Tierärztliche Hochschule Hannover

Untersuchungen zur Pathogenese der caninen BPH unter Berücksichtigung rassespezifischer Besonderheiten beim Rhodesian Ridgeback

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer Doktorin oder
eines Doktors der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Franziska Werhahn Beining
(geb. Werhahn)
Bremen

Hannover 2020

Wissenschaftliche Betreuung:	Univ.- Prof. Dr. A.-R. Günzel-Apel Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken - Klinik für Kleintiere
1. Gutachterin:	Univ.- Prof. Dr. A.-R. Günzel-Apel
2. Gutachter:	Univ. Prof. Dr. M. Fehr
Tag der mündlichen Prüfung:	18.11.2020

Meiner Familie

Teilergebnisse der Studie liegen in publizierter Form vor:

Werhahn Beining F, Urhausen C, Wolf K, et al. Rhodesian Ridgebacks have an increased risk to develop benign prostatic hyperplasia. Reprod Dom Anim 2020; 55:283–292. https://doi.org/10.1111/rda.13616

Zur Publikation weiterer Ergebnisse wurde das Manuskript

Werhahn Beining F, Schmicke M, Wilkens M, Wolf K, Rohn K, Günzel-Apel A. An investigation on the relevance of prolactin, IGF-1, and 25-hydroxyvitamin D_3 (25-OHD_3) in benign prostatic hyperplasia in dogs.

bei Veterinary Medicine and Science eingereicht (Manuskript ID VMS3-2020-Aug-0372)

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 7

2 LITERATURÜBERSICHT 9

2.1 Benigne Prostatahyperplasie (BPH) 9

2.2 Canine prostata-spezifische Argininesterase (CPSE) 10

2.3 Sexualsteroide (Testosteron, 5α-DHT, Estradiol) 11

2.4 Prolaktin (PRL) 11

2.5 Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) 12

2.6 25-Hydroxyvitamin D_3 (25-OHD_3) 14

3 MATERIAL UND METHODEN 17

3.1 Tiere 17

3.2 Klinische Untersuchung und Probengewinnung 17

3.3 Samengewinnung 17

3.4 Morphologische Untersuchung der Genitalorgane 18

3.5 Ultraschalluntersuchung 18

3.6 Samenuntersuchung (Basisspermatologie) 19

3.7 Blutentnahme 20

3.8 Laboruntersuchungen 21

3.8.1 Canine prostata-spezifische Argininesterase (CPSE) 21

3.8.2 Prolaktin (PRL) 21

3.8.3 Testosteron 22

3.8.4 5α-Dihydrotestosteron (5α-DHT) 22

3.8.5 Thyroxin (T_4) und Thyreotropin (TSH) 23

3.8.6 Estradiol-17β 24

3.8.7 Calcidiol/ 25-Hydroxy Vitamin D/ 25-OHD_3 25

3.8.8 Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) 25
3.9 Statistische Auswertung 26
4 ERGEBNISSE 27
4.1 Manuskript I 27
4.2 Manuskript II 54
5 ÜBERGREIFENDE DISKUSSION 89
5.1 Probanden 89
5.2 Relevanz der CPSE-Konzentration für die Charakterisierung des Prostatastatus 90
5.3 Befunde in Bezug auf eine Rassedisposition für die BPH beim Rhodesian Ridgeback (Manuskript I). 91
5.3.1 Klinisch-sonographische Befunde, Prostatavolumen und CPSE 91
5.3.2 Hormonkonzentrationen 92
5.4 Prolaktin, IGF-1 und 25-OHD3 in Bezug auf die Pathogenese der caninen BPH (Manuskript II) 94
5.4.1 Prolaktin (PRL) 94
5.4.2 Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) 96
5.4.3 Vitamin D 98
5.4.3.1 25-OHD_3 im Blutserum 98
5.4.3.2 25-OHD_3 im Prostatasekret 101
6 ZUSAMMENFASSUNG 103
7 SUMMARY 105
8 VERZEICHNISSE 107
8.1 Literaturverzeichnis 107
8.2 Abkürzungsverzeichnis 136
9 DANKSAGUNG 141

1 EINLEITUNG

Beim Rüden ist die Prostata die einzige makro-morphologische akzessorische Geschlechtsdrüse (BARSANTI u. FINCO 1980). Erkrankungen der Prostata können sich sowohl auf die allgemeine Gesundheit als auch auf die Fruchtbarkeit auswirken. Die häufigste Erkrankung ist die Benigne Prostatahyperplasie (BPH). Dabei handelt es sich um eine Vergrößerung der Drüse als Folge sowohl einer Hyperplasie als auch einer Hypertrophie der Prostataepithelzellen (BRENDLER et al. 1983; READ u. BRYDEN 1995). Aufgrund ihrer androgen-abhängigen Pathogenese kommt sie in erster Linie bei unkastrierten Rüden vor (SMITH 2008; POLISCA et al. 2016). Hier betrifft sie bereits ab einem Alter von fünf Jahren etwa 80% der Tiere. Dabei handelt es sich häufig um eine spontane, in erster Linie nicht entzündliche Vergrößerung der Prostata mit zunächst subklinischem Verlauf (BERRY et al. 1986 a, b; JOHNSTON et al. 2000). Erst mit Erreichen einer erheblichen Umfangsvermehrung treten klinische Symptome wie Kotabsatzbeschwerden, Hämaturie und Unwohlsein auf (HORNBUCKLE et al. 1978; BARSANTI u. FINCO 1980; BARSANTI u. FINCO 1986; GOBELLO et al. 2002.; SMITH 2008). Im Gegensatz zum Mann ist eine vergrößerte Prostata nicht mit einer Beeinträchtigung des Harnabsatzes verbunden (KRAWIEC u. HELFIN 1992; READ u. BRYDEN 1995). Ursächliche Zusammenhänge hinsichtlich einer individuellen Betroffenheit sind bisher nicht bekannt (JOHNSON 2010), was eine frühe Diagnostik umso wichtiger macht.

Neuere wissenschaftliche Studien am Menschen weisen darauf hin, dass sowohl Prolaktin (PRL) als auch Vitamin D in die Pathogenese der BPH involviert sind und auch die Spermaqualität beeinflussen (DE ROSA et al. 2004; BACHELOT u. BINART 2007; ADORINI et al. 2010; BLOMBERG JENSEN et al. 2011). Aus diesen Erkenntnissen resultierten mögliche Behandlungsmethoden bzw. diagnostische Möglichkeiten der BPH, welche ggf. auch beim Hund einsetzbar wären (CRESCIOLI et al. 2004; COLLI et al. 2006; ADORINI et al. 2007; ADORINI et al. 2010).

Der Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) ist ein starkes Mitogen für normale und abnormale Zellen. Es fördert die Proliferation, hemmt die Apoptose und unterstützt die

zelluläre Differenzierung (LE ROITH 1996). Beim Menschen wurde der entsprechende Einfluss von IGF-1 auf das Prostatagewebe nachgewiesen (KHOSRAVI et al. 2001).

Studien hinsichtlich einer rasseabhängig erhöhten Prävalenz der BPH beim Hund sind rar. Ein auf klinischen Beobachtungen basierender Verdacht einer Rassedisposition für die Entwicklung einer BPH beim Rhodesian Ridgeback (RR) wurde bereits von WOLF et al. (2012) erhärtet.

Ziele der vorliegenden Studie waren 1. die Überprüfung der von WOLF et al. (2012) publizierten Hinweise zur Rassedisposition beim RR unter Einbeziehung der caninen prostata-spezifischen Argininesterase (CPSE) und der an der Pathogenese beteiligten Steroidhormone und 2. die Untersuchung möglicher ursächlicher Zusammenhänge zwischen BPH und PRL, IGF-1 und Vitamin D. Alle Untersuchungen wurden an einer hinsichtlich des Alters definierten Gruppe von Rüden der Rasse „Rhodesian Ridgeback“ durchgeführt. Als Kontrollgruppe dienten nach identischen Kriterien ausgewählte Rüden der Rasse „Labrador Retriever“. Um Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Prolaktin, IGF-1 und/oder Vitamin D (25-OHD_3) an der Pathogenese der BPH beim Hund zu erlangen, wurden diese Parameter im Blutserum der Tiere gemessen. Darüber hinaus wurde die 25-OHD_3-Konzentration im Prostatasekret bestimmt.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Benigne Prostatahyperplasie (BPH)

Bei der Prostata des Rüden handelt es sich um die einzige makro-morphologische akzessorische Geschlechtsdrüse. Die Samenleiterampullen sind nur schwach ausgebildet (KÖNIG u. LIEBICH 2008). Die Prostata ist von halbkugelförmiger Gestalt und umschließt die Urethra vollständig (GILLE 2008). Die Drüse erreicht ihre normale Größe mit Vollendung der Geschlechtsreife. Reifung und Funktion hängen direkt von den testikulären Steroidhormonen ab, vor allem von Testosteron und Östrogenen (KAWAKAMI et al. 1991).

Die benigne Prostatahyperplasie (BPH) ist eine altersabhängige, primär nicht entzündliche Vergrößerung und die häufigste Prostataerkrankung bei intakten Hunden (BERRY et al. 1986 a, b). Knapp 80 % der unkastrierten Rüden in einem Alter von über 5 Jahren und annähernd 100 % der über 10-12 Jahre alten Rüden sind davon betroffen (JOHNSTON et al. 2000). Die Wahrscheinlichkeit, eine BPH zu entwickeln, steigt im Alter von zwei bis drei Jahren an (TESKE et al. 2002). Im Alter von acht bis neun Jahren wird eine Prävalenz von 95 bis 100% erreicht (BERRY et al. 1986a, b; LOWSETH et al. 1990; GOBELLO et al. 2002). Zu den Gewebeveränderungen gehören sowohl Hyperplasie als auch Hypertrophie des sekretorischen Drüsenepithels und der stromalen Komponenten (ZIRKIN u. STRANDBERG 1984). Zu Beginn liegt eine glanduläre Hyperplasie vor, welche in eine zystische Hyperplasie übergeht (BRENDLER et al. 1983; BERRY et al. 1986 b; SMITH 2008). Die Rüden sind i.d.R. klinisch unauffällig bis die Prostata eine beachtliche Größe einnimmt und es aufgrund dessen zu Hämaturie und Tenesmus kommen kann (HORNBUCKLE et al. 1978; BARSANTI u. FINCO 1986; SMITH 2008). Die Ätiologie konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Eine Veränderung des Metabolismus von Testosteron und Östrogenen sowie eine verstärkte intraprostatische Reduktion von Testosteron zu 5α-Dihydrotestosteron (5α-DHT) wird als Hauptauslöser der BPH angesehen (GLOYNA et al. 1970; WALSH u. WILSON 1976; ISAACS u. COFFEY 1981; EWING et al. 1984; BARSANTI u. FINCO 1986; BAMBERG-THALEN u. LINDE-FORSBERG 1993; JOHNSON 2010). KRAWIEC und HEFLIN (1992) beschreiben eine erhöhte Prävalenz von Prostataerkrankungen bei mittelgroßen und großen Hunden, insbesondere beim

Dobermann und Deutschen Schäferhund. WOLF et al. (2012) weisen auf ein frühes Einsetzen der BPH bei der Rasse Rhodesian Ridgeback hin.

Während der Ejakulation wird das Prostatasekret aus beiden Drüsenlappen in das Beckenstück der Harnröhre abgegeben. Das physiologische Prostatasekret ist wässrig und klar. Beimischung von Blut (Hämospermie) kann auf eine BPH mit oder ohne begleitende chronische Prostatitis hindeuten (KRAWIEC u. HEFLIN 1992; JOHNSTON et al. 2000).

2.2 Canine prostata-spezifische Argininesterase (CPSE)

Die canine prostata-spezifische Argininesterase (CPSE) wird von den Prostataepithelzellen synthetisiert und macht über 90% der Proteine im Prostatasekret des Rüden aus (CHAPDELAINE et al. 1984; CHEVALIER et al. 1984; ISAACS u. SHAPER 1985). Sowohl ihre Synthese als auch die Sekretion sind androgen-abhängig (FRENETTE et al. 1983, 1985; ISAACS u. SHARPER 1985; JUNIEWICZ et al. 1990). Sie ist im peripheren Blut (FRENETTE et al. 1987; BELL et al. 1995; LÉVY et al. 2009) sowie in allen Fraktionen des Hundeejakulates in ähnlichen Konzentrationen nachweisbar (CHAPDELAINE et al. 1984; ISAACS u. COFFEY 1984; FRENETTE et al. 1987). Im Blutserum von Hunden mit einer BPH wurden im Vergleich zu Hunden mit gesunder Prostata und/oder anderen Prostataerkrankungen (z.B. bakterielle Prostatitis, Prostatakarzinom) signifikant höhere CPSE-Konzentrationen gefunden (BELL et al. 1995; KLAUSNER et al. 1995; LÉVY et al. 2009, 2014). Somit stellt die CPSE einen Marker für die Sekretion der Prostata dar (CHAPDELAINE et al. 1984; FRENETTE et al. 1987). Da frühe Stadien der BPH meist einen subklinischen Verlauf haben, wird die CPSE als Indikator zur Früherkennung der BPH empfohlen (GOBELLO u. CORRADA 2002; GOBELLO et al. 2002; LÉVY et al. 2009; HOLST et al. 2017; PINHEIRO et al. 2017; ALONGE et al. 2018). Als CPSE-Schwellenwerte für eine gesunde Prostata wurden Konzentrationen von 50 ng/ml (ALONGE et al. 2018), 60 ng/ml (PINHEIRO et al. 2017) und 90 ng/ml (HOLST et al. 2017) auf der Basis verschiedener Testsysteme festgelegt.

2.3 Sexualsteroide (Testosteron, 5α-DHT, Estradiol)

Die Synthese der testikulären Steroidhormone unterliegt der Kontrolle der übergeordneten Zentren, welche sich im Hypothalamus und der Hypophyse befinden. Aus dem Hypothalamus wird das Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) pulsatil ausgeschüttet. Es bewirkt die Sekretion der hypophysären Gonadotropine (Follikelstimulierendes Hormon/FSH und Luteinisierendes Hormon/LH) (GÜNZEL-APEL et al. 1990; DÖCKE 1994; GÜNZEL-APEL et al. 1994 a; PARKINSON 1996). FSH-Rezeptoren befinden sich in den Sertolizellen der Hoden und sind Syntheseort für Inhibin und androgen-bindendes Protein. LH Rezeptoren befinden sich in den Leydigzellen der Hoden, dem Hauptsyntheseort für Testosteron und andere Androgene (HALL 1994; FELDMAN u. NELSON 1996; ENGLAND 1999). Das pulsatile Sekretionsmuster von GnRH setzt sich auf LH und weiter auf Testosteron fort (BRINKMANN 1989; GÜNZEL-APEL et al. 1990; GÜNZEL-APEL et al. 1994 b; PALLA 1994). Im Zielorgan wird Testosteron durch das Enzym 5α-Reduktase zu 5α-Dihydrotestosteron (5α-DHT), seine gewebeaktive Form, reduziert (BRUCHKOWSKI u. WILSON 1968; SPAN et al. 1998). Die Zunahme der enzymatischen Reduktion von Testosteron zu 5α-DHT wird als wichtigster auslösender Faktor für die Entwicklung einer BPH angesehen (ISAACS u. COFFEY 1981, 1984; EWING et al. 1983, 1984; GELLER 1989 a, b; JOHNSTON et al. 2000). Dies drückt sich durch eine 4- bis 5-fache Erhöhung der Gewebekonzentrationen von 5α-DHT in einer hypertrophen Prostata im Vergleich zur physiologischen Situation aus (GLOYNA et al. 1970; LLOYD et al. 1975). Östrogene werden sowohl peripher als auch testikulär synthetisiert. Beim Rüden entstehen 50% der Östrogene durch periphere Konversion von Östron mit Androstendion als Vorläufer, 40% durch Aromatisierung des im Blut zirkulierenden Testosterons und 10% direkt über die Aromatisierung von Testosteron im Hoden (POULET 1985).

2.4 Prolaktin (PRL)

Prolaktin ist ein Peptidhormon und wird in der Adenohypophyse synthetisiert. Die physiologische Rolle von PRL und seiner spezifischen Zielorgane bei männlichen Individuen wurde bisher bei keiner Spezies vollständig identifiziert. Prolaktin kann die

Steroidsynthese und Spermatogenese direkt beeinflussen. So wurde bei Männern ein hemmender Einfluss einer Hyperprolaktinämie auf die Hodenfunktion mit herabgesetzter Libido und Unfruchtbarkeit nachgewiesen (THORNER et al. 1992; CICCARELLI et al. 2005; BACHELOT u. BINART 2007; BLOMBERG JENSEN et al. 2010). Bei Hunden können kurzzeitige unphysiologisch hohe Prolaktinkonzentrationen eine reversible Azoospermie verursachen (SHAFIK 1994).

Das Prostatagewebe von Mensch und Ratte exprimiert sowohl PRL als auch den dazugehörigen Rezeptor (PRLR) (NEVALAINEN et al. 1997 a, b). Auch in Epithelzellen der Prostata des Hundes wurden intrazelluläres endogenes PRL und Bindungsstellen für exogenes PRL nachgewiesen (EL ETREBY et al. 1979).

Bei Mäusen führte eine Hyperprolaktinämie zu einer neun- bis zwanzigfachen Erhöhung des Prostatagewichtes mit histologischen Hinweisen auf eine Prostatahyperplasie (WENNBO et al. 1997). Sowohl in vivo- als auch in vitro-Studien zeigen, dass PRL das Wachstum und die Differenzierung der Prostata beeinflusst und die Prostataepithelzellen für Androgeneffekte sensibilisiert (REITER et al. 1999). Diesbezüglich wird ein Synergismus zwischen Testosteron und PRL vermutet, der eine Erhöhung der 5α-Reduktase-Aktivität bewirkt (YAMANAKA et al. 1975). Diese Zusammenhänge konnten bei Hunden bisher nicht nachgewiesen werden.

In der Studie von WOLF (2012) kam es zu einem tendenziellen Abfall der PRL-Konzentration mit fortschreitendem Alter und bei Vorliegen einer BPH. Außerdem wurden bei den Rüden der Rasse Rhodesian Ridgebäck signifikant höhere PRL-Konzentrationen nachgewiesen als bei Rüden anderer Rassen mit ähnlichem Körpergewicht.

2.5 Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)

Der insulin-ähnliche Wachstumsfaktor, früher auch Somatomedin C genannt, ist ein aus 70 Aminosäuren bestehendes Polypeptid. Er wird als peripherer Mediator des hypothalamisch-hypophysären Systems in Abhängigkeit vom Wachstumshormon in Leber, Muskelzellen und Hypophyse synthetisiert und sowohl auto- als auch parakrin sezerniert (JAFFE et al. 2001; FROST u. LANG 2003). Als weitere Mediatoren für die

IGF-1 Produktion werden Schilddrüsen- und Steroidhormone angenommen (POLLAK et al. 1992). Zu den Wirkungen von IGF-1 zählen eine Steigerung der Proliferationsneigung, Verringerung der Apoptoserate sowie die Verstärkung der zellulären Differenzierung (LE ROITH 1996). Der Einfluss von IGF-1 auf die Proliferation vieler Gewebe wird auch im Zusammenhang mit der BPH bei Männern beschrieben (KHOSRAVI et al. 2001). Es wurde ein anti-apoptotischer Effekt von IGF-1 auf epitheliale und stromale Zellen der Prostata mit Zunahme hypertropher Veränderungen nachgewiesen. Dabei wurde gezeigt, dass IGF-1 über seinen Membranrezeptor (IGF-R1) und die Tyrosinkinase wirkt (MONTI et al. 2001).

Die Bioaktivität innerhalb von Geweben hängt von den zirkulierenden IGF-1 Spiegeln sowie von der lokalen IGF-1 Produktion und dem Vorhandensein IGF-bindender Proteine (IGFBPs) ab (STATTIN et al. 2001). Es wurde gezeigt, dass Prostatazellen IGF, IGFBPs und den IGF-R1 exprimieren (CHOKKALINGAM et al. 2002). Im Blut kommt IGF-1 selten in freier Form vor. Es ist, i.d.R. an Trägerproteine gebunden (IGFBP 1-6) (KLAUWER 1997), wobei IGFBP-3 die am häufigsten vorkommende Form mit der höchsten Affinität für IGF-1 im zirkulierendem System ist (VAN DOORN et al. 1999). Es bindet 75-90% des zirkulierendes IGF-1 (LEE et al. 2014). IGFBP-3 ist ein starkes anti-proliferatives Protein, das Apoptose bewirkt und beim Menschen die Zellproliferation bei Prostatakrebs hemmt. Wie für IGF-1 beschrieben, waren auch die IGFBP-3 Spiegel bei Männern mit BPH im Vergleich zu prostata-gesunden Kontrollen signifikant niedriger (SAFARINEJAD et al. 2011). Darüber hinaus können zirkulierende Androgenkonzentrationen die IGF-Bioaktivität beeinflussen, weil der androgene Signalweg die IGF-vermittelte Zellregulation beeinflusst. Ferner wurde gezeigt, dass Androgene die Expression des Typ-1-IGF-Rezeptors fördern (VENDOLA et al. 1999). Auch werden dem Wachstumshormon (Growth Hormone/GH) und IGF-1 Einfluss auf die Funktion der Leydigzellen und Sertolizellen zugeschrieben, in welchen sie lokal produziert werden (HULL u. HARVEY 2000). Sowohl GH als auch IGF-1 stimulieren die Testosteronsekretion in Leydigzellen der Ratte (GELBER et al. 1992). Zudem erhöht IGF-1 in der porcinen Leydigzellkultur die Anzahl der LH-Rezeptoren (CHUZEL et al. 1996).

2.6 25-Hydroxyvitamin D_3 (25-OHD_3)

Im Rahmen der Rachitis Forschung bei Kindern wurde erstmals von Edward Mellanby (1918) über die Bedeutung von Vitamin D für die Kalzium- und Phosphathomöostase (Ca:P) bezüglich des Knochenstoffwechsels berichtet (MOHR 2009). Im Gegensatz zum Menschen synthetisieren Hunde Vitamin D nicht (HOW et al. 1994; HAZEWINKEL u. TRYFONIDOU 2002) oder nur in geringem Maß (CARTWRIGHT et al. 2018) durch Einwirkung von ultravioletter Strahlung auf die Haut. Vielmehr hängt die Versorgung mit Vitamin D primär von der Fütterung ab. Die Mehrheit der handelsüblichen Hundefutter erfüllt oder überschreitet den vom National Research Council und der Association of American Feed Control Officials festgelegten täglichen Mindestbedarf an diesem Vitamin (500-5000 IE Vitamin D/kg Futter/Tag) (HAZEWINKEL u. TRYFONIDOU 2002).

Das Vitamin D gehört zu der Gruppe der fettlöslichen Vitamine und wird über die Nahrung als Vitamin D_3 aus tierischen Quellen wie Leber- und Fischölen aufgenommen. Die Hydroxylierung in die aktivere Form, 25-Hydroxycholecalciferol (25-OHD_3), erfolgt durch 25-Hydroxylierung in der Leber, sowohl direkt als Reaktion auf verringerte Kalzium- und Phosphorkonzentrationen im Blut als auch indirekt durch einen Anstieg des Parathormons (PTH) (HAZEWINKEL u. TRYFONIDOU 2002). Eine weitere Umwandlung von 25-OHD_3 erfolgt über die renale 1α-Hydroxylase zu 1,25$(OH)_2D_3$, welches auch als Calcitriol bekannt ist. Calcitriol bewirkt eine direkte Erhöhung der intestinalen Absorption und der renalen Resorption von Kalzium und Phosphor und schlussendlich die Freisetzung beider Komponenten aus den Knochen (HAZEWINKEL u. TRYFONIDOU 2002). Ein Überschuss an Serum-Ca und -P löst dagegen eine Hydroxylierung durch die Nieren zu 24,25$(OH)_2D_3$ aus, was zur Ablagerung von Ca und P im Knochen führt (MOHR 2009). Im Rahmen der Krebsforschung wurde die „nicht traditionelle Rolle“ von Vitamin D entdeckt. Diese resultiert vor allem aus seiner anti-proliferativen Wirkung und der Funktion als Mediator der Zelldifferenzierung und Apoptose in verschiedenen Geweben (HAUSSLER et al. 1998; NAGPAL et al. 2005). Obwohl die BPH nicht als kanzeröser Prozess kategorisiert wird, weist sie insofern Gemeinsamkeiten auf, als die proliferativen Vorgänge gegenüber den apoptotischen Prozessen überwiegen, woraus eine

Zunahme sowohl der Anzahl als auch der Größe der Prostatazellen resultiert. Diese unkontrollierte, wenn auch nicht maligne Wachstumsrate wirkt sich auf die Infektionsanfälligkeit aus (JOHNSTON et al. 2000). Beim Menschen gilt ein niedriger Vitamin D-Status, verifiziert durch geringe Plasmakonzentrationen von 25-OHD_3, als Risikofaktor für die BPH (ESPINOSA et al. 2013). Darüber hinaus wurde im Prostatagewebe von Mensch und Ratte die anti-proliferative Wirkung der biologisch aktiven Form von Vitamin D, 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 (1,25-$(OH)_2D_3$) nachgewiesen, welche sich über den Vitamin D-Rezeptor (VDR) entfaltet (PEEHL 1994; JOHNSON et al. 1996; KIVINEVA et al. 1998; JOHNSON 2010; BLOMBERG JENSEN et al. 2011).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiere

Insgesamt wurden 38 gesunde intakte Rüden in die Studie einbezogen. Dabei handelte es sich um 18 Labrador Retriever (LR) und 20 Rhodesian Ridgebacks (RR) im Alter von 18-72 Monaten. Sie waren entweder für den Zuchteinsatz vorgesehen oder bereits in der Zucht erfolgreich. Das durchschnittliche Körpergewicht der LR betrug 37,2 kg (27,7 – 42,7 kg), das der RR 41,7 kg (34,5 – 48,0 kg). Die Rüden wurden den Altersgruppen 18-24 Monate, 25-48 Monate und 49-72 Monate zugeordnet. Die Altersgruppengröße pro Rasse betrug für die LR 18-24 Monate n=6, 25-48 Monate n=7, 49-72 Monate n=5, für die RR 18-24 Monate n=6, 25-48 Monate n=6, 49-72 Monate n=8.

3.2 Klinische Untersuchung und Probengewinnung

Alle Tiere wurden einer klinischen Untersuchung unterzogen mit ausführlicher Anamnese, Allgemeinuntersuchung und spezieller andrologischer Untersuchung. Letztere beinhaltete in folgender Reihenfolge die Samenentnahme und die palpatorische und sonographische Untersuchung der Hoden und der Prostata. Das gewonnene Ejakulat wurde umgehend der spermatologischen Untersuchung zugeführt. Nach Abschluss der Untersuchungen erfolgte die Entnahme je einer Blutprobe zur Serum- und Plasmagewinnung.

3.3 Samengewinnung

Die Samengewinnung erfolgte unter Ausnutzung des Paarungsverhaltens durch manuelle Stimulation in Anwesenheit einer läufigen Hündin (GÜNZEL-APEL 2016 a). Dabei wurde der Ablauf der tierartspezifischen Verhaltensweisen mit Friktionsphase, Umsteigen, und Hängen ungehindert zugelassen, um ein vollständiges Ejakulat zu erhalten. Das Vorsekret, die spermienreiche und die spermienfreie Ejakulatfraktion bzw. das Prostatasekret wurden separat in graduierten, auf 38°C vorgewärmten

Tulpengläsern (Ludwig Bertram GmbH, MEDVET, Laatzen, Deutschland) aufgefangen.

3.4 Morphologische Untersuchung der Genitalorgane

Im Rahmen der morphologischen Untersuchung wurden die Hoden mit den Nebenhoden und die Prostata untersucht (GÜNZEL-APEL 2016 b; JANTHUR 2016). Dabei wurde die Beschaffenheit der Skrotalhaut adspektorisch untersucht und die Verschieblichkeit der einzelnen Schichten gegeneinander und gegen die Hoden palpatorisch geprüft. Von den Hoden wurden die Größe, Form, Lage und Konsistenz erfasst. Die Größe der Hoden wurde adspektorisch und palpatorisch geschätzt und mittels Schieblehre dreimalig in Länge und Breite vermessen. Die Nebenhoden wurden auf die Abgrenzbarkeit der Nebenhodenanteile Kopf, Körper und Schwanz untersucht. Am Nebenhodenschwanz wurde zusätzlich die Größe (geschätzt) sowie Form, Lage und Konsistenz beurteilt. Danach wurden die Samenstränge bezüglich der Verschieblichkeit der einzelnen Schichten und die Palpierbarkeit (ja/nein) der Hodensacklymphknoten untersucht. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Prostata durch rektale Palpation hinsichtlich ihrer Größe, Symmetrie, Konsistenz, Oberflächenbeschaffenheit und Schmerzhaftigkeit.

3.5 Ultraschalluntersuchung

Für die sonographische Untersuchung der Prostata und der Hoden stand das Ultraschallgerät Logic 5 Pro (General Electric System, Solingen, Deutschland) zur Verfügung. Alle Untersuchungen wurden am unsedierten, stehenden Tier durchgeführt. Nach dem Scheren der Präputialregion und Auftragen von reichlich handelsüblichem Ultraschallgel wurde die Prostata mit einem 6,0-MHz-Mikrokonvex Schallkopf aufgesucht. Dazu wurde der Schallkopf in ventrodorsaler Richtung paramedian des Präputiums aufgesetzt und bis zum Auffinden der Prostata nach kaudal in Richtung Harnblasenhals bzw. Beckeneingang verschoben. Die Drüse wurde im Längs- sowie Querschnitt dargestellt. Es wurden jeweils dreimalig die Länge, Höhe und Breite des Organs im Längs- bzw. Querschnitt gemessen. Das Prostatavolumen wurde rechnerisch ermittelt. Dazu wurden die Mittelwerte der Messungen in folgende Formel für ellipsoide Volumen eingesetzt: Länge x Höhe x

Breite x 0,523. Außerdem wurde das Drüsenparenchym auf seine Beschaffenheit (homogen, inhomogen) (Abbildung 1) und auf ggf. vorliegende Veränderungen (z.B. kleine Zysten) (Abbildung 2) geprüft.

bbildung 3. *Sonographischer Längsschnitt*

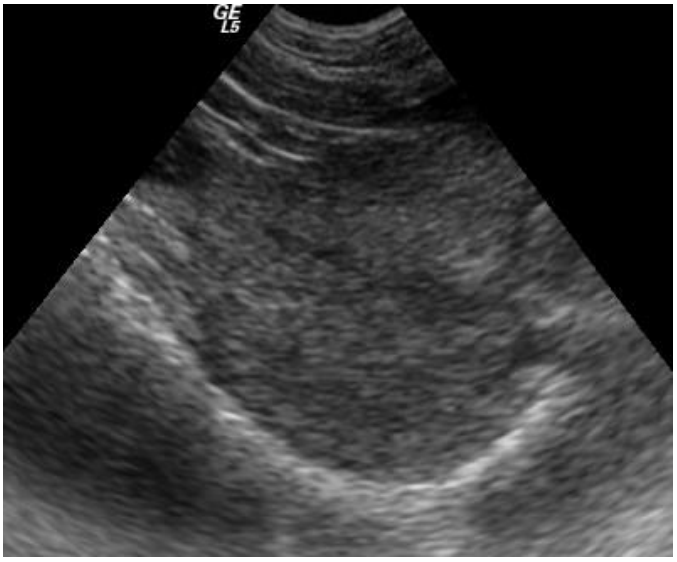

Abbildung 1. Sonographischer Längsschnitt einer Prostata. Das Drüsenparenchym stellt sich homogen dar. Zentral die Urethra als annähernd hypoechogener Streifen.

