Themmen, 2005).

AMH als klinisches Diagnostikum wurde bei Mensch und Tier in den letzten zwei Jahrzehnten intensiv erforscht. In der Humanmedizin wird AMH insbesondere als indirekter, nicht-invasiver Marker der Eierstockreserve genutzt, da die AMH-Serumkonzentration positiv mit der Anzahl der Ovarialfollikel korreliert (De Vet et al., 2002; Van Rooij et al., 2002). In ähnlicher Weise korreliert der AMH-Serumspiegel positiv mit der Anzahl kleiner wachsender Follikel bei Kühen (Monniaux et al., 2012), Stuten (Claes et al., 2016), Hündinnen (Anadol et al., 2020) und weiblichen Hamstern (Place & Cruickshank, 2009). Da AMH ausschließlich von den weiblichen und männlichen Gonaden sezerniert wird, kann es als Diagnostikum des Kastrationsstatus verwendet werden (Place et al., 2011). Bei Katzen und Hunden nach Ovariectomie lassen sich signifikant niedrigere AMH-Serumkonzentrationen im Vergleich zu ihren sexuell intakten Artgenossen nachweisen (Place et al., 2011; Axné & Ström Holst, 2015; Pir Yagci et al., 2016; Themmen et al., 2016; Alm & Holst, 2018; Walter et al., 2019; Anadol et al., 2020). In ähnlicher Weise kann AMH bei Hunden und Katzen mit Verdacht auf Ovarrest-Syndrom (ORS) im Körper verbliebenes Eierstockgewebe nachweisen (Place et al., 2011; Turna Yilmaz et al., 2015; Karakas Alkan et al., 2019; Flock et al., 2022b).

Das uterine Adenokarzinom ist die häufigste Tumorart des weiblichen Kaninchens (Ingalls et al., 1964; Harcourt-Brown, 2017; Van Zeeland, 2017; Bertram et al., 2018), und Kastrationen werden zur Vorbeugung von Uterus- bzw. Ovarneoplasien zunehmend empfohlen und durchgeführt (Walter et al., 2010; Quesenberry & Carpenter, 2011; Harcourt-Brown & Chitty, 2013). AMH könnte bei weiblichen Kaninchen mit unbekannter Krankengeschichte und somit unbekanntem Kastrationsstatus dazu genutzt werden, den Kastrationsstatus zuverlässig und einfach zu bestimmen.

Bei der zu untersuchenden Tierart sind Kenntnisse über physiologische Referenzbereiche und mögliche zyklusabhängige Veränderungen der AMH-Serumkonzentrationen für eine klinische Anwendung von AMH essenziell. Bei Hunden und Katzen wird von signifikanten Schwankungen der AMH-Serumkonzentrationen innerhalb des Reproduktionszyklus berichtet (Walter et al., 2019; Flock et al., 2022a). In einer Studie an Pferden wurden höhere AMH-Konzentrationen bei brünstigen Stuten im Vergleich zu diöstrischen Stuten gemessen (Dal & Kasikci, 2020). Bei Kühen hingegen wurden weitestgehend konstante AMH-Konzentrationsverläufe während des Östruszyklus beschrieben (Rico et al., 2009; Monniaux et al., 2010; El-Sheikh Ali et al., 2013; Pfeiffer et al., 2014; Nabenishi et al., 2017).

Vergleichbare Untersuchungen über die AMH-Serumkonzentrationen weiblicher Kaninchen sind in der zugänglichen Literatur nicht zu finden, auch wenn sich das Kaninchen sowohl als Versuchs- als auch als Haustier großer Beliebtheit erfreut (Suckow et al., 2010; Meredith & Lord, 2014). So zählen Kaninchen nach der Katze und dem Hund zu den beliebtesten Haustieren (Richardson, 2008; Meredith & Lord, 2014). Ebenso stellen Kaninchenbesitzer immer höhere Ansprüche an die Diagnostik und Therapie von Erkrankungen ihrer Haustiere im Rahmen einer tierärztlichen Behandlung (Ewringmann, 2016). AMH könnte als ein weiteres Diagnostikum diesem wachsenden Anspruch gerecht werden.

Ziele dieser Studie waren die Bestimmung der AMH-Serumkonzentrationen weiblicher Kaninchen und die Untersuchung, ob AMH als Diagnostikum zur Unterscheidung von kastrierten und sexuell intakten Kaninchen geeignet ist. Weiterhin sollte der Zusammenhang zwischen den AMH-Serumspiegeln und Scheinträchtigkeiten sowie der Anzahl an Ovarialfollikeln untersucht werden.

II. Literaturübersicht

1. Die Geschlechtsorgane des weiblichen Kaninchens

1.1. Anatomie der weiblichen Geschlechtsorgane des Kaninchens

Die Geschlechtsorgane des weiblichen Kaninchens bestehen von kranial nach kaudal aus den paarigen Eierstöcken (*Ovarii*) mit jeweils einem Eileiter (*Tuba uterina*, *Salpinx*), der Gebärmutter (*Uterus duplex*) mit den paarig angelegten Gebärmutterhörnern (*Cornua uteri*) und Gebärmutterhälsen (*Cervices uteri*), der Scheide (*Vagina*), dem Scheidenvorhof (*Vestibulum vaginae*), der Scham (*Vulva*) und der Klitoris (Koch & Berg, 1990; Liebich, 2004).

1.1.1. Ovarien und Tuba uterina

Die blass-gelben Ovarien des Kaninchens sind von flacher, bohnenförmiger bzw. ovaler Form. Sie sind ca. 15 mm lang und ca. 5 mm breit (Abb. 1) (Janiak, 1971; Koch & Berg, 1990; Bargmann et al., 2013). Sie wiegen, abhängig von den vorherrschenden Funktionskörpern, der Rasse und dem Gewicht des Kaninchens, 20 - 80 mg (Janiak, 1971). Die paarigen Eierstöcke befinden sich intraabdominal und kaudoverdorsal der jeweiligen Niere. Sie sind in reichlich Fett eingebettet und über die Ovarialbänder im Abdomen auf Höhe des 4. Lendenwirbels befestigt (Koch & Berg, 1990; Bargmann et al., 2013; McNitt et al., 2013). Das Mesovarium, eine kurze Duplikatur des Peritoneums, verbindet die Ovarien jeweils mit der hinteren Bauchwand. Die Eierstöcke liegen in einer Furche lateral des *Musculus psoas major*, etwa auf halber Länge des Muskels. Bei jüngeren Tieren ist die Längsachse senkrecht, während sie bei älteren Kaninchen in einem nach außen offenen Winkel schräg zur Medianebene steht. Die konvexe Außenfläche der Ovarien zeigt nach lateral, die konkave Außenfläche nach medial (Bargmann et al., 2013). Die Funktionskörper der Eierstöcke sind Follikel verschiedener Reifestadien sowie, abhängig vom Reproduktionszyklus, Gelbkörper (*Corpora lutea*, Abb. 2) (McNitt et al., 2013). Die Follikel sind von blass-roter bis schwarz-roter Farbe und heben sich von der ebenen Oberfläche der Ovarien ab (Abb. 1) (Lölinger, 1986). Im Gegensatz dazu besitzt das juvenile Ovar noch keine Funktionskörper und dementsprechend eine glatte Oberfläche (McLaughlin & Chiasson, 1990).



Abb. 1: Beide Eierstöcke eines Kaninchens mit mehreren Ovarialfollikeln. Zustand nach 24h Fixierung in 7% Formaldehyd. Maßstab in cm.



Abb. 2: Eierstock eines Kaninchens mit mehreren Gelbkörpern (G) und Ovarialfollikeln (F). Zustand nach 24h Fixierung in 7% Formaldehyd. Maßstab in cm.

Die paarigen Eileiter setzen sich aus *Infundibulum*-, *Ampulla*- und *Isthmus tubae uterinae* zusammen (Brower & Anderson, 1969; Smollich & Michel, 1992). Am kranio-medialen Pol der Ovarien befindet sich der Anfangsabschnitt des Eileiters, das *Infundibulum tubae uterinae*. Es ist ca. 0,5 cm lang, mit Fortsätzen (*Fimbriae tubae*) ausgekleidet und ähnelt der Form eines Trichters (Brower & Anderson, 1969; Koch & Berg, 1990). Das Infundibulum umschließt das Ovar schleifenförmig und ist in der Lage

die gesprungenen Eizellen nach der Ovulation zu empfangen (Bargmann et al., 2013). In der sich dem Infundibulum mit dem *Ostium abdominale tubae uterinae* anschließenden *Ampulla tubae uterinae* findet die Befruchtung der Eizellen statt (Bargmann et al., 2013). Die Ampulla ist ein erweiterter Bereich des Eileiters und macht ca. die Hälfte seiner gesamten Länge aus (Brower & Anderson, 1969). Sie verläuft nach kranial und hängt dort nach Bildung eines Bogens lose in einer Peritonealfalte, welche zusammen mit dem Gekröse des Eileiters (Mesosalpinx) die sich nach ventral öffnende *Bursa ovarica* bildet (Hafez, 1970; Koch & Berg, 1990). Ungefähr die Hälfte der Ovarienoberfläche ist mit einem peritonealen Überzug bedeckt (Bargmann et al., 2013). Die Ampulla verengt sich auf Höhe der Eierstöcke zum *Isthmus tubae uterinae*. Dieser verläuft wellenförmig-geschlängelt und mündet fließend und konzentrisch mit dem *Ostium uterinum tubae* in das jeweilige Uterushorn (Brower & Anderson, 1969; Koch & Berg, 1990; Bargmann et al., 2013). Die Eileiter variieren in der Länge zwischen 8 - 15 cm und sind jeweils ca. 2 mm breit (Pauerstein et al., 1974; Bargmann et al., 2013). Sie sind von rötlicher Farbe und können dem Anschein nach einem Blutgefäß ähneln (Harcourt-Brown & Chitty, 2013; Varga, 2013).

1.1.2. Uterus und Cervix

Im Gegensatz zu den Plazentatieren bleiben Kloakentieren (*Monotremata*) und Beuteltieren (*Marsupialia*) die paarigen Müller'schen Gänge der Embryonalentwicklung erhalten. Diese Tiere besitzen daher eine *Vagina duplex* und einen *Uterus duplex*. Als Vertreter der Plazentatiere, entsteht beim Kaninchen durch Vereinigung der kaudalen Abschnitte der Müller'schen Gänge eine *Vagina simplex*. Ein *Uterus duplex* bleibt bei ihnen jedoch erhalten (Schnorr & Kressin, 2006). Die zwei Uterushörner (*Cornua uteri*), welche von einem bis zur Vagina reichendem Septum voneinander getrennt werden, vereinigen sich nicht zu einem gemeinsamen *Corpus uteri* (Abb. 3) (Koch & Berg, 1990; Flecknell, 2000; Schlolaut et al., 2003; Schnorr & Kressin, 2006; McNitt et al., 2013; Varga, 2013). Die Uterushörner verlaufen geschlängelt, bogenartig divergierend und sind ca. 7 - 8 cm lang (Janiak, 1971; Bargmann et al., 2013). Auf Höhe des Harnblasenscheitels sind die *Cornua uteri* durch ein Zwischenhornband (*Lig. intercornuale*) miteinander verbunden (Koch & Berg, 1990). Beide Uterushörner münden jeweils mit einer Zervix und der *Portio vaginalis* mit dem *Ostium uteri externum* in die Vagina ein (Koch & Berg, 1990). Die Cervices, getrennt durch ein Septum, stellen sich in der Vagina als zapfenartige Vorwölbung dar (Schlolaut et al., 2003). Wie auch die Ovarien und die Eileiter, ist der Uterus mit einer

Duplikatur des Bauchfells (Mesometrium) an der hinteren Bauchwand fixiert (Bargmann et al., 2013). Das Mesometrium dient dem Kaninchen als Hauptspeicher für Fettgewebe (Quesenberry & Carpenter, 2011).

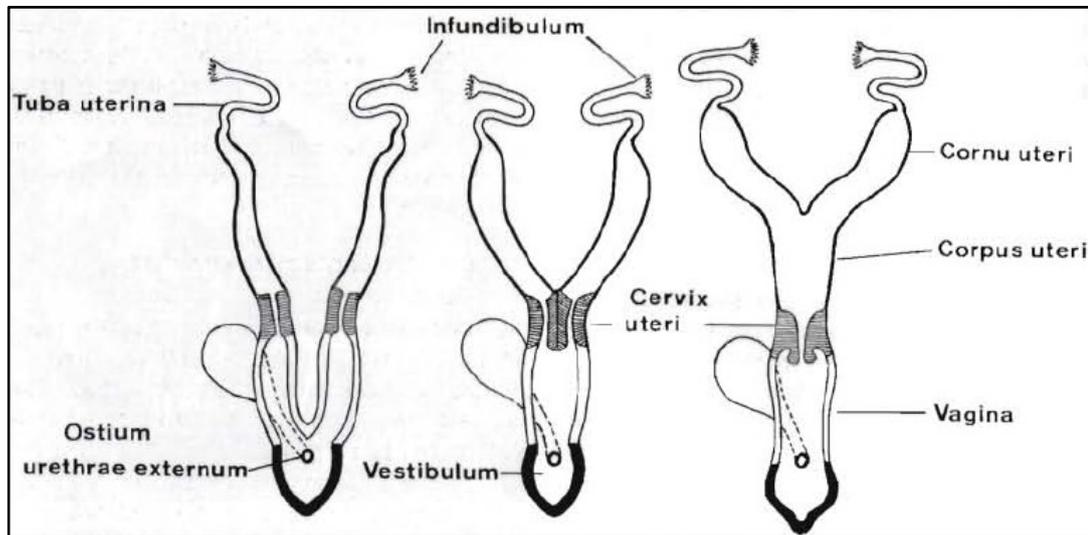


Abb. 3: Schematische Darstellung der Uterusformen. Links: Ursprüngliche Form, *Uterus duplex* und *Vagina duplex*. Mitte: *Uterus duplex* und *Vagina simplex* (Kaninchen). Rechts: *Uterus bicornis* (Pferd) (aus Schnorr & Kressin, 2006).

1.1.3. Vagina und Vestibulum vaginae

Die Vagina des Kaninchens ist, wie bereits beschrieben, unpaarig angelegt (*Vagina simplex*) und verläuft nach kaudal zwischen der ventral gelegenen Harnblase und dem dorsal gelegenen Rektum (Krahmer et al., 1981). Sie ist schlauchförmig, flach und im Durchmesser ca. 0,5 - 1,5 cm breit und 7 - 8 cm lang (Flecknell, 2000; Bargmann et al., 2013). In ihr mündet mittig und ventral die Urethra in das *Vestibulum vaginae* (Cruise & Brewer, 1994; Quesenberry & Carpenter, 2011).

Das *Vestibulum vaginae* beginnt auf Höhe der Beckensymphyse (*Symphysis pelvina*) am *Ostium urethrae externum* (Barberini et al., 1991). Es ist durch die Schamspalte (*Rima vulvae*) nach außen hin geöffnet. Das Vestibulum beinhaltet aufgrund der Einmündung der Harnröhre gleichzeitig den *Sinus urogenitalis* (Koch & Berg, 1990). Die Vagina des Kaninchens wird in einen abdominalen, pelvinen und perinealen Abschnitt unterteilt (Rodríguez-Antolín et al., 2009). Mit ihrem kaudalen Ende mündet das *Vestibulum vaginae* schließlich in der Vulva (Koch & Berg, 1990).

1.1.4. Vulva und Klitoris

Die Vulva des Kaninchens setzt sich aus den Schamlippen (*Labiae vulvae*) zusammen. Die Labien wiederum bilden die Schamspalte. Die Winkel der Schamspalte dorsal und ventral der Vulva werden als Schamwinkel (*Commissura labiorum dorsalis et ventralis*) bezeichnet (Ellenberger & Baum, 2013). Bilateral des dorsalen Schamwinkels befindet sich eine Drüsentasche (*Sinus cutaneus perinealis*), welche die paarigen Perinealdrüsen (*Glandulae perinealis majores et minores*) beinhaltet (Koch & Berg, 1990). Die Vulva befindet sich ventral des Anus und bildet die äußere Geschlechtsöffnung (Löligler, 1986). Je nach Reproduktionszyklus liegt sie in unterschiedlicher Farbe und Größe vor. So kann sie sich als blass, rosa, rot oder violett, und als ödematös-geschwollen oder nicht ödematös-geschwollen darstellen (Abdel-Ghaffar & Agag, 1994; McNitt et al., 2013). Die Schamlippen sind teils von drüsenloser Schleimhaut und teils von äußerer Haut überzogen (Liebich, 2004).

Im ventralen Winkel der Labien befindet sich die Klitoris, die nach Form und Aussehen dem Penis des männlichen Kaninchens ähnelt. Sie wird unterteilt in den *Corpus*-, den *Apex*- (*Glans*) und das *Praeputium clitoridis* (Barone et al., 1973). Die Klitoris entspringt mit zwei Schenkeln am ventralen Rand der Beckensymphyse, ist 2,5 - 3 cm lang und beherbergt einen ausgeprägten Schwellkörper (Janiak, 1971; Bargmann et al., 2013).

1.2. Histologie der weiblichen Geschlechtsorgane des Kaninchens

1.2.1. Ovarien und Tuba uterina

Histologisch wird in den Ovarien zwischen einer Rinden- und einer Markzone unterschieden. Die Markzone (*Medulla ovarii, Zona vasculosa*) ist der zentrale Bereich der Eierstöcke und setzt sich aus lockerem Bindegewebe, marklosen Nerven, Lymphgefäßen und plexusbildenden Blutgefäßen zusammen. Die Nerven und Gefäße verlaufen im *Lig. latum uteri* und dem Mesovarium, um schließlich in der Markzone am Ovarhilus zu münden. Der äußere Bereich der Ovarien, die dicht gebaute Rindenzone (*Cortex ovarii, Zona parenchymatosa*), beinhaltet Blutgefäße, Nerven, Muskelfasern und insbesondere die ovariellen Funktionskörper (Mosimann & Köhler, 1991; Liebich, 2004; McNitt et al., 2013). Eine scharfe Grenze zwischen Rinden- und Markzone ist nicht vorhanden (Bargmann et al., 2013). Die Oberfläche der Ovarien setzt sich aus einer einschichtigen Lage isoprismatischen Epithels zusammen (*Epithelium superficiale*), welches sich in das Serosaepithel der Bauchdecke (Peritonealepithel) fortsetzt (Liebich, 2004). Direkt unterhalb des *Epithelium superficiale* befindet sich die bis zu 100 µm dicke *Tunica albuginea*, eine derbe Bindegewebsschicht, die mit dem Stroma der Rindenzone in Kontakt steht. Das Stroma der Rindenzone wird von den Stromafibrozyten gebildet und ist das Fundament der *Zona parenchymatosa* in welcher sich die Eizellen (Oozyten, *Ovocyti primarii*) befinden (Mosimann & Köhler, 1991; Liebich, 2004). Das Wachstum der Oogonien zu primären Oozyten erfolgt beim Hund, Kaninchen und Hamster in den ersten Wochen nach der Geburt (Schnorr & Kressin, 2006). Abhängig von den vorherrschenden zyklischen ovariellen Funktionsgebilden stellt sich das Oberflächenepithel (Keimdrüsenepithel) unregelmäßig, mit mehr oder weniger großen Vorwölbungen bzw. Einziehungen dar (Liebich, 2004). Die Follikel sind je nach Größe und Entwicklungsstadium der Oberfläche mehr oder weniger angenähert. So sind kleinere Follikel am weitesten außen gelegen, während größere Follikel zentraler liegen (Bargmann et al., 2013).

Die Oozyten werden von Hüllzellen (Follikelzellen) umschlossen. Gemeinsam bilden die Oocyte und die sie umgebenden Follikelzellen eine funktionelle und strukturelle Einheit: den Ovarialfollikel. Histologisch lassen sich die ovariellen Follikel bei allen Haussäugetieren je nach Entwicklungsgrad der Follikelhüllen und der Oozytengröße in fünf verschiedene Entwicklungsstadien unterscheiden (Abb. 4) (Liebich, 2004; Schnorr & Kressin, 2006):

- Primordialfollikel (*Folliculus ovaricus primordialis*)
- Primärfollikel (*Folliculus ovaricus primarius*)
- Sekundärfollikel (*Folliculus ovaricus secundarius*)
- Tertiärfollikel (*Folliculus ovaricus tertarius*)
- Graaf-Follikel (präovulatorischer Follikel)

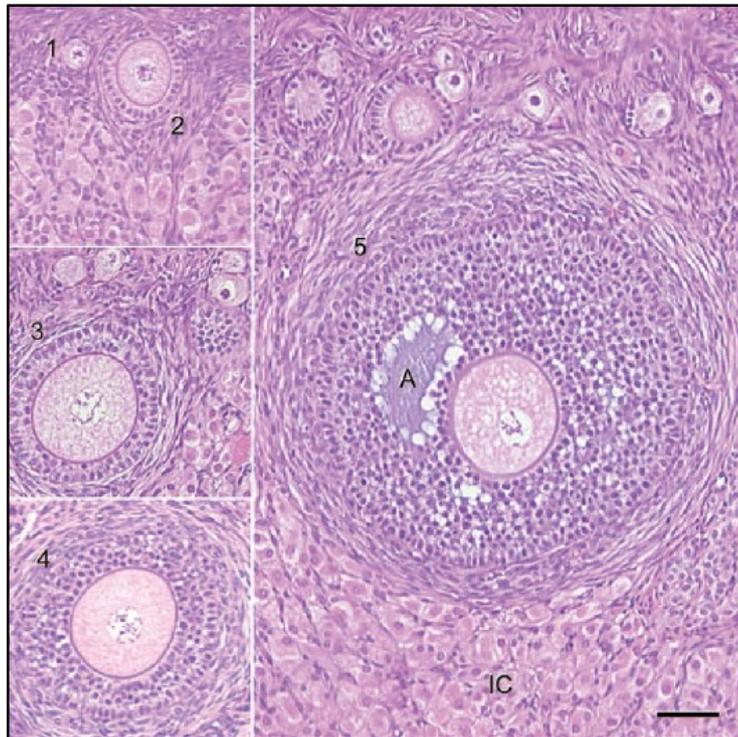


Abb. 4: Entwicklungsstadien der Ovarialfollikel (Hämatoxylin-Eosin-Färbung): Primordialfollikel (1), Primärfollikel (2), Sekundärfollikel (3 und 4), Tertiärfollikel (5). A = *Antrum*. Maßstabsbalken = 50 μm . Alle Bilder wurden mit derselben Vergrößerung fotografiert (aus Bodensteiner et al., 2004).

Primordialfollikel beinhalten eine kleine primäre Oozyte (25 - 30 μm Durchmesser), die von nur einer einzigen Schicht undifferenzierter und abgeplatteter Follikelzellen umgeben wird (Abb. 5) (Liebich, 2004). Der Primordialfollikel stellt ein Ruhestadium dar und kann sich bei entsprechender hormoneller Aktivierung in das Folgestadium, den sogenannten Primärfollikel entwickeln (Liebich, 2004).

Primärfollikel zeichnen sich durch eine geringgradige Volumenzunahme des ovozytären Zytoplasmas aus und sind umgeben von einer einschichtigen, isoprismatischen Follikelzellenschicht (Abb. 5) (Liebich, 2004). Die Oozyte bildet beim Kaninchen $72,8 \pm 2,3\%$ des relativen Volumens des Primärfollikels, während die Follikelzellen $27,2 \pm 2,3\%$ ausmachen (Žitný et al., 2004).

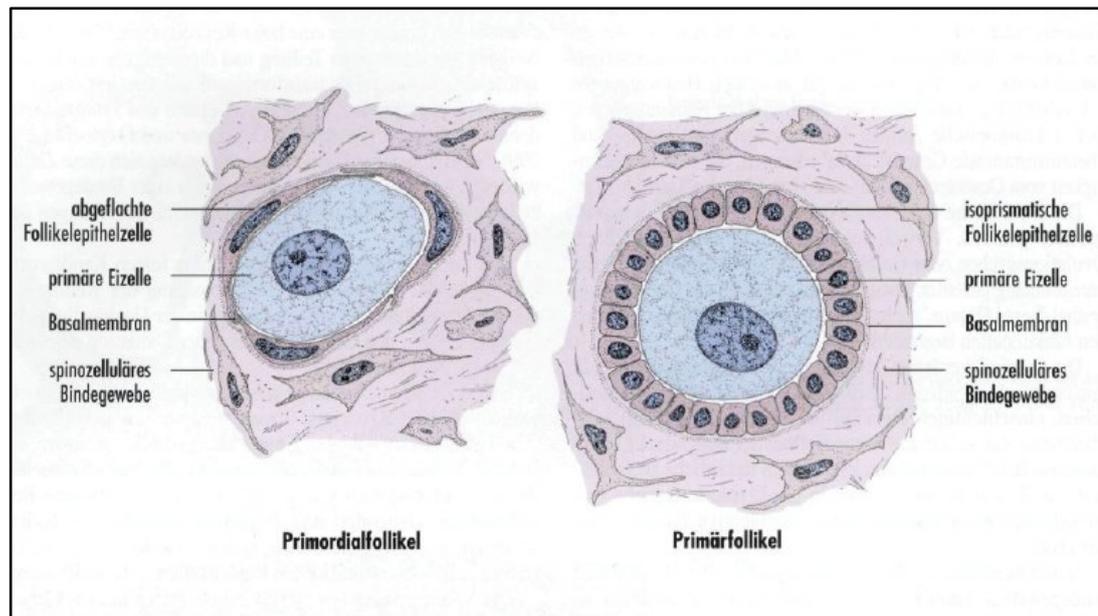


Abb. 5: Schematische Darstellung eines Primordial- und Primärfollikels (aus Liebich, 2004).

Die dem Primärfollikel folgende Entwicklungsstufe ist der Sekundärfollikel (Abb. 6). Dieser entsteht durch mitotische Vermehrung der Follikelzellen, welche sich in mehrschichtigen Lagen (bis zu 5) um die Oozyte anordnen. Weitere Kennzeichen eines Sekundärfollikels sind eine fortschreitende Volumenzunahme der Oozyte (ca. 80 μm Durchmesser), die Bildung der *Zona pellucida* und schließlich die Differenzierung der Stromazellen zur *Theca follicularis*. Die *Zona pellucida* ist eine ca. 12 - 13 μm dicke, glykoproteinreiche Grenzschiicht zwischen der ovozytären Oberfläche und der sie umgebenden Follikelzellen. Über Fortsätze und Desmosomen stehen die Follikelzellen mit der *Zona pellucida* in Kontakt. Auf diese Weise wird die Stoffwechselfersorgung und Nährstoffaufnahme der Oozyte durch die Follikelzellen gewährleistet und der zelluläre Verbund der Einzelzellen verstärkt. Weitere wichtige Funktionen der *Zona pellucida* sind das Verhindern einer Polyspermie und einer Penetration der Eizelle durch artfremde Samenzellen beim Befruchtungsvorgang. Beim Kaninchen ist die *Zona pellucida* ab einem Oozyten-Durchmesser von 70 - 80 μm als homogene Membran mikroskopisch sichtbar (Bargmann et al., 2013). Die *Theca follicularis* ist eine dünne, bindegewebige Schicht. Sie besteht aus Stromazellen, die den Follikel von außen zirkulär umgeben. Im späteren Entwicklungsstadium eines Sekundärfollikels entsteht durch Erweiterung der Interzellularräume zwischen den Intermediärzellen ein mit Hyaluronsäure-haltiger Flüssigkeit (*Liquor follicularis*) gefüllter Follikelhohlraum (*Antrum folliculare*). Dieser Hohlraum bildet den Übergang zur Klassifizierung als Tertiärfollikel (Abb. 6) (Liebich, 2004).

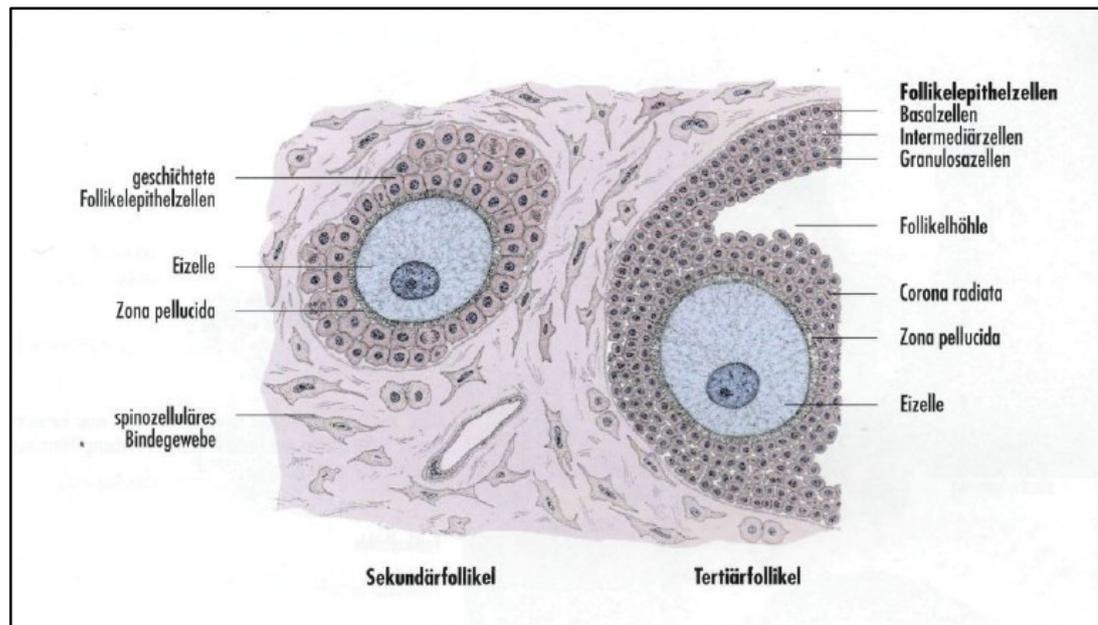


Abb. 6: Schematische Darstellung eines Sekundär- und Tertiärfollikels (aus Liebich, 2004).

Durch das raumfordernde *Antrum folliculare* des Tertiärfollikels werden die Follikelzellen in die Peripherie des Follikels verdrängt, wo sie in mehrschichtigen Zellschichten die Wand der Follikelhöhle bilden. Beim Kaninchen macht das *Antrum folliculare* mit $66,7 \pm 3,4\%$ das größte relative Volumen des Tertiärfollikels aus, während die Follikelzellen und die Oozyte ein relatives Volumen von $30,9 \pm 2,9\%$ bzw. $2,4 \pm 0,7\%$ besitzen (Žitný et al., 2004). Von außen nach innen werden die Follikelzellen der Follikelwand in Basal-, Intermediär- und Granulosazellen unterschieden. Die Oozyte des Tertiärfollikels wird von einem Follikelzellhaufen umgeben. Dieser ist von der Wandschicht der Granulosazellen exzentrisch abgegrenzt und ragt ins *Antrum folliculare* hervor. Dieses Konstrukt wird als Eihügel (*Cumulus oophorus*) bezeichnet. Die direkt der *Zona pellucida* und der Oozyte anliegenden Zellen des Eihügels bilden die *Corona radiata*, ein Verbund aus einschichtigen, hochprismatischen Follikelzellen. Das Wachstum der Oozyte des Tertiärfollikels ist mit einer Größe von 130 - 150 μm bei den meisten Haussäugetieren weitestgehend abgeschlossen (Liebich, 2004). Beim weiblichen Kaninchen ist das Größenwachstum der Oozyten etwas geringer ausgeprägt. So beträgt der Durchmesser der Oozyten in den Primär-, Sekundär-, und Tertiärfollikeln zwischen 40 und 60 μm . Der Durchmesser der Primär-, Sekundär-, und Tertiärfollikel als Ganzes beträgt beim Kaninchen 30 - 400 μm (Žitný et al., 2004).

