

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

**Korrelation des Anti-Müller-Hormons in der Läufigkeit der Hündin
mit der Fertilität**

von
Theresa Johanna Hornberger
aus Kiel

München 2025

**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:
Priv.-Doz. Dr. Beate Walter

**Gedruckt mit der 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: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Tag der Promotion: 26. Juli 2025

Widmung
Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Das Anti-Müller-Hormon (AMH)	2
1.1	Biochemischer Aufbau des AMH	2
1.2	AMH in der Embryologie	2
1.3	AMH während der Follikulogenese der Hündin	2
1.4	AMH in der Tiermedizin	4
1.4.1	Nachweismethoden für AMH	5
1.5	AMH in der Kleintierreproduktion	6
1.5.1	Kryptorchismus	6
1.5.2.	Ovarrestsyndrom	7
1.5.3.	Granulosa- und Sertolizelltumore	8
1.5.4.	AMH in Verbindung mit der Fertilität und Wurfgröße der Hündin	10
2.	Zyklus der Hündin	11
2.1.	Proöstrus	11
2.2.	Östrus	11
2.3.	Metöstrus	12
2.4.	Anöstrus	12
3.	Endokrinologie im Zyklus der Hündin	12
3.1	Anti-Müller-Hormon im Verlauf des Zyklus der Hündin	15
4.	Deckzeitbestimmung bei der Hündin	17
4.1	Gynäkologische Untersuchung	17
4.1.1.	Anamnese	17
4.1.2.	Adspektion und äußere Untersuchung	17
4.1.3.	Vaginoskopie	18
4.2	Vaginalzytologie	19
4.2.1	Probenentnahme	19
4.2.2	Färben von Vaginalabstrichen	19
4.2.3	Beurteilung der Zellen	20
4.3	Progesteronbestimmung	21

III.	PUBLIKATION	22
	Correlation of Anti-Müllerian hormone serum concentration measured in proestrus and estrus with the litter size as a fertility marker in bitches	
IV.	DISKUSSION	28
V.	ZUSAMMENFASSUNG	33
VI.	SUMMARY	35
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	37
VIII.	DANKSAGUNG	48

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AI	Azidophilie-Index
AMH	Anti-Müller-Hormon
CL	Corpus luteum
DA	Dopamin
eCG	Equines Choriongonadotropin
EI	Eosinophilie-Index
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
hCG	Humanes Choriongonadotropin
KDa	KiloDalton
kg	Kilogramm
LH	Luteinisierendes Hormon
ml	Milliliter
ng	Nanogramm
ORS	Ovarrestsyndrom
OV	Ovulation
PIF	Prolaktin Inhibierender Faktor
PRL	Prolaktin
TGF- β	Transforming Growth Factor β

I. EINLEITUNG

Das Anti-Müller-Hormon (AMH) hat in der Humanmedizin schon seit einigen Jahren das Follikelstimulierende Hormon (FSH) als prognostischen Faktor für die ovarielle Follikelreserve abgelöst (Eldar-Geva et al. 2005). Das in den Granulosazellen der heranwachsenden Follikel gebildete AMH korreliert positiv mit der Funktionsreserve des Ovars (de Vet et al. 2002). Auch in der Tiermedizin konnte schon in einigen Bereichen der Zusammenhang zwischen dem Anti-Müller-Hormon (AMH) und der Fertilität weiblicher Tiere nachgewiesen werden. Vor allem bei Kühen und Stuten gibt es einige Studien, die die positive Korrelation von AMH mit der Fertilität darstellen (Rico et al. 2012, Ball et al. 2019). Im Bereich der Großtiere wird AMH deshalb bereits als Biomarker für die Selektion erfolgversprechender Zuchttiere verwendet. In der Hundezucht stehen bisher noch keine ausreichenden Ergebnisse für AMH als Biomarker für die Fertilität zur Verfügung. Der Verlauf von AMH im Zyklus der Hündin ist mittlerweile bekannt (Nagashima et al. 2016, Walter et al. 2019) und es gibt eine erste Studie, die hohe AMH-Werte als Hinweis für größere Würfe nahelegt (Hollinshead et al. 2017). In dieser wurde allerdings nicht beachtet, dass die AMH-Konzentration der individuellen Hündinnen stark schwankt und die zeitliche Einordnung der Probenentnahme im Zyklus der Hündin eine große Rolle spielt. Da es in der zugänglichen Literatur dazu noch keine ausreichenden Untersuchungen gibt, war es Ziel der vorliegenden Studie, mit dem Wissen um individuelle Schwankungen und den Verlauf von AMH im Zyklus der Hündin, zu prüfen, ob AMH zukünftig als prognostischer Faktor für Fertilität und Wurfgröße herangezogen werden kann.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das Anti-Müller-Hormon

1.1 Biochemischer Aufbau des AMH

Das Anti-Müller-Hormon (AMH) ist ein Glykoprotein-Dimer aus zwei 72 kDa schweren Monomeren, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Es besteht aus 560 Aminosäuren und gehört zu der transforming growth factor- β -Familie (TGF- β) (Löffler 2003). AMH ist strukturell verwandt mit Aktivin und Inhibin und spielt eine Schlüsselrolle bei der Geschlechtsdetermination und der Follikulogenese (Rzeszowska et al. 2016).

1.2 Emryologie

Bei männlichen Feten produzieren bereits die fetalen Sertolizellen AMH und induzieren so die Rückbildung der Müllerschen Gänge, welche danach nur noch als Hodenanhängsel (Appendix testis) zwischen Nebenhodenanlage und Hoden erhalten bleiben (Josso et al. 2005). Bei erwachsenen Rüden wird AMH weiterhin in den Sertolizellen gebildet (Themmen et al. 2016). Da bei weiblichen Feten der Einfluss des AMH während der Embryogenese fehlt, entwickeln sich bei diesen aus den Müllerschen Gängen die Gebärmutter, die Eileiter und die proximalen zwei Drittel der Scheide (Josso 1986, Josso et al. 2005). Nach Erreichen der Geschlechtsreife wird AMH in den Granulosazellen der Ovarialfollikel gebildet (Themmen et al. 2016).

1.3 AMH während der Follikulogenese der Hündin

Das Ovar entwickelt sich bei Hunden bereits in der frühen fetalen Phase. Bei der Geburt enthält es zunächst Nester von Oogonien (Andersen et al. 1973). Etwa zwei bis drei Wochen nach der Geburt findet man Primordialfollikel, mit den darin befindlichen Eizellen. Der Pool an Primordialfollikeln beträgt in etwa 100.000 pro Ovar (Andersen et al. 1973). Bei Erreichen der Geschlechtsreife, je nach Rasse im Alter von 6 bis 12 Monaten, wird durch den Hypothalamus Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) und dann durch die Hypophyse das Follikelstimulierende Hormon (FSH) und das Luteinisierende Hormon (LH) ausgeschüttet und so die Weiterbildung einiger Primordialfollikel zum Primärfollikel stimuliert (Abb.1). Die dünne einlagige Schicht der Follikelepithelzellen (Granulosazellen) beim Primordialfollikel entwickelt sich zu einem hochprismatischen Follikelepithel beim Primärfollikel (Preidkalns und Leiser 1998). Der Primärfollikel hat einen Durchmesser von 30 – 100 μm (Tesoriero 1981). In der weiteren Entwicklung entsteht der Sekundärfollikel (präantraler Follikel) mit einem

mehrschichtigen Follikelepithel (Stratum granulosum). Zwischen Eizelle und Follikelepithel wird nun eine Glykoproteinschicht (Zona pellucida) sichtbar (Andersen et al. 1973). Den danach entstehenden Tertiärfollikel (antraler Follikel) kennzeichnet ein mit Liquor gefüllter Hohlraum (Antrum folliculi). Die Eizelle liegt an dessen Rand in einem vom Granulosaepithel gebildeten Hügel (Cumulus oophorus) (Keck 2012). Das Bindegewebe um den Follikel hat sich in eine gut kapillarisierte Theca interna und eine, größere Gefäße führende, Theca externa entwickelt, welche den Übergang zum Stroma des Ovars bildet. Die dominanteren Follikel sezernieren Östrogen und Inhibin, was zu einem Rückgang der FSH-Ausschüttung führt und kleinere Follikel atresieren lässt. Dadurch sinkt der Östrogenspiegel wieder, was zu einer positiven Rückkopplung auf die Hypophyse führt, wodurch die FSH- und LH-Freisetzung erneut ansteigt (Keck 2012). Ein in der Größe zunehmender Tertiärfollikel entwickelt sich dann zum sprungreifen Graaf-Follikel und durch den steilen LH-Anstieg wird die Ovulation ausgelöst (Sadler 2003, Schünke et al. 2009, Keck 2012). Bei der Hündin ovulieren die Eizellen im Stadium der ersten Reifeteilung, in der Prophase I (Andersen et al. 1973, Reynaud et al. 2012). Im Eileiter vollziehen sie die zweite Reifeteilung in die Metaphase II und sind dann etwa 48 Stunden nach der Ovulation befruchtungsfähig.

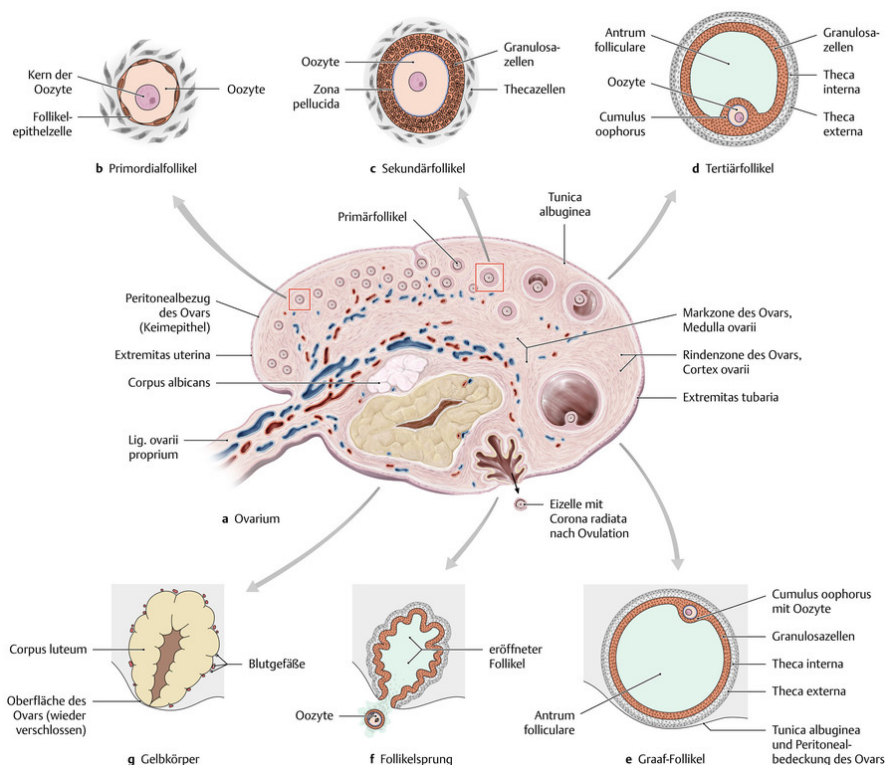


Abb. 1: Follikulogenese (aus Schünke et al. 2009)

Während der Follikulogenese wurde AMH bei der Hündin in den Primär-, Sekundär- und frühen Antralfollikeln nachgewiesen (Nagashima et al. 2016). Die höchste Konzentration von AMH konnte immunhistochemisch bei präantralen und frühen antralen Follikeln nachgewiesen werden. In den späten antralen Follikeln und den Graaf-Follikeln war die AMH Konzentration dann wieder deutlich reduziert (Nagashima et al. 2016). Das von den präantralen und antralen Follikeln exprimierte AMH hemmt die weitere Rekrutierung von Follikeln aus dem Primordialfollikelpool und reduziert die Empfindlichkeit der Antralfollikel gegenüber FSH. Somit führt AMH zur Regulation des Follikelpools (Visser et al. 2006)(Abb.2).

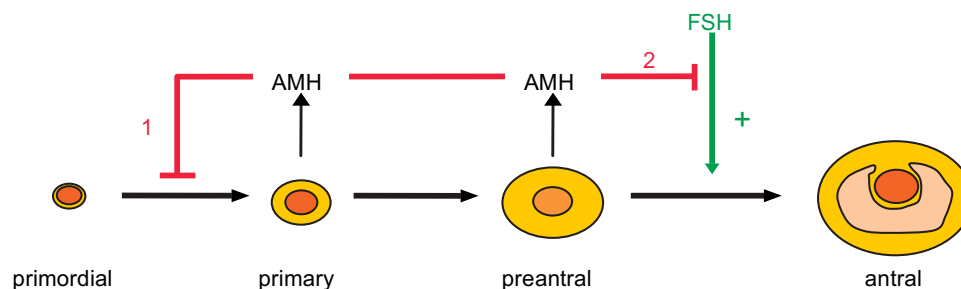


Abb. 2: Wirkung des AMH auf die Follikel (aus Visser et al. 2006)

Es inhibiert 1. die initiale Follikel-Rekrutierung und 2. das FSH abhängige Wachstum von präantralen und kleinen antralen Follikel

1.4 AMH in der Tiermedizin

Aus der Humanmedizin ist AMH als wichtiger Indikator für die Follikelreserve im Ovar und den Beginn der Menopause bei der Frau bekannt (Dolleman et al. 2014, Sahmay et al. 2014). Auch in der Tiermedizin spielt AMH eine Rolle im Bereich der Reproduktion. Milchkühe mit hohen AMH-Konzentrationen im Blut reagieren besser auf Superovulationsprotokolle mit FSH oder eCG (equines Chorion Gonadotropin). So lassen sich mittels AMH geeignete Spenderkühe für den Embryonentransfer selektieren (Rico et al. 2012). Bei Schafen konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen hohen AMH-Werten und besseren Trächtigkeitsraten nachgewiesen werden (Lahoz et al. 2012). Die Fertilität von Stuten nimmt mit zunehmendem Alter ab, aber auch hier zeigte sich, dass die Stuten mit höheren AMH-Werten zuverlässiger und bis in ein höheres Alter trächtig werden können (Ball et al. 2019). AMH kann bei Kühen, Schafen und Stuten also einen Hinweis zur Fertilität geben und so zu der Auswahl von geeigneten Zuchttieren beitragen. Ein Zusammenhang zwischen AMH und Fertilität wurde beim Hund bisher nur in zwei Studien untersucht. In einer wurden von 155 intakten Hündinnen im Alter von 1,2 – 7,6

Jahren über ein Jahr hinweg AMH-Proben gesammelt und unter anderem mit der Wurfgröße in Verbindung gebracht (Hollinshead et al. 2017). Die AMH-Werte lagen, ungeachtet von Gewicht und Alter, zwischen 2,9 und 21,1 ng/ml. Es zeigte sich ein Anstieg der Wurfrate um 0,3 Welpen pro 1 ng/ml AMH im Blut (Hollinshead et al. 2017). Außerdem wurde ein im Durchschnitt sinkender AMH-Wert ab dem vierten Lebensjahr und eine damit einhergehende sinkende Fertilität beobachtet (Hollinshead et al. 2017). Die zweite Studie untersuchte bei 13 Hündinnen unter anderem AMH während der Trächtigkeit im Verhältnis zur Wurfgröße. Bei den untersuchten Hündinnen handelte es sich um Golden Retriever, Labrador Retriever, Cocker Spaniel und Mischlinge. Die trächtigen Hündinnen wurden in drei Gruppen eingeteilt: G1A (1-2 Welpen), G1B (3-4 Welpen) und G1C (5-11 Welpen). AMH wurde am ersten Tag der Paarung und am 12. Tag der Trächtigkeit gemessen. Es gab keinen Unterschied im AMH-Spiegel zwischen trächtigen und nicht trächtigen Hündinnen (Evci et al. 2023). Am 12. Tag der Trächtigkeit hatte Gruppe G1B höhere AMH-Werte als G1A. Allerdings wies Gruppe G1C, die Gruppe mit der größten Anzahl an Welpen, niedrigere AMH-Werte auf als Gruppe G1B (Evci et al. 2023).