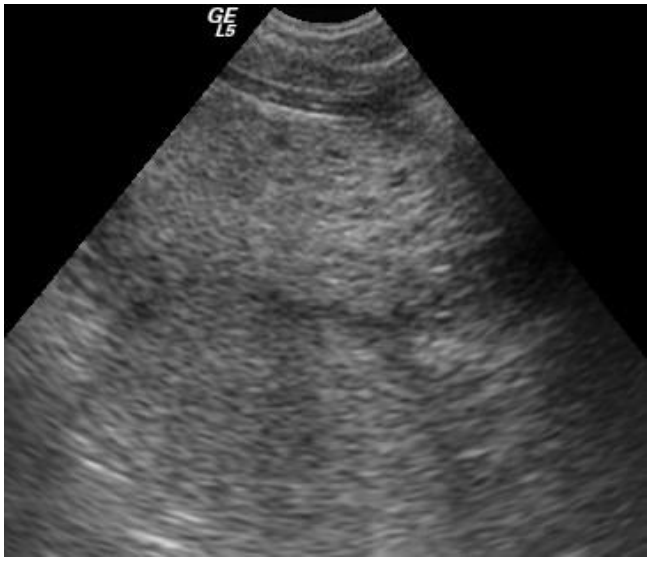

Abbildung 2. Sonographischer Längsschnitt einer vergrößerten Prostata. Zentral die Urethra als annähernd hypoechogener Streifen, dorsal davon gering– bis mittelgradig inhomogenes Prostata-parenchym mit multifokalen kleinen hypoechogenen Zysten.

Abschließend wurden beide Hoden mittels Linearschallkopf untersucht, im Längs- und Querschnitt vermessen und das Hodenparenchym hinsichtlich seiner Beschaffenheit (homogen, inhomogen) beurteilt.

3.6 Samenuntersuchung (Basisspermatologie)

Zur Beurteilung der Ejakulatparameter wurden die von GÜNZEL-APEL et al. (1994 b) und GÜNZEL-APEL (2016 c) empfohlenen Normrichtwerte und die spermatologische Nomenklatur nach WEITZE (2001) herangezogen. Die Untersuchung folgte der von KRAUSE (1965) und GÜNZEL-APEL (2016 c) beschriebenen Verfahrensweise.

Im Anschluss an die biologische Samenuntersuchung wurden 6,0 ml des Nachsekretes in ein unbeschichtetes Kunststoffröhrchen (Mikroröhrchen, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

3.7 Blutentnahme

Abschließend erfolgte die Blutentnahme aus der Vena cephalica antebrachii mit einer sterilen Einmalkanüle (Terumo® Neolus 20G 40mm; Terumo Deutschland GmbH, Eschborn, Deutschland). Insgesamt wurden knapp 30 ml Blut gewonnen. Davon wurden jeweils 10 ml in einem Serumröhrchen, EDTA- bzw. Lithium Heparin beschichteten Röhrchen aufgefangen. Um das Serum bzw. Plasma zu gewinnen, wurden die Proben für 10 Minuten bei 3030 x g zentrifugiert (Zentrifuge: Heraeus®-Labofuge®-200, Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland). Der Überstand wurde unmittelbar danach in unbeschichtete Kunststoffröhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert und bei -20°C bis zur Analyse aufbewahrt.

3.8 Laboruntersuchungen

3.8.1 Canine prostata-spezifische Argininesterase (CPSE)

Für die CPSE-Analysen im Blutplasma fand ein kommerziell erhältlicher ELISA (Odelis® CPSE, Virbac Tierarzneimittel, Bad Oldesloe, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben Anwendung.

Verfahrensschritte: - Verdünnung der Proben mit der zum Test Kit gehörenden Pufferlösung im Verhältnis 1:10, - Pipettieren der Standards, Proben und Kontrollen in die Vertiefungen (Wells) einer mit einem Anti-CPSE-AK beschichteten Mikrotiterplatte, - Abdecken mit Klebefolie, - Inkubation für 60 min bei 37 °C. Nach vier Waschschritten Zugabe des gebrauchsfertigen HRP-Konjugats in jedes Wells, - erneutes Abdecken der Mikrotiterplatte mit Klebefolie, - Inkubation für weitere 60 min bei 37 °C. Nach vier Waschschritten Starten der enzymatischen Reaktion durch Zugabe von Tetramethylbenzidin, - nach 10 min Anhalten der Reaktion durch Zugabe der Stopplösung, - unmittelbar danach Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Die Werte der optischen Dichte verhalten sich proportional zur CPSE-Konzentration in den Standards und Proben. Die Berechnung der CPSE-Konzentration in den Proben erfolgte anhand der erstellten Standardkurve.

3.8.2 Prolaktin (PRL)

Die Messung der Prolaktinkonzentration erfolgte mit Hilfe eines Enzymimmunoassays zur quantitativen Bestimmung von Prolaktin im Hundeserum (Demeditec Prolactin canine ELISA DEV9944, Kiel, Deutschland) im Mikrotiterplatten-Format.

Verfahrensschritte: - Pipettieren der Standards und Serumproben in die mit monoklonalem anti-Hunde-Prolaktin-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatten, - Inkubation bei Raumtemperatur (RT) für zwei Stunden auf einem Plattenschüttler, - Dekantieren des Überstandes und viermaliges Waschen mit Waschpuffer, - Zugabe von enzymmarkierten polyklonalen Antikörpern gegen Hunde-Prolaktin in jede Vertiefung, - Inkubation für eine Stunde auf dem Schüttler, - Dekantieren des

Überstandes und viermalige Waschung, - Pipettieren des Substrats 3,3´,5,5´-Tetra-Methyl-Benzidin (TMB) in jede Vertiefung, - Inkubation im Dunkeln für 30 min, - Beendigung der enzymatischen Reaktion durch Zufügen von Salzsäure als Stopplösung in jede Vertiefung (Farbumschlag blau zu gelb), - unmittelbar im Anschluss Messung der optischen Dichte bei 40 nm.

Die Werte der optischen Dichte der Lösung ist der Konzentration des Hunde-Prolaktins in den Standards und den Serumproben direkt proportional. Der Intraassay – Variationskoeffizient betrug 6,3 %.

3.8.3 Testosteron

Die Testosteronkonzentration wurde mit Hilfe des kompetitiven Radioimmunassays Testosterone direct RIA-Kit (Fa. Beckman Coulter, Prag, Tschechien) bestimmt. Der in diesem Immunoassay verwendete Antikörper ist spezifisch für Testosteron.

Verfahrensschritte: - Inkubation der Probe mit ^{125}I-markiertem Testosteron in antikörperbeschichteten Röhrchen für eine Stunde bei RT, - Dekantieren des Überstandes, - Spülen des Röhrchens zur Entfernung des nicht gebundenen, mit ^{125}I-markierten Testosterons, - Messung der gebundenen Radioaktivität mittels Gamma-Zähler.

Die Testosteronkonzentration in der jeweiligen Probe wird durch Interpolation der Standardkurve angezeigt. Der Intraassay - Variationskoeffizient betrug 5,7 %.

3.8.4 5α-Dihydrotestosteron (5α-DHT)

Die Konzentration von 5α-DHT wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen kompetitiven Enzymimmunoassays (Demetitec 5α Dihydrotestosterone (DHT) ELISA DE2330, Kiel, Deutschland) nach Angaben des Herstellers gemessen.

Verfahrensschritte: - Pipettieren von jeweils 50 µl jedes Standards, jeder Kontrolle und Serumprobe in die Wells der mit Kaninchen-Anti-DHT Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatte, - Zugabe von je 100 µl des verdünnten Enzymkonjugats (DHT-HRP Conjugate Conventrate – X100 verdünnt mit Assaypuffer im Verhältnis 1:100), - Inkubation bei RT für eine Stunde, - dreimaliges Waschen mit 300 µl verdünntem

Waschpuffer, - Ausklopfen der restlichen Flüssigkeit, - Pipettieren von je 150 µl Substratlösung in jedes Well, - Inkubation bei RT für 15 min, - Beendigung der enzymatischen Reaktion durch Zugabe von 50 µl der Stopplösung, - innerhalb von 20 min Messung der optischen Dichte bei 450 nm.

Die Auswertung erfolgte mit der Software Magellan. Der verwendete 5α-Dihydrotestosteron ELISA Kit wies Kreuzreaktionen mit 5α-DHT (100 %), Testosteron (8,7 %), 5β-DHT (2 %) und Androstendion auf. Der Intraassay – Variationskoeffizient betrug 8,7 %.

3.8.5 Thyroxin (T_4) und Thyreotropin (TSH)

Thyroxin und TSH wurden im Serum mittels eines handelsüblichen Chemilumineszenz-Immunoassays (Immulite® Siemens Medical Diagnostics, Bad Nauheim, Deutschland) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip des Tests basiert auf Antikörper (AK)-Antigen (Ag)-Komplexbildung, welche mit Hilfe von Chemilumineszenz mess- und sichtbar gemacht werden.

Die T_4-Messung erfolgt nach dem Prinzip der Kompetition, d.h. das im Serum enthaltene T_4 und das mit alkalischer Phosphatase markierte T_4 konkurrieren um die Bindungsstellen der AK auf der Kugel. Je höher die T_4-Konzentration in der Probe, desto weniger markiertes T_4 kann gebunden werden. Für die TSH-Analyse kommt die sog. Sandwichmethode zur Anwendung. Im Serum befindliches TSH bindet an die AK der Kugeloberfläche und die mit alkalischer Phosphatase markierten im Reagenz enthaltenen AK binden wiederum an das TSH.

Verfahrensschritte: - Pipettieren (per Automat) von 200µl der Serumprobe und des mit alkalischer Phosphatase markierten Ag (T_4) 30 µl bzw. AK (TSH) 25 µl in ein mit einer mit AK- gegen das zu messende Hormon beschichteten Kugel versehenen Teströhrchen, - Inkubation des Gemischs bei 37°C für 30-60 min, - Waschung zum Entfernen von ungebundenen Ag und AK, - Zugabe des Substrats ADPP (Adamantyl 1,2-Dioxetanarylphosphat), welches durch die saure Phosphatase zu lumineszierendem Adamantyldioxtan dephosphoryliert wird.

Bei T_4 verhält sich die entstehende Lichtemission umgekehrt proportional, bei TSH proportional zur Menge des in der Probe enthaltenen jeweiligen Hormons. Die Messung der Lichtemission erfolgt mittels Luminometer, die Berechnung der Hormonkonzentration anhand einer vom Hersteller erstellten Messkurve.

3.8.6 Estradiol-17β

Die Bestimmung der Estradiol-17β-Konzentration wurde an der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere des Justus-Liebig-Universität Giessen in Anlehnung den von HOFFMANN et al. (1992) beschriebenen Sequenztest durchgeführt.

Verfahrensschritte:

Für den Extraktionstest: - Pipettieren von 0,25 ml der zu messenden Probe in 15 ml Wheaton-Schraubgläser im Doppelansatz, - zweimaliges Mischen mit 2,5 ml Toluol (Extraktionsmittel) für 15 min im Rotationsmischer, - nach jeder Extraktion einminütige Zentrifugation der Röhrchen zur Phasentrennung bei 3500 U/min, - Einfrieren der wässrigen Phase im Trockeneis–Alkoholbad bei -50 bis -60 °C für 30 sec, - Dekantieren des Überstandes in Einweg-Reaktionsgefäße, - Abdampfen des Lösungsmittels im Vortex-Evaporator bei 45 °C für ca. 10 min, - Rücklösung der Proben in 0,1 ml BSA-Phosphatpuffer, - Durchführung des Radioimmunotests (RIA).

Zur Definition der nicht-spezifischen Bindung (NSB) wurde dem 0-Wert der Standardkurve ein 312-facher Überschuss von Estradiol-17β (10 ng) zugesetzt.

Die Standardkurve deckte den Bereich von 0,5–32 pg pro Ansatz (0,1 ml) ab und wurde in BSA-Phosphatpuffer erstellt.

Vorbereitung und Durchführung des RIAs:

- erste Inkubation nach Zugabe der Antiserumverdünnung (0,4 ml) bei 4 °C über Nacht, - Einbringen von 32 pg ^{3}H-markiertem Estradiol-17β (0,1 ml) ≙ 24000 dpm in 20 ml BSA-Phosphatpuffer, - zweite Inkubation der Proben bei 4 °C im Eiswasserbad für 45 min, - Trennung von freiem und gebundenem Estradiol-17β durch Adsorption an Holzkohle, dafür Zufügen von 0,2 ml eisgekühlter 0,5 %-iger Holzkohlesuspension und Inkubation bei 4 °C für 30 min, - Zentrifugation der Proben bei 4 °C mit 3200 U/min für

15 min, - Dekantieren von 0,6 ml des Überstandes mit einem Diluter-Dispenser, - Überführen des Überstandes unter Nachspülen mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit in Szintillationsküvetten, - Bestimmung der Radioaktivität der gebundenen Antikörper im Flüssigkeitsszintillationszähler.

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte im Online Verfahren mit dem von der Fa. Beckman bereitgestellten Programm (Linearisierung nach Logit/Log-Transformation).

3.8.7 Calcidiol/ 25-Hydroxy Vitamin D/ 25-OHD$_3$

Das 25-OHD$_3$ wurde mit einem kommerziell erhältlichen kompetitiven ELISA bestimmt (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany).

Verfahrensschritte: - Pipettieren von 20 µl der vorbereiteten Standards, Kontrollen und Proben in die jeweiligen Vertiefungen einer Mikrotiterplatte, - Abkleben mit Abdeckfolie, - Inkubation bei RT für 60 min, - Pipettieren von 150 µl anti-25(OH)-Vitamin-D-Antikörper in jede Vertiefung, - Inkubation bei RT für 45 min, - erneutes Abkleben mit Abdeckfolie, - Inkubation bei RT für 45 min, - Entfernen des Inhalts aus den Vertiefungen und fünfmaliges Waschen mit je 250 µl Waschpuffer, - Entfernen der verbliebenen Waschpufferreste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier, - Pipettieren von 200 µl Konjugat in jede Vertiefung, - Abkleben mit Abdeckfolie und Inkubation bei RT für 45 min, - Entfernen des Inhalts aus den Vertiefungen und fünfmaliges Waschen mit je 250 µl Waschpuffer, - Ausklopfen der Waschpufferreste auf saugfähigem Papier, - Pipettieren von 200 µl Substrat in jede Vertiefung, - Inkubation im Dunklen bei RT für 10–15 min, - Pipettieren von 50 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung.

Es findet ein Farbumschlag von blau nach gelb statt. Unmittelbar danach erfolgt die Messung der Extinktion im Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm.

3.8.8 Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)

Die Messung der IGF-1 Konzentration wurde mit Hilfe eines Radioimmunoassay (IRMA) Kits (Immunotech Beckman Coulter, CA, USA) nach Herstellerangaben

durchgeführt. In dem Kit werden monoklonale Mausantikörper verwendet, bei welchen es sich um verschiedene und deshalb nicht konkurrierende Epitope des IGF-1 handelt.

Verfahrensschritte: - Freisetzung von IGF-1 von seinem Bindungsprotein mittels Dissoziationspuffer, - Pipettieren der Probe in ein mit Antikörper beschichtetes Röhrchen, - in Anwesenheit eines ^{125}I-markierten monoklonalen (zweiten) Antikörpers Inkubation für eine Stunde auf einem Schüttler, - Dekantieren des Überstandes und zweimalige Waschung, - Messung der gebundenen Radioaktivität mittels Gamma-Counter (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA).

Zur Bestimmung der IGF-1-Konzentration in den Proben kam eine mitgeführte Standardkurve zur Anwendung. Die IGF-1-Konzentration verhielt sich direkt proportional zur gebundenen Radioaktivität. Der Intraassay – Variationskoeffizient betrug 9,8 %.

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels SAS® Programm (Statistical Analysis System®, SAS Institute Inc., Version Enterprise Guide® 7.1, Cary North Carolina, USA) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung der Stiftung Tierärztlicher Hochschule Hannover.

Mit Hilfe der Procedure MEANS wurden für alle Gruppen Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Minimum (MIN) und Maximum (MAX) berechnet.

Die deskriptive Statistik wurde mittels nichtparametrischer einfaktorieller ANOVA durchgeführt. Der Kruskal-Wallis-Test und der Wilcoxon-Test wurden verwendet, um die für die verschiedenen Parameter bestehenden Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich CPSE-Status (normal / erhöht), Rasse und Alter zu vergleichen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant bewertet, wenn $p<0,05$. Die Korrelationen wurden mit dem Rang-Korrelationskoeffizienten nach Spearman bestimmt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Manuskript I

Das folgende Manuskript wurde in der Zeitschrift Reproduction in Domestic Animals veröffentlicht (https://doi.org/10.1111/rda.13616):

WERHAHN BEINING F, URHAUSEN C, WOLF K, et al. (2020):

Rhodesian Ridgebacks have an increased risk to develop benign prostatic hyperplasia. Reprod Dom Anim 55, 283–292

Rhodesian Ridgebacks have an increased risk to develop benign prostatic hyperplasia

Franziska Werhahn Beining[1], Carola Urhausen[1], Karola Wolf[1], Marion Schmicke[2], Karl Rohn[3], Gerhard Schuler[4], Anne-Rose Günzel-Apel[1*]

[1]Unit of Reproductive Medicine – Small Animal Clinic, [2]Clinic for Cattle, [3]Institute for Biometry, Epidemiology and Information, University of Veterinary Medicine Hannover, [4]Clinic for Obstetrics, Gynaecology and Andrology of Large and Small Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University Giessen, Germany

Abstract

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is an age-dependent primarily non-inflammatory enlargement of the accessory gland in the intact dog. The aim of the present study was to control a previously raised suspicion of a breed-related higher incidence of BPH in dogs of the Rhodesian Ridgeback breed. For this, 18 Labrador Retrievers/LR and 20 Rhodesian Ridgebacks/RR were assigned to the age groups 18-24 months (n=12), 25-48 months (n=13), and 49-72 months (n=13). Prostate gland status was determined by rectal palpation, B-mode ultrasound, calculation of the prostate gland volume, semen analysis regarding haemospermia and was classified according to blood plasma concentrations of canine prostate specific arginine esterase (CPSE) (normal ≤60 ng/ml, increased ≥61 ng/ml; Pinheiro et al., 2017). Concentrations of testosterone, 5α-dihydrotestosterone and estradiol were analysed in peripheral blood serum or

plasma for detecting breed-specific conditions regarding the endocrine metabolism. Prostatic volume was significantly larger in RR irrespective of the CPSE status. In RR, BPH occurred more frequently and started at an earlier age compared to the LR. Breed-related particularities in steroid metabolism in the RR were indicated by correlations of 5α-dihydrotestosterone and estradiol with age and of testosterone with prostate gland volume. Although the incidence of sonographic signs of BPH and haemospermia did not fit with normal and increased CPSE concentrations, a breed-specific higher incidence of BPH in the RR breed could be clearly verified.

Keywords: canine prostate specific arginine esterase, haemospermia, sexual steroids, ultrasound

1 Introduction

The oval to spherical canine prostate gland is a bilobed structure encircling the proximal urethra (Smith, 2008). It reaches its normal size with completion of sexual maturity. Maturation and function directly depend on testicular steroid hormones, especially on testosterone and estrogens (Kawakami et al., 1991). Benign prostatic hyperplasia (BPH) is a combination of hypertrophy (increase in growth) and hyperplasia (increase in cell number) of the secretory glandular epithelium and stromal components. It is a common spontaneous age-dependent primarily not inflammatory enlargement of the accessory gland and due to this the most frequent prostatic disease in the intact dog, in most cases showing a subclinical course (Berry et al., 1986a,b; Johnston et al., 2000). Early studies performed in Beagles indicate that hyperplasia of glandular epithelial cells may already start by the age of 2.5 years, with an increasing tendency to develop cystic hyperplasia from four years onwards (Brendler et al., 1983; Berry et al., 1986a,b; Lowseth et al., 1990). Regarding pathogenesis of BPH, it is clear that it begins with a change in the testosterone and estrogen metabolism, leading to an alteration in the androgen:estrogen ratio secreted by the testes (Bamberg-Thalen & Linde-Forsberg, 1993). In this regard, estrogens promote BPH by enhancing androgen receptors (Trachtenberg et al., 1980). An increase in enzymatic reduction of testosterone to 5α-dihydrotestosterone (5α-DHT) within the glandular tissue is

considered to be the main trigger of cell hyperplasia (Isaacs & Coffey, 1981, 1984; Ewing et al., 1983, 1984; Geller, 1989a,b). The latter is expressed by an almost four-fold increase in the tissue concentrations of 5α-DHT compared with the physiological situation (Lloyd et al., 1975). During ejaculation, the prostatic secretion is delivered from the two glandular lobes into the pelvic part of the urethra. Its normal appearance is watery and clear. Admixture of blood to the secretion (haemospermia) may indicate BPH with or without accompanying chronic prostatitis (Krawiec & Heflin, 1992; Johnston et al., 2000).

Canine prostate specific arginine esterase (CPSE) makes >90% of the proteins in canine prostatic secretion (Chapdelaine et al., 1984; Chevalier et al., 1984; Isaacs & Shaper 1985) and is the most abundant kallikrein secreted by the canine prostate gland (Dubé 1994). Both its synthesis in prostatic epithelial cells and secretion are androgen dependent (Frenette et al., 1983, 1985; Isaacs & Sharper 1985; Juniewicz et al., 1990). Significantly higher CPSE concentrations in blood serum of dogs with BPH have been found compared with those with healthy prostate glands and in dogs with other prostatic diseases like bacterial prostatitis and prostate gland carcinoma (Bell et al., 1995; Klausner et al., 1995; Lévy et al., 2009, 2014). By means of this, blood serum CPSE concentrations may serve as a valuable indicator for early diagnosis of BPH and for controlling the effect during medical therapy of BPH (Gobello & Corrada, 2002; Gobello et al., 2002; Pinheiro et al., 2017; Alonge et al., 2018). CPSE concentrations of ≤50 ng/ml (Alonge et al., 2018), ≤60 ng/ml (Pinheiro et al., 2017) and ≤90 ng/ml (Holst et al., 2017) were set as threshold values for dogs with healthy prostate glands using different test systems, especially for identifying BPH in asymptomatic dogs.

Krawiec and Heflin (1992) direct attention to an increased prevalence of prostate diseases in medium- and large-sized dogs, especially in Dobermans and German Shepherds, without special reference to BPH. An early enlargement of the prostate gland in Rhodesian Ridgebacks is described in our previous publication (Wolf et al., 2012). A significantly larger prostatic volume and significantly higher CPSE concentrations were found in comparison in dogs of other breeds with a similar body weight. Rhodesian Ridgebacks have not been considered in any other study so far. Therefore, the aim of our present study was to conduct in-depth research on this breed;

we investigated selected criteria in connection with BPH in Rhodesian Ridgeback dogs in comparison to Labrador Retrievers serving as a control group.

2 Materials and Methods

2.1 Animals and experimental design

A total of 38 physically healthy intact male dogs of two selected breeds of comparative size and body weight were included in this study. Physical health included the absence of BPH-related clinical signs like haematuria, constipation and dysuria or problems with defaecation. These privately owned breeding dogs consisted of 18 Labrador Retrievers (LR) (37.2 ± 4.0 kg body weight) and 20 Rhodesian Ridgebacks (RR) (41.7 ± 3.7 kg body weight). The dogs were assigned to three age groups: I (18-24 months, RR: n=6, LR: n=6), II (25-48 months, RR: n=6, LR: n=7) and III (49-72 months, RR: n=8; LR: n=5).

Regarding the prostate gland status (healthy vs. benign prostatic hyperplasia/BPH), classification of dogs was performed in relation to the blood plasma CPSE concentration. A concentration of ≤ 60 ng/ml was equated with “normal” (CPSEn), a concentration of ≥61 ng/ml with “increased” (CPSEi), as published by Pinheiro et al. (2017), who validated the CPSE assay used in our study.

All dogs underwent a complete breeding soundness evaluation including morphological and sonographic examination of the testes and epididymides, semen collection and evaluation. Only dogs with normospermia (LR: n=14, RR: n=18) or dysspermia (LR: n=4, RR: n=2) were included in the study. Dysspermia consisted of a slightly increased percentage of morphologically abnormal spermatozoa as the only alteration in semen quality (Günzel-Apel, 2016). The prostate gland was examined by digital rectal palpation to assess the approximate size, symmetry or asymmetry, the consistency and the position as well as the presence of painfulness. Sonographic images of the glandular parenchyma were differentiated into “hypoechoic, homogeneous” (normal) and “hypoechoic, inhomogeneous” (suspected BPH degree 1) to “inhomogeneous with small cysts” (suspected BPH degree 2). All sonographic examinations were performed in a standing position by means of the ultrasound machine Logic 5 Pro (General Electric Medical Systems GmbH, Solingen, Germany)

using a 6.0 MHz micro-convex transducer. If necessary, the hair coat in the suprapubic area was clipped. Coupling gel was applied to the skin to improve contact. The sonographic presentation of the prostate gland was performed as described by Ruel et al. (1998). Prostatic length and height were measured in a sagittal direction. Length was defined as the maximum diameter along the urethral axis; height was defined as the maximum diameter vertical to the axis of length. To obtain transverse images of the prostate, the transducer was rotated 90 degrees to measure the height and width. Height was defined as the diameter of the gland on a line separating the two lobes, and width as the maximum diameter vertical to the axis of the height.

Prostatic length, width and height were measured three times on maximum longitudinal and transverse sections of ultrasound images and mean values were calculated. Prostatic volume was estimated using the formula for the volume of an ellipsoid body (volume = length x width x height x 0.523) according to Ruel et al. (1998).

Semen collection was performed by digital manipulation in the presence of an oestrous teaser bitch as described by Günzel-Apel (2016). The watery pre-secretion (first fraction), representing the initial portion of prostatic secretion (England et al., 1990), the greyish to whitish sperm rich fraction (second fraction) and the remaining watery prostatic secretion (third fraction) were collected in separate sterile glass vials. Semen analysis was performed regarding the macroscopic appearance of each ejaculated fraction (volume, consistency), determining the sperm concentration using a Thoma counting chamber and calculating the total sperm number by multiplying the volume and sperm concentration of the sperm rich fraction. Sperm motility (percentages of progressively and locally motile as well as immotile spermatozoa) was estimated by phase contrast microscopy on a warming table at 38 °C. The percentage of spermatozoa with damaged plasma membrane was determined using live-dead staining with eosin and the percentage of morphologically altered spermatozoa by phase contrast microscopy after immobilising spermatozoa in 0.3 ml formol citrate (2.9 g trisodiumcitrate-dihydrate, add 100 ml double distilled water, remove 4 ml and add 4 ml of about 35% commercial formaldehyde solution) (Günzel-Apel, 2016). All semen analyses were performed by the same person.

From each ejaculate, one sample either of pre-secretion (n=30) or, if pre-secretion could not be obtained, of sperm-rich fraction (n=8) was subjected to microbiological examination at the Institute of Microbiology, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany. Only dogs with no or a low to medium degree of non-specific bacteria were included in the study.

Blood samples were collected from the left or right cephalic vein and left at room temperature for 20 min. Blood serum or -plasma was separated by centrifugation at 3030 x g for 10 min. The supernatant was divided into split samples of 0.5 to 1.0 ml according to the number of evaluated parameters. All samples were stored at -20°C until analyses.

2.2 Analysis of canine prostate specific arginine esterase (CPSE)

The CPSE concentrations in blood plasma were determined by means of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Odelis®; CPSE, Virbac Tierarzneimittel GmbH, Bad Oldesloe, Germany), which had been validated by Pinheiro et al. (2017). Analyses were performed in accordance with the manufacturer's instructions. As the blood plasma sample of one LR of age group I had been lost, the calculation of CPSE concentrations in the LR was based on 17 instead of 18 samples.

2.3 Hormone analyses

The testosterone (T) concentrations were analysed in blood serum using a competitive radioimmunoassay (Testosterone direct RIA-Kit, RIA Testosterone IM1119, direct, Immunotech s.r.o., Prague, the Czech Republic). The intra-assay CV was 5.7%. To determine the blood serum 5α-dihydrotestosterone (5α-DHT) concentrations, a competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA) (Dihydrotestosterone (DHT) ELISA DE2330; Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany) was used in accordance with the manufacturer's instructions. The intra-assay CV was 8.7%.

Concentrations of estradiol (E_2) were determined in blood plasma by a previously validated and since then repeatedly published RIA described by Hoffmann et al. (1992), Klein et al. (2003) and Shenavai et al. (2010).

2.4 Statistical evaluation

For statistical evaluation, the SAS® program (Statistical Analysis System®, SAS Institute Inc., Version Enterprise Guide® 7.1, Cary North Carolina, USA) was employed.

The descriptive statistic was performed by non-parametric one-factorial ANOVA. The Kruskal-Wallis test and the Wilcoxon´s signed-rank test were used to compare the differences in the various parameters between groups regarding CPSE status (normal vs. increased), breed and age. Results are presented as mean ±SD. Differences between groups were assessed as being significant if $p<0.05$. The Spearman´s rank correlation coefficient was determined for characterisation of related influences.

3 Results

3.1 Clinical findings and CPSE concentrations in blood plasma

In all dogs included in the study, the testes and epididymides showed normal shape and consistency as well as normal sonographic appearance. At rectal digital palpation, only the caudal pole of the prostate gland could be reached due to the size of the dogs. It was detected in a pelvic position, both lobes being symmetric and of a normal, smooth elastic consistency. Symptoms of a painful disease of the prostate gland were missing.

Sonographic findings in relation to CPSE concentrations ≤60 ng/ml and ≥61 ng/ml are summarised in Table 1. In LR, ultrasound examination of the prostate gland revealed no signs of “suspected BPH” in neither of the age groups 18-24 months or 25-48 months, but in three out of five dogs (60%) aged 49-72 months (one degree 1, two degree 2). In RR, two dogs in the age group I (33.3%, both degree 1), three in age group II (50%, two degree 1, one degree 2), and six in group III (75%, all degree 2) were affected.

Haemospermia as a possible indication of BPH was found in a total of 4 LR (22.2%) and 18 RR (90%) being distributed among all age groups (Table 1).

In all LR, CPSE-concentrations were clearly below 60 ng/ml (16.1 ±8.0, 4.6-38.9 ng/ml) and thus classified as CPSE normal (CPSEn). In the 20 RR dogs, CPSE concentrations of ≤60 ng/ml (16.6 ±8.4, 6.8-37.1 ng/ml) and ≥61 ng/ml (180.9 ±119.8, 71.3-401.0 ng/ml) were measured in equal parts (n=10 each). Increased CPSE concentrations (CPSEi) were found in all three age groups (Table 1). This becomes obvious in the high mean plasma CPSE concentrations and the even higher standard deviations shown in Table 3.

3.2 Prostate gland volume and CPSE concentrations in relation to breed and age

In the RR with normal CPSE, the prostate gland volume was 52.9 ±34.4 ccm and thus significantly larger than in the CPSEn LR (26.1 ±11.4 ccm) ($p<0.01$). Comparison of the prostate gland volume of the RR with increased CPSE (81.3 ±38.1 ccm) with that of the total number of dogs with CPSEn (35.7 ±25.5 ccm) and the LR alone also revealed significant differences ($p<0.0001$) (Figure 1). The difference between the glandular volume in the RR with normal and increased CPSE was, however, non-significant ($p=0.08$).