Reife, präovulatorische Follikel werden als Graaf-Follikel bezeichnet. Diese können je nach Spezies in ihrer Größe variieren. Beim Kaninchen besitzt der sprungreife Follikel einen Durchmesser von ca. 650 - 700 μm (Žitný et al., 2004). Die Oozyte des Graaf-

Follikels hat beim Kaninchen einen Durchmesser von ca. 80 - 90 μm und unterscheidet sich damit im Vergleich zum Oozyten-Durchmesser der Tertiärfollikel kaum (Žitný et al., 2004). Durch eine vermehrte Produktion der Follikelflüssigkeit nimmt der Graaf-Follikel stark an Umfang zu, bis die Oocyte den Kontakt zur Follikelwand über den Eihügel verliert und schließlich frei in der Follikelflüssigkeit schwimmt (Liebich, 2004).

Žitný et al. (2004) untersuchten vergleichend die relativen Volumina der verschiedenen Follikel-Entwicklungsstadien in den Ovarien von 10 Kaninchen. Während Primärfollikel mit $84,8 \pm 8,5\%$ den überwiegenden Anteil des relativen Volumens der Ovarien bildeten, machten Sekundärfollikel $10,0 \pm 7,8\%$, Tertiärfollikel $3,9 \pm 4,3\%$ und Graaf-Follikel $1,3 \pm 2,5\%$ des relativen Volumens aus.

An der prädestinierten Rissstelle (*Stigma folliculare*) eines sprungreifen Follikels kann im Verlauf der Follikelreifung die Follikelwand einreißen, was den Eisprung (Ovulation) und damit die Freisetzung der Oocyte in Gang setzt. Die Eizelle wird anschließend mit Hilfe der Fimbrien des Eileitertrichters in den Eileiter aufgenommen (Liebich, 2004).

Post ovulationem bilden sich aus den Stromazellen der *Theca follicularis* und den Granulosazellen der Gelbkörper (*Corpus luteum*), eine temporäre endokrine Drüse. Das ehemals mit Flüssigkeit gefüllte Follikellumen wird vollständig durch den Gelbkörper verdrängt. Die ausdifferenzierten Zellen des Gelbkörpers werden als Luteinzellen bezeichnet, da sie bei den meisten Haussäugetieren (außer Schwein und kleine Wiederkäuer) gelbliche Pigmente (Lipochrome) in ihrem Zytoplasma ablagern. Um die Nährstoffversorgung und den Abtransport der lutealen Hormone zu gewährleisten, wachsen stark verzweigte sinusoidale Kapillarschlingen von der *Theca follicularis* in das Drüsengewebe ein. So kann das von den Luteinzellen produzierte Hormon Progesteron in das zirkulierende Blut aufgenommen werden (Mosimann & Köhler, 1991; Liebich, 2004). Der Gelbkörper unterliegt zyklischen Auf- und Abbauvorgängen. Die narbigen, bindegewebigen Überreste nach Abbau des Gelbkörpers werden als *Corpus albicans* bezeichnet (Liebich, 2004).

Die überwiegende Mehrheit der Primordial- und Primärfollikel sowie weiter fortgeschrittene Follikelstadien gelangen nicht zur Ovulation und unterliegen einer Rückbildung (Follikelatresie). Tatsächlich unterliegen über 90% der Follikel einer irreversiblen Atresie. Im folliculären Kontext bezieht sich der Begriff Atresie auf die Schließung oder das Verschwinden des *Antrum folliculare* (Senger, 2012). Zu jedem

Zeitpunkt des postpubertären Reproduktionszyklus liegt der Anteil atretischer Antrumfollikel beim Kaninchen bei ca. 60% (Senger, 2012). Beginnende atretische Veränderungen der Follikel werden morphologisch durch Lipidtröpfchen und Phagolysosomen im Zytoplasma sowie einsetzender Degeneration der Oozyte und des Follikelepithels ersichtlich. Weiterhin zeigt sich eine Verdickung der Basalmembran mit anschließender Hyalinisierung (Glashaut). Makrophagen bauen schließlich sämtliche Anteile der Follikel ab (Smollich & Michel, 1992; Liebich, 2004).

Die Eileiterwand lässt sich histologisch von innen nach außen in vier Schichten unterteilen (Liebich, 2004):

- *Tunica mucosa (Epithelium mucosae, Lamina propria mucosae)*
- *Tunica muscularis*
- *Tela subserosa*
- *Tunica serosa*

Die *Tunica mucosa* ist ein einschichtiges, hochprismatisches Epithel, in der sich Flimmer- und Drüsenzellen befinden (Brower & Anderson, 1969). Die auf den Flimmerzellen befindlichen Kinozilien bewirken durch rhythmische Bewegungen einen uteruswärts gerichteten aktiven Flüssigkeitsstrom und unterstützen so den Weitertransport der Zygote in Richtung Uteruslumen. Die Drüsenzellen sezernieren vorwiegend Nährstoffe und einen schwach sauren Mukus (Liebich, 2004). Die kinozilientragenden Flimmerzellen machen den Großteil des Epithels im *Infundibulum tubae uterinae* aus, während sie in der *Ampulla-* und dem *Isthmus tubae uterinae* ungefähr die Hälfte des Epithels ausmachen (Brower & Anderson, 1969). Die Oberfläche der *Tunica mucosa* wird durch zahlreiche Längsfalten aufgegliedert (*Plicae tubariae*), welche insbesondere in der Ampulla hohe Sekundär- und Tertiärfalten wirft und so das Eileiterlumen stark einengt (Smollich & Michel, 1992).

Die *Tunica muscularis* ist in den Wandabschnitten des *Infundibulum-* und der *Ampulla tubae uterinae* verhältnismäßig schwach ausgeprägt, während sie im Isthmus deutlich ausgebildet ist (Smollich & Michel, 1992; Liebich, 2004). Am Übergang zum Uterus setzt sich die *Tunica muscularis* aus einer Ring- und Längsmuskulatur zusammen (Hafez & Blandau, 1969). Die *Tela subserosa* des Isthmus ist mit Längsmuskelfasern durchzogen.

Eine einschichtige *Tunica serosa* liegt dem gesamten Eileiter auf (Liebich, 2004).

1.2.2. Uterus und Cervix

Die Uteruswand lässt sich histologisch von innen nach außen in folgende Schichten unterteilen (Liebich, 2004):

- *Tunica mucosa (Epithelium simplex columnare, Lamina propria mucosae)*
- *Tunica muscularis*
- *Tela subserosa*
- *Tunica serosa*

Die *Tunica mucosa (Endometrium)* des Uterus setzt sich aus einem einschichtigen Epithel und einer *Lamina propria mucosae* zusammen. Letztere ist von vielen tubulär-verzweigten Drüsen durchsetzt (Liebich, 2004).

Die uterine *Tunica muscularis (Myometrium)* besteht aus glatten Muskelfaserbündeln, welche sich aus der Muskelschicht des Eileiters fortsetzen. In den Uterushörnern sind die Muskelfasern zirkulär (*Stratum circulare*), mit sich kreuzendem spiraligem Verlauf angeordnet. Weiter außen liegt der Muskelschicht eine Gefäßschicht (*Stratum vasculosum*) mit größeren Arterien, Venen und Lymphgefäßen auf (Liebich, 2004).

Die *Tela subserosa* und *Tunica serosa* bilden zusammen das *Perimetrium*, welches das *Myometrium* von außen umgibt. Die *Tunica serosa* ist ein einschichtiges, peritoneales Epithel (Mesothel), das die *Tela subserosa*, eine glatte Muskelschicht mit longitudinalem Faserverlauf (*Stratum musculare longitudinale*), bedeckt. Letztere zieht bilateral in das *Lig. latum uteri* ein und setzt sich kaudal in die Zervixmuskulatur fort (Liebich, 2004).

Gesteuert durch hormonelle Einflüsse unterliegen die Uterindrüsen, das Bindegewebe und die Gefäße des Endometriums zyklischen Veränderungen. Es werden Phasen der Proliferation, der Sekretion und der Involution unterschieden. Unter Wirkung von Östrogen proliferiert das Epithel des Uterus, die uterinen Drüsen bleiben gestreckt und die Vaskularisation nimmt zu. Zusätzlich schwillt das endometriale, subepitheliale Bindegewebe an, und die interzellulären Räume ödematisieren und erweitern sich (Proliferationsphase). Unter Progesteroneinfluss durch den Gelbkörper schreitet die Hyperplasie der uterinen Drüsen fort, und die Drüsensekretion erreicht ihr Maximum (Sekretionsphase). Ohne Nidation einer befruchteten Eizelle setzt der Abbau des Gelbkörpers, und damit eine Abnahme der Progesteron-Konzentrationen ein, woraufhin die Sekretion durch die Uterindrüsen wieder abnimmt (Involutionsphase) (Mosimann & Köhler, 1991).

Die *Tunica mucosa* des Cervix besteht aus einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel und legt sich in Primär-, Sekundär- und Tertiärfalten, wodurch sich eine Vielzahl an Krypten bildet (Suzuki et al., 1978). Es wird zwischen schleimsezernierenden Zellen und Flimmerzellen unterschieden (Tyler, 1977). Unter Östrogeneinfluss ödematisiert das lockere, proliferationsaktive, kollagene Bindegewebe der *Lamina propria mucosae* (Liebich, 2004).

Die *Tunica muscularis* besteht aus unregelmäßig verlaufenden, glatten Muskelfasern. Zentral ist sie zirkulär und kräftig, peripher hat sie einen longitudinalen Verlauf und ist schwächer ausgebildet. Zusätzlich durchdringen elastische Fasern die zirkuläre Muskelschicht (Mosimann & Köhler, 1991; Liebich, 2004).

1.2.3. Vagina und Vestibulum vaginae

Die Vagina besitzt ein mehrschichtiges Epithel mit einer drüsenlosen *Tunica mucosa*, einer lockeren, kollagenelastischen *Lamina propria mucosae*, und einer Schicht glatter Muskelzellen (*Tunica muscularis*). Letztere ist mit elastischen Fasereinlagerungen durchsetzt. Im peritonealen Teil der Beckenhöhle ist die Vagina von einer lockeren *Tunica serosa* überzogen, wohingegen sie retroperitoneal von einer *Tunica adventitia* bedeckt wird. Das Epithel des *Vestibulum vaginae* ist mehrschichtig und unverhornt (*Epithelium stratificatum squamosum noncornificatum*) und beinhaltet zahlreiche lymphozytäre Infiltrate. Subepithelial finden sich muköse, schlauchförmige Vorhofdrüsen (*Glandulae vestibulares*) (Liebich, 2004).

1.2.4. Vulva

Die Schamlippen (*Labiae pudendi*) sind zum größten Teil von äußerer Haut samt Schweiß- und Talgdrüsen (*Integumentum commune*) bedeckt und teilweise von drüsenloser Schleimhaut (mehrschichtiges Plattenepithel) überzogen. Die strukturelle Grundlage der Labien bildet ein elastisches, kollagenhaltiges Bindegewebe. In den tieferen Zellschichten befinden sich glatte und quergestreifte Muskelfaserbündel (Liebich, 2004).

1.3. Sexualphysiologie des weiblichen Kaninchens

1.3.1. Eintritt der Geschlechtsreife

Die Geschlechtsreife setzt beim weiblichen Kaninchen, je nach Rasse und Größe, unterschiedlich früh ein, im Durchschnitt jedoch 5 - 7 (Suckow et al., 2010) bzw. 4 - 9 (Harcourt-Brown & Chitty, 2013) Monate post natum. Bei großen Rassen beginnt die Geschlechtsreife erst mit ca. 9 - 12 Monaten, wohingegen sie bei mittelgroßen Rassen mit ca. 7 Monaten, und bei kleinen Rassen bereits mit ca. 4 Monaten einsetzt (Arrington & Kelley, 1976; Kaplan & Timmons, 1979; Schlolaut et al., 2003). Auch die Jahreszeit zum Zeitpunkt der Geburt hat Auswirkungen auf den Beginn der Geschlechtsreife. So haben im Herbst geborene Kaninchen ihren ersten Deckakt für gewöhnlich mit ca. 5,5 Monaten, während im Frühling geborene Kaninchen ihre erste Kopulation erst mit ca. 8,5 Monaten haben (Janiak, 1971). Weiterhin gibt das Körpergewicht eines Kaninchens einen Anhaltspunkt auf den Zeitpunkt der Geschlechtsreife. Im Durchschnitt sind Kaninchen mit ca. 80% ihres zu erwartenden Körpergewichts geschlechtsreif (Richardson, 2008). Weibchen sind durchschnittlich 1 - 3 Jahre fruchtbar, 5 - 6 Jahre der Fruchtbarkeit sind jedoch auch möglich (Suckow et al., 2010).

1.3.2. Reproduktionszyklus

Weibliche Kaninchen besitzen, wie auch Feliden, Nerze und Frettchen, einen charakteristischen Reproduktionszyklus, denn anders als die meisten Haussäugetiere können Kaninchen nur durch einen neuro-humoralen Stimulus und nicht spontan ovulieren. Der Eisprung muss folglich durch den Deckakt induziert werden (induzierte Ovulation) (Hamilton, 1951; Bakker & Baum, 2000; Norris & Lopez, 2011; Senger, 2012). Der Reproduktionszyklus ist asaisonal, polyöstrisch und zeitlich nicht genau definiert, jedoch zeigen Kaninchen im Verlauf des Zyklus periodisch Phasen erhöhter bzw. erniedrigter Empfängnisbereitschaft. Die Zeiträume erhöhter Empfängnisbereitschaft sind 4 - 14 Tage lang, während die Phasen fehlender Paarungsbereitschaft 1 - 4 Tage andauern (Caillol et al., 1983; Bakker & Baum, 2000; Easson, 2001; Harkness et al., 2010; Harcourt-Brown & Chitty, 2013). Kaninchen sind somit überwiegend östrisch und damit deckbereit (Brower & Anderson, 1969). Die Zeiträume der Empfängnisbereitschaft unterliegen jedoch hohen individuellen Schwankungen und werden beeinflusst durch Umgebungstemperatur, Ernährung, Lichtverhältnisse und sexuelle Stimulierung (McNitt et al., 2013). So zeigen sich Kaninchen in den Frühlings- und Sommermonaten sexuell aktiver als in den Monaten

mit kürzerer Tageslichtdauer (Brower, 2006). Darüber hinaus scheint die Tageszeit die Fruchtbarkeitsleistung von Kaninchen zu beeinflussen. So hat der Paarungszeitpunkt einen signifikanten Einfluss auf Empfängnisrate, Wurfgröße und Geburtsgewicht der Kaninchenwelpen. Um 8 Uhr früh bedeckte Kaninchen waren fruchtbarer als solche die um 14 Uhr nachmittags bzw. 20 Uhr abends bedeckt wurden. Begattungen in den Morgenstunden scheinen somit die Reproduktionsleistung von Kaninchen zu verbessern (Kishk et al., 2006).

In den Ovarien reifen die Follikel in Wellen von jeweils 5 - 10 Follikeln an, welche im Verlauf ihrer Reifung progressiv steigende Mengen an Östrogenen sezernieren. Nach vollständiger Reifung produzieren die Follikel für 10 - 14 Tage Östrogene. Sofern in diesem Zeitraum keine Ovulation stattgefunden hat, degenerieren die Follikel wieder, was korrespondierend auch eine Reduktion der Östrogen-Konzentration und Paarungsbereitschaft zur Folge hat. Nach ca. 4 Tagen reift in den Ovarien eine neue Follikelwelle und das Kaninchen zeigt sich wieder deckbereit (Schlolaut et al., 2003; Harcourt-Brown & Chitty, 2013; Varga, 2013).

In den Zeiträumen erhöhter Deckbereitschaft ist die Vulva des weiblichen Kaninchens häufig ödematös-geschwollen, feucht und von roter bis rot-blauer Farbe (Abb. 7) (Quesenberry & Carpenter, 2011).



Abb. 7: Links: Rote Vulva eines deckbereiten Kaninchens. Rechts: Bloss-rosa gefärbte Vulva eines bedingt deckbereiten Kaninchens.

Weitere Hinweise erhöhter Paarungsbereitschaft sind Unruhe, häufiger Harnabsatz und das Reiben des Kinns an Gegenständen (Easson, 2001; Richardson, 2008; Harkness et al., 2010; Norris & Lopez, 2011). Kaninchen mit diesen Brunstanzeichen werden mit einer höheren Wahrscheinlichkeit tragend als solche ohne (Maercklin, 1971; Arrington & Kelley, 1976; Dorn & März, 1981). In Perioden verminderter Deckbereitschaft stellt

sich die Vulva des Kaninchens als blassrosa, nicht ödematös-geschwollen und nur leicht feucht dar (Abb. 7) (Ramirez et al., 1986). Kaninchen mit einer blassen Vulva werden nach künstlicher Besamung nicht tragend (Battaglini et al., 1982; Abdel-Ghaffar & Agag, 1994).

1.3.3. Ovulation

Wie bereits beschrieben, ovuliert das Kaninchen nur nach Induktion durch einen Stimulus (Norris & Lopez, 2011). Der Eisprung kann entweder durch einen aufreitenden Rammler, oder aber durch Injektion von luteinisierenden Hormon (LH) oder Gonadotropin-Releasing-Hormon Analoga (GnRH) induziert werden. Auch andere, dem Deckakt ähnliche Stimuli, wie z.B. das Streicheln über den Rücken, oder gegenseitiges Bespringen weiblicher Tiere können die Ovulation auslösen (Quesenberry & Carpenter, 2011; Menchetti et al., 2020). Darüber hinaus können wiederholte intramuskuläre Injektionen von Medikamenten oder das Einführen eines Besamungskatheters das Kaninchen zum Eisprung bringen (Rebollar et al., 2012). Durch diese Stimuli wird die Hypothalamus-Hypophysen-Achse aktiviert, woraufhin GnRH aus dem Hypothalamus freigesetzt wird, welches wiederum die Sezernierung von LH aus dem Hypophysenvorderlappen stimuliert. Die deutlich erhöhte LH-Konzentration (LH-Peak) 1,5 - 2 Stunden nach Stimulation leitet schließlich den Eisprung ein. Beim LH-Peak ist das luteinisierende Hormon um bis zu 6-fach höher konzentriert als 2 Tage vor und nach dem Deckakt (Muelas et al., 2008). Zwar wird LH kontinuierlich auch in kleineren Mengen sezerniert, jedoch reichen diese geringen Konzentrationen nicht zur Ovulationsinduktion aus. Die Ovulation der reifen Follikel findet ca. 9 - 12 Stunden nach dem Stimulus statt (Brower & Anderson, 1969; Arrington & Kelley, 1976; Boiti, 2004; Muelas et al., 2008; Norris & Lopez, 2011). Frisch ovulierte Eizellen befinden sich bereits wenige Minuten nach dem Eisprung am Übergang zwischen *Ampulla*- und *Isthmus tubae uterinae*. Dort verbleiben sie für einige Stunden, um danach weiter in den Isthmus zu wandern (Pauerstein et al., 1974). Etwa 13 Stunden nach dem Deckakt sind alle Eizellen in die Eileiter transportiert worden (Harper, 1963; Liebl, 1996). Die Passage durch den Isthmus des Eileiters dauert ca. 48 Stunden, sodass die Eizellen 66 - 72 Stunden nach ovulationsinduzierendem Stimulus den Uterus erreichen (Pauerstein et al., 1974).

Die Befruchtung der Eizellen findet 1,5 - 3 Stunden post ovulationem statt (Janiak, 1971; Dorn & März, 1981). Innerhalb der ersten 2 Stunden nach Ovulation besitzt die Eizelle die größte Fruchtbarkeit. Nach ca. 6 Stunden bildet sich um die Eizelle eine

Muzinschicht, welche für die Implantation zwar notwendig ist, jedoch das Eindringen der Spermien in die Eizelle verhindert (Hafez, 1970). Kaninchen bleiben über ca. 12 - 13 Stunden nach dem Eisprung noch deckbereit. Danach reduziert sich die Paarungsbereitschaft kurz, um nach ca. 40 Stunden wieder anzusteigen. Ab dem 14. Graviditätstag zeigen die meisten tragenden Kaninchen wieder eine vollständige Deckbereitschaft, jedoch kann aufgrund der Progesteronwirkung durch den Gelbkörper keine Ovulation induziert werden (Janiak, 1971).

1.3.4. Gravidität

Kaninchen zeichnen sich durch ihre hohe Reproduktionsrate aus. Ein einziges Kaninchen kann theoretisch bis zu 60 Nachkommen im Jahr bekommen (Lebas et al., 1997). Weibliche Kaninchen gebären nach ca. 29 - 35 Tagen Trächtigkeit (Schnorr & Kressin, 2006; Harkness et al., 2010; Harcourt-Brown & Chitty, 2013) durchschnittlich zwischen 3 - 9 Jungtiere (Göbel & Ewringmann, 2005; Suckow et al., 2010). Das trächtige Kaninchen kann durch abdominale Palpation frühestens 10 - 14 Tage nach Bedeckung erkannt werden. Die Feten sind dann als olivengroße Strukturen im Abdomen tastbar (Harcourt-Brown & Chitty, 2013). Radiologisch lassen sich die Feten bereits ab dem 11. Graviditätstag nachweisen (Suckow et al., 2010). Die Anzahl der Ovulationen und damit auch die Wurfgrößen scheinen im direkten Zusammenhang mit hohen FSH- und LH-Plasmakonzentrationen zum Zeitpunkt der Bedeckung zu stehen. Auch Prolaktin scheint einen Einfluss auf die Ovulationsrate zu haben (Muelas et al., 2008). Die Geburt der Jungtiere findet für gewöhnlich in den frühen Morgenstunden statt und dauert zwischen 30 - 60 Minuten (Suckow et al., 2010; Harcourt-Brown & Chitty, 2013). Eine Wiederbedeckung ist unmittelbar nach der Geburt der Nachkommen möglich, da Kaninchen innerhalb von 24 Stunden post partum wieder empfängnisbereit sind (post partum Östrus) (Dorn & März, 1981; Lebas et al., 1997). Sofern eine Befruchtung stattfindet, ist das Kaninchen während der Trächtigkeit weiterhin zur Laktation befähigt (Varga, 2013). Die Jungtiere werden ca. 5 - 6 Wochen lang ein- bis maximal zweimal täglich für ca. 3 - 5 Minuten von dem Muttertier gesäugt (Zarrow et al., 1965; Göbel & Ewringmann, 2005; Harcourt-Brown & Chitty, 2013).

1.3.5. Pseudogravidität

Nach Ovulation ohne Befruchtung der Eizellen entwickelt sich beim weiblichen Kaninchen eine Scheinträchtigkeit (Pseudogravidität) (McNitt et al., 2013). Die aus den ovulierten Follikeln entstandenen Corpora lutea bleiben auch ohne eine Trächtigkeit

endokrin aktiv und sezernieren Progesteron (Janiak, 1971). Die Gelbkörper entstehen innerhalb von ca. 4 Tagen post ovulationem durch Hypertrophie und Luteinisierung der Follikelzellen (Caillol et al., 1983). Die Dauer der Pseudogravidität ist kürzer als die Gravidität und beträgt 15 - 18 Tage (Harcourt-Brown & Chitty, 2013; McNitt et al., 2013). Maximale Progesteron-Serumkonzentrationen finden sich am 11. Tag der Pseudogravidität (Thau & Lanman, 1975; Harrington & Rothermel, 1977; Caillol et al., 1983). Die Progesteron-Spiegel steigen von basalen 1 ng/ml auf ca. 2 ng/ml an Tag 2, und auf 12-20 ng/ml an Tag 6 - 8 post ovulationem (Norris & Lopez, 2011). An Tag 16 - 18 sinken die Progesteron-Konzentrationen wieder auf basale Werte < 1 ng/ml (Browning et al., 1980). Hinweise auf eine Scheinträchtigkeit geben das Ausreißen des Fells an Wamme und Bauch, eine eingeschränkte Futteraufnahme, die Anbildung des Gesäuges und ein ausgeprägtes Nestbauverhalten des Kaninchens (Göbel & Ewringmann, 2005; Harcourt-Brown & Chitty, 2013). Auch zeigen scheinträchtige Kaninchen nicht selten ein aggressives bzw. territoriales Verhalten. Während der ersten 10 Tage unter Progesteroneinfluss kommt es zur Gesäugeanbildung (Richardson, 2008). Die Luteolyse beginnt am 14. Tag nach dem Eisprung und ist am 18. Tag beendet (Lytton & Poyser, 1982). Neben Prostaglandin F₂ α (PGF₂ α) sind auch andere Faktoren, wie beispielsweise Stickstoffmonoxid (NO) und das Enzym NO-Synthase (NOS) an der Regulation des Gelbkörpers beteiligt (Gobbetti et al., 1999; Niswender et al., 2000; Boiti, 2004). Mit sinkenden Progesteron-Konzentrationen auf ein basales Niveau können in den Ovarien wieder neue Follikel reifen, da diese durch Progesteron gehemmt werden (Nicosia et al., 1975). Zur Unterscheidung einer Pseudogravidität von einer Gravidität eignet sich die Palpation oder ultrasonographische Untersuchung des Abdomens ab 10 - 14 bzw. 11 Tagen post ovulationem (Harcourt-Brown & Chitty, 2013).

2. Das Anti-Müller-Hormon (AMH)

Das Anti-Müller-Hormon (AMH), in der englischsprachigen Literatur auch bekannt als "Müllerian inhibiting substance" (MIS) oder "Müllerian inhibiting factor" (MIF), ist ein Glykoprotein der Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren (transforming growth factors, TGF), genauer der Untergruppe TGF- β (Cate et al., 1986). Weitere, der TGF- β Familie angehörige Proteine sind unter anderem die Activine, Inhibine, knochenmorphogenetischen Proteine (bone morphogenetic proteins, BMPs) und Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (growth and differentiation factors, GDFs) (Kushnir et al., 2017). Während die Mehrheit dieser Liganden umfangreiche Funktionen im Organismus übernehmen, ist AMH sehr spezifisch in seiner Wirkung auf den Reproduktionstrakt (Seifer & Tal, 2016). AMH ist ein Glykoprotein-Dimer, besitzt ein molekulares Gewicht von ca. 140 kDa und setzt sich aus 553 - 575 Aminosäuren zusammen (Cate et al., 1986). Das für AMH codierende Gen befindet sich beim Menschen auf dem 19., bei Schweinen auf dem 2., bei Schafen auf dem 5., und bei Rindern, Pferden und Ziegen auf dem 7. Chromosom (Cate et al., 1986; Gao & Womack, 1997; Umer et al., 2019).

Die Existenz von AMH wurde erstmals von Alfred Jost im Jahr 1947 beschrieben (Jost, 1947). Jost transplantierte bei Kaninchenfeteten einen Testosteronkristall in die Nähe eines Ovars und beobachtete zwar eine fortschreitende Entwicklung der Wolff'schen Gänge, jedoch keine Rückbildung der Müller'schen Gänge. Letztere bildeten sich nur zurück, wenn stattdessen ein Stück Hodengewebe implantiert wurde. Er schlussfolgerte, dass nicht, wie bisher angenommen, das Sexualhormon Testosteron verantwortlich für die Rückbildung der Müller'schen Gänge ist, sondern ein bis dato unbekanntes Hormon.

Zu Beginn der fetalen Entwicklung ist der Reproduktionstrakt eines Fetus sexuell undifferenziert, und sowohl männliche als auch weibliche Säugetiere besitzen die Wolff'schen und Müller'schen Gänge (Schnorr & Kressin, 2006). Die Müller'schen Gänge bilden die embryonalen Anlagen des Genitaltraktes weiblicher Säugetiere, wohingegen die Wolff'schen Gänge die Ursprünge der männlichen Sexualorgane bilden. Ohne die Hemmung durch AMH entwickeln sich aus den Müller'schen Gängen die Eileiter, der Uterus, die Zervix und der kraniale Anteil der Vagina (Jost et al., 1953; Cate et al., 1986; Schnorr & Kressin, 2006). Während der fetalen Geschlechtsdifferenzierung männlicher Säugetiere wird AMH von den Sertolizellen der Hoden produziert, wodurch die Entwicklung der weiblichen Geschlechtsorgane aus den

Müller'schen Gängen inhibiert wird (Münsterberg & Lovell-Badge, 1991). Unter dem Einfluss von Testosteron differenzieren sich aus den Wolff'schen Gängen die Nebenhoden, die Samenleiter und die Samenblasendrüsen (Josso, 1973; Donahoe et al., 1977; Cate et al., 1986; Schnorr & Kressin, 2006). Postnatal wird AMH beim Mann und männlichen Säugetieren weiterhin produziert. Nach Erreichen der Geschlechtsreife fällt es jedoch deutlich in seinen Serumkonzentrationen ab (Kushnir et al., 2017). In den Hoden hemmt AMH die Proliferation der Leydig-Zellen und die Sekretion von Androgenen (Laurich et al., 2002; Lee et al., 2003). Umgekehrt sind Androgene der wichtigste Regulationsfaktor der AMH-Expression in den Sertolizellen. Bei Fehlen dieser, oder bei Unempfindlichkeit gegenüber Androgenen aufgrund einer Mutation des Androgenrezeptors, bleiben die AMH-Konzentrationen auch nach Eintritt der Geschlechtsreife erhöht, und steigen sogar noch an (Rey et al., 1994).

Auch bei der Frau und weiblichen Säugetieren wird AMH produziert, hier jedoch erst postnatal von den Granulosazellen kleiner wachsender Ovarialfollikel, insbesondere bei geschlechtsreifen Weibchen (Vigier et al., 1984; Lee et al., 2003). Verglichen mit den Sertolizellen der Hoden, welche bis zum Eintritt der Pubertät große Mengen AMH produzieren, legen die Granulosazellen ein recht niedriges Niveau der AMH-Expression an den Tag (Josso et al., 2001). Während die Granulosazellen der Primär-, Sekundär- und frühen Antralfollikel alle AMH exprimieren, stellen letztere die Hauptquelle der AMH-Sezernierung dar (Broekmans et al., 2008). Bei Kühen (Monniaux et al., 2012), Stuten (Claes et al., 2016), Hündinnen (Anadol et al., 2020) und weiblichen Hamstern (Place & Cruickshank, 2009) ist eine positive Korrelation kleiner wachsender Follikeln mit der AMH-Serumkonzentration beschrieben. AMH wird von wachsenden Follikeln so lange exprimiert, bis diese die Größe und Differenzierung erreicht haben, um schließlich vom Follikelstimulierenden Hormon (FSH) als dominante Follikel selektiert zu werden. Bei Mäusen tritt dies im frühen Antralstadium kleiner wachsender Follikel auf (Durlinger et al., 2002a) und bei Frauen in 4 - 6 mm großen Antralfollikeln (Weenen et al., 2004). Bei Rindern, Schafen und Ziegen sind die AMH-Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit kleiner Antralfollikel am höchsten und nehmen bei präovulatorischen Follikeln deutlich ab (Monniaux et al., 2012). Bei der Stute korrelieren die AMH-Spiegel der Follikelflüssigkeit negativ mit dem Durchmesser ovarieller Follikel und sind in präovulatorischen Follikeln nicht mehr nachweisbar (Vernunft et al., 2013).

In den Eierstöcken geschlechtsreifer, weiblicher Säugetiere erfüllt AMH zwei essenzielle Aufgaben: Zum einen inhibiert AMH durch einen negativen Feedback-

Mechanismus die Entwicklung von Primordialfollikeln zu Primärfollikeln, zum anderen vermindert AMH die Ansprechbarkeit wachsender Follikel auf FSH (Abb. 8) (Durlinger et al., 2002a).