1.4.1 Nachweismethoden von AMH

Hormone im Blutserum können über ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren wie den Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) gemessen werden. Der ELISA gehört zu den Immunassay-Verfahren und basiert auf einer enzymatischen Farbreaktion (Kindt 2007). Das nachzuweisende Antigen wird über einen Erstantikörper an eine Mikrotiterplatte adsorptiv gebunden und angereichert, ein Enzym-gekoppelter Zweitantikörper führt zur Reaktion eines Farbstoffsubstrates, dessen Farbintensität mit einer Standardkurve verglichen wird (Kindt 2007). Anfänglich wurden für den AMH-Nachweis im Blutserum von Hunden humane ELISA-Assays verwendet (Diagnostic Systems Laboratory, Immunotech, Beckmann Coulter)(Holst 2017). Pir Yagci et al. (2016) verglichen ein humanes (Beckman Coulter, AMH- Gen II, USA) und ein canines (East BioPharm, China) ELISA-Kit und stellten die Überlegenheit des humanmedizinischen Kits fest, da das von ihnen angewandte canine Kit den Abfall des AMHs nach der Kastration nicht korrekt erkannte (Pir Yagci et al. 2016). Seit kurzem steht zur AMH-Messung im Serum ein weiteres kommerziell erhältliches canines ELISA-System zur Verfügung (Ansh Labs, Webster, Texas, USA) (Turna Yilmaz et al. 2015; Themmen et al. 2016). Canine ELISA-Kits messen durch ihre höhere Sensitivität

allgemein höhere AMH-Konzentrationen als die humanen ELISA-Kits (Axnér und Holst 2015, Turna Yilmaz et al. 2015, Themmen et al. 2016). Die Sensitivität eines humanen ELISA-Kits für den Einsatz bei Hündinnen lag bei Alm & Holst (2018) nur bei 88%. Derzeit mangelt es laut Pir Yagci et al (2016) aber noch an der Standardisierung der AMH-Referenzbereiche der von verschiedenen Labors angebotenen caninen Testkits.

1.5 AMH in der Kleintierreproduktion

Da AMH ausschließlich in den Sertolizellen der Hoden und den Granulosazellen des Ovars gebildet wird, hat es sich in den letzten Jahren als diagnostisches Mittel in der Kleintierreproduktion bewährt, um physiologische und pathologische Vorgänge an diesen Organen nachzuvollziehen.

1.5.1 Kryptorchismus

Wenn im Alter von acht Wochen die Hoden nicht im Skrotum des Rüdens palpierbar sind, spricht man von Kryptorchismus. Je nach Rasse kann der Hodenabstieg (Descensus testis) bei manchen Rüden auch länger dauern. Da sich jedoch im Alter von etwa sechs Monaten die Inguinalringe schließen, ist ein späterer Hodenabstieg kaum noch möglich (Johnston et al. 2001). Man unterscheidet zwischen einseitigem oder beidseitigem sowie abdominalem oder inguinalem Kryptorchismus. In seltenen Fällen sind auch ektopische Lokalisationen der kryptorchiden Hoden möglich (Arnold und Janett 2012). Da kryptorchide Hoden ständig der für Hoden unphysiologischen Körpertemperatur ausgesetzt sind, neigen Sie zu tumorösen Entartungen und sollten erkannt und chirurgisch entfernt werden (Welch Fossum 2020). Durch eine ultrasonografische Untersuchung kann der inguinal oder abdominal liegende Hoden meist dargestellt werden. Ist die Vorgeschichte des Rüdens nicht bekannt und es besteht der Verdacht auf einen kryptorchiden Hoden, kann dieser mittels hormoneller Diagnostik festgestellt werden (Hornakova et al. 2017). Zur Diagnostik eignet sich sowohl ein hCG (humanes Choriongonadotropin) – Stimulationstest, als auch die Bestimmung von AMH. Beim hCG-Stimulationstest wird zuerst eine Blutprobe für den Testosteronbasalwert gewonnen. Dann wird hCG intravenös verabreicht und nach 60 Minuten erneut eine Blutprobe gewonnen (LABOKLIN 05/2020). Erreicht Testosteron nach hCG-Stimulation einen Wert von $> 1,0$ ng/ml, spricht dies für vorhandenes Hodengewebe (LABOKLIN 05/2020). Dieser Test ist nur aussagekräftig, wenn kein zweiter Hoden im Skrotum

vorhanden ist. Bei Rüden mit unklarer Vorgeschichte und Herkunft, die rüdentypisches Verhalten aufweisen, kann auch mittels AMH-Messung Gonadengewebe nachgewiesen werden. Die AMH-Werte der Rüden sind sowohl präpubertär als auch nach Erreichen der Geschlechtsreife hoch, weshalb sie zu jedem Zeitpunkt den Nachweis von Hodengewebe erlauben (Josso et al. 2013, Alexander et al. 2024). Bei kastrierten Rüden oder echter Anorchie sind AMH-Serumwerte $< 0,1$ ng/ml zu erwarten (Laboklin aktuell 05/2012, Hornakova et al. 2017). Der Vorteil der AMH-Messung gegenüber dem hCG-Stimulationstest ist, dass auch bei einem skrotal gelegenen Hoden, ein zweiter kryptorchider Hoden diagnostiziert werden kann, da kryptorchide Hoden meist deutlich mehr AMH sezernieren als skrotal gelegene (Leykam et al. 2018).

1.5.2 Ovarrestsyndrom

Verbleibt nach der chirurgischen Kastration hormonell aktives Ovargewebe im Bauchraum der Hündin, spricht man vom Ovarrestsyndrom (ORS) (Howe 2006). Die Hündinnen können dann weiterhin reguläre Läufigkeitsanzeichen wie zum Beispiel blutigen Vaginalausfluss und Vulvaschwellung zeigen. Dies kann auch erst Monate bis Jahre nach der durchgeführten Kastration wieder auftreten (Günzel-Apel et al. 2012). Da im Abdomen verbliebene Ovarreste zu zystischen oder tumorösen Entartungen bei der Hündin neigen, sollten diese erkannt und chirurgisch entfernt werden (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Hat eine Hündin eine unklare Vorgeschichte oder zeigt trotz erfolgter Kastration Läufigkeitsanzeichen, gibt es verschiedene diagnostische Mittel zum Nachweis eines Ovarrestsyndroms. Dieser Diagnostik geht in jedem Fall eine klinisch-gynäkologische Untersuchung (Ödematisierung der Vulva, Duldungsreflex, Vaginoskopie und Vaginalzytologie) voran, um Hinweise auf östrogenproduziertes Ovarrestgewebe zu erhalten (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Wird eine Hündin im Anöstrus mit dem Verdacht auf Ovarrestsyndrom vorgestellt, können die gynäkologischen Befunde der einer kastrierten Hündin gleichen. Hier kann ein Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) – Stimulationstest zur Diagnose führen (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Dabei wird die durch GnRH stimulierte 17β -Estradiol-Ausschüttung bestimmt. Nach der Entnahme einer Blutprobe für den 17β -Estradiol-Basalwert wird GnRH intravenös appliziert. 60 und 90 Minuten nach der GnRH-Gabe werden erneut Blutproben gewonnen. Bei einem Ovarrest, der sich im Anöstrus befindet, liegt die 17β -Estradiol-Konzentration vor der GnRH-Gabe unter oder knapp über der Nachweisgrenze. Es zeichnet sich aber ein deutlicher Anstieg in den Proben ab, die nach 60 und 90 Minuten genommen wurden (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Auch die

Messung von AMH kann Aufschluss über verbliebenes Ovargewebe geben (Alm und Holst 2018). In allen bisher dazu durchgeführten Studien konnten die kastrierten Hündinnen, unabhängig von der Zyklusphase, deutlich von den unkastrierten Hündinnen oder Hündinnen mit ORS differenziert werden. Je nach Art des AMH-Nachweises (canine ELISA oder regulärer ELISA) ergaben sich unterschiedliche Referenzintervalle. In einer Studie mit 46 Hündinnen und einem für Hunde validierten ELISA (Ansh Labs, Webster, TX, USA) ergaben sich AMH-Werte von $4,26 \pm 0,82$ ng/ml bei unkastrierten Hündinnen, $4,40 \pm 1,09$ ng/ml bei Hündinnen mit ORS und $0,28 \pm 0,09$ ng/ml bei den kastrierten Hündinnen (Turna Yilmaz et al. 2015). Eine andere Studie untersuchte mit einem humanen ELISA 33 Serumproben. Hier konnten AMH-Referenzwerte von 0,10 – 0,41 ng/ml bei unkastrierten Hündinnen, 0,18 – 0,19 ng/ml bei den Hündinnen mit ORS und $< 0,09$ ng/ml bei den kastrierten Hündinnen dargestellt werden (Place et al. 2011). Andere Studien geben die Hündin bei einem AMH-Wert $< 0,02$ ng/ml als kastriert und bei einem AMH-Wert $> 0,5$ ng/ml als unkastriert an (Laboklin aktuell 05/2012, Günzel-Apel und Bostedt 2016). Präpubertäre Hündinnen weisen zum Teil ähnlich niedrige AMH-Werte wie kastrierte Hündinnen auf, weshalb eine Probenentnahme für die AMH-Bestimmung erst nach dem sechsten Lebensmonat aussagekräftig ist (Place et al. 2011).

1.5.3. Granulosa- und Sertolizelltumore

Ovarialtumore machen ca. 1% aller bei der Hündin auftretenden Tumoren aus und treten häufiger bei älteren Hündinnen auf (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Sie lassen sich in epitheliale, stromale und Keimzelltumoren unterteilen. Etwa 50% der stromalen Tumoren sind Granulosazelltumoren (Reichler et al. 2012). Diese sind meist gutartig und metastasieren nur in Ausnahmefällen. Ein Großteil der Granulosazelltumoren ist allerdings hormonell aktiv und führt zu Hyperöstrogenismus. Dieser äußert sich in anhaltender Läuseigkeitssymptomatik, Vulvavergrößerung, Endometritiden und symmetrischer Alopezie (Reichler et al. 2012). Bei anhaltendem Hyperöstrogenismus kann es zu einer generalisierten Knochenmarksdepression und teilweise lebensbedrohlicher Anämie kommen. Wenn sonografisch verändertes Ovargewebe festgestellt wurde oder das klinische Erscheinungsbild auf Hyperöstrogenismus hinweist, kann die AMH-Konzentration Aufschluss über das Vorliegen eines hormonell aktiven Granulosazelltumors geben (Walter et al. 2018). In einer Studie mit 63 Hündinnen konnten Granulosazelltumoren durch die Messung der AMH-Konzentration von anderen Ovarialtumoren und Zysten unterschieden werden. Die Hündinnen mit

Granulosazelltumoren zeigten bei der Serumuntersuchung mit einem humanspezifischen ELISA (Laboklin, Bad Kissingen, Germany) AMH-Konzentrationen von 1,12 bis ≥ 23 ng/ml, wobei 23 ng/ml den höchstmöglich messbaren Wert des ELISAs darstellte. Fünf von neun Hündinnen mit anschließend histopathologisch nachgewiesenem Granulosazelltumor erreichten einen Wert von ≥ 23 ng/ml. Hier stand die Größe des Granulosazelltumors in Korrelation mit den AMH-Konzentrationen. Hündinnen mit anderen Ovarialtumoren zeigten AMH-Konzentrationen von 0,18 bis 1,18 ng/ml (Walter et al. 2018).

Bei den Hodentumoren der Rüden handelt es sich meistens um Sertoli-Zelltumoren, Seminome oder Zwischenzelltumoren, die in mehr als 80% der Fälle gutartig sind (Arnold und Janett 2012). Auch hier können aber die bis zu 50% hormonell aktiven Sertoli-Zelltumoren zu Problemen für den Rüden führen (Arnold und Janett 2012). Es kommt zur vermehrten Produktion von Östrogen, was die Feminisierung des Rüden als Folge hat. Charakteristisch sind symmetrische Alopezie mit Hyperpigmentation in der Flankenregion, Gynäkomastie, ein schlaffes ödematisiertes Präputium und Attraktivität für andere Rüden (Arnold und Janett 2012). Bei länger bestehender Östrogenproduktion kann es zu einer endogenen Östrogenintoxikation und dadurch bedingte Anämie kommen. Da Östrogen in diesen Fällen häufig, aber nicht immer, erhöht ist und starken individuellen Schwankungen unterliegt, bietet sich die AMH-Konzentration als Biomarker für Sertolizelltumoren an (Holst und Dreimanis 2015). In der Studie von Holst und Dreimanis (2015) wurde die AMH-Konzentration von 20 Rüden mit palpierbarem Hodentumor mit einer Kontrollgruppe von 27 gesunden Rüden verglichen. In der Kontrollgruppe zeigten alle Rüden AMH-Konzentrationen < 10 ng/ml. Die Rüden mit einem Sertolizelltumor oder einem Misch tumor hatten AMH-Werte von > 20 ng/ml während die Rüden mit anderen Hodentumoren ähnliche Werte wie die Kontrollgruppe aufwiesen (Holst und Dreimanis 2015).

1.5.4. AMH in Verbindung mit der Fertilität und Wurfgröße der Hündin

Ein Zusammenhang zwischen AMH und Fertilität wurde beim Hund bisher nur in zwei Studien untersucht. In einer wurden von 155 intakten Hündinnen im Alter von 1,2 – 7,6 Jahren über ein Jahr hinweg AMH-Proben gesammelt und unter anderem mit der Wurfgröße in Verbindung gebracht (Hollinshead et al. 2017). Die AMH-Werte lagen, ungeachtet von Gewicht und Alter, zwischen 2,9 und 21,1 ng/ml. Es zeigte sich ein Anstieg der Wurfrate um 0,3 Welpen pro 1 ng/ml AMH im Blut (Hollinshead et al. 2017).

Außerdem wurde ein im Durchschnitt sinkender AMH-Wert ab dem vierten Lebensjahr und eine damit einhergehende sinkende Fertilität beobachtet (Hollinshead et al. 2017). Der AMH-Verlauf von spätem Anöstrus über Proöstrus und Östrus, sowie die individuell stark schwankenden AMH-Konzentrationen wurden hierbei aber noch nicht berücksichtigt. Die Zeitpunkte der Probenentnahme bei Hollinshead et al. (2017) waren variabel im Östrus gewählt, was, wenn man den Verlauf von AMH im Proöstrus und Östrus (Walter et al. 2019) beachtet, nicht unerheblich für die Höhe der AMH-Konzentration ist. So kann man zum Anfang des Östrus noch recht hohe AMH-Werte erhalten, wohingegen kurz vor der Ovulation niedrige AMH-Werte nachgewiesen werden. Die Probenentnahme zu willkürlichen Zeitpunkten im Östrus kann die Ergebnisse in Bezug auf die Wurfgröße also beeinflussen und sollte daher standardisiert zu festgelegten Zeitpunkten im Proöstrus/Östrus erfolgen. Eine zweite Studie untersuchte bei 13 Hündinnen unter anderem AMH während der Trächtigkeit im Verhältnis zur Wurfgröße. Die trächtigen Hündinnen wurden in drei Gruppen eingeteilt: G1A (1-2 Welpen), G1B (3-4 Welpen) und G1C (5-11 Welpen). AMH wurde am ersten Tag der Paarung und am 12. Tag der Trächtigkeit gemessen. Es gab keinen Unterschied im AMH-Spiegel zwischen trächtigen und nicht trächtigen Hündinnen (Evci et al. 2023). Am 12. Tag der Trächtigkeit hatte Gruppe G1B höhere AMH-Werte als G1A. Allerdings wies Gruppe G1C, die Gruppe mit der größten Anzahl an Welpen, niedrigere AMH-Werte auf als Gruppe G1B (Evci et al. 2023). Selbst während der Trächtigkeit scheint AMH also keinen verlässlichen Hinweis auf die Wurfgröße geben zu können.

