

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zum Verständnis der neurokrinen Regulation des Sexualzyklus und zur Pathophysiologie, Therapie und Prophylaxe von Zyklusstörungen beim Rind zu liefern. Dabei wurde die LH-Sekretion nach Applikation eines GnRH-Analogons, nach Behandlung mit Progesteron-freisetzenden Intravaginalspiralen sowie nach Injektion des Dopaminantagonisten Sulpirid und des Opiatantagonisten Naloxon bestimmt.

Zunächst wurden verschiedene Katheterisierungssysteme zur wiederholten Blutentnahme auf ihre Anwendbarkeit für die eigenen Untersuchungen hin überprüft sowie unter Verwendung eines bereits vorhandenen Antiserums - ein Radioimmunoassay zur Bestimmung von bovinem LH etabliert. In den einzelnen Versuchsabschnitten wurden Blutproben zur Bestimmung der LH-Konzentration über einen Zeitraum von im Allgemeinen 4 Stunden in 20minütigen und zum Teil 5minütigen Abständen genommen. Injektionen von Versuchssubstanzen (Buserelin, Sulpirid, Naloxon) erfolgten 60 Minuten nach Versuchsbeginn. Die LH-Sekretion nach Injektion der Versuchssubstanzen wurde als Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) für einen dem jeweiligen Versuch angepaßten Zeitraum (60 bis 120 min.) berechnet. Es wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt:

(1) Bei Kühen im Interöstrus (n=24) wurde der Einfluß unterschiedlicher Dosierungen (4, 8, 20, 40 und 80 µg) des GnRH-Analogons Buserelin auf die LH-Sekretion untersucht. Dabei lösten 20 µg Buserelin eine ausgeprägtere LH-Freisetzung (AUC $2686,3 \pm 313,1 \text{ ng ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$) aus, als 4 µg (AUC $1161,9 \pm 317,1 \text{ ng ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$) und 8 µg (AUC $1165,7 \pm 438,9 \text{ ng ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$) des GnRH-Analogons aber auch als 40 µg (AUC $2050,6 \pm 752,5 \text{ ng ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$) und 80 µg Buserelin (AUC $2110,9 \pm 541,2 \text{ ng ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$; $p < 0,05$). Eine Dosis von 20 µg Buserelin ist beim Rind daher zur Stimulierung der endogenen LH-Freisetzung ausreichend.

(2) Untersuchungen bei Kühen im Interöstrus (n=24) über den Einfluß einer wiederholten Buserelin-Applikation ergaben, daß nach Injektion von Buserelin (20 µg) die Reaktion der Hypophyse auf eine weitere Buserelininjektion (20 µg) für etwa 48 Stunden deutlich reduziert ist und daher wiederholte Buserelinbehandlungen im Abstand von wenigen Stunden nicht sinnvoll sind. Erst 72 Stunden nach einer ersten Buserelininjektion hatte die Ansprechbarkeit der Hypophyse auf eine zweite Buserelininjektion wieder annähernd das Ausgangsniveau erreicht.

(3) In einem weiteren Versuchsabschnitt wurde der Einfluß der Buserelinapplikation bei Kühen (n=6) zu unterschiedlichen Zeiten post partum untersucht. Die Buserelin-induzierte LH-Sekretion war in den ersten 10 Tagen nach dem Abkalben nur gering. Fünf Wochen post partum, d.h. zu einem Zeitpunkt, wo die Tiere einen sekretorisch aktiven Gelbkörper hatten, ließ sich durch eine Buserelininjektion eine deutliche LH-Freisetzung induzieren.

(4) Bei Kühen mit klinisch manifesten Ovarialzysten (n=4) wurde nach Injektion von Buserelin mehr LH freigesetzt, als bei zyklischen Kühen in den übrigen Versuchsabschnitten. Im Gegensatz zur endogenen GnRH-Sekretion sind LH-Synthese und Hypophysenfunktion bei Vorliegen von Ovarialzysten offensichtlich nicht beeinträchtigt.