Comparison of the prostate gland volume in relation to age revealed a steady increase in the LR dogs with significant differences between the youngest group I, on the one hand, and groups II and III, on the other hand ($p<0.05$) (Figure 2). Comparison of the LR with the CPSEn RR revealed a significantly larger prostate gland volume in the RR in age group I ($p<0.05$) (Figure 2). Consideration of age-related development of the prostate gland volume showed a similar process in the RR with CPSEn as in the LR up to four years of age (Figure 2). However, a significant increase occurred in the oldest age group, where the prostate gland volume was as large as in the corresponding RR with CPSEi. Differences between the prostate gland volume of RR with CPSEn and CPSEi in age groups I and II were not significant, probably due to the small number of dogs per age group.

Considering the entire group of dogs included in the study, significant correlations were found for breed on the one hand, and prostate gland volume, CPSE status and plasma CPSE concentration on the other hand (Table 4). Prostate gland volume was also correlated with age with regard to the total number of LR and RR (CPSEn and CPSEi),

the CPSEn LR and the total number of CPSEn LR and RR as well as with regard to the entire group of RR (CPSEn and CPSEi) but not to the RR with CPSEi. Positive correlations with age were found for the CPSE concentration in the dogs with normal CPSE (LR and RR), but not in the RR group alone. Furthermore, CPSE was correlated with prostate gland volume in both the entire group of dogs (LR and RR) and the entire group of RR irrespective of the CPSE status.

3.3 Hormone concentrations in relation to breed and age

Despite markedly lower serum concentrations of T especially in the RR with CPSEn, the difference turned out to be non-significant, probably due to the large variation in T values in the LR (Table 2). On the other hand, tendentially higher 5□-DHT concentrations were found in the RR compared with the LR. Plasma concentrations of estradiol did not differ regarding breeds and the CPSE status of the RR (Table 2). However, the E_2/T ratio was significantly higher in the RR with increased CPSE compared with the CPSEn LR ($p<0.05$) (Table 2).

Age-related concentrations of steroid hormones and CPSE of both breeds irrespective of the CPSE status are summarised in Table 3. Differences in concentrations of serum T and 5□-DHT, detected in RR, both between the youngest and oldest age groups, were close to significant (Table 3).

Correlations of peripheral steroid hormone concentrations were limited to the RR breed. 5□-DHT and estradiol were correlated with age in RR with CPSEi, whereas T was correlated with prostate gland volume in the entire group of RR regardless of the CPSE status (Table 4). A close to significant correlation was detected between the E_2/T ratio and the prostate gland volume when considering the entire group of 38 dogs ($r=0.32$ $p=0.053$).

4 Discussion

Studies regarding the incidence and appearance of canine BPH have been mostly performed in canine populations including a large variety of breeds. Detailed breed-specific features have not been published so far. Data on Rhodesian Ridgeback dogs (RR) are completely missing. Due to a suspected breed disposition resulting from a

previous study (Wolf et al., 2012), the main focus of the present study was on the RR breed. Our study concentrated on dogs which were intended to be used for breeding or had already started their breeding career. In order to avoid multifactorial influences of different breeds, we chose the Labrador Retriever as control group because its body weight is similar to RR dogs. The dog ages were restricted to three defined groups with the upper limit of 72 months (6 years) to obtain information about the early incidence and development of BPH in the two breeds.

4.1 Clinical findings, prostate gland volume and CPSE concentration regarding BPH in relation to breed

Sonographic symptoms of BPH were found in three of the oldest LR and in a total of 11 RR, these being distributed among all age groups (Table 1). Furthermore, in age group III (49-72 months), a higher incidence of inhomogeneous prostatic tissue with small cysts (degree 2) occurred in RR (n=6) compared with the LR (n=2). These findings, together with the markedly higher incidence of haemospermia in the RR (n=18, 90%) compared with the LR (n=4, 22.2%) point to a breed disposition to develop cystic BPH in the RR. Moreover, based on the high incidence of sonographic findings with or without haemospermia in age groups I and II of the RR regardless of the CPSE status, a breed-related tendency to develop BPH earlier becomes obvious.

In dogs, the sanguineous prostatic fluid most commonly occurs secondary to BPH (England & Allen, 1992; Memon, 2007). Blood admixture may be due to an increased vascularisation of the hypertrophic canine prostate gland that has been verified by Doppler ultrasonography (Günzel-Apel et al., 2001) and contrast-enhanced ultrasonography (Troisi et al., 2015). The latter research study found a characteristic change in vascular architecture with an enhancement of blood vessels in BPH. The increase in vascularisation may result in vascular leakage or haemorrhage into the gland and excretion of blood through the secretory ducts into the urethra. Chronic prostatitis as cause of haemospermia can be largely ruled out in this study, because only dogs with no bacteria or a low to medium degree of non-specific bacteria in pre-secretion or semen were selected. Other possible sources of blood admixture, such as

penile tumour or accidental trauma of the penis or prepuce during semen collection (Johnston et al., 2001; Rijsselaere et al., 2004), can also be excluded.

In addition to the increased frequency of clinical findings, the significantly larger mean prostate gland volume found in RR with CPSEn (52.9 ccm) compared with the LR with CPSEn (26.1 ccm) may indicate a breed-related feature. This is supported by the significant correlation of the prostate gland volume with breed (Table 4). However, in the CPSEn RR, the prostate gland volume varied from 20.2 to 130.2 ccm compared to the situation in the LR (11.1-50.7 ccm). This discrepancy is due to the fact that 40% of the RR with CPSE ≤60 ng/ml showed sonographic signs of BPH and/or haemospermia.

As expected and described by Ruel et al. (1998), a correlation between prostate gland volume and age was found in all groups of dogs, except for the CPSEi RR (Table 4). In the LR, the breed not showing clinical signs of BPH in age groups I and II, the significantly larger prostate gland volume seen in the 25- to 48-month-old dogs compared with the younger age group (Figure 2) may represent early hyperplasia of glandular epithelial cells. This is described as starting by the age of 2.5 years, with an increasing tendency to develop cystic hyperplasia from four years upwards (Berry et al., 1986 a,b; Lowseth et al., 1990). The latter can be assumed as reason for the significant increase in prostatic size in the 49- to 72-month-old LR. In two out of five dogs, this was combined with the sonographic finding of an inhomogeneous tissue echotexture and small intraprostatic cysts.

In the 18- to 24-month-old RR with CPSEn, a breed-related stronger shaping of the prostate gland became obvious in the significantly larger glandular volume in comparison with the LR in age group I (Figure 2). However, in the 49- to 72-month-old CPSEn RR, the increase in prostate gland volume was 3.2 times that of the youngest CPSEn RR and 5.7 times that of the youngest LR, thus being identical with that of the CPSEi RR in age group III (Figure 2). These growth ratios are within the range of twofold to 6.5-fold increase in prostatic volume given for dogs with BPH compared with dogs with a normal prostate (Johnston et al., 2000). Therefore, in the RR dogs a primarily BPH-related prostatic growth is obvious. This assessment is supported by the missing correlation of prostate gland volume with age in the CPSEi RR.

The correlations of the CPSE status and plasma CPSE concentration with breed detected in the entire group of dogs (Table 4) is assessed as an additional indication of a breed-related increased incidence of BPH in the RR breed.

4.2 CPSE concentrations as indicator of BPH

In the present study, we used the CPSE concentration of 60 ng/ml as a threshold CPSE value to characterise the prostate gland status. This value had been set by Pinheiro et al. (2017), who validated the same test system regarding cytological criteria of BPH. Holst et al. (2017) set the threshold of CPSE at 90 ng/ml, based on a 2.5-fold increase in the prostatic size compared with the size of younger dogs. In our study, values between 60 ng/ml and 90 ng/ml were only detected in three of the RR combined with haemospermia (18-24 months n=2, 49-72 months n=1). In the remaining seven RR, CPSE values ranged from 138.2 to 401.0 ng/ml. On the other hand, Alonge et al. (2018) suggested setting the threshold level at 50 ng/ml for clinically asymptomatic dogs (aged 1 to 5 years) showing ultrasonographic alterations and increased prostatic size (the volume being 1.5 times greater than normal). As in our study, CPSE concentrations of all dogs with CPSEn were <50 ng/ml (LR: 4.6-38.9 ng/ml; RR 6.8-37.1 ng/ml), the grouping would have remained the same.

The suitability pf the blood plasma CPSE concentration as an indicator of BPH was evaluated in a large variety of breeds excluding the Rhodesian Ridgeback breed (Gobello & Corrada, 2002; Gobello et al., 2002; Lévy et al., 2009, 2014; Holst et al., 2017; Pinheiro et al., 2017; Alonge et al., 2018). In our study, the correlations of CPSE with age and prostate gland volume (Table 4) may confirm this assessment. However, the discrepancy between CPSE concentrations and the presence of PBH-related clinical findings (Table 1) contradicts the statement of Pinheiro et al. (2017) that the CPSE test can accurately differentiate between dogs with and without BPH. Even in the LR with CPSEn, a combination of signs indicating BPH was detected in three out of the five 49- to 72-month-old dogs. In the RR, the discrepancy between CPSE concentrations and the presence of BPH-related sonographic signs and haemospermia was even stronger. Thus, the only use of the peripheral CPSE concentration as indicator of BPH in clinically asymptomatic dogs cannot be

recommended in general and especially not in this breed. This may not only be true for the CPSE assay, used in our study, but also for other test systems (Holst et al., 2017; Alonge et al., 2018).

4.3 Hormone concentrations regarding BPH in relation to breed

The comparison of blood steroid concentrations between the LR and RR with CPSEn as well as between RR with CPSEn and CPSEi (Table 2) did not reveal any significant difference, confirming the results of Wolf et al. (2012). However, it must be considered that in both studies only a single blood sample was taken from each dog, which can only roughly represent the testicular endocrine function. It is well known that testosterone is secreted in a pulsatile manner following the superordinate secretion of LH and GnRH at the pituitary and hypothalamic level, respectively (De Coster et al., 1979; Günzel-Apel et al., 1990; De Palatis et al., 1978). Nevertheless, the positive correlation between prostate gland volume and serum testosterone in the entire group of RR (Table 4) may point to a causal connection with the breed-related incidence of BPH. This assessment is underlined by the close to significantly higher mean concentrations of testosterone and 5α-DHT measured with increasing age in the RR (Table 3). Moreover, the correlation between 5α-DHT and age in the RR CPSEi group (Table 4) confirms this. Elevated 5α-DHT concentrations in prostatic tissue are reported for dogs with BPH, representing an increased intraprostatic reduction of testosterone into 5α-DHT due to an increased 5α-reductase activity (Ewing et al., 1983, 1984; Isaacs & Coffey, 1981). Furthermore, the significantly higher E_2/T ratio observed in RR with CPSE concentrations ≥61 ng/ml compared with the LR (Table 2) confirms the results of our previous study (Wolf et al., 2012), where the E_2/T ratio was significantly higher in dogs with BPH than in those with a healthy prostate gland. This finding may indicate a shift in testicular steroid synthesis, which is known to play a role in the pathogenesis of canine BPH (Isaacs & Coffey, 1981). In addition, the positive correlation of estradiol with age in the RR CPSEi group (Table 4) may be the result of the breed-specific earlier and higher incidence of BPH.

5 Conclusions

The results of the present study confirm the previously suspected breed disposition for BPH in Rhodesian Ridgebacks. It becomes obvious in the frequency and early incidence of cystic BPH and/or haemospermia as well as the significant BPH-related increase in prostate gland volume. These findings must be considered with regard to a higher risk of developing acute or chronic prostatitis. The latter may turn out to be the reason for a progressive decline in fertility resulting in an early termination of the breeding career. Therefore, a special focus should be given to the prostate gland even in young breeding dogs of the RR breed in order to avoid unnoticed development of a severe chronic prostatic disease. The examination must include rectal palpation, sonographic imaging and sonographic measurement of the prostate gland and. Furthermore, in the case of breeding dogs, semen collection and evaluation with regard to the presence of blood admixture must be carried out. Determining the CPSE concentration in blood serum or plasma is considered to be an additional feature when characterising the prostate gland health status. To the best of our knowledge, this is the first report on a breed-related prevalence of canine BPH.

Conflict of interest

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

Author contributions

Günzel-Apel designed study, supervised experimental part and corrected manuscript to final version. Werhahn Beining recruited patients, performed ultrasound examinations and blood sampling, analysed data and drafted paper. Urhausen performed clinical examinations. Wolf contributed to semen collections and evaluations. Schmicke was envolved in analyses of CPSE, T and 5-α-DHT. Rohn supported statistical analyses. Schuler was involved in analysis of estradiol.

Declarations – Ethical guidelines committee

The study was approved by the Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety, Germany (Reference no. 33.19-42502-04-15/1885). Informed owner consent was obtained.

Data Availability

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

References

Alonge, S., Melandri, M., Leoci, R., Lacalandra, G. M., & Aiudi, G. (2018). Canine prostate specific esterase (CPSE) as a useful biomarker in preventive screening programme of canine prostate: CPSE threshold value assessment and its correlation with ultrasonographic prostatic abnormalities in asymptomatic dogs. Reproduction in Domestic Animals, 53, 359–364. https://doi.org/10.1111/rda.13113

Bamberg-Thalen, B. L., & Linde-Forsberg, C. (1993). Treatment of canine prostatic hyperplasia with medroxyprogesterone acetate. Journal of the American Animal Hospital Association, 29, 221-226.

Bell, F. W., Klausner, J. S., Hayden, D. W., Lund, E. M., Liebenstein, B. B., Feeney, D. A., Johnston, S. D., Shivers, J. L., Ewing, C. M., & Isaacs, W. B. (1995). Evaluation of serum and seminal plasma markers in the diagnosis of canine prostatic disorders. Journal of Veterinary Internal Medicine, 9, 149-153. https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1995.tb03288.x

Berry, S. J., Coffey, D. S., & Ewing, L. L. (1986a). Effects of aging on prostate growth in Beagles. American Journal of Physiology, 250, R1039-1046. https://doi.org/:10.1152/aiprequ.1986.250.6.R1039

Berry, S. J., Strandberg, J. D., Saunders W. J., & Coffey, D. S. (1986b). Development of canine benign prostatic hyperplasia with age. Prostate, 9, 363-373. https://doi.org/10.1002/pros.2990090406

Brendler, C. B., Berry, S. J., Ewing, L. L., McCullough, A. R., Cochran, R. C., Strandenberg, J. D., Zirkin, B. R., Coffey, D. S., Wheaton, L. G., Hiler, M. L., Bordy, M. G., Niswender, J. D., Scott, W. W., & Walsh, P. C. (1983). Spontaneous benign prostatic hyperplasia in the Beagle. Journal of Clinical Investigation, 71, 1114-1123. https://doi.org/10.1172/jci.110861

Chapdelaine, P., Dube, J. Y., Frenette, G., & Tremblay, R. R. (1984). Identification of arginine esterase as the major androgen-dependent protein secreted by dog prostate and preliminary molecular characterization in seminal plasma. Journal of Andrology, 5, 206-210. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1984.tb02395.x

Chevalier, S., Bleau, G., Robert, K. D., & Chapdelaine, A. (1984). Nonsteroidal serum factors involved in the regulation of the proliferation of canine prostatic epithelial cells in culture. Prostate, 5, 503-512. https://doi.org/10.1002/pros.2990050506

De Coster, R., Beckers, J. F., Wouters-Ballman, P., & Ectors, F. (1979). Variation nycthemerales de la testosterone et de la lutropine plasmatique chez le chien. Annales de Médicine Vétérinaire, 123, 423-428.

De Palatis, L., Moore, J., & Falvo, R. E. (1978). Plasma concentrations of testosterone and LH in the male dog. Journal of Reproduction and Fertility, 52, 201-207. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0520201

Dubé, J. Y. (1994). Prostatic kallikreins: biochemistry and physiology. Comparative Biochemistry and Physiology, 107C, 13-20. https://doi.org/10.1016/1367-8280(94)90004-3

England, G. C., Allen, W. E., & Middleton, D. J. (1990). An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. Research in Veterinary Science, 49, 66-70. https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31048-8

England, G. C. W., & Allen, W. E. (1992). Factors affecting the viability of canine spermatozoa II. Effects of seminal plasma and blood. Theriogenology, 37, 373-381. https://doi.org/10.1210/endo-113-6-2004

Ewing, L. L., Berry, S. J., & Higginbottom, E. G. (1983). Dihydrotestosterone concentration of Beagle prostatic tissue: effect of age and hyperplasia. Endocrinology, 113, 2004-2009. https://doi.org/10.1210/endo-113-6-2004

Ewing, L. L., Thompson, D. L., Cochran, R. C., Lasley, B. L., Thompson, M. A., & Zirkin, B. R. (1984). Testicular androgen and estrogen secretion and benign prostatic hyperplasia in the Beagle. *Endocrinology,* 114, 1308–1314. https://doi.org/10.1210/endo-114-4-1308

Frenette, G., Dubé, J. Y., & Tremblay, R. R. (1983). Effect of castration and steroid treatments on the activity of some hydrolytic enzymes in dog prostate. Prostate, 4, 383-390. https://doi.org/10.1002/pros.2990040408

Frenette, G., Dubé, J. Y., & Tremblay, R. R. (1985). Enzymatic characterization of arginine esterase from dog seminal plasma. Biochimica et Biophysica Acta, 838, 270-276. https://doi.org/10.1016/0304-4165(85)90089-3

Geller, J. (1989a). Overview of benign prostatic hypertrophy. Urology, 34 (Suppl. 4), 57-63, 87-96. https://doi.org/10.1016/0090-4295(89)90235-5

Geller, J. (1989b). Pathogenesis and medical treatment of benign prostatic hyperplasia. Prostate, Suppl. 2, 95-104. https://doi.org/10.1016/0090-4295(89)90235-5

Gobello, C., Castex, G., & Corrada, Y. (2002). Serum and seminal markers in the diagnosis of disorders of the genital tract of the dog: a mini-review. Theriogenology, 57, 1285-1291. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00628-3

Gobello, C., & Corrada Y. (2002). Noninfectious prostatic diseases in dogs. Compendium of Continuing Education for the Practising Veterinarian, 24, 99-107.

Günzel-Apel, A. R. (2016). Untersuchungstechniken. In A. R. Günzel-Apel & H. Bostedt (Eds.), Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze. (pp. 640-653): Schattauer Stuttgart, Thieme Stuttgart.

Günzel-Apel, A. R., Brinckmann, H. G., & Hoppen, H. O. (1990). Dynamik der LH- und Testosteron-Sekretion bei Beagle-Rüden verschiedener Altersgruppen. Reproduction in Domestic Animals, 25, 78-86. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1990.tb00684.x

Günzel-Apel, A. R., Möhrke, C., & Poulsen Nautrup, C. (2001). Colour-coded and pulsed Doppler sonography of the canine testis, epididymis and prostate gland, physiological and pathological findings. Reproduction in Domestic Animals, 36, 236-240. https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00288.x

Hoffmann, B., Höveler, R., Hasan, S. H., & Failing, K. (1992). Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. Journal of Reproduction and Fertility, 96, 837-845. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0960837

Holst, B. S., Holmroos, E., Friling, L., Hanås, S., Langborg, L. M., Franko, M. A., & Hansson K. (2017). The association between the serum concentration of canine prostate specific esterase (CPSE) and the size of the canine prostate. Theriogenology, 93, 33-39. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.032

Isaacs, W. B., & Coffey D. S. (1981). Changes in dihydrotestosterone metabolism associated with the development of canine benign prostatic hyperplasia. Endocrinology, 108, 445-453. https://doi.org/10.1210/endo-108-2-445

Isaacs, W. B., & Coffey, D. S. (1984). The predominant protein of canine seminal plasma is an enzyme. Journal of Biological Chemistry, 259, 11520-11526.

Isaacs, W. B., & Shaper, J. H. (1985). Immunological localization and quantitation of the androgen-dependent secretory protease of the canine prostate. Endocrinology, 117, 1512-1520. https://doi.org/10.1210/endo-117-4-1512

Johnston, S. D., Kamolpatana, K., Root-Kustritz, M. V., & Johnston, G. R. (2000). Prostatic disorders in the dog. Animal Reproduction Science, 60-61, 405-415. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00101-9

Juniewicz, P. E., Barbolt, T. A., Egy, M. A., Frenette, G., Dube, J. Y., & Tremblay, R. R. (1990). Effects of androgen and antiandrogen treatment on canine prostatic arginine esterase. Prostate, 17, 101-111. https://doi.org/10.1002/pros.2990170204

Kawakami, E., Tsutsui, T., & Ogasa A. (1991). Histological observations of the reproductive organs ot the male dog from birth to sexual maturity. Journal of Veterinary Medical Science, 53, 241-248. https://doi.org/10.1292/jvms.53.241

Klausner, J. S., Johnston, S. D., & Bell, F. W. (1995). Canine prostatic disorders. In Current Veterinary Therapy 12. J. D. Bonagura. & R. W. Kirk (Eds), (pp. 1103-1110): W.B. Saunders

Klein, R., Schams, D., Failing, K., & Hoffmann, B. (2003). Investigations on the re-establishment of the positive feedback of oestradiol during anoestrus in the bitch. Reproduction in Domestic Animals, 38, 13-20. https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00389.x

Krawiec, D. R., & Heflin D. (1992). Repros of retrospective studies: Study of prostatic disease in dogs: 177 cases (1981-1986). Journal of the American Veterinary Medical Association, 200, 1119-1122.

Lévy, X., Mimouni, P., Fontbonne, A., Derre, G., Claret, E., Audhuy, S., & Morlet J. (2009). Performance evaluation of the new blood test Odelis® CPSE in the diagnosis of Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) in dogs. In Proceeding of the 6th EVSSAR Annual Symposium, Wroclaw, Poland (p 4)

Lévy, X., Niżański, W., von Heimendahl, A., & Mimouni P. (2014). Diagnosis of common prostatic conditions in dogs: an update. Reproduction in Domestic Animals, 49 (Suppl. 2), 50–57. https://doi.org/10.1111/rda.12296

Lloyd, J. W., Thomas, J. A., Mawhinney, M. G. (1975). Androgens and estrogens in the plasma and prostatic tissue of normal dogs and dogs with benign prostatic hyperplasia. Investigative Urology, 13, 220-222.

Lowseth, L. A., Gerlach, R. F., Gillett, N. A., & Muggenburg B. A. (1990). Age-related changes in the prostate and testes of Beagle dogs. Veterinary Pathology, 27, 347-353. https://doi.org/10.1177/030098589002700507

Memon, M. A. (2007). Common causes of male dog infertility. Theriogenology, 68, 322-328. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.025

Pinheiro, D., Machado, J., Viegas, C., Baptista, C., Bastos, E., Magalhães, J., Pires, M. A., Cardoso, L., & Martins-Bessa, A. (2017). Evaluation of biomarker canine-prostate specific arginine esterase (CPSE) for the diagnosis of benign prostatic hyperplasia. BMC Veterinary Research, 13, 76. https://doi.org/10.1186/s12917-017-0996-5

Rijsselaere, T., von Soom, A., Maes, D., Verberckmoes, S., & de Kruif, A. (2004). Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed spermatozoa. Theriogenology, 61, 1589-1602. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.09.008

Ruel, Y., Barthez, P. Y., Mailles, A., & Begon, D. (1998) Ultrasonographic evaluation of the prostate in healthy intact dogs. Veterinary Radiology and Ultrasound, 39, 212-216. https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.1998.tb00342.x

Shenavai, S., Hoffmann, B., Dilly, M., Pfarrer, C., Ozalp, G. R., Caliskan, C., Seyrek-Intas, K., & Schuler, G. (2010). Use of the progesterone (P_4) receptor antagonist aglepristone to characterize the role of P_4 withdrawal for parturition and placental release in cows. Reproduction, 140, 623-632. https://doi.org/10.1530/REP-10-0182

Smith, J. (2008). Canine prostatic disease: A review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. Theriogenology, 70, 375-383. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.039

Trachtenberg, J., Hicks, L.L., Walsh, P. C. (1980). Androgen- and estrogen-receptor content in spontaneous and experimentally induced canine prostatic hyperplasia. Journal of Clinical Investigation, 65, 1051-1059. https://doi.org/10.1172/JCI109757

Troisi, A., Orlandi, R., Bargellini, P., Menchetti, L., Borges, P., Zelli, R., & Polisca A. (2015). Contrast-enhanced ultrasonographic characteristics of the diseased canine prostate gland. Theriogenology, 84, 1423-1430. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.029

Wolf, K., Kayacelebi, H., Urhausen, C., Piechotta, M., Mischke, R., Kramer, S., Einspanier, A., Oie, C. H. Y., & Günzel-Apel, A. (2012). Testicular steroids, prolactin, relaxin and prostate gland markers in peripheral blood and seminal plasma of normal dogs and dogs with prostatic hyperplasia. Reproduction in Domestic Animals, 47 (Suppl. 6), 243-246. https://doi.org/10.1111/rda.12083

Tables and figures

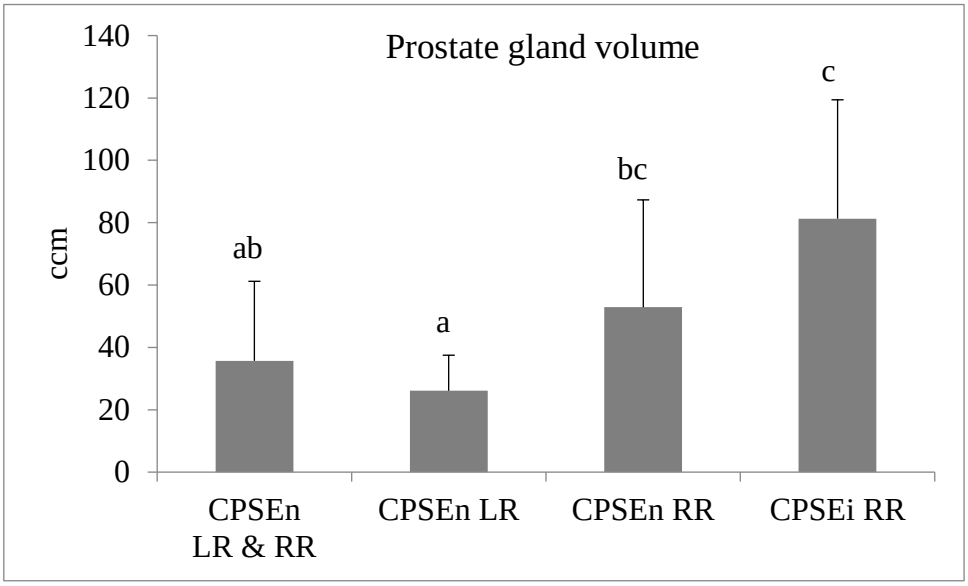

Figure 1 Prostate gland volume (mean ±SD) in dogs with normal and increased concentrations of canine prostate-specific arginine esterase (CPSEn, CPSEi). a:c and ab:c p<0.0001, a:bc p<0.01. LR = Labrador Retriever, RR = Rhodesian Ridgeback

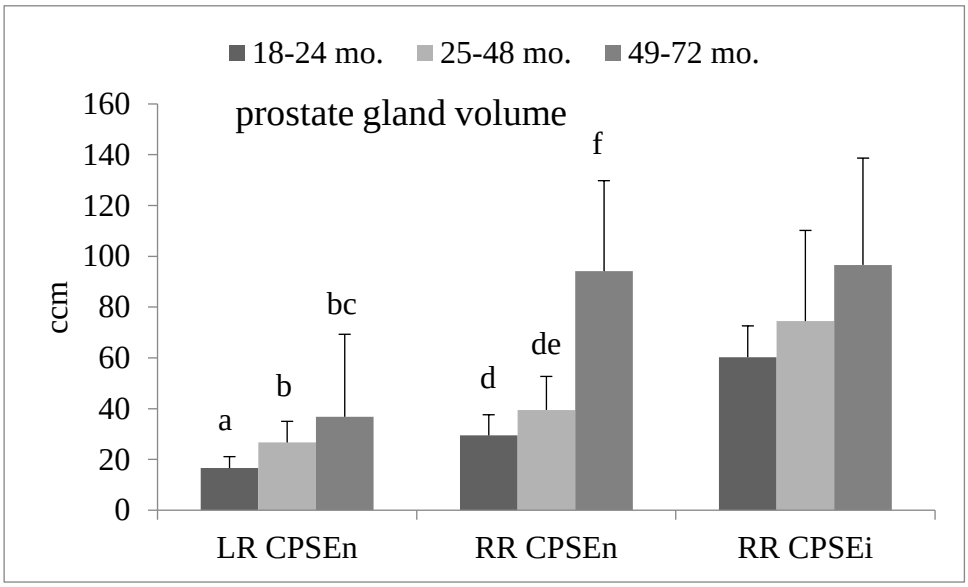

Figure 2 Prostate gland volume (mean ±SD) in Labrador Retrievers (LR) and Rhodesian Ridgebacks (RR) of different age with normal and increased concentrations of canine prostate-specific arginine esterase (CPSEn, CPSEi).

LR CPSEn: a/b and a/c p<0.05; RR CPSEn: d/f and e/f p<0.05;

LR CPSEn vs. RR CPSEn - 18-24 mo: a/d p<0.05; 49-72 mo: bc/f p<0.05

Table 1 Sonographic findings (US) and haemospermia in Labrador Retriever and Rhodesian Ridgeback dogs classified according to CPSE concentrations ≤60 ng/ml and ≥61 ng/ml.

	C P S E					
	≤60 ng/ml (normal)			≥61 ng/ml (increased)		
Labrador Retriever (n=18)						
age (months)	18-24	25-48	49-72	-		
n %	6 100	7 100	5 100	-		
US n %*	0	0	3 60	-		
degree 1 n %*	0	0	1 20	-		
degree 2 n %*	0	0	2 40	-		
haemosp. n %*	1 16.7	1 14.3	2 40	-		
Rhodesian Ridgeback (n=20)						
age (months)	18-24	25-48	49-72	18-24	25-48	49-72
n %	3 50	4 66.6	3 37.5	3 50	2 33.3	5 62.5
US n %*	1 33.3	2 50	1 33.3	1 33.3	1 50	5 100
degree 1 n %*	1 33.3	1 25	0	1 33.3	1 50	0
degree 2 n %*	0	1 25	1 33.3	0	0	5 100
haemosp. n %*	2 66.6	3 75	3 100	3 100	2 100	5 100

*% of the respective age group

Table 2: Concentrations of testosterone (T, ng/ml), 5α-DHT (ng/ml), estradiol (E_2, pg/ml) and CPSE (ng/ml) in blood serum or plasma of Labrador Retrievers (LR) and Rhodesian Ridgebacks (RR) with normal CPSE concentrations (CPSEn) and increased CPSE concentrations (CPSEi).

Parameter	CPSEn LR		CPSEn RR		CPSEi RR	
	mean	±SD	mean	±SD	mean	±SD
T	1.8	1.7	1.1	0.5	1.4	0.5
5α-DHT	1.3	1.0	1.6	0.9	1.8	1.4
E_2	26.3	9.0	24.9	7.4	24.2	5.7
E_2/T ratio	1.3^{a}	0.5	1.4^{ab}	0.5	1.6^{b}	0.4
CPSE	16.1^{a}	8.0	16.6^{a}	8.4	180.9^{b}	119.8

E_2/T ratio: comparison between CPSEn LR and CPSEi RR: a/b $p<0.05$;

CPSE: comparison between CPSEn LR and CPSEi RR: a/b $p<0.0001$,

comparison between CPSEn RR and CPSEi RR a/b $p<0.001$

Table 3 Concentrations of testosterone (T, ng/ml), 5α-DHT (ng/ml), estradiol (E_2, pg/ml), E_2/T ratio, and CPSE (ng/ml) in blood serum or plasma of Labrador Retrievers (LR) and Rhodesian Ridgebacks (RR) of different age irrespective of the CPSE status.