2. Zyklus der Hündin

Der Eintritt der Geschlechtsreife ist durch das Auftreten der ersten Läufigkeit gekennzeichnet. Diese tritt meist auf, wenn das adulte Körpergewicht erreicht ist und variiert daher je nach Rasse. Kleinere Rassen sind früher geschlechtsreif als größere Rassen (Sokolowski 1977). Hier sind Zeiträume von sechs bis 24 Monaten beschrieben, in denen die erste Läufigkeit beginnt (Goodman 1992, Reichler et al. 2012). Die Hündin gehört zu den asaisonal monoöstrischen Tieren (Sokolowski 1977) und die durchschnittlichen Läufigkeitsintervalle betragen sechs bis sieben Monate (Sokolowski 1977, Goodman 1992). Es ist aber auch eine Streuung der Läufigkeitsintervalle von vier bis 12 Monaten beschrieben, wobei die Dauer eines Läufigkeitsintervalls bei der individuellen Hündin meist konstant ist (Bouchard et al. 1991, Reichler et al. 2012). Der Läufigkeitszyklus unterteilt sich in vier Phasen: Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Anöstrus. Der Proöstrus bildet gemeinsam mit dem Östrus die Läufigkeit (Günzel-Apel und Bostedt 2016).

2.1 Proöstrus

Der Proöstrus kennzeichnet den Beginn der Läufigkeit. Die Dauer des Proöstrus beträgt durchschnittlich neun Tage, wobei Schwankungen von drei bis 27 Tagen beschrieben sind (Sokolowski 1977, Reichler et al. 2012). Klinische Anzeichen des Proöstrus sind eine prall angeschwollene Vulva, blutiger Vaginalausfluss und Attraktivität für Rüden, aber noch keine Deckbereitschaft (Jöchle und Andersen 1977). Im Verlauf des späten Proöstrus wird die Vulva weicher und der Vaginalausfluss stellt sich fleischwasserfarben dar. Im Proöstrus findet die Follikelreifung statt (Concannon 2011).

2.2 Östrus

Der Östrus kann als Zeitraum der Paarungsbereitschaft angesehen werden. Er dauert etwa neun Tage, wobei auch hier Schwankungen von vier bis 24 Tagen beschrieben sind (Reichler et al. 2012). Die Vulva ist nicht mehr so stark ödematisiert und weicher und die Hündin ist deckbereit. Die Ovulationen beginnen meistens am 2.-4. Tag des Östrus und dauern 24-48 Stunden an (Reichler et al. 2012). In den letzten Tagen des Östrus beginnt die Gelbkörperanbildung.

2.3 Metöstrus

Der Metöstrus ist äußerlich durch das Abklingen der Paarungsbereitschaft gekennzeichnet. In einigen Literaturquellen wird der Metöstrus mit der Lutealphase gleichgesetzt und die Phase der Gelbkörperregression und der Endometriumreparation schon dem Anöstrus zugeordnet (de Gier et al. 2006). Werden diese Phasen zusammengefasst, resultiert für den Metöstrus eine Gesamtdauer von 4,5 Monaten, bestehend aus durchschnittlich 2 Monaten Lutealphase (Trächtigkeit oder Scheinträchtigkeit) und etwa 2,5 Monaten Endometriumreparation (Günzel-Apel und Bostedt 2016).

2.4 Anöstrus

Ist der Metöstrus beendet, wird der Begriff Anöstrus ausschließlich für die Phase der Ovarruhe verwendet. Dieser ist gekennzeichnet von vollständig wiederhergestelltem und hormonell unbeeinflusstem Endometrium (Jöchle und Andersen 1977, Günzel-Apel 1994). Diese Zyklusphase ist in ihrer Dauer am variabelsten und individuell verschieden. Bis zum nächsten Proöstrus können ein bis drei oder sogar bis zu sechs Monate vergehen (Günzel-Apel und Bostedt 2016).

3. Endokrinologie im Zyklus der Hündin

Die übergeordneten Zentren der neuroendokrinen Steuerung des Zyklus der Hündin sind der Hypothalamus und die Hypophyse. Die von ihnen ausgeschütteten Hormone wirken auf die Ovarien als Zielorgane (Günzel-Apel und Bostedt 2016)(Abb. 3). Der Hypothalamus setzt pulsatil Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) frei, welches über ein kapilläres Portalsystem zum Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse) gelangt (Concannon 2009). Reagierend auf die GnRH-Freisetzung kommt es durch die Hypophyse zur Freisetzung von Follikelstimulierendem Hormon (FSH) und Luteinisierendem Hormon (LH). Die Ovarien synthetisieren die Sexualsteroid Östrogen und Progesteron. Im Anöstrus befinden sich die Sexualsteroid im Bereich ihrer Basalwerte. Die Progesteronwerte betragen $< 1 \text{ ng/ml}$ und die Östradiolwerte $< 10 \text{ pg/ml}$ (de Gier et al. 2006). Beginnt die Freisetzung von GnRH und somit auch von FSH, bewirkt dies die Anbildung und Reifung der Ovarfollikel. Diese synthetisieren dann proportional zu ihrer Quantität und Größe Östrogen. Das in den Granulosazellen der

wachsenden Follikel produzierte Inhibin hat gemeinsam mit der negativen Rückkopplungswirkung der Ovarsteroiden einen hemmenden Effekt auf die FSH-Synthese (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Dies verhindert die ungehemmte Anbildung von weiteren Primordialfollikeln. Die im Endstadium der Follikelreifung maximalen Östrogenkonzentrationen von 40 bis 90 pg/ml führen durch ein positives Feedback auf die Hypophyse zu einer starken LH-Freisetzung (Reichler et al. 2012). Dieser LH-Peak führt zur Luteinisierung der Granulosazellen und nach etwa 48 bis 60 Stunden zur Ovulation (Concannon 2011). Die Luteinisierung der Granulosazellen bewirkt außerdem einen Progesteronanstieg auf (je nach verwendetem Assay) 4 bis 10 ng/ml zum Zeitpunkt der Ovulation (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Die Theka- und Granulosazellen bilden sich nach der Ovulation in Thekalutein- und Granulosaluteinzellen um (Luteinisierung) (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Der so entstandene Gelbkörper (Corpus luteum) produziert weiterhin Progesteron und so finden sich im Blut bis zum 25. Tag nach der Ovulation Progesteronwerte von 15 bis 60 ng/ml (Concannon 2011). Das Bestehen des Gelbkörpers wird durch das von der Hypophyse freigesetzte Prolaktin unterstützt, welchem eine luteotrope Wirkung zugesprochen wird (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Da sowohl bei einer Trächtigkeit als auch bei einer Scheinträchtigkeit der Gelbkörper über eine Dauer von etwa 60 Tagen bestehen bleibt, eignet sich Progesteron nicht zum Trächtigkeitsnachweis. Zwischen dem 60. und 90. Tag nach der Ovulation sinkt der Progesteronwert wieder auf < 1 ng/ml (Concannon 2011, Reichler et al. 2012).

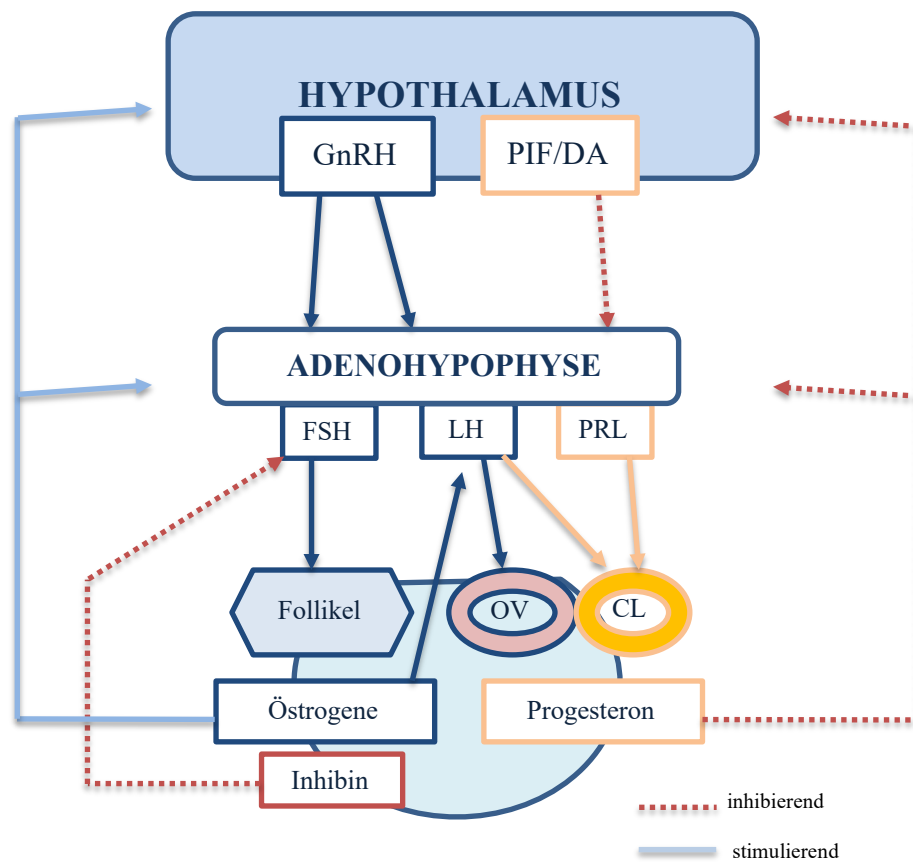


Abb. 3 (eigene Grafik): Endokrine Steuerung des Zyklus bei der Hündin (aus Günzel-Apel und Bostedt 2016)

CL: Corpora lutea; DA:Dopamin; FSH: Follikelstimulierendes Hormon; GnRH: Gonadotropin Releasing Hormon; LH: Luteinisierendes Hormon; OV: Ovulation; PIF: Prolaktin Inhibierender Faktor; PRL: Prolaktin; dunkelblau: follikulotrope Achse; orange: luteotrope Achse

3.1 Anti-Müller-Hormon im Verlauf des Zyklus der Hündin

Das Anti-Müller-Hormon ist dem Inhibin strukturell sehr ähnlich (Rzeszowska et al. 2016) und wird in der Follikulogenese ebenfalls von den Granulosazellen der heranwachsenden Follikel gebildet. Ähnlich wie Inhibin hemmt es die Produktion von FSH und reguliert so die Follikelressourcen (Visser et al. 2006). Eine Studie mit fünf Beaglehündinnen untersuchte den Verlauf von AMH vom späten Anöstrus bis zum Östrus (Nagashima et al. 2016). Es wurden drei- bis siebenmal in der Woche AMH-Proben genommen, wobei sich die Frequenz der Probennahme im Proöstrus steigerte. Der LH-Peak und die Ovulation wurden mittels Progesteronmessungen nachvollzogen. Es stellte sich heraus, dass die Basalwerte im Anöstrus individuell sehr verschieden sind. Sie lagen zwischen 0,21 und 0,58 ng/ml (Nagashima et al. 2016). Neun bis acht Tage vor dem LH-Peak konnte ein Anstieg der AMH-Konzentration von durchschnittlich 0,3 ng/ml auf 0,6 ng/ml festgestellt werden. Vier Tage vor dem LH-Peak lagen die AMH-Werte wieder etwa auf dem ursprünglichen Basalwert (Nagashima et al. 2016) (Abb. 5). Eine andere Studie hat 20 Hündinnen wöchentlich ab sechs Wochen vor Beginn der Läufigkeit und dann zwei- bis achtmal im Proöstrus und Östrus untersucht. Der Zyklusstand wurde über die Messung von Progesteron detektiert, wobei sich die Hündin bei > 2 ng/ml im Östrus befand und die Ovulation bei 8 bis 10 ng/ml stattfand (Walter et al. 2019). Auch hier konnte ein deutlicher AMH-Anstieg vom späten Anöstrus bis etwa sechs Tage vor der Ovulation, was dem Proöstrus entspricht, nachgewiesen werden. Danach erfolgte ein deutlicher Abfall hin zum präovulatorischen Östrus. Die höchsten AMH-Werte konnten etwa ab drei Wochen vor der Ovulation bis zu sechs Tage vor der Ovulation gemessen werden. Die niedrigsten AMH-Werte wurden im Metöstrus und Anöstrus gemessen (Walter et al. 2019) (Abb. 4). Auch hier wurden die individuell sehr unterschiedlichen AMH-Werte bemerkt. Die AMH-Werte im Zyklusverlauf lagen zwischen 0,09 und 2,65 ng/ml und wurden mit einem für Hunde validierten humanmedizinischen ELISA gemessen (Walter et al. 2019).

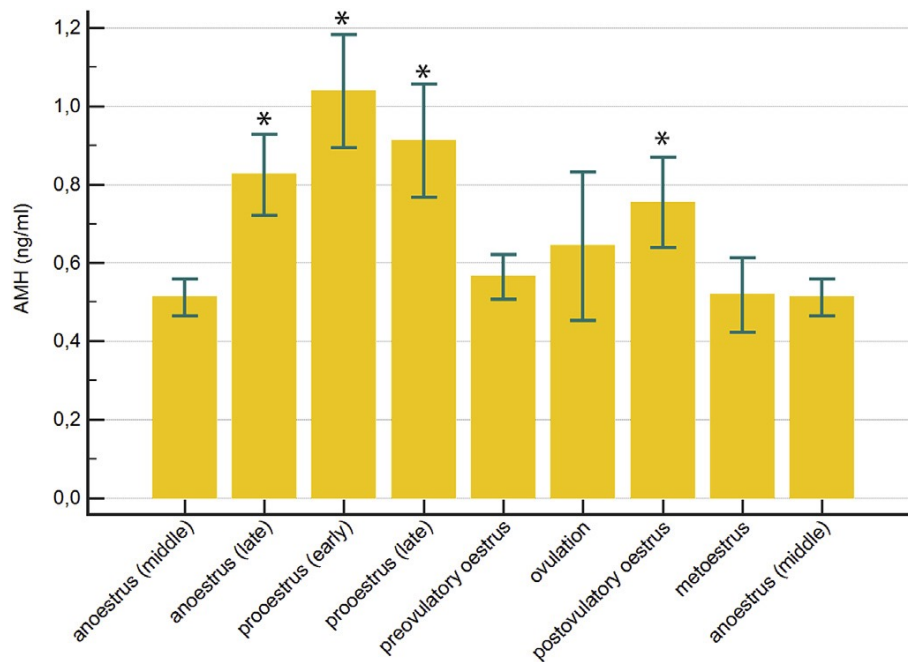


Abb. 4: Balkendiagramm über die mittleren AMH-Werte im Zyklus der Hündin.

* markieren die Zyklusphasen mit signifikant höheren AMH-Werten als im mittleren Anöstrus (aus Walter et al. 2019)

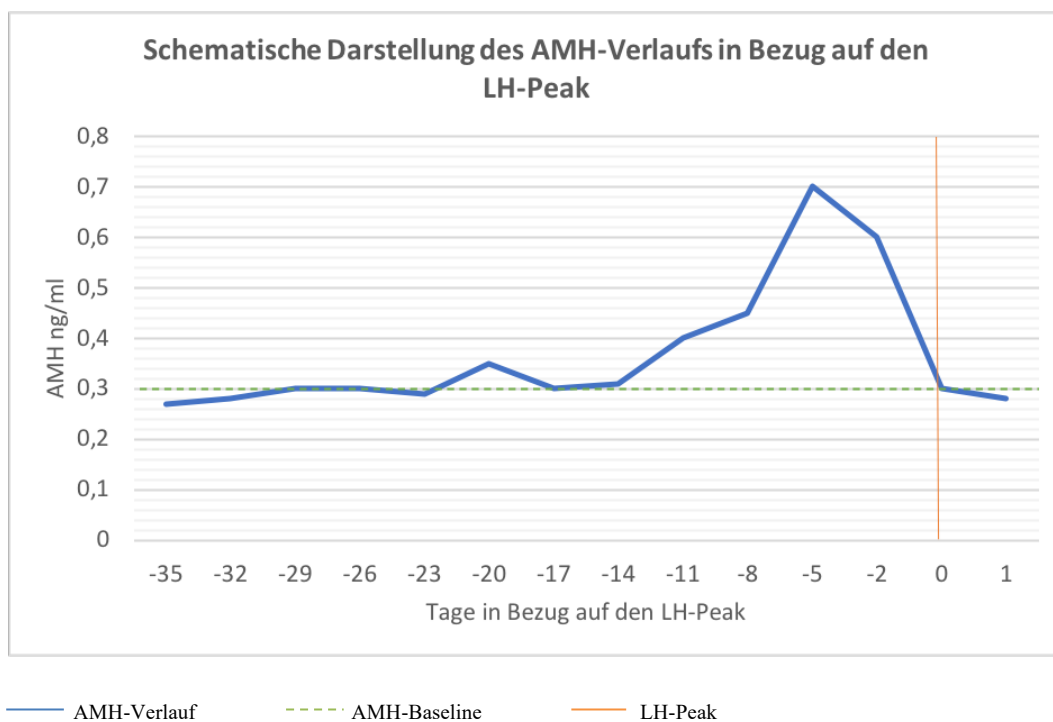


Abb. 5: Schematische Darstellung des AMH-Verlaufs in Bezug auf den LH-Peak (aus Nagashima et al. 2016)

4. Deckzeitbestimmung bei der Hündin

Die Deckzeitbestimmung dient der Festlegung des optimalen Bedeckungszeitpunktes in der Läufigkeit. Sie setzt sich aus der gynäkologischen Untersuchung, der Vaginalzytologie und der Messung von Progesteron zusammen und hat das Ziel, die Ovulation nachzuweisen (Bunck und Günzel-Apel 2016). Aufgrund des individuell sehr variablen Zeitraums zwischen Läufigkeitsbeginn und Ovulation führen nur konsequente Verlaufskontrollen zu einer Eingrenzung des Ovulationstermins. Eine erste Untersuchung innerhalb der ersten drei Tage der Läufigkeit hat sich als sinnvoll erwiesen (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Danach können die Untersuchungsintervalle je nach Zyklusstand angepasst werden.