(5) Im fünften Experiment erhielten 6 Tiere über 12 Tage eine Progesteron-abgebende Intravaginalspirale (PRID-Spirale), 4 Kühe erhielten am Tag 7 zusätzlich eine zweite PRID-Spirale und 5 Tiere blieben als Kontrolle unbehandelt. In den ersten drei Tagen nach Applikation einer Intravaginalspirale war die Plasmaprogesteronkonzentration bei den PRID-behandelten Tieren annähernd gleich hoch wie bei zyklischen Tieren in der Gelbkörperphase, die LH-Sekretion wurde durch die PRID-Behandlung bei den meisten Tieren fast vollständig unterdrückt. In den folgenden Tagen stieg die LH-Sekretion bei beiden Versuchsgruppen wieder an (Eine PRID-Spirale: Tag 2: $AUC\ 61,1 \pm 24,8\ ng\ ml^{-1}\ min^{-1}$; Tag 9: $117,7 \pm 20,3\ ng\ ml^{-1}\ min^{-1}$; $p < 0,05$ zwischen den Zeiten; Zwei PRID-Spiralen: Tag 2: $AUC\ 56,6 \pm 19,5\ ng\ ml^{-1}$

min⁻¹; Tag 9: 89,9 ± 18,4 ng ml⁻¹ min⁻¹; n.s. zwischen den Zeiten). Zwischen den mit einer und mit zwei PRID-Spiralen behandelten Tieren lagen keine signifikanten Mittelwertunterschiede der LH-Sekretion vor. Nach Ende der Gestagenbehandlung war eine deutliche Zunahme der LH-Sekretion festzustellen. Sowohl bei den Färsen, die mit einer wie auch den Tieren, die mit zwei PRID-Spiralen behandelt worden waren, stieg die LH-Freisetzung an und war signifikant höher als Tag 2 und Tag 9 der Progesteronbehandlung (AUC 1 PRID: 196,8 0,7 ± 23,8 ng ml⁻¹ min⁻¹; 2 PRID: 259,8 0,7 ± 24,6 ng ml⁻¹ min⁻¹; p<0,01 im Vergleich zu Tag 2 bzw. Tag 9).

(6) Im sechsten Versuchsabschnitt wurde der Einfluß dopaminerger Regelkreise auf die Steuerung von Fortpflanzungsfunktionen bei Kühen in unterschiedlichen Reproduktionsstadien untersucht. Die Tiere erhielten 300 mg des Dopamin-D₂-Antagonisten Sulpirid, oder physiologische Kochsalzlösung als Kontrolle intravenös appliziert. Sulpirid führte in keinem Fall zu einer im Vergleich zu den Kontrolltieren, die 0,9%ige NaCl-Lösung erhalten, unterschiedlichen LH-Konzentration im Plasma. Die Busserelin-induzierte LH-Freisetzung bei mit Sulpirid und mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Tieren unterschied sich ebenfalls nicht signifikant. Eine Bedeutung dopaminerger neuronaler Systeme für die LH-Sekretion bei Kühen konnte damit nicht nachgewiesen werden.

(7) Im letzten Versuchsabschnitt wurde die Bedeutung opioidergere Regelkreise für die GnRH-/LH-Sekretion bei Kühen (n=5) im letzten Monat der Gravidität untersucht. Die Tiere erhielten den Opiatantagonisten Naloxon in einer Dosis von 1mg/kg Körpergewicht oder physiologische Kochsalzlösung als Kontrolle intravenös injiziert. Naloxon bewirkte keine Änderung der Plasma-LH-Konzentration. Dies deutet darauf hin, daß endogene Opiode nicht an der Hemmung der LH- bzw. der GnRH-Freisetzung bei hochtragenden Kühen beteiligt sind.

6. Summary

Claudia Goehring (1998): Regulation of LH release in cattle

In this study LH, release in response to administration of a GnRH agonist or a progesterone-releasing intravaginal device and after injection of the dopamine antagonist sulpiride and the opiate antagonist naloxone were studied. The aim of the experiments was a better understanding of the neurocrine regulation underlying the bovine oestrous cycle and of the pathogenesis and prophylaxis of subfertility in postpartum dairy cows.