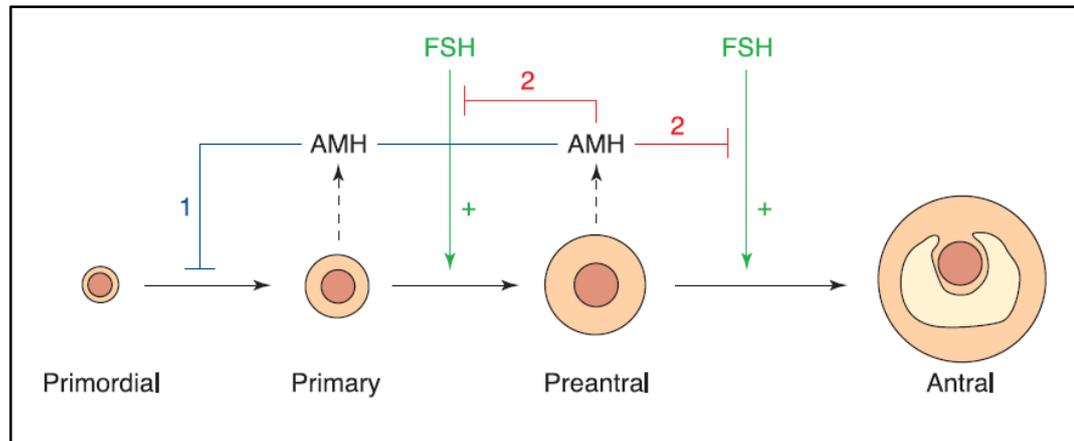


Abb. 8: Wirkung des AMH im postnatalen Ovar. AMH wird in den Primär-, Präantral- und kleinen Antralfollikeln gebildet. Es verhindert die Entwicklung zu vieler Primärfollikel (blau) und vermindert die stimulierende Wirkung von FSH auf das Wachstum präantraler- und kleiner Antralfollikel. (rot) (aus Durlinger et al. 2002a).

Durlinger et al. (1999) untersuchten die gesamte Follikelpopulation von AMH-Knockout-Mäusen. Es zeigte sich, dass die Ovarien von 25 Tage bzw. 4 Monate alten AMH-Knockout-Mäusen im Vergleich zu den Eierstöcken gleichaltriger Weibchen des Wildtyps signifikant mehr präantrale- und kleine antrale Follikel aufwiesen. Weiterhin besaßen 4 bzw. 13 Monate alte AMH-Knockout-Mäuse signifikant geringere Primordialfollikelreserven als gleichaltrige Wildtyp-Mäuse. Während den 13 Monate alten AMH-Knockout-Mäusen durchschnittlich 38 ± 15 Primordialfollikel verblieben, besaßen gleichaltrige Mäuse des Wildtyps noch im Schnitt 225 ± 52 Primordialfollikel. In einer weiteren Studie untersuchten Durlinger et al. (2002b) die Auswirkungen der An- bzw. Abwesenheit von AMH auf die Follikelpopulationen neonataler Ovarien von 2 Tage alten Mäusen. Die Ovarien, welche für 2 bzw. 4 Tage in vitro mit AMH kultiviert wurden, zeigten eine verminderte Anzahl wachsender Follikel um 40 - 50% im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne AMH-Kultivierung. Ein Mangel an AMH führt somit zu einem schnelleren Verbrauch ovarieller Follikelreserven, während physiologische AMH-Serumkonzentrationen die gleichzeitige Entwicklung zu vieler Follikel und somit eine vorzeitige Erschöpfung ovarieller Reserven verhindern (Durlinger et al., 2002a). Darüber hinaus hemmt AMH die Zellteilung der Granulosazellen in den Ovarien, die Sekretion von Progesteron und die enzymatische Aktivität der Aromatase (Kim et al., 1992; Hagen et al., 2015).

2.1. Entwicklung der Nachweismethoden für AMH

Die AMH-Konzentrationen im Blutserum werden mit sogenannten enzymgekoppelten Immunsorptionstests (enzyme-linked immunosorbent assay = ELISA) bestimmt. Der ELISA ist ein häufig verwendetes analytisches biochemisches Immunassay-Verfahren, welches erstmalig von Eva Engvall und Peter Perlmann beschrieben wurde (Engvall & Perlmann, 1972). Der ELISA nutzt ein Festphasen-Immunassay, um das Vorhandensein eines Liganden (üblicherweise ein Protein) in einer flüssigen Probe, unter Verwendung von gegen das zu messende Protein gerichteten Antikörpern, nachzuweisen. In seiner einfachsten Form wird beim ELISA das zu untersuchende Antigen, z.B. AMH, über einen Erstantikörper an eine Mikrotiterplatte gebunden. Anschließend bindet ein Enzym-gekoppelter Zweitantikörper an den Erstantikörper und löst so einen Farbumschlag aus. Die Intensität des Farbumschlages durch das Farbstoffsubstrat wird anschließend mit einer Standardkurve verglichen (Engvall & Perlmann, 1972; Owen et al., 2013). Es wird zwischen indirekten-, kompetitiven- und Sandwich-ELISAs unterschieden. Alle ELISAs können qualitativ das Vorhandensein von Antikörpern oder Antigenen nachweisen. Zur quantitativen Auswertung der Proben-Konzentrationen ist eine Standardkurve basierend auf bekannten Konzentrationen von Antikörper oder Antigen notwendig. Mit einem indirekten ELISA können Antikörper bestimmt werden, während mit einem Sandwich- und kompetitiven ELISA Antigene gemessen werden. Beim kompetitiven ELISA ist die Konzentration des Antigens umgekehrt proportional zur erzeugten Farbe (Owen et al., 2013).

Die AMH-Konzentrationen in Blutserum-Proben wurden erstmalig 1990 mit drei verschiedenen ELISAs gemessen (Baker et al., 1990; Hudson et al., 1990; Josso et al., 1990). Alle drei Testverfahren zeigten jedoch nur eine geringe Sensitivität (Josso, 2019). Grund zur Entwicklung dieser Nachweismethoden war ursprünglich, um AMH als Marker für die Funktion der Hoden präpubertärer Jungen zu nutzen, da hier die AMH-Konzentrationen im Blut deutlich höher liegen als bei Mädchen (Dewailly et al., 2014). Die Erkenntnis, dass die AMH-Serumkonzentrationen bei Frauen positiv mit der ovariellen Reserve korrelieren und AMH somit einen außerordentlichen klinischen Nutzen haben könnte, setzte die Erforschung und Entwicklung verbesserter Assays mit erhöhter Sensitivität in Gang (Josso, 2019). In der Humanmedizin werden vorwiegend der modifizierte „Gen II ELISA-Assay“ (Beckman Coulter), der „ultrasensitive AMH-ELISA“ und der „picoAMH-ELISA“ (beide Ansh Labs) verwendet (Bhide & Homburg, 2016). Große Variationen der gemessenen AMH-Konzentrationen zwischen den

Laboren verschiedener Forschungseinrichtungen limitierten jedoch die Aussagekraft und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Bhide & Homburg, 2016). Daher wurden zwei kommerzielle, automatisierte AMH-Assays entwickelt: „Access AMH“ von Beckman Coulter und „Elecsys AMH“ von Roche. Die automatisierten Testverfahren sind aufgrund einer erhöhten Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Schnelligkeit den nicht-automatisierten Assays vorzuziehen (Moolhuijsen & Visser, 2020). Da die hormonelle Aktivität von AMH zwischen Säugetieren interspezifisch ist (Josso, 1971), wurden zur Messung der AMH-Konzentrationen im Blutserum verschiedener Haussäugetiere anfangs die kommerziell erhältlichen humanmedizinischen ELISA-Assays verwendet. Zuerst die Assays von „Diagnostic Systems Laboratory“ (Active AMH-ELISA, DSL) und „Immunotech“ (IOT), und schließlich das „Gen II ELISA-Assay“ von Beckman Coulter (Holst, 2017). Der „Gen II ELISA-Assay“ fand beispielsweise bei Rindern Anwendung (El-Sheikh Ali et al., 2013), während der „Active AMH-ELISA“ von DSL bei Hengsten verwendet wurde (Claes et al., 2013). Mittlerweile sind auch für Hunde spezifische AMH-Assays kommerziell erhältlich (Turna Yilmaz et al., 2015). Außerdem fand ein für Pferde (Minitube of America) bzw. Rinder (Bovine AMH ELISA, Ansh Labs) spezifischer ELISA Anwendung (Ball et al., 2019; Sakaguchi et al., 2019).

Der AMH-Assay von Roche (Elecsys AMH Plus) wurde bei Hunden und Katzen erfolgreich verwendet und auch validiert (Walter et al., 2019; Domain et al., 2022; Flock et al., 2022b). Die Koeffizienten der Intra- bzw. Inter-Assay-Variabilität lagen bei 1,0 - 1,8% bzw. 2,7 - 7,4%. Bei dem Elecsys AMH Plus handelt es sich um ein Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA). Das Testprinzip ist ein Sandwich-Assay (Abb. 9).

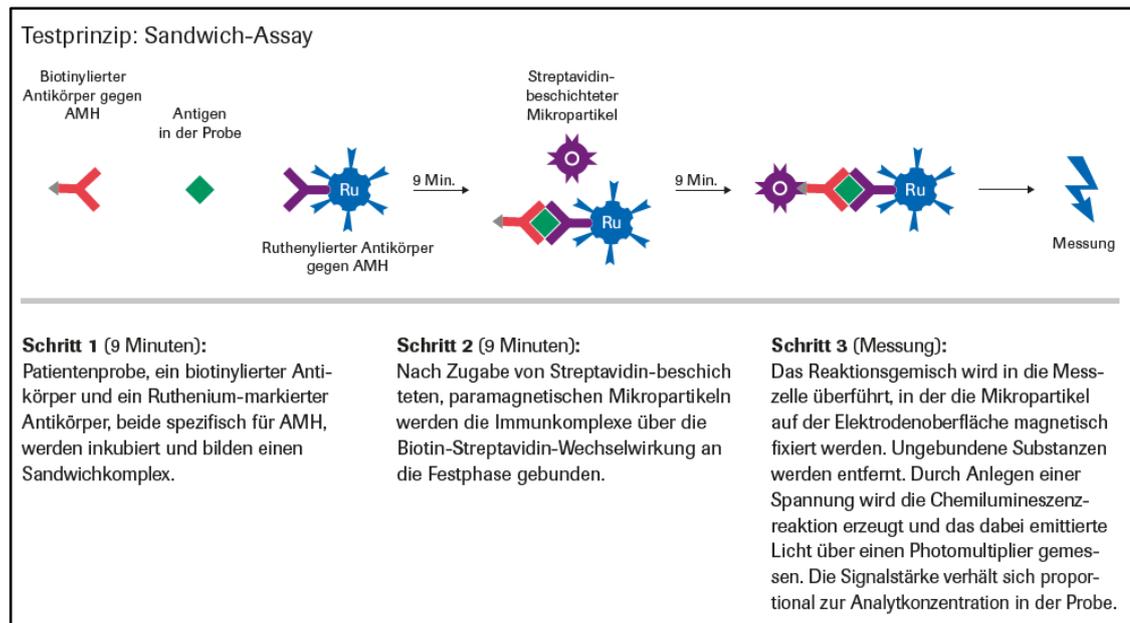


Abb. 9: Testprinzip des AMH-Assays: Elecsys AMH Plus, Roche Diagnostics Deutschland GmbH (aus www.diagnostics.roche.com).

2.2. Einflüsse auf die AMH-Konzentrationen im Blutserum

Es sind eine Vielzahl an Faktoren beschrieben, welche die AMH-Konzentrationen im Blutserum beeinflussen können. Hierzu gehören unter anderem der verwendete Assay, das Alter, die Phase des Reproduktionszyklus, die Spezies, die Rasse und die Art der Blutprobe (Kabithe & Place, 2008; Walter, 2020).

2.2.1. Einfluss des Assays

Verglichen mit dem Assay von DSL zeigten sich beim Menschen mit dem „Gen II ELISA-Assay“ von Beckman Coulter ca. 40% höhere (Wallace et al., 2011) bzw. 20% niedrigere (Rustamov et al., 2012) AMH-Konzentrationen. Bei Hunden variieren die AMH-Konzentrationen zwischen den verschiedenen Assays aufgrund unterschiedlicher Kreuzreaktivitäten von AMH und den verwendeten Antikörpern. So wurde mit den hundespezifischen ELISA-Assays von Ansh Labs und EastBioPharm cMIS/AMH bei Hunden höhere AMH-Konzentrationen gemessen, als mit den beiden humanmedizinischen Assays „Gen II ELISA-Assay“ von Beckman Coulter und dem „Elecsys AMH-Assay“ von Roche (Walter, 2020). Während der canine AMH-Assay von East BioPharm (China) dem „Gen II ELISA-Assay“ unterlegen war, da es den AMH-Konzentrationsabfall bei Hunden nach Kastration nicht akkurat erkannte (Pir Yagci et al., 2016), hat sich der hundespezifische Assay von Ansh Labs als sensitiver gezeigt (Axner & Ström Holst, 2015; Turna Yilmaz et al., 2015; Themmen et al., 2016). Nach Holst (2017) ist es notwendig, dass jedes Labor eigene Referenzwerte der AMH-

Konzentrationen für die verschiedenen Assays entwickelt, und dass in der Veterinärmedizin wie auch in der Humanmedizin (Li et al., 2012) eine internationale Standardisierung der unterschiedlichen AMH-Assays erfolgt (Holst, 2017). Ohne Standardisierung ist die klinische Interpretation der AMH-Konzentrationen nur innerhalb eines jeden Assays möglich, was in einer eingeschränkten Vergleichbarkeit der gemessenen AMH-Konzentrationen resultiert (Bhide & Homburg, 2016).

2.2.2. Einfluss des Alters

Bei Frauen korrelieren die AMH-Serumkonzentrationen negativ mit dem Alter ($r = -0,24$; $P < 0,001$) (Lie Fong et al., 2012). Das Alter der maximalen AMH-Spiegel liegt bei ca. 16 Jahren. Danach bleiben die AMH-Konzentrationen auf einem konstant hohen Level, um ab dem 25. Lebensjahr bis zum Eintritt der Menopause kontinuierlich zu sinken. Nach der Menopause befindet sich AMH schließlich unterhalb der Nachweisgrenze, was den Verbrauch der folliculären Reserven deutlich macht (Josso et al., 2001; Lie Fong et al., 2012). Bei jungen Mädchen ist AMH bis zum Eintritt der Geschlechtsreife stark erniedrigt bzw. überhaupt nicht nachweisbar (Hudson et al., 1990; Lee et al., 1996). Overbeek et al. (2012) beschreiben bei jungen Frauen mit insgesamt physiologischen bis erhöhten AMH-Konzentrationen signifikant höhere Fluktuationen von AMH während eines Menstruationszyklus als bei älteren Frauen mit niedrigen AMH-Konzentrationen. Im Widerspruch dazu zeigten andere Studien größere AMH-Schwankungen bei älteren Frauen (Robertson et al., 2014; Lambert-Messerlian et al., 2016).

Auch bei der Hündin (Hollinshead et al., 2017), der Katze (Axnér & Ström Holst, 2015; Snoeck et al., 2017), dem weiblichen Geparden (Place et al., 2017), der Stute (Ball et al., 2019), dem weiblichen Hamster (Place & Cruickshank, 2009) und der weiblichen Maus (Kevenaer et al., 2006) sinken die AMH Konzentrationen mit Fortschreiten des Alters.

Die mittleren AMH-Serumkonzentrationen von Hündinnen verschiedener Rassen ($n = 155$) betragen bei Tieren jünger als 4 Jahre durchschnittlich 12,4 ng/ml, bei Hündinnen älter als 4 Jahre durchschnittlich 10,5 ng/ml. Bei Tieren älter als 1 Jahr bewirkte jedes weitere Lebensjahr eine durchschnittliche Verringerung des AMH-Serumspiegels um 0,5 ng/ml (Hollinshead et al., 2017). Bei präpubertären Hündinnen jünger als 6 Monate konnten mit einem für Hunde spezifischen ELISA nur AMH-Konzentrationen unter der Nachweisgrenze des Assays gemessen werden. Bei postpubertären Hündinnen waren

die AMH-Konzentrationen messbar und signifikant höher (Place et al., 2011; Turna Yilmaz et al., 2015). Bei weiblichen Geparden war die Variabilität der AMH-Serumkonzentrationen bei gleichaltrigen Weibchen beträchtlich. Die Raten, mit denen die AMH-Spiegel im Laufe des Alters abnahmen, waren ebenfalls sehr unterschiedlich (Place et al., 2017). Mossa et al. (2017) untersuchten die AMH-Serumkonzentrationen bei weiblichen Holstein-Kälbern von der Geburt an bis zur Pubertät. Während der ersten 2 Lebensmonate zeigte AMH eine stetige Konzentrationszunahme, im 5. Lebensmonat eine Abnahme, und im Alter von 8 - 9 Monaten, um die Zeit der ersten Ovulation, blieben die AMH-Spiegel stabil hoch. Bei Maine-Anjou-Färsen stiegen die AMH-Serumkonzentrationen zwischen dem 1. und 3. Lebensmonat schnell an, blieben im 6. Lebensmonat konstant hoch und sanken bis zu einem Alter von 12 Monaten langsam ab (Monniaux et al., 2012).

Beim Mann (Lee et al., 1996), Hengst (Claes et al., 2013) und dem männlichen Rind (Rota et al., 2002) ist eine Abnahme der AMH-Spiegel im Blutserum nach der Pubertät beschrieben. Bei Katern fanden sich die höchsten AMH-Serumkonzentrationen vor Eintritt der Geschlechtsreife. Postpubertär nahmen die AMH-Spiegel deutlich ab, waren jedoch weiterhin nachweisbar (Place et al., 2011; Axner & Ström Holst, 2015). Diese Abnahme bewirken die erhöhten Testosteron-Konzentrationen während und nach der Pubertät. Testosteron hemmt über Bindung an Androgen-Rezeptoren maturierter Sertoli-Zellen die Sekretion von AMH (Josso et al., 2013). Die genaue Funktion von AMH beim Mann und männlichen Säugetieren in dem Zeitraum zwischen abgeschlossener sexueller Differenzierung und der Pubertät ist bisher nicht bekannt (Bhide & Homburg, 2016).

2.2.3. Einfluss des Reproduktionszyklus

Da signifikante Schwankungen der AMH-Serumkonzentrationen innerhalb des Reproduktionszyklus die Aussagekraft einer einmaligen AMH-Messung verringern würden, ist es von Bedeutung, den Konzentrationsverlauf von AMH im Verlauf des Reproduktionszyklus der verschiedenen Spezies zu kennen. So ist beim Hund eine einmalige Bestimmung der AMH-Konzentration ausreichend, um auf beispielsweise den Kastrationsstatus oder das Vorliegen eines Granulosa- bzw. Sertolizelltumors zu schließen (Place et al., 2011; Holst & Dreimanis, 2015; Themmen et al., 2016; Walter et al., 2018). AMH als Fruchtbarkeitsmarker bei der Hündin kann jedoch ohne genauere Kenntnisse über individuelle Konzentrationen im Verlauf des Reproduktionszyklus nicht ohne Einschränkung genutzt werden. Auch hohe interindividuelle Unterschiede

können den Nutzen von AMH als Fruchtbarkeitsmarker einschränken. Um den optimalen Zeitpunkt der Probengewinnung zu kennen, sollten das physiologische Sekretionsmuster und physiologische Referenzbereiche von AMH bekannt sein (Walter et al., 2019). Damit AMH als potenzieller Fruchtbarkeitsmarker bei Rindern und anderen Nutztieren genutzt werden kann, ist auch bei diesen Tierarten ein umfassendes Verständnis der physiologischen AMH-Serumkonzentrationen von großer Bedeutung (Mossa et al., 2017).

Im Verlauf des Menstruationszyklus der Frau zeigte AMH in vielen Studien kein erkennbares Sekretionsmuster. Zusätzlich sind signifikante Konzentrationsschwankungen sowohl innerhalb eines Zyklus als auch zwischen aufeinanderfolgenden Zyklen beschrieben (Lie Fong et al., 2012; Overbeek et al., 2012; Melado et al., 2018; Moolhuijsen & Visser, 2020). Die intrazyklischen AMH-Schwankungen wurden jedoch überwiegend als zu gering erachtet, um von klinischer Relevanz zu sein (Li et al., 2021). Im Gegensatz dazu zeigten andere Studien keine signifikanten AMH-Konzentrationsschwankungen während des Menstruationszyklus (Hehenkamp et al., 2006; La Marca et al., 2006; Tsepelidis et al., 2007; Sowers et al., 2010; Van Disseldorp et al., 2010; Gracia et al., 2018). Der AMH-Serumspiegel der Frau wird jedoch weitestgehend als vom Menstruationszyklus unabhängig angesehen (Tsepelidis et al., 2007; Van Disseldorp et al., 2010; Hadlow et al., 2013; Pilsgaard et al., 2018), wenn auch wenige Studien eine Konzentrationszunahme von AMH gegen Ende der Follikelphase, nach abgeschlossener Rekrutierung des dominanten Follikels, beschreiben (Wunder et al., 2008; Lambert-Messerlian et al., 2016).

In einer Studie an 25 weiblichen Pferden wiesen Dal & Kasikci (2020) bei im Östrus befindlichen Stuten signifikant höhere AMH-Serumkonzentrationen nach als bei diöstrischen Stuten ($P < 0,05$). Almeida et al. (2011) beschrieben hingegen bei der Stute keine signifikanten Schwankungen der AMH-Spiegel im Verlauf des Reproduktionszyklus oder während der Trächtigkeit. Weder die Phase des Reproduktionszyklus noch der Trächtigkeitsmonat standen in Zusammenhang mit den gemessenen AMH-Konzentrationen. Trächtige und nicht tragende Tiere zeigten mittlere AMH-Serumspiegel von $0,96 \pm 0,08$ ng/ml bzw. $0,72 \pm 0,05$ ng/ml.

Bei den meisten Studien an Kühen sind keine signifikanten AMH-Konzentrationsschwankungen beschrieben (Rico et al., 2009; Monniaux et al., 2010; El-Sheikh Ali et al., 2013; Pfeiffer et al., 2014; Nabenishi et al., 2017). Lediglich eine Studie beschrieb eine Spitze der AMH-Serumspiegel am ersten Tag des Östrus (Rico et

al., 2011). Nabenishi et al. (2017) untersuchten die Plasmakonzentrationen von AMH bei sechs Färsen monatlich innerhalb von 3 Monaten vor erfolgreicher Besamung bis 3 Monate postpartum. Auch hier ergaben sich während des gesamten Untersuchungszeitraumes keine signifikanten Unterschiede in den AMH-Plasmakonzentrationen. Es zeigten sich jedoch signifikante interindividuelle Unterschiede der AMH-Konzentrationen ($P < 0,05$). Pfeiffer et al. (2014) verglichen die AMH-Serumkonzentrationen von Kühen mit natürlichem Östruszyklus mit Zyklus-synchronisierten Kühen. Die mittleren AMH-Spiegel unterschieden sich zwischen den Kühen mit natürlichen und synchronisierten Östruszyklen nicht ($P > 0,05$).

Bei der Hündin und der Katze sind signifikante Schwankungen der AMH-Serumkonzentrationen im Verlauf des Reproduktionszyklus beschrieben, wenn auch limitiert durch den Einfluss der Rasse und hohen individuellen Variationen. So zeigten Hündinnen und Katzen signifikant höhere AMH-Spiegel, beginnend im späten Östrus bis 6 Tage vor dem Eisprung, und signifikant niedrigere AMH-Konzentrationen 3 Tage vor der Ovulation (Nagashima et al., 2016; Walter et al., 2019; Flock et al., 2022a). Die Erhöhung der AMH-Serumspiegel 6 Tage vor dem Eisprung scheint die Konsequenz einer erhöhten Anzahl von Antralfollikeln in den Ovarien zu sein, während die darauffolgende Konzentrationsverringerung mit der Atresie oder der weiteren Reifung dieser zu präovulatorischen Follikeln zu erklären ist (Nagashima et al., 2016; Walter et al., 2019).

Claes et al. (2013) beschrieben bei Hengsten signifikant höhere AMH-Serumkonzentrationen während der Frühlings- und Sommermonate. Die mittleren AMH-Spiegel der Hengste über alle Monate hinweg betrugen 19,8 ng/ml. Im November erreichten die AMH-Konzentrationen ihren Tiefpunkt und im Mai ihren um den Faktor 1,7 größeren Höhepunkt.

Auch ist der Einfluss der Tageslichtdauer bei Hamstern beschrieben. So zeigten weibliche Dsungarische Zwerghamster, welche in einer Haltung mit kurzen Tageslichtperioden aufgewachsen sind, signifikant niedrigere AMH-Serumkonzentrationen als jene Tiere, die bei langen Tageslichtperioden gehalten wurden (Kabithe & Place, 2008).

2.2.4. Einfluss der Spezies und der Rasse

Die AMH-Konzentrationen im Blutserum weiblicher Katzen waren bei Verwendung des gleichen Assays insgesamt höher als bei Hündinnen. Es ist jedoch noch nicht

geklärt, ob dies das Ergebnis absolut erhöhter AMH-Konzentrationen bei Katzen ist, oder in einer erhöhten Kreuzreaktivität des felines AMH mit den verwendeten ELISA-Antikörpern begründet ist (Place et al., 2011; Walter et al., 2019; Flock et al., 2022b).

Bei Hunden existieren zwei Studien, die sich mit dem Einfluss der Rasse auf die AMH-Serumkonzentrationen befassen. Beide beschrieben bei Hunden kleiner Rassen höhere AMH-Spiegel als bei Hunden großer Rassen. Somit hatte die Größe der Hündin einen signifikanten Einfluss auf die AMH-Konzentrationen. Der AMH-Referenzbereich bei Riesenrassen (1,75 - 15,6 ng/ml) war signifikant ($P < 0,01$) niedriger als bei kleinen (5,6 - 24,2 ng/ml), mittelgroßen (4,3 - 23,7 ng/ml) und großen Hündinnen (4,3 - 21,0 ng/ml) (Hollinshead et al., 2017). Bei Beagle-Hündinnen lagen die AMH-Konzentrationen signifikant über den AMH-Spiegeln von Labrador-Mischlingen, insbesondere im späten Proöstrus ($P = 0,040$) und präovulatorischem Östrus ($P = 0,014$) (Walter et al., 2019).

2.2.5. Einfluss der Blutprobe

Beim Menschen zeigte sich, dass die Lagerung von Vollblut- und Serumproben bei Raumtemperatur die AMH-Spiegel um ca. 30% nach 3,5 Tagen (Fleming et al., 2013) bzw. um ca. 30% nach 2 Tagen erhöhte (Rustamov et al., 2012).

Bei Hunden waren die AMH-Konzentrationen in Heparinplasma-Proben höher als in Serumproben (Themmen et al., 2016).

Ball et al. (2019) untersuchten die Stabilität der AMH-Spiegel im Blutserum von Stuten ($n = 9$) nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen der Proben. Die gemessenen AMH-Konzentrationen unterschieden sich nach bis zu vier Gefrier-Auftau-Zyklen nicht ($P = 0,68$).

2.2.6. Weitere Einflüsse

In der Humanmedizin sind eine Vielzahl an weiteren Einflussfaktoren der AMH-Konzentrationen im Blutserum beschrieben. So scheint beispielsweise die Ethnie ein Faktor zu sein. Afroamerikanische und hispanische Frauen hatten niedrigere AMH-Serumkonzentrationen als Frauen kaukasischer Herkunft (Seifer et al., 2009; Schuh-Huerta et al., 2012).

Auch eine negative Korrelation zwischen dem Body-Mass-Index (BMI) und den AMH-Serumkonzentrationen ist beschrieben. So zeigten übergewichtige Frauen niedrigere AMH-Spiegel und eine verminderte Fruchtbarkeit aufgrund reduzierter ovarieller Reserven und Funktionsstörungen der Follikulogenese (Jamil et al., 2016). In einer

anderen Studie zeigt sich diese Wechselwirkung jedoch eher von sekundärer Natur aufgrund einer stärkeren negativen Korrelation der AMH-Serumkonzentrationen und BMI mit dem Alter (Kumar & Singh, 2015). La Marca et al. (2012) konnten im Gegensatz dazu bei 415 gesunden Frauen keine Beeinflussung der AMH-Spiegel durch den BMI nachweisen.

Aktives Rauchen von Zigaretten und vermehrter Alkoholkonsum sind ebenso als negative Einflussfaktoren der AMH-Konzentrationen beschrieben, wenn auch bei ersterem mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen (Freeman et al., 2007; Dafopoulos et al., 2010; Plante et al., 2010; Freeman et al., 2012; Freour et al., 2012; La Marca et al., 2012).

Bei Frauen mit polyzystischem Ovarialsyndrom sind nach Einnahme oraler Kontrazeptiva niedrigere AMH-Serumkonzentrationen beschrieben. Kontrazeptiva mit 0,035 mg Ethinylestradiol und 2 mg Cyproteronacetat bewirkten eine signifikante Verringerung der Anzahl kleiner wachsender Follikel und damit einhergehend auch der AMH-Spiegel (Panidis et al., 2011).

3. Die klinische Relevanz von AMH

AMH erlangte in der Human- und Veterinärmedizin erst in den letzten zwei Jahrzehnten seinen heutigen Stellenwert als klinisches Diagnostikum. Ursprünglich ist man davon ausgegangen, dass AMH ausschließlich bei männlichen Feten während der Geschlechtsdifferenzierung wirkt. AMH war daher für die medizinische Fachwelt nicht von besonders großem Interesse (Josso, 2019). Auch die Entdeckung von Vigier et al. (1984), dass AMH von wachsenden Follikeln im adulten Ovar produziert wird, änderte daran erstmal nichts. Erst als eine Forschungsgruppe aus Rotterdam auf Grundlage von Vigiers Ergebnissen zeigte, dass die AMH-Serumkonzentrationen von Frauen positiv mit der Anzahl ihrer Ovarialfollikel korrelierten (De Vet et al., 2002; Van Rooij et al., 2002), gewann AMH für die Medizin zunehmend an Bedeutung (Josso, 2019). Seitdem haben sich die Anwendungsmöglichkeiten von AMH als klinisches Diagnostikum vor allem in der Humanmedizin und mittlerweile auch in der Veterinärmedizin deutlich erweitert.

3.1. AMH in der Humanmedizin

In der Humanmedizin wird AMH bei Frauen als indirekter, nichtinvasiver Marker der Größe ovarieller Follikelreserven genutzt (Josso, 2019). Da der Pool kleiner, wachsender Follikel mit der Gesamtzahl der Primordialfollikel positiv korreliert, reflektiert AMH die folliculären Reserven (Hansen et al., 2008). AMH kann somit hinweisend für die verbleibenden fruchtbaren Jahre der Frau bis zum Eintritt der Menopause sein (Visser et al., 2006; Freeman et al., 2012; Peluso et al., 2014; Finkelstein et al., 2020). Finkelstein et al. (2020) zeigten, dass AMH in Kombination mit Alter und BMI den Beginn der Menopause besser prognostizieren konnte als FSH. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Frau mit AMH-Serumkonzentrationen < 10 pg/ml innerhalb der nächsten 12 Monate ihren letzten Menstruationszyklus hat, reichte von 51% im Alter von < 48 Jahren bis 79% im Alter von ≥ 51 Jahren. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Frau mit AMH-Serumspiegeln > 100 pg/ml innerhalb der nächsten 12 Monate ihren letzten Menstruationszyklus nicht hat, reichte von 97% bei < 48 Jahre alten Frauen bis 90% bei ≥ 51 Jahre alten Frauen. Die AMH-Serumkonzentrationen nehmen mit fortschreitendem Alter stetig ab, bis sie ca. 5 Jahre vor Eintritt der Menopause, wenn der Vorrat an Primordialfollikeln erschöpft ist, nicht mehr nachweisbar sind. Es existieren jedoch große individuelle Unterschiede in der Geschwindigkeit der Depletion des Follikelpools und der initialen Follikelpoolgröße.