4.1 Gynäkologische Untersuchung

4.1.1 Anamnese

Eine gezielte Erhebung des Vorberichtes kann im Rahmen der Deckzeitbestimmung erste Hinweise auf unphysiologische Läufigkeiten oder andere gynäkologische Probleme geben, die die Fertilität beeinträchtigen. Zu den wichtigsten Auskünften gehören Informationen über das Allgemeinbefinden (Aktivität, Wasseraufnahme und Harnabsatz), Zeitpunkt und Verlauf der letzten Läufigkeit sowie die Regelmäßigkeit der vorangegangenen Läufigkeiten und deren Dauer (Reichler et al. 2012). Die Anzahl der bisherigen Zuchteinsätze und die Wurfgröße und der Verlauf der Geburt bei erfolgreichem Zuchteinsatz sind ebenfalls zu erfassen. Sollte der Zuchteinsatz erfolglos gewesen sein, ist es von Interesse, ob zuvor eine Deckzeitbestimmung durchgeführt wurde und wie es um die Fertilität des Deckrüden steht (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Für die Deckzeitbestimmung werden die Hündinnen meist in der Läufigkeit vorgestellt und es sollte erfragt werden, seit wie vielen Tagen blutiger Vaginalausfluss zu beobachten ist, um einen ungefähren Eindruck des Zyklusstandes zu erhalten. Aktuell oder vor kurzem eingesetzte Medikamente, insbesondere Hormone und Antibiotika, sollten ebenfalls erfasst werden (Günzel-Apel und Bostedt 2016).

4.1.2 Adspektion und äußere Untersuchung

Bei der Adspektion und äußeren Untersuchung werden vor allem die durch den Östrogeneinfluss bedingten gynäkologischen Veränderungen erfasst. Dazu gehört das Vorhandensein von Vaginalausfluss und die Beurteilung von Menge und Farbe (blutig,

fleischwasserfarben) (Bunck und Günzel-Apel 2016). Hier ist es ratsam auch auf Sekretspuren unterhalb der Rute und an den Hintergliedmaßen zu achten. Auf einem weißen angefeuchteten Tupfer lässt sich die Qualität des Vaginalausflusses am besten beurteilen (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Im frühen Proöstrus ist der Vaginalausfluss typischerweise dunkelrot und blutähnlich, verändert sich aber dann zur Ovulation hin zu hellrosa und fleischwasserähnlich (Concannon 2011, Günzel-Apel und Bostedt 2016). Die Absonderung von Läufigkeitssekret kann vollständig fehlen oder bis in den Metöstrus hineinreichen und stellt deshalb kein sicheres Kriterium für die Zyklusdiagnostik dar. Die Vulva wird auf Größe und Konsistenz untersucht. Unter Östrogeneinfluss wird die Vulva im Proöstrus ödematös und prall (Goodman 2001). Durch das Absinken der Östrogenkonzentration zum Östrus wird die Vulva wieder kleiner und von teigiger Konsistenz (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Die Prüfung der Vulvakonsistenz erfolgt durch leichten Druck mit dem Zeigefinger auf den dorsalen Vulvabereich. Hierbei kann gleichzeitig die Auslösbarkeit des Duldungsreflexes überprüft werden (Bunck und Günzel-Apel 2016, Johnston et al. 2001).

4.1.3 Vaginoskopie

Dem Verlauf des Östrogenspiegels folgend, ändert die Vaginalschleimhaut ihr Erscheinungsbild im Laufe des Sexualzyklus erheblich (Concannon 2011). Für die Beurteilung der Vaginalschleimhaut wird ein Vaginoskop, vorzugsweise mit integrierter Lichtquelle, verwendet. Dieses wird angewärmt, gleitfähig gemacht und dann unter Spreizung der Labien in dorsaler Richtung in den Scheidenvorhof eingeführt (Reichler et al. 2012). Beim Passieren des Hymenalringes tritt ein leichter Widerstand auf. Danach wird das Vaginoskop nach horizontal gekippt und schonend etwas weiter vorgeschoben (Reichler et al. 2012). Unter langsamem Zurückziehen lässt sich die Vaginalschleimhaut gut beurteilen. An der Vaginalmukosa werden Ödematisierungsgrad, Faltenform, Farbe und Feuchtigkeit beurteilt (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Der Östrogenanstieg im Proöstrus führt zu einer besseren Durchblutung und interstitieller Flüssigkeitsretention in der Vaginalmucosa. Im frühen Proöstrus ist die Schleimhaut gering- bis mittelgradig geschwollen und verschließt das Lumen noch nicht vollständig. Sie ist rosa und feucht glänzend. Mit fortschreitendem Proöstrus ist die Schleimhaut ausgeprägt ödematisiert und legt sich Falten (Blockmalzstruktur) (England und von Heimendahl 2010). Die Oberfläche erscheint blassrosa und feucht glänzend. Die wieder sinkenden Östrogenkonzentrationen im Östrus führen zu einem Abquellen der Schleimhaut und es tritt eine beginnende Sekundärfältelung auf ihrer Oberfläche auf. Zusätzlich zum

Östrogenabfall trägt auch der präovulatorische Progesteronanstieg dazu bei, dass die Schleimhaut matt und pappig wird; die Schleimhaut erscheint blass (Reichler et al. 2012).

4.2 Vaginalzytologie

Der Aufbau des Vaginalepithels unterliegt den hormonellen Einflüssen der Follikelreifung. Während die Vagina im Anöstrus von einem zwei- bis dreischichtigen Plattenepithel aus Basalzellen ausgekleidet ist, proliferieren und verhornen die Zellschichten unter Östrogeneinfluss (Goericke-Pesch et al. 2010). In der Läufigkeit kann das Epithel bis zu 20 Schichten, bestehend aus Basal-, Parabasal-, Intermediär- und Superfizialzellen sowie kernlosen Schollen, umfassen (Reichler et al. 2012).

4.2.1 Probenentnahme

Um Kontaminationen mit Zellen des Vestibulums zu vermeiden, wird ein mit Kochsalzlösung angefeuchteter Watteträger durch ein Vaginoskop oder Spekulum in die Scheide eingeführt (Wehrend et al. 2013). Der Watteträger wird unter drehenden Bewegungen am Scheidendach entlanggeführt (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Die so gewonnenen Zellen werden auf einen Objektträger abgerollt. Dieser wird luftgetrocknet und dann gefärbt. Es empfiehlt sich, stets zwei Ausstriche anzufertigen (Günzel-Apel und Bostedt 2016).

4.2.1 Färben von Vaginalabstrichen

Ziel bei der Untersuchung von Vaginalabstrichen im Rahmen einer Zyklusdiagnostik ist es, die verhornten Superfizialzellen von den übrigen Zellen unterscheiden zu können. Hierfür eignet sich die Färbung nach Papanicolaou, in der sich die azidophilen verhornten Superfizialzellen rotorange und die tieferen Zellschichten blaugrün anfärben (Kraft und Dürr 1997). Diese Färbemethode ist mit etwa 30 Minuten recht zeitaufwändig, gibt aber eindeutigen Aufschluss über die Zellverteilung (Suter 2012). Die Zellen können alternativ auch anhand ihrer Morphologie unterschieden werden, wofür eine Diff-Quick-Färbung ausreichend ist (Johnston et al. 2001).

4.2.3 Beurteilung der Zellen

Das Oberflächenepithel der Vagina besteht aus einem Stratum basale, einem Stratum intermedium und einem Stratum superficiale. Die im Vaginalabstrich vorliegenden Zellen werden hinsichtlich ihrer Form, Größe, dem Verhältnis von Zellkern zu Zytoplasma, dem

Verhornungsgrad, ihrer Randbeschaffenheit und ihrer Lage zueinander beurteilt (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Basalzellen reagieren basophil, sind zylindrisch mit basalständigem Kern und zwischen 10 bis 20 μm groß. Parabasalzellen sind basophil, von runder Form mit mittelständigem Kern und 15 bis 20 μm groß (Kraft und Dürr 1997). Die Intermediärzellen reagieren ebenfalls basophil, sind eher länglich-ellipsoid mit einem großen Kern. Sie sind 20 bis 30 μm groß. Die unteren Superfizialzellen reagieren sowohl basophil als auch azidophil, sind polygonal mit einem großen Kern. Sie messen zwischen 35 und 65 μm (Kraft und Dürr 1997). Bei den oberen Superfizialzellen zeigt sich eine Kernpyknose (Verdichtung des Chromatins im Zellkern), sonst verhalten sie sich ähnlich zu den unteren Oberflächenzellen (Kraft und Dürr 1997). Nach der Schrumpfung des Zellkerns bezeichnet man die zellkernlosen Zellen als Schollen. Sie sind hauptsächlich azidophil und von gleicher Größe wie die Superfizialzellen (Dreier 2005). Im Anöstrus liegen nur wenige Schichten von Basalzellen vor. Die östrogeninduzierte Proliferation der Vaginalzellen führt dazu, dass neben den Basalzellen im Proöstrus auch Parabasal- und Intermediärzellen nachweisbar sind. Entsprechend der Proöstrusblutung sind auch Erythrozyten und vereinzelt Leukozyten zu finden (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Durch den weiteren Östrogenanstieg nehmen Intermediärzellen prozentual zu und Superfizialzellen treten auf. Die oberflächlichen Zellen verhornen kontinuierlich, so dass schließlich Superfizialzellen mit pyknotischem Kern und kernlose Schollen überwiegen (Abb. 6) (Johnston 2001). Diese machen gemeinsam etwa sieben Tage vor der Ovulation und sechs bis sieben Tage nach der Ovulation 100% der Zellen aus, weshalb sie keinen eindeutigen Hinweis auf den Zeitpunkt der Ovulation geben (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Untersuchungen haben aber gezeigt, dass rund 75% der Hündinnen am ersten Tag der maximalen Verhornung ovulieren (Reichler et al. 2012). Der Verhornungsgrad der Zellen kann in polychromatisch gefärbten Ausstrichen (Papanicolau-Färbung) anhand des Eosinophilie-Index (EI) oder Azidophilie-Index (AI) erfasst werden. Die verhornten Zellen sind eosinophil (azidophil) und färben sich orange-rot. Etwa sieben Tage vor der Ovulation liegt der EI auf einem Niveau von $> 70\%$ (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Auch die Randbeschaffenheit und Lage der Vaginalzellen unterscheidet sich je nach Zyklusstand. Sind in der frühen bis fortgeschrittenen Follikelphase die Ränder der in Gruppen liegenden Superfizialzellen umgeschlagen, so liegen sie ovulationsnah eher einzeln und plan mit glatten Rändern auf dem Objektträger (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Etwa sechs Tage nach der Ovulation beherrschen wieder die tiefen Basalzellen das Zellbild.

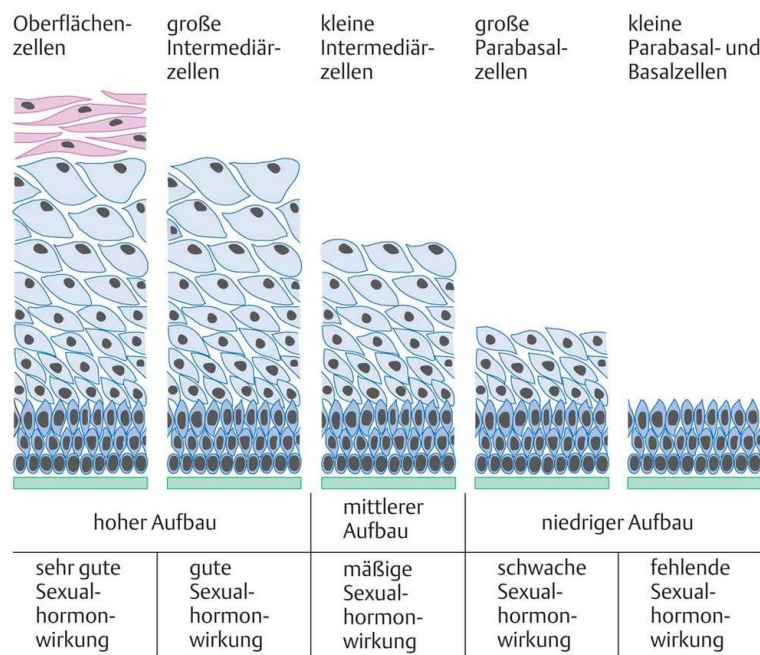


Abb. 6: Schematische Darstellung des Vaginalepithels im Verlauf des Sexualzyklus aus Nauth (2002)

4.3 Progesteronbestimmung

Ergänzend zu der gynäkologischen Untersuchung und der Vaginalzytologie hat sich die Messung des präovulatorischen Progesteronanstiegs mittels ELISA aus einer Serumprobe bewährt (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Während des Proöstrus liegen die Progesteronwerte, je nach verwendetem Assay, auf einem Basalniveau von $< 0,25$ ng/ml bis 1 ng/ml (Concannon 2009, Brugger et al. 2011). Kommt es dann präovulatorisch zu der Luteinisierung der Follikelzellen, produzieren diese vermehrt Progesteron und führen zu einem Progesteronanstieg (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Präovulatorisch werden, je nach verwendetem Assay, Progesteronwerte von 3 ng/ml bis 8 ng/ml gemessen (Brugger et al. 2011). Höhere Werte sprechen für eine stattgefundenene Ovulation und das Vorhandensein eines Gelbkörpers (Günzel-Apel und Bostedt 2016). In Ovulationsnähe finden sich also eine teigige, nicht mehr so stark ödematisierte Vulva, abquellende, blasse und trockene Vaginalschleimhaut, Superfizialzellen und Schollen, die einzeln und plan liegen, sowie ein dem Assay entsprechender Progesteronwert.

III. PUBLIKATION

Correlation of Anti-Müllerian hormone serum concentration measured in proestrus and estrus with the litter size as a fertility marker in bitches

Theresa Hornberger¹, med. vet.

Sven Reese², PD Dr. med. vet.

Andrea Meyer-Lindenberg¹, Prof. Dr. med. vet.

Beate Walter¹, Dr. med. vet. habil.

¹ Clinic of Small Animal Surgery and Reproduction at the Centre for Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Veterinaerstr. 13, 80539 Munich, Germany

² Chair of Anatomy, Histology and Embryology, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Veterinaerstr. 13, 80539 Munich, Germany

Die Publikation wurde am 24. November 2024 im Journal „Domestic Animal Endocrinology“ eingereicht und am 25. November 2024 zur Veröffentlichung akzeptiert. Am 28. November 2024 wurde der Originaltext online publiziert.

