

*Efficiëntie van oestrussynchronisatie en de invloed van metabole stress
door vasten op de superstimulatie respons bij melktypische pinken*



Marieke van Dijk Bsc., 3382095

Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde

Departement Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren

Onderzoeksstage

Onder begeleiding van:

Dr. Peter Vos

Drs. Hilde Aardema

Utrecht, mei 2012

Inhoudsopgave

1. Inleiding.....	4
2. Materiaal en methoden.....	6
2.1 Experimentdesign.....	6
2.1.1 Pre-experimentele fase.....	7
2.1.2 Oestrussynchronisatie.....	7
2.1.3 Dominante follikel punctie.....	8
2.1.4 Rantsoen.....	8
2.1.5 Superstimulatie.....	9
2.1.6 Ovariectomie.....	10
2.1.7 Follikelmetingen.....	10
2.2 Bloedafname en analyses.....	11
2.3 Body condition score en lichaamsgewicht.....	12
2.4 Statistiek.....	12
3. Resultaten.....	13
3.1 Validatie experimentdesign.....	13
3.2 Verschil tussen controle- en vastengroep.....	17
3.2.1 Aantal follikels.....	17
3.2.2 Follikelgrootte.....	19
4. Discussie.....	21
5. Conclusie.....	25
6. Bijlagen.....	26
6.1 Bijlage 1.....	26
6.2 Bijlage 2.....	27
7. Referenties.....	28

Samenvatting

De jarenlange intensieve selectie op melkgift bij de Holstein Friesian koe heeft een verminderde vruchtbaarheid bij dit ras als gevolg. Verminderde vruchtbaarheid kan door vele factoren worden veroorzaakt, één van die factoren is de negatieve energiebalans waarin de melkkoe kort postpartum zich bevindt. Een typisch beeld wat elke melkkoe postpartum doormaakt door de snel op gang komende hoge productie van melk en een verminderde voeropname postpartum. Het afbreken van vetreserves is een logisch gevolg, waardoor de NEFA concentratie zowel in het bloed als in de follikelvloeistof stijgt. Uit eerder onderzoek is gebleken dat de verhouding tussen verzadigde en onverzadigde vetzuren in de follikelvloeistof van belang is voor de eicelkwaliteit. In dit in vivo experiment wordt bij 32 melktypische pinken door middel van een vastenperiode van vier dagen en een model van synchronisatie van superstimulatie de relatie tussen een gestegen NEFA concentratie in het bloed en de fertiliteit onderzocht. Als resultaat valt allereerst het lagere oestrussynchronisatie percentage bij gebruik van een GnRH injectie bij de oestrussynchronisatie op. Ten tweede is er een verschil in superstimulatierepons gevonden tussen de vasten- en controle groep. De follikels van pinken uit de vastengroep waren significant kleiner dan follikels van pinken uit de controle groep. Naar de relatie tussen follikelgrootte en fertiliteit zou verdergaand onderzoek moeten worden gedaan.

1. Inleiding

In Nederland zijn ongeveer 1,2 miljoen melkproducerende koeien en elke koe produceert gemiddeld 8387 kg melk per jaar (CRV jaarverslag 2010-2011). Een topprestatie, die mede dankzij de selectie op melkgift, niet ongevoelbaar is voor de moderne Holstein Friesian koe. De intensieve selectie op melkgift heeft echter nadelige gevolgen gehad voor de vruchtbaarheid van de melkkoe, wat voor de veehouder een grote economische schadepost is (Matabo et al., 2012). Infertiliteit is een multifactorieel probleem met zowel koe gerelateerde factoren; bijvoorbeeld verminderde eikelkwaliteit, als externe factoren zoals huisvesting (Matabo et al., 2012).

Een belangrijke factor bij de verminderde fertiliteit is de metabole status waarin de koe postpartum verkeert. De grote hoeveelheden melk die de koe vroeg-postpartum produceert kosten ontzettend veel energie, waardoor de koe snel in een negatieve energie balans (NEB) terecht kan komen. De NEB wordt veroorzaakt doordat vroeg-postpartum de energievraag niet gecompenseerd kan worden door energie vanuit de voeding als gevolg van een verminderde voeropname (Matabo et al., 2012). Een typisch beeld dat alle melkkoeien doormaken en waarbij 1 op 9 melkkoeien ketotisch wordt (Van der Drift et al., 2012). Ten tijde van deze metabole stress zullen onder andere de vetreserves worden aangesproken en zullen ten gevolge hiervan de non esterified fatty acids (NEFA's) gaan stijgen in het bloed. (Matabo et al., 2012; Leroy et al., 2005)

De NEFA's die vrijkomen ten tijde van metabole stress zijn zowel verzadigde als onverzadigde vetzuren en gebleken is dat de verhouding tussen verzadigde en onverzadigde vetzuren van essentieel belang is voor de eikel kwaliteit (Aardema et al., 2011). Uit onderzoek is namelijk gebleken dat de NEFA concentratie ook in de follikelvloeistof stijgt ten tijde van metabole stress en dat met name de verzadigde vetzuren een negatieve invloed hebben op kwaliteit van de eikel (Leroy et al., 2005, Aardema et al., 2011). Naast hoge NEFA concentraties in het bloed zijn ook lage concentraties van insuline, IGF-1 en glucose samen met de toegenomen concentraties van BHBZ, geassocieerd met een verminderde fertiliteit (Matabo et al., 2012).

Het doel van dit *in vivo* onderzoek is om de relatie tussen een gestegen NEFA concentratie in het bloed en de fertiliteit te achterhalen. Dit wordt gedaan door middel van een vasten periode van vier dagen en een model van synchronisatie en superstimulatie waarna de follikels op de ovaria als maatstaf van fertiliteit wordt gebruikt. Ten eerste wordt de efficiëntie van de oestrussynchronisatie met en zonder GnRH-injectie vergeleken. Ten tweede wordt er naar de aantallen en grootte van de follikels gekeken. De onderzoeksvraag luidt: *Heeft de GnRH-injectie tijdens de oestrussynchronisatie een positief effect op het synchronisatie resultaat en is er een verschil in superstimulatie respons tussen controle en metabool gestresste melktypische pinken?*

O N D E R Z O E K S S T A G E
Departement Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren

De hypothesen hierbij zijn: de GnRH-injectie heeft een positief effect op het oestrussynchronisatie resultaat en gevaste pinken zullen kleinere en minder follikels hebben na de superstimulatie ten opzichte van pinken uit de controle groep.

2. Materiaal en methoden

2.1 Experimentdesign

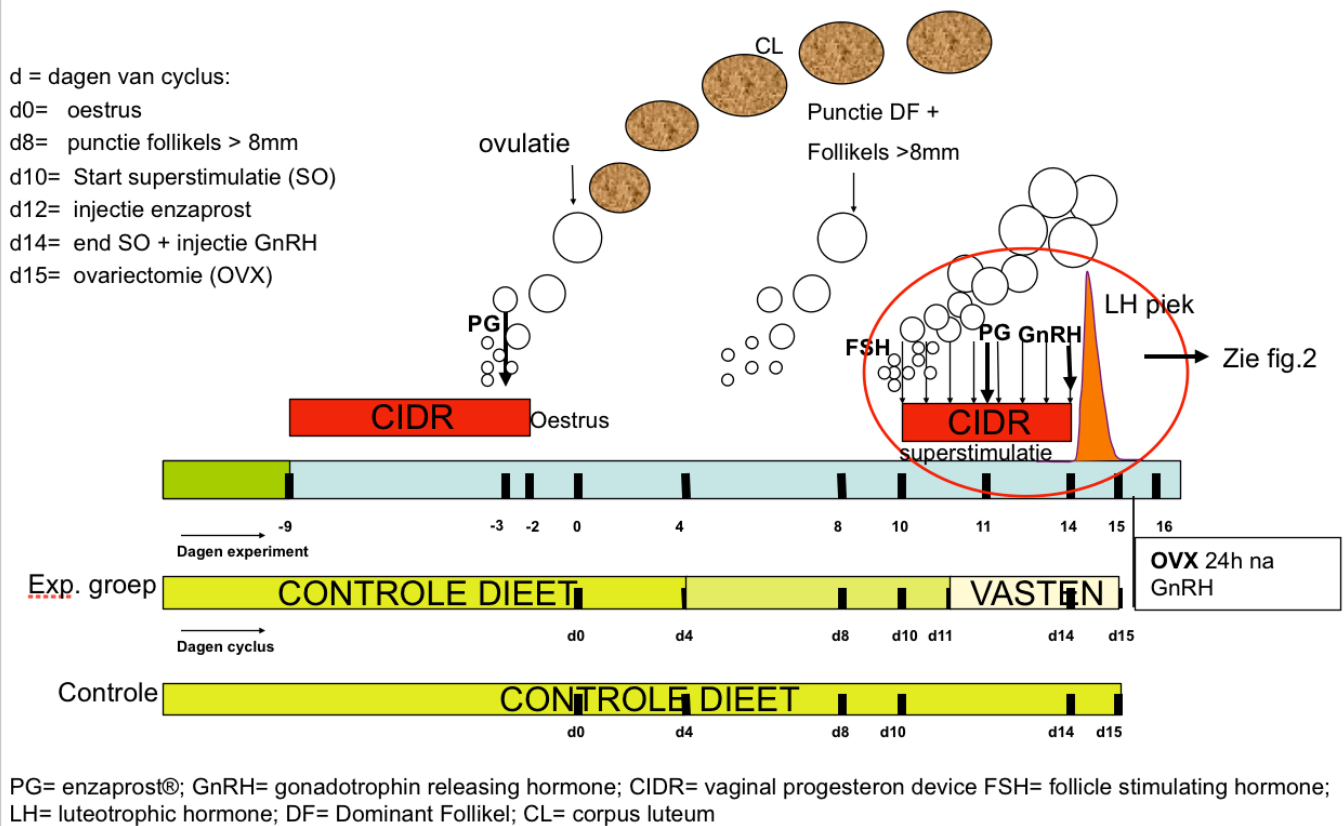
In totaal zullen 32 melktypische pinken participeren aan dit onderzoek, verdeeld over een controle groep (n=16) en een experimentele groep (n=16). De experimentele- of vastengroep zal tijdens de ontwikkeling en finale rijping van de follikel en eikel vier dagen gaan vasten om een hoge NEFA concentratie in het bloed te garanderen. Alle pinken ondergaan een procedure van oestrussynchronisatie, dominante follikel punctie (DFP), superstimulatie en ovariectomie (OVX) (zie *figuur 1*). Het experiment bestaat uit twee trials: trial 1 vond plaats in 2009 en trial 2 in 2011. Beide trials hadden hetzelfde experimentdesign (zie *figuur 1*) op de GnRH injectie op dag - 9 tijdens de oestrussynchronisatie na. Deze injectie is in trial 1 wel gegeven en in trial 2 niet. Een schematische weergave van het experimentdesign is te vinden op pagina 7, *figuur 1*.