Dies erklärt die großen zeitlichen Unterschiede des Beginns der Menopause bei Frauen (Broer et al., 2014). Im Gegensatz zu den anderen Biomarkern der ovariellen Follikelreserve, wie beispielsweise FSH und Inhibin B, fluktuieren die AMH-Serumkonzentrationen der Frau während eines physiologischen Menstruationszyklus in einem vernachlässigbarem Ausmaß. Diese Tatsache macht AMH zu einem zuverlässigen Biomarker der Follikelreserve, da es zu jedem Zeitpunkt des Menstruationszyklus bestimmt und interpretiert werden kann (Tsepelidis et al., 2007). Eine einmalige Messung der AMH-Serumkonzentration sollte bei Frauen jedoch nicht zur Einschätzung der Fruchtbarkeit genutzt werden. Lediglich mehrere AMH-Messungen, über einen längeren Zeitraum hinweg, haben eine Aussagekraft auf die Geschwindigkeit der Abnahme der AMH-Spiegel und somit auf die Depletion des Primordialfollikelpools (Pilsgaard et al., 2018).

Es besteht Konsens darüber, dass AMH ein exzellenter Marker ovarieller Follikelreserven ist, jedoch gibt es bisher keine einstimmigen Ergebnisse über die Verwendung von AMH als Fruchtbarkeitsmarker (Oh et al., 2019). Neuere Studien deuten darauf hin, dass, sofern eine Frau zur Ovulation befähigt ist, die ovariellen Follikelreserven nur einen geringen Einfluss auf ihre Fruchtbarkeit haben (Hawkins Bressler & Steiner, 2018). So zeigten 30 - 44 Jahre alte Frauen mit niedrigen AMH-Serumkonzentrationen, welche seit ≤ 3 Monaten versuchten schwanger zu werden, keine signifikanten Unterschiede in den prognostizierten Empfängniswahrscheinlichkeiten im Vergleich zu Frauen mit normalen AMH-Spiegeln (Steiner et al., 2017). Der wichtigste Prädiktor einer Schwangerschaft scheint das Alter zu sein. So hatten jüngere Frauen, die eine In-vitro-Fertilisation (IVF) durchführen ließen und sehr niedrige AMH-Spiegel ($< 0,5$ ng/ml) hatten, noch gute Chancen schwanger zu werden, wohingegen die Chancen auf eine Schwangerschaft bei älteren Frauen verringert waren (Revelli et al., 2016).

Darüber hinaus wird AMH bei Frauen als Indikator für das polyzystische Ovarialsyndrom, die primäre Ovarialinsuffizienz und für die Erfolgsaussichten bei IVF genutzt (Bedenk et al., 2020). Frauen mit polyzystischem Ovarialsyndrom haben mehr als doppelt so hohe AMH-Serumkonzentrationen als nicht erkrankte Frauen (Pellatt et al., 2007). Außerdem ist AMH als Prädiktor für die zu erwartende Reaktion der Eierstöcke auf Ovarialstimulationsprotokolle beschrieben und kann dabei helfen, die Dosierung einer ovariellen Stimulation zu individualisieren, wodurch Effizienz und Sicherheit einer IVF verbessert werden könnten (Broer et al., 2014). Die AMH-

Serumkonzentrationen sind auch bei bestimmten neoplastischen Entartungen der Gonaden deutlich erhöht. So kann AMH zur Sicherung der Diagnose von Granulosa- oder Sertolizelltumoren genutzt werden (Rey et al., 1996; Lane et al., 1999; Rey et al., 2000; La Marca & Volpe, 2007; Chong et al., 2012; Chen et al., 2020). Die AMH-Spiegel sind bei 76 - 93% der Frauen mit Granulosazelltumor erhöht (Lane et al., 1999; Long et al., 2000). Nach initialer Resektion des Primärtumors erhöhen sich die AMH-Konzentrationen bereits durchschnittlich 3 Monate vor klinischer Erkennung eines Tumor-Rezidivs (Lane et al., 1999). Nach einer bilateralen Ovariectomie sind 3 - 5 Tage post operationem keine nennenswerten AMH-Spiegel im Blutserum mehr nachweisbar (La Marca et al., 2005).

AMH als klinisches Diagnostikum findet auch in der Neonatologie und Pädiatrie Anwendung. Hier wird AMH als Marker der fetalen sexuellen Differenzierung genutzt, in Fällen von Neugeborenen mit nicht eindeutigen Genitalien und Geschlecht. Auch dient AMH als Biomarker bei Kryptorchismus und verzögertem Eintritt der Geschlechtsreife (Kushnir et al., 2017). Bei präpubertären Jungen kann AMH als Indikator testikulären Gewebes genutzt werden und kann Hinweise auf die Anzahl funktioneller Sertoli-Zellen geben. Physiologische AMH-Serumkonzentrationen machen eine Gonadendysgenese unwahrscheinlicher (Freire et al., 2018). Jungen mit kryptorchiden Hoden haben ähnliche AMH-Serumspiegel wie Jungen mit abgestiegenen Hoden. Daher kann durch Bestimmung der AMH-Konzentrationen ein Kryptorchismus von einer Anorchie unterschieden werden (Lee et al., 1997). Weiterhin hilft AMH beim Müller-Gang-Persistenzsyndrom zwischen einer Mutation von AMH und dem AMH-Rezeptor-II-Gen zu unterscheiden (Picard et al., 2017).

AMH ist nicht nur als ein Diagnostikum, sondern auch als ein Therapeutikum beschrieben, jedoch wurde es bisher noch nicht für die klinische Anwendung zugelassen (Josso, 2019). AMH wird beispielsweise als reversible Verhütungsmethode diskutiert, da es die Weiterentwicklung des Primordialfollikelpools und folglich deren Wachstum zu sprungreifen Follikeln hemmt. Auf diese Weise kann auch das Einsetzen der Wechseljahre verzögert werden (Kushnir et al., 2017). Im Tiermodell konnte dies bei Mäusen bereits gezeigt werden (Hayes et al., 2016). Weiterhin ist AMH als Therapeutikum bei ovariellen Neoplasien beschrieben, denn in vitro zeigt AMH eine hemmende Wirkung auf die Proliferation von Krebszelllinien mit hoher Expression des AMH2-Rezeptors (Park et al., 2017). Außerdem kann die zusätzliche Gabe von AMH während der Chemotherapie von Krebspatientinnen wachsende ovarielle Follikel vor

einer frühzeitigen Degeneration bewahren (Goldman et al., 2017). Durch den Einfluss von AMH kann somit durch Hemmung der Rekrutierung von Primordialfollikeln die ovarielle Follikelreserve erhalten und die häufig mit Chemotherapien assoziierte primäre Ovarialinsuffizienz verhindert werden (Kano et al., 2017). Bei Mäusen unter Therapie mit den Chemotherapeutika Cyclophosphamid, Carboplatin und Doxorubicin half die gleichzeitige Gabe von AMH dabei die Follikelreserven der Eierstöcke vor Degeneration zu schützen (Kano et al., 2017; Sonigo et al., 2019).

3.2. AMH in der Veterinärmedizin

Viele der in der Humanmedizin beschriebenen Anwendungsmöglichkeiten von AMH wurden in den letzten Jahren auch für die Nutzung in der Veterinärmedizin untersucht. So ist AMH auch bei Nutz- und Haustieren als Fruchtbarkeitsmarker und Indikator der folliculären Reserve beschrieben (Monniaux et al., 2010; Lahoz et al., 2012; Rico et al., 2012; Lahoz et al., 2014; Souza et al., 2015; Hollinshead et al., 2017; Ball et al., 2019; Papas et al., 2021; Karl et al., 2022). Bei Hunden und Katzen wird AMH insbesondere zur Erhebung des Kastrationsstatus verwendet (Place et al., 2011; Axné & Ström Holst, 2015; Pir Yagci et al., 2016; Themmen et al., 2016; Walter et al., 2019; Anadol et al., 2020). Außerdem kann AMH als Indikator verschiedener Erkrankungen genutzt werden, wie z.B. beim Ovarrest-Syndrom, bei Kryptorchismus, kongenitalen sexuellen Fehlbildungen oder neoplastischen Entartungen der Gonaden (Walter et al., 2019; Walter et al., 2022). Während sich in der Veterinärmedizin bisher nur vereinzelt Studien mit AMH als Fruchtbarkeitsmarker befasst haben, wurden die klinischen Möglichkeiten der Bestimmung der AMH-Serumkonzentrationen bei der Frage nach dem Kastrationsstatus, dem Ovarrest-Syndrom und neoplastischen Erkrankungen intensiv erforscht (Walter et al., 2019).

3.2.1. AMH als Fruchtbarkeitsmarker und Indikator der Follikelreserven

Wie beim Menschen auch, korrelieren bei Kühen (Ireland et al., 2008), Hamstern (Place & Cruickshank, 2009) und Mäusen (Kevenaer et al., 2006) die AMH-Serumspiegel mit der Anzahl verbleibender Primordialfollikel. Anadol et al. (2020) fanden hingegen bei der Hündin keine Korrelation zwischen den AMH-Konzentrationen und der Anzahl der Primordialfollikel. Darüber hinaus ist AMH bei der Hündin (Hollinshead et al., 2017), dem Schaf (Lahoz et al., 2012; Lahoz et al., 2014), der Kuh (Monniaux et al., 2010; Rico et al., 2012; Souza et al., 2015; Karl et al., 2022), der Ziege und der Stute (Ball et al., 2019; Papas et al., 2021) als Fruchtbarkeitsmarker beschrieben.

Hollinshead et al. (2017) untersuchten die Fortpflanzungsleistung von 155 sexuell intakten Hündinnen. Kleinere Rassen hatten, trotz höherer AMH-Serumspiegel, kleinere Würfe im Vergleich zu größeren Rassen. Bei Hündinnen von Rassen ähnlicher Größe hatten die Tiere mit höheren AMH-Konzentrationen jedoch signifikant größere Wurfgrößen ($P < 0,01$). Bei jedem Anstieg der AMH-Spiegel um 1 ng/ml, erhöhten sich die Wurfgrößen um 0,3 Jungtiere pro Wurf. Ein Zusammenhang der AMH-Serumkonzentrationen und der Wurfraten konnte nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise hatte auch das Alter der Hündinnen keinen Einfluss auf die Wurfraten.

Auch bei reinrassigen Stuten ($n = 419$) wurde der Zusammenhang zwischen den AMH-Serumkonzentrationen und der Fertilität untersucht. Beurteilt wurde dies anhand der Trächtigkeitsraten im ersten Reproduktionszyklus. Die Stuten des Quartils mit den niedrigsten AMH-Spiegeln waren mit einer höheren Wahrscheinlichkeit an Tag 13 - 18 nicht tragend als die Stuten der Quartile mittlerer ($OR = 1,87$) bzw. der höchsten AMH-Konzentrationen ($OR = 2,62$) (Ball et al., 2019). Papas et al. (2021) untersuchten an Pferden den Nutzen von AMH als Prädiktor des Erfolgs der Eizellenentnahmen (Ovum-Pick-Up, OPU) und intrazytoplasmatischen Spermieninjektionen (Intracytoplasmic-Sperm-Injection, ICSI). Es wurden die AMH-Serumkonzentrationen von 103 Stuten bestimmt, welche dem OPU-ICSI-Verfahren unterzogen wurden. Dabei korrelierten die AMH-Spiegel signifikant mit der Anzahl punktierter Follikel und der Anzahl gewonnener Eizellen ($P < 0,001$). Die Stuten mit AMH-Konzentrationen $> 2,5 \mu\text{g/L}$ produzierten signifikant mehr Follikel, Oozyten und Blastozysten pro OPU-ICSI-Sitzung im Vergleich zu Stuten mit mittleren ($1,5 - 2,5 \mu\text{g/L}$) oder niedrigen AMH-Spiegeln ($< 1,5 \mu\text{g/L}$). Jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede der Blastozystenraten beobachtet werden. Somit gingen hohe AMH-Serumkonzentrationen zum Zeitpunkt des OPU zwar mit einer erhöhten Anzahl gewonnener Eizellen und Embryonen nach ICSI einher, jedoch scheint AMH als unabhängiger Prädiktor des OPU-ICSI-Ergebnisses nicht geeignet, da sich auch bei 58% der Stuten mit niedrigen AMH-Spiegeln mindestens einen Embryo entwickelte. Die Auswahl der Stuten durch transrektale, sonographische Bestimmung der Follikelzahlen erwies sich als geeigneteres Kriterium des Erfolges eines OPU-ICSI-Programms.

Eine Studie an 76 Rasa-Aragonesa-Lämmern untersuchte AMH ebenfalls als Fertilitätsmarker. Im Alter von 3,6 Monaten wurden bei allen Lämmern die AMH-Spiegel im Blutplasma bestimmt. Nach Verabreichung von 600 I.E. equinem

Choriongonadotropin (eCG) wurde 6 Tage später die Anzahl der Eisprünge bestimmt. Die AMH-Konzentrationen waren etwa 3 bis 4-fach höher bei ovulierenden als bei nicht ovulierenden Lämmern. Anschließend wurden die Schafe im Alter von ca. 10 Monaten bedeckt. Die Fruchtbarkeit zum Zeitpunkt der ersten Paarung korrelierte signifikant mit den AMH-Spiegeln im Blutplasma im Alter von 3,6 Monaten (Spearman's $\rho = 0,34$; $P < 0,01$). Bei einem Cut-off-Wert von 97 pg/ml ergab sich eine Sensitivität von 68,2% und eine Spezifität von 72,2% für AMH als Prädiktor der Trächtigkeitswahrscheinlichkeit bei der ersten Bedeckung. Die Wahrscheinlichkeit tragend zu werden, lag bei Schafen mit AMH-Konzentrationen ≥ 97 pg/ml bei 50% und bei Schafen mit AMH-Spiegeln < 97 pg/ml bei 15% (Lahoz et al., 2012). In einer anderen Studie an Rasa-Aragonesa-Schafen beschrieben Lahoz et al. (2014) AMH als guten Prädiktor der Reaktion der Ovarien auf FSH-Stimulation. Pro Erhöhung der AMH-Serumkonzentrationen um 100 pg/ml zeigten die Schafe jeweils 5,1 zusätzliche Follikel und 2,7 zusätzliche Cumulus-Eizellen-Komplexe ($P < 0,0001$ bzw. $P < 0,01$). Auch Pinto et al. (2018) beschrieben AMH als geeigneten Marker zur Auswahl von Spender-Mutterschafen bei der Produktion von Embryonen *in vivo*.

Souza et al. (2015) untersuchten den Zusammenhang der AMH-Serumkonzentrationen und der Erfolgsrate einer Superovulation an 72 weiblichen Rindern. Kühe mit AMH-Spiegeln zwischen 184,4 und 374,3 pg/ml ($n = 18$) zeigten mit durchschnittlich 25,6 Gelbkörpern und 14,0 Embryonen eine mehr als doppelt so hohe Ansprechbarkeit auf Superovulation als Rinder mit AMH-Konzentrationen zwischen 0,01 und 82,6 pg/ml ($n = 18$) und durchschnittlich 12,0 Gelbkörpern und 5,0 Embryonen. Auch die AMH-Spiegel im Plasma von Spenderkühen für die Embryonenproduktion korrelierten während der ersten Laktation und mehrere Monate vor Beginn der Superovulation signifikant mit der maximalen Anzahl gesammelter und transferierbarer Embryonen (Monniaux et al., 2010). AMH könnte somit zur Verbesserung der Effizienz von Superovulations-Programmen bei Milchkühen beitragen (Monniaux et al., 2010; Souza et al., 2015). Vernunft et al. (2015) kamen hingegen zu dem Ergebnis, dass die Korrelation zwischen AMH und dem Ergebnis eines Ovum-Pick-Up-In-Vitro-Produktion-Programms (OPU-IVP) zu gering war, um AMH als akkuraten, prädiktiven Marker für den Erfolg eines OPU-IVP bei Holstein-Friesian-Färsen anzuwenden. AMH könnte jedoch dabei helfen, sehr gute von sehr schlechten Eizellspender-Tieren zu unterscheiden. Ayala Guanga et al. (2022) untersuchten den Zusammenhang zwischen den AMH-Serumkonzentrationen und der Anzahl der Antralfollikel (antral follicle

count, AFC) bei Holstein-Friesian-Kühen. Die Kühe mit AMH-Spiegeln $> 0,09$ ng/ml zeigten einen höheren AFC ($25,0 \pm 2,21$ Follikel) als die Kühe mit AMH-Konzentrationen $< 0,05$ ng/ml ($14,08 \pm 2,68$ Follikel; $P < 0,001$). Sie schlugen einen AMH-Cut-Off-Wert von $0,09$ ng/ml für die Auswahl von Spenderkühen bei Embryotransferprogrammen vor. Karl et al. (2022) schlussfolgerten, dass mithilfe der AMH-Serumkonzentrationen und des AFCs bei Superovulationsprogrammen an Färsen mit kleiner Ovarialreserve, zwar die Anzahl, jedoch nicht die Funktionalität der ovulationsreifen Follikel abgeschätzt werden können. Da sich dies auch auf die Qualität der Eizelle auswirken könnte, stellten sie den Nutzen von AMH und AFC zur Verbesserung der IVF- oder Embryotransferergebnisse bei Färsen mit kleiner Ovarialreserve in Frage.

Bei Ziegen waren die AMH-Konzentrationen prädiktiv für das Potential einer Spenderziege eine hohe bzw. niedrige Anzahl qualitativ hochwertiger Embryonen zu produzieren (Monniaux et al., 2011).

3.2.2. AMH als Marker des Kastrationsstatus

Hunde aus Tierheimen oder dem Ausland mit unbekannter Anamnese und Kastrationsstatus werden häufig in der tierärztlichen Praxis vorgestellt (Place et al., 2011; Themmen et al., 2016). In diesen Fällen ist ein zuverlässiges, einfaches und auch preiswertes Diagnostikum des Kastrationsstatus von großer Bedeutung (Place et al., 2011). Zwar gibt es viele Möglichkeiten den Kastrationsstatus eines Hundes oder einer Katze zu erheben, jedoch unterscheiden sich diese in vielerlei Hinsicht. Bei männlichen Tieren ohne Kryptorchismus ist die Erhebung des Kastrationsstatus aufgrund der gut sichtbaren Hoden außerhalb der Körperhöhle zwar auch rein adspektorisch und palpatorisch möglich, bei Hündinnen gestaltet sich dies jedoch aufgrund der intraabdominalen Lage der Gonaden schwieriger. Eine sichtbare Operationsnarbe kann zwar auf eine Kastration hinweisen, sie jedoch nicht beweisen. Bei Tieren, die in einem sehr jungen Alter einer Ovariectomie unterzogen wurden, oder minimalinvasiv endoskopisch kastriert wurden, ist eine Operationsnarbe unter dem Fell nicht immer gut sichtbar (Olson et al., 2001; Place et al., 2011). Eine sonographische Untersuchung des Abdomens kann zwar auf Ovargewebe hinweisen, jedoch ist sie in großem Maße von der Erfahrung des Untersuchers, dem Reproduktionszyklus zum Zeitpunkt der Untersuchung und der Größe der Ovarien bzw. der Ovarreste abhängig (Ball et al., 2010). Eine weitere Methode ovarielles Gewebe nachzuweisen ist die explorative Laparotomie. Diese stellt jedoch einen, mit einer Narkose verbundenen, erheblich

invasiven Eingriff dar, der Tierbesitzer oder Tierheime unnötig finanziell belasten würde (Place et al., 2011). Weniger invasive Alternativen, Eierstöcke oder Eierstockreste nachzuweisen, sind die klinische Untersuchung, die Vaginalzytologie, ein GnRH-Stimulationstest und die Bestimmung von LH, Progesteron oder Östradiol (Wallace, 1991; Place et al., 2011; Rohlertz et al., 2012). Diese sind jedoch nicht ohne Einschränkungen nutzbar und unterscheiden sich erheblich in ihrer Zuverlässigkeit. So besitzt eine Vaginalzytologie nur Aussagekraft, wenn sich das Tier im Proöstrus oder Östrus befindet. Doch auch in diesem Fall sollte eine definitive Diagnose nur durch eine oder mehrere Messungen der Östrogen- bzw. Progesteron-Serumkonzentrationen gestellt werden (Feldman & Nelson, 2004). Der GnRH-Stimulationstest ist zwar eindeutiger, jedoch kostenintensiver und mit mehreren Tierarztbesuchen und Blutentnahmen verbunden, was eine zusätzliche Belastung des Tieres bedeutet (Buijters et al., 2006; Axner & Ström Holst, 2015). Eine einmalige LH-Messung zum Nachweis von Ovargewebe liefert ein weniger eindeutiges Ergebnis. Der Test hat zwar eine sehr gute Sensitivität (98%), jedoch eine nur mäßige Spezifität (78%) aufgrund vermehrt falsch positiver Testergebnisse. Eine einzige Messung einer hohen LH-Serumkonzentration ist somit kein zuverlässiger Indikator für das Fehlen von Ovargewebe (Löfstedt & Vanleeuwen, 2002). Eine vorausgehende Stimulation durch ein GnRH-Analogon erhöht die Aussagekraft einer solitären Bestimmung von LH (Löfstedt & Vanleeuwen, 2002; Buijters et al., 2006). Messungen der Progesteron- oder Östradiol-Konzentrationen sind in hohem Maße von dem vorherrschenden Reproduktionszyklus abhängig und daher in Zyklusphasen mit erniedrigten Konzentrationen nicht aussagekräftig (Rohlertz et al., 2012).

Da AMH ausschließlich in den Sertoli- und Granulosazellen der männlichen bzw. weiblichen Gonaden sezerniert wird, kann es als Diagnostikum zur Unterscheidung von kastrierten und intakten Tieren verwendet werden (Place et al., 2011; Themmen et al., 2016; Walter et al., 2019). Nennenswerte AMH-Konzentrationen im Blut lassen somit auf das Vorhandensein von Keimdrüsen schließen, da nach deren Entfernung AMH im Blut nicht mehr nachweisbar ist (La Marca et al., 2005). Im Gegensatz zu anderen Methoden der Erhebung des Kastrationsstatus ist AMH weitaus weniger vom Zyklusgeschehen abhängig und zu jedem Zeitpunkt des Reproduktionszyklus messbar (Turna Yilmaz et al., 2015). So ist AMH auch bei weiblichen Tieren im Anöstrus nachweisbar (Place & Cruickshank, 2009; Anadol et al., 2020). Eine einzige Blutentnahme ist daher zur Bestimmung des Kastrationsstatus mittels AMH

ausreichend (Turna Yilmaz et al., 2015). Bei Katzen und Hunden nach Ovariektomie lassen sich signifikant niedrigere AMH-Serumkonzentrationen im Vergleich zu ihren sexuell intakten Artgenossen nachweisen (Place et al., 2011; Axnér & Ström Holst, 2015; Pir Yagci et al., 2016; Themmen et al., 2016; Walter et al., 2019; Anadol et al., 2020). In einer Studie von Place et al. (2011) betrug die Wahrscheinlichkeit, den Kastrationsstatus intakter und kastrierter Hündinnen richtig zu erkennen, 93,9 bzw. 93,8%. Diese hohen Wahrscheinlichkeiten ergaben sich erst bei Tieren älter als 6 Monate. Grund hierfür war, dass bei den jüngeren Weibchen niedrigere AMH-Spiegel gemessen wurden. Der Cut-Off-Wert wurde mit 0,09 ng/ml angegeben. Es hatten 46/49 der intakten Hündinnen AMH-Konzentrationen über dem Cut-Off-Wert, während 15/16 der kastrierte Hündinnen darunter lagen. Lediglich bei einem kastrierten Tier lag der AMH-Wert bei 0,36 ng/ml (Place et al., 2011). Auch bei Hill et al. (2018) zeigte das verwendete AMH-Assay bei der Erkennung von Ovargewebe bei Hündinnen jünger als 6 Monate eine niedrige Sensitivität. Bei solch jungen Hündinnen sollte daher mit einer AMH-Messung zur Erhebung des Kastrationsstatus gewartet werden. In einer weiteren Studie zeigten sexuell intakte weibliche Hunde ($n = 10$) mittlere AMH-Serumkonzentrationen von $4,26 \pm 0,82$ ng/ml, kastrierte Hündinnen ($n = 9$) hingegen Werte von $0,28 \pm 0,09$ ng/ml. Auch hier waren die Unterschiede der AMH-Konzentrationen signifikant (Turna Yilmaz et al., 2015). Anadol et al. (2020) untersuchten die AMH-Serumspiegel von 8 Hündinnen im Diöstrus und 8 Hündinnen im Anöstrus einmalig vor (Tag 0), und dreimalig nach Ovariohysterektomie (Tag 1, 5 und 10). Die AMH-Konzentrationen aller Tiere waren an Tag 1 und 5 signifikant niedriger als an Tag 0 ($P < 0,05$). Bereits am 10. Tag nach erfolgter Kastration fielen die AMH-Spiegel auf Werte unter der Nachweisgrenze des AMH-Assays (1,0 ng/ml).

Ebenso verringert die Kastration von Rüden (Themmen et al., 2016), Katern (Axnér & Ström Holst, 2015), Hengsten (Claes et al., 2013) und männlichen Kälbern (Kitahara et al., 2012) die AMH-Konzentrationen im Blutserum signifikant. Als Marker von Ovar- bzw. Hodengewebe zeigte der AMH-Assay in einer Studie von Axnér & Ström Holst (2015) sowohl bei Katzen als auch bei Katern eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100%. Hierfür wurden die AMH-Serumspiegel bei kastrierten ($n = 15$) bzw. intakten Katzen ($n = 16$) und bei kastrierten ($n = 15$) bzw. intakten Katern ($n = 12$) bestimmt. Die AMH-Konzentrationen der kastrierten Tiere lagen alle unter der Nachweisgrenze (0,14 ng/ml) des Assays (AMH Gen II ELISA). Bei den intakten Weibchen lagen die AMH-Spiegel zwischen 1,3 und 19,0 ng/ml, während sie bei den intakten Männchen

zwischen 4,8 und 81,3 ng/ml lagen.

Themmen et al. (2016) bestimmten die AMH-Konzentrationen im Blutplasma von 46 intakten bzw. 48 kastrierten Hündinnen und 50 intakten bzw. 48 kastrierten Rüden und verglichen auch hier die AMH-Spiegel der verschiedenen Gruppen. Die AMH-Konzentrationen der intakten Tiere unterschieden sich von denen der kastrierten Tiere signifikant. Insgesamt wurden bei den intakten Hündinnen niedrigere AMH-Serumspiegel gemessen als bei den intakten Rüden ($P < 0,0001$).

Place et al. (2017) untersuchten die AMH-Serumkonzentrationen weiblicher Geparden ($n = 5$), die 6 - 18 Monate vor Blutprobenentnahme mit dem langwirksamen GnRH-Agonisten Deslorelin behandelt worden waren. Die AMH-Konzentrationen waren im Vergleich zu den unbehandelten Weibchen deutlich niedriger.

3.2.3. AMH als Marker des Ovarrest-Syndroms

Obwohl nach Ovariectomien und Ovariohysterektomien die Ovarien immer auf Vollständigkeit überprüft werden sollten, kommt eine unvollständige Entnahme der Eierstöcke trotz allem vor (Günzel-Apel et al., 2012). Sollten Ovarreste im Tierkörper verbleiben, können diese nach Revaskularisierung oder Anastomosenbildung wieder endokrin aktiv werden und das sogenannte Ovarrest-Syndrom (ovarian remnant syndrome, ORS) hervorrufen (Buijtel et al., 2006; Günzel-Apel et al., 2012).

Hündinnen mit ORS zeigen zyklisch wiederkehrende Läufigkeitssymptome und seltener Scheinträchtigkeiten (Günzel-Apel et al., 2012). Durch die endokrine Aktivität der Eierstockreste kann auch AMH wieder sezerniert werden, was sich im Blutserum bei Hunden nachweisen ließ (Place et al., 2011; Turna Yilmaz et al., 2015; Karakas Alkan et al., 2019). AMH kann somit, wie bei der Fragestellung des Kastrationsstatus, auch bei Verdachtsfällen von ORS als Diagnostikum genutzt werden (Place et al., 2011). Place et al. (2019) schlugen eine gleichzeitige Bestimmung von AMH und Progesteron zur Verbesserung der Effektivität von AMH als ORS-Marker vor. Während in den meisten Studien zwar weibliche, kastrierte Hunde von an ORS erkrankten Hündinnen unterschieden werden konnten, gab es keine signifikanten Unterschiede der AMH-Serumkonzentrationen zwischen sexuell intakten Hündinnen und Tieren mit ORS (Place et al., 2011; Turna Yilmaz et al., 2015). Im Gegensatz dazu hatten Katzen mit ORS signifikant niedrigere AMH-Serumspiegel als sexuell intakte Katzen. Die AMH-Serumkonzentrationen der kastrierten weiblichen Katzen waren auch hier signifikant niedriger als bei unkastrierten Tieren bzw. Katzen mit ORS (Place et al., 2011; Flock et

al., 2022b).

3.2.4. AMH als Marker bei Kryptorchismus

AMH ist auch in der Veterinärmedizin als klinischer Marker bei Verdacht auf Kryptorchismus beschrieben. So zeigten Rüden mit bilateralem oder unilateralem Kryptorchismus signifikant höhere AMH-Serumkonzentrationen als kastrierte Rüden (Gharagozlou et al., 2014; Hornakova et al., 2017; Leykam et al., 2018). Ähnliche Ergebnisse erbrachte eine Studie von Kitahara et al. (2012) an Kälbern mit unilateralem Kryptorchismus. Auch hier wurden bei den kryptorchiden Tieren (n = 9) signifikant höhere AMH-Serumspiegel gemessen als bei den kastrierten Kälbern. Hornakova et al. (2017) konnten mit Hilfe von AMH sogar zwischen kryptorchiden Rüden und Rüden mit abgestiegenen Hoden unterscheiden. Erstere hatten signifikant höhere AMH-Serumkonzentrationen. Ähnlich zeigten kryptorchide Hengste und Kälber signifikant höhere AMH-Serumspiegel als Hengste (Claes et al., 2013) bzw. Kälber (Kitahara et al., 2012) mit physiologischen Hoden. Als Grund hierfür wird die morphologische Ähnlichkeit kryptorchider Hoden mit präpubertären Hoden vorgeschlagen (Claes et al., 2013). Kryptorchide Hoden weisen im Gegensatz zu abgestiegenen Hoden eine erhöhte AMH- und AMH-Rezeptor-II-Expression auf, was auf unreife Sertolizellen und/oder eine fehlende Suppression durch Testosteron hinweist (Almeida et al., 2013).

3.2.5. AMH als Marker kongenitaler sexueller Fehlbildungen

Die AMH-Serumspiegel wurden auch bei Hunden mit Störungen der Geschlechtsentwicklung bzw. testikulärer Dysgenese erforscht. Walter et al. (2022) untersuchten elf Hunde mit Störungen der Geschlechtsentwicklung und kamen zu dem Ergebnis, dass die AMH-Serumkonzentrationen dieser Hunde signifikant höher waren ($P < 0,001$) als bei gesunden, sexuell intakten Hündinnen und Rüden. Die AMH-Spiegel überschritten bei sechs Tieren den oberen Grenzwert des AMH-Assays (23 ng/ml). Bei drei Tieren waren die AMH-Konzentrationen im Referenzbereich der intakten Kontrollgruppe, obwohl bei diesen Hunden kryptorchide Hoden nachgewiesen wurden. Ein Hund zeigte eine testikuläre Dysgenese mit fehlendem Hodengewebe. Der AMH-Serumspiegel dieses Hundes war niedriger als der untere Grenzwert des AMH-Assays (0.01 ng/ml) und vergleichbar mit den AMH-Konzentrationen kastrierter Hunde.

3.2.6. AMH als Marker neoplastischer Erkrankungen

Wie beim Menschen können hohe AMH-Serumkonzentrationen auch beim Tier Hinweise auf eine neoplastische Entartung der AMH-produzierenden Zellen der

männlichen bzw. weiblichen Gonaden geben. Hierzu gehören der Granulosazelltumor der Stute (Almeida et al., 2011; Ball et al., 2013), der Hündin (Walter et al., 2018) und der Kuh (El-Sheikh Ali et al., 2013), sowie der Sertolizelltumor des Rüden (Ano et al., 2014; Holst & Dreimanis, 2015).

