

## 6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die beim Rind nach Superovulation beobachtete individuelle Variabilität der Superovulationsantwort einzuschränken und das Superovulationsergebnis zu verbessern. Dazu fanden 99 Holstein-Friesian Kühe in zwei getrennten Versuchsreihen Verwendung. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde geprüft, ob eine am 5. Zyklustag beginnende Ultraschallkontrolle in zweitägigem Abstand als praxisnahes Ultraschalluntersuchungsregime zur Selektion von Spendertieren und zur Bestimmung eines funktionell dominanten Follikels geeignet ist. Dazu wurden die Ultraschallaufnahmen direkt anhand von Videobändern ausgewertet. Die Superovulationseinleitung erfolgte durch einmal tägliche i.m. Injektion von Folltropin® in abfallender Dosierung über 4 Tage. Der zweite Teil der Arbeit befaßte sich mit der Untersuchung der Wirkung einer chronische GnRH-a-Zufuhr (Buserelin) auf Adenohypophyse und Follikeldynamik. Innerhalb eines Zeitraumes von 14 Tagen wurden 5 verschiedene GnRH-a-Dosierungen (20/50/100/300/600 µg) zweimal täglich über einen Dauerkatheter verabreicht. Die Kontrolltiere erhielten zur gleichen Zeit physiologische NaCl-Lösung. Zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurve erfolgte vor und nach jeder chronischen Behandlung ein GnRH-a-Stimulationstest, wobei jeweils 80 bzw. 40 µg GnRH-a appliziert und über einen begrenzten Zeitraum frequent Blutproben entnommen wurden. Zur Bestimmung der LH-, Östradiol-17-β- und Progesteron-Konzentrationen wurde täglich morgens vor der GnRH-a-Applikation eine Blutprobe entnommen. Die Superovulationsbehandlung mit Folltropin® erfolgte im unmittelbaren Anschluß. In verschiedenen Versuchsanstellungen wurden 5.000 oder 10.000 IE HCG i.v. zur Ovulationseinleitung sowie eine vier- oder fünftägige Superovulationsbehandlung bei gleicher Gesamtdosierung (400 mg) einmal täglich i.m. in abfallender Dosierung eingesetzt und die Auswirkungen auf die Superovulationsantwort studiert. Die Auswertung der täglichen Ultraschalluntersuchung der Follikeldynamik während der GnRH-a-Behandlung erfolgte retrospektiv anhand von Videobändern. Die Embryonen beider Versuchsreihen wurden 7 Tage nach der ersten Insemination unblutig gewonnen.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

- 1.) Durch die in zweitägigem Abstand erfolgende Ultraschalluntersuchung konnte der dominante Follikel bei allen 51 Tieren eindeutig identifiziert werden. Bei Kühen, die zur Zeit der Superovulationseinleitung einen funktionell dominanten Follikel besaßen ( $n=25$ ), war im Vergleich zu Kühen ohne dominanten Follikel die Anzahl der Gelbkörper ( $10,7 \pm 6,1$  gegenüber  $18,9 \pm 6,8$ ), der Eizellen und Embryonen ( $7,7 \pm 6,2$  gegenüber  $13,9 \pm 7,4$ ) und der transfertauglichen Embryonen ( $3,2 \pm 3,7$  gegenüber  $8,0 \pm 6,9$ ) hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) erniedrigt.
- 2.) Die Gelbkörperdurchmesser zur Zeit der Superovulationseinleitung waren in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.
- 3.) Die erste GnRH-a-Applikation (80 bzw. 40  $\mu\text{g}$  Buserelin) im GnRH-a-Stimulationstest vor der chronischen GnRH-a-Behandlung führte bei allen 48 Tieren zu einer deutlichen gipfelartigen LH-Ausschüttung. Die Plasma-LH-Konzentrationen ( $\bar{x}$ ) der Tiere, die mit 100  $\mu\text{g}$  pro Applikation behandelt wurden, stiegen innerhalb der ersten 120 Minuten nach der GnRH-a-Applikation von  $0,97 \pm 0,78 \mu\text{IU/ml}$  hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) auf einen Höchstwert von  $35,27 \pm 10,04 \mu\text{IU/ml}$  an und fielen danach langsam ab.
- 4.) Die GnRH-a-Applikation (80 bzw. 40  $\mu\text{g}$  Buserelin) im GnRH-a-Stimulationstest nach der GnRH-a-Behandlung bewirkte bei allen Tieren Plasma-LH-Konzentrationserhöhungen um weniger als das Doppelte des Ausgangswertes, bei den Kontrolltieren jedoch eine deutliche gipfelartige LH-Ausschüttung.
- 5.) Die LH-Konzentrationen ( $\bar{x}$ ) der Tiere, die mit 100  $\mu\text{g}$  pro GnRH-a-Applikation über 14 Tage behandelt wurden, sanken tendenziell von  $0,99 \pm 0,76 \mu\text{IU/ml}$  auf  $0,69 \pm 0,50 \mu\text{IU/ml}$  am 14. Versuchstag. Am folgenden Tag stiegen sie geringfügig auf  $0,79 \pm 0,79 \mu\text{IU/ml}$  an.