De 32 melktypische pinken (14-22 maanden leeftijd) zijn afkomstig van verschillende melkveebedrijven in Nederland zijn ad random geselecteerd voor dit experiment. De 32 pinken zijn Holstein Friesian van ras of een Holstein Friesian kruising met minimaal 50% Holstein Friesian. Per trial zijn 16 pinken ingezet.

De pinken worden binnen gehuisvest, verdeeld over twee identieke (temperatuur en ventilatie) aanbindstallen (2x8). De pinken hebben ad libitum toegang tot kuil en krijgen twee keer daags een halve kilo krachtvoer (zie kopje *Rantsoen*). Het experiment voldoet aan de voorwaarden van de Ethische Commissie, horend bij faculteit diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht.

De pinken zijn in twee groepen pseudo ad random, op basis van de body condition score, verdeeld in een controle- en vastengroep. De vastengroep zal vier dagen, tijdens de ontwikkeling en finale rijping van de follikel en eikel, gaan vasten (zie kopje *Rantsoen*).

Op basis van het synchronisatieresultaat zijn 4 pinken, 2 uit de controle- en 2 uit de vastengroep, retrospectief verwijderd uit het experiment.



Figuur 1: Experimentdesign. In de bovenste balk staat de pre-experimentele periode aangegeven in groen. De synchronisatie loopt van dag -9 tot en met -2 en de superstimulatie loopt van dag 10 tot en met 14. Op dag 8 is de DFP en op dag 15 de OVX. Op de middelste balk staat het rantsoen van de vastengroep en de onderste balk het rantsoen van de controlegroep aangegeven.

2.1.1 Pre-experimentele fase

Tijdens de pre-experimentele fase wordt drie keer per week bloed afgenomen uit de vena jugularis om de progesteron concentratie te bepalen voor monitoring van de cycliciteit van de pinken. Tevens worden de pinken eenmalig onder rectale begeleiding echoscopisch in beeld gebracht, voor het controleren van het vrouwelijke geslachtsapparaat en de cycliciteit.

2.1.2 Oestrussynchronisatie

Om er voor te zorgen dat de pinken in hetzelfde cyclusstadium terecht komen, wordt op dag -9 de oestrussynchronisatie gestart door middel van een intravaginale toedieningsvorm van progesteron (Pfizer, Eazi-Breed™ CIDR®, 1,38 gram). De CIDR blijft zeven dagen in de vagina zitten en 24 uur voordat de CIDR wordt verwijderd (dag -3), krijgen de pinken een prostaglandine injectie (CEVA, Enzaprost®, 5ml, i.m.) (zie figuur 1). De continue toediening van progesteron zal, bij een pink die zich in de folliculaire fase bevindt, ovulatie van een dominant follikel onderdrukken. Wanneer een pink zich in de luteale fase bevindt, zal deze

luteale fase door de progesteron toediening (langer) aanhouden. Na 6 dagen gaat een eventueel aanwezig CL door de prostaglandine injectie in regressie. Samen met het wegvallen van de progesteronbron op dag - 2, zullen de pinken een nieuwe folliculaire groeigolf opstarten en rond dag 0 ovuleren en in oestrus komen. Een goed gesynchroniseerde pink heeft op dag 8 een CL en een progesteronconcentratie groter dan 3 ng/mL. Op dag -9 en - 3 wordt met behulp van echoapparatuur de ovaria in beeld gebracht ter controle van cycliciteit op dag - 9 en de aanwezigheid van follikels en een corpus luteum op experimentdag - 3.

In trial 1 van dit experiment werd op dag - 9 een GnRH-injectie (Intervet, Fertagyl®, 5ml, i.m.) toegediend. De GnRH-injectie leidt tot secretie van FSH en LH uit de hypofyse, wat invloed heeft op aanwezige follikels en CL op het ovarium. Binnen drie dagen na de GnRH-injectie zal bij alle pinken een dominant follikel ontstaan (Kohram *et al.*, 1997; Twagiramungu; 1995), waardoor de pinken kunnen ovuleren op hetzelfde tijdstip (zie *Bijlage 1*). In trial 2 is deze GnRH-injectie niet toegediend.

2.1.3 Dominante follikel punctie

Nadat de pinken zijn gesynchroniseerd volgt de Dominante follikel punctie (DFP) op dag 8 (zie *figuur 1*). De dominante follikel en eventuele andere follikels met een diameter groter dan 8mm, ontstaan in de tweede folliculaire groeigolf, worden gepuncteerd. De punctie zorgt voor het opstarten van een nieuwe folliculaire groeigolf met een beter superstimulatie respons als gevolg.

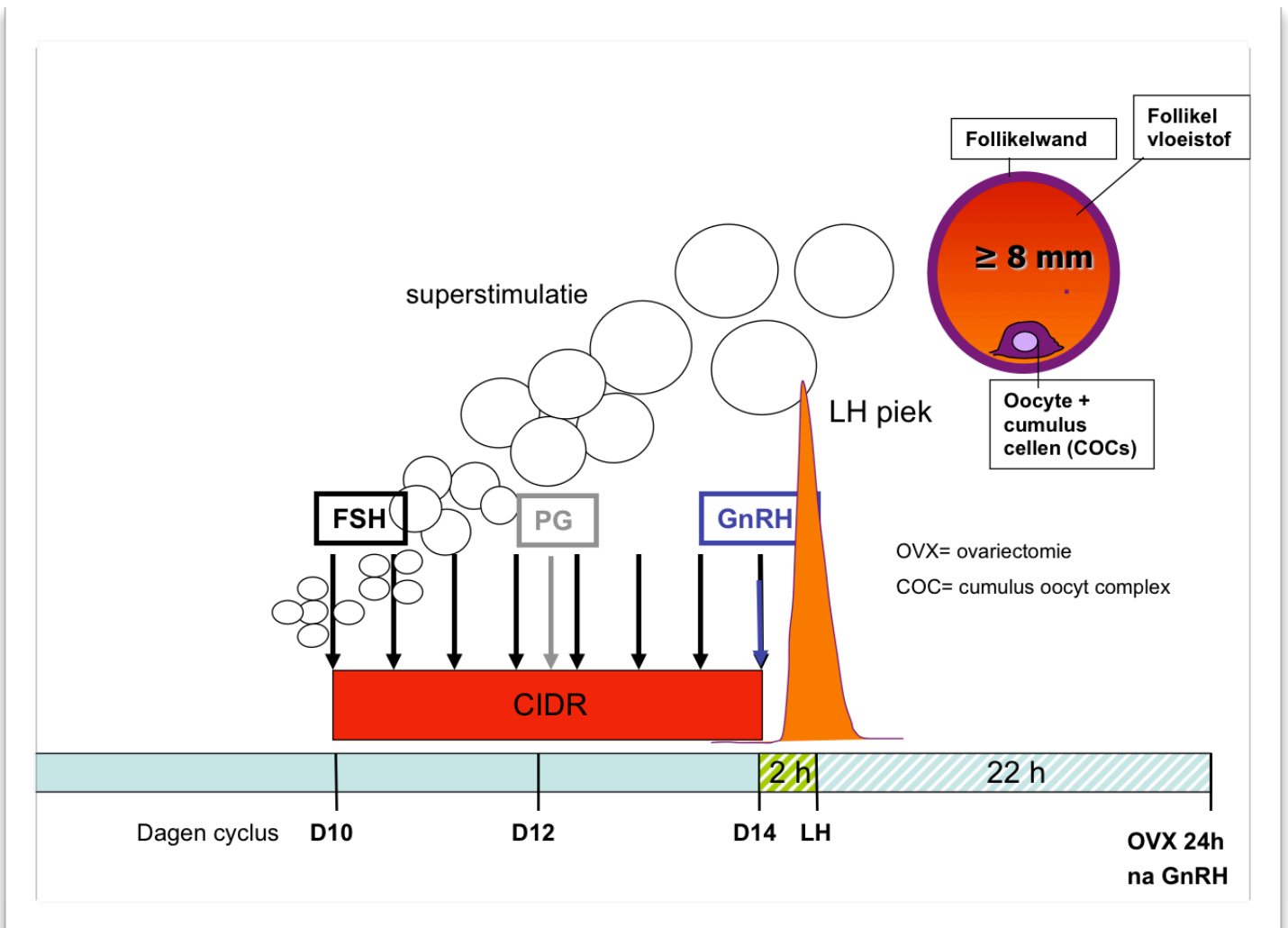
Via het rectum worden de ovaria opgepakt waarna een 50 cm lange naaldhouder met daarin een ultrasound endovaginale sector-transducer (Pieterse *et al.*, 1988) vaginaal wordt ingebracht. Onder begeleiding van deze echo wordt de dominante follikel via de vaginawand met de naald aangeprikt en leeggezogen. Tevens wordt met de echo gescoord op de aanwezigheid van een CL, die bij goed gesynchroniseerde dieren aanwezig zou moeten zijn.