Almeida et al. (2011) untersuchten die AMH-Serumspiegel bei Stuten mit Granulosazelltumor. Die AMH-Konzentrationen der Pferde mit Granulosazelltumor lagen bei $1901,4 \pm 1144,6$ ng/ml und waren damit signifikant höher als bei nicht trächtigen ($0,96 \pm 0,08$ ng/ml) bzw. trächtigen Stuten ($0,72 \pm 0,05$) ohne Granulosazelltumor. Bei fünf der Pferde wurde nach therapeutischer Entfernung der neoplastisch entarteten Ovarien die AMH-Konzentration im Blutserum wiederholt bestimmt. Bei allen verringerte sich der AMH-Serumspiegel bereits am ersten postoperativen Tag deutlich. Die Halbwertszeit von AMH im Blutserum wurde mit 1,9 Tagen angegeben.

Auch Rinder mit Granulosazelltumoren zeigten signifikant höhere AMH-Serumkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht erkrankter Tiere (3,59 bzw. 0,07 ng/ml). Eine Woche nach Ovariectomie fielen die AMH-Werte wieder auf ca. 0,05 ng/ml. Im Vergleich zu immunoreaktivem-Inhibin (ir-INH) und Östradiol-17 β (E2), welche zuvor als Diagnostika von Granulosazelltumoren dienten, zeigte AMH bei einem Cut-off-Wert von 0,36 ng/ml die höchste diagnostische Genauigkeit mit einer Sensitivität und Spezifität von 100 bzw. 99,1%. Die Hormone ir-INH und E2 hatten im Gegensatz dazu eine Sensitivität von 77,8 bzw. 88,9% und eine Spezifität von 85 bzw. 84,1% (El-Sheikh Ali et al., 2013).

Bei weiblichen Hunden mit Granulosazelltumor waren die AMH-Serumspiegel signifikant höher ($P < 0,05$) als bei Hündinnen ohne Pathologien bzw. Hündinnen mit Ovarialzysten oder anderen Neoplasien der Eierstöcke. Der Cut-off-Wert zur Diagnose eines Granulosazelltumors wurde bei 0,99 ng/ml angesetzt, womit sich eine Sensitivität und Spezifität des Assays von 100 bzw. 94,44% ergab (Walter et al., 2018).

Neoplasien der Ovarien sind bei der Katze eher selten vorzufinden. Grund hierfür ist wahrscheinlich die verbreitete Praxis weibliche Katzen zu kastrieren. In einem Fallbericht über eine weibliche Katze mit Granulosazelltumor wird auch von einer signifikant erhöhten AMH-Serumkonzentration (5,7 ng/ml) berichtet. Zwei Monate nach therapeutischer Ovariohysterektomie zeigte die Katze eine signifikante Abnahme des AMH-Spiegels ($< 0,04$ ng/ml), passend zu den AMH-Konzentrationen der

kastrierten Kontrollgruppe (n = 8) (Heaps et al., 2017).

Bei Rüden mit Sertolizelltumor (n = 6) konnten signifikant (P = 0,0004) höhere AMH-Serumkonzentrationen (> 22 ng/ml) nachgewiesen werden als bei den Rüden der nicht erkrankten Kontrollgruppe (n = 27; < 10 ng/ml). Lediglich ein Hund der Kontrollgruppe hatte einen AMH-Spiegel von 43 ng/ml. Die Hunde mit palpierbaren, testikulären Massen, welche jedoch keine Sertolizelltumoren waren (n = 14), hatten mittlere AMH-Konzentrationen von 12,0 ng/ml (Holst & Dreimanis, 2015).

III. Publikation

Die Publikation wurde am 13. Juni 2022 im Journal „Reproduction in Domestic Animals“ eingereicht und am 31. August 2022 zur Veröffentlichung akzeptiert. Am 2. September 2022 wurde der Originalartikel online publiziert.

Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians-University
Munich, Germany

Anti-Müllerian hormone concentrations in female rabbits and its relation to spay status, pseudopregnancy and ovarian follicle numbers

Florian Böhmer, Katharina Erber, Anja Ewringmann, Ruth Klein, Sven Reese,
Christine Böhmer, Andrea Meyer-Lindenberg, Beate Walter

Received: 13 June 2022 | Accepted: 31 August 2022

DOI: 10.1111/rda.14240

ORIGINAL ARTICLE

Reproduction in Domestic Animals | WILEY

Anti-Müllerian hormone concentrations in female rabbits and its relation to spay status, pseudopregnancy and ovarian follicle numbers

Florian Böhmer¹ | Katharina Erber² | Anja Ewringmann³ | Ruth Klein⁴ |
Sven Reese⁵ | Christine Böhmer⁶ | Andrea Meyer-Lindenberg¹ | Beate Walter¹

¹Faculty of Veterinary Medicine, Clinic of Small Animal Surgery and Reproduction at the Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany

²Institute of Veterinary Pathology, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany

³Practice for Small Pets, Dr. Anja Ewringmann, Berlin, Germany

⁴Laboklin GmbH & Co.KG, Bad Kissingen, Germany

⁵Institute of Veterinary Anatomy, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany

⁶Zoological Institute, Zoology and Functional Morphology of Vertebrates, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, Germany

Correspondence

Florian Böhmer, Faculty of Veterinary Medicine, Clinic of Small Animal Surgery and Reproduction at the Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig Maximilian University, Veterinaerstr. 13, 80539 Munich, Germany.

Email: florian.boehmer@chir.vetmed.uni-muenchen.de

Abstract

Anti-Müllerian hormone (AMH), known for its role during foetal sexual differentiation, is secreted by the Sertoli cells in males and the granulosa cells in females during post-natal life. As serum AMH concentrations correlate with follicle numbers, AMH is utilized as a marker of ovarian reserve in many species. In dogs and cats, AMH is used as a diagnostic tool to determine spay or neuter status. In the available literature, no research regarding serum AMH levels in rabbits has been published yet. The objectives of the present study were to (1) measure serum AMH concentrations in female rabbits and investigate the value of AMH as a diagnostic tool to differentiate between spayed and intact does and (2) relate measured AMH levels to pseudopregnancy and ovarian follicle numbers. For AMH measurement, serum samples were obtained from sexually intact ($n = 64$) and spayed ($n = 22$) female rabbits. Spayed does were of various breeds; intact rabbits were Zika hybrid rabbits. In the intact does, AMH measurement was complemented by determination of progesterone levels, gynaecological examination and histopathological evaluation of the uterus and ovaries, including follicle counts. Serum AMH and progesterone concentrations were measured using a human-based chemiluminescence immunoassay (CLIA) and an enzyme-linked fluorescence assay (ELFA), respectively. Depending on progesterone levels, sexually intact does were classified into follicular ($n = 52$) or luteal phase ($n = 12$). Median serum AMH levels were 1.53 ng/ml (range 0.77–3.36 ng/ml) in intact and 0.06 ng/ml (range ≤ 0.01 –0.23 ng/ml) in spayed does. AMH concentrations between the intact and spayed rabbits differed significantly and did not overlap ($p < .001$). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis yielded a sensitivity and specificity of 100% for a cut-off level of 0.50 ng/ml. Follicular or luteal phase had no significant influence on measured AMH levels ($t = 0.061$, $df = 62$, $p = .951$). While the number of secondary follicles correlated significantly with AMH concentrations ($r_s = 0.410$, $p = .001$), the number of primary or antral follicles did not ($r_s = 0.241$, $p = .055$ and $r_s = 0.137$, $p = .281$, respectively). In conclusion, a single determination of serum AMH

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *Reproduction in Domestic Animals* published by Wiley-VCH GmbH.

concentrations was adequate to distinguish spayed from intact female rabbits. Among sexually intact individuals, whether does were in follicular or luteal phase had no significant influence on measured serum AMH concentrations. The relationship between small growing follicles and AMH levels as described in other species could be partially confirmed, as secondary follicles correlated significantly with AMH.

KEYWORDS

anti-Müllerian hormone, follicle numbers, pseudopregnancy, rabbit, spay status

1 | INTRODUCTION

Anti-Müllerian hormone (AMH) is a dimeric glycoprotein and responsible for suppression of Müllerian duct development during embryogenesis in males (Cate et al., 1986; Jost, 1947). If not suppressed by AMH, the Müllerian duct develops into the uterus, vagina and fallopian tubes (Cate et al., 1986). In males, AMH is exclusively produced by Sertoli cells of the testes (Josso, 1973). In females, AMH is predominantly secreted by granulosa cells of pre-antral and small antral ovarian follicles (Vigier et al., 1984), where it has two roles in ovarian physiology. Firstly, AMH inhibits the recruitment of primordial follicles into the pool of growing follicles, and secondly, AMH decreases the responsiveness of growing follicles to follicle-stimulating hormone (FSH). Thus, AMH is responsible for preserving the ovarian follicle pool and avoiding premature exhaustion (Durlinger et al., 2002).

In human medicine, AMH is mainly used as an indirect, non-invasive marker for the size of the ovarian reserve, as serum AMH levels correlate with the number of follicles (Van Rooij et al., 2002). Similarly, AMH concentrations correlate with the number of small growing follicles in cows, mares, bitches and hamsters (Anadol et al., 2020; Claes et al., 2016; Monniaux et al., 2012; Place & Cruickshank, 2009).

Since AMH is mainly produced in the male and female gonads, it can be used as a diagnostic tool to distinguish between intact and castrated individuals (Place et al., 2011; Themmen et al., 2016). Ovariectomy decreases serum AMH concentrations significantly in women, bitches and queens (Alm & Holst, 2018; Anadol et al., 2020; Axné & Ström Holst, 2015; Flock et al., 2022; La Marca et al., 2005; Pir Yagci et al., 2016; Place et al., 2011; Themmen et al., 2016; Walter et al., 2019). Similarly, in bitches and queens, AMH can provide evidence for ovarian tissue in suspected cases of ovarian remnant syndrome (ORS) (Flock et al., 2022; Karakas Alkan et al., 2019; Place et al., 2011; Turna Yilmaz et al., 2015). In rabbits, as uterine adenocarcinoma is the most common tumour type, ovariectomy is increasingly performed as a preventive for uterine and ovarian neoplasms (Quesenberry & Carpenter, 2011; Walter et al., 2010). Therefore, in does with unknown medical history, knowledge about spay status is essential, and AMH could be an effective diagnostic tool for spay status in these cases.

In the species of interest, knowledge about normal reference intervals and possible cycle-associated changes in serum AMH concentrations are required for its application in a clinical setting. In the bitch and the queen, significant fluctuations of serum AMH

concentrations during the oestrous cycle were reported, albeit limited by breed influences and high individual variations (Flock et al., 2019; Walter et al., 2019). In horses, while one study described no significant changes in AMH levels during the oestrous cycle or pregnancy (Almeida et al., 2011), a recent study suggested increased AMH concentrations in oestrous mares compared with mares in dioestrus (Dal & Kasikci, 2020). In most studies in cattle, no significant variations of serum AMH levels throughout oestrous cycles were described (El-Sheikh Ali et al., 2013; Monniaux et al., 2010; Rico et al., 2009).

Along with felids, minks and ferrets, rabbits are induced ovulators (Senger, 2012). If fertilization does not occur after ovulation, pseudopregnancy can develop (Rubin & Azrin, 1967). Pseudopregnancy persists 16–18 days and is accompanied by increased progesterone levels of 1–2 ng/ml on day two post-ovulation, up to 12–20 ng/ml between days six and eight post-ovulation (Norris & Lopez, 2011). On Days 16–18, progesterone concentrations return to basal levels of <1 ng/ml (Browning et al., 1980). Throughout the reproductive cycle, female rabbits display periods of increased and reduced sexual receptivity lasting about 7–14 and 1–4 days, respectively (Easson, 2001; Mc Nitt et al., 2013). In periods of increased receptivity, the doe's vulva is commonly enlarged, moist and of reddish purple colour (Quesenberry & Carpenter, 2011). In periods of decreased receptivity, rabbits have bright pink vulvas with no swelling and only slight moistness (Ramirez et al., 1986). On each ovary, follicular development occurs in waves of 5 to 10 follicles. Mature follicles remain active for about 12–14 days, after which they degenerate, followed by reduced sexual receptivity (Mc Nitt et al., 2013).

The objectives of the present study were to (1) measure serum AMH concentrations in female rabbits and investigate the value of AMH as a diagnostic tool to differentiate between spayed and sexually intact does and (2) relate measured AMH levels to pseudopregnancy and ovarian follicle numbers.

2 | MATERIALS AND METHODS**2.1 | Animals and collection of specimens**

The present study was conducted in accordance with the guidelines of the Protection of Animal Act and was approved by the ethics committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Ludwig Maximilian University (ref. no 273–July 19, 2021).

After owner agreement, blood samples of spayed rabbits ($n = 22$) were collected from does which were presented at a local veterinary practice due to dental disease and routine health check-ups. Sampling of 1 ml of blood was performed 0.4–7.2 years (mean 2.7 years) after initial spaying by puncture of the marginal ear vein. Spayed animals were lionhead ($n = 8$), lop ($n = 5$), mini lop ($n = 4$), pygmy ($n = 4$) and angora hybrid ($n = 1$) rabbits, aged 1.6–12.1 years (mean 5.6 years) and weighing 1.49–2.85 kg (mean 2.23 kg).

Specimens of sexually intact does ($n = 64$) were collected from animals after they were sacrificed due to a different authorized study (ref. no 55.2-2532.Vet 03-17-110, Bavarian Government). Following euthanasia by intravenous application of pentobarbital, 2 ml of blood was collected by cardiac puncture. Before sacrifice, all does were deemed clinically healthy. Intact rabbits were white-coloured, female Zika hybrid rabbits, aged 5.7–8.8 months (mean 7.5 months) and weighing 3.86–7.20 kg (mean 5.72 kg).

Blood samples were left to clot at room temperature and were then centrifuged at 2000g for 5 min (IKA® mini G S000). Thereafter, serum was collected and stored at -20°C until measurement of hormones.

In the intact does, AMH measurement was complemented by determination of progesterone levels, gynaecological examination and histopathological evaluation of the uterus and ovaries, including follicle counts.

2.2 | Gynaecological examination

The vulva of each intact doe was examined and checked for enlargement, change of colour (pale, pink or red) and vaginal discharge. The vulva's appearance was documented photographically to ensure impartial comparability. Thereafter, mammary glands were checked for enlargement and milk production.

2.3 | Histopathological examination

Following euthanasia, the ovaries and uterus were removed, dissected free of surrounding fat and immersed in 7% buffered formalin. After fixation in formalin for at least 24 h, serial dehydration with ethanol and clearing with Xylol was performed. Specimens were then embedded into paraffin blocks and serially sectioned at $4\ \mu\text{m}$. Ovaries were cut sagittally, the uterus was cut transversely. For each ovary, one representative section was selected from the midsagittal and lateral sagittal planes, totalling three sections. In addition, a representative section from the uterus was obtained from the middle of both uterine horns and at the height of both cervixes. Tissue ribbons were stained with a Giemsa and haematoxylin–eosin stain. Specimens were then examined for histopathological conditions. Further, follicle numbers and presence of corpora lutea were documented. Follicles with a single layer of cuboidal granulosa cells were regarded as primary follicles, those with multiple layers were classified as secondary follicles. Follicles with an antrum of any size were

defined as antral follicles (Place & Cruickshank, 2009). Only follicles with a healthy oocyte nucleolus were recorded. Slides of the uterus were examined for epithelial hyperplasia, stromal oedema and lumen dilatation, indicating pseudopregnancy (Geyer et al., 2016). All histological slides were evaluated by a single examiner, unaware of the results from the gynaecological examination and hormone analysis.

2.4 | Hormone analysis

Serum AMH concentrations were measured at a commercial laboratory (Laboklin GmbH & Co. KG, Bad Kissingen, Germany) using a chemiluminescence immunoassay (CLIA) on a cobas E602 analyzer (Roche). The AMH assay was validated for rabbits. In the sexually intact animals, intra-assay coefficients of variation were between 1.40 and 1.47%, inter-assay coefficients of variation were between 3.70 and 4.91%. In the spayed animals, intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 2.55 and 8.21%, respectively. Additionally, the intra-assay coefficient of variation was calculated for serial dilutions (1:2, 1:5: 1:10, 1:20) using serum of sexually intact rabbits and a physiologic salt solution as a diluting agent. The intra-assay coefficients of variation were 5.41% at 3.63 ng/ml, 6.52% at 2.15 ng/ml and 17.06% at 1.8 ng/ml. Comparison of the expected values to the measured values after dilution yielded a mean recovery rate of 107.13% (range 94.91–138.89%). Recovery of human AMH standard added to rabbit serum showed changes in optical density parallel to the AMH standard curve. Minimum and maximum detection limit of the AMH assay were 0.01 and 23 ng/ml, respectively. Measurements of serum progesterone concentrations were conducted using an enzyme-linked fluorescence assay (ELFA) (miniVidas; bioMérieux, Inc.). Sexually intact rabbits with progesterone levels $<2\ \text{ng/ml}$ were classified as non-pseudopregnant (follicular phase), whereas does with progesterone concentrations $>2\ \text{ng/ml}$ were considered pseudopregnant (luteal phase) (YoungLai et al., 1989).

2.5 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using the software R v3.6.3 and SPSS 28.0.1.0 (IBM, Ehningen, Deutschland). AMH concentrations were displayed as mean \pm standard deviation and median with range. Normal distribution and homogeneity of variances were confirmed by Shapiro–Wilk and Levene's tests, respectively. In the spayed and intact animals, the Shapiro–Wilk test revealed a non-normal distribution of AMH levels; therefore, the Mann–Whitney U test was used. In the pseudopregnant and non-pseudopregnant intact rabbits, the Shapiro–Wilk test revealed a normal distribution of AMH levels, Levene's test showed equal variance; therefore, the parametric t -test was used to check for significant differences between the groups. For correlation analysis of AMH and follicle numbers, Spearman's rank correlation coefficient was used. For analysis of differences between vulva parameters in relation to AMH, the Mann–Whitney U test was used. Receiver operating characteristic

(ROC) curve analysis was performed to obtain optimal AMH cut-off values and their associated sensitivity and specificity values in the sexually intact and spayed does. A p -value $<.05$ was defined as statistically significant.

3 | RESULTS

Median serum AMH levels in the intact does ($n = 64$) were 1.53 ng/ml (range 0.77–3.36 ng/ml) and 0.06 ng/ml (range ≤ 0.01 –0.23 ng/ml) in the spayed does ($n = 22$; Table 1). AMH concentrations between intact and spayed rabbits differed significantly and did not overlap ($p < .001$; Figure 1). ROC curve analysis yielded a sensitivity and specificity of 100% for a cut-off level of 0.50 ng/ml. If the cut-off level was set at 0.15 ng/ml, sensitivity and specificity were 100 and 95.5%, respectively.

In the 64 intact rabbits, gynaecological examination revealed enlarged mammary glands in 17 (26.56%) and milk production in 14 (21.87%) does. Vulva colour was red in 23 (35.94%), pink in 39 (64.06%) and pale in 0 rabbits. Enlargement of the vulva was noted in 31 (48.44%) does. Vaginal discharge was observed in none. Histopathological examination of reproductive organs did not reveal any pathologic conditions. Epithelial hyperplasia, stromal oedema and lumen dilatation of the uterus was noted in 18 (28.13%) rabbits. In 12 (18.75%) does, multiple corpora lutea on the ovaries were evident. Likewise, 12 (18.75%) does had serum progesterone levels >2 ng/ml and were therefore considered in luteal phase (pseudopregnant). Fifty-two (81.25%) does had progesterone concentrations <2 ng/ml and were therefore deemed in follicular phase (non-pseudopregnant). Median progesterone concentrations of does in follicular and luteal phase were 0.30 ng/ml (range ≤ 0.25 –1.67 ng/ml) and 16.04 ng/ml (range 4.44–28.30 ng/ml), respectively. All 12 pseudopregnant does had multiple corpora lutea in the ovaries, and epithelial hyperplasia, stromal oedema and lumen dilatation in the uterus. Progesterone levels were significantly higher if corpora lutea were present ($p < .001$). Enlargement of mammary glands and milk production was noted in 4 (33.33%) and 3 (25%) does in luteal phase, and in 13 (25%) and 11 (21.15%) does in follicular phase.

Median AMH levels of rabbits in follicular phase were 1.52 ng/ml (range 0.77–3.36 ng/ml) and 1.55 ng/ml (range 0.80–3.32 ng/ml) in does in luteal phase (Table 1). Whether does were in follicular or luteal phase had no significant influence on measured serum AMH concentrations ($t = 0.061$, $df = 62$, $p = .951$; Figure 2). Vulva colour

or whether a vulva was enlarged showed no significant effect on measured AMH levels ($p = .401$ and $p = .337$, respectively).

In the ovaries, mean follicle numbers were 44.0 (range 14.0–113.0) for primary, 21.3 (range 5.0–46.0) for secondary and 15.2 (range 7.0–32.0) for antral follicles. The correlation of serum AMH concentrations and the number of primary or antral follicles was not significant ($r_s = 0.241$, $p = .055$ and $r_s = 0.137$, $p = .281$ respectively), whereas AMH levels correlated significantly with the number of secondary follicles ($r_s = 0.410$, $p < .001$; Figure 3).

4 | DISCUSSION

AMH is a valuable diagnostic tool in reproductive medicine. Regarding rabbits, there is no research about serum AMH levels in the available literature. To the authors' knowledge, this was the first study to measure serum AMH concentrations in female rabbits and relate them to spay status, pseudopregnancy and ovarian follicle numbers, using a human-based CLIA.

The results of the present study suggest that a single measurement of serum AMH concentrations is indicative for the absence or presence of the ovaries in rabbits. The ovaries appear to be the main source of AMH production in the doe. This is in accordance with the findings in women, bitches and queens (Anadol et al., 2020; Axné & Ström Holst, 2015; Flock et al., 2022; La Marca et al., 2005; Pir Yagci et al., 2016; Place et al., 2011; Themmen et al., 2016; Walter et al., 2019). Therefore, AMH appears to be an excellent diagnostic tool in does with unknown medical history where spay status is unclear. All spayed rabbits had AMH levels of ≤ 0.07 ng/ml, except for one with 0.23 ng/ml. This doe appeared to be a statistical outlier, as the AMH concentration was about 4 standard deviations greater than the mean in the other spayed rabbits. At a cut-off value of 0.50 ng/ml, the AMH assay had a sensitivity and specificity of 100%, which was about 8-fold higher compared with the cut-off level of 0.06 ng/ml described in dogs using the same AMH assay (Walter et al., 2019). No attempt was made to confirm absence of the ovaries in the reportedly spayed does. Thus, there was a possibility some animals may not have been spayed after all, though for no rabbit symptoms of ORS were reported.

Pseudopregnancy had no significant influence on measured serum AMH levels. Neither did colour nor enlargement of the vulva. Thus, in the sexually intact rabbits, AMH appears to be a reliable tool for diagnosing the spay status regardless of luteal or follicular phase, or changes in vulva colour or size. Similarly, in bitches

Spay status	Reproductive phase	Group size	Serum AMH concentration [ng/ml]				
			Mean	SD	Median	Min	Max
Intact		64	1.67	0.64	1.53	0.77	3.36
	Follicular phase	52	1.68	0.60	1.52	0.77	3.36
	Luteal phase	12	1.66	0.82	1.55	0.80	3.32
Spayed		22	0.05	0.04	0.06	0.01	0.23

TABLE 1 Mean serum anti-Müllerian hormone (AMH) concentrations with standard deviation (SD) and median serum AMH concentrations with minimum (min) and maximum (max) values in sexually intact and spayed female rabbits.

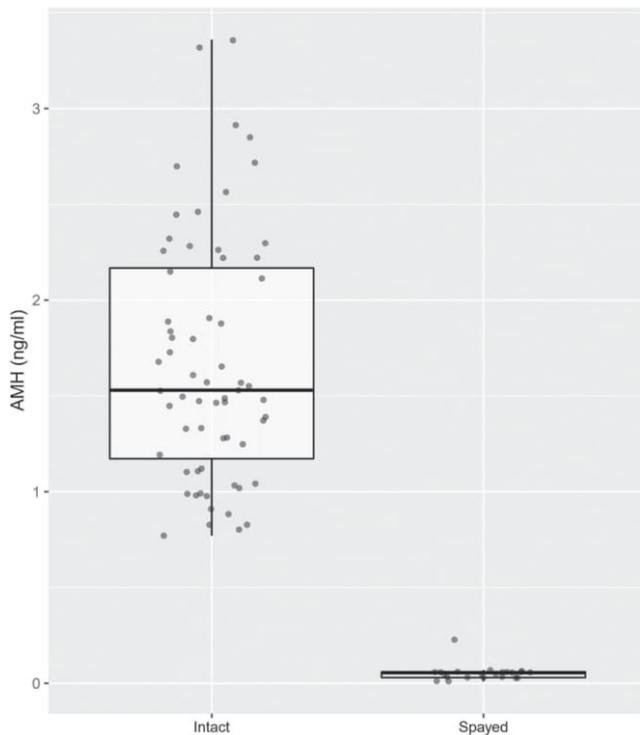


FIGURE 1 Combined dot and box plot of serum anti-Müllerian hormone (AMH) concentrations in sexually intact ($n = 64$) and spayed ($n = 22$) female rabbits. AMH levels between the intact and spayed rabbits differed significantly and did not overlap ($p < .001$).

and queens in luteal phase, determining AMH concentrations was a reliable method for diagnosing spay status (Alm & Holst, 2018; Axner & Ström Holst, 2015). Interestingly, in the present study, enlargement of mammary glands and milk production were noted in only 33.33 and 25% of does in luteal phase, and in 25 and 21.15% of does in follicular phase, respectively. Therefore, enlarged mammary glands and milk production were not a reliable indication of pseudopregnancy. The present study was limited by only measuring the serum AMH concentration within a single time frame of an individual rabbit. Because of possible intraindividual variations of AMH levels, obtaining multiple blood samples from the same animal throughout its reproductive cycle would have given more insight into AMH concentrations in rabbits, as significant fluctuations of AMH during the cycle could lessen the reliability of a single measurement and hamper clinical decision making. Furthermore, compared to the spayed does which were of various ages, intact rabbits were young and of similar ages. Further research is needed in intact does of advanced ages. While the time from spaying to AMH measurement was highly variable in the spayed rabbits ranging from 0.4 to 7.2 years ($SD = 2.04$), measured serum AMH concentrations were not as variable ($SD = 0.04$; Table 1). Another study limitation was that the majority of does were in follicular phase. More does in luteal phase would have made comparison of AMH levels in rabbits in luteal and follicular phase more balanced. The raise in AMH concentrations described in bitches and cows during follicular phase could not be seen in does (Brugger et al., 2011; Walter et al., 2019). Though, comparison is difficult

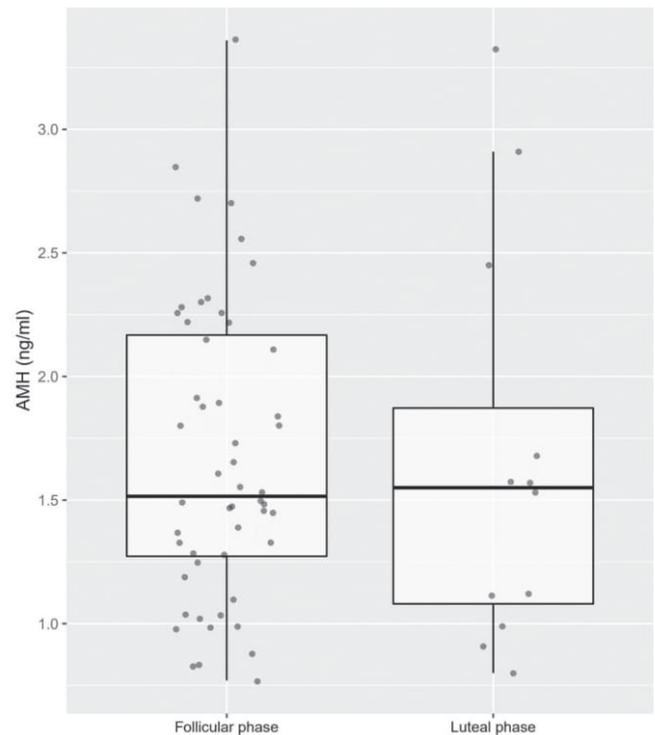


FIGURE 2 Combined dot and box plot of serum anti-Müllerian hormone (AMH) concentrations in sexually intact female rabbits in follicular ($n = 52$) and luteal ($n = 12$) phase. Whether does were in follicular or luteal phase (pseudopregnancy) had no significant influence on measured serum AMH concentrations ($t = 0.061$, $df = 62$, $p = .951$).

due to the doe being an induced ovulator. As no does were gravid in the present study, it remains to be seen whether pregnancy influences AMH levels in rabbits. In horses and queens, pregnancy does not seem to influence serum AMH concentrations (Almeida et al., 2011; Flock et al., 2019).

The correlation between small growing follicles and serum AMH levels as described in cows, mares, bitches and female hamsters (Anadol et al., 2020; Claes et al., 2016; Monniaux et al., 2012; Place & Cruickshank, 2009) could be confirmed partly in the present study. While the number of secondary follicles correlated significantly with AMH levels, primary and antral follicles did not. In dioestrous bitches, while the correlation of AMH levels and secondary follicles was significant as well ($r = 0.942$, $p < .01$), serum AMH concentrations correlated negatively with antral follicle numbers ($r = -0.765$, $p < .05$) (Anadol et al., 2020). Furthermore, in hamsters, AMH levels and number of pre-antral follicles correlated significantly ($r^2 = 0.41$, $p = .0004$) (Place & Cruickshank, 2009). Whether secondary follicles are the main source of AMH production in the doe should be investigated in future studies by evaluating immunohistochemical reaction of follicles for AMH as described in mature bovine ovaries (Vigier et al., 1984). As in the present study only three sectional planes of each ovary were evaluated, some follicles might have been missed out on. More accurate follicle numbers could have been achieved by serially sectioning of the ovaries at $6 \mu\text{m}$ and evaluating every tenth section

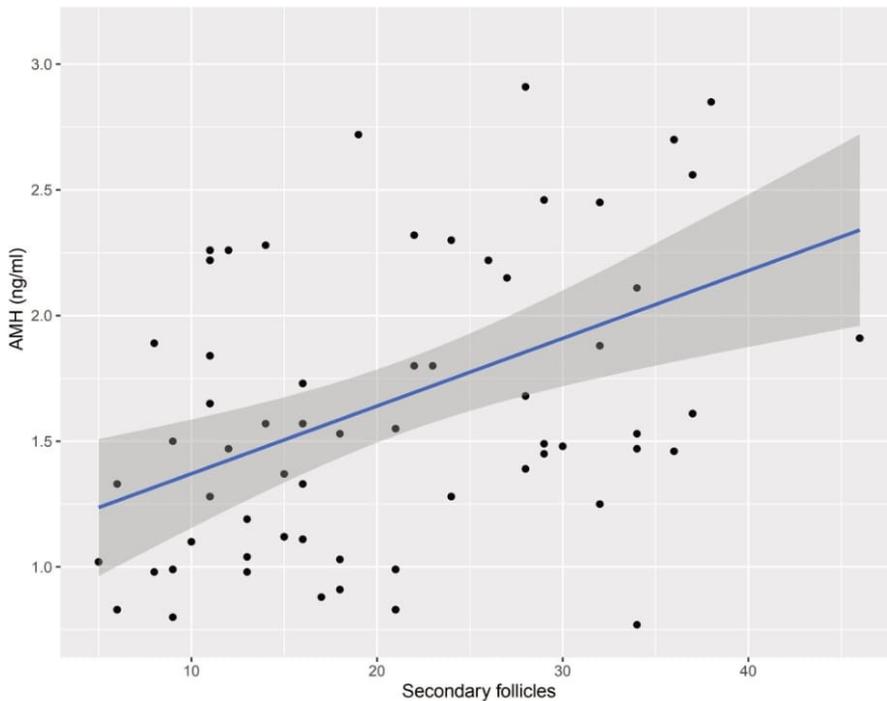


FIGURE 3 Linear regression of serum anti-Müllerian hormone (AMH) concentrations and number of secondary follicles. AMH levels correlated significantly with the number of secondary follicles ($r_s = 0.410$, $p < .001$).

as described in hamsters (Place & Cruickshank, 2009). Though, a statistical average of follicle counts can be expected by using three representative sections from each ovary. A stereological approach using a fractionator, optical disector technique as described in the mouse ovary, might have yielded more precise follicle counts (Myers et al., 2004).