- 6.) Bei den Kontrolltieren und den chronisch GnRH-a-behandelten Tieren ovulierte der dominante Follikel der ersten Follikelwelle, und es bildete sich ein zusätzlicher Gelbkörper. Zwischen Tag 7 und 11 des Versuchs wuchs die zweite Follikelwelle mit dominantem Follikel. Beide Gelbkörper unterlagen zwischen dem 17. und 21. Zyklustag der Regression.
- 7.) Die Plasmaöstradiol-17- $\beta$ -Konzentrationen ( $\bar{x}$ ) der Tiere in den Versuchen 3 bis 5 waren niedrig und nahmen tendenziell von  $2,27 \pm 1,13$  pg/ml auf  $1,77 \pm 1,29$  pg/ml ab. Bei einem Kontrolltier stieg die Östradiol-17- $\beta$ -Konzentration zwischen den Versuchstagen 11 und 15 von weniger als 3 auf  $6,7$  pg/ml an.
- 8.) Die Plasmaprogesteron-Konzentrationen ( $\bar{x}$ ) der Tiere, die mit  $100 \mu\text{g}$  pro GnRH-a-Applikation behandelt wurden, stiegen zwischen den Versuchstagen 1 und 10 von  $1,18 \pm 0,77$  ng/ml auf  $1,88 \pm 1,33$  ng/ml. Zwischen den Versuchstagen 10 und 15 fielen sie auf  $0,74 \pm 1,08$  ng/ml ab. Es bestanden jeweils signifikante ( $p < 0,05$ ) Unterschiede.
- 9.) Bei der Superovulationsbehandlung über 4 Tage waren bei den Kühen nach Ovulationseinleitung durch 5000 IE HCG folgende Parameter im Vergleich zu den Kühen, die mit 10.000 IE HCG-behandelt wurden (Versuch 4), signifikant ( $p < 0,05$ ) erniedrigt: die Anzahl der degenerierten Embryonen (0 gegenüber  $0,6 \pm 0,7$ ) und der transfertauglichen Embryonen ( $0,4 \pm 1,2$  gegenüber  $2,9 \pm 2,7$ ). Die Anzahl der nicht ovulierten Follikel ( $9,8 \pm 6,0$  gegenüber  $3,2 \pm 2,3$ ) war hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) erniedrigt. Bei allen Tieren waren sehr gute Ovarreaktionen nachweisbar. Die sehr steil nach den Ovulationen ansteigenden Milchprogesteron-Konzentrationen zeigen, daß die sich bildenden Gelbkörper voll funktionsfähig waren.
- 10.) Bei Superovulationsbehandlung über 5 Tage bestanden keine signifikanten Unterschiede in den Superovulationsergebnissen zwischen der Ovulationseinleitung mit 10.000 IE HCG am 20. Versuchstag abends (Versuch 5a) und der 12 Stunden später erfolgenden Behandlung (Versuch 5b). In der Anzahl der unbefruchteten

Eizellen ( $5,1 \pm 4,9$  gegenüber  $1,4 \pm 2,6$ ) und der degenerierten Embryonen ( $0,6 \pm 0,1$  gegenüber 0) bestanden signifikante Unterschiede zur viertägigen Behandlung mit Folltropin®. Die Anzahl der transfertauglichen Embryonen stieg tendenziell von  $2,9 \pm 2,7$  in Versuch 4 auf  $4,6 \pm 5,4$  in Versuch 5a und  $4,1 \pm 6,8$  in Versuch 5b.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Anwesenheit eines dominanten Follikels zum Zeitpunkt der Superovulationseinleitung die Superovulationsantwort bei Milchkühen erheblich beeinflusst. Die Anwesenheit eines funktionell dominanten Follikels kann durch die am 5. Zyklustag beginnende Ultraschallkontrolle in zweitägigem Abstand sicher festgestellt werden, indem der Charakter der Wachstums- und der Plateauphase des dominanten Follikels als Kriterium herangezogen wird. Tieren denen ein sich anbildender Gelbkörper am 5. Zyklustag fehlt, sind potentiell schlechte Reagenten und können von der Superovulation ausgeschlossen werden.