Para-meter	18-24 months				25-48 months				49-72 months			
	LR n=6		RR n=6		LR n=7		RR n=6		LR n=5		RR n=8	
	mean	±SD	mean	±SD	mean	±SD	mean	±SD	mean	±SD	mean	±SD
T	1.5	0.9	1.0[a]	0.4	1.9	2.4	1.2	0.5	2.0	1.3	1.5[b]	0.5
5α-DHT	1.7	1.5	1.2[a]	1.1	0.9	0.6	1.3	0.6	1.3	0.7	2.3[b]	1.3
E_2	27.2	9.6	23.8	8.3	28.5	7.5	22.5	4.6	22.0	10.4	26.8	6.3
E_2/T ratio	1.5	0.3	1.3	0.8	1.2	0.6	1.5	0.2	1.0	0.6	1.6	0.2
CPSE	10.7	4.8	99.5	151.3	16.5	5.1	67.3	73.4	20.9	11.0	121.8	127.1

T - RR: 18-24 mo – 49-72 mo a/b p=0.05; 5α-DHT: 18-24 mo - 49-72 mo a/b p=0.06

Table 4 Correlations of breed, age, and prostate gland volume (PGV) with concentrations of CPSE, testosterone, 5α-dihydrotestosterone and estradiol in blood plasma or blood serum regarding the CPSE status (CPSEn - normal concentration, CPSEi - increased concentration).

	total (CPSEn & CPSEi)		total LR (CPSEn)		total CPSEn (LR & RR)		total RR (CPSEn & CPSEi)		RR (CPSEi)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
breed	prostate gland volume									
	0.67	<0.0001	-	-	-	-	-	-	-	-
	CPSE status									
	0.58	<0.0001	-	-	-	-	-	-	-	-
	CPSE									
	0.44	<0.01	-	-	-	-	-	-	-	-
age	prostate gland volume									
	0.63	<0.0001	0.80	<0.0001	0.71	<0.0001	0.59	<0.01	-	-
	CPSE									
	0.38	<0.05	0.5	<0.05	0.43	<0.05	-	-	-	-
	5α-dihydrotestosterone									
	-	-	-	-	-	-	-	-	0.70	<0.05
	estradiol									
	-	-	-	-	-	-	-	-	0.76	<0.05
PGV	CPSE									
	0.59	≤0.0001	-	-	-	-	0.50	<0.05	-	-
	testosterone									
	-	-	-	-	-	-	0.65	<0.01	-	-

The degrees of association between breed, age and prostate gland volume (left side vertical column) and the parameters listed in the corresponding horizontal lines were calculated using the Spearman´s rank correlation test

4.2 Manuskript II

Das folgende Manuskript wurde bei der Zeitschrift Veterinary Medicine and Science eingereicht (Manuskript ID VMS3-2020-Aug-0372)

WERHAHN BEINING F, SCHMICKE M, WILKENS M, WOLF K, ROHN K, GÜNZEL-APEL A. An investigation on the relevance of prolactin, IGF-1, and 25-hydroxyvitamin D_3 (25-OHD_3) in benign prostatic hyperplasia in dogs.

An investigation on the relevance of prolactin, IGF-1, and 25-hydroxyvitamin D_3 (25-OHD_3) in benign prostatic hyperplasia in dogs

F. Werhahn Beining[1], M. Schmicke[2], M. Wilkens[3], K. Wolf[1], K. Rohn[4], A. Günzel-Apel[1]

[1]Unit of Reproductive Medicine – Small Animal Clinic, [2]Clinic for Cattle, [3]Institute for Physiology and Cell Biology, [4]Institute for Biometry, Epidemiology and Information, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany

Correspondence

Anne-Rose Günzel-Apel, Unit of Reproductive Medicine – Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany. Email: anne-rose.guenzel-apel@tiho-hannover.de

Abstract

Serum concentrations of prolactin (PRL), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and 25 hydroxyvitamin D_3 (25-OHD_3) were analysed to investigate their possible involvement in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia (BPH). For this, dogs of the Rhodesian Ridgeback (RR) breed were used because of a verified breed disposition

for the development of BPH (Werhahn Beining et al., 2020). Labrador Retrievers (LR) served as controls. In addition to sonographic findings and haemospermia, the prostate gland status was characterised by plasma concentrations of canine prostate-specific arginine esterase (CPSE) (Werhahn Beining et al., 2020). In the RR dogs with normal CPSE (CPSEn), high PRL concentrations indicated an androgen-independent involvement of PRL in early BPH development, underlined by a correlation of PRL with breed. Concentrations of IGF-1 were at similar levels in CPSEn dogs of both breeds, but were significantly higher in the youngest CPSEn RR than in the youngest RR with increased CPSE (CPSEi). Moreover, a decrease in IGF-1 with age was found in the CPSEn RR. Negative correlations of IGF-1 with age and prostatic volume as well as with CPSE indicated a decreasing influence of IGF-1 with progressive development of BPH. Concentrations of 25-OHD_3 were tendentially lower in the CPSEi RR compared with the CPSEn LR and RR. A gradual decrease in 25-OHD_3 values occurring with increasing age in the CPSEi RR, and a negative correlation of 25-OHD_3 with age found in this group and in the entire group of dogs pointed to age-related changes in vitamin D metabolism.

Keywords: Rhodesian Ridgeback, prolactin, IGF-1, 25-OHD_3, prevention of BPH

1 Introduction

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is an age-dependent primarily non-inflammatory enlargement and the most common prostatic disease in intact dogs (Berry et al., 1986a, 1986b). Tissue alterations include both hyperplasia and hypertrophy of the secretory glandular epithelium and stromal components (Zirkin & Strandberg, 1984). The probability of developing BPH increases by the age of two to three years (Teske et al., 2002). A prevalence of 95 to 100% is reached at the age of eight to nine years (Berry et al., 1986a, 1986b; Lowseth et al., 1990; Gobello et al., 2002). Regarding pathogenesis of BPH, a change in metabolism of testosterone and estrogens and an increased intraprostatic reduction in testosterone into 5□-dihydrotestosterone have been verified. The latter is regarded as the main trigger of BPH (Gloyna et al., 1970; Walsh & Wilson, 1976; Isaacs & Coffey, 1981; Ewing et al., 1984; Barsanti & Finco, 1986; Bamberg-Thalen & Linde-Forsberg, 1993; Johnson 2010). In our more recent

studies, breed predisposition to develop BPH earlier and in a more pronounced form has been verified in Rhodesian Ridgebacks (Wolf et al., 2012; Werhahn Beining et al., 2020).

Canine prostate-specific arginine esterase (CPSE) makes up >90% of the proteins in canine prostatic secretion (Chapdelaine et al., 1984). Its synthesis and secretion in the glandular epithelial cells is androgen-dependent (Frenette et al., 1983; Isaacs & Sharper, 1985; Juniewicz et al., 1990). Significantly higher serum CPSE concentrations exist in dogs with BPH than in those animals with a healthy prostate gland (Bell et al., 1995). As early developmental stages of BPH most commonly show a subclinical course, CPSE is recommended to be used as an indicator of BPH especially for early diagnosis (Gobello & Corrada, 2002; Gobello et al., 2002; Holst et al., 2017; Pinheiro et al., 2017; Alonge et al. 2018). However, in our previous study, increased CPSE concentrations appeared to be an additional characteristic in clinically manifest BPH (Werhahn Beining et al., 2020).

Besides androgen-dependency, other factors which may cause BPH in dogs are largely unknown. In humans, prolactin (PRL) and vitamin D have been shown to affect the prostate gland and semen quality (De Rosa et al., 2004; Bachelot & Binart, 2007; Adorini et al., 2010; Blomberg Jensen et al., 2011). In men and rats, an androgen-dependent intraprostatic increase in PRL and its receptors is described (Ouhtit et al., 1993; Hair et al., 2002). Moreover, PRL may raise the uptake of testosterone into the prostate and the intraprostatic testosterone metabolism (Farnsworth et al., 1981).

Low vitamin D status, verified by plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D_3 (25-OHD_3) is considered a risk factor in human BPH (Espinosa et al., 2013). Moreover, antitumour activity of the biologically active form of vitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D_3 (1,25-$(OH)_2D_3$) acting via the vitamin D receptor (VDR), has been verified in human and rat prostatic tissue (Johnson et al., 1996; Kivineva et al., 1998; Blomberg Jensen et al., 2011).

The polypeptide insulin-like growth factor-1 (IGF-1) is a strong mitogen for normal and abnormal cells. By this, it increases proliferation and decreases apoptosis and intensification of cellular differentiation (Le Roith, 1996). The impact of IGF-1 on proliferation of many tissues was considered regarding BPH in men (Khosravi et al.,

2001). Thus, an anti-apoptotic effect of IGF-1 on epithelial and stromal cells of the prostate acting via its membrane receptor (IGF-R1) and tyrosine kinase was shown, leading to an increase in hypertrophic changes (Monti et al., 2001).

The aim of the present study was to investigate the serum concentrations of prolactin, IGF-1 and 25-OHD_3 as well as 25-OHD_3 in the prostatic secretion of male dogs with regard to a possible causal involvement in BPH. For this, we compared the results obtained in Rhodesian Ridgebacks, a breed with a verified breed disposition to develop BPH, and in Labrador Retrievers, showing species-specific development of BPH (Werhahn Beining et al., 2020).

2 Materials and Methods

2.1 Animals and experimental design

A total of 38 physically healthy privately owned male breeding dogs of two selected breeds (Labrador Retriever/LR, n=18 and Rhodesian Ridgeback/RR, n=20) were included in this study. Regarding the health status, thyroid function was additionally considered in all dogs. This was checked by measuring the serum concentrations of thyroxine and thyrotropin (TSH). Only dogs with concentrations of both hormones within the laboratory-specific reference range were used. The RR was chosen due to a verified breed-related increased tendency to develop BPH (Werhahn Beining et al., 2020). The LR served as control. In the latter breed, benign enlargement of the prostate gland has been verified to occur in accordance with the results of earlier studies demonstrating expected age-related changes in the canine prostate gland (Werhahn Beining et al., 2020). A further criterion for using dogs of these two breeds was their similar body weight (LR: 37.2 ± 4.0 kg; RR: 41.7 ± 3.7 kg) in order to allow the comparison of obtained group-wise results. The dogs were assigned to the three age groups I (18-24 months, LR: n=6, RR: n=6), II (25-48 months, LR: n=7, RR: n=6) and III (49-72 months, LR: n=5, RR: n=8).

The majority of dogs were fed with a commercial diet (LR: n=11/61.1%, RR: n=13/65%). Combined feeding with commercial feed plus a homemade diet (so-called “biologically appropriate raw food”/“barf”) occurred in one LR (5.6%) and two RR

(10%). The remaining dogs were exclusively fed with “barf” (LR: n=6/33.3%, RR: n=5/25%). The feeding management within the age groups is shown in Table 1.

Besides clinical signs of BPH (sonographic findings/SF and/or the presence of haemospermia/HS), blood plasma concentration of the canine prostate-specific arginine esterase (CPSE) was used for classifying the prostate gland status as previously described (Werhahn Beining et al., 2020). A CPSE concentration of ≤60 ng/ml was equated with “normal” (CPSEn), a concentration of ≥61 ng/ml with “increased” (CPSEi) based on the findings of Pinheiro et al. (2017), who validated the CPSE assay used in our study. In all dogs of the LR breed, the CPSE concentrations were within the normal range. In age group III, three dogs showed SF alone (n=1) or combined with HS (n=2). In the RR group, each of the ten dogs had normal or increased CPSE concentrations. Clinical signs of BPH were recorded in 80% of the RR with CPSEn and in 100% of the RR with CPSEi (HS alone n=7, HS plus SF n=11). The age-related distribution of dogs with CPSEn and CPSEi is shown in Table 2.

Blood samples were collected from the left or right cephalic vein and left at room temperature for 20 min. Blood serum was separated by centrifugation at 3030 x g for 10 min. The supernatant was divided into split samples of 0.5 to 1.0 ml according to the number of evaluated parameters. All samples were stored at -20°C until analyses.

2.2 Laboratory analyses

Measurement of prolactin concentrations in peripheral blood serum was performed using the Demeditec Prolactin canine ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany) in accordance with the manufacturer´s instructions. The intra-assay coefficient of variation was 6.3%.

The IGF-1 concentration was determined by means of the radioimmunoassay kit (IRMA) (Immunotech Beckman Coulter, CA, Czech Republic). Analyses were performed corresponding with the manufacturer´s information. The intra-assay coefficient of variation was 9.8 %.

The concentration of calcidiol / 25-hydroxy vitamin D_3 (25-OHD_3) in blood serum was determined using a commercially available competitive ELISA kit (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany) in accordance with the manufacturer´s instructions.

2.3 Statistical evaluation

For statistical evaluation, the SAS® program (Statistical Analysis System®, SAS Institute Inc., Version Enterprise Guide® 7.1, Cary, NC, USA) was employed.

The dogs were grouped according to the CPSE status (normal vs. increased) as described by Werhahn Beining et al. (2020).

The descriptive statistic was performed by non-parametric one-factorial ANOVA. The Kruskal-Wallis test and the Wilcoxon´s signed-rank test were used to compare the differences in the various parameters between groups regarding CPSE status, breed and age. Results are presented as mean ±SD. Differences between groups were assessed as being significant if $p<0.05$. The Spearman´s rank correlation coefficient was determined for characterisation of related influences. As one blood serum sample of an LR dog in age group III had been lost, the statistical analyses referring to PRL in the LR dogs were based on 17 instead of 18 samples.

3 Results

3.1 Prolactin (PRL)

Prolactin concentrations were 4.0 ±4.1 ng/ml in the LR dogs and 5.5 ±4.1 ng/ml in dogs of the RR breed regardless of the CPSE status. The highest mean serum PRL concentration was found in the CPSEn RR (Figure 1). The difference was significant compared with the CPSEn LR group ($p<0.01$) and close to significant with the RR dogs with increased CPSE ($p=0.05$). Prolactin concentrations in the LR dogs and the CPSEi RR were at a similar low level in all age groups (Figure 2). In all CPSEn LR dogs in age group III, the PRL concentration was at the lowest detectable level and with this significantly different to the values of the respective CPSEn RR (Figure 2).

Regarding the entire group of dogs , a significant correlation of PRL was found with the breed (r=0.39, p<0.05). For the RR group (n=20), a close to significant correlation of PRL with IGF-1 was detected (r=0.43, p=0.06) (Table 4).

3.2 IGF-1

Serum concentrations of IGF-1 were 450.7 ±133.5 ng/ml in the LR dogs and 443.1 ±93.4 ng/ml in the entire group of RR. Regarding the CPSE status, IGF-1 concentrations were slightly lower in the RR with CPSEi than in those with CPSEn (Figure 3). No age-related variation was found in the LR breed, whereas in the RR CPSEn, decreasing values were detected from age group I over age group II to age group III (p<0.05) (Figure 4). Within the group of RR dogs, the mean IGF-1 concentration was lower in the 18- 24-month-old CPSEi dogs than in the CPSEn dogs of the same age group (p<0.05) (Figure 4).

A negative correlation of IGF-1 with age was verified in the entire group of dogs (r=-0.37, p<0.05), in the total group of dogs with normal CPSE (r=-0.47, p<0.05), and in the RR CPSEn (r=-0.85, p<0.01) (Table 4). Further correlations were found with prostate gland volume in the entire group of dogs (r=-0.33, p<0.05) and in the entire group of RR (r=-0.57, p<0.01), as well as in the RR CPSEn (r=-0.9, p<0.001). In all 38 dogs, a negative correlation was detected between IGF-1 and CPSE (r=-0.36, p<0.05). The same was true for the dogs with normal serum CPSE concentrations (LR: r=-0.56, p<0.05; LR and RR: r=-0.48, p<0.05) (Table 4).

3.3 Calcidiol / 25-hydroxy vitamin D_3 (25-OHD_3)

The overall 25-OHD_3 concentrations in blood serum of the LR and RR dogs were 88.7 ±30.8 ng/ml and 80.4 ±42.5 ng/ml, respectively. The 25-OHD_3 pattern regarding breed differences including the CPSE status showed a tendentially lower mean level in the RR with CPSEi (Figure 5). Within this dog group, 25-OHD_3 values decreased gradually with increasing age (Figure 6).

With regard to the varying feeding regimes, the lowest 25-OHD_3 concentrations (<20 ng/ml) were found in three RR dogs fed with commercial food (two RR CPSEn, one

from age group I and one from age group III) and one RR CPSEi from age group III which received commercial food plus “barf” (Table 3). In all the other dogs, the values varied from 46.5 to 189.3 ng/ml (Table 3).

Serum 25-OHD_3 was negatively correlated with age in the entire group of dogs ($r=-0.33$, $p<0.05$), and in the RR with CPSEi ($r=-0.63$, $p<0.05$).

Analysis of 25-OHD_3 in prostatic secretion revealed detectable values only in dogs of the RR breed (CPSEn n=4, CPSEi n=7), mean values showing a similar pattern as in blood serum (Figure 7). In the prostatic secretion of the LR dogs, 25-OHD_3 could not be verified. Out of the four affected CPSEn RR dogs, one belonged to age group I and one to age group II and two belonged to age group III. In these four dogs, clinical examination had revealed signs of BPH like haemospermia alone (n=2) or combined with sonographic alterations of the prostate gland (n=2) (Werhahn Beining et al., 2020). Out of the seven CPSEi RR dogs, the distribution in the age groups was 18-24 months n=2, 25-48 months n=1 and 49-72 months n=4. Haemospermia alone was found in two dogs (one in age group I and one in II). Haemospermia combined with BPH related sonographic findings was detected in the remaining five dogs (age group I n=1, age group III n=4) (Werhahn Beining et al., 2020).

Due to the fact that 25-OHD_3 was only detectable in the prostatic secretion of RR dogs, positive correlations existed with breed considering the entire group of dogs ($r=0.59$, $p<0.0001$) and the entire group of dogs with normal CPSEn ($r=0.55$, $p<0.01$). Further correlations were detected with the prostate gland volume both in the entire group of RR dogs ($r=0.55$, $p<0.05$) and in the group of RR with increased CPSE ($r=0.68$, $p<0.05$) (Table 4).

4 Discussion

4.1 Selection of dogs

Regarding the choice of the two breeds, the primary feature of selection was the almost identical body weight with regard to the related size of the reproductive organs, especially the prostate gland. In addition, the Labrador Retriever and the Rhodesian Ridgeback have been shown to have a number of consistent features regarding the health status that justify the comparison (Adams et al., 2010). A further aspect of

breed selection is the well-known positive correlation between body weight and plasma IGF-I concentration (Eigenmann et al., 1988; Greer et al., 2011; Jaillardon et al., 2011).

An essential criterion of animal selection was the preceding verification of euthyroidism regarding the interaction of thyrotropin releasing hormone (TRH) and PRL secretion. This has been demonstrated in both, intact and castrated male beagle dogs (Koch et al., 2006; Günzel-Apel et al., 2009) as well as in dogs of different breeds (Urhausen et al., 2009). Thus, a stimulation of the TRH secretion via feedback due to abnormally low peripheral concentrations of thyroid hormones and a consequent increase in the peripheral PRL concentration can be excluded. This is also relevant regarding the IGF-I concentrations measured in our study, as primary hypothyroidism has been described as a possible reason for significantly increased IGF-I concentrations (Jaillardon et al., 2011).

4.2 Prolactin

The mean PRL concentrations measured in the present study result from a single PRL value per dog. Regarding diurnal PRL secretion, Koch et al. (2006) identified in male beagle dogs just a smoothly oscillating baseline without significant pulses over a six-hour period, whereas Corrada et al. (2003) detected occasional distinct elevations in individual dogs as well as a circannual rhythmicity of PRL secretion. However, neither study considered the prostate gland status of the dogs.

Breed differences in peripheral PRL concentrations of male dogs are described by Corrada et al. (2006) and Urhausen et al. (2009) without considering the RR breed. This was done for the first time by Wolf et al. (2012), who detected significantly higher PRL concentrations in RR dogs compared with dogs of various other breeds with similar body weight. In the present study, this condition became only tendentially obvious when comparing the entire group of RR dogs with the LR group. It was, however, confirmed by the significantly higher PRL concentrations of the RR dogs with normal CPSE with respect to the LR dogs (Figure 1). Breed specificity is additionally underlined by the positive correlation between PRL and breed.

The meaningfulness of the results obtained for the three age groups may be limited due to the small number of animals per group. Nevertheless, the markedly higher mean PRL concentration found in the 18-24-month-old CPSEn RR dogs compared with the corresponding CPSEn LR (Figure 2) may indicate an early androgen-independent induction of BPH in the RR breed. This supposition is based on the clinical conditions of these dogs, described in our previous paper (Werhahn Beining et al., 2020). Despite normal blood plasma concentrations of CPSE, eight out of the ten CPSEn RR dogs showed haemospermia alone or combined with sonographic signs of BPH, among them all three dogs belonging to age group I.

From experimental models, it is known that PRL displays androgen-independent hypertrophic effects on the prostate (Nevalainen et al., 1997; Reiter et al., 1999; Syms et al., 2006). Expression of PRL and its receptor has been verified in epithelial cells of the rat and human prostate gland (Ouhtit et al., 1993; Nevalainen et al., 1997; Hair et al., 2002). Thus, PRL has been shown to act as a direct growth and differentiation factor for the prostate (Nevalainen et al., 1997; Syms et al., 2006). As prolactin and its binding sites have also been identified in various tissues including focal glandular hyperplastic cells of the canine prostate (El Etreby & Mahrous, 1979), stimulatory effects of PRL on prostate growth and development of canine BPH can be expected. However, in accordance with Kukk (2011), no correlation was found between PRL on the one hand and BPH or linked parameters on the other hand.

Comparison of the CPSEn and CPSEi group within the RR breed revealed a close to significantly lower PRL concentration in the CPSEi dogs (Figure 1), the relatively low PRL levels being distributed across all three age groups (Figure 2). In our previous study, a positive correlation between prostate gland volume on the one hand and CPSE ($p<0.05$) and testosterone ($p<0.01$) on the other hand, was found, indicating the well known androgen dependence of BPH (Werhahn Beining et al., 2020). Thus, considering the increased CPSE concentration as indicator of raised androgen activity (Frenette, Dubé & Tremblay, 1983; Frenette, Dubé & Tremblay, 1985; Isaacs & Sharper, 1985; Juniewicz et al., 1990), it can be assumed that the latter may have caused an increase in the number of prostatic PRL receptors. On the other hand, as PRL is supposed to raise the uptake of testosterone into the prostate and the

intraprostatic testosterone metabolism (Farnsworth et al., 1981), the increase in CPSE may have resulted from the initially increased PRL secretion.

This is supported by experimental studies in rodents. In rats, for example, prolactin has been suggested to work synergistically with testosterone to increase 5□-reductase activity in both, in vitro and in vivo studies, and induces growth, differentiation and hyperplastic changes of the prostate (Tangbanluekal & Robinette, 1993; Nevalainen et al., 1996; Lane et al., 1997; Reiter et al., 1999). The latter is represented by the 100% presence of clinical signs of BPH in the CPSEi RR.

4.3 IGF-1

Regarding IGF-1, the absolute serum concentrations measured in the present study in male LR and RR dogs were on a similar level as analysed in a serum pool of healthy intact beagle dogs and in a group of healthy dogs of different breeds of both genders, respectively (Tvarijonaviciute et al., 2011; McQuown et al., 2018).

In human patients with BPH, lower serum IGF-1 levels were found compared with healthy controls (Safarinejad et al., 2011). This agrees with the tendentially lower mean IGF-1 concentrations in the RR with CPSEi compared to both RR and LR with normal CPSE. The close to significant correlation of IGF-1 with PRL in the entire group of RR (n=20) (r=0.43, p=0.06) may reflect a supplementary androgen-independent effect of both compounds on the early development of BPH in this breed. This assessment may be supported by the high IGF-1 concentration found in the youngest CPSEn RR and the subsequent decrease in IGF-1 with age. However, a decline in IGF-1 over time has been described for both intact male and female dogs regarding a life-span of several months to >16 years (Greer et al., 2011). Thus, the age-related decrease in IGF-1 concentrations expressed in our study by the negative correlation of IGF-1 with age may primarily reflect independence of BPH, as it was verified for the entire group of dogs (CPSEn and CPSEi, n=38) (r=-0.37, p<0.05), the total group of dogs with normal CPSE (n=28) (r=-0.47, p<0.05), and in the RR CPSEn (n=10) (r=-0.85, p<0.01) but not for the RR CPSEi. (Table 4). Furthermore, the negative correlations between IGF-1 on the one hand and prostate gland volume and the serum CPSE concentration

on the other hand (Table 4) may indicate a decreasing influence of IGF-1 on BPH development.

Regarding causal connections between IGF-1 on the one hand and the prostate gland status on the other hand, investigations have been mainly performed in humans. Insulin-like growth factor-1 is known to be a strongly mitogenic and anti-apoptotic factor in the development of benign prostatic hyperplasia (BPH). Its bioactivity within tissues may depend on circulating IGF-1 levels, as well as on the local production of IGF-1 and the presence of IGF-binding proteins (IGFBPs) (Stattin et al., 2001). Prostate cells have been shown to express IGF, IGFBPs and the type 1 IGF receptor (Chokkalingam et al., 2002). As an example, among IGFBPs, IGFBP-3 is the most abundant form, with the highest affinity for IGF-1 in the circulatory system, binding 75–90% of circulating IGF-1 (Lee et al., 2014). IGFBP-3 is a strong anti-proliferative protein that provokes apoptosis and inhibits cell proliferation in human prostate cancer. As described for IGF-1, IGFBP-3 levels were significantly lower in men with BPH compared with controls (Safarinejad et al., 2011). Moreover, it is possible that circulating levels of androgens may influence IGF bioactivity levels, particularly because the androgen pathway influences IGF-mediated cellular regulation. Furthermore, androgens have been shown to promote the expression of the type 1 IGF receptor (Vendola et al., 1999).

In our previous study considering the identical dog population, prostate gland volume was correlated with the androgen-dependent CPSE ($p<0.05$) and testosterone ($p<0.01$) in the entire group of RR dogs (Werhahn Beining et al., 2020). Thus, although no correlations were found between IGF-1 and 5α-DHT or testosterone, an influence of those androgens on the expression of both, IGF receptor and IGFBPs must be taken into account.

4.4 Calcidiol / 25-hydroxy vitamin D_3 (25-OHD_3)

It is generally accepted that dogs primarily rely upon dietary intake of vitamin D (How et al. 1994). With regard to health, benign disease and cancer in dogs, relative risk was found to increase with decreasing serum 25(OH)D_3 concentrations, with a lower limit of 40 ng/ml and vitamin D sufficiency was defined as serum concentrations of 100 to 120 ng/ml (Selting et al., 2014). In 292 dogs fed commercial foods from 40

different manufacturers, Sharp et al. (2015) found an overall median serum 25-OHD_3 concentration of 67.9 ng/ml ranging from 47.4 to 100.1 ng/ml with significant differences among the manufacturers. In the present study, a similar range of values existed in the majority of dogs fed with a commercial diet or with commercial plus homemade food (all LR dogs, RR CPSEn of age groups I and III, RR CPSEi of age groups I and II), and in all dogs exclusively fed a homemade diet (Table 3). Values above 100 ng/ml were measured in each of six LR and RR dogs with no clear relation to the fed diet (Table 3). These findings contradict the observation of Sharp et al. (2015), who found the lowest 25-OHD_3 level in dogs fed homemade diets (minimum 9.5 ng/ml). In our study, comparably low values existed only in dogs of the RR breed [two RR CPSEi in age group III receiving commercial food (17.0 ng/ml) or commercial food plus homemade diet (15.7 ng/ml) and two RR CPSEn fed with commercial food (16.5 ng/ml in age group I, 15.6 ng/ml in age group III)] (Table 3). Significant differences, as found in a human study between men with healthy prostate gland and BPH (Elshazly et al., 2017) is missing probably due to the small number of dogs per RR group. In humans, vitamin D has gained increasing interest with regard to its anti-proliferative effects and its role as a mediator of cell differentiation and apoptosis in multiple tissues including the prostate gland (Haussler et al., 1998; Nagpal et al., 2005). Moreover, the vitamin D receptor (VDR) has been isolated and identified in rat and human prostatic tissue (Johnson et al., 1996; Holick, 2008; Blomberg Jensen et al., 2011). Furthermore, VDR expression has been detected in cultured stromal cells derived from the prostate of human BPH patients (Peehl et al. 1994; Crescioli et al., 2003; Crescioli et al., 2005). The use of vitamin D analogues specific to the VDR in human prostatic tissue has resulted in a significant shrinkage of the enlarged gland in men with benign prostatic hyperplasia (Crescioli et al., 2004; Colli et al., 2006; Adorini et al., 2010). In addition to VDR, normal, cancerous and hyperplastic human prostatic tissue has been shown to express D-1α-hydroxylase activity and contain 1,25-$(OH)_2D_3$, indicating that it is able to synthesise its own intracellularly active 1,25-$(OH)_2D_3$ from 25-OHD_3 (Schwartz et al., 1998; Holick, 2008). Vitamin D receptor was also verified in the canine prostate gland both in vitro and in vivo (Kunakornsawat et al., 2004; Adorini et al., 2007; Taniguchi et al., 2010). Furthermore, cell growth was inhibited by 1,25-

$(OH)_2D_3$ (Kunakornsawat et al., 2004), and the anti-proliferative effect of VDR agonists was proven in prostate glands and prostatic tissue of Beagles with spontaneous BPH (Adorini et al., 2007; Taniguchi et al., 2010).

The gradual decrease in 25-OHD_3 values, seen with increasing age in the CPSEi RR (Figure 6), together with the negative correlation of serum 25-OHD_3 with age (Table 4), may indicate an age-related reduction of the endogenous transformation of vitamin D to 25-OHD_3 (Ebeling et al., 1992). This may result in a decrease in the inhibiting influence of 25-OHD_3 or 1,25-$(OH)_2D_3$ on the development of BPH. This assumption is supported by the breed-specific findings in our previous study (Werhahn Beining et al. 2020), where both, the prostate gland volume and its age-related increase was significantly more pronounced in the RR dogs compared with the LR dogs. In accordance, a negative correlation was found between 25-OHD_3 and prostate gland volume in healthy men with BPH (Park et al., 2018). As other causes, an age-related reduction in intraprostatic synthesis of 1,25-$(OH)_2D_3$ or of prostatic VDR expression leading to an increased resistance of prostatic tissue to 1,25-$(OH)_2D_3$-mediated effects could be hypothesised.

Causal connections between IGF-1 and vitamin D metabolism must also be taken into account. IGF-1 activates the renal 1□-hydroxylase leading to an increase in 1,25-$(OH)_2D_3$ synthesis (Nesbitt & Drezner, 1993). Thus, a positive correlation of the IGF-1 concentration and 1,25-$(OH)_2D_3$ is described in men (Hyppönen et al., 2008; Forouhi et al., 2008). Regarding the prostate gland, IGF, among other growth factors, is implicated in the mechanism by which vitamin D exerts its action in BPH cells (Crescioli et al., 2003). On the other hand, in BPH, being an androgen-dependent condition, vitamin D is thought to work downstream from the androgen receptor (AR) to inhibit the production of certain growth factors and pro-inflammatory cytokines (Nagpal et al., 2005; Adorini et al., 2010).

Regarding the detection of measurable 25-OHD_3 concentrations in the prostatic secretion of 11 RR dogs (CPSEn n=4, CPSEi n=7) (Figure 7), a BPH-related specificity in the RR breed must be taken into consideration. The positive correlation between prostate gland volume and the 25-OHD_3 concentrations in the prostatic secretion (Table 4) may indicate a reduced transformation to 1,25-$(OH)_2D_3$ in the enlarged

prostate gland and a concomitant increased excretion of 25-OHD_3 into the prostatic secretion.