Unter Berücksichtigung der in der Literaturübersicht erläuterten Einflussfaktoren auf AMH wurde in dieser Arbeit die Korrelation von AMH und Wurfgröße bei der Hündin untersucht. AMH wurde zu zwei festgelegten Zeitpunkten im Proöstrus und Östrus bestimmt und mit der Wurfgröße in Korrelation gesetzt. Hierfür wurden Hündinnen mit ähnlichem Körpergewicht paarweise verglichen. Es ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen AMH und Wurfgröße.

In der folgenden Veröffentlichung werden der Studienaufbau und die Ergebnisse näher erläutert und diskutiert.



Contents lists available at ScienceDirect

Domestic Animal Endocrinology

journal homepage: www.journals.elsevier.com/domestic-animal-endocrinology

Correlation of Anti-Müllerian hormone serum concentration measured in proestrus and estrus with the litter size as a fertility marker in bitches

Theresa Hornberger^{a,*}, Sven Reese^b, Klaus Perbandt^c, Andrea Meyer-Lindenberg^a, Beate Walter^{a,*}^a Clinic of Small Animal Surgery and Reproduction at the Centre for Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Veterinaerstr. 13, 80539 Munich, Germany^b Chair of Anatomy, Histology and Embryology, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Veterinaerstr. 13, 80539 Munich, Germany^c Freelance Mathematician, Rotenhöfer Weg 4, 24768 Rendsburg, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Anti-Müllerian hormone
Bitch
Estrous cycle
Fertility
Litter size

ABSTRACT

The use of the anti-Müllerian hormone (AMH) serum concentration as a fertility marker has been shown in cows, sheep and mares and has been indicated in one study in female dogs. The aim of this study was to investigate the connection between the AMH serum concentration, taken at two defined time points during the bitch's heat, and the litter size to investigate whether AMH can be used as a practical measurement for the individual breeding bitch to predict litter size. The study was carried out on 27 healthy female dogs presented for pre-breeding examination, considering all previously known influencing factors on AMH in the bitch such as age, body weight and estrous cycle phase at the time the sample was taken. Due to the AMH increase in early proestrus and its drop around ovulation, AMH was measured in blood samples taken within the first three days of heat (AMH1) and near ovulation (AMH2) with AMH1 being significantly higher than AMH 2 ($p < 0.001$). There was a highly significant negative correlation of body weight and AMH at both sampling times ($p < 0.001$). There were no significant results when the dogs were paired and grouped according to high or low AMH concentrations, but a significant effect of AMH serum concentration on litter size was found in the multifactorial analysis when the dogs were matched according to their body weight (AMH1: $p = 0.022$; AMH2: $p = 0.030$). In conclusion, a significant effect of the AMH concentration and the litter size among female dogs with matching body weight could be found, but a much larger sample collection is needed to evaluate reference intervals for AMH for bitches of different weight to predict the fertility of an individual bitch in the future.

1. Introduction

Anti-Müllerian hormone (AMH) is a dimeric glycoprotein secreted by the granulosa cells of the ovarian follicles in females and the Sertoli cells of the testes in males [1]. In recent years AMH determination replaces the measurement of follicle stimulating hormone (FSH) as a reliable endocrine marker for ovarian reserve in human medicine [2]. In veterinary medicine AMH has been described as a fertility marker in cows and mares to select suitable individuals for superovulation programs in cows and donor mares for embryo transfer [3–5]. In dogs AMH can be used to prove cryptorchidism and ovarian remnant syndrome, to diagnose tumorous degeneration of granulosa and Sertoli cells and to determine the castration status of individuals with unknown history [6–13]. In one

study the use of AMH as a predictor of litter size by taking AMH samples at a variable point during estrus has been evaluated [14]. The authors showed that within one breed size, bitches with higher AMH values had larger litter than bitches with lower AMH concentrations. For each 1 ng/ml increase in AMH the litter size increased by 0.3 pups. Another study examined, among other things, AMH during pregnancy in relation to litter size in 13 bitches. The pregnant bitches were divided into three groups. G1A (1–2 puppies), G1B (3–4 puppies) and G1C (5–11 puppies). AMH was measured on the first day of mating and on day 12 of gestation. There was no difference in the AMH levels between the pregnant and non-pregnant bitches. On day 12 of pregnancy, group G1B had higher AMH levels than G1A. However, group G1C, the group with the largest number of puppies, again showed lower AMH values than G1B.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: theresahornberger@web.de (T. Hornberger), Beate.Walter@lmu.de (B. Walter).<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2024.106897>

Received 21 May 2024; Received in revised form 24 November 2024; Accepted 25 November 2024

Available online 28 November 2024

0739-7240/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Body weight was not taken into account in the groups and was examined separately in relation to AMH [15].

Furthermore, changes of the AMH concentration over the estrus cycle in intact bitches have been described [16,17]. The highest AMH concentrations were reached in the last three weeks before the onset of heat until six days before ovulation, which represents the phase of growing pre-antral and small antral follicles, with high inter-individual and intra-individual variation [16,17]. Further Walter et al. (2019) [17] showed a significant decrease over the last three days before ovulation. With this knowledge the time of serum sample collection for AMH measurement should be chosen carefully to get comparable results. The aim of this study was to collect blood serum samples for AMH measurement at certain points in heat and to correlate them with the litter size.

2. Materials and methods

2.1. Animals

For the study 27 healthy, sexually mature bitches, presented to our clinic for pre-breeding examination, were examined. They belonged to 17 different breeds which were Newfoundland (n = 4), Boxer (n = 3), Rhodesian Ridgeback (n = 3), Kooikerhondje (n = 2), Chinese Crested (n = 2), German Pinscher (n = 2), French Bulldog (n = 1), Jack Russel Terrier (n = 1), Parson Russel Terrier (n = 1), Bouvier des Ardennes (n = 1), Border Collie (n = 1), Bullterrier (n = 1), Dobermann (n = 1), Flat Coated Retriever (n = 1), Dalmatian (n = 1), Chesapeake Bay Retriever (n = 1) and PON (n = 1). They were at the age of 2 years (n = 4), 3 years (n = 3), 4 years (n = 7), 5 years (n = 5), 6 years (n = 6) and 7 years (n = 2). Because of the knowledge, that bitches with lighter bodyweight have higher AMH concentrations [14,17], the bitches were divided in groups of <15 kg (n = 7), 15–30 kg (n = 10) and > 30 kg (n = 10). All bitches had at least one normal estrous cycle previously, 15 bitches had one or more litters so far and there weren't any abnormalities in their current estrous cycle. None of the bitches had a systemic disease. All bitches, except of two, were mated with stud dogs that all had sired one or more litters within the last year. Natural mating took place in every case except of one, which got artificial insemination.

2.2. Blood sample collection

All blood samples were collected during routine pre-breeding examinations.

The first examination was performed between day one and three of heat. Further examinations were undertaken every two to three days starting on day seven or eight until ovulation took place. All bitches were examined two to six times during proestrus and estrus. The pre-breeding examinations included the documentation of behavior, the inspection of the vulva, vaginoscopy, vaginal cytology and the determination of serum progesterone concentration. The first occurrence of serosanguinous vaginal discharge represented the beginning of proestrus. Serum progesterone concentration was the main parameter to determine the first day of estrus as well as ovulation. Blood samples were centrifuged by 600 G for ten minutes, the supernatant was taken and divided into two aliquots. One sample was immediately used for progesterone determination, the other one was stored by -20°C for AMH measurement later on. All owners provided signed consent for the collection of data for the purpose of treatment and care of animals, as well as for research and agreed, that the collected serum samples for progesterone measurement may be used additionally for AMH measurement.

2.3. Hormone analysis

Serum progesterone concentrations were measured with an enzyme linked fluorescence assay (miniVidas; Inc. Biomerieux, Marcy-l'Étoile,

France), which has been validated for the bitch [18]. The start of estrus was defined as the rise of progesterone above 2 ng/ml. Ovulation took place at serum progesterone concentrations between 8 and 10 ng/ml and with progesterone concentrations higher than 10 ng/ml ovulation was confirmed.

Because of highest AMH concentrations at early proestrus and the significant decrease over the last three days before ovulation [17], AMH was measured in the serum samples taken on day one to three (AMH1) and the ones taken nearest to ovulation (AMH2), which means one day before, the day of or one day after ovulation. Out of this results the decrease of AMH (AMHd) from proestrus to ovulation was calculated. The main focus was on the AMH1 values, as these represent the early phase of folliculogenesis and thus the development of potentially fertilizable eggs [16].

Measurement of AMH was performed at a commercial laboratory (Laboklin GmbH & Co. kg, Bad Kissingen, Germany). Serum concentrations of AMH were determined using a chemiluminescence immunoassay on a cobas E602 analyser (Roche Diagnostics Deutschland GmbH) using murine anti-AMH-antibodies. The test was validated for dogs [17]. Minimum detection limit of the AMH test was 0.01 ng/ml and maximum detection limit was 23 ng/ml. This test was also used to examine AMH concentrations throughout the estrus cycle of the bitch.

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS 29.01 software. First, the data were tested for normality using the Shapiro-Wilk test. No data set showed a significant deviation from a normal distribution. The mean and standard deviation were calculated for descriptive statistical summary of the data. A paired sample t-test was used to compare AMH serum concentrations at the two time points. In a primary unifactorial analysis, the correlation coefficient Pearson r was calculated to detect possible associations between litter size AMH1 and AMH2, as well as body weight and age of the bitches. Since body weight had a significant relationship with both litter size and AMH concentrations at both time points, bitches with approximately the same body weight were paired and subjected to a multifactorial matched pairs analysis for those parameters with unifactorial significant relationships. This was done using the generalized linear model (GLM) in the variation for repeated measurements (GEE). Litter size was set as the dependent variable, and body weight and AMH concentration at both time points were the predictor variables. In addition, a possible interaction between body weight and AMH1 as well as AMH2 was tested. A significance level of $p = 0.05$ was chosen.

3. Results

The mean AMH1 serum concentration of the 27 bitches was 1.36 ± 0.63 ng/ml, which was significantly higher (26.9 %) than the AMH2 serum concentration of 0.99 ± 0.50 ng/ml ($p < 0.001$) (Table 1). Three bitches did not become pregnant, but in none of the cases was there an abnormally low AMH serum concentration. These animals were not included in the following unifactorial correlation analysis of litter size with the other measured parameters.

Ovulation occurred in all bitches examined, which was confirmed using progesterone.

Correlation analysis revealed highly significant negative correlations between body weight (BW) and AMH concentrations at both sampling times (BW-AMH1: $r = -0.68$, $p < 0.001$; BW-AMH2: $r = -0.60$, $p < 0.001$) as shown in Fig. 1. No significant relationship could be found between age and AMH concentrations (age-AMH1: $r = -0.291$, $p = 0.141$; age-AMH2: $r = -0.227$, $p = 0.255$).

The strongest influence on litter size is body weight ($r = 0.543$, $p = 0.006$) as shown in Fig. 2, whereas no significant influence is found for age on litter size ($r = 0.205$, $p = 0.337$). At the same time, a higher AMH serum concentration seems to be associated with a decrease in litter size

Table 1

Overview of all taken samples and calculation of the AMH decrease from proestrus to ovulation listed in ascending order of weight.

Breed	Weight in kg	Age in years	AMH1 ng/ml early proestrus	AMH2 ng/ml ovulation	AMHdecrease ng/ml AMH2 – AMH1	Litter size
Jack Russel Terrier	5	5	1.23	1.03	-0.2	3
Parson Jack Russel	7	6	2.32	2.06	-0.26	4
Kooikerhondje	7	2	2.66	2.35	-0.31	4
Chinese Crested	8	2	2.52	1.41	-1.11	5
French Bulldog	10	4	1.74	1.02	-0.72	3
Chinese Crested	12	5	0.99	1.02	0.03	4
Kooikerhondje	15	6	1.89	1.24	-0.65	6
German Pinscher	17	4	1.66	1.4	-0.26	7
Border Collie	17	5	1.15	0.81	-0.35	5
PON	19	3	0.94	0.42	-0.52	6
German Pinscher	20	3	1.33	1.19	-0.14	9
Boxer	25	2	2.1	1.49	-0.61	10
Bullterrier	25	5	1.06	0.7	-0.36	-
Dalmatian	26	6	1.7	0.76	-0.94	10
Bouvier des Ardenes	27	4	1.83	0.98	-0.85	6
Boxer	27	4	1.86	1.26	-0.6	6
Dobermann	29	4	1.11	0.75	-0.36	7
Boxer	31	6	0.71	0.79	0.08	7
Flatcoated Retriever	32	6	1.88	1.6	-0.28	10
Rhodesian Ridgeback	36	6	0.75	0.36	-0.39	11
Chesapeake Bay Retriever	36	5	1.26	0.87	-0.39	11
Rhodesian Ridgeback	39	7	0.41	0.27	-0.14	14
Rhodesian Ridgeback	40	4	1.06	0.61	-0.45	-
Newfoundland	53	2	0.65	0.6	-0.05	10
Newfoundland	58	3	0.56	0.53	-0.03	6
Newfoundland	59	7	0.76	0.8	-0.04	6
Newfoundland	59	4	0.55	0.48	-0.07	-
			mean AMH1 ng/ml 1.36	mean AMH2 ng/ml 0.99	mean AMH decrease 26,9 %	

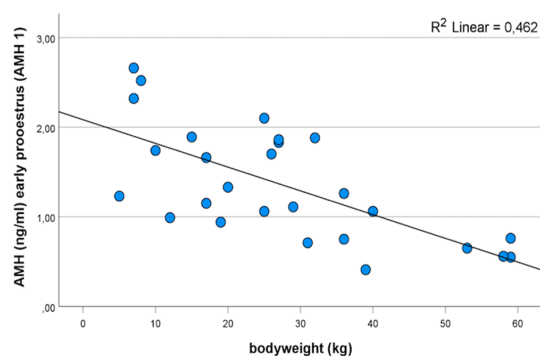


Fig. 1. Scatter plot showing the relationship between body weight and the serum concentration of AMH.

shown in Fig. 3, although this effect is not clearly significant (litter size-AMH1: $r = -0.356$, $p = 0.088$; litter size-AMH2: $r = -0.405$, $p = 0.050$).

The matched pairs were divided into two groups according to the different AMH1 serum concentrations within the pairs, group 1 with lower AMH1 serum concentrations and group 2 with higher AMH1 serum concentrations. The mean body weight of these two groups was almost identical, with a difference of 0.16 kg. The mean AMH1 concentration in group 1 was 1.08 ± 0.55 ng/ml and was significantly higher in group 2 at 1.65 ± 0.62 ng/ml (paired t-test $p < 0.001$). The mean AMH2 serum concentration was also significantly lower in group 1 at 0.77 ± 0.45 ng/ml than in group 2 at 1.22 ± 0.47 ng/ml ($p < 0.001$).

The multifactorial analysis (GEE) using the matched pairs of bitches with similar body weights showed no significant effect of body weight on litter size ($p = 0.355$), confirming that the goal of creating matched pairs to significantly reduce the effect of body weight on litter size was achieved. Thus, a significant effect of AMH serum concentration on litter

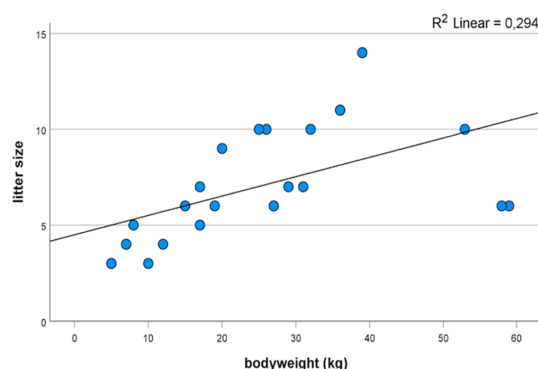


Fig. 2. Scatter plot showing the relationship between body weight and litter size.

size was found (AMH1: $p = 0.022$; AMH2: $p = 0.030$; Fig. 4). The parallel test for an interaction between body weight and AMH serum concentration showed that there was a highly significant interaction at both time points (interaction BW-AMH1: $p = 0.001$; interaction BW-AMH2: $p = 0.016$). This means that the independent variable “AMH serum concentration” has a highly significant different effect on the outcome “litter size” depending on the values of the independent variable “body weight”.