2.1.4 Rantsoen

Tijdens de pre-experimentele fase hebben alle zestien pinken ad libitum toegang tot kuil (opname is gemiddeld 16 kg per dag) en krijgen de pinken twee maal daags een halve kilo krachtvoer (Synchro optimaal, De Heus). De controle groep (n=8) zal het gehele experiment tot en met dag 15 het controle dieet volgen. Het controle dieet bestaat uit ad libitum toegang tot kuil en twee maal daags een halve kilo krachtvoer, net als in de pre-experimentele fase. De vastengroep (n=8) volgt tot en met dag 10 het controle dieet en gaat vervolgens vier dagen vasten, vanaf dag 11 tot en met dag 14 (zie *figuur 1*). Het rantsoen in dit experiment is gebaseerd op het fasting heifer model van Jorritsma *et al.*, 2003

2.1.5 Superstimulatie

Op dag 10 begint de superstimulatie volgens het *postponementmodel* (Vos et al., 1994; Knijn et al., 2008), zoals in *Figuur 2* gedetailleerd is weergegeven. De superstimulatie bestaat uit het inbrengen van opnieuw een CIDR (Pfizer, Eazi-Breed™ CIDR®, 1,38 gram) met als doel het voorkomen van een endogene LH-piek en het, met een tussentijd van 12 uur (2x daags, dag 10-14 nieuwe cyclus), toedienen van in totaal 8 FSH injecties (Bioniche, Folltropin-V®, totaal van 10,0 ml i.m.) in afnemende dosering (2,0 ml, 1,5ml, 1,0ml, 0,5ml). Op dag 12 wordt een prostaglandine injectie (CEVA, Enzaprost®, 10ml, i.m.) toegediend om het CL, ontstaan uit ovulatie na synchronisatie, in regressie te laten gaan. Op dag 14 wordt de CIDR verwijderd en wordt een GnRH (Intervet, Fertagyl®, 5ml, i.m.) injectie toegediend. De GnRH injectie zorgt voor een getimede LH-piek, namelijk 2 uur na toediening (Vos et al., 1994). Gemiddeld vindt 24 uur na de LH-piek de ovulatie plaats bij het rund.



Figuur 2. Postponementmodel volgens Vos et al., 1994 en Knijn et al., 2008

2.1.6 Ovariectomie

Vlak voordat de pinken zullen ovuleren worden de ovaria via een flanksnede uit het lichaam verwijderd. Het staande dier wordt lokaal via de infiltratietechniek met Procaine plus adrenaline (4x 20 ml) geanestheseerd. Via een door-en-door incisie in de linker flank wordt de buikholte geopend en worden de ligamenten van de ovaria afgebonden met een navelklemmetje waarna de ovaria worden verwijderd. De ovaria worden opgevangen in een bekersglas met daarin een warme (30°C) NaCl oplossing (0,9%) en direct in een thermobox naar het laboratorium vervoerd. De snede wordt in vier lagen (peritoneum + m. transversus, m. internus, m. externus + subcutis en huid) met een continue doorlopende hechting en een doorlopende Feston hechting (huid) gesloten. Direct na het verwijderen van de ovaria krijgen de pinken intraveneus antibiotica (Dopharma, Ampidry[®], 25 ml, i.v.) en intramusculair pijnstilling (Merial, Ketofen[®], 5ml, i.m.) toegediend. De dag na de operatie krijgen de pinken nogmaals Ketofen (5 ml, i.m.) toegediend en antibiotica (Norobrittin[®], 25ml, i.m.) zal de eerste en ook de tweede dag na de operatie worden toegediend. Tien dagen na de operatie worden de hechtingen verwijderd.

2.1.7 Follikelmetingen

In het laboratorium worden de follikels groter dan 8 mm gepuncteerd en de follikelvloeistof geaspireerd met een 18 Gauge gevleugelde naald verbonden aan een 10 ml buis onder een verkregen lage druk (vacuümsysteem). Bij elke punctie van een follikel is het systeem verbonden met een nieuwe naald en een nieuwe 10 ml buis waar de follikelvloeistof in wordt opgevangen. Na het verwijderen van de follikelvloeistof wordt het slangetje van het vacuümsysteem nagespoeld met PBS, wat wederom in een nieuwe 10 ml buis wordt opgevangen. Het volume van de follikelvloeistof in elke buis wordt op het oog gemeten en genoteerd. Aan de hand van het volume kan de diameter worden bepaald, zie daarvoor bijlage 2.

Om een eventueel verschil in superstimulatie respons tussen de controle- en vastengroep aan te kunnen tonen heeft er een selectie van follikels plaats gevonden. Alleen follikels met een volume van 300 μ l (diameter van 8,3 mm) of meer worden meegenomen in de bepaling. Dubbel aangeprikte follikels zijn verwijderd uit de data, net als de follikels waarin een atretische eikel zit.

Op het lab wordt er onderscheidt gemaakt tussen kwalitatief goede en kwalitatief slechtere follikels door middel van hormoonbepalingen (met behulp van *solid phase* ¹²⁵I radioimmunoassay methode (Coat-a-count KPG and Coat-a-count TKE respectievelijk, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA)) in de follikelvloeistof. Een kwalitatief goede, gezond, follikel voldoet aan de volgende eisen:

- De progesteron concentratie in de follikelvloeistof is groter dan 142 ng/ml
- De oestradiol / progesteron ratio in de follikelvloeistof is kleiner dan 1

2.2 Bloedafname en analyses

Gedurende het experiment worden dagelijks bloedmonsters uit de vena jugularis afgenomen met verschillende doeleinden:

1. *Progesteronbepaling.* De progesteronconcentratie wordt gedurende de pre-experimentele fase 3 keer per week bepaald. Tijdens het experiment wordt dagelijks de progesteronconcentratie bepaald. De bepaling wordt gedaan ter controle van de cyclus (pre-experimenteel) en de efficiëntie van synchronisatie en de superstimulatie en de werkzaamheid van de PG-injecties (experimenteel). Het bloed voor deze bepaling zal worden opgevangen in een heparine buis.
2. *Bepaling metabole status.* Tijdens het experiment wordt er zeven keer bloed afgenomen om de NEFA en β hydroxybutyraat (BHBZ) concentratie te bepalen. Bloed ter bepaling van de NEFA en BHBZ concentratie wordt opgevangen in een serumbuis.
3. *Oestradiolbepaling.* Tijdens de superstimulatie wordt op dag 10, 11, 12, 13 twee maal daags met 12 uur tussentijd een bloedmonster afgenomen ter bepaling van de oestradiolconcentratie, ter controle van het superstimulatie respons. Het bloed voor deze bepaling zal worden opgevangen in een EDTA-buis.
4. *LH-bepaling.* Op dag 14 wordt er om het uur (vanaf 8.30 uur) in totaal 6x bloed afgenomen ter bepaling van de LH piek die wordt geïnduceerd door de GnRH-injectie op dag 14 (8.30 uur). Om na te gaan of er geen endogene LH-piek heeft plaats gevonden wordt er de avond (dag 13, 20.00 uur) en nacht (dag 14, 0.00, 3.00, 6.00 uur) ervoor ook bloed afgenomen. Het bloed voor deze bepaling zal worden opgevangen in een Natrium-Fosforbuis.

Alle bloedmonsters worden gecentrifugeerd met een snelheid van 3800 rotaties per minuut, gedurende 10 minuten. Progesteron en oestradiol- 17β concentraties zijn gemeten met behulp van een solid phase ^{125}I radioimmunoassay methode (Coat-a-count KPG and Coat-a-count TKE respectievelijk, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA). LH concentraties zijn met behulp van een radioimmunoassay methode bepaald zoals staat beschreven in *Dieleman et al., 1986*. NEFA en BHBZ concentraties zijn bepaald met een colometrische methode, Beckman DXC 600.

2.3 Body Condition Score en lichaamsgewicht

Wekelijks wordt de BCS bepaald door altijd dezelfde ervaren persoon die de koeien op een schaal van 1 tot 5 scoort zoals beschreven staat in *Wildman et al., 1982*. Tevens worden de pinken wekelijks gewogen op een weegschaal.