The results of the present study indicate general and breed-related involvement of prolactin, IGF-1 and 25-OHD_3 in the pathogenesis of canine BPH. They lead, however, to a number of questions that must be considered in future research.

5 Conclusions

The results of the present study point to a breed-specific involvement of prolactin and IGF-1 in the early development of BPH in the Rhodesian Ridgeback. However, data regarding the expression of prostatic receptors of PRL and IGF-1 in dogs are scarce so far, and breed-related conditions are completely missing. Thus, our results must be taken as an initiation for further studies to go more in-depth with regard to prostatic tissue in general and especially concerning breed differences. A very similar conclusion can be drawn from our results regarding 25-OHD_3. As explained in detail, vitamin D supply with feeding varied between dogs of both breeds, and by this may have influenced the 25-OHD_3 concentrations measured in blood serum. Nevertheless, the negative correlation with age detected in the RR with increased CPSE and the verification of 25-OHD_3 in the prostatic secretion of RR dogs, but not in LR dogs, may indicate a breed-specific prostatic 25-OHD_3 metabolism. Furthermore, the results may give rise to the relevance of vitamin D sufficiency for preventing or treating BPH in dogs in general and especially in the Rhodesian Ridegback.

To the best of our knowledge, peripheral concentrations of IGF-1 and 25-OHD_3 have not been considered regarding their clinical relevance with respect to canine BPH.

Conflict of interest

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

Author contributions

Werhahn Beining was intensely involved in designing the study, recruited patients, performed ultrasound examinations and blood sampling, analysed data and drafted

paper. Wolf assisted in recruitment of patients and clinical examinations. Schmicke was responsible for the analyses of prolactin and IGF-1. Wilkens was responsible for 25-OHD_3 analysis. Rohn supported statistical analyses. Günzel-Apel designed study, supervised experimental part and corrected manuscript to final version.

Declaration – Ethical guidelines committee

The study was approved by the Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety, Germany (Reference no. 33.19-42502-04-15/1885). Informed owner consent was obtained.

Data Availability Statement

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

References

Adams, V. J., Evans, K. M., Sampson, J., & Wood, J. L. N. (2010). Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. *Journal of Small Animal Practice, 51*, 512–524. http://doi:10.1111/j.1748-5827.2010.00974.x

Adorini, L., Penna, G., Amuchastegui, S., Cossetti, C., Aquilano, F., Mariani, R., ... & Maggi, M. (2007). Inhibition of prostate growth and inflammation by the vitamin D receptor agonist BXL-628 (elocalcitol). *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 103,* 689-693. http://doi:10.1016/j.jsbmb.2006.12.065

Adorini, L., Penna, G., Fibbi, B., & Maggi, M. (2010). Vitamin D receptor agonists target static, dynamic, and inflammatory components of benign prostatic hyperplasia. *Annals of New York Academic Sciences, 1193*, 146-152. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05299.x.

Alonge, S., Melandri, M., Leoci, R., Lacalandra, G. M., & Aiudi, G. (2018). Canine prostate specific esterase (CPSE) as a useful biomarker in preventive screening programme of canine prostate: CPSE threshold value assessment and its correlation with ultrasonographic prostatic abnormalities in asymptomatic dogs. *Reproduction in Domestic Animals, 53*, 359–364. https://doi.org/10.1111/rda.13113

Bachelot, A. & Binart, N. (2007). Reproductive role of prolactin (Review article). *Reproduction, 33*, 361-369. https://doi.org/10.1550/REP-06-0299

Bamberg-Thalen, B. L., & Linde-Forsberg, C. (1993). Treatment of canine prostatic hyperplasia with medroxyprogesterone acetate. *Journal of the American Animal Hospital Association, 29*, 221-226.

Barsanti, J. A., & Finco, D. R. (1986). Canine prostatic disease. *Veterinary Clinics of North America, 16,* 587-599. https://doi.org/10.1016/S0195-5616(86)50063-2

Bell, F. W., Klausner, J. S., Hayden, D. W., Lund, E. M., Liebenstein, B. B., Feeney, D. A. … & Isaacs, W. B. (1995). Evaluation of serum and seminal plasma markers in the diagnosis of canine prostatic disorders. *Journal of Veterinary Internal Medicine, 9,* 149-153. https://doi.org/10.1111/j.1939-676.1995.tb03288.x

Berry, S. J., Coffey, D. S., & Ewing, L. L. (1986a). Effects of aging on prostate growth in Beagles. *American Journal of Physiology, 250*, R1039-1046. https://doi.org/10.1152/aiprequ.1986.250.6.R1039

Berry, S. J., Strandberg, J. D., Saunders W. J., & Coffey, D. S. (1986b). Development of canine benign prostatic hyperplasia with age. *Prostate, 9*, 363-373. https://doi.org/10.1002/pros.2990090406

Blomberg Jensen, M., Bjerrum, P. J., Jessen, T. E., Nielsen, J. E., Joensen, U. N., Olesen, I. A., … & Jørgensen, N. (2011). Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa. *Human Reproduction, 26,* 1307-1317. https://doi.org/10.1093/humrep/der059

Chapdelaine, P., Dube, J. Y., Frenette, G., & Tremblay, R. R. (1984). Identification of arginine esterase as the major androgen-dependent protein secreted by dog prostate and preliminary molecular characterization in seminal plasma. *Journal of Andrology, 5,* 206-210. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1984.tb02395.x

Chokkalingam, A. P., Gao, Y. T., Deng, J., Stanczyk, F. Z., Sesterhenn, I. A., Mostofi, F. K., … & Hsing, A. W. (2002). Insulin-like growth factors and risk of benign prostatic hyperplasia. *Prostate, 52*, 98-105. https://doi.org/10.1002/pros.10096

Colli, E., Rigatti, P., Montorsi, F., Artibani, W., Petta, S., Mondaini, N., … & Maggi, M. (2006). BXL628, a novel vitamin D3 analog arrests prostate growth in patients with benign prostatic hyperplasia: a randomized clinical trial. *European Journal of Urology, 49,* 82-86. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2005.08.014

Corrada, Y., Castex, G., Sosa, Y., & Gobello, C. (2003). Secretory patterns of prolactin in dogs: circannual and ultradian rhythms. *Reproduction in Domestic Animals, 38*, 219–223. https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00432.x

Corrada, Y., Rimoldi, I., Arreseigor, S., Marecco, G., & Gobello, C. (2006). Prolactin reference range and pulsatility in male dogs. *Theriogenology, 66,* 1599-1602. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.003

Crescioli C, Ferruzzi P, Caporali A, Mancina R, Comerci A, Muratori M, … & Maggi M. (2003). Inhibition of spontaneous and androgen-induced prostate growth by a nonhypercalcemic calcitriol analog. *Endocrinology, 144,* 3046-3057. https://doi.org/10.1210/en.2002-0210

Crescioli, C., Ferruzzi, P., Caporali, A., Scaltriti, M., Bettuzzi, S., Mancina, R., … & Maggi, M. (2004). Inhibition of prostate cell growth by BXL-628, a calcitriol analogue selected for a phase II clinical trial in patients with benign prostate hyperplasia. *European Journal of Endocrinology, 150*, 591-603. https://doi.org/10.1530/eje.0.1500591

Crescioli, C., Morelli, A., Adorini, L., Ferruzzi, P., Luconi, M., Vannelli, G. B., ... & Maggi, M. (2005). Human bladder as a novel target for vitamin D receptor ligands. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 90, 962–972. https://doi.org/10.1210/jc.2004-1496

De Rosa, M., Zarrilli, S., Vitale, G., Di Somma, C., Orio, F., Tauchmanova, L., … & Colao, A. (2004). Six months of treatment with cabergoline restores sexual potency in hyperprolactinemic males: an open longitudinal study monitoring nocturnal penile tumescence. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 89,* 621-625. https://doi.org/10.1210/jc.2003-030852

Ebeling, P.R., Sandgren, M. E., DiMagno, E. P., Lane, A. W., DeLuca, H. F., & Riggs, B. L. (1992). Evidence of an age-related decrease in intestinal responsiveness to vitamin D: relationship between serum 1,25-dihydroxyvitamin D3 and intestinal vitamin D receptor concentrations in normal women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 75*, 176–182. https://doi.org/10.1210/jcem.75.1.1320048

Eigenmann, J. E., Amador, A., & Patterson, D. F. (1988). Insulin-like growth factor I levels in proportionate dogs, chondrodystrophic dogs and in giant dogs. *Acta Endocrinologica (Copenhagen), 118*, 105-108. https://doi.org/10.1530/acta.0.1180105

El Etreby, M. F., & Mahrous, A. T. (1979). Immunocytochemical technique for detection of prolactin (PRL) and growth hormone (GH) in hyperplastic and neoplastic lesions of dog prostate and mammary gland. *Histochemistry, 64*, 279-286. https://doi.org/10.1007/bf00495028

Elshazly, M. A., Sultan, M. F., Aboutaleb, H. A., Salem, S. M., Aziz, M. S., Abd Elbaky, T. M., … & Kehinde, E. (2017). Vitamin D deficiency and lower urinary tract symptoms in males above 50 years of age. *Urology Annals, 9,* 170-173. https://doi.org/10.4103/0974-7796.204192

Espinosa, G., Esposito, R., Kazzazi, A., & Djavan, B. (2013). Vitamin D and benign prostatic hyperplasia – a review. *The Canadian Journal of Urology, 20*, 6820-6825.

Ewing, L. L., Thompson, D. L., Cochran, R. C., Lasley, B. L., Thompson, M. A., & Zirkin, B. R. (1984). Testicular androgen and estrogen secretion and benign prostatic hyperplasia in the Beagle. *Endocrinology, 114,* 1308–1314. https://doi.org/10.1210/endo-114-4-1308

Farnsworth, W.E., Slaunwhite, W.R., Sharma, J.R.M., Oseko, F., Brown, J.R., Gonder, M.J., & Cartagena, R. (1981). Interaction of prolactin and testosterone in the human prostate. *Urological Research 9,* 79-88. https://doi.org/10.1007/bf00256681

Forouhi, N. G., Luan, J., Cooper, A., Boucher, B. J. & Wareham, N. J. (2008). Baseline serum 25-hydroxy vitamin D is predictive of future glycemic status and insulin resistance. The Medical Research Council Ely Prospective Study 1990–2000. *Diabetes, 57,* 2619–2625. https://doi.org/10.2337/db08-0593

Frenette, G., Dubé, J. Y., & Tremblay, R. R. (1983). Effect of castration and steroid treatments on the activity of some hydrolytic enzymes in dog prostate. *Prostate, 4*, 383-390. https://doi.org/10.1002/pros.2990040408

Frenette, G., Dubé, J. Y., & Tremblay, R. R. (1985). Enzymatic characterization of arginine esterase from dog seminal plasma. *Biochimica et Biophysica Acta, 838*, 270-276. https://doi.org/10.1016/0304-4165(85)90089-3

Gloyna, R. E., Siiteri, P. K., & Wilson, J. D. (1970). Dihydrotestosterone in prostatic hyperplasia. *Journal of Clinical Investigation, 49,* 1646-1753. https://doi.org/10.1172/JCI106392

Gobello, C., Castex, G., & Corrada, Y. (2002). Serum and seminal markers in the diagnosis of disorders of the genital tract of the dog: a mini-review. *Theriogenology, 57,* 1285-1291. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00628-3

Gobello, C., & Corrada Y. (2002). Noninfectious prostatic diseases in dogs. *Compendium of Continuing Education for the Practising Veterinarian, 24*, 99-107.

Greer, K. A., Hughes, L. M., & Masternak, M. M. (2011). Connecting serum IGF-1, body size, and age in the domestic dog. *AGE, 33*, 475–483. https://doi.org/10.1007/s11357-010-9182-4.

Günzel-Apel, A-R., Seefeldt, A., Eschricht, F. M., Urhausen, C., Kramer, S., Mischke, R., … & Dieleman, S. J. (2009). Effects of gonadectomy on prolactin and LH secretion and the pituitary-thyroid axis in male dogs. *Theriogenology, 71,* 746-753. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.047

Hair, W. M., Gubbay, O., Jabbour, H. N, & Lincoln, G. A. (2002). Prolactin receptor expression in human testis and accessory tissues: localization and function. *Molecular Human Reproduction, 8,* 606-611. https://doi.org/10.1093/molehr/8.7.606

Haussler, M. R., Kerr Whitfield, G., Haussler, C. A., Hsieh, J.-C., Thompson, P. D., Selznick, S. H., … & Jurutka, P. W. (1998). The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. Journal of Bone and Mineral Research, 13, 325-349. https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.3.325

Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. (2004). *American Journal of Clinical Nutrition, 80,*1678S–1688S. https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1678S

Holick, M. F. The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: mechanisms of action. (2008). *Molecular Aspects in Medicine, 29*, 361-368. https://doi: 10.1016/j.mam.2008.08.008

Holst, B. S., Holmroos, E., Friling, L., Hanås, S., Langborg, L. M., Franko, M. A., & Hansson K. (2017). The association between the serum concentration of canine prostate specific esterase (CPSE) and the size of the canine prostate. *Theriogenology, 93,* 33-39. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.032

How, K. L., Hazewinkel, H. A., & Mol, J. A. (1994): Dietary vitamin D dependence of cat and dog due to inadequate cutaneous synthesis of vitamin D. *General and Competitive Endocrinology 96,* 12-18. https://doi.org/10.1006/gcen.1994.1154

Hyppönen, E., Boucher B.J., Berry D.J., & Power, C. (2008). 25-hydroxyvitamin D, IGF-1, and metabolic syndrome at 45 years of age. A cross-sectional study in the 1958 British birth cohort. *Diabetes, 57,* 298–305. https://doi.org/10.2337/db07-1122

Isaacs, W. B., & Coffey D. S. (1981). Changes in dihydrotestosterone metabolism associated with the development of canine benign prostatic hyperplasia. *Endocrinology, 108,* 445-453. https://doi.org/10.1210/endo-108-2-445

Isaacs, W. B., & Shaper, J. H. (1985). Immunological localization and quantitation of the androgen-dependent secretory protease of the canine prostate. *Endocrinology, 117,* 1512-1520. https://doi.org/10.1210/endo-117-4-1512

Jaillardon, L., Martin, L., Nguyen, P., & Siliart, B. (2011). Serum insulin-like growth factor type 1 concentrations in healthy dogs and dogs with spontaneous primary hypothyroidism. *Veterinary Journal, 90,* e95-99. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.03.020

Johnson, C.A (2010). Benigne Prostatahyperplasie. In: Nelson, W.N. & Couto, C. G. (Ed.) Innere Medizin der Kleintiere, 2nd ed., Elsevier Urban & Fischer, München, pp. 1012-1014. ISBN 978-3-437-57041-4.

Johnson, J. A., Grande, J. P., Roche, P. C., & Kumar, R. (1996). Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in rat reproductive tissues. *Histochemistry and Cell Biology, 105, 7-15*. https://doi.org/10.1007/bf01450873

Juniewicz, P. E., Barbolt, T. A., Egy, M. A., Frenette, G., Dube, J. Y., & Tremblay, R. R. (1990). Effects of androgen and antiandrogen treatment on canine prostatic arginine esterase. *Prostate, 17*, 101-111. https://doi.org/10.1002/pros.2990170204

Khosravi, J., Diamandi, A., Mistry, J., & Scorilas, A. (2001). Insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86, 694-699. https://doi.org/10.1210/jcem.86.2.7211

Kivineva, M., Bläuer, M., Syvälä, H., Tammela, T., & Tuohimaa, P. (1998). Localization of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor (VDR) expression in human prostate. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 66, 121-127. https://doi.org/10.1016/s0960-0760(98)00054-5

Koch, A., Hoppen, H-O., Dieleman, S. J., Kooistra, H. S., & Günzel-Apel A-R. (2006). Effects of the dopamine agonist cabergoline on the pulsatile and TRH-induced secretion of prolactin, LH, and testosterone in male beagle dogs. *Theriogenology, 65*, 1666-1677. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.013

Kukk, A. J. (2011). Associations between canine male reproductive parameters and serum vitamin D and prolactin concentrations. Postgraduate Thesis, The University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada

Kunakornsawat, S., Rosol, T. J., Capen, C. C., Omdahl, J. L., Leroy, B. E. & Inpanbutr, N. (2004). Effects of 1,25(OH)2D3, 25OHD3, and EB1089 on cell growth and Vitamin D receptor mRNA and 1alpha-hydroxylase mRNA expression in primary cultures of the canine prostate. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 89-90*, 409-412. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.03.009

Lane, K. E., Leav, I., Ziar, J., Bridges, R. S., Rand, W. M., & Ho, S. M. (1997). Suppression of testosterone and estradiol-17β-induced dysplasia in the dorsolateral prostate of Noble rats by bromocriptine. *Carcinogenesis, 18,* 1505–1510. https://doi.org/10.1093/carcin/18.8.1505

Lee, H., Kim, S. R., Oh, Y., Cho, S. H., Schleimer, R. P., & Lee, Y. Ch. (2014). Targeting Insulin-Like Growth Factor-I and Insulin-Like Growth Factor–Binding Protein-3 signaling pathways a novel therapeutic approach for asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 50,* 667-677. https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0397TR.

Le Roith, D. (1996). Insulin-like growth factor receptors and binding proteins. *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism, 10,* 49-73. https://doi.org/10.1016/s0950-351x(96)80298-9

Lowseth, L. A., Gerlach, R. F., Gillett, N. A., & Muggenburg B. A. (1990). Age-related changes in the prostate and testes of Beagle dogs. *Veterinary Pathology, 27,* 347-353. https://doi.org/10.1177/030098589002700507

McQuown, B., Burgess, K. E., & Heinze, C. R. (2018). Preliminary investigation of blood concentrations of insulin-like growth factor, insulin, lactate and β-hydroxybutyrate in dogs with lymphoma as compared with matched controls. *Veterinary and Comparative Oncology, 16,* 262-267. https://doi.org/10.1111/vco.12376

Monti, S., Di Silverio, F., Iraci, R., Martini, C., Lanzara, S., Falasca, P., … & Toscano, V. (2001). Regional variations of insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and receptor type I in benign prostatic hyperplasia tissue and their correlation with intraprostatic androgens. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86,* 1700-1706. https://doi.org/10.1210/jcem.86.4.7413

Nagpal, S., Na, S., & Rathnachalam, R. (2005). Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocrinology Review, 26,* 662-687. https://doi.org/10.1210/er.2004-0002

Nesbitt, T., & Drezner, M. K. (1993). Insulin-Like Growth Factor-I regulation of renal 25- hydroxyvitamin D-1-hydroxylase activity. *Endocrinology, 132,* 133-138. https://doi.org/10.1210/endo.132.1.8419119

Nevalainen, M.T., Valve, E.M., Ingleton, P.M., & Harkönen, P.L. (1996). Expression and hormone regulation of prolactin receptors in rat dorsal and lateral prostate. *Endocrinology*, *137,* 3078-3088. https://doi.org/10.1210/endo.137.7.8770934

Nevalainen, M. T., Valve, E. M., Ingleton, P. M., Nurmi, M., Martikainen, P. M., & Härkönen, P. L. (1997). Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. Journal of *Clinical Investigation, 99,* 618–627. https://doi.org/10.1172/JCI119204

Ouhtit, A., Morel, G., & Kelly, P. A. (1993). Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in rat reproductive tissues. *Biology of Reproduction, 49,* 528-536. https://doi.org/10.1210/endo.133.1.8319561

Park SG, Yeo JK, Cho DY, Park MG. (2018). Impact of metabolic status on the association of serum vitamin D with hypogonadism and lower urinary tract symptoms/benign prostatic hyperplasia. *Aging Male, 21*, 55-59. https://doi.org/10.1080/13685538.2017.1311857.

Peehl, D. M., Skowronski, R. J., Leung, G. K., Wong, S. T., Stamey, T. A. & Feldman, D. (1994). Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on primary cultures of human prostatic cells. *Cancer Research 54*, 805-810.

Pinheiro, D., Machado, J., Viegas, C., Baptista, C., Bastos, E., Magalhães, J., … & Martins-Bessa, A. (2017). Evaluation of biomarker canine-prostate specific arginine esterase (CPSE) for the diagnosis of benign prostatic hyperplasia. *BMC Veterinary Research, 13,* 76. https://doi.org/10.1186/s12917-017-0996-5

Reiter, E., Hennuy, B., Bruyninx, M., Cornet, A., Klug, M., McNamara, M., … & Hennen, G. (1999). Effects of pituitary hormones on the prostate. Review Article. *Prostate, 38,* 159-165.https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0045(19990201)38:2<159::aid-pros10>3.0.co;2-5

Safarinejad, M. R., Shafiei, N., & Safarinejad, S. (2011). Relationship of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 (IGFBP-3) gene polymorphism with the susceptibility to development of prostate cancer and influence on serum levels of IGF-1, and IGFBP-3. *Growth Hormone & IGF Research, 21,* 146-154. https://doi.org/10.1016/j.ghir.2011.03.008

Schwartz, G. G., Whitlach, L. W., Chen, T. C., Lokeshwar, B. & Holick, M. F. (1998). Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D3 from 25-hydroxyvitamin D3. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 7,* 391–395.

Selting KA, Sharp CR, Ringold R, Thamm DH, & Backus R. (2014). Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs—correlation with health and cancer risk. *Veterinary and Comparative Oncology, 14,* 295–305. https://doi.org/10.1111/vco.12101

Sharp, C. R., Selting, K. A. & Ringold, R. (2015). The effect of diet on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs*. BMC Research Notes, 8*, 442. https://doi.org/10.1186/s13104-015-1360-0

Stattin, P., Kaaks, R., Riboli, E., Ferrari, P., Dechaud, H., & Hallmans, G. (2001). Circulating insulin-like growth factor-I and benign prostatic hyperplasia - a prospective study. Scandinavian Journal of Urology & Nephrology, 35, 122-126. https://doi.org/10.1080/003655901750170506

Syms, A. J., Haper, M. E., & Griffiths, K. (2006). The effect of prolactin on human BPH epithelial proliferation. *Prostate, 6,* 145-153. https://doi.org/10.1002/pros.2990060204

Tangbanluelkal, L., & Robinette, C. L. (1993). Prolactin mediates estradiol-induced inflammation in the lateral prostate of Wistar rats. *Endocrinology, 132,* 2407-2416. https://doi.org/10.1210/endo.132.6.8504745

Taniguchi, K., Katagiri, K., Kashiwagi, H., Harada, S., Sugimoto, Y., Shimizu, Y., … & Aoki, Y. (2010). A novel nonsecosteroidal VDR agonist (CH5036249) exhibits efficacy in a spontaneous benign prostatic hyperplasia beagle model. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 121*, 204-207. https://doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.03.043.

Teske, E, Naan, E. C., van Dijk, E. M., Van Garderen, E., & Schalken, J. A. (2002). Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs. *Molecular & Cellular Endocrinology 197*, 251-255. https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00261-7

Tvarijonaviciute, A., Tecles, F., Carillo, J. M., Rubio, M., & Ceron, J. J. (2011). Serum insulin-like growth factor-1 measurements in dogs: Performance characteristics of an automated assay and study of some sources of variation. *The Canadian Journal of Veterinary Research, 75*, 312–316.

Urhausen, C., Seefeldt, A., Eschricht, F. M., Koch, A., Hoppen, H-O., Beyerbach, M., & Günzel-Apel, A-R. (2009). Concentrations of prolactin, LH, testosterone, TSH and thyroxine in normospermic dogs of different breeds. *Reproduction in Domestic Animals, 44 (Suppl 2),* 279-282. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01455.x

Vendola, K., Zhou, J., Wang, J., & Bondy, C. A. (1999). Androgens promote insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I receptor gene expression in the primate ovary. *Human Reproduction, 4,* 2328–2332. https://doi.org/10.1093/humrep/14.9.2328

Walsh, P. C. & Wilson J. D. (1976). The induction of prostatic hypertrophy in the dog with androstanediol. *Journal of Clinical Investigation, 57,* 1093-1097. https://doi.org/10.1172/JCI108353.

Werhahn Beining, F., Urhausen, C., Wolf, K., et al. (2020). Rhodesian Ridgebacks have an increased risk to develop benign prostatic hyperplasia. *Reproduction in Domestic Animals, 55,* 283–292. https://doi.org/10.1111/rda.13616

Wolf, K., Kayacelebi, H., Urhausen, C., Piechotta, M., Mischke, R., Kramer, S., … & Günzel-Apel, A. (2012). Testicular steroids, prolactin, relaxin and prostate gland markers in peripheral blood and seminal plasma of normal dogs and dogs with prostatic hyperplasia. *Reproduction in Domestic Animals, 47 (Suppl 6)*, 243-246. https://doi.org/10.1111/rad.12029, ISSN 0936-6768

Zirkin, B. R. & Strandberg, J. D. (1984). Quantitative changes in the morphology of the aging canine prostate. *Anatomical Record, 208*, 207-214. http://doi.org/10.1002/ar.1092080207

Figures and Tables

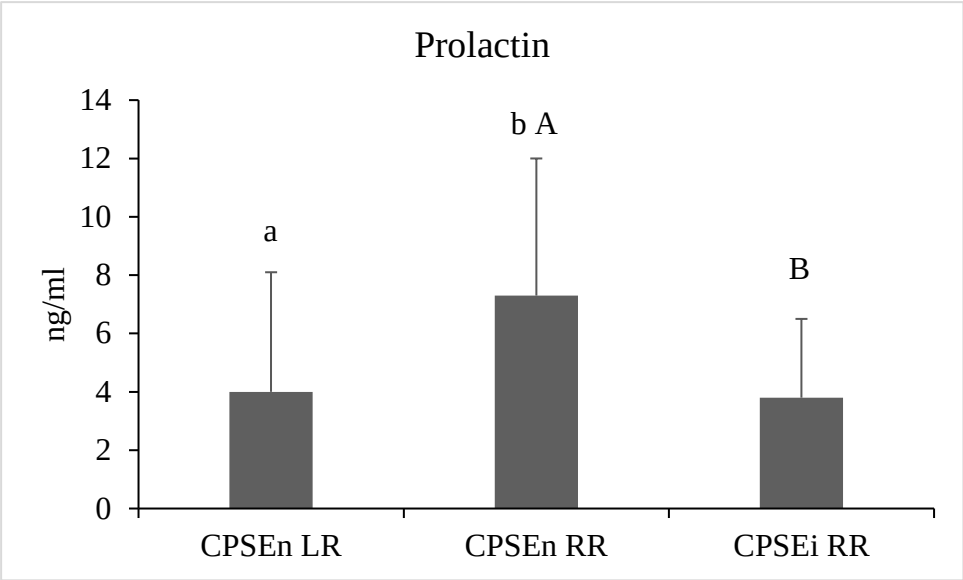

Figure 1 Serum prolactin concentrations (mean ±SD) in dogs with normal and increased concentrations of canine prostate-specific arginine esterase (CPSEn, CPSEi). Wilcoxon test – a/b $p < 0.01$, Kruskal-Wallis test - A/B $p = 0.05$

LR = Labrador Retriever, RR = Rhodesian Ridgeback

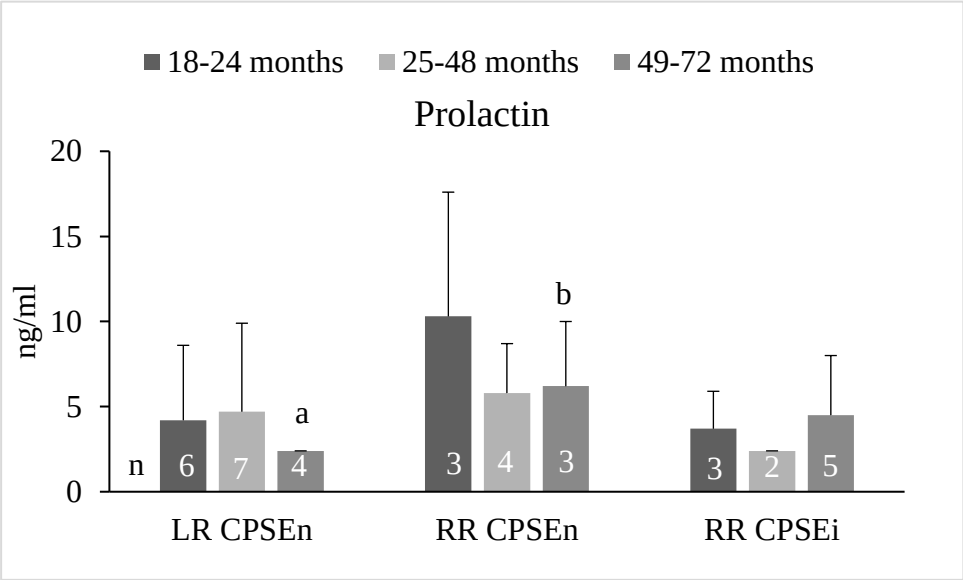

Figure 2 Serum prolactin concentrations (mean ±SD) in Labrador Retrievers (LR) and Rhodesian Ridgebacks (RR) of different age with normal and increased concentrations of canine prostate-specific arginine esterase (CPSEn, CPSEi). Wilcoxon test - a/b $p < 0.05$, n = number of dogs per age group

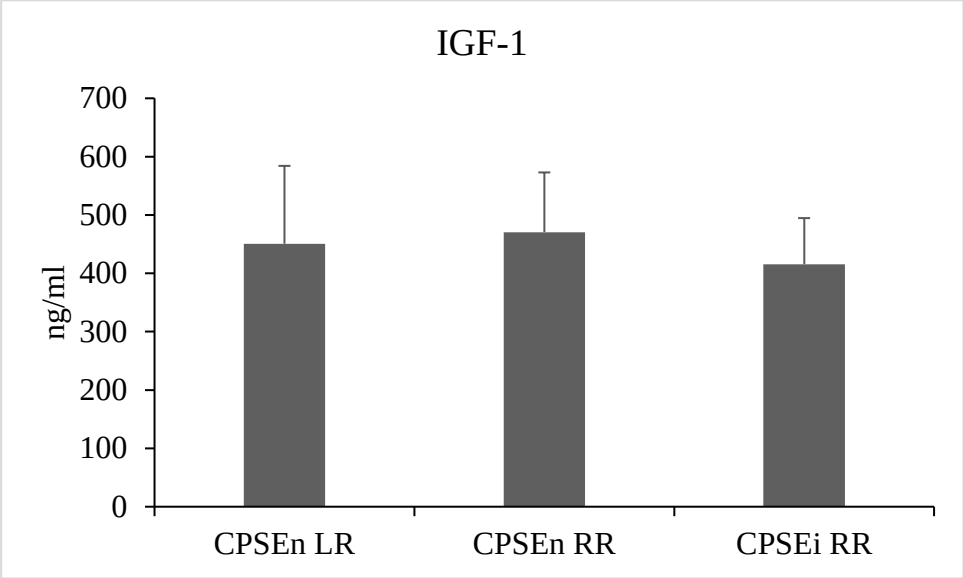

Figure 3 Serum IGF-1 concentrations (mean ±SD) in dogs with normal and increased concentrations of canine prostate-specific arginine esterase (CPSEn, CPSEi).