4. Discussion

The aim of this study was to investigate whether AMH can be used as a practical relevant predictor for litter size as a marker for fertility in the individual bitch when the blood sample collection takes place on precisely defined times in heat of the bitches. Therefore, the serum AMH concentrations were determined in early proestrus (AMH1) and around

T. Hornberger et al.

Domestic Animal Endocrinology 91 (2025) 106897

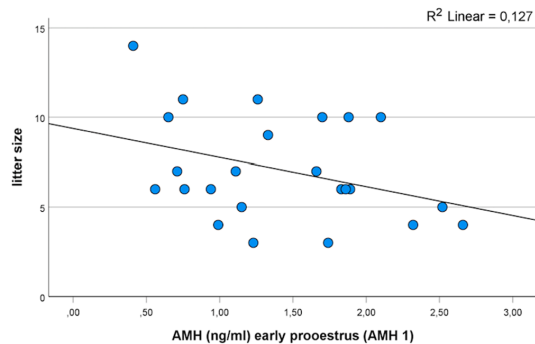


Fig. 3. Scatter plot showing the relationship between AMH serum concentration and litter size.

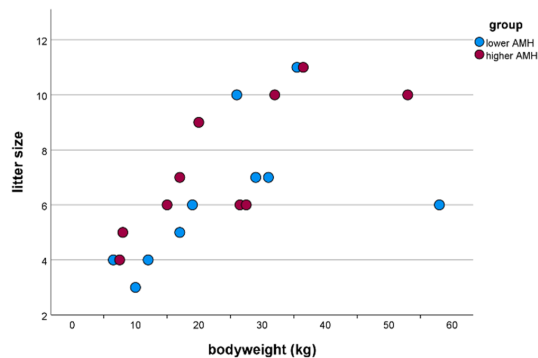


Fig. 4. Scatter plot showing the larger litter size in the bitches with the higher AMH serum concentration from the different matched pairs.

ovulation (AMH2) and set into correlation with the litter size. In addition, the effect of weight and age on AMH serum concentration was examined. The average AMH1-value in early proestrus was 1.36 ± 0.63 ng/ml. Near ovulation the average AMH2-value was 0.99 ± 0.50 ng/ml. This matches the results of Walter et al. (2019) [17] using the same test procedure as this study. A narrow reference interval ($0.21 - 0.99$ ng/ml) was determined with another human ELISA validated for dogs in the study of Nagashima et al. (2016) [16]. In contrast, Hollinshead et al. (2017) [14] used a canine specific ELISA and got a higher and more broad reference interval (11.6 ± 5.6 ng/ml).

This study showed a highly significant negative correlation between body weight and AMH at both sampling times. This coincides with three other studies [14,15,17] but exceptions were seen when some bitches with a high body weight reached as high AMH1-values as bitches with a lower body weight. An explanation for lower AMH values in female dogs with a higher weight could be that although there are a larger number of follicles on the ovary that are ready for ovulation, the AMH they secrete is distributed over a disproportionately larger blood volume. We have to assume that a dog twice as large does not have an ovary twice as large or twice as many follicles. As body mass increases, the AMH value decreases due to the larger blood volume.

The strongest influence on the litter size was the body weight in this study. With an increase in body weight the litter size also increased. This is also shown in the study of Borge et al. (2011) [19]. However, above a body weight of 50 kg the litter size became relatively smaller again in the present study. This is similar to the study by Hollinshead et al. (2017) [14], where bitches above 40 kg had poorer fertility. When

examining the AMH progression from early proestrus to ovulation, an average AMH drop of 26.9 % was shown. But the AMH drop was sometimes very small and two bitches even showed a slight increase. This average AMH decrease to ovulation is also described in the other studies by Walter et al. (2019) and Nagashima et al. (2016), where AMH concentration declined sharply back to baseline values beginning 4 days prior to the LH surge.

A general influence of comparatively high AMH values on the size of the litter could not be confirmed in the present study. And even the fact that three bitches failed to get pregnant could not be associated with excessively low AMH1 or AMH2 values in comparison to the bitches which got pregnant. However, if comparing the AMH values of bitches with matching body weight there is a significant effect on the litter size. The correlation of AMH and litter size has only been examined in the study by Hollinshead et al. (2017) [14] so far. The authors have described an increase of the litter size by 0.3 puppies for every 1 ng/ml AMH. It should be noted that the study by Hollinshead et al. (2017) [14] was carried out with a canine ELISA test, which leads to a much wider reference interval of AMH (2.9-21.1 ng/ml). Also, the number of 155 bitches sampled compared to this study may lead to a higher accuracy. Besides, the sampling times in the study of Hollinshead et al. (2017) [14] were variable over estrus, whereas the present study is based on precise sampling times, which, if one considers the course of AMH in proestrus and estrus, is not insignificant for the level of AMH concentration. Thus, at the beginning of estrus, you can still get quite high AMH values, whereas you can detect low AMH values just before ovulation [16]. Therefore, sampling at random times in estrus may have an effect on the correlation with litter size. Even during pregnancy, AMH does not seem to be able to give a reliable indication of litter size. In the study carried out for this purpose, the bitches with medium-sized litters had higher AMH values on day 12 of pregnancy than the bitches with small litters, but the bitches with the largest litters had lower AMH values. Body weight, which has a decisive influence on the level of AMH values, was not taken into account but was assessed separately [15].

Looking at current studies from human medicine which deal with AMH and fertility, other possible reasons for the lack of a correlation between AMH and fertility in the bitch are possible. In human medicine, AMH is used as an indirect marker to estimate the ovarian functional reserve and to predict the onset of menopause [20]. It should be mentioned here that AMH only allows statements to be made about the functional ovarian reserve (FOR) and not about the actual ovarian reserve. The FOR describes the pool of follicles that have a size of 2 to 5 mm and can therefore be stimulated by FSH [21]. Actual follicular reserve is described as the number of dormant primordial follicles [21]. As an indirect marker of the functional ovarian reserve, AMH is subject to influencing factors which not always affect the actual ovarian reserve, but can possibly be transferred to veterinary medicine. For example, in women AMH values 18 % higher were measured in the summer, which is why a connection with the vitamin D level is suspected [22]. A study of women between the ages of 18 and 40 also found out that women with comparatively low AMH values were just as likely to become pregnant as women with high AMH values [23]. Another study found large differences in fertility of women despite similar AMH levels [24]. In human medicine, AMH is used more to find out if there are follicles that are potentially ready to rupture, but does not allow any statement to be made about the quality of the oocyte, so it is not necessarily suitable as a predictor for the probability of pregnancy [20,25]. Since AMH does not provide any information about the quality of the oocytes, this is a possible explanation why in the present study bitches with high AMH values do not automatically have proportionally larger litters. However, after comparison of bitches with similar body weight there was a significant correlation and therefore in the bitch there might be an informative value of the AMH concentration with regard to fertility. But this finding needs to be confirmed in future studies with a larger sampling size.

The average decrease in AMH concentration from the fourth year of

life described by Hollinshead et al. (2017) [14] could not be seen in this study. The results of this study are more consistent with the results of the study of Turna et al. (2015) [7], in which no age-related AMH decline was found.

A general and gynecological examination of all bitches, as well as history taking, should have minimized other factors affecting fertility. However, it cannot be ruled out that circumstances such as being kept in a pack, other stress factors or a drop in progesterone during pregnancy led to smaller litter sizes. This would have required a standardized ultrasound examination, which was also not mentioned in the study of Hollinshead et al. (2027) [14]. The sperm quality of the male dogs should also be taken into account when interpreting this study. Using breeding dogs that have successfully bred within the last year should reduce the likelihood of smaller litters due to poor sperm quality. A standardized examination of the sperm would have allowed more precise results.

5. Conclusion

Body weight has the strongest influence on litter size and there is a highly significant negative correlation between the AMH value and the body weight. This leads to a significant effect of the AMH concentration and the litter size among female dogs with matching body weight.

However, a much larger sample collection is needed to evaluate reference intervals for AMH within the different weight groups to predict the fertility of an individual bitch in the future.

CRedit authorship contribution statement

Theresa Hornberger: Writing – original draft, Methodology, Data curation. **Sven Reese:** Formal analysis. **Klaus Perbandt:** Formal analysis. **Andrea Meyer-Lindenberg:** Supervision. **Beate Walter:** Supervision, Methodology.

Declaration of competing interest

The authors have no conflicts of interest and there are no financial conflicts of interest.

Acknowledgements

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- [1] Josso N, Belville C, Di Clemente N, Picard J-Y. AMH and AMH receptor defects in persistent Müllerian duct syndrome. *Hum Reprod Update* 2005;11(4):351–6.
- [2] Eldar-Geva T, et al. Dynamic assays of inhibin B, anti-Müllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Hum Reprod* 2005;20(11):3178–83.
- [3] Rico C, et al. 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. *Reprod Fertil Dev* 2012;24(7):932–44. <https://doi.org/10.1071/RD11290>.
- [4] Ball BA, et al. Relationship between anti-Müllerian hormone and fertility in the mare. *Theriogenology* 2019;125:335–41. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.005>. Feb.
- [5] Rico C, et al. Regulation of anti-Müllerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. *Biol Reprod* 2011;84(3):560–71. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088187>. Mar.
- [6] Josso N, Rey RA, Picard JY. Anti-müllerian hormone: a valuable addition to the toolbox of the pediatric endocrinologist. *Int J Endocrinol* 2013;2013:12. <https://doi.org/10.1155/2013/674105>.
- [7] Turna Yılmaz Ö, Toydemir TS, Kirsan I, Ucmak ZGunay, Karacam ECaliskan. Anti-Müllerian hormone as a diagnostic tool for ovarian remnant syndrome in bitches. *Vet Res Commun* 2015;(3):159–62. <https://doi.org/10.1007/s11259-015-9639-0>.
- [8] Place NJ, et al. Measurement of serum anti-Müllerian hormone concentration in female dogs and cats before and after ovariohysterectomy. *J Vet Diagn Invest* 2011;23(3):524–7. <https://doi.org/10.1177/1040638711403428>. May.
- [9] Walter B, Coelfen A, Jager K, Reese S, Meyer-Lindenberg A, Aupperle-Lellbach H. Anti-Müllerian hormone concentration in bitches with histopathologically diagnosed ovarian tumours and cysts. *Wiley Reprod Domest Anim* 2018;53(3):784–92. <https://doi.org/10.1111/rda.13171>. Jun.
- [10] Themmen APN, et al. The use of anti-Müllerian hormone as diagnostic for gonadectomy status in dogs. *Theriogenology* 2016;86(6):1467–74. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.004>. Oct 1.
- [11] Alm H, Holst BS. Identifying ovarian tissue in the bitch using anti-Müllerian hormone (AMH) or luteinizing hormone (LH). *Theriogenology* 2018;106:15–20.
- [12] Holst BS, Dreimanis U. Anti-Müllerian hormone: a potentially useful biomarker for the diagnosis of canine Sertoli cell tumours. *BMC Vet Res* 2015;11:1–7. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0487-5>.
- [13] Flock U, Fischer S, Weeger J, Reese S, Walter B. Anti-Müllerian hormone as a diagnostic tool to identify queens with ovarian remnant syndrome. *J Feline Med Surg* 2022;24(8):168–74. <https://doi.org/10.1177/1098612X221099195>.
- [14] Hollinshead FK, Walker C, Hanlon DW. Determination of the normal reference interval for anti-Müllerian hormone (AMH) in bitches and use of AMH as a potential predictor of litter size. *Wiley Reprod Domest Anim* 2017;52(Suppl 2):35–40. <https://doi.org/10.1111/rda.12822>. Apr.
- [15] Evci EC, et al. Monitoring of canine pregnancy by considering Anti-Müllerian hormone, C-reactive protein, progesterone and complete blood count in pregnant and non-pregnant dogs. *Theriogenology* 2023;195:69–76. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.10.020>. Jan 1.
- [16] Nagashima JB, Hansen BS, Songsasen N, Travis AJ, Place NJ. Anti-Müllerian Hormone in the Domestic Dog during the Anestrus to Oestrous Transition. *Wiley Reprod Domest Anim* 2016;51(1):158–64. <https://doi.org/10.1111/rda.12660>. Feb.
- [17] Walter B, Feulner H, Otzdorff C, Klein R, Reese S, Meyer-Lindenberg A. Changes in anti-Müllerian hormone concentrations in bitches throughout the oestrous cycle. *Theriogenology* 2019;127:114–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.007>. Mar 15.
- [18] Brugger N, Otzdorff C, Walter B, Hoffmann B, Braun J. Quantitative Determination of Progesterone (P4) in Canine Blood Serum Using an Enzyme-linked Fluorescence Assay. *Reprod Domest Anim* 2011;46(5):870–3.
- [19] Borge KS, Tønnessen R, Nødtvedt A, Indrebo A. Litter size at birth in purebred dogs—A retrospective study of 224 breeds. *Theriogenology* 2011;75(5):911–9.
- [20] Rebhan D, Bachmann A. Update zur Einschätzung des Anti-Müller-Hormons (AMH) als Marker der ovariellen Reserve. *J Für Gynäkol Endokrinol/Schweiz* 2021;24(3):138–43.
- [21] Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9(1):1–11.
- [22] Dennis NA, Houghton LA, Jones GT, van Rij AM, Morgan K, McLennan IS. The level of serum anti-Müllerian hormone correlates with vitamin D status in men and women but not in boys. *J Clin Endocr Metab* 2012;97(7):2450–5.
- [23] Zarek SM, et al. Is anti-Müllerian hormone associated with fecundability? Findings from the EAGeR trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100(11):4215–21.
- [24] Korsholm A-S, Petersen KB, Bentzen JG, Hilsted LM, Andersen AN, Hvidman HW. Investigation of anti-Müllerian hormone concentrations in relation to natural conception rate and time to pregnancy. *Reprod Biomed Online* 2018;36(5):568–75.
- [25] Hawkins Bressler L, Steiner A. Anti-Müllerian hormone as a predictor of reproductive potential. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2018;25(6):385–90.

IV. DISKUSSION

Ziel dieser Studie war es, die Eignung der AMH-Serumkonzentration als Fertilitätsmarker zu untersuchen, wenn die Blutentnahme an genau definierten Zeitpunkten im Zyklus der Hündin erfolgt. Hierfür wurde die AMH-Konzentration im frühen Proöstrus (AMH1) und zum Zeitpunkt der Ovulation (AMH2) bestimmt und der Zusammenhang mit der Wurfgröße ermittelt. Zudem wurde der Einfluss des Alters und des Gewichts auf die AMH-Serumkonzentration untersucht, sowie die Veränderung der AMH-Serumkonzentration vom frühen Proöstrus zur Ovulation betrachtet.

Der mittlere AMH1-Wert aller Serumproben dieser Studie zum Zeitpunkt des frühen Proöstrus, ermittelt über einen für Hunde validierten humanmedizinischen AMH-ELISA, betrug $1,36 \pm 0,63$ ng/ml. Zum Zeitpunkt der Ovulation lag der AMH2-Wert mit $0,99 \pm 0,50$ ng/ml deutlich unter dem AMH1-Wert (Hornberger et al. 2024). Dies entspricht den Ergebnissen der Studie von Walter et al. (2019), welche das gleiche Testverfahren verwendeten ($0,09$ - $2,65$ ng/ml). Ein kleineres Referenzintervall ($0,21$ – $0,99$ ng/ml) ist in der Studie von Nagashima et al. (2016) beschrieben, in welcher ein anderer für Hunde validierter humanmedizinischer ELISA verwendet wurde. Hollinshead et al. (2017) beschrieben unter Verwendung eines hundespezifischen ELISAs ein deutlich größeres Referenzintervall ($11,6 \pm 5,6$ ng/ml). Interindividuell zeigten sich die AMH-Werte deutlich variabel. Dies wurde auch in den Studien von Nagashima et al. (2016) und Walter et al. (2019) beschrieben.