2.4 Statistiek

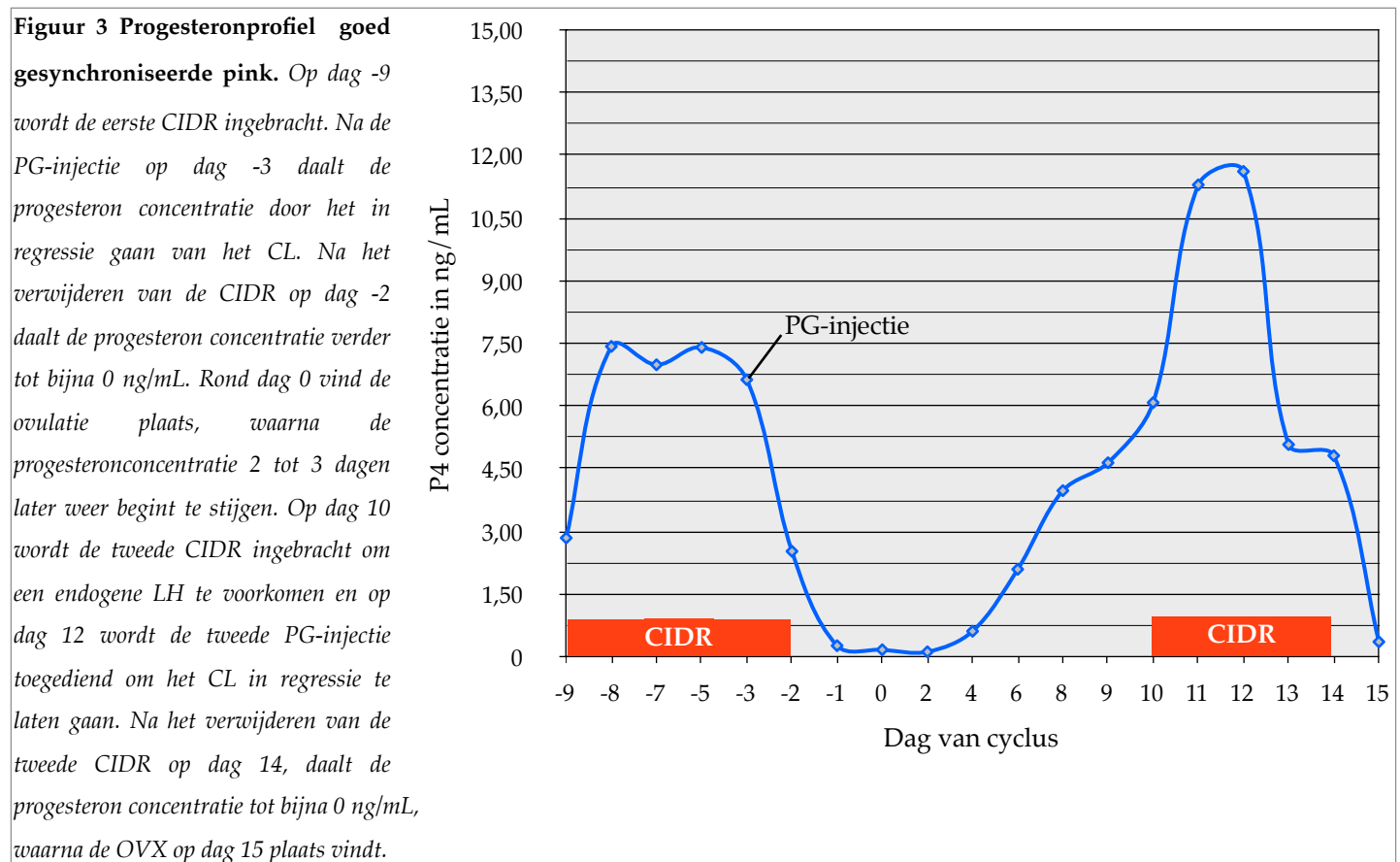
De statistische analyses zijn gedaan met behulp van het programma SPSS16. De *Mann Whitney test* is gebruikt voor het bepalen van verschil in maximale oestradiol-17 β concentratie, NEFA concentratie en BHBZ concentratie tussen de vasten- en controlegroep. Verschil in maximale LH concentratie tussen de vasten- en controle groep is bepaald met een *t-test*. Om aan te tonen of er verschil is in het aantal follikels en het gemiddelde volume van de follikels tussen de vasten- en controlegroep, is gebruik gemaakt van een *lineaire regressie*. De lineaire regressie is ook gebruikt voor het bepalen van een verschil in het aantal kwalitatief goede follikels en het gemiddelde volume van de kwalitatief goede follikels tussen de vasten- en controlegroep. Er wordt een betrouwbaarheidsinterval van 95% gehanteerd waarbij een p-waarde kleiner dan 0,05 als significant wordt beschouwd. Gevonden waarden worden weergegeven als gemiddelden met de standaardafwijking.

3. Resultaten

3.1 Validatie experimentdesign

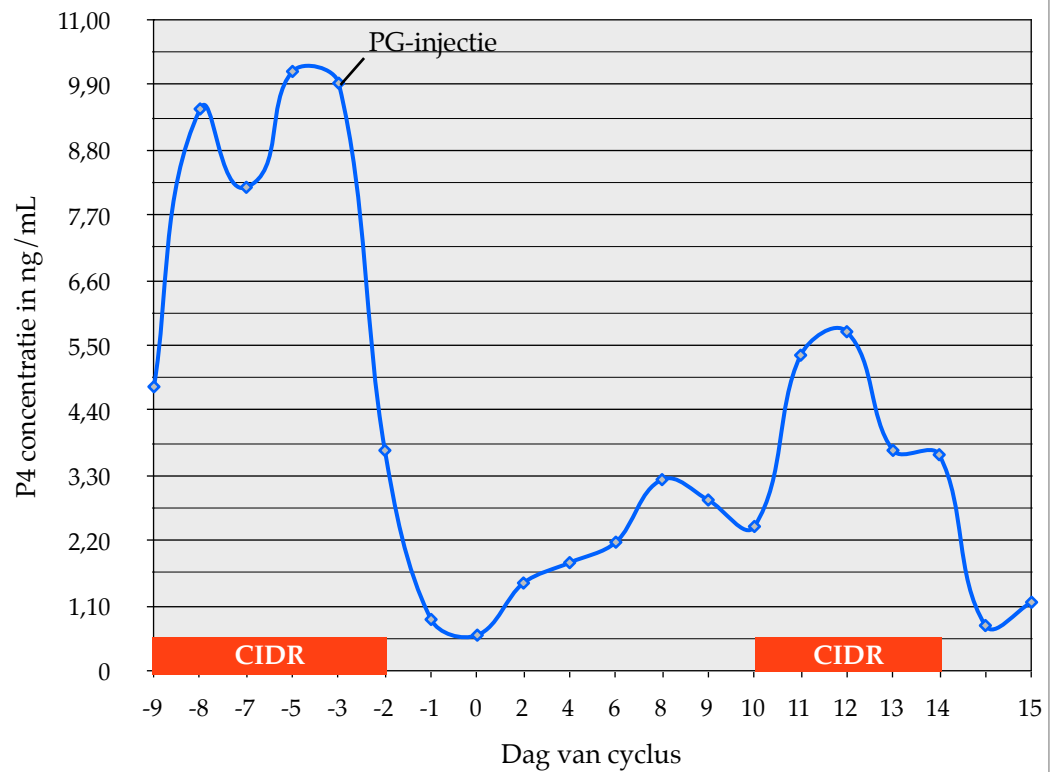
3.1.1 Synchronisatie

Van de 32 pinken zijn 28 pinken gesynchroniseerd in cyclus, wat een slagingspercentage van 87,5% is. Op dag 8 hebben 3 pinken geen CL en een progesteron concentratie van 0,13 ng/ml, 0,07 ng/ml en 0,15 ng/ml en zijn daardoor niet gesynchroniseerd. De vierde pink heeft op dag 8 een progesteron concentratie van 3,32 ng/ml maar geen CL en is daardoor ook niet goed gesynchroniseerd. De vier pinken die niet gesynchroniseerd zijn zaten allen in trial 1 van dit experiment. Het slagingspercentage in trial 1 is 75%, terwijl dat 100% in trial 2 is. Bij 2 van de 4 niet gesynchroniseerde pinken is een duidelijk verschil in progesteron concentratie te vinden tussen dag -2 en 2 ten opzichte van gesynchroniseerde pinken, de periode waarin de pinken zouden moeten ovuleren. Zie hiervoor figuren 3, 4 en 5.



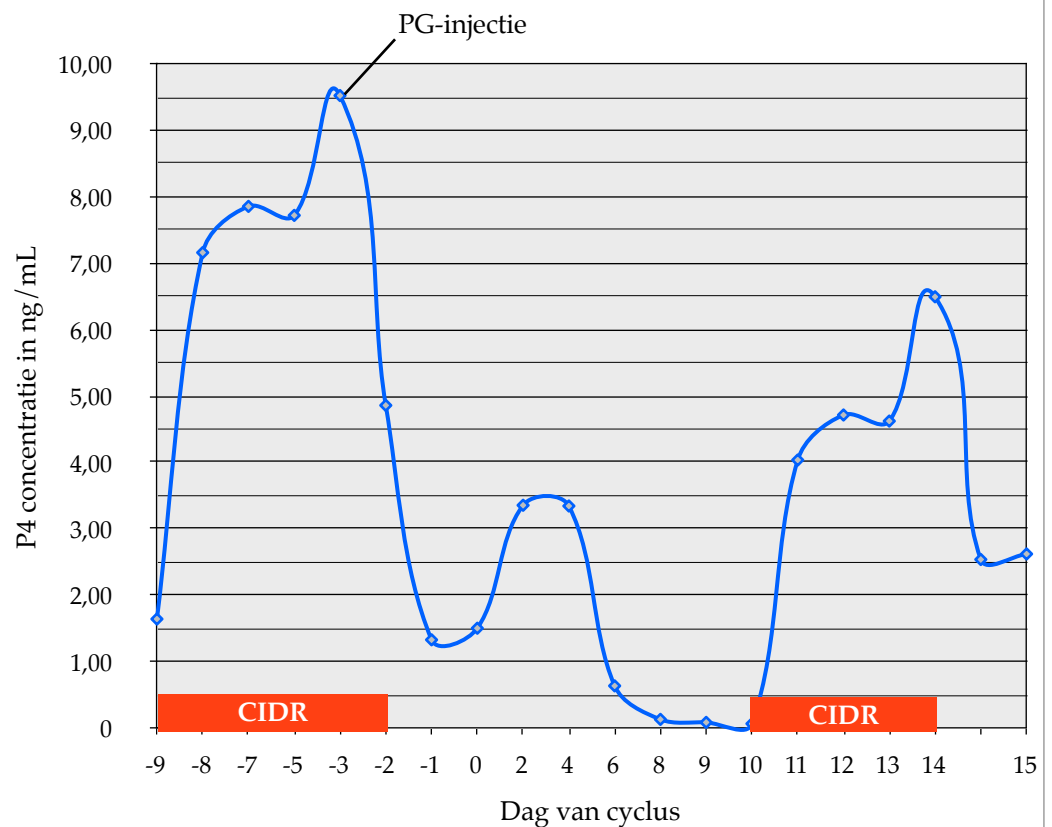
Figuur 4 Afwijkend progesteronprofiel na synchronisatie.