LR = Labrador Retriever, RR = Rhodesian Ridgeback

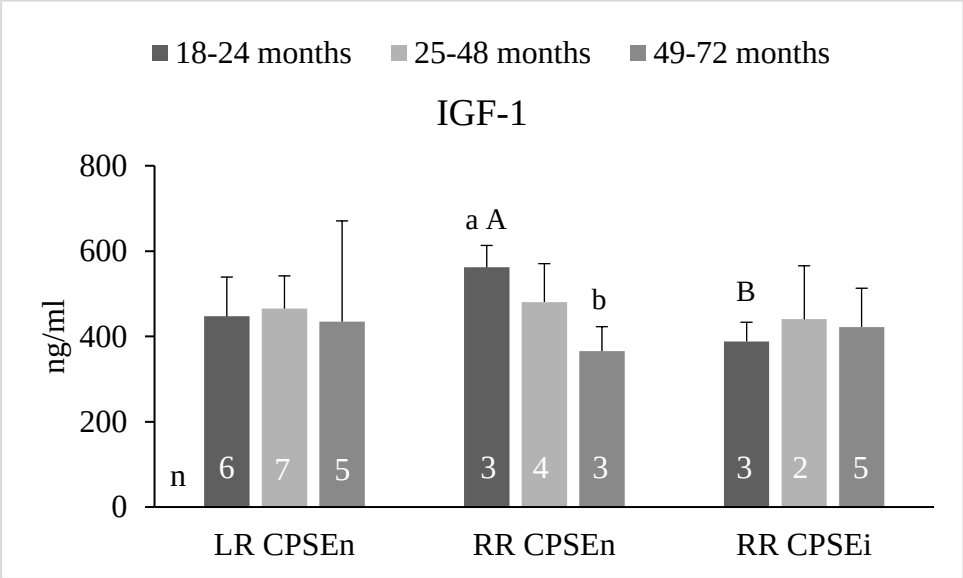

Figure 4 Serum IGF-1 concentrations (mean ±SD) in Labrador Retrievers (LR) and Rhodesian Ridgebacks (RR) of different age with normal and increased concentrations of canine prostate-specific arginine esterase (CPSEn, CPSEi).

Kruskal-Wallis test - a/b $p < 0.05$, A/B $p < 0.05$, n = number of dogs per age group

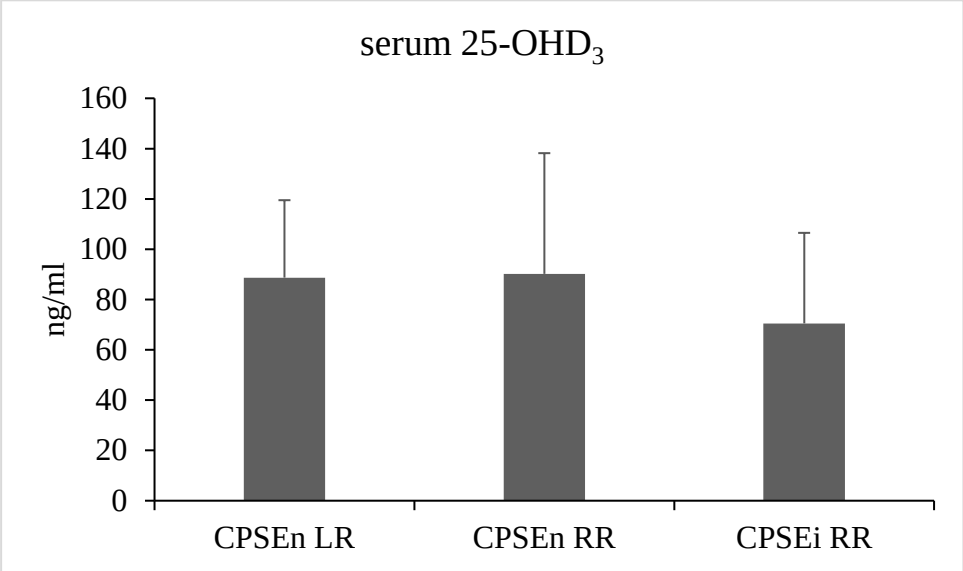

Figure 5 Serum 25-OHD$_3$ concentrations (mean ±SD) in dogs with normal and increased concentrations of canine prostate-specific arginine esterase (CPSEn, CPSEi). LR = Labrador Retriever, RR = Rhodesian Ridgeback

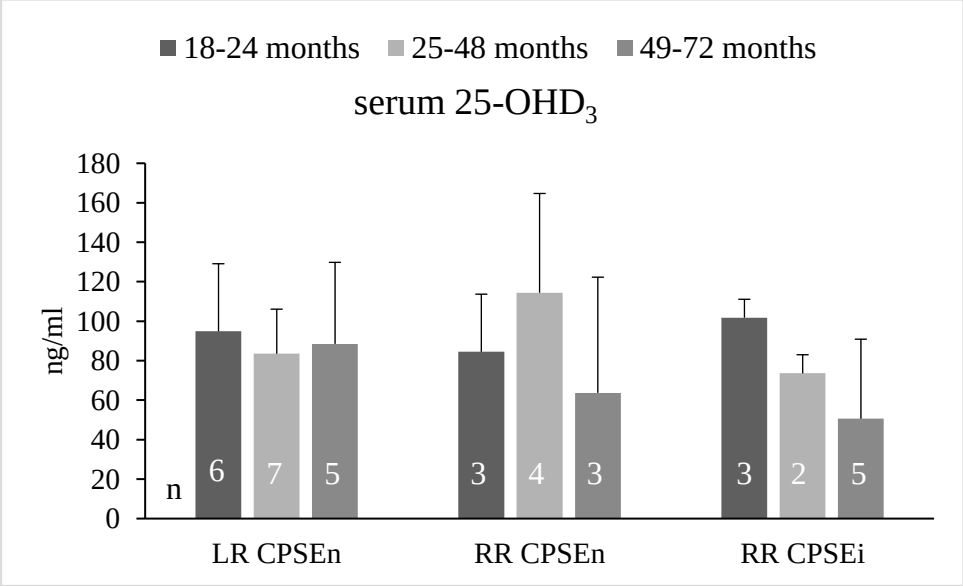

Figure 6 Serum 25-OHD$_3$ concentrations (mean ±SD) in Labrador Retrievers (LR) and Rhodesian Ridgebacks (RR) of different age with normal and increased concentrations of canine prostate-specific arginine esterase (CPSEn, CPSEi).
n = number of dogs per age group

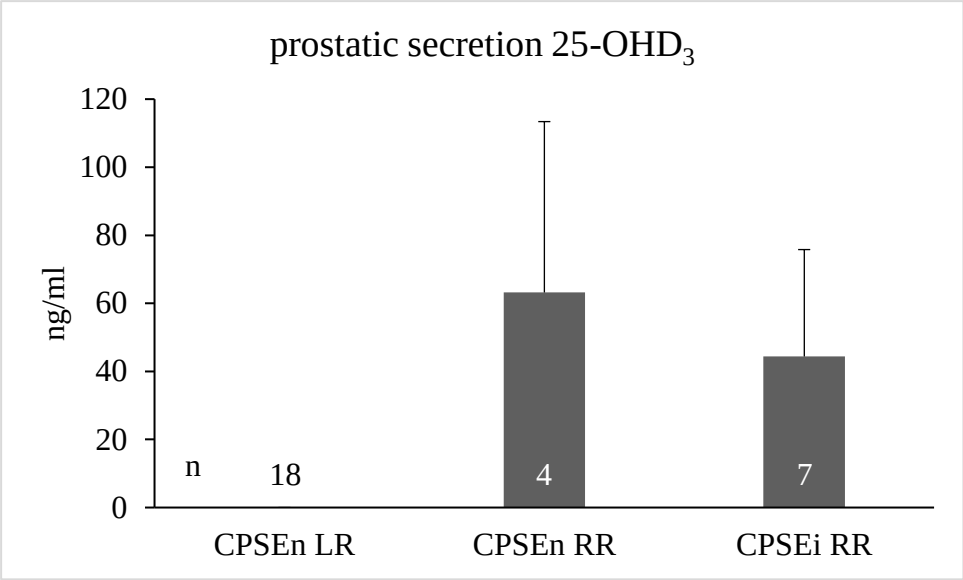

Figure 7 25-OHD_3 concentrations in prostatic secretion (mean ±SD) in dogs with normal and increased concentrations of canine prostate-specific arginine esterase (CPSEn, CPSEi). LR = Labrador Retriever, RR = Rhodesian Ridgeback, n = number of dogs per group

Table 1 Feeding of dogs according to breed and age

	Labrador Retriever				Rhodesian Ridgeback			
Age (months)	18-24		25-48		49-72		18-24		25-48		49-72	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Commercial food	4	66.6	6	85.7	1	20	5	83.3	3	50	5	62.5
Commercial food + “barf”	1	16.7	-		-		-		-		2	25
“barf”	1	16.7	1	16.7	4	80	1	16.7	3	50	1	12.5

“barf” = biologically appropriate raw food

Table 2 Age related distribution of dogs with normal (n) and increased (i) concentrations of canine prostate-specific arginine esterase (CPSE)

	Labrador Retriever				Rhodesian Ridgeback			
Age (months)	18-24		25-48		49-72		18-24		25-48		49-72	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
CPSEn	6	100	7	100	5	100	3	50	4	66.6	3	37.5
CPSEi	-		-		-		3	50	2	33.3	5	62.5

Table 3 Serum 25-OHD$_3$ concentrations (ng/ml) in differently fed Labrador Retrievers (LR) and Rhodesian Ridgebacks (RR)

breed			Commercial food				Commercial food + barf				barf			
			n	mean	±SD	min-max	n	mean	±SD	min-max	n	mean	±SD	min-max
LR	total		11	87.7	29.8	48.7-151.4	1	101.6			6	88.4	37.8	48.6-153.8
	Age (months)	18-24	4	90.8	43.4	49.9-151.4	1	101.6			1	104.3		
		25-48	6	84.4	24.7	48.7-117.6			-		1	78.5		
		49-72	1	95.1					-		4	86.9	47.6	48.6-153.6
RR CPSEn	total		6	90.5	58.7	5.6-189.3	1	46.5			3	104.1	22.3	85.7-128.9
	Age (months)	18-24	3	84.5	29.2	16.5-116.9			-		-			
		25-48	2	137.1	73.8	85.0-189.3			-		2	91.7	8.4	85.7- 97.6
		49-72	1	15.6			1	46.5			1	128.9		
RR CPSEi	total		7	74.2	35.4	17.0-114.4	1	15.7			2	85.0	25.4	67.0-103.0

Table 4 Correlations of concentrations of prolactin (PRL), IGF-1 and 25-OHD_3 in serum (S) or prostatic secretion (PS) with breed, age, and prostate gland volume regarding the CPSE status (CPSEn - normal concentration, CPSEi - increased concentration).

	total (CPSEn & CPSEi)		total LR (CPSEn)		total CPSEn (LR & RR)		total RR (CPSEn & CPSEi)		RR (CPSEn)		RR (CPSEi)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
PRL	breed											
	0.39	<0.05	-	-	0.55	0.01	-	-	-	-	-	-
	IGF-1											
	-	-	-	-	-	-	0.43	0.06	-	-	-	-
IGF-1	age											
	-0.37	<0.05	-	-	-0.47	<0.05	-	-	-	-	-	-
	prostate gland volume											
	-0.33	<0.05	-	-	-	-	-0.57	<0.01	-0.9	<0.001	-	-
	CPSE											
	-0.36	<0.05	-0.56	<0.05	-0.48	<0.05	-	-	-	-	-	-
S-25-OHD_3	age											
	-0.33	<0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.63	<0.05
PS-25-OHD_3	breed											
	0.59	<0.0001	-	-	0.55	<0.01	-	-	-	-	-	-
	prostate gland volume											
	-	-	-	-	0.53	<0.01	0.55	<0.05	0.68	<0.05	-	-

5 ÜBERGREIFENDE DISKUSSION

5.1 Probanden

Studien zur Inzidenz und zum Auftreten einer BPH bei Rüden wurden bereits bei einer Vielzahl von Rassen durchgeführt. Detaillierte Rasse-spezifische Merkmale wurden jedoch bisher nicht veröffentlicht. Daten über Rüden der Rasse „Rhodesian Ridgeback“ (RR) fehlen vollständig. Aufgrund des aus einer früheren Studie von WOLF et al. (2012) resultierenden Verdachts einer Rassedisposition beim RR, wurde der Schwerpunkt der vorliegenden Untersuchungen auf diese Rasse gelegt. Bei den in die Studie einbezogenen Hunden handelte es sich um Rüden, die zur Zucht bestimmt waren oder bereits erfolgreich in der Zucht eingesetzt wurden. Um multifaktorielle Einflüsse verschiedener Rassen zu vermeiden, wurden Rüden der Rasse „Labrador Retriever“ (LR) als Kontrollgruppe gewählt. Hierfür waren das mit den RR vergleichbare Körpergewicht vor allem in Bezug auf die Größe der Fortpflanzungsorgane einschließlich der Prostata sowie eine „normale“ Entwicklung der BPH bei dieser Rasse ausschlaggebend. Ferner kann bei beiden Rassen von ähnlichen Voraussetzungen in Bezug auf den Gesundheitsstatus ausgegangen werden (ADAMS et al. 2010). Diese beziehen sich auf das mediane Alter am Todestag (LR 12,25 Jahre, RR 11 Jahre), das prozentuale Alter der Hunde, die länger lebten bzw. später verstarben (LR 23%, RR 18%), Tod durch Krebserkrankung (LR 31,2%, RR 30,6%) und Tod aufgrund urologischer Erkrankungen (LR 1,9%, RR 2,7%).

Einflüsse des Alters auf das Einsetzen und Fortschreiten der BPH wurden durch Bildung von drei definierten Altersgruppen untersucht. Bei der Altersgruppe I (18-24 Monate) handelte es sich i.d.R. um Rüden, die vor dem ersten Zuchteinsatz standen. Die Altersobergrenze wurde auf 72 Monate (sechs Jahre) beschränkt, um Informationen über die frühe Inzidenz und Entwicklung der BPH bei beiden Rassen zu erhalten.

Im Hinblick auf die unter 4.2 dargelegten Untersuchungen (Manuskript II) richtete sich die Auswahl der beiden Rassen ebenfalls nach bekannten Zusammenhängen zwischen den untersuchten Parametern und dem Körpergewicht. So sind bei Hunden

größerer Rassen signifikant höhere IGF-1 Plasmakonzentrationen zu erwarten als bei mittelgroßen und kleinen Rassen (EIGENMANN et al. 1988; GREER et al. 2011; JAILLARDON et al. 2011).

Eine essenzielle Voraussetzung für die Einbeziehung der einzelnen Rüden in die Studie war eine bestehende Euthyreose, die im Rahmen der Eingangsuntersuchung festgestellt wurde. Bei intakten und kastrierten Beagle-Rüden (KOCH et al. 2006; GÜNZEL-APEL et al. 2009) sowie bei Hunden unterschiedlicher Rassen (URHAUSEN et al. 2009) wurde eine unmittelbare Interaktion von Thyreotropin-Releasing-Hormone (TRH) und Prolaktin (PRL) nachgewiesen. Entsprechend kann im Falle einer Hypothyreose ein Einfluss einer gesteigerten TRH-Sekretion auf die hypophysäre PRL-Sekretion nicht ausgeschlossen werden. Zudem wird ein primärer Hypothyreoidismus als mögliche Ursache für signifikant steigende IGF-1 Konzentrationen beschrieben (JAILLARDON et al. 2011).

5.2 Relevanz der CPSE-Konzentration für die Charakterisierung des Prostatastatus

Neben den klinisch-sonographischen und spermatologischen Kriterien wurde die CPSE-Konzentration im peripheren Blutplasma zur Charakterisierung des Prostatastatus einbezogen. Dabei wurde der von PINHEIRO et al. (2017) mit dem auch in der vorliegenden Studie verwendeten Assay festgelegte Grenzwert von 60 ng/ml zugrunde gelegt. CPSE-Werte ≤ 60 ng/ml wurden als „normal“ (CPSEn), Werte von ≥ 61 ng/ml als „erhöht“ (englisch „increased“, CPSEi) definiert. Da die Androgen-Abhängigkeit von Synthese und Sekretion der CPSE erwiesen ist (FRENETTE et al. 1983; FRENETTE et al. 1985; ISAACS u. SHARPER 1985; JUNIEWICZ et al. 1990), stellt die CPSE-Konzentration im peripheren Blutplasma einen Indikator für den Nachweis einer noch „asymptomatischen“ BPH in Bezug auf das Fehlen von Blutträufeln und Kotabsatzbeschwerden dar (LÉVY et al. 2009, 2014). Allerdings kann die Aussage von PINHEIRO et al. (2017), mit dem CPSE-Test könne zwischen Hunden mit und ohne BPH unterschieden werden, anhand der eigenen Ergebnisse nicht bestätigt werden. Hier stellte sich eine erhöhte CPSE-Konzentration als zusätzlich bestätigendes Kriterium bei Rüden mit sonographischen Befunden einer

BPH und/oder Hämospermie dar (Manuskript I, Table 1) und wurde als solches für die Klassifizierung des Prostatastatus verwendet. Diese Vorgehensweise wird durch die Korrelationen der CPSE-Konzentration mit dem Alter und dem Prostatavolumen sowie durch die für die gesamte RR-Gruppe nachgewiesene Korrelation des Prostatavolumens mit CPSE ($p<0,05$) und Testosteron ($p<0,01$) gerechtfertigt. Die Zusammenhänge zwischen testikulärer Steroidsynthese, intraprostatischem Androgenmetabolismus und BPH sowie CPSE wird bei im Manuskript I ausführlich beschrieben und diskutiert.

5.3 Befunde in Bezug auf eine Rassedisposition für die BPH beim Rhodesian Ridgeback (Manuskript I).

5.3.1 Klinisch-sonographische Befunde, Prostatavolumen und CPSE

Im Vergleich zu den LR-Rüden war der Prozentsatz an RR-Rüden mit sonographischen Symptomen einer BPH deutlich höher (LR: 3/18 – 16,7%; RR: 11/20 – 55%). Dabei waren bei den LR-Rüden ausschließlich Tiere aus der ältesten Gruppe (49-72 Monate), bei den RR-Rüden Tiere aus allen Altersgruppen betroffen. Darüber hinaus war das Prostatagewebe bei sechs RR aus der Altersgruppe III (49-72 Monate) und nur bei zwei LR-Rüden kleinzystisch verändert. Diese Befunde, zusammen mit der deutlich höheren Inzidenz einer Hämospermie bei den RR (90%) im Vergleich zu den LR (22,2%), deuten auf eine beim RR bestehende Rassedisposition für die Entwicklung einer BPH hin. Diese findet zudem in der Anzahl der bis zu 4 Jahre alten RR-Rüden mit BPH-spezifischen Symptomen Ausdruck (RR: 83,3 %; LR: 15,4 %) und deutet auf eine rassebedingte Tendenz zur früheren Entwicklung einer BPH hin.

Über die klinisch-sonographischen Befunde hinaus unterstreichen die signifikanten Unterschiede des durchschnittlichen Prostatavolumens bei den Rüden mit normaler CPSE Konzentration (LR: 26,1 ccm; RR: 52,9 ccm) die Rassedisposition (Manuskript I, Figure 1). Dabei dürfte der deutliche Unterschied in der Variationsbreite des Prostatavolumens (LR: 11,1-50,7 ccm; RR: 20,2-130,2 ccm) in ursächlichem Zusammenhang mit dem Nachweis sonographischer Anzeichen einer BPH bei 40% der RR Rüden mit normaler CPSE Konzentration stehen. Unterstützt wird die

Rassedisposition durch die signifikante Korrelation des Prostatavolumens mit der Rasse (Manuskript I, Table 4).

Wie von RUEL et al. (1998) erwartet und beschrieben, wurde - mit Ausnahme der CPSEi RR Gruppe - in allen Gruppen eine Korrelation zwischen Prostatavolumen und Alter gefunden (Manuskript I, Table 4). Bei den LR-Rüden dürfte die signifikante Zunahme des Prostatavolumens von Altersgruppe I zu Altersgruppe II (Manuskript I, Figure 2) die von BERRY et al. (1986 a, b) und LOWSETH et al. (1990) beschriebene, im Alter von 2,5 Jahren einsetzende Drüsenzellhyperplasie wiederspiegeln, während die weitere Vergrößerung der Drüse bei den 49-72 Monate alten LR-Rüden der zunehmenden Tendenz zur zystischen Hyperplasie zuzuschreiben wäre.

Bei den 49-72 Monate alten RR mit normaler CPSE-Konzentration war die Zunahme des Prostatavolumens 3,2-mal so hoch wie bei den jüngsten CPSEn RR und 5,7-mal so hoch wie bei den jüngsten LR und damit identisch mit dem Prostatavolumen der CPSEi RR in der Altersgruppe III (Manuskript I, Figure 2). Dieser Größenzuwachs liegt innerhalb der Spanne von 2- bis 6,5-fach, welche für die Zunahme des Prostatavolumens bei Hunden mit BPH im Vergleich zu Hunden mit einer normalen Prostata angegeben wird (JOHNSTON et al. 2000). Daraus wird bei den RR-Rüden ein primär BPH-bedingtes Prostatawachstum offensichtlich. Diese Einschätzung wird durch die fehlende Korrelation des Prostatavolumens mit dem Alter in der CPSEi RR Gruppe unterstützt.

Die Korrelationen des CPSE-Status und der CPSE-Konzentration im Plasma mit der Rasse, die für die gesamte Gruppe der 38 Hunde festgestellt wurden (Manuskript I, Table 4), werden als zusätzlicher Hinweis auf eine erhöhte Inzidenz der BPH bei Rüden der Rasse Rhodesian Ridgeback bewertet.

5.3.2 Hormonkonzentrationen

Die Sexualsteroidkonzentrationen der LR- und RR-Rüden mit CPSEn sowie der RR-Rüden mit CPSEi (Manuskript I, Table 20) wiesen keine Unterschiede auf, was die Ergebnisse von WOLF et al. (2012) bestätigt. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass in beiden Studien von jedem Hund jeweils lediglich ein Einzelwert pro Hormon

bestimmt wurde, womit die endokrine Hodenfunktion nur grob dargestellt werden kann. So ist bekannt, dass die Testosteronsynthese und -sekretion der Kontrolle der übergeordneten Zentren unterliegt und ein pulsatiles Sekretionsmuster mit z. T. erheblichen Schwankungen der Werte aufweist (DE PALATIS et al. 1978; DE COSTER et al. 1979; GÜNZEL-APEL et al. 1990). Dennoch kann die für die gesamte RR-Gruppe nachgewiesene positive Korrelation zwischen Prostatavolumen und Testosteron (Manuskript I, Table 4) auf einen kausalen Zusammenhang mit der rassebedingten Inzidenz der BPH hinweisen. Diese Einschätzung wird durch die signifikant höhere mittlere Testosteronkonzentration der RR-Rüden in Altersgruppe III im Vergleich zur Altersgruppe I gestützt und durch die entsprechende Entwicklung der 5α-DHT–Konzentrationen (Manuskript I, Table 3) und die Korrelation zwischen 5α-DHT und dem Alter in der RR CPSEi-Gruppe (Manuskript I, Table 4) untermauert. So wurden im Prostatagewebe von Hunden mit einer BPH erhöhte 5α-DHT-Konzentrationen festgestellt, welche auf eine Zunahme der intraprostatischen Reduktion von Testosteron zu 5α-DHT aufgrund einer Steigerung der 5α-Reduktase-Aktivität zurückzuführen ist (ISAACS u. COFFEY 1981; EWING et al. 1983, 1984). Darüber hinaus bestätigt der signifikante Unterschied im E_2/T-Verhältnis zwischen den LR (1,3±0,5) und den RR mit CPSE-Konzentrationen von 61 ng/ml (1,6±0,4) (Manuskript I, Table 2) die Ergebnisse von WOLF et al. (2012), die bei Hunden mit einer BPH ebenfalls eine Verschiebung zugunsten von E_2 feststellten. Estrogene fördern die Entwicklung einer BPH durch Vermehrung der intraprostatischen Androgenrezeptoren (TRACHTENBERG et al. 1980; ISAACS u. COFFEY 1981). Die für die RR CPSEi-Gruppe nachgewiesene positive Korrelation von Estradiol mit dem Alter (Manuskript I, Table 4) stellt ein weiteres Indiz für die rassespezifisch frühere Entwicklung und höhere Inzidenz BPH beim Rhodesian Ridgeback dar.

5.4 Prolaktin, IGF-1 und 25-OHD3 in Bezug auf die Pathogenese der caninen BPH (Manuskript II)

5.4.1 Prolaktin (PRL)

Auch die mittlere PRL-Konzentration resultiert in der vorliegenden Studie aus einer Messung pro Hund. Bezüglich tageszeitlicher Schwankungen der PRL-Sekretion sind in der Literatur widersprüchliche Aussagen zu finden. Während CORRADA et al. (2003) bei einzelnen Hunden spontan deutlichere Anstiege sowie einen jahreszeitlichen Rhythmus der PRL-Sekretion feststellten, beobachteten KOCH et al. (2006) bei Beagle-Rüden über sechs Stunden eine nur geringfügig oszillierende Grundlinie ohne signifikante Schwankungen. Da in keiner der beiden Studien der Prostatastatus der Hunde berücksichtigt wurde, kann ein diesbezüglicher Einfluss auf die Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden.

In den von CORRADA et al. (2006) und URHAUSEN et al. (2009) publizierten Daten über PRL-Konzentrationen im Serum von Rüden unterschiedlicher Rassen ist der Rhodesian Ridgeback nicht vertreten.

Von WOLF et al. (2012) wurden signifikant höhere PRL-Konzentrationen bei Rüden dieser Rasse im Vergleich zu Rüden verschiedener anderer Rassen mit ähnlichem Körpergewicht ermittelt. In der vorliegenden Studie zeichnete sich dies beim Vergleich der gesamten Gruppe der RR-Hunde mit der LR-Gruppe nur tendenziell ab, wurde jedoch anhand signifikant höherer PRL-Konzentrationen der RR-Rüden mit normaler CPSE-Konzentration im Vergleich mit den LR-Rüden deutlich (Manuskript II, Figure 1). Die Rassespezifität wird durch die positive Korrelation von PRL und Rasse unterstrichen.

Die Aussagekraft, der für die drei Altersgruppen erzielten Ergebnisse muss aufgrund der geringen Anzahl von Tieren pro Gruppe als eingeschränkt beurteilt werden. Dennoch kann die deutlich höhere mittlere PRL-Konzentration, die bei den 18-24 Monate alten CPSEn RR-Rüden im Vergleich zu den entsprechend alten LR-Rüden (Manuskript II, Figure 2) gefunden wurde, auf eine frühe androgen-unabhängige Induktion der BPH bei der Rasse RR hinweisen. Aus experimentellen Modellen ist

bekannt, dass PRL einen androgen-unabhängigen hypertrophen Effekt auf die Prostata ausübt (NEVALAINEN et al. 1997 b; REITER et al. 1999; SYMS et al. 2006). Die Expression von PRL und seinem Rezeptor wurde in Epithelzellen der Ratte und der menschlichen Prostata verifiziert (OUHTIT et al. 1993; NEVALAINEN et al. 1997 b; HAIR et al. 2002). So hat sich gezeigt, dass PRL als direkter Wachstums- und Differenzierungsfaktor auf die Prostata wirkt (NEVALAINEN et al. 1997 b; SYMS et al. 2006). Prolaktin und seine Bindungsstellen wurden auch in fibromuskulären und epithelialen Zellen sowie in fokalen hyperplastischen Drüsenzellen der caninen Prostata identifiziert (EL ETREBY u. MAHROUS 1979). Die stimulierende Wirkung von PRL auf das Prostatawachstum und die Entwicklung der BPH bei Rüden ist somit offensichtlich. In Übereinstimmung mit KUKK (2011) wurde jedoch keine Korrelation zwischen PRL auf der einen Seite und BPH oder damit verbundenen Parametern auf der anderen Seite gefunden.

Zudem wird im Hinblick auf die initiale Entwicklung der BPH ein indirekter Einfluss von PRL vermutet, indem es die Testosteronaufnahme in die Prostata und den intraprostatischen Testosteronmetabolismus fördert (FARNSWORTH et al. 1981). Dies wird durch experimentelle Studien an Nagetieren unterstützt. Bei der Ratte wurde z. B. sowohl in vitro als auch in vivo gezeigt, dass PRL synergistisch mit Testosteron wirkt und auf diese Weise die 5α-Reduktase-Aktivität erhöht und somit Wachstum, Differenzierung und hyperplastische Veränderungen der Prostata induziert (TANGBANLUEKAL u. ROBINETTE 1993; NEVALAINEN et al. 1996; LANE et al. 1997; REITER et al. 1999). Letzteres wird durch das 100%ige Vorhandensein klinischer Anzeichen einer BPH (sonographische Veränderungen und Hämospermie) bei den CPSEi RR repräsentiert (Manuskript I, Table 1).

Der signifikante Unterschied in den peripheren PRL-Konzentrationen zwischen CPSEn RR und LR in der Altersgruppe III kann teilweise auf die einheitlich niedrigen PRL-Werte bei den LR-Rüden zurückzuführen sein (Manuskript II, Figure 2). Wie in der Altersgruppe I kann jedoch ein kausaler Zusammenhang mit einer rassespezifischen Entwicklung der BPH nicht ausgeschlossen werden. Eine Korrelation zwischen PRL und dem Alter wurde weder in der Gesamtgruppe der Hunde

noch in den Untergruppen hinsichtlich Rasse und CPSE-Status gefunden, was die Ergebnisse von CORRADA et al. (2006) bestätigt.

In der Studie von WOLF (2012) wird ein tendenzielles Absinken der PRL Konzentration mit fortschreitendem Alter und bei Vorliegen einer BPH beschrieben. Dieser Zusammenhang zeigt sich auch in der vorliegenden Studie anhand der annähernd signifikant geringeren PRL-Konzentration der RR CPSEi im Vergleich zu den RR CPSEn ($p=0,056$) (Manuskript II, Figure 1). Die im Manuskript I beschriebene positive Korrelation zwischen dem Prostatavolumen auf der einen Seite und CPSE ($p<0,05$) und Testosteron ($p<0,01$) auf der anderen Seite weist auf die bekannte Androgenabhängigkeit der BPH hin. Da die erhöhte CPSE-Konzentration als Indikator für eine erhöhte Androgenaktivität anzusehen ist (FRENETTE et al. 1983; FRENETTE et al. 1985; ISAACS u. SHARPER 1985; JUNIEWICZ et al. 1990), liegt die Vermutung nahe, dass letztere einen Anstieg der Anzahl prostatischer PRL-Rezeptoren verursacht haben könnte.

5.4.2 Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1)

Die in der vorliegenden Arbeit bei LR- und RR-Rüden gemessenen Serumkonzentrationen von IGF-1 liegen auf ähnlichem Niveau wie in Publikationen, die sich mit verschiedenen Gesundheitsaspekten bei Hunden befassten und unterschiedliche Labortests verwendeten (TVARIJONAVICIUTE et al. 2011; MCQUOWN et al. 2018). Nahezu identische Mittelwerte von 315,2 ng/ml und 315,9 ±100,2 ng/ml (entsprechend 41,3 ±13,1 nmol/L) wurden in einem Serumpool von gesunden intakten Beagle Hunden bzw. in einer Gruppe von gesunden Hunden verschiedener Rassen beider Geschlechter analysiert (MCQUOWN et al. 2018).

Bei Männern mit BPH wurden im Vergleich zu gesunden Kontrollen niedrigere IGF-1-Serumspiegel gefunden (SAFARINEJAD et al. 2011). Dies kommt in der vorliegenden Studie möglicherweise in den tendenziell niedrigeren mittleren IGF-1-Konzentrationen der RR mit CPSEi im Vergleich zu den RR- und LR-Rüden mit normaler CPSE-Konzentration zum Ausdruck. Die für die gesamte Gruppe der RR ($n=20$) ermittelte annähernd signifikante Korrelation von IGF-1 mit PRL ($r=0,43$, $p=0,06$) kann einen

ergänzenden Effekt beider Parameter auf die Entwicklung einer BPH bei dieser Rasse widerspiegeln.