Die eigene Studie zeigte eine hochsignifikante negative Korrelation zwischen Körpergewicht und AMH zu beiden Probenentnahmezeitpunkten (Hornberger et al. 2024). Dies deckt sich mit den Ergebnissen aller bisherigen Studien zu AMH bei der Hündin (Hollinshead et al. 2017, Walter et al. 2019). In der vorliegenden Studie stellten sich teilweise Ausnahmen dar, wobei Hündinnen der höchsten Gewichtsklasse AMH1-Werte von $1,2$ ng/ml erreichten, die auch bei Hündinnen der niedrigsten Gewichtsklasse vertreten waren (Hornberger et al. 2024). Die Höhe des AMH-Wertes lässt sich anhand der Ergebnisse der eigenen Studie also nicht mit Sicherheit an dem Gewicht der Hündin vorhersagen, die Tendenz zu höheren AMH-Werten bei niedrigerem Körpergewicht ist aber deutlich. Eine Erklärung für niedrigere AMH-Werte bei Hündinnen mit höherem Körpergewicht könnte darin liegen, dass am Ovar zwar mehr für den Eisprung bereite Follikel vorhanden sind, das von ihnen ausgeschüttete AMH jedoch über ein unverhältnismäßig größeres Blutvolumen verteilt ist. Es ist davon auszugehen, dass eine

Hündin mit doppelt so hohem Körpergewicht weder ein doppelt so großes Ovar, noch doppelt so viele Follikel hat. Mit zunehmendem Körpergewicht könnte also der AMH-Wert aufgrund des größeren Blutvolumens sinken.

Ein positiver linearer Zusammenhang zeigte sich in der eigenen Studie zwischen Körpergewicht und Wurfgröße. Je höher das Körpergewicht der Hündinnen, desto größer war auch die durchschnittliche Wurfgröße (Hornberger et al. 2024). Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer retrospektiven Studie über den Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Wurfgröße bei reinrassigen Hunden (Borge et al. 2011). Ab einem Körpergewicht von 50 kg zeigten sich in der vorliegenden Studie verhältnismäßig wieder kleinere Würfe. Dies ist ähnlich in der Studie von Hollinshead et al. 2017 beschrieben, in der Hündinnen > 40 kg eine schlechtere Fertilität aufwiesen.

In der eigenen Studie zeigte sich bei der Untersuchung des AMH-Verlaufs vom frühen Proöstrus zur Ovulation ein durchschnittlicher AMH-Abfall von 26,9 % (0,42 ng/ml), wobei zwei Hündinnen einen leichten AMH-Anstieg zeigten und der Abfall von AMH zur Ovulation hin teilweise nur geringgradig war (Hornberger et al. 2024). Diese durchschnittliche Abnahme der AMH-Konzentration war auch in der Studie von Walter et al. (2019) beschrieben, in der im frühen Proöstrus die höchsten AMH-Werte festgestellt wurden, welche dann zur Ovulation hin abnahmen. Auch Nagashima et al. (2016) beschrieben einen AMH-Abfall zur Ovulation.

Vergleicht man paarweise die AMH-Werte von Hündinnen mit entsprechend ähnlichem Körpergewicht, zeigte sich in der eigenen Studie ein signifikanter Einfluss auf die Wurfgröße. Ein allgemeingültiger Einfluss vergleichsweise hoher AMH-Werte auf die Wurfgröße konnte in der vorliegenden Studie aber nicht bestätigt werden. Selbst die Tatsache, dass drei Hündinnen nicht trächtig wurden, konnte nicht mit zu niedrigen AMH1- oder AMH2-Werten im Vergleich zu den trächtigen Hündinnen in Verbindung gebracht werden (Hornberger et al. 2024). Die Korrelation von AMH mit der Wurfgröße wurde bisher nur in einer anderen Studie untersucht (Hollinshead et al. 2017). Die Autoren hatten eine Zunahme der Wurfgröße um 0,3 Welpen pro 1 ng/ml AMH beschrieben. Hierbei bleibt zu beachten, dass die Studie von Hollinshead et al. (2017) mit einem caninen ELISA durchgeführt wurde, was zu einem wesentlich breiteren Referenzintervall der AMH-Werte führt (2,9-21,1 ng/ml). Auch die Anzahl von 155 untersuchten Hündinnen bei Hollinshead et al. (2017) im Vergleich zu der eigenen Studie führt zu einer höheren Genauigkeit. Die Zeitpunkte der Probenentnahme bei Hollinshead et al. (2017) waren jedoch variabel im Östrus gewählt, wohingegen der eigenen Studie genaue Zeitpunkte der Probenentnahme zugrunde lagen, was, wenn man den Verlauf von

AMH im Proöstrus und Östrus beachtet, nicht unerheblich für die Höhe der AMH-Konzentration ist (Walter et al. 2019). So können zum Anfang des Östrus noch recht hohe AMH-Werte nachgewiesen werden, wohingegen kurz vor der Ovulation wieder niedrige AMH-Werte gemessen werden. Die Probenentnahme zu willkürlichen Zeitpunkten im Östrus kann die Ergebnisse in Bezug auf die Wurfgröße also beeinflussen und sollte daher standardisiert zu festgelegten Zeitpunkten in der Läufigkeit erfolgen. Selbst während der Trächtigkeit scheint AMH keinen verlässlichen Hinweis auf die Wurfgröße geben zu können. In der hierzu durchgeführten Studie von Evci et al. (2023) hatten Hündinnen mit mittelgroßen Würfen am 12. Tag der Trächtigkeit höhere AMH-Werte als die Hündinnen mit kleinen Würfen. Die Hündinnen mit den größten Würfen hatten jedoch niedrigere AMH-Werte. Das Körpergewicht, das einen entscheidenden Einfluss auf die AMH-Werte hat, wurde nicht berücksichtigt, sondern separat untersucht (Evci et al. 2023).

Betrachtet man aktuelle Studien aus der Humanmedizin, lassen sich weitere mögliche Gründe für das Ausbleiben einer eindeutigen Korrelation von AMH und Wurfgröße bei der Hündin in der eigenen Studie nachvollziehen. In der Humanmedizin wird AMH als indirekter Marker zur Abschätzung der ovariellen Funktionsreserve und für die Vorhersage des Eintritts der Menopause eingesetzt (Rebhan und Bachmann 2021). AMH soll des weiteren die Abschätzung der hormonellen Stimulierbarkeit der Ovarien für eine künstliche Befruchtung erleichtern (Gnoth et al. 2008, Broer et al. 2009). Auch bei der Verlaufskontrolle von Granulosazelltumoren, der Beurteilung der Schädigung der Ovarien durch eine Chemo- oder Strahlentherapie und bei der Diagnostik des polyzystischen Ovarialsyndroms wird AMH gemessen (Vagios et al. 2021). Grundsätzlich gilt AMH als der beste Parameter zur Beurteilung der ovariellen Reserve der Frau. Hierbei ist zu beachten, dass AMH nur Aussagen über die funktionelle Ovarielle Reserve (FOR) und nicht über die tatsächliche ovarielle Reserve zulässt. Die FOR beschreibt den Pool an Follikeln, die eine Größe von 2-5 mm haben und somit durch FSH stimulierbar sind (Gleicher et al. 2011). Die tatsächliche ovarielle Reserve ist beschrieben als die Anzahl der ruhenden Primordialfollikel (Gleicher et al. 2011). Auch bei der Frau ist eine einmalige Messung des AMH Wertes nicht unbedingt aussagekräftig, da auch hier AMH zyklusabhängig schwankt und ebenfalls kurz vor der Ovulation ein AMH-Abfall zu beobachten ist (La Marca et al. 2004, Overbeek et al. 2012). Es ist eine intrazyklische Variabilität von 20,7 % beschrieben (Moolhuijsen und Visser 2020). AMH unterliegt als indirekter Marker der funktionellen ovariellen Reserve Einflussfaktoren, die nicht immer die tatsächliche ovarielle Reserve betreffen, sich aber möglicherweise auch auf die Tiermedizin übertragen lassen. So wurden beispielsweise bei Frauen im Sommer

18 % höhere AMH-Werte gemessen, weshalb ein Zusammenhang mit dem Vitamin-D-Spiegel vermutet wird (Dennis et al. 2012). Auch wurde in einer Studie mit Frauen zwischen 18 und 40 Jahren festgestellt, dass die Frauen mit vergleichsweise niedrigen AMH-Werten mit der gleichen Wahrscheinlichkeit schwanger wurden wie die Frauen mit hohen AMH-Werten (Zarek et al. 2015). Eine andere Studie stellte starke Unterschiede in der Fruchtbarkeit trotz ähnlich hoher AMH-Werte fest (Korsholm et al. 2018). AMH dient in der Humanmedizin also eher zur Darstellung potentiell sprungreifer Follikel, lässt aber keine Aussage über die Qualität der Eizelle zu, ist also nicht unbedingt als Prädiktor für die Wahrscheinlichkeit des Eintritts einer Schwangerschaft geeignet (Hawkins Bressler und Steiner 2018, Rebhan und Bachmann 2021). Da AMH scheinbar keinen Rückschluss auf die Qualität der Eizelle gibt, ist dies eine mögliche Erklärung, warum in der vorliegenden Studie Hündinnen mit hohen AMH-Werten nicht automatisch proportional größere Würfe haben. Beim direkten Vergleich von Hündinnen mit ähnlichem Körpergewicht ergab sich in der eigenen Studie jedoch eine signifikante Korrelation zwischen AMH und Wurfgröße. Diese Beobachtung sollte jedoch in zukünftigen Studien mit deutlich größerer Probenanzahl bestätigt werden.

Die von Hollinshead et al. (2017) beschriebene durchschnittliche Abnahme der AMH-Konzentration ab dem vierten Lebensjahr ist in der eigenen Studie nicht so eindeutig und deckt sich eher mit den Ergebnissen einer anderen Studie, in welcher ebenfalls kein altersbedingter AMH-Abfall festgestellt wurde (Turna Yilmaz et al. 2015).

Eine allgemeine und gynäkologische Untersuchung aller Hündinnen, sowie die Erfassung der Anamnese sollte andere, die Fertilität beeinflussende Faktoren minimieren. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass Umstände wie die Haltung im Rudel mit ranghöheren Hündinnen, andere Stressfaktoren im Umfeld der Hündin oder auch ein Progesteronabfall während der Trächtigkeit zu geringeren Wurfgrößen in der eigenen Studie führten. Hierfür wäre eine regelmäßige Ultraschallkontrolle der Fruchtanlagen und Progesteronbestimmung im Verlauf der Trächtigkeit notwendig, um ein eventuelles Resorbieren dieser in den ersten Trächtigkeitswochen zu dokumentieren (England und Russo 2006).

Die vergleichsweise kleinen Würfe der Hündinnen > 50 kg, wobei es sich in der eigenen Studie ausschließlich um Neufundländer handelte, lassen weiteren Untersuchungsspielraum. Hier stellt sich die Frage, ob die kleineren Würfe nur mit dem Gewicht oder auch mit der Rasse des Neufundländers zusammenhängen. In der zugänglichen Literatur gibt es aktuell noch keine Studien bezüglich der Fertilität bei Neufundländern. Hollinshead et al. (2017) beschrieben ebenfalls eine Abnahme der

Fertilität bei Hündinnen > 40 kg, wobei die untersuchten Rassen nicht näher genannt wurden.

Zusammenfassend hat das Körpergewicht den stärksten Einfluss auf die Wurfgröße und es besteht eine hochsignifikante negative Korrelation zwischen dem AMH-Wert und dem Körpergewicht (Hornberger et al. 2024). Dies führt zu einem signifikanten Einfluss der AMH-Konzentration auf die Wurfgröße bei Hündinnen mit entsprechendem Körpergewicht (Hornberger et al. 2024). Allerdings ist eine viel größere Probensammlung erforderlich, um Referenzwerte für AMH innerhalb der verschiedenen Gewichtsgruppen zu bewerten und die Fruchtbarkeit einer einzelnen Hündin in der Zukunft vorherzusagen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Zusammenhang der AMH-Serumkonzentration, gemessen zu genau definierten Zeitpunkten im frühen Proöstrus und Östrus der Hündin, mit der Wurfgröße zu untersuchen. Die Studie wurde unter Berücksichtigung aller bisher bekannten Einflussfaktoren auf AMH bei der Hündin (Alter, Gewicht, Zyklusstand zum Zeitpunkt der Probenentnahme) durchgeführt. Es wurden Serum-AMH-Proben von 27 Hündinnen im Alter von zwei bis sieben Jahren, die zur Deckzeitbestimmung vorgestellt wurden, auf eine Korrelation mit der Wurfgröße untersucht. Aufgrund der höchsten AMH-Werte im frühen Proöstrus sowie deren Abfall zur Ovulation (Walter et al. 2019), wurden die Blutproben innerhalb der ersten drei Tage der Läufigkeit (AMH-1) und zum Zeitpunkt der Ovulation (AMH-2) abgenommen. Um die AMH-Serumkonzentrationen zu den beiden Messzeitpunkten zu vergleichen, wurde ein t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. In einer ersten einfachen Analyse wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet, um mögliche Zusammenhänge zwischen der Wurfgröße, den AMH-Werten (AMH-1 und AMH-2), dem Körpergewicht und dem Alter der Hündinnen zu untersuchen. Da sich zeigte, dass das Körpergewicht sowohl mit der Wurfgröße als auch mit den AMH-Werten zu beiden Zeitpunkten in einem signifikanten Zusammenhang stand, wurden Hündinnen mit ungefähr gleichem Körpergewicht paarweise verglichen. Für diese Parameter, die in der einfachen Analyse eine bedeutende Beziehung zeigten, wurde dann eine erweiterte, mehrfaktorielle Analyse durchgeführt. Dafür wurde das generalisierte lineare Modell (GLM) für wiederholte Messungen (GEE) verwendet. In dieser Analyse wurde die Wurfgröße als abhängige Variable festgelegt, während das Körpergewicht und die AMH-Werte zu beiden Zeitpunkten als Einflussfaktoren (Prädiktoren) betrachtet wurden. Zusätzlich wurde geprüft, ob es eine Wechselwirkung zwischen dem Körpergewicht und den beiden AMH-Werten (AMH-1 und AMH-2) gibt. Ein Signifikanzniveau von $p = 0,05$ wurde festgelegt, um statistisch bedeutsame Ergebnisse zu bestimmen. Die durchschnittliche AMH-1-Serumkonzentration der 27 Hündinnen betrug $1,36 \pm 0,63$ ng/ml und war damit signifikant höher (um 26,9%) als die AMH-2-Serumkonzentration von $0,99 \pm 0,50$ ng/ml ($p < 0,001$). Die Analyse zeigte eine stark negative Korrelation zwischen dem Körpergewicht (BW) und den AMH-Konzentrationen zu beiden Messzeitpunkten ((BW-AMH1: $r = -0,68$, $p < 0,001$) (BW-AMH2: $r = -0,60$, $p < 0,001$)). Dagegen gab es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Alter der Hündinnen und den AMH-

Konzentrationen ((Alter-AMH1: $r = -0,291$, $p = 0,141$) (Alter-AMH2: $r = -0,227$, $p = 0,255$)). Der stärkste Einflussfaktor auf die Wurfgröße war das Körpergewicht der Hündinnen ($r = 0,543$, $p = 0,006$). Das Alter hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Wurfgröße ($r = 0,205$, $p = 0,337$). Die Hündinnen wurden basierend auf ihren AMH-1-Serumkonzentrationen in zwei Gruppen unterteilt (Gruppe 1: niedrigere AMH-1-Konzentrationen, Gruppe 2: höhere AMH-1-Konzentrationen). Das durchschnittliche Körpergewicht beider Gruppen war mit 0,16 kg Unterschied nahezu identisch. Die AMH-1- und AMH-2-Serumkonzentrationen waren in Gruppe 2 signifikant höher ($p < 0,001$). Für die detailliertere Analyse wurden Hündinnen mit ähnlichem Körpergewicht in Paare eingeteilt. Die GEE-Analyse zeigte danach keinen signifikanten Effekt des Körpergewichts auf die Wurfgröße ($p = 0,355$). Das bestätigt, dass die paarweise Zuordnung erfolgreich den Einfluss des Körpergewichts auf die Wurfgröße minimierte. Stattdessen konnte ein signifikanter Einfluss der AMH-Serumkonzentration auf die Wurfgröße festgestellt werden ((AMH1: $p = 0,022$) (AMH2: $p = 0,030$)).