Ten opzichte van figuur 3 is hier duidelijk te zien dat de progesteronconcentratie na het verwijderen van de CIDR op dag -2 niet voldoende, nabij de 0 ng/mL, daalt. Verder is te zien dat de progesteronconcentratie op dag 0 alweer begint te stijgen en de progesteronconcentratie niet lang onder 1 ng/mL blijft.



Figuur 5 Afwijkend progesteronprofiel na synchronisatie.

Ook in dit figuur is duidelijk te zien dat de progesteronconcentratie na het verwijderen van de CIDR op dag -2 niet voldoende daalt en op dag -1 alweer begint te stijgen. Opmerkelijk is ook de daling in progesteronconcentratie na dag 4 tot bijna 0 ng/ml op dag 8,9 en 10 wat duidt op een ovulatie. Tijdens de DFP op dag 8 is bij deze pink tochtstijm geobserveerd en was er geen CL aanwezig. De stijging van progesteronconcentratie na de PG-injectie op dag 12 is opmerkelijk en mogelijk te verklaren door een jong, ongevoelig CL die is gevormd na de ovulatie rond dag 8.



3.1.2 Dominante Follikel Punctie

De aangeprikte dominante follikel van de pinken had een gemiddelde diameter van $13,3 \pm 2,9$ mm. Bij 25 pinken is 1 follikel aangeprikt, bij 2 pinken zijn 2 follikels aangeprikt, bij 1 pink is niets aangeprikt vanwege onbereikbaarheid van het ovarium.

3.1.3 Superstimulatie

3.1.3.1 Oestradiol-17 β

Tijdens de vier dagen van superstimulatie is bij alle 28 pinken een stijging in oestradiol17 β concentratie te zien. De maximale Oestradiol17 β concentratie was voor de controlegroep $10,76 \pm 5,47$ pg/ml en voor de vastengroep $9,35 \pm 3,25$ pg/ml. Er is geen significant verschil ($p = 0,800$) te vinden tussen de controle en de vastengroep voor de maximale Oestradiol17 β concentratie. De gemiddelde basale Oestradiol17 β concentratie op dag 9, 8.00 uur is $1,91 \pm 0,91$ pg/ml.

3.1.3.2 LH

Alle 32 pinken bereiken 2 uur na het toedienen van de GnRH injectie een maximale LH concentratie. De gemiddelde basale LH concentratie, gemeten op dag 22, 20.00 uur, was $0,87 \pm 0,22$ ng/ml en steeg tot een maximale concentratie van $17,88 \pm 7,31$ ng/ml en $24,29 \pm 11,60$ ng/ml voor respectievelijk de controle- en de vastengroep. Er was geen significant verschil, $p = 0,092$, te vinden tussen de controle en de vastengroep voor de maximale LH concentratie.

3.1.3.3 Progesteron

De gemiddelde progesteron concentratie op dag 3 van de superstimulatie voor de vastengroep is $12,52 \pm 1,66$ ng/ml en voor de controlegroep $8,81 \pm 1,97$ ng/ml. De progesteronconcentratie op dag 3 van de superstimulatie van de vastengroep is significant ($p < 0,0001$) hoger dan die van de controle groep.

Op de dag van de OVX is de gemiddelde progesteron concentratie voor de controle groep is $0,62 \pm 1,39$ ng/ml en voor de vastengroep is dat $0,64 \pm 0,21$ ng/ml. Er is geen significant verschil in progesteronconcentratie op de dag van de OVX tussen beide groepen. Opvallend is wel de waarde eenn pink, deze is namelijk $5,44$ ng/ml. Deze zou rond de ovulatie lager dan 1 ng/ml moeten zijn.

3.1.4 Metabool

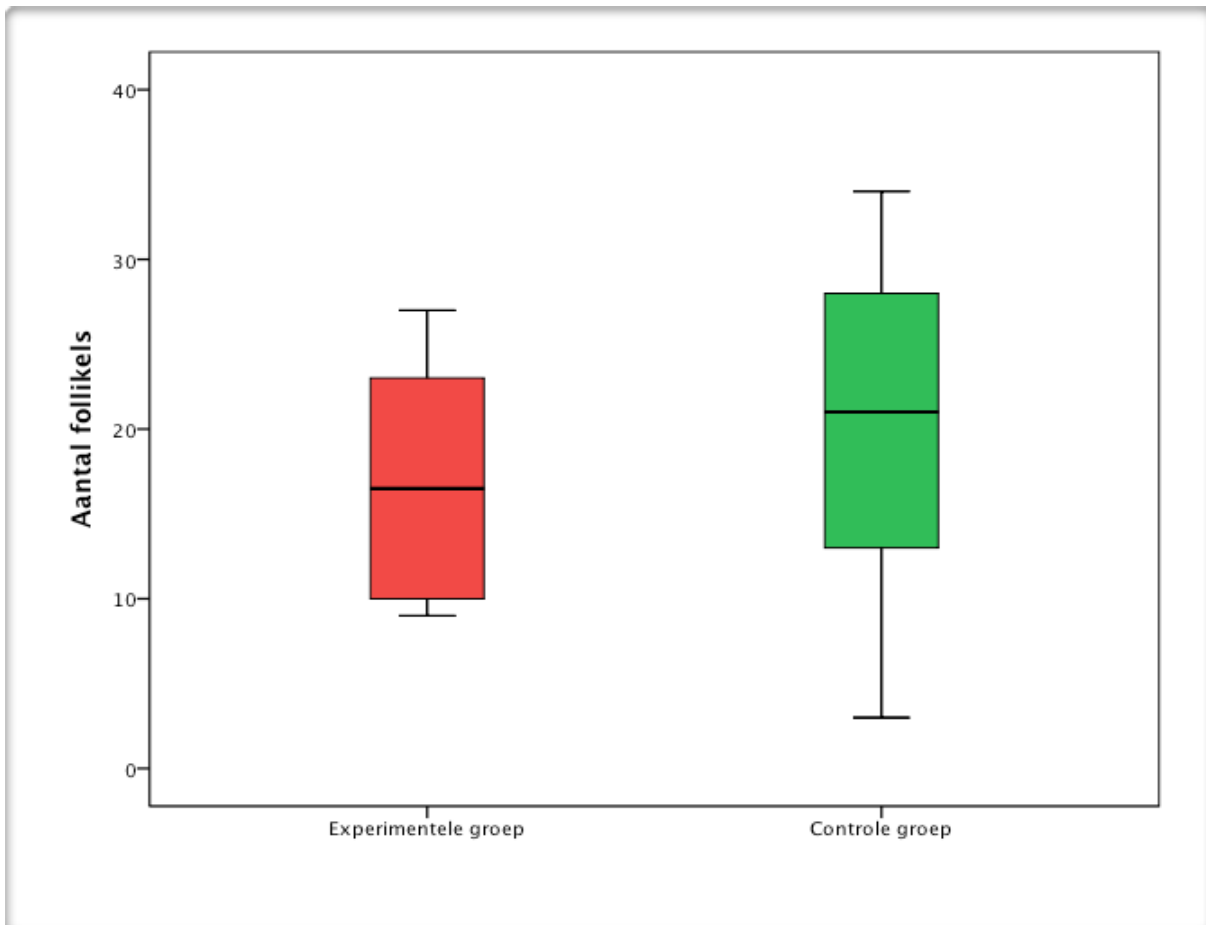
Op dag 15, de dag van de OVX, nadat de vastengroep 4 dagen heeft gevast, is er een significant verschil te vinden tussen de vasten- en controle groep voor NEFA ($p < 0,0001$) en BHBZ ($p < 0,0001$) concentraties in het bloed. De concentratie NEFA en BHBZ is dus na vier dagen vasten significant hoger dan concentraties NEFA en BHBZ concentratie gemeten bij de controle dieren op hetzelfde tijdstip.