So kann die hohe IGF-1-Konzentration der jüngsten CPSEn RR–Rüden dahingehend gedeutet werden, dass IGF-1 bei dieser Rasse gemeinsam mit PRL ursächlich an der frühen Entwicklung der BPH beteiligt sein könnte. Allerdings wird sowohl bei intakten Rüden als auch bei intakten Hündinnen ein physiologisches Absinken der IGF-1-Konzentration mit fortschreitendem Alter innerhalb einer Lebensspanne von mehreren Monaten bis >16 Jahren beschrieben (GREER et al. 2011). Wie beim Menschen (KAKLAMANI et al. 1999; HOLMES et al. 2002; JOHANSSON et al. 2004; MORIMOTO et al. 2005) drückt sich ein altersabhängiger Rückgang der IGF-1-Konzentrationen in der vorliegenden Studie durch die negative Korrelation von IGF-1 mit dem Alter aus (Manuskript II, Table 4). Diese wurde für die gesamte Gruppe von Hunden (CPSEn und CPSEi, n=38; r=-0,37, p<0,05), für die gesamte Gruppe der CPSEn-Hunde (n=28; r=-0,47, p<0,05) und für die RR-CPSEn (n=10; r=-0,37, p<0,05), jedoch nicht für die RR-CPSEi festgestellt. Hieraus lässt sich ableiten, dass sich die BPH mit fortschreitendem Alter weitgehend unabhängig von IGF-1 weiterentwickelt. Auf einen abnehmenden Einfluss von IGF-1 weisen auch die negativen Korrelationen zwischen IGF-1 auf der einen Seite und dem Prostatavolumen und der CPSE-Konzentration auf der anderen Seite hin (Manuskript II, Table 4). Diese Annahme wird durch die fehlende Korrelation von IGF-1 mit dem Alter in der Gruppe der RR mit erhöhter CPSE-Konzentration gestützt (Manuskript II, Table 4).

Die Synthese und Sekretion von IGF-1 findet in der Leber, den Muskelzellen, der Hypophyse und in verschiedenen anderen Geweben mit autokrinen und parakrinen wachstumshormonabhängigen Effekten statt (JAFFE et al. 2001; FROST u. LANG 2003). Kausale Zusammenhänge zwischen IGF-1 und dem Prostatastatus wurden hauptsächlich am Menschen untersucht. Es ist bekannt, dass IGF-1 als stark mitogener und anti-apoptotischer Faktor an der Entstehung der benignen Prostatahyperplasie beteiligt ist. Seine Bioaktivität innerhalb von Geweben hängt von den peripheren IGF-1-Konzentrationen und von der lokalen IGF-1-Produktion sowie vom Vorhandensein IGF-bindender Proteine (IGFBPs) ab (STATTIN et al. 2001). Prostatazellen können IGF, IGFBPs und IGF-Rezeptoren (IGFR) exprimieren

(CHOKKALINGAM et al. 2002). Von den IGFBPs kommt IGFBP-3 im Prostatagewebe am häufigsten vor. Hier bindet es 75-90% des zirkulierenden IGF-1 (LEE et al. 2014). IGFBP-3 ist ein stark anti-proliferativ wirkendes Protein. Es induziert Apoptose und hemmt auf diese Weise bei Männern mit einem Prostatakarzinom die Zellproliferation. So wurde gezeigt, dass Androgene die Expression des Typ-I-IGF-Rezeptors fördern (VENDOLA et al. 1999). Diese Interaktionen müssen auch beim Hund in Betracht gezogen werden und bedürfen der Aufklärung.

Studien über ursächliche Zusammenhänge der peripheren IGF-1-Konzentration und der BPH des Hundes sind im Schrifttum bisher nicht zu finden.

5.4.3 Vitamin D

5.4.3.1 25-OHD_3 im Blutserum

Im Rassevergleich der CPSEn-Rüden (RR n= 10; LR n= 18) war kein Unterschied in der Serumkonzentration von 25-OHD_3 feststellbar (Manuskript II, Figure 5). Da der Vitamin D Status beim Hund in erster Linie von der Fütterung abhängig ist (HOW et al. 1994; HAZEWINKEL u. TRYFONIDOU 2002), ist besonderes Augenmerk auf die Zusammensetzung der verabreichten Futterrationen zu legen. In der Mehrzahl der kommerziellen Hundefutter wird die minimale Tagesdosis an Vitamin D überschritten. Diese liegt nach Maßgabe der National Research Council and Association of American Feed Control Officials bei 500-5000 IU Vitamin D/kg Futter/Tag (HAZEWINKEL u. TRYFONIDOU 2002). In der vorliegenden Studie waren anhand der Serumkonzentrationen von 25-OHD_3 keine signifikanten Unterschiede in der Vitamin D Versorgung in Anhängigkeit von der Art der Ernährung ersichtlich. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung von KUKK (2011). Bei 292 Hunden, die mit kommerziellem Futter von 40 verschiedenen Herstellern ernährt wurden, fanden SHARP et al. (2015) eine mediane 25-OHD_3-Konzentration von 67,9 ng/ml (47,4-100,1 ng/ml). Dabei bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Futtermitteln der einzelnen Hersteller. In der vorliegenden Studie lagen die Werte bei der Mehrzahl der Hunde, die mit kommerziellem Futter allein oder plus „BARF“ gefüttert wurden (alle LR, die RR CPSEn der Altersgruppen I und III, die RR CPSEi der Altersgruppen I und II) und bei den Hunden, die ausschließlich mit „BARF“ ernährt wurden, auf ähnlichem

Niveau (Manuskript II, Table 3). Werte über 100 ng/ml wurden jeweils bei sechs LR und RR ohne klare Relation zur Futterration gefunden (Manuskript II, Table 3). Demgegenüber ermittelten SHARP et al. (2015) bei ausschließlich mit „BARF“ gefütterten Hunden die geringsten 25-OHD_3 Konzentrationen mit einem Minimum von 9,5 ng/ml. Ähnlich niedrige Werte traten in der vorliegenden Studie nur bei vier Hunden der Rasse RR auf. Diese wurden jedoch mit kommerziellem Futter allein (zwei RR-CPSEn: 16,5 ng/ml Altersgruppe I, 15,6 ng/ml Altersgruppe III; ein RR-CPSEi: 17,0 ng/ml, Altersgruppe III) oder in Kombination mit „BARF“ (ein RR-CPSEi: 15,7 ng/ml, Altersgruppe III) ernährt (Manuskript II, Table 3).

Aus den tendenziell niedrigeren 25-OHD_3 Konzentrationen bei den RR-CPSEi (Manuskript II, Figure 5) ergibt sich zwar ein Verdacht auf einen kausalen Zusammenhang mit der BPH, wie er beim Mann bekannt ist (EL SHAZLY et al. 2017), doch konnte dieser in der vorliegenden Studie nicht eindeutig dargestellt werden. Dies kann unter anderem an der relativ geringen Tierzahl pro RR-Gruppe liegen. In der Humanmedizin hat Vitamin D aufgrund seiner auch im Prostatagewebe nachgewiesenen anti-proliferativen Wirkung und als Mediator für die Zelldifferenzierung und Apoptose zunehmendes Interesse gewonnen (HAUSSLER et al. 1998; NAGPAL et al. 2005). In dieser Hinsicht wurde auch der Vitamin D Rezeptor (VDR) im Prostatagewebe bei Mensch und Ratte isoliert (JOHNSON et al. 1996; HOLICK 2008; BLOMBERG JENSEN et al. 2011). Auch in kultivierten Stromazellen aus menschlichem hyperplastischem Prostatagewebe konnte eine VDR Expression identifiziert werden (PEEHL et al. 1994; CRESCIOLI et al. 2003; CRESCIOLI et al. 2005). Zusätzlich deutet der Nachweis von 1,25$(OH)_2D_3$ (aktive Form) und des für die Umwandlung zuständigen Enzyms D-1α-Hydroxylase in gesundem, kanzerösem und hyperplastischem humanen Prostatagewebe darauf hin, dass Prostatazellen in der Lage sind, die intrazellulär aktive Form selber zu synthetisieren (SCHWARTZ et al. 1998; HOLICK 2008).

Therapeutisch führte die Einnahme von Vitamin D Analoga zu einer signifikanten Verkleinerung der Prostata von BPH Patienten (CRESCIOLI et al. 2004; COLLI et al. 2006; ADORINI et al. 2010).

Auch beim Hund konnten in der Prostata in vivo und in vitro VDR nachgewiesen werden (KUNAKORNSAWAT et al. 2004; ADORINI et al. 2007; TANIGUCHI et al. 2010). Außerdem wurde das Zellwachstum durch $1,25(OH)_2D_3$ inhibiert (KUNAKORNSAWAT et al. 2004). Der anti-proliferative Effekt von VDR Agonisten konnte bei Beagle-Rüden mit spontaner BPH im Prostatagewebe nachgewiesen werden (ADORINI et al. 2007; TANIGUCHI et al. 2010).

In der vorliegenden Studie wurde in der CPSEi RR-Gruppe eine allmähliche Abnahme der 25-OHD_3 Konzentrationen mit steigendem Alter beobachtet (Manuskript II, Figure 6). Dieser Befund, gemeinsam mit der für diese Gruppe und die gesamte Gruppe aus LR und RR errechneten negativen Korrelation der Serum-25-OHD_3-Konzentration mit dem Alter (Manuskript II, Table 4) kann auf einen altersabhängigen Wechsel im Vitamin D Metabolismus hindeuten, in dessen Folge es zu einer Reduktion des inhibitorischen Effektes von 25-OHD_3 auf die BPH Entwicklung kommen würde. Diese Annahme wird durch die im Manuskript I (Figure 2) beschriebenen signifikanten rassespezifischen Befunde des Prostatavolumens und der altersabhängigen Größenzunahme beim RR im Vergleich zum LR gestützt. Damit übereinstimmend fanden PARK et al. (2018) bei Männern mit gesunder Prostata und bei Patienten mit einer BPH eine negative Korrelation zwischen der 25-OHD_3-Konzentration und dem Prostatavolumen. Mögliche Ursachen könnten eine Abnahme der endogenen 25-OHD_3-Synthese und/oder der intestinalen Resorption aufgrund reduzierter VDR Expression sein (EBELING et al. 1992).

Kausale Zusammenhänge zwischen IGF-1 und 25-OHD_3 müssen ebenfalls berücksichtigt werden. IGF-1 aktiviert die renale 25-OHD_3-1-Hydroxylase, was zu einer Steigerung der Vitamin D-Synthese führt (NESBITT u. DREZNER 1993). So wird bei Männern eine positive Korrelation zwischen IGF-1 und Vitamin D beschrieben (FOROUHI et al. 2008; HYPPÖNEN et al. 2008). In Bezug auf die BPH beeinflusst IGF-1 neben anderen Wachstumsfaktoren die Wirkungsmechanismen von Vitamin D an Prostatazellen (CRESCIOLI et al. 2003). Da es sich bei der BPH um eine androgen-abhängige Erkrankung handelt, wird angenommen, dass Vitamin D einen „Rezeptor-Downstream“ des Androgenrezeptors verursacht und die Produktion einiger

Wachstumsfaktoren und pro-inflammatorischer Zytokine hemmt (NAGPAL et al. 2005; ADORINI et al. 2010).

5.4.3.2 25-OHD_3 im Prostatasekret

Im Prostatasekret waren messbare 25-OHD_3 Konzentrationen ausschließlich bei Rüden der Rasse Rhodesian Ridgeback zu finden (RR-CPSEn n=4, RR-CPSEi n=7) (Manuskript II, Figure7). Ein kausaler Zusammenhang könnte in der bei allen 11 Rüden vorliegenden Blutbeimengung im Prostatasekret bestehen. Dagegen war bei keinem der LR-Rüden 25-OHD_3 im Prostatasekret nachweisbar. Dies betrifft auch die beiden LR der Altersgruppe III, bei welchen eine Hämospermie in Kombination mit sonographischen Befunden einer BPH vorlag. Somit kann auch dieser Befund im Zusammenhang mit der von WERHAHN BEINING et al. (2020) nachgewiesenen Prädisposition der Rhodesian Ridgebacks hinsichtlich der Entwicklung einer BPH gesehen werden. Möglicherweise resultiert die positive Korrelation zwischen dem Prostatavolumen und der 25-OHD_3-Konzentration im Prostatasekret (Manuskript II, Table 4) aus einer reduzierten Expression von VDR in der vergrößerten Prostata bei gleichzeitiger Exkretion von 25-OHD_3 ins Prostatasekret. Dieser Vermutung muss durch entsprechende Untersuchungen am Prostatagewebe nachgegangen werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Werhahn Beining, Franziska (2020)

Untersuchungen zur Pathogenese der caninen BPH unter Berücksichtigung rassespezifischer Besonderheiten beim Rhodesian Ridgeback

Die Benigne Prostatahyperplasie (BPH) ist eine altersabhängige, primär nicht entzündliche Vergrößerung der Prostata und die häufigste Erkrankung der Drüse bei intakten Rüden.

Aufgrund bereits in einer früheren Studie erhaltener Hinweise auf eine höhere Inzidenz der BPH bei Rüden der Rasse Rhodesian Ridgeback (RR) (WOLF et al. 2012), sollte diesem Verdacht in der vorliegenden Studie gezielt nachgegangen werden. Dafür wurden 18 Labrador Retriever/LR (Kontrollgruppe) und 20 Rhodesian Ridgebacks/RR („Versuchsgruppe“) den Altersgruppen 18-24 Monate (n=12), 25-48 Monate (n=13) und 49-72 Monate (n=13) zugeordnet. Der Prostatastatus wurde durch rektale Palpation, B-Bild-Sonographie, das Prostatavolumen und das Vorliegen einer Hämospermie ermittelt. Als zusätzliches Kriterium wurde die Blutplasmakonzentration der Caninen Prostata-spezifischen Argininesterase (CPSE) (normal ≤60 ng/ml, erhöht ≥61 ng/ml; PINHEIRO et al. 2017) zur Klassifikation herangezogen. Des Weiteren wurden die Konzentrationen von Testosteron, 5α-Dihydrotestosteron (5α-DHT) und Estradiol in Bezug auf rassespezifische Gegebenheiten des endokrinen Metabolismus analysiert.

Ferner wurden aufgrund von bei Mensch und Labornagern bekannten ursächlichen Zusammenhängen zwischen der BPH einerseits und Prolaktin (PRL), Insulin-like Growth Faktor-1 (IGF-1) und 25-Hydroxyvitamin D_3 (25-OHD_3) andererseits diese Parameter im Blutserum der Hunde analysiert. Die 25-OHD_3-Konzentration wurde darüber hinaus im Prostatasekret bestimmt.

Das Prostatavolumen der RR-Rüden war unabhängig vom CPSE-Status signifikant größer als bei den LR-Rüden. Bei den RR trat die BPH häufiger auf und setzte früher ein als bei den LR. Rassebezogene Spezifitäten im Steroidstoffwechsel der RR wurden durch Korrelationen von 5α-DHT und Estradiol mit dem Alter und von Testosteron mit dem Prostatavolumen angezeigt. Obwohl die Inzidenz sonographischer Anzeichen einer BPH und/oder einer Hämospermie nicht bei allen Hunden mit dem Vorliegen einer normalen oder erhöhten CPSE-Konzentration übereinstimmte, konnte ein rassespezifisch häufigeres Vorkommen der BPH bei Rüden der Rasse Rhodesian Ridgeback eindeutig verifiziert werden.

Bei den 18-24 Monate alten RR-Hunden mit normalem CPSE (CPSEn) deuteten hohe PRL-Konzentrationen auf eine frühe androgen-unabhängige Entwicklung der BPH hin. Dies wird durch eine Korrelation von PRL mit der Rasse unterstrichen. Die Konzentrationen von IGF-1 waren bei den CPSEn-Rüden beider Rassen auf ähnlichem Niveau, doch waren sie bei den jüngsten CPSEn-RR signifkant höher als bei den jüngsten RR mit erhöhtem CPSE (CPSEi). Darüber hinaus wurde in der CPSEn RR-Gruppe ein Absinken der IGF-1-Konzentrationen mit fortschreitendem Alter beobachtet. Negative Korrelationen von IGF-1 mit dem Alter und dem Prostatavolumen sowie mit der CPSE-Konzentration weisen auf einen abnehmenden Einfluss von IGF-1 im Rahmen der fortschreitenden Entwicklung der BPH hin. Die Serumkonzentrationen von 25-OHD_3 waren bei den CPSEi-RR im Vergleich zu den CPSEn-LR und -RR tendenziell niedriger. Die sich bei den CPSEi-RR abzeichnende allmähliche Abnahme der 25-OHD_3-Werte mit fortschreitendem Alter spricht, ebenso wie die negative Korrelation von 25-OHD_3 mit dem Alter in dieser Gruppe und in der gesamten Gruppe von Hunden, für altersabhängige Veränderungen im Vitamin-D-Stoffwechsel hin. Der alleinige Nachweis von 25-OHD_3 im Prostatasekret von Rüden der Rasse RR deutet zusätzlich auf rassespezifische Mechanismen des intraprostatischen Vitamin D-Stoffwechsels hin.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie eröffnen neue Aspekte der Forschung zur Pathogenese der BPH beim Hund. Die dargestellten Zusammenhänge zwischen BPH und 25-OHD_3 zeigen, gemeinsam mit den Erkenntnissen aus der Humanmedizin, die

Bedeutung der diätetischen Vitamin D Versorgung zur Prophylaxe der BPH auf. Darüber hinaus können sich aus den in der humanmedizinischen Literatur dargestellten Therapieverfahren zur Stimulation des intraprostatischen Vitamin D Stoffwechsels beachtenswerte Behandlungsmöglichkeiten für den Hund ergeben.

7 SUMMARY

Werhahn Beining, Franziska (2020)

Investigations on the pathogenesis of canine BPH considering breed-specific peculiarities of the Rhodesian Ridgeback

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is an age-dependent primarily non-inflammatory enlargement of the accessory gland and the most common disease of the gland in intact male dogs. Based on indications of a higher incidence of BPH in dogs of the Rhodesian Ridgeback (RR) breed, observed by Wolf et al. (2012), the suspicion was investigated in more detail in the present study. For this, 18 Labrador Retrievers/LR (control group) and 20 Rhodesian Ridgebacks/RR ("experimental group"), were assigned to the age groups 18-24 months (n=12), 25-48 months (n=13), and 49-72 months (n=13). The prostate gland status was determined by rectal palpation, B-mode ultrasound, the prostate gland volume and the presence of haemospermia. As additional criterion, the blood plasma concentrations of canine prostate-specific arginine esterase (CPSE) (normal ≤60 ng/ml, increased ≥61 ng/ml; PINHEIRO et al. 2017) was used for classifying BPH. Concentrations of testosterone, 5α-dihydrotestosterone (5α-DHT) and estradiol were analysed to detect breed-specific conditions regarding the endocrine metabolism.

Moreover, serum concentrations of prolactin (PRL), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and 25-hydroxyvitamin D_3 (25-OHD_3) were analysed to investigate their possible involvement in the pathogenesis of canine BPH, as has already been verified in men and rodents. The 25-OHD_3-concentration was additionally measured in the prostatic secretion.

Prostatic volume was significantly larger in RR than in LR, irrespective of the CPSE status. In RR-dogs, BPH occurred more frequently and started at an earlier age compared to the LR. Breed-related peculiarities in steroid metabolism in the RR were indicated by correlations of 5α-DHT and estradiol with age and of testosterone with prostate gland volume. Although the incidence of sonographic signs of BPH and/or haemospermia did not fit with normal and increased CPSE concentrations in all dogs, a breed-specific higher incidence of BPH in the RR breed could be clearly verified.

In the 18- to 24-month-old RR dogs with normal CPSE (CPSEn), high PRL concentrations indicated an androgen-independent involvement of PRL in early BPH development. It was underlined by a correlation of PRL with breed. Concentrations of IGF-1 were at similar levels in CPSEn dogs of both breeds but were significantly higher in the youngest CPSEn RR than in the youngest RR with increased CPSE. Moreover, a decrease of IGF-1 with age was observed in the CPSEn RR. Negative correlations of IGF-1 with age and prostatic volume as well as with CPSE indicated a decreasing influence of IGF-1 with progressing development of BPH. Concentrations of 25-OHD_3 were tendentially lower in the CPSEi RR compared with the CPSEn LR and RR. A gradual decrease in 25-OHD_3 values occurring with increasing age in the CPSEi RR, and a negative correlation of 25-OHD_3 with age found in this group and in the entire group of dogs pointed to age related changes in the vitamin D metabolism.

The results of the present study open up new aspects of research on the pathogenesis of BPH in dogs. The relationships between BPH and 25-OHD_3, together with the findings from human medicine, show the importance of dietary vitamin D supply for the prophylaxis of BPH. In addition, the therapeutic methods for stimulation of the intraprostatic vitamin D metabolism presented in human literature may result in remarkable treatment options for dogs.

8 VERZEICHNISSE

8.1 Literaturverzeichnis

ADAMS, V. J., K. M. EVANS, J. SAMPSON u. J. L. N. WOOD (2010):

Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK.

J. Small Anim. Pract. 51, 512–524

ADORINI, L., G. PENNA, S. AMUCHASTEGUI, C. COSSETTI, F. AQUILANO, R. MARIANI, B. FIBBI, A. MORELLI, M. USKOKOVIC, E. COLLI u. M. MAGGI (2007):

Inhibition of prostate growth and inflammation by the vitamin D receptor agonist BXL-628 (elocalcitol).

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 103, 689-693

ADORINI, L, G. PENNA, B. FIBBI u. M. MAGGI (2010):

Vitamin D receptor agonists target static, dynamic, and inflammatory components of benign prostatic hyperplasia.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 1193, 146–152

ALONGE, S, M. MELANDRI, R. LEOCI, G.M. LACALANDRA u. G. AIUDI (2018):

Canine prostate specific esterase (CPSE) as a useful biomarker in preventive screening programme of canine prostate: CPSE threshold value assessment and its correlation with ultrasonographic prostatic abnormalities in asymptomatic dogs.

Reprod. Dom. Anim. 53, 359–364

BACHELOT, A. u. N. BINART (2007):

Reproductive role of prolactin.

Reproduction 133, 361-369

BAMBERG-THALEN, B. L. u. C. LINDE-FORSBERG (1993):
Treatment of canine prostatic hyperplasia with medroxyprogesterone acetate.
J. Am. AHA 29, 221-226

BARSANTI, J. A. u. D. R. FINCO (1980):
Canine bacterial prostatitis.
Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract. 9, 679-700

BARSANTI, J.A. u. D.R. FINCO (1986):
Canine Prostatic Diseases.
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 16, 587-599

BELL, F.W., J. S. KLAUSNER, D. W. HAYDEN, E. M. LUND, B. B. LIEBENSTEIN, D. A. FEENEY, S.D. JOHNSTON, J. L. SHIVERS, C. M. EWING, W. B. ISAACS (1995):
Evaluation of serum and seminal plasma markers in the diagnosis of canine prostatic disorders.
J. Vet. Intern. Med. 9, 149-153

BERRY, S. J., D. S. COFFEY u. L. L. EWING (1986 a):
Effects of aging on prostate growth in Beagles.
Am. J. Physiol. 250, 1039-1046

BERRY, S. J., J. D. STRANDBERG, W. J. SAUNDERS u. D. S. COFFEY (1986 b):
Development of canine benign prostatic hyperplasia with age.
Prostate 9, 363-373

BLOMBERG JENSEN, M., P. J. BJERRUM, T. E. JESSEN, J. E. NIELSEN, U. N. JOENSEN, I. A. OLESEN, J. H. PETERSEN, A. JUUL, S. DISSING, N. JØRGENSEN (2011):

Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa.

Human Reprod. 26, 1307-1317

BLOMBERG JENSEN, M., J.E. NIELSEN, A. JØRGENSEN, E. RAJPERT-DE MEYTS, D. M. KRISTENSEN, N. JØRGENSEN, N. E. SKAKKEBAEK, A. JUUL u. H. LEFFERS (2010):

Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract.

Human Reprod. 25, 1303-1311

BRENDLER, C. B., S. J. BERRY, L. L. EWING, A. R. MCCULLOUGH, R.C. COCHRAN, J. D. STRANDBERG, B. R. ZIRKIN, D. S. COFFEY, L. G. WHEATON. M. L. HILER, M. J. BORDY, G. D. NISWENDER, W. W. SCOTT u. P. C. WALSH (1983):

Spontaneous benign prostatic hyperplasia in the beagle. Age-associated changes in serum hormone levels, and the morphology and secretory function of the canine prostate.

J. Clin. Invest. 71, 1114-1123

BRINCKMANN, H.G. (1989):

Untersuchungen der physiologischen LH- und Testosteronrhythmik bei Rüden verschiedener Altersgruppen.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

BRUCHOVSKY, N. u. J.D. WILSON (1968):

The conversion of testosterone to 5α-androstan-17ß-ol-3 one by rat prostate in vivo and in vitro.

J. Biol. Chem. 243, 2012-2121

CARTWRIGHT, J. A., A.G. GOW, E. MILNE, D. DRUMMOND, S. SMITH, I. HANDEL u. R.J. MELLANB (2018):

Vitamin D receptor expression in dogs.

J. Vet. Intern. Med. 32, 764–774

CHAPDELAINE, P., J. Y. DUBE, G. FRENETTE u. R. R. TREMBLAY (1984): Identification of arginine esterase as the major androgen-dependent protein secreted by dog prostate and preliminary molecular characterization in seminal plasma.

J. Androl. 5, 206-210

CHEVALIER, S, G. BLEAU, K. D. ROBERT u. A. CHAPDELAINE (1984):

Nonsteroidal serum factors involved in the regulation of the proliferation of canine prostatic epithelial cells in culture.

Prostate 5, 503-512

CHOKKALINGAM, A. P., Y. T. GAO, J. DENG, F. Z. STANCZYK, I. A. SESTERHENN, F. K. MOSTOFI, J. F. FRAUMENI u. A. W. HSING (2002):
Insulin-like growth factors and risk of benign prostatic hyperplasia.
Prostate 52, 98-105

CHUZEL, F., A. M. CLARK, O. AVALLET u. J. M. SAEZ (1996):

Transcriptional regulation of the lutropin/human choriogonadotropin receptor and three enzymes of steroidogenesis by growth factors in cultured pig Leydig cells.

Eur. J. Biochem. 239, 8-16

CICCARELLI, A, E. GUERRA, M. DE ROSA, F. MILONE, S. ZARRILLI, G. LOMBARDI u. A. COLAO (2005):

PRL secreting adenomas in male patients.

Pituitary 8, 39-42

COCULESCU, M. (1999):

Blood-brain barrier for human growth hormone and insulin-like growth factor-I.

J. Ped. Endocrinol. Metab. 12,113-124

COLLI, E., P. RIGATTI, F. MONTORSI, W. ARTIBANI, S. PETTA, N. MONDAINI, R. SCARPA, P. USAI, L. OLIVIERI u. M. MAGGI (2006):

BXL628, a novel vitamin D3 analog arrests prostate growth in patients with benign prostatic hyperplasia: a randomized clinical trial.

Eur. J. Urol. 49, 82-86

CORRADA, Y., G. CASTEX, Y. SOSA u. C. GOBELLO (2003):

Secretory patterns of prolactin in dogs: circannual and ultradian rhythms.

Reprod. Dom. Anim. 38, 219–223

CORRADA, Y., I. RIMOLDI, S. ARRESEIGOR, G. MARECCO u. C. GOBELLO (2006):

Prolactin reference range and pulsatility in male dogs.

Theriogenology 66,1599–1602

CRESCIOLI, C., P. FERRUZZI, A. CAPORALIR. MANCINA, A. COMERCI, M. MURATORI, M. SCALTRITI, G. B. VANNELLI, S. SMIROLDO, R. MARIANI, D. VILLARI, S. BETTUZZI, M. SERIO, L. ADORINI u. M. MAGGI (2003):

Inhibition of spontaneous and androgen-induced prostate growth by a non hypercalcemic calcitriol analog.

Endocrinology 144, 3046-3057

CRESCIOLI, C., P. FERRUZZI, A. CAPORALI, M. SCALTRITI, S. BETTUZZI, R. MANCINA, S. GELMINI, M. SERIO, D. VILLARI, G. B. VANNELLI, E. COLLI, L. ADORINI u. M. MAGGI (2004):

Inhibition of prostate cell growth by BXL-628, a calcitriol analogue selected for a phase II clinical trial in patients with benign prostate hyperplasia.

Eur. J. Endocrinol. 150, 591-603

CRESCIOLI, C., A. MORELLI, L. ADORINI, P. FERRUZZI, M. LUCONI, G. B. VANNELLI, M. MARINI, S. GELMINI, B. FIBBI, S. DONATI, D. VILLARI, G. FORTI, E. COLLI, K. E. ANDERSSON u. M. MAGGI (2005):

Human bladder as a novel target for vitamin D receptor ligands.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 90, 962–972

DE COSTER, R., J. F. BECKERS, P. WOUTERS-BALLMAN u. F. ECTORS (1979): Variation nycthemerales de la testosterone et de la lutropine plasmatique chez le chien.

Ann. Med. Vet. 123, 423-428

DE PALATIS, L., J. MOORE u. R. E. FALVO (1978):

Plasma concentrations of testosterone and LH in the male dog.

J. Reprod. Fertil. 52, 201-207

DE ROSA, M., S. ZARRILLI, G. VITALE, C. DI SOMMA, F. ORIO, L. TAUCHMANOVA, G. LOMBARDI u. A. COLAO (2004):

Six months of treatment with cabergoline restores sexual potency in hyperprolactinemic males: an open longitudinal study monitoring nocturnal penile tumescence.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 89, 621-625

DÖCKE, F. (1994):

Keimdrüsen.

In: F. DÖCKE (Hrsg.): Veterinärmedizinische Endokrinologie.

Verlag Enke, Stuttgart, 3. Aufl., S. 399-508

EBELING, P.R., M. E. SANDGREN, E. P. DIMAGNO, A. W. LANE, H. F. DELUCA u. B. L. RIGGS (1992):

Evidence of an age-related decrease in intestinal responsiveness to vitamin D: relationship between serum 1,25-dihydroxyvitamin D3 and intestinal vitamin D receptor concentrations in normal women.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 75, 176–182

EIGENMANN, J. E., A. AMADOR u. D. F. PATTERSON (1988):

Insulin-like growth factor I levels in proportionate dogs, chondrodystrophic dogs and in giant dogs.

Acta Endocrinol. (Copenhagen) 118, 105-108

EL ETREBY, M. F., E. FRIEDREICH,S. H. HASAN, A. T. MAHROUS, K. SCHWARZ, T. SENGE, U. TUNN u. F. NEUMANN (1979):

Role of the pituitary gland in experimental hormonal induction and prevention of benign prostatic hyperplasia in the dog.

Cell Tissue Res. 204, 367-378

EL ETREBY, M. F. u. A. T. MAHROUS (1979):

Immunocytochemical technique for detection of prolactin (PRL) and growth hormone (GH) in hyperplastic and neoplastic lesions of dog prostate and mammary gland.