Zusammenfassend scheint AMH als alleiniger Parameter nicht ausreichend zu sein, um einen sicheren Ausblick auf die Fertilität und Wurfgröße individueller Hündinnen zu geben. Weitere Studien mit größeren Patientenzahlen und ebenfalls standardisierten AMH-Probenentnahmen im frühen Proöstrus und Östrus sind für die Bestätigung der Ergebnisse erforderlich.

VI. SUMMARY

The aim of the present study was to investigate the relationship between serum AMH (Anti-Müllerian hormone) concentrations, measured at precisely defined time points during early proestrus and estrus in the bitch, and litter size. The study was conducted taking into account all previously known influencing factors on AMH levels in the bitch (age, body weight, and cycle stage at the time of sampling). Serum AMH samples from 27 bitches aged between two and seven years, presented for mating time determination, were analyzed for a potential correlation with litter size. Based on the findings of Walter et al. (2019), which showed peak AMH levels during early proestrus and a decline toward ovulation, blood samples were collected within the first three days of estrus (AMH-1) and at the time of ovulation (AMH-2). To compare AMH serum concentrations at the two time points, a paired sample t-test was performed. In an initial univariate analysis, Pearson's correlation coefficient was calculated to examine possible associations between litter size, AMH values (AMH-1 and AMH-2), body weight, and age of the bitches. Since body weight showed a significant relationship with both litter size and AMH concentrations at both time points, bitches with approximately the same body weight were paired. A more detailed, multifactorial analysis was then carried out for those parameters that had shown a significant relationship in the univariate analysis. For this purpose, the generalized linear model (GLM) for repeated measures (GEE) was applied. In this analysis, litter size was defined as the dependent variable, while body weight and the AMH values at both time points were considered as predictor variables. Additionally, a potential interaction between body weight and AMH-1 as well as AMH-2 was tested. A significance level of $p = 0.05$ was defined to determine statistically relevant results. The mean AMH-1 serum concentration of the 27 bitches was 1.36 ± 0.63 ng/ml and was significantly higher (by 26.9%) than the AMH-2 serum concentration of 0.99 ± 0.50 ng/ml ($p < 0.001$). The analysis revealed a strong negative correlation between body weight and AMH concentrations at both sampling times (BW-AMH1: $r = -0.68$, $p < 0.001$; BW-AMH2: $r = -0.60$, $p < 0.001$). In contrast, no significant relationship was found between age and AMH concentrations (age-AMH1: $r = -0.291$, $p = 0.141$; age-AMH2: $r = -0.227$, $p = 0.255$). The strongest influencing factor on litter size was the body weight of the bitches ($r = 0.543$, $p = 0.006$), while age had no significant influence on litter size ($r = 0.205$, $p = 0.337$). The bitches were divided into two groups based on their AMH-1 serum concentrations (Group 1: lower AMH-1 concentrations, Group 2: higher

AMH-1 concentrations). The average body weight of both groups differed by only 0.16 kg and was therefore nearly identical. AMH-1 and AMH-2 serum concentrations were significantly higher in Group 2 ($p < 0.001$). For further detailed analysis, bitches with similar body weights were paired. The subsequent GEE analysis showed no significant effect of body weight on litter size ($p = 0.355$), confirming that the pairwise assignment successfully minimized the influence of body weight on litter size. Instead, a significant effect of AMH serum concentration on litter size was found (AMH1: $p = 0.022$; AMH2: $p = 0.030$). In conclusion, AMH alone does not appear to be a sufficiently reliable parameter to accurately predict fertility and litter size in individual bitches. Further studies with larger sample sizes and standardized AMH sampling in early proestrus and estrus are needed to confirm these results.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Alexander T, Flock U, Klein R, Reese S, Meyer-Lindenberg A, Walter B

Physiological Anti-Müllerian Hormone Concentrations in Male and Female Dogs and Cats before and around Puberty. *Animals*. 2024; 14 (17): 2561

Alm H, Holst BS

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

Theriogenology. 2018; 106: 15-20

Andersen A, Simpson M, Inc GX

Ovarian development, from birth to puberty.

Geron-X Inc.: The Ovary and the Reproductive Cycle of the Dog (Beagle). 1973: 48-102

Arnold S, Janett F

Erkrankungen des männlichen Geschlechtsapparates. In Niemand H.G., Suter P.F., Kohn B., Schwarz G. *Praktikum in der Hundeklinik* Bd. 11, Stuttgart, Enke, 2012

Axnér E, Holst BS

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

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

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

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

Theriogenology. 2019; 125: 335-341

Borge KS, Tønnessen R, Nødtvedt A, Indrebø A

Litter size at birth in purebred dogs—A retrospective study of 224 breeds.'

Theriogenology. 2011; 75(5): 911-919

Bouchard G, Youngquist R, Vaillancourt D, Krause G, Guay P, Paradis M

Seasonality and variability of the interestrus interval in the bitch.

Theriogenology. 1991; 36(1): 41-50

Broer SL, Mol BWJ, Hendriks D, Broekmans FJ

The role of antimüllerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count.

Fertility and sterility. 2009; 91(3): 705-714

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

Concannon PW

Endocrinologic control of normal canine ovarian function.

Reprod Domest Anim. 2009; 44 Suppl 2: 3-15

Concannon PW

Reproductive cycles of the domestic bitch.

Anim Reprod Sci. 2011; 124(3-4): 200-210

de Gier J, Kooistra HS, Djajadiningrat-Laanen SC, Dieleman SJ, Okkens AC

Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17beta, progesterone, prolactin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch.

Theriogenology. 2006; 65(7): 1346-1359

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

Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging.

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

Dennis NA, Houghton LA, Jones GT, van Rij AM, Morgan K, McLennan IS

The level of serum anti-Müllerian hormone correlates with vitamin D status in men and women but not in boys.

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2012; 97(7): 2450-2455

Dolleman M, Depmann M, Eijkemans MJ, Heimensem J, Broer SL, van der Stroom EM, Laven JS, Van Rooij IA, Scheffer GJ, Peeters PH, van der Schouw YT, Lambalk CB, Broekmans FJ

Anti-Mullerian hormone is a more accurate predictor of individual time to menopause than mother's age at menopause.

Human Reproduction. 2014; 29(3): 584-591

Dreier H

Untersuchungsmethoden bei Kleintieren/Genitaltrakt.

In Kraft W and Dürr U: Labordiagnostik in der Tiermedizin Bd. 6, Stuttgart, Schattauer, 2005

Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T, Gal M, Zylber-Haran E, Margalioth EJ

Dynamic assays of inhibin B, anti-Mullerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome.

Human reproduction. 2005; 20(11): 3178-3183

England G, Russo M

Ultrasonographic characteristics of early pregnancy failure in bitches.

Theriogenology. 2006; 66(6-7): 1694-1698

Evcı EC, Aslan S, Schafer-Somi S, Ergene O, Sayiner S, Darbaz I, Seyrek-Intas K, Wehrend A

Monitoring of canine pregnancy by considering Anti-Mullerian hormone, C-reactive protein, progesterone and complete blood count in pregnant and non-pregnant dogs.

Theriogenology. 2023; 195: 69-76

Gleicher N, Weghofer A, Barad DH

Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging.

Reproductive biology and endocrinology. 2011; 9(1): 1-11

Gnoth C, Schuring A, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E

Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program.

Human Reproduction. 2008; 23(6): 1359-1365

Goericke-Pesch S, Schmidt B, Failing K, Wehrend A

Changes in the histomorphology of the canine cervix through the oestrous cycle.

Theriogenology. 2010; 74(6): 1075-1081, 1081e1071

Goodman M

Canine ovulation timing.

Problems in veterinary medicine. 1992; 4(3): 433-444

Günzel-Apel A

Die Zuchthündin: Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund.

Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 1994

Günzel-Apel A, Bostedt H

Reproduktionsmedizin und Neonatalogie von Hund und Katze.

Schattauer Verlag, 2016

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

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

Hollinshead FK, Walker C, Hanlon DW

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

Wiley Reproduction in Domestic Animals. 2017; 52 Suppl 2: 35-40

Holst BS

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

Wiley Reproduction in Domestic Animals. 2017; 51 Suppl 3: 1-7

Holst BS, Dreimanis U

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

BMC Veterinary Research. 2015; 11

Hornakova L, Vrbovska T, Pavlak M, Valencakova-Agyagosova A, Halo M, Hajurka J

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

Polish journal of veterinary sciences. 2017; 20(4)

Hornberger T, Reese S, Perbandt K, Meyer-Lindenberg A, Walter B

Correlation of Anti-Mullerian hormone serum concentration measured in proestrus and estrus with the litter size as a fertility marker in bitches.

Domest Anim Endocrinol. 2024; 91: 106897

Howe LM

Surgical methods of contraception and sterilization.

Theriogenology. 2006; 66(3): 500-509

Jöchle W, Andersen AC

The estrous cycle in the dog: a review.

Theriogenology. 1977; 7(3): 113-140

Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PS

Disorders of the canine testis and epididymes.
Canine and feline theriogenology. 2001

Josso N

AntiMüllerian hormone: new perspectives for a sexist molecule.
Endocrine reviews. 1986; 7(4): 421-433

Josso N, Belville C, Di Clemente N, Picard J-Y

AMH and AMH receptor defects in persistent Müllerian duct syndrome.
Human reproduction update. 2005; 11(4): 351-356

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: 12

Keck C

Endokrinologie, Reproduktionsmedizin, Andrologie.
Stuttgart, Thieme, 2012

Kindt T

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). 2007

Korsholm A-S, Petersen KB, Bentzen JG, Hilsted LM, Andersen AN, Hvidman HW

Investigation of anti-Müllerian hormone concentrations in relation to natural conception rate and time to pregnancy.
Reproductive Biomedicine Online. 2018; 36(5): 568-575

Kraft W, Dürr U

Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, Ed.
Stuttgart, Schattauer Verlag, 1997

La Marca A, Malmusi S, Giulini S, Tamaro LF, Orvieto R, Levratti P, Volpe A -
Anti-Müllerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during
treatment with FSH to induce ovulation.

Human Reproduction. 2004; 19(12): 2738-2741

LABOKLIN

HCG-Stimulationstest.

(05/2020) HCG-Stimulationstest Series, von

<https://laboklin.com/de/nc/leistungen/leistungen-details/hcg-stimulationstest/>

Laboklin aktuell

Anti-Müller-Hormon.

(05/2012) Anti-Müller-Hormon Series, von <https://laboklin.com/de/laboklin-aktuell/newsdetails/article/anti-mueller-hormon/>

Lahoz B, Alabart J, 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; 118(8)

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

Anti-Müllerian hormone concentration in dogs with unilateral cryptorchidism.

Reproduction in Domestic Animals, WILEY 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774,
NJ USA 2018

Löffler G

Biochemie und Pathobiochemie.

Heidelberg, Springer, 2003

Moolhuijsen LM, Visser JA

Anti-Müllerian hormone and ovarian reserve: update on assessing ovarian function. The
Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2020; 105(11): 3361-3373

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

Anti-Mullerian Hormone in the Domestic Dog during the Anestrus to Oestrous Transition. Wiley Reproduction in Domestic Animals. 2016; 51(1): 158-164

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

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

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

Measurement of serum anti-Mullerian hormone concentration in female dogs and cats before and after ovariohysterectomy. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2011; 23(3): 524-527

Preidkalns J, Leiser R

Female reproductive System. In Dellmann H and Eurell S: Textbook of Veterinary Histology, Baltimore, Williams & Wilkins, 1998

Rebhan D, Bachmann A

Update zur Einschätzung des Anti-Müller-Hormons (AMH) als Marker der ovariellen Reserve. Journal für Gynäkologische Endokrinologie/Schweiz. 2021; 24(3): 138-143

Reichler I, Hubler M, Arnold S

Weiblicher Geschlechtsapparat.

In: Praktikum in der Hundeklinik Bd. 11, Stuttgart, Enke, 2012

Reynaud K, Fontbonne A, Saint-Dizier M, Thoumire S, Marnier C, Tahir MZ, Meylheuc T, Chastant-Maillard S

Folliculogenesis, ovulation and endocrine control of oocytes and embryos in the dog. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012; 47 Suppl 6: 66-69

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

Determination of anti-Mullerian 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

Rzeszowska M, Leszcz A, Putowski L, Hałabiś M, Tkaczuk-Włach J, Kotarski J, Polak G

Anti-Müllerian hormone: structure, properties and appliance. *Ginekologia polska*. 2016; 87(9): 669-674

Sadler T

Medizinische Embryologie. Stuttgart, Thieme, 2003

Sahmay S, Oncul M, Tuten A, Tok A, Acikgoz AS, Cepni I

Anti-mullerian hormone levels as a predictor of the pregnancy rate in women of advanced reproductive age. *Assisted Reproduction Technologies*. 2014; 31(11): 1469-1474

Schünke M, Schulte E, Schumacher U

Prometheus: Lernatlas der Anatomie. Stuttgart, Thieme, 2009

Sokolowski JH

Reproductive patterns in the bitch.

The Veterinary clinics of North America. 1977; 7(4): 653-666

Tesoriero JV

Early ultrastructural changes of developing oocytes in the dog. *Journal of morphology*. 1981; 168(2): 171-179

Themmen APN, Kalra B, Visser JA, Kumar A, Savjani G, de Gier J, Jaques S -
The use of anti-Mullerian hormone as diagnostic for gonadectomy status in dogs.
Theriogenology. 2016; 86(6): 1467-1474

Turna Yilmaz Ö, Toydemir TS, Kirsan I, Gunay Ucmak Z, Caliskan Karacam E
Anti-Mullerian hormone as a diagnostic tool for ovarian remnant syndrome in bitches.
Vet Res Commun. 2015(3): 159-162

Vagios S, James KE, Sacha CR, Hsu JY, Dimitriadis I, Bormann CL, Souter I - A
patient-specific model combining antimüllerian hormone and body mass index as a
predictor of polycystic ovary syndrome and other oligo-anovulation disorders. Fertility
and Sterility. 2021; 115(1): 229-237

Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP
Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. Reproduction Review.
2006; 131(1): 1-9

Walter B, Coelfen A, Jager K, Reese S, Meyer-Lindenberg A, Aupperle-Lellbach H
Anti-Muellerian hormone concentration in bitches with histopathologically diagnosed
ovarian tumours and cysts. Wiley 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

Wehrend A, Von Plato K, Goericke-Pesch S
Die exfoliative Vaginalzytologie bei der Hündin–Indikationen, Durchführung,
Interpretation. Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere/Heimtiere. 2013; 41(04): 267-
274

Welch Fossum T
Chirurgie der Kleintiere., 2020

Zarek SM, Mitchell EM, Sjaarda LA, Mumford SL, Silver RM, Stanford JB, Galai N, White MV, Schliep KC, DeCherney AH

Is anti-Müllerian hormone associated with fecundability? Findings from the EAGeR trial. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2015; 100(11): 4215-4221

VIII. DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich Frau Prof. Meyer-Lindenberg und Dr. Beate Walter für die Betreuung meiner Doktorarbeit ganz herzlich danken. Sie standen mir über die Jahre mit Rat und Tat zur Seite und haben es verstanden, mich mit freundlichen Nachfragen zum Stand meiner Arbeit am Ball zu halten.

Dr. Beate Walter und ihr Team in der CTK haben mich sowohl zur Zeit der Probensammlung als auch danach immer geduldig, freundlich und mit viel Einsatz unterstützt. Als Doktorandin habe ich mich sehr glücklich geschätzt, eine solch erstklassige Betreuung zu haben.

Ein weiterer Dank geht an Klaus Perbandt, der mich in Statistikfragen unermüdlich und immer gut gelaunt unterstützt hat und der leider viel zu früh verstorben ist. Daher danke ich natürlich auch Dr. Sven Reese, der anschließend meine Versuchsdaten statistisch aufgearbeitet hat.

Auch meinen Freunden und meiner Schwester möchte ich für die andauernde emotionale Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit danken.

Einen besonderen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen, die an mein Durchhaltevermögen appelliert und mich in vielerlei Hinsicht kontinuierlich und wie selbstverständlich unterstützt haben.