

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

An sechs nicht laktierenden Stuten im Alter von drei bis elf Jahren wurden die Auswirkungen einer aktiven Immunisierung gegen eine rekombinante humane Inhibin  $\alpha$ -Untereinheit auf ovarielle und endokrine Parameter untersucht, wobei ursprünglich die Frage im Vordergrund stand, ob auf diesem Wege eine Steigerung der Ovulationsrate und der Embryonenzahl pro Rosse erzielt werden können.

Die Untersuchungen an den Stuten wurden von Mai bis Oktober 1992 durchgeführt. Die Stuten hatten während der gesamten Versuchsdauer (146 Tage) Weidegang.

Nach Zyklussynchronisation wurden vier Stuten am 19. Mai (d 1) mit 500  $\mu$ g der Inhibin  $\alpha$ -Kette erstmals immunisiert, am 18. Juni (d 31) mit 500  $\mu$ g der Inhibin  $\alpha$ -Kette ein erstes Mal und am 11. August (d 85) mit 250  $\mu$ g ein zweites Mal geboostert. Zwei Stuten, die als Kontrollen dienten, erhielten zeitgleich das Adjuvans.

Als Antigen diente eine rekombinante humane Inhibin  $\alpha$ -Untereinheit gebunden an das Adjuvans ABM 2 complete. Die Applikation erfolgte subkutan. Die Antikörpertiter gegen die rekombinante humane Inhibin  $\alpha$ -Untereinheit wurden in wöchentlichen Serumproben mittels eines spezifischen ELISA bestimmt.

Embryonengewinnungen wurden bei den sechs Stuten jeweils in der zweiten Rosse der Versuchsphasen I (d 1 - 31) und II (d 32 - 85) durchgeführt. Aufgrund der beobachteten modifizierten Ovaraktivität wurde in Versuchsabschnitt III (d 86 - 146) von weiteren Embryonengewinnungen abgesehen.

Aus Plasmaproben, die in zweitägigem (d1 bis 59) beziehungsweise eintägigem (d 60 bis 146) Abstand gewonnen wurden, erfolgte radioimmunologisch die Bestimmung von FSH, LH, Progesteron und Östradiol. Aus den Östradiol- und Progesteronwerten wurde das  $E_2/P_4$ -Verhältnis berechnet. Hochfrequente Blutentnahmen wurden über den Zeitraum von 24 Stunden im Diöstrus der Stuten durchgeführt, um die Pulsatilität der hypophysären Gonadotropinsekretion zu untersuchen.

Die Stuten wurden im Östrus täglich und im Diöstrus jeden zweiten Tag auf äußere Rossesymptome geprüft. In denselben zeitlichen Abständen wurden die Ovarien palpatorisch und sonographisch auf Follikelentwicklung und Ovulationen untersucht. Die sonographisch erhobenen Ovarbefunde wurden auf Videoband dokumentiert und ausgewertet.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Alle vier immunisierten Stuten entwickelten einen Antikörpertiter gegen die rekombinante humane Inhibin  $\alpha$ -Kette, wobei erhebliche individuelle Unterschiede in der Titerhöhe bestanden. Nach jeder Immunisierung erfolgte ein Antikörpertiteranstieg bei den Stuten. Die Verlaufscharakteristik der Antikörpertiter war trotz verschiedener Titerhöhen vergleichbar. Die erste Boosterinjektion brachte bei allen vier Stuten, die zweite Boosterinjektion bei drei der vier Stuten jeweils einen starken Titeranstieg.

Am Tage des  $E_2/P_4$ -Maximums zeigten die Follikelpopulationen der immunisierten Stuten einen höheren Anteil mittelgroßer und großer Follikel als die Kontrolltiere. Die immunisierten Stuten ( $n=4$ ) bildeten über den Versuchszeitraum zusammen 59 dominante Follikel mit einem Durchmesser  $\geq 30$  mm, die Kontrollstuten ( $n=2$ ) dagegen 16 Follikel dieser Größe. Die Ovulationsrate in Rosse betrug bei den immunisierten Stuten 1,4 und bei den Kontrollstuten 1,0. Sechszwanzig der 59 dominanten Follikel kamen bei den immunisierten Stuten nicht in einer Rosse zur Ovulation, in der Kontrollgruppe waren dies drei der 16 dominanten Follikel. Anovulatorisch hämorrhagische Follikel, verzögerte Ovulationen und ohne Rosse ovulierende bzw. atresierende dominante Follikel wurden in der immunisierten Gruppe somit vermehrt beobachtet.

Innerhalb der Gruppe der immunisierten Stuten betrug bei einem Ak-Titer  $< 1:1.000$  das Verhältnis von angestrebter zu unerwünschter ovarieller Aktivität  $1 : 0,75$ . Bei Ak-Titerhöhen  $> 1:1.000$  betrug dieses Verhältnis  $1 : 1,62$ . Die Veränderung dieses Verhältnisses innerhalb der immunisierten Gruppe zeigt, daß die im Versuchsverlauf zunehmende Entgleisung der ovariellen Aktivität in einem Zusammenhang mit dem Ak-Titer zu sehen ist. Die interovulatorischen Abstände der gegen Inhibin immunisierten Stuten variierten deutlich. Die Sekretionsprofile der Gonadotropine und der ovariellen Steroide über den Versuchszeitraum folgten den tierartspezifischen Mustern. Sie bestätigen somit die klinisch erhobenen Ovarbefunde, ohne eine Erklärung für die Modifikation der Ovaraktivität zu geben. Im Gegensatz zu den diöstrischen FSH-Tagesprofilen zeigten die LH-Tagesprofile zweier immunisierter Stuten Abweichungen im Pulsmuster gegenüber den Kontrollen und Literaturangaben.