The same human-based AMH CLIA used in the present study has been described in female intact and spayed dogs and cats (Flock et al., 2022; Walter et al., 2019). Median serum AMH concentrations in the intact does (1.53 ng/ml) were about 2.4-fold higher compared to the intact bitches (0.65 ng/ml) and about 5.6-fold lower compared with intact queens (8.46 ng/ml) (Flock et al., 2022; Walter et al., 2019). Whether this represents absolute higher levels of AMH in does and queens or better cross-reactivity of rabbit and feline AMH with the assays murine anti-AMH antibodies remains to be determined. Spayed rabbits had 6-fold higher median AMH concentrations compared with spayed bitches and queens (both <0.01 ng/ml) (Flock et al., 2022; Walter et al., 2019). Interestingly, while in bitches no AMH was left in circulation 1 year after spaying (Walter et al., 2019), in the present study, even after up to 7.2 years after spaying of does, traces of AMH could still be measured. This could be due to another small source of AMH production in the doe or the erroneously detection of a different protein in the assay used. In dogs, anti-mouse antibodies can cause erroneously increased AMH levels (Bergman et al., 2019). The human-based AMH assay used in the present study was validated for rabbits by determination of intra and inter-assay coefficients of variation and by comparison of optical density parallel to the AMH standard curve. While this displayed evidence of parallelism of assay results, direct evidence of AMH measurement was not provided. Further research is needed in rabbits.

As stated in the introduction section, AMH has a wide array of diagnostic applications in veterinary medicine. With the present

study we hope to promote further research regarding these applications in rabbits, for example as a diagnostic tool for ORS, assessment of fertility and gonadal disorders. In rabbits, due to the fragile consistency of the ovaries, risk of incomplete gonadectomy and ORS is present (Harcourt-Brown & Chitty, 2013). It remains to be determined whether AMH can indicate presence of ovarian tissue in cases of ORS in rabbits as described in dogs and cats (Flock et al., 2022; Karakas Alkan et al., 2019; Place et al., 2011; Turna Yilmaz et al., 2015) and whether AMH can be used as a predictor for the response to superovulation as reported in cattle, sheep and mares (Umer et al., 2019), or as a diagnostic tool for granulosa cell tumours, a neoplasia which also infrequently occurs in does (Walter et al., 2010).

5 | CONCLUSION

In conclusion, a single determination of the serum AMH concentration, using a human-based chemiluminescence immunoassay (CLIA), was adequate to distinguish spayed from intact female rabbits, making AMH an excellent marker for presence or absence of the ovaries in the doe. Consequently, the doe's ovaries appear to be the main source of AMH production. In the sexually intact rabbits, whether does were pseudopregnant or not had no influence on measured AMH levels. While the correlation of serum AMH concentrations and the number of primary or antral follicles was not significant, AMH levels correlated significantly with the number of secondary follicles.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Florian Böhmer contributed to acquisition of specimens from intact female rabbits, gynaecological examination, measurement of serum progesterone concentrations and writing of the manuscript;

Katharina Erber contributed to pathohistological examination and follicle counts; Anja Ewringmann contributed to acquisition of blood samples from spayed does; Ruth Klein did the AMH assay; Sven Reese and Christine Böhmer contributed to statistical analysis; Andrea Meyer-Lindenberg and Beate Walter contributed to project guidance and revising of the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial or non-profit sectors. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

CONFLICT OF INTEREST

None of the authors have any conflict of interest to declare.

DATA AVAILABILITY

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Florian Böhmer  <https://orcid.org/0000-0003-2554-1332>

Ruth Klein  <https://orcid.org/0000-0001-9319-3785>

Sven Reese  <https://orcid.org/0000-0002-4605-9791>

Christine Böhmer  <https://orcid.org/0000-0003-1931-0888>

Andrea Meyer-Lindenberg  <https://orcid.org/0000-0001-6137-3773>

Beate Walter  <https://orcid.org/0000-0001-6137-3773>

Beate Walter  <https://orcid.org/0000-0003-3570-6620>

REFERENCES

- Alm, H., & Holst, B. S. (2018). Identifying ovarian tissue in the bitch using anti-Müllerian hormone (AMH) or luteinizing hormone (LH). *Theriogenology*, *106*, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.028>
- Almeida, J., Ball, B. A., Conley, A. J., Place, N. J., Liu, I. K., Scholtz, E. L., Mathewson, L., Stanley, S. D., & Moeller, B. C. (2011). Biological and clinical significance of anti-Müllerian hormone determination in blood serum of the mare. *Theriogenology*, *76*, 1393–1403. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.008>
- Anadol, E., Gultiken, N., Yarim, G. F., Karaca, E., Kanca, H., & Yarim, M. (2020). Investigation of diagnostic use of serum anti-Müllerian hormone concentration in dioestrus and anoestrus bitches before and after ovariohysterectomy and the relationship with ovarian follicle numbers. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *23*, 391–397. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2020.134683>
- Axnér, E., & Ström Holst, B. (2015). Concentrations of anti-Müllerian hormone in the domestic cat. Relation with spay or neuter status and serum estradiol. *Theriogenology*, *83*, 817–821. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.016>
- Bergman, D., Larsson, A., Hansson-Hamlin, H., & Ström Holst, B. (2019). Investigation of interference from canine anti-mouse antibodies in hormone immunoassays. *Veterinary Clinical Pathology*, *48*, 59–69.
- Browning, J. Y., Landis Keyes, P., & Wolf, R. C. (1980). Comparison of serum progesterone, 20 α -Dihydroprogesterone, and Estradiol-17 β in pregnant and Pseudopregnant rabbits: Evidence for Postimplantation recognition of pregnancy. *Biology of Reproduction*, *23*, 1014–1019.
- Brugger, N., Otdzdrorf, C., Walter, B., Hoffmann, B., & Braun, J. (2011). Quantitative determination of progesterone (P4) in canine blood serum using an enzyme-linked fluorescence assay. *Reproduction in Domestic Animals*, *46*, 870–873. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01757.x>
- Cate, R. L., Mattaliano, R. J., Hession, C., Tizard, R., Farber, N. M., Cheung, A., Ninfa, E. G., Frey, A. Z., Gash, D. J., Chow, E. P., Fisher, R. A., Bertonis, J. M., Torres, G., Wallner, B. P., Ramachandran, K. L., Ragin, R. C., Manganaro, T. F., MacLaughlin, D. T., & Donahoe, P. K. (1986). Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*, *45*, 685–698. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90783-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90783-x)
- Claes, A., Ball, B. A., Troedsson, M. H., Curry, T. E., Jr., Squires, E. L., & Scoggin, K. E. (2016). Molecular changes in the equine follicle in relation to variations in antral follicle count and anti-Müllerian hormone concentrations. *Equine Veterinary Journal*, *48*, 741–748. <https://doi.org/10.1111/evj.12514>
- Dal, G. E., & Kasikci, G. (2020). Serum anti-Müllerian hormone levels during Estrus and Diestrus in mares. *Medycyna Weterynaryjna*, *76*, 282–284.
- Durlinger, A. L., Visser, J. A., & Themmen, A. P. (2002). Regulation of ovarian function: The role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction*, *124*, 601–609. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1240601>
- Easson, W. (2001). A review of rabbit and rodent production medicine. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, *10*, 131–139. <https://doi.org/10.1053/saep.2001.24252>
- El-Sheikh Ali, H., Kitahara, G., Nibe, K., Yamaguchi, R., Horii, Y., Zaabel, S., & Osawa, T. (2013). Plasma anti-Müllerian hormone as a biomarker for bovine granulosa-theca cell tumors: Comparison with immunoreactive inhibin and ovarian steroid concentrations. *Theriogenology*, *80*, 940–949. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.022>
- Flock, U., Fischer, S., Weeger, J., Reese, S., & Walter, B. (2022). Anti-Müllerian hormone as a diagnostic tool to identify queens with ovarian remnant syndrome. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *24*, 168–174. <https://doi.org/10.1177/1098612x221099195>
- Flock, U., Reese, S., Leykam, C., Otdzdrorf, C., Klein, R., Meyer-Lindenberg, A., & Walter, B. (2019). Changes in anti-Müllerian hormone concentrations in queens throughout the oestrous cycle. *Theriogenology*, *127*, 114–119.
- Geyer, A., Poth, T., Otdzdrorf, C., Daub, L., Reese, S., Braun, J., & Walter, B. (2016). Histopathologic examination of the genital tract in rabbits treated once or twice with a slow-release deslorelin implant for reversible suppression of ovarian function. *Theriogenology*, *86*, 2281–2289. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.024>
- Harcourt-Brown, F., & Chitty, J. (2013). *BSAVA manual of rabbit surgery, dentistry and imaging*. British Small Animal Veterinary Association.
- Josso, N. (1973). In vitro synthesis of müllerian-inhibiting hormone by seminiferous tubules isolated from the calf fetal testis. *Endocrinology*, *93*, 829–834. <https://doi.org/10.1210/endo-93-4-829>
- Jost, A. (1947). Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. *Archives d'anatomie microscopique et de morphologie expérimentale*, *36*, 271–315.
- Karakas Alkan, K., Ceylan, A., Alkan, H., Ozen, D., Bayraktaroglu, A. G., & Kaymaz, M. (2019). Immunohistochemical and qPCR determination of the expression and serum level of anti-Müllerian hormone in prepubertal, intact and ovarian remnant syndrome detected bitches. *Reproduction in Domestic Animals*, *54*, 979–986.
- La Marca, A., De Leo, V., Giulini, S., Orvieto, R., Malmusi, S., Giannella, L., & Volpe, A. (2005). Anti-Müllerian hormone in premenopausal women and after spontaneous or surgically induced menopause. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, *12*, 545–548. <https://doi.org/10.1016/j.jsig.2005.06.001>
- McNitt, J. I., Lukefahr, S. D., Cheeke, P. R., & Patton, N. M. (2013). *Rabbit production*. Centre for Agriculture and Bioscience International.
- Monniaux, D., Barbey, S., Rico, C., Fabre, S., Gallard, Y., & Larroque, H. (2010). Anti-Müllerian hormone: A predictive marker of embryo

- production in cattle? *Reproduction, Fertility and Development*, 22, 1083–1091. <https://doi.org/10.1071/rd09279>
- Monniaux, D., Drouilhet, L., Rico, C., Estienne, A., Jarrier, P., Touzé, J. L., Sapa, J., Phocas, F., Dupont, J., Dalbiès-Tran, R., & Fabre, S. (2012). Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. *Reproduction, Fertility and Development*, 25, 1–16. <https://doi.org/10.1071/rd12270>
- Myers, M., Britt, K. L., Wreford, N. G. M., Ebling, F. J., & Kerr, J. B. (2004). Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction*, 127, 569–580.
- Norris, D. O., & Lopez, K. H. (2011). *Hormones and reproduction of vertebrates* (Vol. 5). Academic Press.
- Pir Yagci, I., Pekcan, M., Polat, I. M., Kalender, H., & Macun, H. C. (2016). Does serum anti-Müllerian hormone levels always discriminate presence of the ovaries in adult bitches? Comparison of two ELISA kits. *Reproduction in Domestic Animals*, 51, 910–915. <https://doi.org/10.1111/rda.12757>
- Place, N. J., & Cruickshank, J. (2009). Graded response to short photoperiod during development and early adulthood in Siberian hamsters and the effects on reproduction as females age. *Hormones and Behavior*, 55, 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.01.005>
- Place, N. J., Hansen, B. S., Cheraskin, J. L., Cudney, S. E., Flanders, J. A., Newmark, A. D., Barry, B., & Scarlett, J. M. (2011). Measurement of serum anti-Müllerian hormone concentration in female dogs and cats before and after ovariohysterectomy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23, 524–527. <https://doi.org/10.1177/1040638711403428>
- Quesenberry, K., & Carpenter, J. W. (2011). *Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. Elsevier Health Sciences.
- Ramirez, V. D., Ramirez, A. D., Slamet, W., & Nduka, E. (1986). Functional characteristics of the luteinizing hormone-releasing hormone pulse generator in conscious unrestrained female rabbits: Activation by norepinephrine. *Endocrinology*, 118, 2331–2339. <https://doi.org/10.1210/endo-118-6-2331>
- Rico, C., Fabre, S., Médigue, C., di Clemente, N., Clément, F., Bontoux, M., Touzé, J. L., Dupont, M., Briant, E., Rémy, B., Beckers, J. F., & Monniaux, D. (2009). Anti-müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biology of Reproduction*, 80, 50–59. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072157>
- Rubin, H. B., & Azrin, N. H. (1967). Temporal patterns of sexual behavior in rabbits as determined by an automatic recording technique. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 10, 219–231. <https://doi.org/10.1901/jeab.1967.10-219>
- Senger, P. (2012). *Pathways to pregnancy and parturition* (3rd ed.). Current Conceptions, Inc.
- Themmen, A. P. N., Kalra, B., Visser, J. A., Kumar, A., Savjani, G., de Gier, J., & Jaques, S. (2016). The use of anti-Müllerian hormone as diagnostic for gonadectomy status in dogs. *Theriogenology*, 86, 1467–1474. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.004>
- Turna Yilmaz, Ö., Toydemir, T. S., Kirsan, I., Gunay Ucmak, Z., & Caliskan Karacam, E. (2015). Anti-Müllerian hormone as a diagnostic tool for ovarian remnant syndrome in bitches. *Veterinary Research Communications*, 39, 159–162. <https://doi.org/10.1007/s11259-015-9639-0>
- Umer, S., Zhao, S. J., Sammad, A., Weldegebriall Sahlu, B., Yunwei, P., & Zhu, H. (2019). AMH: Could it be used as a biomarker for fertility and superovulation in domestic animals? *Genes (Basel)*, 10, 1009. <https://doi.org/10.3390/genes10121009>
- Van Rooij, I., Broekmans, F., Te Velde, E., Fauser, B., Bancsi, L., De Jong, F., & Themmen, A. (2002). Serum anti-Müllerian hormone levels: A novel measure of ovarian reserve. *Human Reproduction*, 17, 3065–3071.
- Vigier, B., Picard, J. Y., Tran, D., Legeai, L., & Josso, N. (1984). Production of anti-Müllerian hormone: Another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology*, 114, 1315–1320. <https://doi.org/10.1210/endo-114-4-1315>
- Walter, B., Feulner, H., Otzdorff, C., Klein, R., Reese, S., & Meyer-Lindenberg, A. (2019). Changes in anti-Müllerian hormone concentrations in bitches throughout the oestrous cycle. *Theriogenology*, 127, 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.007>
- Walter, B., Poth, T., Bohmer, E., Braun, J., & Matis, U. (2010). Uterine disorders in 59 rabbits. *Veterinary Record*, 166, 230–233. <https://doi.org/10.1136/vr.b4749>
- YoungLai, E. V., Thompson, N., & Foster, W. (1989). Effects of in-vivo administration of GnRH on the release of gonadotrophins in the female rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility*, 85, 325–329. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0850325>

How to cite this article: Böhmer, F., Erber, K., Ewringmann, A., Klein, R., Reese, S., Böhmer, C., Meyer-Lindenberg, A., & Walter, B. (2022). Anti-Müllerian hormone concentrations in female rabbits and its relation to spay status, pseudopregnancy and ovarian follicle numbers. *Reproduction in Domestic Animals*, 00, 1–8. <https://doi.org/10.1111/rda.14240>

IV. Diskussion

AMH konnte sich in den letzten Jahren in der Reproduktionsmedizin bei vielen Tierarten als äußerst nützlich klinisches Diagnostikum etablieren (Walter et al., 2019). In der zugänglichen Literatur gibt es jedoch bisher noch keine Untersuchungen zu den AMH-Konzentrationen im Blutserum weiblicher Kaninchen. Dies ist die erste Studie, in welcher die AMH-Serumkonzentrationen weiblicher Kaninchen mit einem humanmedizinischen CLIA gemessen werden sollten. Darüber hinaus sollten die AMH-Serumspiegel in Zusammenhang mit Kastrationsstatus, Scheinträchtigkeit und der Anzahl ovarieller Follikel gebracht werden.

Mit dem in dieser Studie verwendeten humanmedizinischen CLIA ließen sich die AMH-Serumspiegel weiblicher Kaninchen zuverlässig bestimmen. Der AMH-Assay konnte für die Nutzung beim weiblichen Kaninchen validiert werden. Die niedrigen Werte der Variationskoeffizienten zeigten eine gute Inter- und Intra-Assay Reproduzierbarkeit der AMH-Messungen. Die Ergebnisse der Studie lassen darauf schließen, dass eine einzige Messung der AMH-Serumkonzentrationen hinweisend für das Vorhandensein bzw. Fehlen der Eierstöcke weiblicher Kaninchen ist. Die Ovarien scheinen die Hauptquelle der AMH-Produktion bei weiblichen Kaninchen zu sein. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Studien bei Frauen (La Marca et al., 2005), Hündinnen (Place et al., 2011; Pir Yagci et al., 2016; Themmen et al., 2016; Walter et al., 2019; Anadol et al., 2020) und Katzen (Axnér & Ström Holst, 2015; Flock et al., 2022b). AMH könnte bei weiblichen Kaninchen mit unbekannter Krankengeschichte und somit unbekanntem Kastrationsstatus, wie bei Hunden und Katzen auch, dazu genutzt werden, den Kastrationsstatus zuverlässig und einfach zu bestimmen. Dies ist insbesondere relevant, da zur Vorbeugung von Ovar- bzw. Uterustumoren zunehmend Ovariohysterektomien bei Kaninchen durchgeführt und empfohlen werden (Walter et al., 2010; Quesenberry & Carpenter, 2011; Harcourt-Brown & Chitty, 2013). Insbesondere die Prävention des uterinen Adenokarzinoms spielt beim Kaninchen eine wichtige Rolle, da es die häufigste Neoplasie beim weiblichen Kaninchen darstellt (Ingalls et al., 1964; Harcourt-Brown, 2017; Van Zeeland, 2017; Bertram et al., 2018). Die Inzidenz des uterinen Adenokarzinoms nimmt mit fortschreitendem Alter stetig zu und wird bei Kaninchen älter als 4 und 7 Jahren mit 60 bzw. 75% beschrieben (Greene, 1941). Zwar haben weibliche, intakte Kaninchen eine höhere Wahrscheinlichkeit Neoplasien zu entwickeln als weibliche, kastrierte Kaninchen, jedoch konnte bisher nicht gezeigt werden, dass

eine Kastration in einer höheren Lebenserwartung weiblicher Kaninchen resultiert. Es gilt daher noch zu klären, ob Ovariohysterektomien beim Kaninchen, insbesondere im Hinblick auf den Tierschutz und das Wohl des Tieres, routinemäßig durchgeführt werden sollten (Bertram et al., 2021).

Alle untersuchten weiblichen, kastrierten Kaninchen hatten AMH-Serumspiegel von $\leq 0,07$ ng/ml. Lediglich bei einem Kaninchen wurde ein AMH-Wert von 0,23 ng/ml gemessen. Dieses Kaninchen scheint ein statistischer Ausreißer zu sein, da die AMH-Konzentration etwa 4 Standardabweichungen über dem Mittelwert aller anderen kastrierten Kaninchen lag. Bei einem Cut-off-Wert von 0,50 ng/ml hatte der AMH-Assay eine Sensitivität (Wahrscheinlichkeit der korrekten Identifizierung sexuell intakter Tiere) und Spezifität (Wahrscheinlichkeit der korrekten Identifizierung kastrierter Tiere) von jeweils 100%. Dies ist etwa 8-mal höher als der Cut-off-Wert von 0,06 ng/ml, welcher bei Hündinnen bei Nutzung desselben AMH-Assays beschrieben wurde (Walter et al., 2019). Bei Herabsetzen des Cut-off-Wertes auf 0,15 ng/ml ergab sich eine Sensitivität und Spezifität von 100 bzw. 95,5%. Es wurde kein Versuch unternommen das Fehlen der Eierstöcke bei den vorberichtlich kastrierten Kaninchen anderweitig zu bestätigen. Somit besteht die Möglichkeit, dass vereinzelt Tiere nicht vollständig kastriert waren. Von den Tierbesitzern wurde jedoch bei keinem der Kaninchen von Symptomen berichtet, welche hinweisend auf ein ORS wären.

Etwaige Scheinträchtigkeiten hatten in der vorliegenden Studie keinen signifikanten Einfluss auf die gemessenen AMH-Serumspiegel. Ebenso zeigten Farbveränderung oder Vergrößerung der Vulva keinen signifikanten Einfluss auf die AMH-Konzentrationen. AMH scheint somit ein zuverlässiges Diagnostikum des Kastrationsstatus weiblicher Kaninchen zu sein, unabhängig davon, ob das untersuchte Kaninchen zum Zeitpunkt der Probenentnahme scheinträchtig war (Lutealphase) oder nicht (Follikelphase) und, ob die Vulva farbverändert oder vergrößert war. Auch bei sich in der Lutealphase befindlichen Hündinnen und Katzen war die Bestimmung der AMH-Serumkonzentrationen eine zuverlässige Methode zur Bestimmung des Kastrationsstatus (Axnér & Ström Holst, 2015; Alm & Holst, 2018). Interessanterweise waren eine vermehrte Anbildung der Mamma bzw. Milchproduktion nur bei 33,33 bzw. 25% der Kaninchen in der Lutealphase, und bei 25 bzw. 21,15% der Tiere in der Follikelphase nachweisbar. Eine vermehrt angebildete Mamma bzw. die Produktion von Milchsekret waren daher in der vorliegenden Studie kein zuverlässiger Marker einer Scheinträchtigkeit.

Studienlimitierend war, dass die AMH-Serumkonzentrationen nur einmalig und zu einem zufälligen Zeitpunkt bei den verschiedenen Kaninchen gemessen wurden. Aufgrund möglicher individueller Schwankungen der AMH-Spiegel hätte die Entnahme mehrerer Blutproben bei demselben Tier über den gesamten Reproduktionszyklus hinweg einen besseren Einblick in den AMH-Konzentrationsverlauf weiblicher Kaninchen gegeben. So können signifikante Fluktuationen der AMH-Spiegel im Verlauf eines Zyklus die Zuverlässigkeit einer einzelnen Messung verringern und die klinische Interpretation der gemessenen AMH-Werte beeinträchtigen (Walter et al., 2019). Eine weitere Studienlimitation war, dass das Alter der intakten Kaninchen keine große Varianz aufwies, und alle Tiere ähnlich jung waren. Im Gegensatz dazu waren bei den untersuchten kastrierten Tieren weitaus mehr Altersklassen vertreten. Weitere Untersuchungen bei intakten Kaninchen unterschiedlichen Alters, insbesondere bei älteren Tieren, wären hierfür erforderlich. Eine weitere Einschränkung der Studie war, dass sich die Mehrheit der Kaninchen in der Follikelphase befand. Mehr Kaninchen in der Lutealphase hätte die Verteilung der Tiere in die zwei verschiedenen festgelegten Reproduktionszyklen ausgeglichener gemacht. Der bei Hündinnen (Walter et al., 2019) und Kühen (Brugger et al., 2011) beschriebene Anstieg der AMH-Serumkonzentrationen während der Follikelphase konnte bei den untersuchten Kaninchen nicht beobachtet werden. Bei diesem Vergleich gilt es jedoch zu beachten, dass das Kaninchen, anders als die Hündin und die Kuh, keinen spontanen Eisprung besitzt und nur nach erfolgter Induktion ovuliert. Bei Katzen wurden interessanterweise signifikant höhere AMH-Serumspiegel bei anöstrischen Tieren im Vergleich zu im Östrus befindlichen Tieren beschrieben ($P < 0,001$) (Flock et al., 2022a). Da in dieser Studie keine Kaninchen trächtig waren, kann keine Aussage dazu gemacht werden, ob eine Gravidität die AMH-Spiegel bei Kaninchen beeinflusst. Bei Pferden (Almeida et al., 2011) und Katzen (Flock et al., 2022a) war dies nicht der Fall.

Die Korrelation kleiner wachsender Follikel mit den AMH-Serumkonzentrationen wie sie bei Kühen (Monniaux et al., 2012), Stuten (Claes et al., 2016), Hündinnen (Anadol et al., 2020) und weiblichen Hamstern (Place & Cruickshank, 2009) beschrieben wurde, konnte in der vorliegenden Studie teilweise beobachtet werden. Während die Anzahl der Sekundärfollikel signifikant mit AMH korrelierte, war dies bei Primär- und Tertiärfollikeln (Antralfollikel) nicht der Fall. In einer Studie an diöstrischen Hündinnen war die Korrelation der AMH-Serumspiegel mit der Anzahl der Sekundärfollikel ebenfalls signifikant ($r = 0,942$, $P < 0,01$). Gegenteilig verhielt es sich bei den

Antralfollikeln. Hier korrelierte deren Anzahl sogar negativ mit den AMH-Konzentrationen ($r = -0,765$, $P < 0,05$) (Anadol et al., 2020). Auch bei Hamstern konnte eine signifikante Korrelation der AMH-Serumspiegel mit der Anzahl präantraler Follikel ($r^2 = 0,41$, $P = 0,0004$) beobachtet werden (Place & Cruickshank, 2009). Ob Sekundärfollikel somit die Hauptquelle der AMH-Produktion des Kaninchens bilden, muss in weiterführenden Studien geklärt werden, beispielsweise durch Auswertung der immunhistochemischen Reaktion der Ovarialfollikel auf AMH, wie es bereits bei bovinen Eierstöcken beschrieben und untersucht worden ist (Vigier et al., 1984). Bei Rindern, Schafen und Ziegen sind die AMH-Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit kleiner Antralfollikel am größten und nehmen bei präovulatorischen Follikeln deutlich ab (Monniaux et al., 2012). Da jeweils nur drei histologische Schnittebenen der Ovarien ausgewertet wurden, ist es möglich, dass Follikel vereinzelt nicht angeschnitten wurden und somit bei der histologischen Auszählung nicht berücksichtigt werden konnten. Akkuratere Follikelzahlen wären womöglich durch Auswertung eines jeden zehnten Schnittes, bei 6 μm Schnittdicke, wie bei Hamstern beschrieben (Place & Cruickshank, 2009), möglich gewesen. Bei drei repräsentativen Schnitten eines jeden Eierstockes kann jedoch von einem statistisch aussagekräftigen Durchschnitt der Follikelzahlen ausgegangen werden. Eine stereologische Zählmethode, unter Verwendung eines Fraktionators und einer optischen Dissektortechnik, wie für den Eierstock der Maus beschrieben (Myers et al., 2004), hätte möglicherweise auch in genaueren Follikelzahlen resultiert. Eine weitere Möglichkeit der Follikelzählung ist die dreidimensionale Mikro-Computertomographie der Ovarien. Eine solche Technik wurde bereits erfolgreich für die Ovarien adulter Mäuse beschrieben, wobei jedoch keine Primordial- oder Primärfollikel ausgewertet werden konnten. Sekundär-, Antralfollikel und Corpora lutea waren jedoch gut quantifizierbar (Fiorentino et al., 2020).

Das in dieser Studie verwendete humanmedizinische AMH-CLIA wurde bereits für Blutserumproben von intakten und kastrierten Hündinnen (Walter et al., 2019) bzw. Katzen (Flock et al., 2022b) verwendet. Die mediane AMH-Serumkonzentration der intakten Kaninchen der vorliegenden Studie war mit 1,53 ng/ml ca. 2,4-fach höher als bei den intakten Hündinnen (0,65 ng/ml) (Walter et al., 2019), und etwa 5,6-fach niedriger im Vergleich zu den intakten Katzen (8,46 ng/ml) (Flock et al., 2022b). Ob dies auf absolut höhere AMH-Serumspiegel bei weiblichen Kaninchen bzw. Katzen zurückzuführen ist, oder auf eine bessere Kreuzreaktivität von Kaninchen- bzw. Katzen-AMH mit den murinen Anti-AMH-Antikörpern des Assays beruht, gilt es noch zu

klären. Die kastrierten Kaninchen dieser Studie wiesen im Vergleich zu den medianen AMH-Serumspiegeln der kastrierten Hündinnen (Walter et al., 2019) bzw. Katzen (beide $< 0,01$ ng/ml) (Flock et al., 2022b) eine 6-fach höhere mediane AMH-Serumkonzentration auf. Während bei den Hündinnen ein Jahr nach Kastration kein AMH mehr im Blutkreislauf nachweisbar war (Walter et al., 2019), wurden bei den kastrierten Kaninchen der vorliegenden Studie sogar bis zu 7,2 Jahre nach erfolgter Kastration noch Spuren von AMH gemessen. Dies könnte auf eine zusätzliche, jedoch weitaus kleinere Quelle der AMH-Produktion beim Kaninchen zurückzuführen sein, oder aber womöglich in einem irrtümlichen Nachweis eines anderen, noch unbekanntes Proteins begründet sein. Bei Hunden sind beispielsweise Anti-Maus-Antikörper eine Quelle fehlerhafter AMH-Messungen, da sie falsch hohe AMH-Werte verursachen können (Bergman et al., 2019). Der in der vorliegenden Studie verwendete AMH-Assay wurde für Kaninchen validiert, indem die Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten bestimmt und die optische Dichte mit der AMH-Standardkurve des Assays verglichen wurden. Damit konnte zwar die Parallelität der Assay-Ergebnisse gezeigt werden, ein direkter Beweis einer tatsächlichen Messung der AMH-Serumkonzentrationen konnte jedoch nicht geliefert werden. Weitere Untersuchungen in diese Richtung sind beim weiblichen Kaninchen erforderlich.

Wie einleitend beschrieben, wird AMH in der Veterinärmedizin für eine Vielzahl diagnostischer Fragestellungen verwendet. Während Nutztiere wie Rinder, Ziegen und Schafe im Forschungsmittelpunkt stehen, gibt es auch eine Reihe von Untersuchungen zu AMH bei Haustieren wie Pferden, Hunden und Katzen. Da Kaninchen sowohl als Nutz- als auch als Haustiere einen hohen Stellenwert genießen, sind Kenntnisse über die AMH-Serumkonzentrationen bei dieser Tierart durchaus von Interesse. Mit dieser Arbeit soll der Grundstein für weitere Forschung bezüglich dieser Anwendungen beim Kaninchen gelegt werden. Beispielsweise bei Verdachtsfällen von ORS, Tumoren der Gonaden und/oder zur Beurteilung der Fruchtbarkeit.