3.2 Verschil in superstimulatie respons tussen controle- en vastengroep

3.2.1 Aantal follikels

3.2.1.1 Totaal aantal follikels

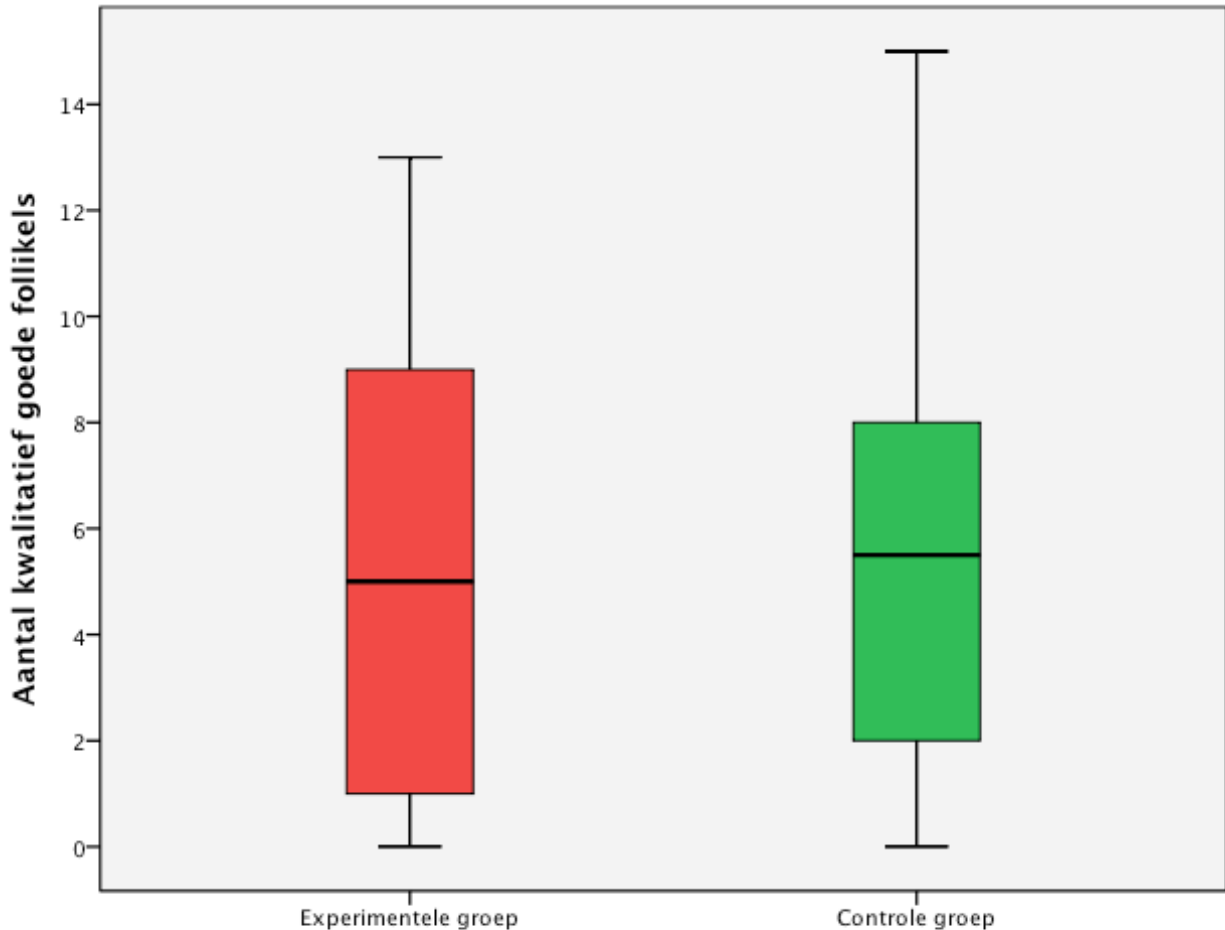
Het gemiddelde aantal follikels in de controle groep is $20,6 \pm 9,0$, voor de vastengroep is dat $17,6 \pm 7,1$. Het totaal aantal follikels uit de controle groep verschilt niet significant ($p=0,306$) met de totaal aantal follikels in de vastengroep (figuur 6).



Figuur 6 Aantal follikels. Boxplot van totaal aantal follikels voor vasten- en controle groep.

3.2.1.2 Aantal kwalitatief goede follikels

Het gemiddelde aantal kwalitatief goede follikels in de controle groep is $5,7 \pm 4,5$, voor de vastengroep is dat $5,0 \pm 4,1$. Het aantal kwalitatief goede follikels uit de controle groep verschilt niet significant ($p=0,697$) met de aantal kwalitatief goede follikels in de vastengroep (figuur 7).

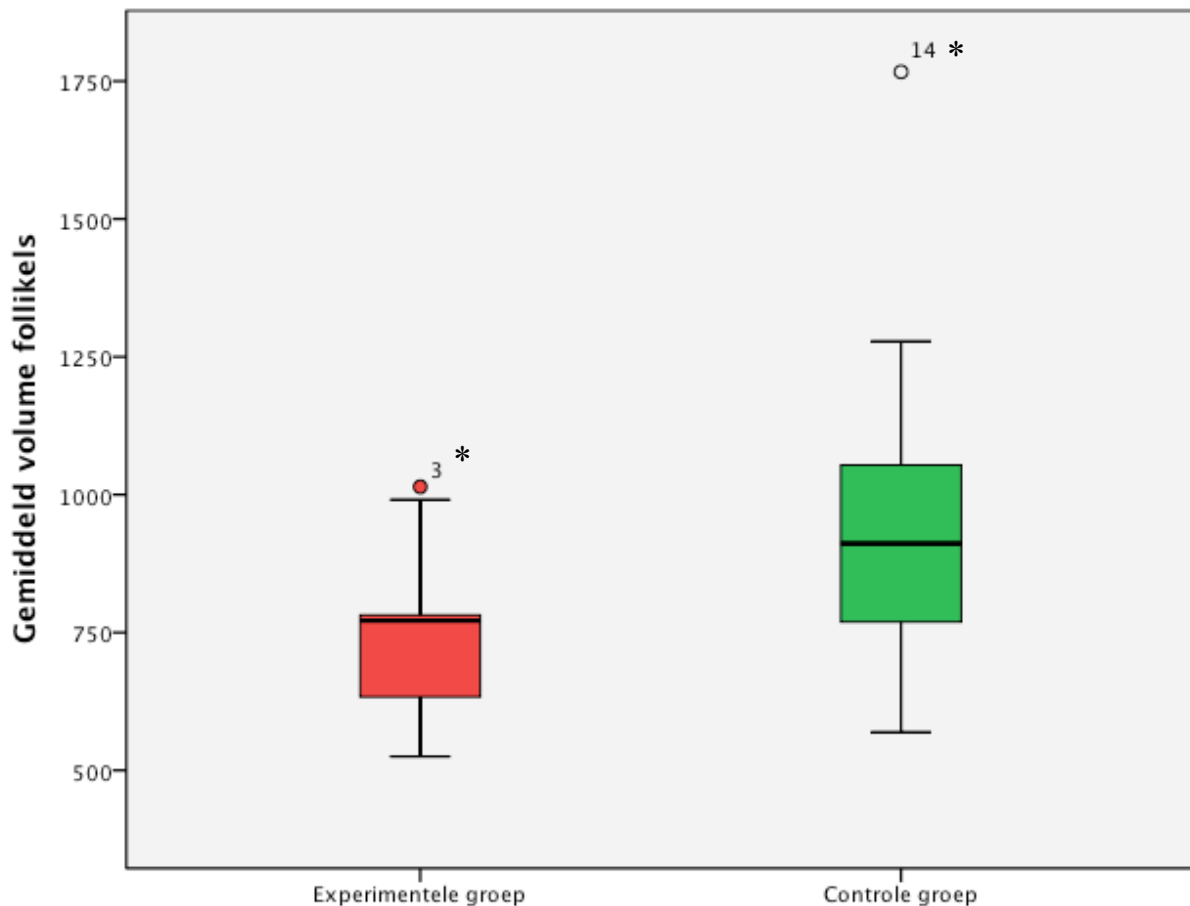


Figuur 7 Aantal kwalitatief goede follikels. Boxplot van aantal kwalitatief goede follikels voor vasten- en controle groep.