At first, different catheter systems for repeated blood sampling in cattle were evaluated and - using a validated antiserum- a radioimmunoassay for the determination of bovine LH was established. In different experiments, blood samples for determination of LH were taken in general over a 4-hour period at 20 or 5-minute intervals. Experimental drugs (buserelin, sulpiride, naloxone) were injected 60 min. after the start of experiments. LH release was calculated as the area under the curve (AUC) for a time period adequate to the experiment (60 to 120 min.). The following experiments were performed:

(1) In dioestrous cows (n=24), the effect of different doses of the GnRH agonist buserelin (4, 8, 20, 40 and 80 µg) on LH release was investigated. A buserelin dose of 20 µg induced an LH release (AUC $2686,3 \pm 313,1 \text{ ng ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$) more pronounced than either 4 (AUC $1161,9 \pm 317,1 \text{ ng ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$) and 8 µg buserelin (AUC $1165,7 \pm 438,9 \text{ ng ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$) or 40 (AUC $2050,6 \pm 752,5 \text{ ng ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$) and 80 µg of the GnRH agonist (AUC $2110,9 \pm 541,2 \text{ ng ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$; $p < 0,05$). A dose of 20 µg Buserelin in cattle is therefore adequate to stimulate endogenous LH-release.

(2) The effect of repeated buserelin injections (20 µg) on LH release was investigated in dioestrous cattle (n=24). After injection of buserelin, pituitary response to a se-

cond buserelin injection was markedly reduced for approximately 48 hours. Repeated buserelin injection at an interval of several hours therefore cannot be recommended. Only after 72 hours pituitary response to buserelin was restored to a levels comparable to the response observed after the first buserelin injection.

(3) In another experiment effects of buserelin on LH release in cattle (n=6) at different time periods after calving were studied. Buserelin-induced LH-secretion was reduced during the first 10 days after calving. In contrast, five weeks post partum, i.e. at a time period when a corpus luteum was present, buserelin injection was followed by a marked increase in plasma LH concentrations.

(4) In cattle diagnosed as having cystic ovarian degeneration (n=4), buserelin injection caused a more pronounced LH release than in cyclic cows in the other experiments. In contrast to endogenous GnRH release, LH synthesis and pituitary function are not impaired in animals with cystic ovarian disease.

(5) In the fifth experiment 6 heifers were treated for 12 days with a progesterone-releasing intravaginal device (PRID). Four heifers received an additional PRID on day 6 of the experiment, whereas 5 heifers remained untreated and served as controls. During the first three days after PRID insertion, plasma progesterone concentrations were on the same level as in spontaneously cyclic animals. LH release, in most animals was markedly suppressed by the PRID treatment. Subsequently, LH release increased in animals of both experimental groups (one PRID: day 2: $AUC\ 61,1 \pm 24,8\ ng\ ml^{-1}\ min^{-1}$; day 9: $117,7 \pm 20,3\ ng\ ml^{-1}\ min^{-1}$; $p < 0,05$ between times, two PRID: day 2: $AUC\ 56,6 \pm 19,5\ ng\ ml^{-1}\ min^{-1}$; day 9: $89,9 \pm 18,4\ ng\ ml^{-1}\ min^{-1}$; n.s. between times). No significant differences in LH release were found between heifers treated with one and two PRID. After termination of progesterone treatment, LH release increased significantly. In animals treated with one as well as with two PRID, LH release after PRID removal was higher than either on day 2 or 9 of the treatment

(AUC 1 PRID: $196,8 \pm 23,8 \text{ ng ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$; 2 PRID: $259,8 \pm 24,6 \text{ ng ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$; $p < 0,01$ versus days 2 and 9).

(6) In the sixth experiment, the influence of dopaminergic systems on regulation of the oestrous cycle in cattle at different reproductive stages was studied. The animals were treated with the dopamine- D_2 -antagonist sulpiride at a dose of 300 mg per animal i.v. or physiological saline as control. At no time did sulpiride significantly affect LH release when compared to the respective controls. Buserelin-induced LH secretion was also not significantly different between sulpiride pretreated and saline-pretreated animals. A role of dopaminergic neuronal systems in the control of LH release in cattle therefore could not be demonstrated.

(7) In the last experiment, a possible function of opioidergic neuronal pathways in the suppression of LH secretion in cattle during the last month of gestation ($n=5$) was studied. The animals were treated either with the opiate antagonist naloxone (1 mg/kg body weight i.v.) or physiological saline. Naloxone did not cause any changes in plasma LH concentrations. This indicates that endogenous opioids do not suppress LH or GnRH secretion in cows during late pregnancy.