Eine vierzehntägige GnRH-a-Zufuhr (Buserelin) führt zur Desensibilisierung und GnRH-Rezeptor-Downregulation der Adenohypophyse. Dadurch wird die die Ovulation induzierende endogene gipfelartige LH-Ausschüttung blockiert. Trotz Desensibilisierung und GnRH-Rezeptor-Downregulation findet bei allen Tieren ein Follikelwachstum statt. Der sich zur Zeit der Superovulationseinleitung in der Wachstumsphase befindliche dominante Follikel besitzt keine funktionelle Dominanz, da er das Wachstum kleiner Follikel während der Folltropin-Stimulation nicht inhibiert. Bei sehr hohen Ovarreaktionen bleibt das durch Erhöhung der HCG-Dosierung und Verlängerung der Superovulationsbehandlung verbesserte Superovulationsergebnis durch einen hohen Anteil unbefruchteter Eizellen unbefriedigend. Zur Optimierung des Behandlungsschemas sind weitere Untersuchungen notwendig.

## 7 Summary

Michael Hoppe

### Experimental investigations to decrease the superovulatory variability in dairy cows by ultrasonographic determination of the optimal time point for superovulatory induction and by chronic GnRH-a administration (Buserelin)

The aim of the present study was to decrease individual variability of response after the superovulatory treatment of cows and to improve superovulatory responses. A total of 99 HF cows were used in two separate experiments. The first part of the present study was to investigate whether ultrasonographic analysis in two-days-intervals beginning at the 5<sup>th</sup> day of the oestrus cycle is suitable for identification of the dominant follicle. For this propose, the ultrasonographic investigation was analysed directly from videotapes. The superovulatory treatment consisted of a once daily intramuscular injection of Folltropin® in decreasing doses over four days. In a second experiment, the effect of chronic GnRH-a-administration (Buserelin) on the adenohypophysis and on follicular dynamics was investigated. In this trial, 5 different GnRH-a-doses (20/50/100/300/600 µg) were given twice daily i.v. over 14 days. The control animals were given injections of normal saline. To produce a dose response curve, an GnRH-a-stimulation test was carried out at the beginning and the end of each chronic treatment. The response curve for the first chronic experiment was general with 80 µg GnRH-a stimulation and the respons curves for the folloving four experiments ware using 40 µg GnRH-a because of their lower trial dosage. Blood samples were taken frequently over a determined period. For determination of LH, oestradiol-17-β and progesterone concentrations, daily blood samples were taken during treatment before the GnRH-a administration. The superovulatory treatment with Folltropin® was started directly after the 14<sup>th</sup> day. In separate experiments, 5,000 or 10,000 I.U hCG were administered i.v. to induce ovulation. Four or five singel daily injections (400 mg pFSH) were used to induce superovulatory response. Evaluation of the daily ultrasonographic recording of follicular dynamics was done retrospectively from videotapes. The embryos of both experimental series were collected nonsurgically 7 days after the first insemination.

Following results were obtained:

- 1.) Using a two-day examination interval, the dominant follicle in all 51 cows could be positively identified by ultrasound. The number of corpora lutea ( $10.7 \pm 6.1$  to  $18.9 \pm 6.9$ ), of ova and embryos ( $7.7 \pm 6.2$  to  $13.9 \pm 7.4$ ) and of transferable embryos ( $3.2 \pm 3.7$  to  $8.0 \pm 6.9$ ) was significantly reduced ( $p < 0.01$ ) in cows with a functional dominant follicle ( $n=25$ ) throughout the period of superovulation in comparison to those without a dominant follicle.
- 2.) The mean diameter of corpora lutea during the introduction of superovulation was not influenced by the presence or absence of a dominant follicle.
- 3.) The first GnRH-a application (80 or 40  $\mu\text{g}$  of Buserelin) of the GnRH-a-stimulation test at the initiation of chronic GnRH-treatment resulted in a clear LH-surge in all 48 animals. The mean plasma-LH concentrations of animals injected with 100  $\mu\text{g}$  GnRH-a were significantly increased ( $p < 0.01$ ) 120 minutes after the first GnRH-a application from the initial  $0.97 \pm 0.78 \mu\text{IU/ml}$  to a maximum of  $35.27 \pm 10.04 \mu\text{IU/ml}$  and afterwards decreased.
- 4.) GnRH-a application (80 or 40  $\mu\text{g}$  of Buserelin) in the GnRH-a-stimulation test, after GnRH-a treatment, induced increasing plasma-LH concentrations in all animals up to a peak just less than twice the basal level. An LH surge was also produced in control animals.
- 5.) Mean LH concentrations of animals receiving 100  $\mu\text{g}$  per GnRH-a application for 14 days decreased from  $0.99 \pm 0.76 \mu\text{IU/ml}$  at onset (day 1) to  $0.69 \pm 0.50 \mu\text{IU/ml}$  on the 14<sup>th</sup> day of the experiment. The day after injections ceased, concentrations increased slightly to  $0.79 \pm 0.79 \mu\text{IU/ml}$ .
- 6.) In control animals and in animals treated chronically with GnRH-a, the dominant follicle produced in the first wave was ovulated and an additional corpus luteum began to develop. Between the 7<sup>th</sup> and 11<sup>th</sup> day of the experiment, a second follicle