Obwohl Ovariectomien und Ovariohysterektomien zu den Routineeingriffen der tierärztlichen Praxis gehören, und die Ovarien nach Entnahme immer auf Vollständigkeit überprüft werden sollten, kommt eine unvollständige Entnahme der Eierstöcke trotz allem vor (Günzel-Apel et al., 2012). Auch bei weiblichen, kastrierten Kaninchen ist das Krankheitsbild des ORS beschrieben (Fecteau et al., 2007). Aufgrund der brüchigen Konsistenz der Eierstöcke geschlechtsreifer Kaninchen, besteht das Risiko einer unvollständigen Ovariectomie. Zurückgebliebenes Eierstockgewebe kann

an intraabdominalen Oberflächen anhaften und nach Revaskularisierung wieder endokrin aktiv werden (Harcourt-Brown & Chitty, 2013). Der Verdacht auf ORS wird üblicherweise bei vorberichtlich kastrierten Kaninchen gestellt, welche trotz erfolgter Kastration Hypersexualität, Aggression oder anhaltendes Brunstverhalten zeigen (Harcourt-Brown & Chitty, 2013). Hypersexualität und Aggression sind auch Symptome von an Hyperadrenokortizismus erkrankten weiblichen, kastrierten Kaninchen. Zur Unterscheidung von ORS und Hyperadrenokortizismus findet beim Kaninchen der hCG- (humane Choriongonadotropin) Stimulationstest Anwendung. Das hCG ist dem LH in seiner Funktion sehr ähnlich und begünstigt die Gelbkörperentwicklung und die daraus folgende Sekretion von Progesteron. Beim hCG-Stimulationstest wird zuerst Blut zur Bestimmung der basalen Progesteron-Konzentration gewonnen. Daraufhin werden dem Kaninchen 50 I.E. hCG intravenös verabreicht. Vier Tage nach hCG-Applikation wird eine zweite Blutprobe gewonnen und die Progesteron-Konzentration wiederholt gemessen. Eine signifikante Erhöhung der Progesteron-Konzentration ist hinweisend auf ORS (Kaufmann et al., 1992; Meredith & Lord, 2014). AMH als Marker des Ovarrest-Syndroms wurde für das Kaninchen in der zugänglichen Literatur bisher nicht beschrieben. Im Vergleich zum hCG-Stimulationstest könnte AMH jedoch mit nur einer einzigen Hormonmessung und ohne intravenöse Medikamentengabe diagnostisch sein. Es gilt in weiteren Studien zu untersuchen, ob AMH bei Kaninchen das Vorhandensein von verbliebenem Ovargewebe in Fällen von ORS anzeigen kann, wie dies bei Hunden und Katzen bereits beobachtet werden konnte (Place et al., 2011; Turna Yilmaz et al., 2015; Karakas Alkan et al., 2019).

Beim Kaninchen sind Neoplasien der Ovarien beschrieben, die Inzidenz scheint jedoch niedrig zu sein (Greene & Strauss, 1949; Saito et al., 2002; Walter et al., 2010; Bertram et al., 2017; Bertram et al., 2018). Die histopathologisch diagnostizierten Tumorarten beschränken sich auf Granulosazell- und epitheliale Tumore (Walter et al., 2010). In einer Studie von Walter et al. (2010) hatten, über einen Zeitraum von 6 Jahren, von 59 Kaninchen mit Erkrankungen des Reproduktionstraktes, vier Ovarialtumoren. Drei (5,1%) davon entfielen auf Granulosazelltumoren und eins (1,7%) auf ein Adenokarzinom. Neoplasien der Hoden, wie beispielsweise Sertolizelltumore, Seminome, interstitielle Zelltumore oder Teratome sind beim Kaninchen auch eher die Ausnahme (Cruise & Brewer, 1994; Ness, 1998). In der Literatur existiert ein Fallbericht über ein 6 Jahre altes Kaninchen mit unilateralem Sertolizelltumor. Nach

Orchiektomie des neoplastisch entarteten Hodens wurde dieser immunhistochemisch auf AMH untersucht. Die neoplastisch entarteten Sertolizellen stellten sich als diffus positiv für AMH dar (Banco et al., 2018). Ein Zusammenhang der AMH-Konzentrationen im Blutserum und neoplastischen Erkrankungen der Gonaden wurde beim Kaninchen in der zugänglichen Literatur bisher nicht beschrieben.

Darüber hinaus ist bei Kühen, Schafen und Stuten AMH als ein guter Prädiktor der Antwort auf Superovulation beschrieben (Umer et al., 2019). Auch beim Kaninchen finden Superovulationen und Embryonentransfers Anwendung (McNitt et al., 2013). Der erste erfolgreiche Embryotransfer überhaupt wurde im Jahr 1890 bei einem Kaninchen durchgeführt (Senger, 2012). Insbesondere bei für die Fleisch- bzw. Wollproduktion wertvollen Zuchttieren, werden die Embryonen genetisch vorteilhaften Spendertieren entnommen und in Empfängertiere verpflanzt (McNitt et al., 2013). Ein Zusammenhang zwischen der AMH-Konzentration und der Ansprechbarkeit auf Superovulationen wurde beim Kaninchen bisher nicht beschrieben.

V. Zusammenfassung

Das Anti-Müller-Hormon (AMH) wird fast ausschließlich in den Gonaden sezerniert und kann daher als Marker des Kastrationsstatus verwendet werden. Zu den AMH-Serumkonzentrationen weiblicher Kaninchen gibt es in der zugänglichen Literatur bisher noch keine Untersuchungen. Kenntnisse über die physiologischen AMH-Serumspiegel und mögliche zyklusabhängige Veränderungen der AMH-Konzentrationen sind erforderlich, um AMH bei der zu untersuchenden Spezies als diagnostisches Mittel nutzen zu können. Ziele dieser Studie waren die Bestimmung der AMH-Serumkonzentrationen bei weiblichen Kaninchen, und die Untersuchung von AMH als Diagnostikum zur Unterscheidung von kastrierten und sexuell intakten Individuen. Darüber hinaus sollten der Zusammenhang zwischen den gemessenen AMH-Serumspiegeln und Scheinträchtigkeiten sowie der Anzahl an Ovarialfollikel untersucht werden.

Für die Messung der AMH-Konzentrationen wurden Serumproben von sexuell intakten ($n = 64$) und kastrierten ($n = 22$), weiblichen Kaninchen gewonnen. Die kastrierten Tiere waren Vertreter unterschiedlicher Rassen und von unterschiedlichem Alter (1,6 - 12,1 Jahre). Bei den intakten Kaninchen handelte es sich um Zika-Hybrid-Kaninchen ähnlichen Alters (5,7 - 8,8 Monate). Die AMH-Messung wurde bei den intakten Kaninchen durch eine Bestimmung des Progesteron-Spiegels, eine gynäkologische Untersuchung und eine histopathologische Untersuchung der Gebärmutter bzw. der Eierstöcke ergänzt. Außerdem wurden die Follikel beider Ovarien klassifiziert und quantifiziert. Die AMH- bzw. Progesteron-Serumkonzentrationen wurden mit einem humanmedizinischen Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) bzw. einem Enzyme-linked-Fluorescence-Assay (ELFA) gemessen. Abhängig von der jeweils gemessenen Progesteron-Konzentration wurden die sexuell intakten Tiere als scheinträchtig (Lutealphase; $n = 12$) bzw. nicht scheinträchtig (Follikelphase; $n = 52$) klassifiziert. Die mittleren AMH-Serumkonzentrationen der intakten und kastrierten Tiere betragen 1,53 ng/ml (0,77 - 3,36 ng/ml) bzw. 0,06 ng/ml ($\leq 0,01$ - 0,23 ng/ml). Die AMH-Serumspiegel der intakten und kastrierten Kaninchen unterschieden sich signifikant und überschneiden sich nicht ($P < 0,001$). Bei einem Cut-off-Wert von 0,50 ng/ml ergab sich mittels ROC-Kurvenanalyse für den Assay eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100%. Follikel- oder Lutealphase hatten keinen signifikanten Einfluss auf die gemessenen AMH-Serumkonzentrationen ($t = 0,061$, $df = 62$, $P = 0,951$). Während die

Anzahl der Sekundärfollikel signifikant mit den AMH-Serumspiegeln korrelierte ($r_s = 0,410$, $p = 0,001$), war dies bei den Primär- und Antralfollikeln nicht der Fall ($r_s = 0,241$, $P = 0,055$ bzw. $r_s = 0,137$, $P = 0,281$).

Eine einzige Bestimmung der AMH-Serumkonzentration mit einem humanmedizinischen Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) war ausreichend, um kastrierte, weibliche Kaninchen von intakten, weiblichen Kaninchen, unabhängig von der Zyklusphase, zu unterscheiden. Die Eierstöcke des Kaninchens scheinen, wie bei der Frau, der Hündin und der Katze, die Hauptquelle der AMH-Produktion zu sein. Der bei anderen Spezies beschriebene Zusammenhang zwischen kleinen, wachsenden Follikeln und den AMH-Serumkonzentrationen konnte teilweise bestätigt werden, da die Anzahl sekundärer Follikel signifikant mit den AMH-Spiegeln korrelierte.

VI. Summary

Anti-Müllerian hormone (AMH) is secreted almost exclusively in the male and female gonads. AMH can therefore be used as a diagnostic tool for the determination of the castration status. In the available literature, no research on serum AMH concentrations in female rabbits has been published so far. In the species of interest, knowledge about normal reference intervals and possible cycle-associated changes of serum AMH concentrations are required for its application in a clinical setting. The objectives of the present study were to measure serum AMH concentrations in female rabbits and to investigate the value of AMH as a diagnostic tool to differentiate between spayed and intact does. Furthermore, measured serum AMH concentrations were related to pseudopregnancy and ovarian follicle numbers.

For AMH measurement, serum samples were obtained from sexually intact ($n = 64$) and spayed ($n = 22$) female rabbits. Spayed does were of various breeds and ages (range 1.6 - 12.1 years); intact rabbits were Zika hybrid rabbits of similar ages (range 5.7 - 8.8 months). In the intact does, AMH measurement was complemented by determination of progesterone levels, gynaecological examination, and histopathologic evaluation of the uterus and ovaries, including follicle counts. Serum AMH and progesterone concentrations were measured using a human-based chemiluminescence immunoassay (CLIA) and an enzyme-linked fluorescence assay (ELFA), respectively. Depending on progesterone levels, sexually intact does were categorized as pseudopregnant (luteal phase, $n = 12$) or non-pseudopregnant (follicular phase, $n = 52$). Median serum AMH levels of intact and spayed does were 1.53 ng/ml (range 0.77 - 3.36 ng/ml) and 0.06 ng/ml (range ≤ 0.01 - 0.23 ng/ml), respectively. AMH concentrations between the intact and spayed rabbits differed significantly and did not overlap ($p < 0.001$). ROC curve analysis yielded a 100% sensitivity and specificity for the AMH assay at a cut-off level of 0.50 ng/ml. Whether does were in follicular or luteal phase had no significant influence on the measured serum AMH concentrations ($t = 0.061$, $df = 62$, $p = 0.951$). While the number of secondary follicles correlated significantly with AMH concentrations ($r_s = 0.410$, $p = 0.001$), the number of primary or antral follicles did not ($r_s = 0.241$, $p = 0.055$ and $r_s = 0.137$, $p = 0.281$, respectively).

In conclusion, a single determination of serum AMH concentrations was adequate to distinguish spayed from intact female rabbits, regardless of luteal or follicle phase. As

in women, bitches and queens, the does ovaries appeared to be the main source of AMH production. The relationship between small growing follicles and AMH levels as described in other species could be partly confirmed, as secondary follicles correlated significantly with AMH.

VII. Literaturverzeichnis

Abdel-Ghaffar A, Agag M

Relation between vulva color and reproductive performance in rabbits using AI technique.

Mediterranean Agronomic Institute of Zaragoza. 1994: 299-303

Alm H, Holst BS

Identifying ovarian tissue in the bitch using anti-Müllerian hormone (AMH) or luteinizing hormone (LH).

Theriogenology. 2018; 106: 15-20

Almeida J, Ball BA, Conley AJ, Place NJ, Liu IK, Scholtz EL, Mathewson L, Stanley SD, Moeller BC

Biological and clinical significance of anti-Müllerian hormone determination in blood serum of the mare.

Theriogenology. 2011; 76 (8): 1393-1403

Almeida J, Conley AJ, Ball B

Expression of anti-Müllerian hormone, CDKN1B, connexin 43, androgen receptor and steroidogenic enzymes in the equine cryptorchid testis.

Equine Veterinary Journal. 2013; 45 (5): 538-545

Anadol E, Gultiken N, Yarim GF, Karaca E, Kanca H, Yarim M

Investigation of diagnostic use of serum anti-Müllerian hormone concentration in dioestrus and anoestrus bitches before and after ovariohysterectomy and the relationship with ovarian follicle numbers.

Polish Journal of Veterinary Sciences. 2020; 23 (3): 391-397

Ano H, Hidaka Y, Katamoto H

Evaluation of anti-Müllerian hormone in a dog with a Sertoli cell tumour.

Veterinary Dermatology. 2014; 25 (2): 141-145

Arrington LR, Kelley KC

Domestic rabbit biology and production.

University Presses of Florida, 1976: 53-57.

Axnér E, Ström Holst B

Concentrations of anti-Müllerian hormone in the domestic cat. Relation with spay or neuter status and serum estradiol.

Theriogenology. 2015; 83 (5): 817-821

Ayala Guanga L, Astiz S, Dutan Sanango J, Samaniego JX, López Cabrera RX, Perea F, Hernandez-Fonseca HJ, Pesántez Pacheco JL

Relationship between the concentration of anti-Müllerian hormone and antral follicle count in pasture-managed Holstein cows in the high tropics.

Journal of Dairy Research. 2022: 1-5

Baker ML, Metcalfe SA, Hutson JM

Serum levels of mullerian inhibiting substance in boys from birth to 18 years, as determined by enzyme immunoassay.

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1990; 70 (1): 11-15

Bakker J, Baum MJ

Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators.

Frontiers in Neuroendocrinology. 2000; 21 (3): 220-262

Ball BA, Almeida J, Conley AJ

Determination of serum anti-Müllerian hormone concentrations for the diagnosis of granulosa-cell tumours in mares.

Equine Veterinary Journal. 2013; 45 (2): 199-203

Ball BA, El-Sheikh Ali H, Scoggin KE, Riddle WT, Schnobrich M, Bradekamp E, Agnew M, Squires EL, Troedsson MHT

Relationship between anti-Mullerian hormone and fertility in the mare.

Theriogenology. 2019; 125: 335-341

Ball RL, Birchard SJ, May LR, Threlfall WR, Young GS

Ovarian remnant syndrome in dogs and cats: 21 cases (2000-2007).

Journal of the American Veterinary Medical Association. 2010; 236 (5): 548-553

Banco B, Binanti D, Penna V, Grieco V

Sertoli cell tumour in a pet rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): histological and immunohistochemical characterization.

Open Veterinary Journal. 2018; 8 (3): 250-255

Barberini F, Correr S, De Santis F, Motta PM

The epithelium of the rabbit vagina: a microtopographical study by light, transmission and scanning electron microscopy.

Archives of Histology and Cytology. 1991; 54 (4): 365-378

Bargmann W, Cohrs P, Jaffe R

Pathologie der Laboratoriumstiere.

Springer Verlag, 2013: 410-415.

Barone R, Pavaux C, Blin P, Cuq P

Atlas of rabbit anatomy.

Masson & Cie, Paris, 1973: 89-92.

Battaglini M, Constantini F, Baldissera C, Castrovilli C

Induction of ovulation and artificial insemination in the rabbit.

Coniglicoltura. 1982; 19: 45-54

Bedenk J, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I

The role of anti-Mullerian hormone (AMH) in ovarian disease and infertility.

Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2020; 37 (1): 89-100

Bergman D, Larsson A, Hansson-Hamlin H, Ström Holst B

Investigation of interference from canine anti-mouse antibodies in hormone immunoassays.

Veterinary Clinical Pathology. 2019; 48: 59-69

Bertram C, Müller K, Klopfleisch R

Genital tract pathology in female pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): a retrospective study of 854 necropsy examinations and 152 biopsy samples.

Journal of Comparative Pathology. 2018; 164: 17-26

Bertram CA, Klopfleisch R, Mueller K

Ovarian lesions in 44 rabbits (*Oryctolagus cuniculus*).

Journal of Veterinary Medical Science. 2017: 170358

Bertram CA, Bertram B, Bartel A, Ewringmann A, Fragoso-Garcia MA, Erickson NA, Müller K, Klopfleisch R

Neoplasia and tumor-like lesions in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): a retrospective analysis of cases between 1995 and 2019.

Veterinary Pathology. 2021; 58 (5): 901-911

Bhide P, Homburg R

Anti-Müllerian hormone and polycystic ovary syndrome.

Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. 2016; 37: 38-45

Boiti C

Underlying physiological mechanisms controlling the reproductive axis of rabbit does.

8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico, 2004: 186-206.

Broekmans FJ, Visser JA, Laven JS, Broer SL, Themmen AP, Fauser BC

Anti-Müllerian hormone and ovarian dysfunction.

Trends in Endocrinology & Metabolism. 2008; 19 (9): 340-347

Broer SL, Broekmans FJ, Laven JS, Fauser BC

Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications.

Human Reproduction. 2014; 20 (5): 688-701

Brower LK, Anderson E

Cytological Events Associated with the Secretory Process in the Rabbit Oviduct.

Biology of Reproduction. 1969; 1 (2): 130-148

Brower M

Practitioner's guide to pocket pet and rabbit theriogenology.

Theriogenology. 2006; 66 (3): 618-623

Browning JY, Landis Keyes P, Wolf RC

Comparison of Serum Progesterone, 20 α -Dihydroprogesterone, and Estradiol-17 β in Pregnant and Pseudopregnant Rabbits: Evidence for Postimplantation Recognition of Pregnancy.

Biology of Reproduction. 1980; 23 (5): 1014-1019

Brugger N, Otdorff C, Walter B, Hoffmann B, Braun J

Quantitative determination of progesterone (P4) in canine blood serum using an enzyme-linked fluorescence assay.

Reproduction in Domestic Animals. 2011; 46 (5): 870-873

Buijtel JJ, Beijerink NJ, Kooistra HS, Dieleman SJ, Okkens AC

Effects of gonadotrophin releasing hormone administration on the pituitary-ovarian axis in anoestrous vs ovariectomized bitches.

Reproduction in Domestic Animals. 2006; 41 (6): 555-561

Caillol M, Dauphin-Villemant C, Martinet L

Oestrous behaviour and circulating progesterone and oestrogen levels during pseudopregnancy in the domestic rabbit.

Journal of Reproduction and Development. 1983; 69 (1): 179-186

Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP, et al.

Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells.

Cell. 1986; 45 (5): 685-698

Chen S, Yang B, Fan J

Diagnostic value of Anti-Müllerian hormone in ovarian granulosa cell tumor: A meta-analysis.

European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2020; 253: 266-272

Chong YH, Campbell AJ, Farrand S, McLennan IS

Anti-Müllerian hormone level in older women: detection of granulosa cell tumor recurrence.

International Journal of Gynecological Cancer. 2012; 22 (9): 1497-1499

Claes A, Ball BA, Almeida J, Corbin CJ, Conley AJ

Serum anti-Müllerian hormone concentrations in stallions: developmental changes, seasonal variation, and differences between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings.

Theriogenology. 2013; 79 (9): 1229-1235

Claes A, Ball BA, Troedsson MH, Curry TE, Jr., Squires EL, Scoggin KE

Molecular changes in the equine follicle in relation to variations in antral follicle count and anti-Müllerian hormone concentrations.

Equine Veterinary Journal. 2016; 48 (6): 741-748

Cruise L, Brewer N

The biology of the laboratory rabbit.

Academic Press. 1994: 57-70

Dafopoulos A, Dafopoulos K, Georgoulas P, Galazios G, Limberis V, Tsikouras P, Koutlaki N, Maroulis G

Smoking and AMH levels in women with normal reproductive history.

Archives of gynecology and obstetrics. 2010; 282 (2): 215-219

Dal GE, Kasikci G

Serum anti-Müllerian hormone levels during estrus and diestrus in mares.

Medycyna Weterynaryjna. 2020; 76 (5): 282-284

de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC

Anti-Müllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging.

Fertility and sterility. 2002; 77 (2): 357-362

Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, Griesinger G, Kelsey TW, La Marca A, Lambalk C

The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women.

Human Reproduction. 2014; 20 (3): 370-385

Domain G, Buczkowska J, Kalak P, Wydooghe E, Banchi P, Pascottini OB, Nizański W, Van Soom A

Serum Anti-Müllerian Hormone: A Potential Semen Quality Biomarker in Stud Dogs?

Animals (Basel). 2022; 12 (3): 323

Donahoe PK, Ito Y, Price JM, Hendren WH

Müllerian Inhibiting Substance Activity in Bovine Fetal, Newborn and Prepubertal Testes.

Biology of Reproduction. 1977; 16 (2): 238-243

Dorn FK, März G

Rassekaninchenzucht - Ein Handbuch für den Kaninchenhalter und Züchter.

Neumann, 1981: 78-79, 152-233.

Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA,

Themmen AP

Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary.

Endocrinology. 1999; 140 (12): 5789-5796

Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP

Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone.

Reproduction. 2002a; 124 (5): 601-609

Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP

Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary.

Endocrinology. 2002b; 143 (3): 1076-1084

Easson W

A review of rabbit and rodent production medicine.

Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine. 2001; 10 (3): 131-139

El-Sheikh Ali H, Kitahara G, Nibe K, Yamaguchi R, Horii Y, Zaabel S, Osawa T

Plasma anti-Müllerian hormone as a biomarker for bovine granulosa-theca cell tumors: comparison with immunoreactive inhibin and ovarian steroid concentrations.

Theriogenology. 2013; 80 (8): 940-949

Ellenberger W, Baum H

Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere.

Springer-Verlag, 2013: 549-558.

Engvall E, Perlmann P

Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA: III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.

The Journal of Immunology. 1972; 109 (1): 129-135

Ewringmann A

Leitsymptome beim Kaninchen: Diagnostischer Leitfaden und Therapie.

Enke Verlag, Stuttgart, 2016: 5-6.

Fecteau KA, Deeb BJ, Rickel JM, Kelch WJ, Oliver JW

Diagnostic endocrinology: blood steroid concentrations in neutered male and female rabbits.

Journal of Exotic Pet Medicine. 2007; 16 (4): 256-259

Feldman E, Nelson R

Infertility, associated breeding disorders, and disorders of sexual development.

Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. 2004; 3: 893-898

Finkelstein JS, Lee H, Karlamangla A, Neer RM, Sluss PM, Burnett-Bowie SM, Darakananda K, Donahoe PK, Harlow SD, Prizand SH, Joffe H, Kumar A, Martin DE, McConnell D, Merrilat S, Morrison A, Pastore LM, Randolph JF, Greendale GA, Santoro N

Antimüllerian Hormone and Impending Menopause in Late Reproductive Age: The Study of Women's Health Across the Nation.

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2020; 105 (4): 1862-1871

Fiorentino G, Parrilli A, Garagna S, Zuccotti M

Three-dimensional micro-computed tomography of the adult mouse Ovary.

Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2020: 1150

Flecknell PA

BSAVA manual of rabbit medicine and surgery.

British Small Animal Veterinary Association, 2000: 49, 51-54.

Fleming R, Fairbairn C, Blaney C, Lucas D, Gaudoin M

Stability of AMH measurement in blood and avoidance of proteolytic changes.

Reproductive BioMedicine Online. 2013; 26 (2): 130-132

Flock U, Reese S, Otdorff C, Klein R, Walter B

Anti-Müllerian hormone concentrations in queens throughout the oestrous cycle.

Domestic Animal Endocrinology. 2022a; 81: 106749

Flock U, Fischer S, Weeger J, Reese S, Walter B

Anti-Müllerian hormone as a diagnostic tool to identify queens with ovarian remnant syndrome.

Journal of Feline Medicine and Surgery. 2022b; 24 (8): 168-174

Freeman EW, Gracia CR, Sammel MD, Lin H, Lim LC-L, Strauss III JF

Association of anti-mullerian hormone levels with obesity in late reproductive-age women.

Fertility and sterility. 2007; 87 (1): 101-106

Freeman EW, Sammel MD, Lin H, Gracia CR

Anti-mullerian hormone as a predictor of time to menopause in late reproductive age women.

The Journal of Clinical Endocrinology. 2012; 97 (5): 1673-1680

Freire AV, Grinspon RP, Rey RA

Importance of serum testicular protein hormone measurement in the assessment of disorders of sex development.

Sexual Development. 2018; 12 (1-3): 30-40

Freour T, Masson D, Dessolle L, Allaoua D, Dejoie T, Mirallie S, Jean M, Barriere P

Ovarian reserve and in vitro fertilization cycles outcome according to women smoking status and stimulation regimen.

Archives of gynecology and obstetrics. 2012; 285 (4): 1177-1182

Gao Q, Womack JE

A genetic map of bovine chromosome 7 with an interspecific hybrid backcross panel.

Mammalian genome. 1997; 8 (4): 258-261

Gharagozlou F, Youssefi R, Akbarinejad V, Mohammadkhani NI, Shahpoorzadeh T

Anti-Mullerian hormone: a potential biomarker for differential diagnosis of cryptorchidism in dogs.

Veterinary Record. 2014; 175 (18): 460

Gobbetti A, Boiti C, Canali C, Zerani M

Nitric oxide synthase acutely regulates progesterone production by in vitro cultured rabbit corpora lutea.

Journal of Endocrinology. 1999; 160 (2): 275-284

Göbel T, Ewringmann A

Heimtierkrankheiten: Kleinsäuger, Amphibien, Reptilien.

UTB GmbH, 2005: 54-57.

Goldman KN, Chenette D, Arju R, Duncan FE, Keefe DL, Grifo JA, Schneider RJ

mTORC1/2 inhibition preserves ovarian function and fertility during genotoxic chemotherapy.

Proceedings of the National Academy of Sciences. 2017; 114 (12): 3186-3191

Gracia CR, Shin SS, Prewitt M, Chamberlin JS, Lofaro LR, Jones KL, Clendenin M, Manzanera KE, Broyles DL

Multi-center clinical evaluation of the Access AMH assay to determine AMH levels in reproductive age women during normal menstrual cycles.

Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2018; 35 (5): 777-783

Greene HS

Uterine adenomata in the rabbit: III. Susceptibility as a function of constitutional factors.

The Journal of Experimental Medicine. 1941; 73 (2): 273-292

Greene HS, Strauss JS

Multiple primary tumors in the rabbit.

Cancer. 1949; 2 (4): 673-691

Günzel-Apel A-R, Buschhaus J, Urhausen C, Masal C, Wolf K, Meyer-Lindenberg A, Piechotta M, Beyerbach M, Schoon H-A

Klinische Symptomatik, diagnostische Vorgehensweise und Therapie beim so genannten Ovarrest-Syndrom der Hündin.

Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere / Heimtiere. 2012; 40 (01): 35-42

Hadlow N, Longhurst K, McClements A, Natalwala J, Brown SJ, Matson PL

Variation in antimüllerian hormone concentration during the menstrual cycle may change the clinical classification of the ovarian response.

Fertility and Sterility. 2013; 99 (6): 1791-1797

Hafez ES

Reproductive and breeding techniques for laboratory animals.

Lea and Ferbigler, Philadelphia, 1970: 74-122, 277.

Hafez ESE, Blandau RJ

The mammalian oviduct. Comparative biology and methodology.

The University of Chicago press, Chicago, London, 1969: 85-126, 129-162.

Hagen CP, Mouritsen A, Mieritz MG, Tinggaard J, Wohlfart-Veje C, Fallentin E, Brocks V, Sundberg K, Jensen LN, Anderson RA

Circulating AMH reflects ovarian morphology by magnetic resonance imaging and 3D ultrasound in 121 healthy girls.

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2015; 100 (3): 880-890

Hamilton CE

Evidences of cyclic reproductive phenomena in the rabbit.

The Anatomical Record. 1951; 110 (4): 557-571

Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR, Klein NA

A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause.

Human Reproduction. 2008; 23 (3): 699-708

Harcourt-Brown F, Chitty J

BSAVA manual of rabbit surgery, dentistry and imaging.

British Small Animal Veterinary Association, 2013: 138-149, 161.

Harcourt-Brown FM

Disorders of the reproductive tract of rabbits.

Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice. 2017; 20 (2): 555-587

Harkness JE, Turner PV, VandeWoude S, Wheler CL

Harkness and Wagner's biology and medicine of rabbits and rodents.

John Wiley & Sons, 2010: 39.

Harper M

Ovulation in the rabbit: the time of follicular rupture and expulsion of the eggs, in relation to injection of luteinizing hormone.

Journal of Endocrinology. 1963; 26 (3): 307-316

Harrington FE, Rothermel JD

Daily changes in peripheral plasma progesterone concentrations in pregnant and

pseudopregnant rabbits.

Life Sciences. 1977; 20 (8): 1333-1340

Hawkins Bressler L, Steiner A

Anti-Müllerian hormone as a predictor of reproductive potential.

Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity. 2018; 25 (6): 385-390

Hayes E, Kushnir V, Ma X, Biswas A, Prizant H, Gleicher N, Sen A

Intra-cellular mechanism of Anti-Müllerian hormone (AMH) in regulation of follicular development.

Molecular and Cellular Endocrinology. 2016; 433: 56-65

Heaps LA, Scudder CJ, Lipscomb VJ, Steinbach SM, Priestnall SL, Martineau H, Szlodovits B, Fowkes RC, Garden OA

Serum anti-Müllerian hormone concentrations before and after treatment of an ovarian granulosa cell tumour in a cat.

Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports. 2017; 3 (2): 2055116917722701

Hehenkamp WJ, Looman CW, Themmen AP, de Jong FH, Te Velde ER, Broekmans FJ

Anti-Müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation.

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2006; 91 (10): 4057-4063

Hill JR, Wilkinson J, Mallyon J, Anderson ST

Low sensitivity of a test for anti-Müllerian hormone to assess presence of ovaries in prepubertal bitches.

Australian Veterinary Journal. 2018; 96 (9): 356-359

Hollinshead F, Walker C, Hanlon D

Determination of the normal reference interval for anti-Müllerian hormone (AMH) in bitches and use of AMH as a potential predictor of litter size.

Reproduction in Domestic Animals. 2017; 52: 35-40

Holst BS, Dreimanis U

Anti-Müllerian hormone: a potentially useful biomarker for the diagnosis of canine Sertoli cell tumours.

BMC Veterinary Research. 2015; 11: 166

Holst BS

Diagnostic possibilities from a serum sample-Clinical value of new methods within small animal reproduction, with focus on anti-Mullerian hormone.

Reproduction in Domestic Animals. 2017; 52 Suppl 2: 303-309

Hornakova L, Vrbovska T, Pavl'ak M, Valencakova-Agyagosova A, Halo M, Hajurka J

The evaluation of blood concentrations of testosterone, 17 β -oestradiol and anti-Mu"llerian hormone in dogs with cryptorchidism and testicular tumours.

Polish Journal of Veterinary Sciences. 2017; 20 (4): 677-685

Hudson PL, Dugas I, Donahoe PK, Cate RL, Epstein J, Pepinsky RB, Maclaughlin, David T

An immunoassay to detect human mullerian inhibiting substance in males and females during normal development.

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1990; 70 (1): 16-22

Ingalls TH, Adams WM, Lurie MB, Ipsen J

Natural History of Adenocarcinoma of the Uterus in the Phipps Rabbit Colony.

Journal of the National Cancer Institute. 1964; 33: 799-806

Ireland JLH, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen APN, Ward F, Lonergan P, Smith GW, Perez GI, Evans ACO, Ireland JJ

Antral Follicle Count Reliably Predicts Number of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle1.

Biology of Reproduction. 2008; 79 (6): 1219-1225

Jamil Z, Fatima SS, Ahmed K, Malik R

Anti-Mullerian Hormone: Above and Beyond Conventional Ovarian Reserve Markers.

Disease Markers. 2016; 2016: 5246217

Janiak MI

Anatomische Besonderheiten und physiologische Zustände der eproduktionsorgane des Kaninchens.

Schaper, Hannover, 1971: 129-133.

Josso N

Interspecific character of the Müllerian-inhibiting substance: action of the human fetal

testis, ovary and adrenal on the fetal rat Müllerian duct in organ culture.

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1971; 32 (3): 404-409

Josso N

In vitro synthesis of müllerian-inhibiting hormone by seminiferous tubules isolated from the calf fetal testis.

Endocrinology. 1973; 93 (4): 829-834

Josso N, Legeai L, Forest MG, Chaussain J-L, Brauner R

An enzyme linked immunoassay for anti-Müllerian hormone: a new tool for the evaluation of testicular function in infants and children.

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1990; 70 (1): 23-27

Josso N, di Clemente N, Gouédard L

Anti-Müllerian hormone and its receptors.

Molecular and Cellular Endocrinology. 2001; 179 (1-2): 25-32

Josso N, Rey RA, Picard JY

Anti-mullerian hormone: a valuable addition to the toolbox of the pediatric endocrinologist.