Im Rahmen von zwölf Uterusspülungen wurden bei den vier immunisierten Stuten in der ersten Versuchsphase zwei singuläre Embryonen gewonnen, während bei den zwei Kontrollstuten in Versuchsphase II ein Embryo gefunden wurde.

Im Oktober 1993, ein Jahr nach Ende der klinischen Untersuchungsperiode, war im Blut von zwei immunisierten Stuten ein Ak-Titer von  $1 : 5.300$  bzw.  $1 : 11.000$  meßbar, während die beiden anderen Stuten über keinen meßbaren Ak-Titer verfügten. Diese Beobachtung zeigt,

daß das Verfahren nicht kurzfristig und sicher reversibel angewendet werden kann, und daß die Ak-Titer nicht mit Sicherheit innerhalb eines Jahres wieder abgebaut werden. Es wird die Schlußfolgerung gezogen, daß eine aktive Immunisierung gegen die rekombinante humane Inhibin  $\alpha$ -Kette, wie in dieser Versuchsreihe durchgeführt, kein sinnvolles Verfahren zur Steigerung der Ovulationsrate von Stuten in Embryotransferprogrammen darstellt. Art und Umfang der Beeinflussung endokriner und lokaler Regelkreise im Ovar als Ursache für die modifizierte Ovaraktivität nach der Immunisierung gegen die Inhibin  $\alpha$ -Kette werden diskutiert.

Active immunization of mares against a recombinant human inhibin  $\alpha$ -subunit  
- Effects on ovarian function and endocrine parameters -

## 6. Summary

Six non-lactating mares aged 3 to 11 years were tested for the effect of an active immunization against a recombinant human inhibin  $\alpha$ -subunit on ovarian function and endocrine parameters. The main intention was to find out whether the immunization would increase ovulation rate and embryonic yield per oestrous.

The mares were examined from may to october 1992. They were on pasture during the whole period (146 d).

After synchronization of oestrous, four mares were immunized on may 19th (d 1) with 500  $\mu$ g of the inhibin  $\alpha$ -chain. They were boostert on june 18th (d 31) with 500  $\mu$ g and on august 11th (d 85) with 250  $\mu$ g of the inhibin  $\alpha$ -chain. Two mares functioned as controls and received only the adjuvans. The recombinant human inhibin  $\alpha$ -subunit was conjugated to the adjuvans ABM 2 complete. The form of application was subcutaneous. Antibody titers against the recombinant human inhibin  $\alpha$ -subunit were analyzed in bloodserum samples taken once a week with a specific ELISA.

Embryo recovery was done after the second oestrous of phase I (d 1 - 31) and phase II ( 32 - 85) with all six mares. Because of the modified ovarian activity, no embryo recovery was done in phase III (d 86 - 146).

FSH, LH, progesterone and oestradiol levels were measured with specific radioimmunoassays from plasma samples taken every other day (d1 - 59) and every day (d 60 - 146). With their help the  $E_2/P_4$ -Relation was calculated. Frequent blood sampling was done for 24 hours in the dioestrous of the mares in order to examine pulsatile secretion of gonadotropins.

The mares were teased daily in oestrous and every other day in dioestrous. At the same time follicular development and ovulation was assessed by rectal palpation and monitored by ultrasonography. The sonographic findings were documented and analized on video tape.

The following results were obtained:

All four immunized mares produced antibodies against the recombinant human inhibin  $\alpha$ -subunit, but showed big individual variety. After each immunization titers increased. Profiles of the antibody titers were similar in the mares despite differing individual heights. The first booster injection produced an increase in the titers of all four mares, the second booster injection in three of the four mares.

The follicular population showed more medium sized and maximum sized follicles at the day of the  $E_2/P_4$ -maximum than in the control mares. The immunized mares together ( $n = 4$ ) developed 59 dominant follicles with a diameter  $\geq 30$  mm, the control mares ( $n = 2$ ) 16 follicles of the same size. The ovulation rate in oestrous was 1.4 in the immunized in contrast to 1.0 in the control mares. 26 of the 59 dominant follicles did not ovulate in oestrous in the immunized group. 3 out of 16 did not ovulate in the control animals. Anovulatory hemorrhagic follicles, delayed ovulations and ovulations without heat or follicle atresia was thus observed more frequently in the immunized group.

In the immunized mares with low antibody titers the normal and irregular ovarian activity was in a ratio of 1 : 0.75. With high antibody titers this relation was 1 : 1.62. This indicates a correlation between height of the antibody titer and irregular ovarian activity.

The interovulatory intervals varied considerably in the immunized mares.

The secretion profiles of the gonadotropins and the ovarian steroids showed specific equine patterns without giving an explanation for the modification of the ovarian activity. Two of the immunized mares had changes in the pulsatility of LH secretion in dioestrus in contrast to the controls. No changes in the pulsatility of FSH secretion were seen.

Two singular embryos were recovered in the immunized mares and one embryo in the control group.

In October 1993, one year after clinical examination was finished, two mares still showed antibody titers of 1 : 5,300 and 1 : 11,000, while the other two did not have a measurable titer anymore. This fact demonstrates that active immunization is not a method which is reversible in a short time.

The conclusion is that an active immunization against a recombinant human inhibin  $\alpha$ -subunit is no useful method to increase the ovulation rate in mares for embryo transfer. The influence of endocrine and local ovarian feedback mechanisms are discussed as a cause for modified ovarian activity after immunization against a recombinant human inhibin  $\alpha$ -subunit.