3.2.2 Follikel grootte

3.2.2.1 Gemiddelde follikel grootte

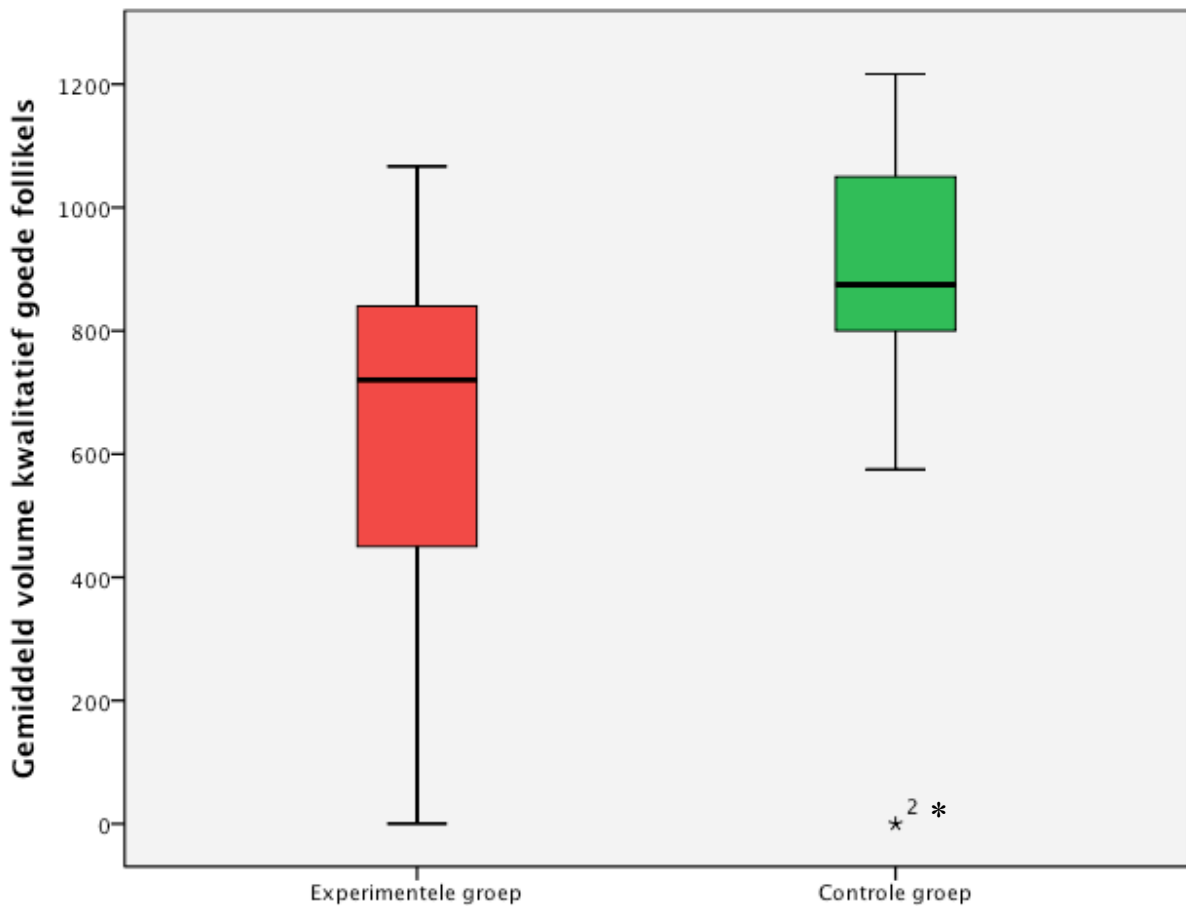
Het gemiddelde volume van de totaal aanwezige follikels per koe is bepaald om vervolgens te bepalen of er een verschil in gemiddelde volume van de follikels is tussen de controle- en de vastengroep (zie *figuur 8*). Het gemiddelde volume van de follikels van pinken uit de controle groep is $975 \pm 318 \mu\text{l}$, voor pinken uit de vasten groep is dat $778 \pm 168 \mu\text{l}$. Er is een significant verschil ($p=0,028$) gevonden tussen de controle en vastengroep in gemiddeld volume van follikels. De gemiddelde volumes van follikels van pinken uit de controle groep zijn significant hoger dan de gemiddelde volumes van follikels van pinken uit de vastengroep. In *Bijlage 2* staan de volumes omgerekend naar diameter.



Figuur 8 Gemiddeld volume follikels. Het gemiddelde volume in microliter van follikels na superstimulatie per dier vergeleken tussen de controle en metabool gestresste groep weergegeven in een boxplot. * resultaten die buiten de box vallen; extreme waarden.

3.2.2.2 Gemiddelde grootte van kwalitatief goede follikel

Hieronder staat het gemiddelde volume van de kwalitatief goede follikels per koe (zie *figuur 6*). Het gemiddelde volume van de kwalitatief goede follikels van pinken uit de controle groep is $857 \pm 297 \mu\text{l}$, voor pinken uit de vasten groep is dat $595 \pm 352 \mu\text{l}$. Er is een significant verschil ($p=0,044$) gevonden tussen de controle en vastengroep in gemiddeld volume van follikels. De gemiddelde volumes van kwalitatief goede follikels van pinken uit de controle groep zijn significant hoger dan de gemiddelde volumes van kwalitatief goede follikels van pinken uit de vastengroep. In *Bijlage 1* staan de volumes omgerekend naar diameter.



Figuur 9 Gemiddeld volume kwalitatief goede follikels. Het gemiddelde volume in microliter van kwalitatief goede follikels na superstimulatie per dier vergeleken tussen de controle en metabool gestresste groep weergegeven in een boxplot. * resultaat dat buiten de box valt; extreme waarde.

4. Discussie

4.1 Oestrussynchronisatie

Een verschil in synchronisatieprocedure tussen trial 1 en 2 is de GnRH injectie op dag -9. De GnRH injectie zorgt er volgens *Kohram et al., 1997* en *Tagiramingu et al., 1995* voor het ontwikkelen van follikels en drie tot vier dagen na toediening van de injectie, het ontstaan van een nieuw dominant follikel. Indien er grote follikels aanwezig zijn op het ovarium zouden deze onder invloed van LH kunnen gaan ovuleren en ontstaat er een nieuw CL (zie *Bijlage 1*). Op dag -3 wordt een PG-injectie toegediend om een aanwezig CL in regressie te laten gaan. Het nieuwe, nog jonge CL zal ongevoelig zijn voor de PG en is daardoor mogelijk niet in regressie gegaan. Gevolg is dat de pink niet in oestrus zal komen en het bereiken van het doel: oestrussynchronisatie, mislukt is. Dit kan het verschil in slagingspercentage van oestrussynchronisatie tussen de twee trials mogelijk verklaren.

De vier pinken die niet zijn gesynchroniseerd zaten allen in trial 1 en het is mogelijk dat bij 2 van de 4 pinken de afwijkende progesteronprofielen te relateren zijn aan de GnRH-injectie op dag -9. Deze pinken hadden een duidelijk afwijkend progesteronprofiel na de synchronisatie, rond de ovulatie op dag 0 (zie *figuren 4 en 5*). Een causaal verband tussen de GnRH-injectie en de mislukte synchronisatie is echter niet aan te tonen. De andere 2 pinken die niet goed gesynchroniseerd zijn hadden niet een duidelijke associatie met de GnRH injectie op dag -9. Een van de pinken was vermoedelijk cysteus waardoor er geen nieuwe groeigolf op gang is gekomen na de oestrussynchronisatie. De andere pink had een sterk verkorte luteale fase na de ovulatie op dag 0 waardoor deze pink op dag 8 wederom heeft geovuleerd.

Bij vier pinken is de CIDR van de synchronisatie 1 dag te laat verwijderd. De progesteronprofielen zijn echter niet afwijkend. Op experimentdag 8 hebben de desbetreffende pinken een progesteron concentratie van 0,3 ng/ml of lager en zullen dus in oestrus komen.

4.2 Dominante follikel punctie

Bij één pink was op dag 8 wel een dominant follikel aanwezig maar was deze vanwege zijn ligging zeer lastig aan te prikken. De follikel is niet aangeprikt, waardoor er waarschijnlijk geen nieuwe groeigolf is opgestart en de dominante follikel mogelijk heeft geïnterfereerd met de andere aanwezige follikels door de productie van inhibine. Het lage superstimulatie respons (in totaal 2 follikels met een volume van 300 μ l of meer) bij deze pink is hier mogelijk door te verklaren.

4.3 Superstimulatie

De superstimulatieprocedure is goed verlopen. Alle dieren toonden stijgende oestradiol-17 β concentraties en een LH piek ongeveer 2 uur na toedienen van de GnRH injectie. Opvallend is wel de significant hogere progesteronconcentratie in de vastengroep op dag 3 van de superstimulatie. Een mogelijke verklaring voor de significant hogere progesteron concentratie bij de vastengroep tijdens de superstimulatie is de vermoedelijk verminderde bloedstroom door de lever ten tijde van metabole stress. *Wiltbank et al., 2012* vond namelijk precies het omgekeerde verschijnsel bij hoog productieve dieren: een toegenomen bloedstroom door de lever, waardoor er meer progesteron wordt afgebroken. Bij een verminderde bloedstroom zal er minder progesteron in de lever worden afgebroken en dus de concentratie in het bloed hoog blijven.

Op de dag van de ovulatie, dag 15, heeft één pink een hoge progesteron concentratie, namelijk 5,44 ng/mL, ondanks dat het een controle dier is. Een mogelijke verklaring hiervoor is de hormoonbehandeling tijdens de superstimulatie. De oplossing die wordt gegeven tijdens de superstimulatie bestaat niet enkel uit FSH, maar bezit ook LH. De ratio LH: FSH in de oplossing is klein, maar het aanwezige LH leidt tot progesteronproductie in de granulosa cellen.

4.4 Metabole factoren

De vastengroep heeft een significant hogere NEFA concentratie in het bloed tijdens de vastenperiode ten opzichte van pinken uit de controle groepen. Tijdens het vasten worden vetreserves afgebroken en ontstaan er NEFA's om de energievraag te beantwoorden. De NEFA concentratie stijgt ook in de follikelvloeistof tijdens metabole stress (*Leroy et al., 2005, bevindingen Aardema et al., 2009 unpublished*). Somatische cellen kunnen vetzuren gebruiken als alternatieve energiebron middels mitochondriale verbranding. Vetzuren kunnen ook in triacylglycerol of cholesterolesters worden omgezet en vastgelegd als neutrale lipide in vetdruppels. Gebleken is dat vetzuren ook in de eicel kunnen worden opgenomen en geïncorporeerd kunnen worden in vetdruppels. Opgeslagen vet in vetdruppels kan door de eicel gebruikt worden als energiebron en verder kan het zo zijn dat het opslaan van vetzuren in de vetdruppel de eicel beschermt tegen potentieel gevaarlijke vetzuren. De ontwikkelingscompetentie van een eicel is verbeterd wanneer het vetdruppels heeft opgeslagen. (*Aardema et al., 2011*)

Het hangt er echter van af aan welke vetzuren de eicel wordt blootgesteld tijdens de maturatie. Ten tijde van metabole stress, waar in de vastengroep sprake van is, zullen vooral palmitine-, olie- en stearinezuur aanwezig zijn in het bloed en in de follikelvloeistof (*Leroy et al., 2005, bevindingen Aardema et al., 2011 unpublished*).