International Journal of Endocrinology. 2013; 2013: 674105

Josso N

Women in Reproductive Science: Anti-Müllerian hormone: a look back and ahead.

Reproduction. 2019; 158 (6): 81-89

Jost A

Action of testosterone on the castrated rabbit embryo.

Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales. 1947; 141 (5-6): 275

Jost A, Gonse-Danysz P, Jacquot R

Studies on physiology of fetal hypophysis in rabbits and its relation to testicular function.

Journal of Physiology. 1953; 45 (1): 134-136

Kabithé EW, Place NJ

Photoperiod-dependent modulation of anti-Müllerian hormone in female Siberian hamsters, *Phodopus sungorus*.

Reproduction. 2008; 135 (3): 335-342

Kano M, Sosulski AE, Zhang L, Saatcioglu HD, Wang D, Nagykerly N, Sabatini ME, Gao G, Donahoe PK, Pépin D

AMH/MIS as a contraceptive that protects the ovarian reserve during chemotherapy.

Proceedings of the National Academy of Sciences. 2017; 114 (9): 1688-1697

Kaplan HM, Timmons EH

The rabbit: a model for the principles of mammalian physiology and surgery.

Academic Press, New York, 1979: 4-6, 60.

Karakas Alkan K, Ceylan A, Alkan H, Ozen D, Bayraktaroglu AG, Kaymaz M

Immunohistochemical and qPCR determination of the expression and serum level of anti-Müllerian hormone in pre-pubertal, intact and ovarian remnant syndrome detected bitches.

Reproduction in Domestic Animals. 2019; 54 (7): 979-986

Karl KR, Ireland JLH, Clark ZL, Tempelman RJ, Latham KE, Ireland JJ

Limitations in use of ovarian reserve biomarkers to predict the superovulation response in small ovarian reserve heifers.

Theriogenology. 2022; 182: 53-62

Kaufmann RA, Savoy-Moore RT, Subramanian MG, Moghissi KS

Cocaine inhibits mating-induced, but not human chorionic gonadotropin-stimulated, ovulation in the rabbit.

Biology of Reproduction. 1992; 46 (4): 641-647

Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, van de Lang-Born BM, de Jong FH, Groome NP, Themmen AP, Visser JA

Serum anti-müllerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice.

Endocrinology. 2006; 147 (7): 3228-3234

Kim J, Seibel M, MacLaughlin D, Donahoe P, Ransil B, Hametz P, Richards C

The inhibitory effects of Müllerian-inhibiting substance on epidermal growth factor induced proliferation and progesterone production of human granulosa-luteal cells.

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1992; 75 (3): 911-917

Kishk W, Khalil H, Hassanein A, Ayoub M

Physiological, Reproductive and Productive traits of New Zealand White rabbits doe as affected by natural mating time.

Egyptian Journal of rabbit science. 2006; 16 (2): 223-232

Kitahara G, El-Sheikh Ali H, Sato T, Kobayashi I, Hemmi K, Shirao Y, Kamimura S

Anti-Müllerian hormone (AMH) profiles as a novel biomarker to evaluate the existence of a functional cryptorchid testis in Japanese Black calves.

Journal of Reproduction and Development. 2012; 58 (3): 310-315

Koch T, Berg R

Lehrbuch der Veterinär-Anatomie, Band II: Eingeweidelehre.

Gustav Fischer, Jena, Germany. 1990: 312-350

Krahmer R, Schröder L, Gutte G, Michel G

Anatomie der Haustiere.

Verlag Hirzel, Leipzig, 1981: 220-225.

Kumar N, Singh AK

Role of Anti-Müllerian Hormone in Gynecology: A Review of Literature.

International Journal of Infertility & Fetal Medicine. 2015; 6 (2): 51-61

Kushnir VA, Seifer DB, Barad DH, Sen A, Gleicher N

Potential therapeutic applications of human anti-Müllerian hormone (AMH) analogues in reproductive medicine.

Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2017; 34 (9): 1105-1113

La Marca A, De Leo V, Giulini S, Orvieto R, Malmusi S, Giannella L, Volpe A

Anti-Mullerian hormone in premenopausal women and after spontaneous or surgically induced menopause.

Journal of the Society for Gynecologic Investigation. 2005; 12 (7): 545-548

La Marca A, Stabile G, Arsenio AC, Volpe A

Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle.

Human Reproduction. 2006; 21 (12): 3103-3107

La Marca A, Volpe A

The Anti-Müllerian hormone and ovarian cancer.

Human Reproduction. 2007; 13 (3): 265-273

La Marca A, Spada E, Grisendi V, Argento C, Papaleo E, Milani S, Volpe A

Normal serum anti-Müllerian hormone levels in the general female population and the relationship with reproductive history.

European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2012; 163 (2): 180-184

Lahoz B, Alabart JL, Monniaux D, Mermillod P, Folch J

Anti-Müllerian hormone plasma concentration in prepubertal ewe lambs as a predictor of their fertility at a young age.

BMC Veterinary Research. 2012; 8: 118

Lahoz B, Alabart JL, Cocero MJ, Monniaux D, Echegoyen E, Sánchez P, Folch J

Anti-Müllerian hormone concentration in sheep and its dependence of age and independence of BMP15 genotype: an endocrine predictor to select the best donors for embryo biotechnologies.

Theriogenology. 2014; 81 (2): 347-357

Lambert-Messerlian G, Plante B, Eklund EE, Raker C, Moore RG

Levels of antimüllerian hormone in serum during the normal menstrual cycle.

Fertility and sterility. 2016; 105 (1): 208-213

Lane AH, Lee MM, Fuller AF, Jr., Kehas DJ, Donahoe PK, MacLaughlin DT

Diagnostic utility of Müllerian inhibiting substance determination in patients with primary and recurrent granulosa cell tumors.

Gynecologic Oncology. 1999; 73 (1): 51-55

Laurich VM, Trbovich AM, O'Neill FH, Houk CP, Sluss PM, Payne AH, Donahoe PK, Teixeira J

Müllerian Inhibiting Substance Blocks the Protein Kinase A-Induced Expression of Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase/C17-20 Lyase mRNA in a Mouse Leydig Cell Line Independent of cAMP Responsive Element Binding Protein Phosphorylation.

Endocrinology. 2002; 143 (9): 3351-3360

Lebas F, Coudert P, Rouvier R, De Rochambeau H

The Rabbit: husbandry, health, and production.

Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, 1997: 45-60.

Lee MM, Donahoe PK, Hasegawa T, Silverman B, Crist GB, Best S, Hasegawa Y, Noto RA, Schoenfeld D, MacLaughlin DT

Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood.

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1996; 81 (2): 571-576

Lee MM, Donahoe PK, Silverman BL, Hasegawa T, Hasegawa Y, Gustafson ML, Chang YC, MacLaughlin DT

Measurements of serum müllerian inhibiting substance in the evaluation of children with nonpalpable gonads.

The New England Journal of Medicine. 1997; 336 (21): 1480-1486

Lee MM, Misra M, Donahoe PK, MacLaughlin DT

MIS/AMH in the assessment of cryptorchidism and intersex conditions.

Molecular and Cellular Endocrinology. 2003; 211 (1-2): 91-98

Leykam C, Otzdorff C, Flock U, Kempker L, Aupperle H, Coelfen A, Meyer-Lindenberg A, Walter B

Anti-Mullerian hormone concentration in dogs with unilateral cryptorchidism.

Reproduction in Domestic Animals. 2018; 53: 22-23

Li HW, Ng EH, Wong BP, Anderson RA, Ho PC, Yeung WS

Correlation between three assay systems for anti-Müllerian hormone (AMH) determination.

Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2012; 29 (12): 1443-1446

Li HWR, Robertson DM, Burns C, Ledger WL

Challenges in Measuring AMH in the Clinical Setting.

Frontiers in Endocrinology. 2021; 12: 691432

Lie Fong S, Visser J, Welt C, De Rijke Y, Eijkemans M, Broekmans F, Roes E, Peters W, Hokken-Koelega A, Fauser B

Serum anti-müllerian hormone levels in healthy females: a nomogram ranging from infancy to adulthood.

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2012; 97 (12): 4650-4655

Liebich H-G

Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis.

Schattauer Verlag, 2004: 293-310.

Liebl I

Endoskopischer Eileitertransfer bei Kaninchen.

Ludwig-Maximilians-Universität, München, 1996: 10-15.

Löfstedt RM, Vanleeuwen JA

Evaluation of a commercially available luteinizing hormone test for its ability to distinguish between ovariectomized and sexually intact bitches.

Journal of the American Veterinary Medical Association. 2002; 220 (9): 1331-1335

Löliger HC

Kaninchenkrankheiten.

Enke Verlag, 1986: 9-18.

Long WQ, Ranchin V, Pautier P, Belville C, Denizot P, Cailla H, Lhommé C, Picard JY, Bidart JM, Rey R

Detection of minimal levels of serum anti-Müllerian hormone during follow-up of patients with ovarian granulosa cell tumor by means of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay.

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2000; 85 (2): 540-544

Lytton FD, Poyser N

Concentrations of PGF-2 α and PGE-2 in the uterine venous blood of rabbits during pseudopregnancy and pregnancy.

Reproduction. 1982; 64 (2): 421-429

Maercklin T

Über den Einfluss von Fütterungsfaktoren auf die Fruchtbarkeit von Kaninchen unter besonderer Berücksichtigung des histologischen Aufbaues der Fortpflanzungsorgane.

Tierärztliche Hochschule Hannover, 1971: 7-11.

McNitt JI, Lukefahr SD, Cheeke PR, Patton NM

Rabbit production.

Centre for Agriculture and Bioscience International, 2013: 43-44, 144-159.

McLaughlin CA, Chiasson RB

Laboratory anatomy of the rabbit.

Verlag WCB, McGraw-Hill, 1990: 52-55.

Melado L, Lawrenz B, Sibal J, Abu E, Coughlan C, Navarro AT, Fatemi HM

Anti-müllerian Hormone During Natural Cycle Presents Significant Intra and Intercycle Variations When Measured With Fully Automated Assay.

Frontiers in Endocrinology. 2018; 9: 686

Menchetti L, Andoni E, Barbato O, Canali C, Quattrone A, Vigo D, Codini M, Curone G, Brecchia G

Energy homeostasis in rabbit does during pregnancy and pseudopregnancy.

Animal Reproduction Science. 2020; 218: 106505

Meredith A, Lord B

BSAVA manual of rabbit medicine.

British Small Animal Veterinary Association, 2014: 1, 36-52.

Monniaux D, Barbey S, Rico C, Fabre S, Gallard Y, Larroque H

Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle?

Reproduction, Fertility and Development. 2010; 22 (7): 1083-1091

Monniaux D, Baril G, Laine AL, Jarrier P, Poulin N, Cognié J, Fabre S

Anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat.

Reproduction. 2011; 142 (6): 845-854

Monniaux D, Drouilhet L, Rico C, Estienne A, Jarrier P, Touzé JL, Sapa J, Phocas F, Dupont J, Dalbiès-Tran R, Fabre S

Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals.

Reproduction, Fertility and Development. 2012; 25 (1): 1-16

Moolhuijsen LME, Visser JA

Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function.

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2020; 105 (11): 3361-3373

Mosimann W, Köhler T

Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie der Haustiere.

Paul Parey Berlin, 1991: 232-238, 241-248.

Mossa F, Jimenez-Krassel F, Scheetz D, Weber-Nielsen M, Evans ACO, Ireland JJ

Anti-Müllerian Hormone (AMH) and fertility management in agricultural species.

Reproduction. 2017; 154 (1): R1-11

Muelas R, Cano P, García M, Esquifino A, Argente M

Influence of FSH, LH and prolactin on the components of litter size in rabbit does.

9th World Rabbit Congress, Verone, Italy, 2008: 405-410.

Münsterberg A, Lovell-Badge R

Expression of the mouse anti-müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation.

Development. 1991; 113 (2): 613-624

Myers M, Britt KL, Wreford NGM, Ebling FJ, Kerr JB

Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary.

Reproduction. 2004; 127 (5): 569-580

Nabenishi H, Kitahara G, Takagi S, Yamazaki A, Osawa T

Relationship between plasma anti-Müllerian hormone concentrations during the rearing period and subsequent embryo productivity in Japanese black cattle.

Domestic Animal Endocrinology. 2017; 60: 19-24

Nagashima JB, Hansen BS, Songsasen N, Travis AJ, Place NJ

Anti-Müllerian Hormone in the Domestic Dog during the Anestrus to Oestrous Transition.

Reproduction in Domestic Animals. 2016; 51 (1): 158-164

Ness R

Neoplasia in rabbits and guinea pigs.

Proceedings of the North American Veterinary Conference, 1998: 853–854.

Nicosia SV, Evangelista I, Batta SK

Rabbit ovarian follicles. I. Isolation technique and characterization at different stages of development.

Biology of Reproduction. 1975; 13 (4): 423-447

Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW

Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum.

Physiological Reviews. 2000; 80 (1): 1-29

Norris DO, Lopez KH

Hormones and reproduction of vertebrates Vol. 5, Vol. 5.

Academic Press, 2011: 59-72, 87-89.

Oh SR, Choe SY, Cho YJ

Clinical application of serum anti-Müllerian hormone in women.

Clinical and Experimental Reproductive Medicine. 2019; 46 (2): 50-59

Olson PN, Kustritz MV, Johnston SD

Early-age neutering of dogs and cats in the United States (a review).

Journal of reproduction and fertility. 2001; 57: 223-232

Overbeek A, Broekmans FJ, Hehenkamp WJ, Wijdeveld ME, van Disseldorp J, van Dulmen-den Broeder E, Lambalk CB

Intra-cycle fluctuations of anti-Müllerian hormone in normal women with a regular cycle: a re-analysis.

Reproductive BioMedicine Online. 2012; 24 (6): 664-669

Owen JA, Punt J, Stranford SA

Kuby immunology.

WH Freeman New York, NY, USA, 2013: 660-662.

Panidis D, Georgopoulos NA, Piouka A, Katsikis I, Saltamavros AD, Decavalas G, Diamanti-Kandarakis E

The impact of oral contraceptives and metformin on anti-Müllerian hormone serum levels in women with polycystic ovary syndrome and biochemical hyperandrogenemia.

Gynecological Endocrinology. 2011; 27 (8): 587-592

Papas M, Govaere J, Peere S, Gerits I, Van de Velde M, Angel-Velez D, De Coster T, Van Soom A, Smits K

Anti-Müllerian Hormone and OPU-ICSI Outcome in the Mare.

Animals (Basel). 2021; 11 (7): 11072004

Park SH, Chung YJ, Song JY, Kim SI, Pépin D, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Kim JH

Müllerian inhibiting substance inhibits an ovarian cancer cell line via β -catenin interacting protein deregulation of the Wnt signal pathway.

International Journal of Oncology. 2017; 50 (3): 1022-1028

Pauerstein CJ, Anderson V, Chatkoff ML, Hodgson BJ

Effect of estrogen and progesterone on the time-course of tubal ovum transport in rabbits.

American Journal of Obstetrics & Gynecology. 1974; 120 (3): 299-308

Pellatt L, Hanna L, Brincat M, Galea R, Brain H, Whitehead S, Mason H

Granulosa cell production of anti-Müllerian hormone is increased in polycystic ovaries.

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2007; 92 (1): 240-245

Peluso C, Fonseca FL, Rodart IF, Cavalcanti V, Gastaldo G, Christofolini DM, Barbosa CP, Bianco B

AMH: An ovarian reserve biomarker in assisted reproduction.

Clinica Chimica Acta. 2014; 437: 175-182

Pfeiffer KE, Jury LJ, Larson JE

Determination of anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle.

Domestic Animal Endocrinology. 2014; 46: 58-64

Picard J-Y, Cate RL, Racine C, Josso N

The persistent Müllerian duct syndrome: an update based upon a personal experience of 157 cases.

Sexual Development. 2017; 11 (3): 109-125

Pilsgaard F, Grynnerup AGA, Løssl K, Bungum L, Pinborg A

The use of anti-Müllerian hormone for controlled ovarian stimulation in assisted reproductive technology, fertility assessment and-counseling.

Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica. 2018; 97 (9): 1105-1113

Pinto PHN, Balaro MFA, Souza-Fabjan JMG, Ribeiro LDS, Bragança GM, Leite CR, Arashiro EKN, de Moraes Silva K, Da Fonseca JF, Brandão FZ

Anti-Müllerian hormone and antral follicle count are more effective for selecting ewes with good potential for in vivo embryo production than the presence of FecG(E) mutation or eCG pre-selection tests.

Theriogenology. 2018; 113: 146-152

Pir Yagci I, Pekcan M, Polat IM, Kalender H, Macun HC

Does serum anti-Müllerian hormone levels always discriminate presence of the ovaries in adult bitches? Comparison of two ELISA kits.

Reproduction in Domestic Animals. 2016; 51 (6): 910-915

Place NJ, Cruickshank J

Graded response to short photoperiod during development and early adulthood in Siberian hamsters and the effects on reproduction as females age.

Hormones and Behavior. 2009; 55 (3): 390-397

Place NJ, Hansen BS, Cheraskin JL, Cudney SE, Flanders JA, Newmark AD, Barry B, Scarlett JM

Measurement of serum anti-Müllerian hormone concentration in female dogs and cats before and after ovariectomy.

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2011; 23 (3): 524-527

Place NJ, Crosier AE, Comizzoli P, Nagashima JB, Haefele H, Schmidt-Küntzel A, Marker LL

Age-associated and deslorelin-induced declines in serum anti-Müllerian hormone concentrations in female cheetahs, *Acinonyx jubatus*.

General and Comparative Endocrinology. 2017; 250: 54-57

Place NJ, Cheraskin JL, Hansen BS

Evaluation of combined assessments of serum anti-Müllerian hormone and progesterone concentrations for the diagnosis of ovarian remnant syndrome in dogs.

Journal of the American Veterinary Medical Association. 2019; 254 (9): 1067-1072

Plante BJ, Cooper GS, Baird DD, Steiner AZ

The impact of smoking on antimüllerian hormone levels in women aged 38 to 50 years.

Menopause. 2010; 17 (3): 571

Quesenberry K, Carpenter JW

Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery.
Elsevier Health Sciences, 2011: 141, 201-205.

Ramirez VD, Ramirez AD, Slamet W, Nduka E

Functional characteristics of the luteinizing hormone-releasing hormone pulse generator in conscious unrestrained female rabbits: activation by norepinephrine.
Endocrinology. 1986; 118 (6): 2331-2339

Rebollar PG, Dal Bosco A, Millan P, Cardinali R, Brecchia G, Sylla L, Lorenzo PL, Castellini C

Ovulating induction methods in rabbit does: the pituitary and ovarian responses.
Theriogenology. 2012; 77 (2): 292-298

Revelli A, Biasoni V, Gennarelli G, Canosa S, Dalmasso P, Benedetto C

IVF results in patients with very low serum AMH are significantly affected by chronological age.
Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2016; 33 (5): 603-609

Rey R, Mebarki F, Forest MG, Mowszowicz I, Cate RL, Morel Y, Chaussain JL, Josso N

Anti-müllerian hormone in children with androgen insensitivity.
The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1994; 79 (4): 960-964

Rey R, Sabourin JC, Venara M, Long WQ, Jaubert F, Zeller WP, Duvillard P, Chemes H, Bidart JM

Anti-Müllerian hormone is a specific marker of sertoli- and granulosa-cell origin in gonadal tumors.
Human Pathology. 2000; 31 (10): 1202-1208

Rey RA, Lhommé C, Marcillac I, Lahlou N, Duvillard P, Josso N, Bidart JM

Antimüllerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumors of the ovary: comparative study with serum α -inhibin and estradiol.
American Journal of Obstetrics & Gynecology. 1996; 174 (3): 958-965

Richardson VC

Rabbits: health, husbandry and diseases.

John Wiley & Sons, 2008: 44-58.

Rico C, Fabre S, Médigue C, di Clemente N, Clément F, Bontoux M, Touzé JL, Dupont M, Briant E, Rémy B, Beckers JF, Monniaux D

Anti-mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow.

Biology of Reproduction. 2009; 80 (1): 50-59

Rico C, Médigue C, Fabre S, Jarrier P, Bontoux M, Clément F, Monniaux D

Regulation of anti-Müllerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels.

Biology of Reproduction. 2011; 84 (3): 560-571

Rico C, Drouilhet L, Salvetti P, Dalbiès-Tran R, Jarrier P, Touzé JL, Pillet E, Ponsart C, Fabre S, Monniaux D

Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm.

Reproduction, Fertility and Development. 2012; 24 (7): 932-944

Robertson DM, Kumar A, Kalra B, Shah S, Pruyssers E, Vanden Brink H, Chizen D, Visser JA, Themmen AP, Baerwald A

Detection of serum antimüllerian hormone in women approaching menopause using sensitive antimüllerian hormone enzyme-linked immunosorbent assays.

Menopause. 2014; 21 (12): 1277-1286

Rodríguez-Antolín J, Xelhuantzi N, García-Lorenzana M, Cuevas E, Hudson R, Martínez-Gómez M

General tissue characteristics of the lower urethral and vaginal walls in the domestic rabbit.

International Urogynecology Journal. 2009; 20 (1): 53-60

Rohlertz M, Ström Holst B, Axné E

Comparison of the GnRH-stimulation test and a semiquantitative quick test for LH to diagnose presence of ovaries in the female domestic cat.

Theriogenology. 2012; 78 (9): 1901-1906

Rota A, Ballarin C, Vigier B, Cozzi B, Rey R

Age dependent changes in plasma anti-Müllerian hormone concentrations in the bovine male, female, and freemartin from birth to puberty: relationship between testosterone

production and influence on sex differentiation.

General and Comparative Endocrinology. 2002; 129 (1): 39-44

Rustamov O, Smith A, Roberts SA, Yates AP, Fitzgerald C, Krishnan M, Nardo LG, Pemberton PW

Anti-Müllerian hormone: poor assay reproducibility in a large cohort of subjects suggests sample instability.

Human Reproduction. 2012; 27 (10): 3085-3091

Saito K, Nakanishi M, Hasegawa A

Uterine disorders diagnosed by ventrotomy in 47 rabbits.

The Journal of Veterinary Medical Science. 2002; 64 (6): 495-497

Sakaguchi K, Yanagawa Y, Yoshioka K, Suda T, Katagiri S, Nagano M

Relationships between the antral follicle count, steroidogenesis, and secretion of follicle-stimulating hormone and anti-Müllerian hormone during follicular growth in cattle.

Reproductive Biology and Endocrinology. 2019; 17 (1): 88

Schlögl W, Lange K, Löhle K, Löliger HC, Rudolph W

Das große Buch vom Kaninchen.

Verlag DLG, Frankfurt, 2003: 161-169.

Schnorr B, Kressin M

Embryologie der Haustiere: Ein Kurzlehrbuch.

Georg Thieme Verlag, 2006: 14-19, 194-195.

Schuh-Huerta SM, Johnson NA, Rosen MP, Sternfeld B, Cedars MI, Reijo Pera RA

Genetic variants and environmental factors associated with hormonal markers of ovarian reserve in Caucasian and African American women.

Human Reproduction. 2012; 27 (2): 594-608

Seifer D, Tal R

Anti-Müllerian hormone: Biology, role in ovarian function and clinical significance.

Nova Science Publishers, Inc., 2016: 13-32.

Seifer DB, Golub ET, Lambert-Messerlian G, Benning L, Anastos K, Watts DH, Cohen MH, Karim R, Young MA, Minkoff H

Variations in serum müllerian inhibiting substance between white, black, and Hispanic women.

Fertility and sterility. 2009; 92 (5): 1674-1678

Senger P

Pathways to pregnancy and parturition 3rd edition.

Redmond, OR: Current Conceptions, Inc, 2012: 30, 160-201, 284.

Smollich A, Michel G

Mikroskopische Anatomie der Haustiere.

Verlag Gustav Fischer, Stuttgart, 1992: 299-328.

Snoeck F, Sarrazin S, Wydooghe E, Van Soom A

Age and anti-Müllerian hormone levels predict the success of in vitro maturation of cat oocytes.

Reproduction in Domestic Animals. 2017; 52: 98-102

Sonigo C, Beau I, Grynberg M, Binart N

AMH prevents primordial ovarian follicle loss and fertility alteration in cyclophosphamide-treated mice.

The FASEB Journal. 2019; 33 (1): 1278-1287

Souza AH, Carvalho PD, Rozner AE, Vieira LM, Hackbart KS, Bender RW, Dresch AR, Verstegen JP, Shaver RD, Wiltbank MC

Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows.

Journal of Dairy Science. 2015; 98 (1): 169-178

Sowers M, McConnell D, Gast K, Zheng H, Nan B, McCarthy JD, Randolph JF

Anti-Müllerian hormone and inhibin B variability during normal menstrual cycles.

Fertility and sterility. 2010; 94 (4): 1482-1486

Steiner AZ, Pritchard D, Stanczyk FZ, Kesner JS, Meadows JW, Herring AH, Baird DD

Association Between Biomarkers of Ovarian Reserve and Infertility Among Older Women of Reproductive Age.

Journal of the American Medical Association. 2017; 318 (14): 1367-1376

Suckow MA, Schroeder V, Douglas FA

The laboratory rabbit.

CRC Press Taylor & Francis Group, 2010: 1, 8-9.

SUZUKI H, TAKEDA T, TSUTSUMI Y

Gross and microscopic features of the cervix in the non-pregnant rabbit.

Japanese Journal of Zootechnical Science. 1978; 49: 614-624

THAU RB, LANMAN JT

Metabolic clearance rates (MCR) and production rates (PR) of plasma progesterone in pregnant and pseudopregnant rabbits.

Endocrinology. 1975; 97 (2): 454-457

Themmen APN, Kalra B, Visser JA, Kumar A, Savjani G, de Gier J, Jaques S

The use of anti-Müllerian hormone as diagnostic for gonadectomy status in dogs.

Theriogenology. 2016; 86 (6): 1467-1474

Tselpidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy C, Englert Y

Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women.

Human Reproduction. 2007; 22 (7): 1837-1840

Turna Yilmaz Ö, Toydemir TS, Kirsan I, Gunay Ucmak Z, Caliskan Karacam E

Anti-Müllerian hormone as a diagnostic tool for ovarian remnant syndrome in bitches.

Veterinary Research Communications. 2015; 39 (3): 159-162

Tyler K

Histological changes in the cervix of the rabbit after coitus.

Reproduction. 1977; 49 (2): 341-345

Umer S, Zhao SJ, Sammad A, Weldegebriall Sahlu B, Yunwei P, Zhu H

AMH: Could It Be Used as A Biomarker for Fertility and Superovulation in Domestic Animals?

Genes (Basel). 2019; 10 (12): 1009

van Disseldorp J, Lambalk CB, Kwee J, Looman CW, Eijkemans MJ, Fauser BC, Broekmans FJ

Comparison of inter- and intra-cycle variability of anti-Müllerian hormone and antral follicle counts.

Human Reproduction. 2010; 25 (1): 221-217

Van Rooij I, Broekmans F, Te Velde E, Fauser B, Bancsi L, De Jong F, Themmen A

Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve.

Human Reproduction. 2002; 17 (12): 3065-3071

van Zeeland Y

Rabbit oncology: diseases, diagnostics, and therapeutics.

Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice. 2017; 20 (1): 135-182

Varga M

Textbook of Rabbit Medicine.

Elsevier Health Sciences, 2013: 82-88.

Vernunft A, Lührke B, Tuchscherer A, Weitzel JM, Viergutz T

Concentrations of anti-Müllerian-hormone in follicular fluid from antral follicles and their relation to functional characteristics of follicle development in mares.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift. 2013; 126 (1-2): 77-82

Vernunft A, Schwerhoff M, Viergutz T, Diederich M, Kuwer A

Anti-Müllerian hormone levels in plasma of Holstein-Friesian heifers as a predictive parameter for ovum pick-up and embryo production outcomes.

Journal of Reproduction and Development. 2015; 61 (1): 74-79

Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N

Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells.

Endocrinology. 1984; 114 (4): 1315-1320

Visser JA, Themmen AP

Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis.

Molecular and Cellular Endocrinology. 2005; 234 (1-2): 81-86

Visser JA, De Jong FH, Laven JSE, Themmen APN

Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function.

Reproduction. 2006; 131 (1): 1-9

Wallace A, Faye S, Fleming R, Nelson S

A multicentre evaluation of the new Beckman Coulter anti-Müllerian hormone immunoassay (AMH Gen II).

Annals of Clinical Biochemistry. 2011; 48 (4): 370-373

Wallace MS

The ovarian remnant syndrome in the bitch and queen.

Veterinary Clinics: Small Animal Practice. 1991; 21 (3): 501-507

Walter B, Poth T, Bohmer E, Braun J, Matis U

Uterine disorders in 59 rabbits.

Veterinary Record. 2010; 166 (8): 230-233

Walter B, Coelfen A, Jäger K, Reese S, Meyer-Lindenberg A, Aupperle-Lellbach H

Anti-Muellerian hormone concentration in bitches with histopathologically diagnosed ovarian tumours and cysts.

Reproduction in Domestic Animals. 2018; 53 (3): 784-792

Walter B, Feulner H, Otzdorff C, Klein R, Reese S, Meyer-Lindenberg A

Changes in anti-Mullerian hormone concentrations in bitches throughout the oestrous cycle.

Theriogenology. 2019; 127: 114-119

Walter B

Anti-Mullerian hormone in dogs and cats reproduction.

Reproduction in Domestic Animals. 2020; 55 Suppl 2: 26-31

Walter B, Flock U, Leykam C, Otzdorff C, Simmet K, Hecht W, Kempker L, Aupperle-Lellbach H, Reese S

Serum anti-Müllerian hormone concentration as a diagnostic tool to identify testicular tissue in canine disorders of sexual development.

Domestic Animal Endocrinology. 2022; 78: 106654

Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP

Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment.

Molecular Human Reproduction. 2004; 10 (2): 77-83

Wunder DM, Bersinger NA, Yared M, Kretschmer R, Birkhäuser MH

Statistically significant changes of antimüllerian hormone and inhibin levels during the physiologic menstrual cycle in reproductive age women.

Fertility and Sterility. 2008; 89 (4): 927-933

Zarrow M, Denenberg VH, Anderson CO

Rabbit: frequency of suckling in the pup.

Science. 1965; 150 (3705): 1835-1836

Žitný J, Massányi P, Trakovická A, Rafaj J, Toman R

Quantification of the ovarian follicular growth in rabbits.

Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy. 2004; 48: 37-40

VIII. Danksagung

Herzlich danken möchte ich an erster Stelle Frau Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg, die mir als Leiterin der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik die Promotion, die Absolvierung eines rotierenden Internship-Programms und die Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter ermöglicht hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Beate Walter für die großartige Betreuung meiner Arbeit. Ihre kompetente, fachliche Unterstützung und Beratung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich hätte mir keine bessere Betreuerin wünschen können.

Herzlich bedanken möchte ich mich darüber hinaus bei meinen Co-Autoren der Publikation Dr. Katharina Erber, Dr. Anja Ewringmann, Dr. Ruth Klein, PD Dr. Sven Reese und meiner Schwester Prof. Dr. Christine Böhmer. Auch bei Dr. Annette Kaiser bedanke ich mich für die anfängliche Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich mich bei Elena Gerdes und Herrn Prof. Dr. Hermann Ammer bedanken, ohne deren Hilfe bei der Probenbeschaffung ich diese Arbeit nicht hätte fertigstellen können.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meiner Oma, die mich seit ich denken kann bedingungslos unterstützt und stets an mich geglaubt haben. Es hat mir an nichts gefehlt und sie haben mir immer alles ermöglicht.

Nicht zuletzt möchte ich mich noch bei dir bedanken, Veronika. Danke für dein Verständnis, deine unermüdliche Unterstützung und, dass du mich immer wieder aufgemuntert hast, wenn es mal nicht so lief, wie ich es gerne gehabt hätte. Du warst immer meine größte Motivation. Danke, dass du an meiner Seite bist!