wave and a second dominant follicle were produced. Both corpora lutea regressed between 17<sup>th</sup> and 21<sup>th</sup> day of cycle.

- 7.) Mean plasma oestradiol-17- $\beta$  concentrations in animals in experiments 3 to 5 were low at 8:00 am on the first day ( $2.27 \pm 1.13$  pg/ml) and decreased after the 14 day treatment to  $1.77 \pm 1.29$  pg/ml. Only in one control animal was oestradiol-17- $\beta$  concentration increased. In this animal, the oestradiol-17- $\beta$  concentration rose from 3 pg/ml on day 11 to 6.7 pg/ml on day 15.
- 8.) Mean plasma progesterone concentrations of animals receiving 100  $\mu$ g per GnRH-a, increased between days 1 and 10 from  $1.18 \pm 0.77$  to  $1.88 \pm 1.33$  ng/ml. Between days 10 and 15, concentrations decreased further to  $0.74 \pm 1.08$  ng/ml. These differences were significant ( $p < 0.05$ ).
- 9.) After superovulatory treatment for 4 days, the number of degenerated embryos ( $0.6 \pm 0.7$ ) was reduced to 0 and the number of transferable embryos was increased from ( $0.4 \pm 1.2$ ) to ( $2.9 \pm 2.7$ ) when the dose of each hCG injection was 10,000 I.U. as opposed to 5,000 I.U.. The higher hCG dosage also significantly reduced the number of non-ovulated follicles from  $9.8 \pm 6.0$  to  $3.2 \pm 2.3$  ( $p < 0.01$ ). In all animals a strong ovarian reaction was evident. A rapidly increasing concentration of milk progesterone after ovulation was taken as proof that the developing corpora lutea were fully active.
- 10.) In the group receiving superovulatory treatment for 5 days, no significant differences in ovulation were evident between animals receiving 10,000 I.U. hCG in the evening of the 20<sup>th</sup> day (expt. 5a) or 12 hours later (expt. 5b). The 5 day treatment made a significant reduction in the number of unfertilized ova ( $5.1 \pm 4.9$  as opposed to  $1.4 \pm 2.6$  with the 4 day treatment). Similarly, the number of transferable embryos increased from  $2.9 \pm 2.7$  (expt. 4) to  $4.6 \pm 5.4$  (expt. 5a).

These results demonstrate that the presence of a dominant follicle at the beginning of superovulation significantly influences the superovulatory response. The presence of a dominant follicle can be detected by ultrasonographic analysis starting on the 5<sup>th</sup> day of the

oestrus cycle by monitoring the growth phase and the plateau phase at two-day intervals. Potentially poor donors, ie. animals which are missing a corpus luteum on the 5<sup>th</sup> day of the oestrus, should not be used for superovulation.

A fortnight's application of GnRH-a (Buserelin) results in desensitization and GnRH-receptor downregulation in the adenohipophysis. This blocks the ovulation inducing endogenous LH-surge. Despite desensitization and GnRH-receptor downregulation, follicle growth is found in all animals. A dominant follicle growing at the beginning of superovulatory treatment has no functional dominance as it doesn't inhibit the growth of other small follicles during Folltropin® stimulation. Despite high ovarian reactivity the superovulatory response was improved by increasing the hCG dosage and extending the duration of superovulatory treatment. The yield was nevertheless unsatisfactory because of the high percentage of unfertilized ova. Further investigations to optimize treatment schedule are necessary.