Histochemistry 64, 279-286

EL SHAZLY, M. A., M. F. SULTAN, H. A. ABOUTALEB, S. M. SALEM, M. S. AZIZ, T. M. ABD ELBAKY, E. A. ELSHERIF, M. M. GAWISH, F. T. ALAJRAWI, F. A. A. ELGADI, A. H. THAHER, M. A. SHEBL, A. M. ALLAM u. E. KEHINDE (2017):
Vitamin D deficiency and lower urinary tract symptoms in males above 50 years of age.
Urol. Ann. 9, 170-173

ENGLAND, G.C.W. (1999):
Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation.
Theriogenology 52, 981-986

ESPINOSA, G., R. ESPOSITO, A. KAZZAZI u. DJAVAN (2013):
Vitamin D and benign prostatic hyperplasia -- a review.
Can. J. Urol. 20, 6820-6825

EWING, L. L., S. J. BERRY u. E.G. HIGGINBOTTOM (1983):
Dihydrotestosterone concentration of Beagle prostatic tissue: effect of age and hyperplasia.
Endocrinology 113, 2004-2009

EWING, L. L., D. L. THOMPSON, R. C. COCHRAN, B. L. LASLEY, M. A. THOMPSON u. B. R. ZIRKIN (1984):
Testicular androgen and estrogen secretion and benign prostatic hyperplasia in the Beagle.
Endocrinology 114, 1308–1314

FARNSWORTH, W.E., W. R. SLAUNWHITE, J. R. M. SHARMA, F. OSEKO, J. R. BROWN, M. J. GONDER u. R. CARTAGENA (1981):
Interaction of prolactin and testosterone in the human prostate.
Urol. Res. 9, 79-88

FELDMAN, E.C. u. R.W. NELSON (1996):

Canine male reproduction.

In: FELDMAN, E. C. u. R. W. NELSON (Hrsg.): Canine and feline endocrinology and reproduction.

Verlag Saunders, Philadelphia, 2. Aufl., S. 684-690

FOROUHI, N. G., J. LUAN, A. COOPER, B. J. BOUCHER u. N. J. WAREHAM (2008):

Baseline serum 25-hydroxy vitamin d is predictive of future glycemic status and insulin resistance: the Medical Research Council Ely Prospective Study 1990-2000.

Diabetes 57, 2619-2625

FRENETTE, G., J. Y. DUBÉ, D. LACOSTE u. R. R. TREMBLAY (1987) : Radioimmunoassay in blood plasma of arginine esterase: the major secretory product of dog prostate.

Prostate 10, 145-152

FRENETTE, G., J. Y. DUBÉ u. R.R. TREMBLAY (1983):

Effect of castration and steroid treatments on the activity of some hydrolytic enzymes in dog prostate.

Prostate 4, 383-390

FRENETTE, G., J. Y. DUBÉ, R. R. TREMBLAY (1985):

Enzymatic characterization of arginine esterase from dog seminal plasma.

Biochim. Biophys. Acta. 838, 270-276

FROST, R. A. u. C. H. LANG (2003):

Regulation of insulin-like growth factor-I in skeletal muscle and muscle cells.

Minerva Endocrinol. 28, 53-73

GELBER, S.J., M. P. HARDY, S. M. MENDIS-HANDAGAMA u. S. J. CASELLA (1992):
Effects of insulin-like growth factor-I on androgen production by highly purified pubertal and adult rat Leydig cells.
J. Androl. 13, 125-130

GELLER, J. (1989 a):
Overview of benign prostatic hypertrophy.
Urology 34, 57-63, 87-96

GELLER, J. (1989 b):
Pathogenesis and medical treatment of benign prostatic hyperplasia.
Prostate Suppl. 2, 95-104

GILLE, U. (2008): Akzessorische Geschlechtsdrüsen, Glandulae genitales accessoriae.
In: F. V. SALOMON, H. GEYER u. U. GILLE (Hrsg.): Anatomie für die Tiermedizin
Verlag Enke, Stuttgart, Bd. 2, S. 359- 397

GLOYNA, R. E., P. K. SIITERI u. J. D. WILSON (1970):
Dihydrotestosterone in prostatic hypertrophy.
J. Clin. Invest. 49, 1746-1753

GOBELLO, C., G. CASTEX G u. Y. CORRADA (2002):
Serum and seminal markers in the diagnosis of disorders of the genital tract of the dog: a mini-review.
Theriogenology 57, 1285-1291

GOBELLO, C. u. Y. CORRADA (2002):

Noninfectious prostatic diseases in dogs.

Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. 24, 99-107

GREER, K. A., L. M. HUGHES u. M. M. MASTERNAK (2011):

Connecting serum IGF-1, body size, and age in the domestic dog.

AGE 33, 475–483

GÜNZEL-APEL, A.R. (2016 a):

Andrologische Untersuchung – Samengewinnung. In: A. R. GÜNZEL-APEL u. H. BOSTEDT (Hrsg.): Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze.

Verlag Thieme/Schattauer, Stuttgart, S. 640-643

GÜNZEL-APEL, A.R. (2016 b):

Andrologische Untersuchung – Morphologische Untersuchung der Genitalorgane. In: A. R. GÜNZEL-APEL u. H. BOSTEDT (Hrsg.): Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze.

Verlag Thieme/Schattauer, Stuttgart, S. 643-645

GÜNZEL-APEL, A.R. (2016 c):

Andrologische Untersuchung – Samenuntersuchung und Ejakulatbeurteilung. In: A. R. GÜNZEL-APEL u. H. BOSTEDT (Hrsg.): Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze.

Verlag Thieme/Schattauer, Stuttgart, S. 645-651

GÜNZEL-APEL, A. R., H. G. BRINCKMANN u. H. O. HOPPEN (1990):

Dynamik der LH- und Testosteron-Sekretion bei Beagle-Rüden verschiedener Altersgruppen.

Reprod. Dom. Anim. 25, 78-86

GÜNZEL-APEL, A.R., P. HILLE u. H.O. HOPPEN (1994 a):

Spontaneous and GnRH-induced pulsatile LH and testosterone release in pubertal, adult and aging male beagle.

Theriogenology 41, 737-745

GÜNZEL-APEL, A-R., A. SEEFELDT, F. M. ESCHRICHT, C. URHAUSEN, S. KRAMER, R. MISCHKE, H. O. HOPPEN, M. BEYERBACH, M. KOIVISTO, u. S. J. DIELEMAN (2009):

Effects of gonadectomy on prolactin and LH secretion and the pituitary-thyroid axis in male dogs.

Theriogenology 71, 746-753

GÜNZEL-APEL, A.R., P. TERHAER u. D. WABERSKI (1994 b):

Hodendimensionen und Ejakulatbeschaffenheit fertiler Rüden unterschiedlicher Körpergewichte.

Kleintierpraxis 39, 483-486

HAIR, W.M., O. GUBBAY, H. N. JABBOUR u. G. A. LINCOLN (2002):

Prolactin receptor expression in human testis and accessory tissues: localization and function.

Mol. Human Reprod. 8, 606-611

HALL, P. F. (1994):

Testicular steroid synthesis: organisation and regulation.

In: E. KNOBIL u. J.D. NEILL (Hrsg.): The physiology of reproduction.

Verlag Raven Press, New York, 2. Aufl, S. 1335- 1362

HAUSSLER, M. R., G. K. WHITFIELD, C. A. HAUSSLER, J. C. HSIEH, P. D. THOMPSON, S. H. SELZNICK, C. E. DOMINGUEZ u. P. W. JURUTKA (1998):

The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed.

J. Bone Miner. Res. 13, 325-349

HAZEWINKEL, H.A. u. M. A. TRYFONIDOU (2002):

Vitamin D3 metabolism in dogs.

Mol. Cell Endocrinol. 197, 23-33

HOFFMANN, B., R. HÖVELER, S. H. HASAN u. K. FAILING (1992):

Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy.

J. Reprod. Fertil. 96, 837-845

HOLICK, M. F. (2008):

The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: mechanisms of action.

Molecular Aspects in Medicine 29, 361-368

HOLMES, M. D., M. N. POLLAK u. S. E. HANKINSON (2002):

Lifestyle correlates of plasma insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 3 concentrations.

Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 11, 862-867

HOLST, B. S., E. HOLMROOS, L. FRILING, S. HANÅS, L. M. LANGBORG, M. A. FRANKO u. K. HANSSON (2017):

The association between the serum concentration of canine prostate specific esterase (CPSE) and the size of the canine prostate.

Theriogenology 93, 33-39

HORNBUCKLE, W. E., D. M. MACCOY, G. S. ALLAN u. R. GUNTHER (1978): Prostatic disease in the dog.

Cornell Vet. 68, 284-305

HOW, K.L., H. A. HAZEWINKEL u. J. A. MOL (1994):

Dietary vitamin D dependence of cat and dog due to inadequate cutaneous synthesis of vitamin D.

Gen. Comp. Endocrinol. 96, 12-18

HULL, K.L. u. S. HARVEY (2000):

Growth hormone: roles in male reproduction.

Endocrine 13, 243-50

HYPPÖNEN, E., B. J. BOUCHER, J. D. BERRY u. C. POWER (2008):

25-hydroxyvitamin D, IGF-1, and metabolic syndrome at 45 years of age: a cross-sectional study in the 1958 British birth cohort.

Diabetes 57, 298-305

ISAACS, W. B. u. D. S. COFFEY (1981):

Changes in dihydrotestosterone metabolism associated with the development of canine benign prostatic hyperplasia.

Endocrinology 108, 445-453

ISAACS, W. B. u. D. S. COFFEY (1984):

The predominant protein of canine seminal plasma is an enzyme.

J. Biol. Chem. 259, 11520-11526

ISAACS, W. B. u. J. H. SHAPER (1985):

Immunological localization and quantitation of the androgen-dependent secretory protease of the canine prostate.

Endocrinology 117, 1512-1520

JAFFE, C. A., W. PAN, M. B. BROWN, R. DEMOTT-FRIBERG u. A. L. BARKAN (2001):

Regulation of GH secretion in acromegaly: reproducibility of daily GH profiles and attenuated negative feedback by IGF-I.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 86, 4364-4370

JAILLARDON, L., L. MARTIN, P. NGYUEN u. B. SILIART (2011):

Serum insulin-like growth factor type 1 concentrations in healthy dogs and dogs with spontaneous primary hypothyroidism.

Vet. J. 90, 95-99

JANTHUR M (2016):

Akzessorische Geschlechtsdrüsen – Untersuchung der Prostata. In: A. R. GÜNZEL-APEL u. H. BOSTEDT (Hrsg.): Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze.

Verlag Thieme/Schattauer, Stuttgart, S. 689-690

JOHANSSON, H., L. BAGLIETTO, A. GUERRIERI-GONZAGA, B. BONANNI, F. MARIETTE, D. MACIS, D. SERRANO, M. T. SANDRI u. A. DECENSI (2004): Factors associated with circulating levels of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein3 in 740 women at risk for breast cancer.

Breast Cancer Res. Treat. 88, 63-73

JOHNSON, J. A., J. P. GRANDE, P. C. ROCHE u. R. KUMAR (1996): Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in rat reproductive tissues.

Histochem. Cell Biol. 105, 7-15

JOHNSON, C. A (2010):
Benigne Prostatahyperplasie.
In: W. N. NELSON u. C. G. COUTO (Hrsg.): Innere Medizin der Kleintiere.
Elsevier Urban & Fischer, München, Bd. 2, S. 1012-1014

JOHNSTON, S. D., K. KAMOLPATANA, M. V. ROOT-KUSTRITZ u. G. R. JOHNSTON (2000):

Prostatic disorders in the dog.

Anim. Reprod. Sci. 60-61,405-415

JUNIEWICZ, P. E., T. A. BARBOLT, M. A. , G. FRENETTE, J. Y. u. R. R. TREMBLAY (1990):

Effects of androgen and antiandrogen treatment on canine prostatic arginine esterase.

Prostate 17, 101-111

KAKLAMANI, V.G., A. LINOS, E. KAKLAMANI, I. MARKAKI u. C. MANTZOROS (1999):

Age, sex, and smoking are predictors of circulating insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor-binding protein 3.

J. Clin. Oncol. 17, 813-817

KAWAKAMI, E., T. TSUTSUI u. A. OGASA (1991):

Histological observations of the reproductive organs of the male dog from birth to sexual maturity.

J. Vet. Med. Sci. 53, 241-248

KHOSRAVI, J., A. DIAMANDI, J. MISTRY u. A. SCORILAS (2001):

Insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 86, 694-699

KIVINEVA, M., M. BLÄUER, H. SYVÄLÄ, T. TAMMELA u. P. TUOHIMAA (1998): Localization of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor (VDR) expression in human prostate.

J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 66, 121-127

KLAUSNER, J. S., S. D. JOHNSTON u. F. W. BELL (1995):

Canine prostatic disorders.

In: J. D. BONAGURA u. R. W. KIRK (Hrsg.): Current Veterinary Therapy.

Verlag W.B. Saunders Co., Philadelphia. S. 1103-1110

KLAUWER, D. B.W., S. HANITSCH, W. RASCHER, P. D. LEE u. W. KIESS (1997): IGF-I, -II, free IGF-I and IGFBP -1, -2, -3 levels in venous cord blood: relationship to birth-weight, length and gestational age in healthy newborns.

Acta Paediatr. 86, 826-833

KOCH, A., H. O. HOPPEN, S. J. DIELEMAN, H. S. KOOISTRA u. A. R. GÜNZEL-APEL (2006):

Effects of the dopamine agonist cabergoline on the pulsatile and TRH-induced secretion of prolactin, LH, and testosterone in male beagle dogs.

Theriogenology 65, 1666-1677

KÖNIG, H. E. u. H.-G. LIEBICH (2008):

Männliche Geschlechtsorgane

In: KÖNIG, H.E. u. H.-G. LIEBICH (Hrsg.):

Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Verlag Schattauer, Stuttgart, S. 405-420

KRAUSE, D. (1965):

Zur Fertilitätsuntersuchung beim Hund.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 72, 3-10

KRAWIEC, D. R. u. HEFLIN D. (1992):

Repros of retrospective studies: Study of prostatic disease in dogs: 177 cases (1981-1986).

J. Am. Vet. Med. Assoc. 200, 1119-1122

KUKK, A. J. (2011):
Associations between canine male reproductive parameters and serum vitamin D and prolactin concentrations.
Postgraduate Thesis, The University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada

KUNAKORNSAWAT, S., T. J. ROSOL, C. C. CAPEN, J. L. OMDAHL, B. E. LEROY, u. N. INPANBUTR (2004):
Effects of 1,25(OH)2D3, 25OHD3, and EB1089 on cell growth and Vitamin D receptor mRNA and 1alpha-hydroxylase mRNA expression in primary cultures of the canine prostate.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 89-90, 409-412

LANE, K. E., I. LEAV, J. ZIAR, R. S. BRIDGES, W. M. RAND u. S. M. HO (1997): Suppression of testosterone and estradiol-17β-induced dysplasia in the dorsolateral prostate of Noble rats by bromocriptine.
Carcinogenesis 18, 1505–1510

LEE, H., S. R. KIM, Y. OH, S. H. CHO, R. P. SCHLEIMER u. Y. CH. LEE (2014): Targeting Insulin-Like Growth Factor-I and Insulin-Like Growth Factor–Binding Protein-3 signaling pathways a novel therapeutic approach for asthma.
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 50, 667-677

LE ROITH, D. (1996):
Insulin-like growth factor receptors and binding proteins.
Baillieres Clin. Endocrinol. Metab. 10, 49-73

LÉVY, X., P. MIMOUNI, A. FONTBONNE, G. DERRE, E. CLARET, S. AUDHUY u. J. MORLET (2009):

Performance evaluation of the new blood test Odelis® CPSE in the diagnosis of Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) in dogs.

In: Proc. 6th EVSSAR Annual Symposium, Wroclaw, Poland 2009, S. 46

LÉVY, X., W. NIŻAŃSKI, A. VON HEIMENDAHL u. P. MIMOUNI (2014):

Diagnosis of common prostatic conditions in dogs: an update.

Reprod. Dom. Anim. 49, 50–57

LLOYD, J. W., J. A. THOMAS u. M. G. MAWHINNEY (1975):

Androgens and estrogens in the plasma and prostatic tissue of normal dogs and dogs with benign prostatic hyperplasia.

Invest. Urol. 13, 220-222

LOWSETH, L. A., R. F. GERLACH, N. A. GILLETT u. B. A. MUGGENBURG (1990): Age-related changes in the prostate and testes of Beagle dogs.

Vet. Pathol. 27, 347-353

MCQUOWN, B., K. E. BURGESS u. C. R. HEINZE (2018):

Preliminary investigation of blood concentrations of insulin-like growth factor, insulin, lactate and β-hydroxybutyrate in dogs with lymphoma as compared with matched controls.

Vet Comp Oncol. 16, 262-267

MOHR, S.B. (2009):

A brief history of vitamin D and cancer prevention.

Ann. Epidemiol. 19, 79-83

MONTI, S., F. DI SILVERIO, R. IRACI, C. MARTINI, S. LANZARA, P. FALASCA, M. POGGI, A. STIGLIANO, F. SCIARRA u. V. TOSCANO (2001):
Regional variations of insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and receptor type I in benign prostatic hyperplasia tissue and their correlation with intraprostatic androgens.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 86,1700-1706

MORIMOTO, L.M., P. A. NEWCOMB, E. WHITE, J. BIGLER u. J. D. POTTER (2005):
Variation in plasma insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein3, personal and lifestyle factors (United States).
Cancer Causes Control. 16, 917-927

NAGPAL, S., S. NA u. R. RATHNACHALAM (2005):
Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands.
Endocrinol. Rev. 26, 662-687

NESBITT, T. u. M. K. DREZNER (1993):
Insulin-like growth factor-I regulation of renal 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase activity.
Endocrinology 132, 133–138

NEVALAINEN, M.T., E. M. VALVE, P. M. INGLETON u. P. L. HARKÖNEN (1996):
Expression and hormone regulation of prolactin receptors in rat dorsal and lateral prostate.
Endocrinology 137, 3078-3088

NEVALAINEN, M. T., E. M. VALVE, T. AHONEN, A. YAGI, J. PARANKO u. P. L. HÄRKÖNEN (1997 a):

Androgen-dependent expression of prolactin in rat prostate epithelium in vivo and in organ culture.

FASEB J. 11, 1297-1307

NEVALAINEN, M. T., E. M. VALVE, P. M. INGLETON, M. NURMI, P. M. MARTIKAINEN u. P. L. HARKONEN (1997 b):

Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate.

J. Clin. Invest. 99, 618-627

OUHTIT, A., G. MOREL G u. P. A. KELLY (1993):

Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptors in rat reproductive tissues.

Biol. Reprod. 49, 528-536

PALLA, H. (1994):

Untersuchung zur Physiologie und Pathophysiologie von Östradiol und Androstendion beim männlichen Hund.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

PARK, S.G., J. K. YEO, D. Y. CHO u. M. G. PARK (2018):

Impact of metabolic status on the association of serum vitamin D with hypogonadism and lower urinary tract symptoms/benign prostatic hyperplasia.

Aging Male. 21, 55-59

PARKINSON, T.J. (1996):

Normal reproduction in male animals

In: G. H. ARTHUR, D.E. NOAKES u. H. PEARSON (Hrsg.): Veterinary Reproduction and Obstetrics.

Verlag Saunders, Philadelphia, 6. Aufl., S. 551-571

PEEHL, D. M., R. J. SKOWRONSKI, G. K. LEUNG, S. T. WONG, T. A. STAMEY u. D. FELDMAN (1994):

Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on primary cultures of human prostatic cells.

Cancer Res. 54, 805-810

PINHEIRO, D., J. MACHADO, C. VIEGAS, C. BAPTISTA, E. BASTOS, J. MAGALHÃES, M. A. PIRES, L. CARDOSO u. A. MARTINS-BESSA (2017): Evaluation of biomarker canine-prostate specific arginine esterase (CPSE) for the diagnosis of benign prostatic hyperplasia.

BMC Veterinary Research 13, 76

POLISCA, A., A. TROISI, E. FONTAINE, L. MENCHETTI u. A. FONTBONNE (2016): A retrospective study of canine prostatic diseases from 2002 to 2009 at the Alfort Veterinary College in France.

Theriogenology 85, 835-840

POLLAK, M.N., H. T. HUYNH u. S. P. LEFEBVRE (1992):

Tamoxifen reduces serum insulin-like growth factor I (IGF-I).

Breast Cancer Res. Treat. 22, 91-100

POULET, F. (1985):

Evolution de la prostate canine en fonction de l'age.

Ann. Med. Vet. 129, 567-584

READ, R. A. u. S. BRYDEN (1995):

Urethral bleeding as a presenting sign of benign prostatic hyperplasia in the dog: a retrospective study (1979- 1993).

J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 31, 261-7

REITER, E., B. HENNUY, M. BRUYNINX, A. CORNET, M. KLUG, M. MCNAMARA, J. CLOSSET u. G. HENNEN (1999):

Effects of pituitary hormones on the prostate.

Prostate 38, 159-165

RUEL, Y., P. Y. BARTHEZ, A. MAILLES u. D. BEGON (1998):

Ultrasonographic evaluation of the prostate in healthy intact dogs.

Vet. Radiol. Ultrasound 39, 212-216

SAFARINEJAD, M. R., N. SHAFIEI u. S. SAFARINEJAD (2011):

Relationship of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 (IGFBP-3) gene polymorphism with the susceptibility to development of prostate cancer and influence on serum levels of IGF-1, and IGFBP-3.

Growth Horm. IGF Res. 21, 146-154

SCHWARTZ, G. G., L. W. WHITLACH, T. C. CHEN, B. LOKESHWAR u. M. F. HOLICK (1998):

Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D3 from 25-hydroxyvitamin D3.

Cancer Epidemio., Biomarkers,Prev. 7, 391–395

SELTING, K. A., C. R. SHARP, R. RINGOLD, D. H. THAMM u. R. BACKUS (2014): Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs -correlation with health and cancer risk.

Vet. Comp. Oncol. 14, 295–305

SHAFIK, A. (1994):

Prolactin injection, a new contraceptive method: experimental study.

Contraception 50, 191-199

SHARP, C. R., K. A. SELTING u. R. RINGOLD (2015):

The effect of diet on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in dogs.

BMC Research Notes 8, 442

SMITH, J (2008):

Canine prostatic disease: A review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. Theriogenology 70, 375-383

SPAN, P.N., J.A. SCHALKEN, F.G. SWEEP u. A.G. SMALS (1998):

Identification and partial characterization of two steroid 5-α-reductase isoenzymes in the canine prostate.

Prostate 34, 222-230

STATTIN, P., R. KAAKS, E. RIBOLI, P. FERRARI, H. DECHAUD u. G. HALLMANS (2001):

Circulating insulin-like growth factor-I and benign prostatic hyperplasia - a prospective study.

Scand. J. Urol. Nephrol. 35, 122-126

SYMS, A. J., M. E. HAPER u. K. GRIFFITHS (2006):
The effect of prolactin on human BPH epithelial proliferation.
Prostate 6, 145-153

TANGBANLUELKAL, L., u. C. L. ROBINETTE (1993):
Prolactin mediates estradiol-induced inflammation in the lateral prostate of Wistar rats.
Endocrinology 132, 2407-2416

TANIGUCHI, K., K. KATAGIRI, H. KASHIWAGI, S. HARADA, Y. SUGIMOTO, Y. SHIMIZU, H. ARAKAWA, T. ITO, M. YAMAZAKI, T. WATANABE, A. KATO, E. HOSHINO, T. TAKAHASHI, T. ESAKI, M. SUZUKI, S. TAKEDA, F. ICHIKAWA, A. HARADA, N. SEKIGUCHI, M. ISHIGAI, H. KAWATA, T. YONEYA, E. ONUMA, M. SUDOH u. Y. AOKI (2010):
A novel nonsecosteroidal VDR agonist (CH5036249) exhibits efficacy in a spontaneous benign prostatic hyperplasia beagle model.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 121, 204-207

TESKE, E., E. C. NAAN, E. M. VAN DIJK, E. VAN GARDEREN u. J. A. SCHALKEN (2002):
Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs.
Mol. Cell. Endocrinol. 197, 251-255

THORNER, M. O., M. L. VANCE, E. HORVATH u. KOVATH K. (1992):
The anterior pituitary.
In: J. D. WILSON u. D. W. FOSTER (Hrsg.): William´s textbook of endocrinology.
WB Saunders Co., Philadelphia, Bd. 8, S. 221–310

TRACHTENBERG, J., L. L. HICKS u. P. C. WALSH (1980):

Androgen- and estrogen-receptor content in spontaneous and experimentally induced canine prostatic hyperplasia.

J. Clin. Invest. 65,1051-1059

TROISI, A., R. ORLANDI, P. BARGELLINI, L. MENCHETTI, P. BORGES, R. ZELLI, u. A. POLISCA (2015):

Contrast-enhanced ultrasonographic characteristics of the diseased canine prostate gland.

Theriogenology 84, 1423-1430

TVARIJONAVICIUTE, A., F. TECLES, J. M. CARILLO, M. RUBIO u. J. J. CERON (2011):

Serum insulin-like growth factor-1 measurements in dogs: Performance characteristics of an automated assay and study of some sources of variation.

Can. J. Vet. Res. 75, 312–316

URHAUSEN, C., A. SEEFELDT, F. M. ESCHRICHT, A. KOCH, H. O. HOPPEN, M. BEYERBACH, C. MÖHRKE, S. J. DIELEMANN u. A. R. GÜNZEL-APEL (2009): Concentrations of prolactin, LH, testosterone, TSH and thyroxin in normospermic dogs of different breeds.

Reprod. Dom. Anim. 44, 279-282

VAN DOORN, J., A. M. RINGELING, S. S. SHMUELI, M. C. KUIJPERS, A. C. HOKKEN-KOELEGA, S. C. VAN BUUL-OFFERS u. M. JANSEN (1999):

Circulating levels of human insulin-like growth factor binding protein-6 (IGFBP-6) in health and disease as determined by radioimmunoassay.

Clin. Endocrinol. (Oxf). 50, 601-609

VENDOLA, K., J. ZHOU, J. WANG u. C. A. BONDY (1999):
Androgens promote insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I receptor gene expression in the primate ovary.
Human Reprod. 4, 2328–2332

WALSH, P. C. u. J. D. WILSON (1976):
The induction of prostatic hypertrophy in the dog with androstanediol.
J. Clin. Invest. 57, 1093-1097

WEITZE, K.F. (2001):
Spermatologische Untersuchung
In: W. BUSCH u. A. HOLZMANN: Veterinärmedizinische Andrologie.
Verlag Schattauer, Stuttgart, S. 87-118

WENNBO, H., J. KINDBLOM, O. ISAKSSON u. J. TORNELL (1997):
Transgenic mice overexpressing the prolactin gene develop dramatic enlargement of the prostata gland.
Endocrinology 138, 4410–4415

WERHAHN BEINING, F., C. URHAUSEN, K. WOLF, M. SCHMICKE, K. ROHN, G. SCHULER u. GÜNZEL-APEL AR (2020):
Rhodesian Ridgebacks have an increased risk to develop benign prostatic hyperplasia.
Reprod. Dom. Anim. 55, 283-292

WOLF, K., H. KAYACELEBI, C. URHAUSEN, M. PIECHOTTA, R. MISCHKE, S. KRAMER, A. EINSPANIER, O. I. E. CHY u. A. R. GÜNZEL-APEL (2012):

Testicular steroids, prolactin, relaxin and prostate gland markers in peripheral blood and seminal plasma of normal dogs and dogs with prostatic hyperplasia.

Reprod. Dom. Anim. 47, 243-246

WOLF, K. (2012):

Konzentrationen von Prolaktin und Relaxin sowie Sexualsteroiden im peripheren Blut und Prostatasekret von Rüden mit unterschiedlichem Prostata- und Ejakulatstatus. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

YAMANAKA, H., J. SHIMAZAKI, K. IMAI, Y. SUGIYAMA u. K. SHIDA (1975):

Effect of estrogen administration on activities of testosterone 5alpha-reductase, alkaline phosphatase and arginase in the ventral and the dorsolateral prostates of rats.

Endocrinol. Jpn. 22, 297-302

ZIRKIN, B. R. u. J. D. STRANDBERG (1984):

Quantitative changes in the morphology of the aging canine prostate.

Anat. Rec. 208, 207-214

8.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADPP	Adamantyl 1,2-Dioxetanarylphosphat
Ag	Antigen
AK	Antikörper
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
ccm	Kubikzentimeter
CPSE	Canine prostata-spezifische Argininesterase
CPSEi	Canine prostata-spezifische Argininesterase increased
CPSEn	Canine prostata-spezifische Argininesterase normal
Da	Dalton
DHT	Dihydrotestosteron
dpm	disintegrations per minute (Zerfall pro Minute)
E_2	Estradiol-17β
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay
et al.	lat.: et alii
Fa.	Firma
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblastenwachstumsfaktor)
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
ggf.	gegebenenfalls
GH	Growth Hormone (Wachstumshormon)

GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormone
i.d.R.	in der Regel
IGF	Insulin-like Growth Factor (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor)
IGFBPs	Insulin-like Growth Factor bindende Proteine
IGFR	Insulin-like Growth Factor Rezeptor
IU	Internationale Einheit
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
LH	Luteinisierendes Hormon
LR	Labrador Retriever
MAX	Maximum
mg	Mikrogramm
MHz	Megahertz
MIN	Minimum
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mo	Monate
MW	Mittelwert
MS	Microsoft
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
o.b.B.	ohne besonderen Befund
o.g.	oben genannt
OHD_3	Hydroxy Vitamin D

p	Wahrscheinlichkeit
pg	Picogramm
PIF	Prolaktin-inhibierender Faktor
PRL	Prolaktin
PRLR	Prolaktin Rezeptor
PrRP	Prolactin-Releasing-Peptid
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTH	Parathormon
r	Korrelationskoeffizient
RIA	Radioimmunoassay
rpm	revolutions per minute
RR	Rhodesian Ridgeback
RT	Raumtemperatur
RXFP1	Relaxin/Insulin-like Family Peptide Receptor 1 (Relaxinrezeptor 1)
SAS ®	Statistical Analysis System
SD	standard deviation (Standardabweichung)
sec	Sekunde
sog.	sogenannt
T	Testosteron
T_4	Thyroxin/Tetrajodthyronin
Tab.	Tabelle
TMB	3,3´,5,5´-Tetra-Methyl-Benzidin
TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormone
TSH	Thyreotropin/Thyreoidea-Stimulierendes Hormon
U	Unit (Einheit)
u.	und
u.a.	und andere

V.	Vena
VDR	Vitamin D Rezeptor
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

9 DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Günzel-Apel herzlichst bedanken. Einerseits für die Überlassung des interessanten und gleichzeitig praxisnahen Themas als auch für die Unterstützung jeglicher Art zu jeder Zeit und Ort.

Außerdem möchte ich meinen Dank gegenüber dem „Repro-Team“ aussprechen, die mir alle unterstützend zur Seite gestanden haben. Dazu gehörte Erika Schröder, die immer ein Lächeln und ein nettes Wort übrig hatte. Karo, die mir fachlich stets zur Seite stand und ganz besonders Caro, die mir mit Rat und Tat zur Seite stand und des ein oder anderes Mal auch mit „Hand angelegt hat“.

Vielen Dank an Frau Prof. Schmicke und das gesamte „Endo-Team“ für die Bearbeitung meiner Proben. Vor allem ist Frau Jordan zu erwähnen, die mir alle Fragen stets beantworten konnte.

Auch Herrn Prof. Schuler möchte ich danken für die unkomplizierte Unterstützung bzgl. der Estradiolmessungen.

Mein besonderer Dank gilt natürlich meinen Eltern und meiner Schwester Henri, ich danke Euch! Für Euer Vertrauen und eure Unterstützung jeglicher Art. Ihr standet immer bedingungslos hinter mir. Niemals brauchte ich das Gefühl zu erleben, keinen Rückhalt zu haben. Das lässt sich nicht in Worte fassen. Ich bin einfach nur stolz und glücklich eine so tolle Familie zu haben.

Vor allem möchte ich auch Marco, meinem Ehemann, ein RIESN Dank aussprechen. Du hast immer versucht mir den Rücken frei zu halten und mich zu unterstützen. Ohne zu zögern hast du mir bei Allem sofort geholfen. Vielen Dank für dein bedingungsloses Vertrauen und Liebe.