Gebleken is dat palmitaat en stearaat, beide verzadigde vetzuren, aanwezige lipiden in de eicel reduceren en een negatieve invloed hebben op de kwaliteit van de eicel. Het enkelvoudig onverzadigde vetzuur, oleaat, is aan de andere kant onschadelijk tijdens in vitro rijping van eicellen en zorgt voor een toename van de vetvoorraad in de eicel. Daarnaast bleek oleaat zelfs in staat om schadelijke effecten van verzadigde vetzuren te neutraliseren. Niet alleen de concentratie maar ook de verhouding van verzadigde en onverzadigde vetzuren zijn dus van belang voor de ontwikkelingscompetentie van de maturerende eicel. (Aardema et al., 2011)

Hoewel er niets bekend is over de verhouding tussen de verzadigde en onverzadigde vetzuren in de follikelvloeistof bij deze pinken is er wel een significante ($p < 0,0001$) negatieve correlatie te vinden tussen de NEFA concentratie in het bloed en de gemiddelde grootte van de follikels. Een hoge NEFA concentratie beïnvloedt dus negatief de follikelgrootte.

Naast de significante stijging van de NEFA concentratie in het bloed is er ook een significantie stijging van het ketonlichaam β -hydroxybutyraat (BHBZ) concentratie in het bloed tijdens de vastenperiode. BHBZ ontstaat na ketogenese in hepatocyten uit butyraat, het is een ester van boterzuur die vrijkomt tijdens de vetmobilisatie ten tijde van metabole stress. (Sakha et al., 2006) Ketogenese is een proces dat energie oplevert, wat nuttig is ten tijde van metabole stress. Ook tussen de BHBZ concentratie en de gemiddelde follikelgrootte is een significante ($p < 0,0001$) negatieve correlatie gevonden. Een hoge BHBZ concentratie beïnvloedt dus negatief de follikelgrootte.

4.2 Aantal follikels

De aantallen follikels, zowel het totaal aantal als het aantal kwalitatief goede follikels, per vastengroep verschilt niet significant. Er bestaat in dit experiment individuele variatie, desalniettemin had 96,4% van de pinken 5 follikels met tenminste een diameter van 8 mm had en 85,7% van de pinken tenminste 1 kwalitatief goede follikel. Verlenging van de tijd tussen de PG injectie en de LH piek zou mogelijk de variatie in respons tussen de pinken mogelijk verkleind hebben doordat alle follikels de kans krijgen zich te ontwikkelen tot een kwalitatief goede follikel dat in staat is op de LH piek te reageren (Vos et al., 1994).

4.3 Follikelgrootte

In dit experiment is een significant verschil in follikelgrootte tussen de controle en de vastengroep aangetoond. Het gemiddelde volume van follikels van pinken uit de controle groep was significant groter dan follikels van pinken uit de vastengroep.

Zoals eerder genoemd lijkt metabole stress, hoge NEFA en BHBZ concentratie, de follikelgrootte negatief te beïnvloeden, dit resultaat vond *Jorritsma et al., 2003* ook. In dat onderzoek waren de follikels van dieren die hebben gevast ook significant kleiner dan follikels van gevoede dieren. Als verklaring voor de significante kleinere follikels noemt *Jorritsma et al., 2003* de beïnvloeding van het vasten op de hypothalamus. De hypothalamus is een belangrijk en gevoelig regelcentrum, dat snel verstoord kan raken door bijvoorbeeld metabole veranderingen bij vasten (*Kuhla et al., 2007*). De hypothalamus van het rund kan zich goed aanpassen aan rantsoenwisselingen waarbij de nutrientconcentratie in het bloed verandert (*Kuhla et al., 2007*). Bewezen is dat de aanpassing zich kenmerkt door het up- of downreguleren van bepaalde eiwitten in de hypothalamus waardoor bij metabole stress onder andere vetreserves worden aangebroken om de energie homeostase te handhaven (*Kuhla et al., 2007*). Wellicht vinden er ook veranderingen in de hypothalamus plaats ten tijde van metabole stress die invloed hebben op de follikelgrootte, waardoor de significant kleinere follikels verklaard kunnen worden. Verdergaand onderzoek zou hiervoor nodig zijn.

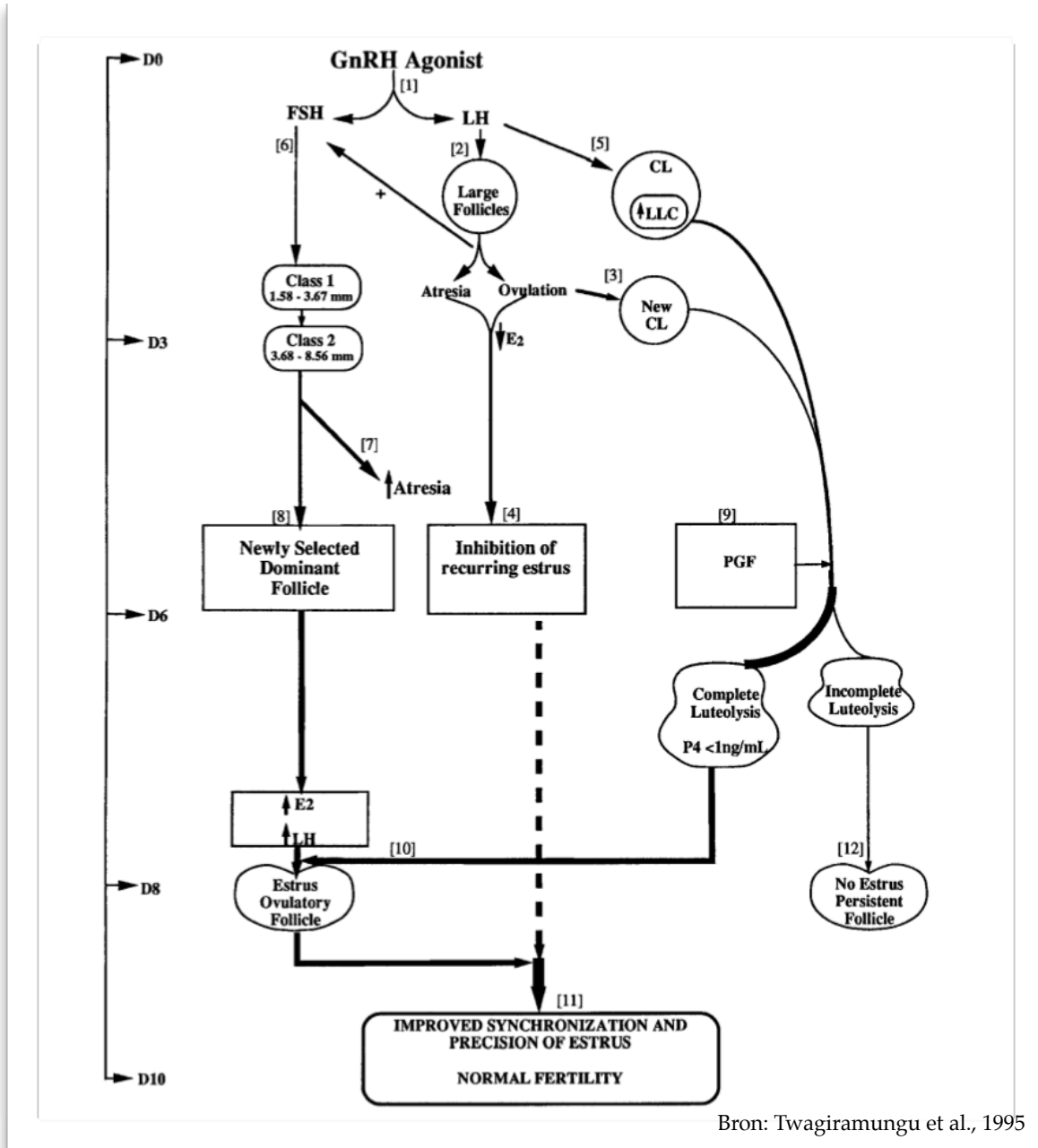
Bij berekeningen met de volumes van de follikels zijn gemiddelden per koe gebruikt, waardoor het aantal follikels per koe is verwaarloosd. Wanneer er gebruik wordt gemaakt van sommatie van de volumes van de follikels per koe is er geen significant verschil te vinden in follikel grootte tussen de vasten- en controlegroep voor zowel het totaal aantal follikels als het aantal kwalitatief goede follikels.

5. Conclusie

Concluderend kan worden gesteld dat de GnRH injectie *in dit experiment* geen positief, maar eerder een negatief effect heeft gehad op de oestrussynchronisatie, in tegenstelling tot de hypothese. Er is echter geen causaal verband tussen de GnRH-injectie en de mislukte oestrussynchronisatie aan te tonen. Er is een verschil in superstimulatie respons tussen controle en metabool gestresste melktypische pinken na een gepaste procedure van synchronisatie en superstimulatie. Het verschil dat is aangetoond, is een verschil in follikelgrootte, zowel voor het totale aantal als voor het aantal kwalitatief goede follikels. Metabool gestresste pinken hadden significant kleinere follikels dan controle pinken. Er is een negatieve correlatie gevonden tussen de follikelgrootte en NEFA concentratie en tussen de follikelgrootte en BHBZ concentratie. De aantallen follikels, voor zowel het totale aantal als het aantal kwalitatief goede follikels, verschilden niet significant tussen de controle en metabool gestresste pinken, waardoor ook op dit vlak de hypothese dus niet geheel is uitgekomen. Een mogelijk vervolgonderzoek zou een onderzoek kunnen zijn naar de relatie tussen follikelgrootte en drachtigheidspercentages bij de melkkoe.

6 Bijlagen

6.1 Bijlage 1



Model voor effect van GnRH op follikels tijdens de oestrussynchronisatie. Op dag 0 wordt de GnRH injectie toegediend waardoor het vrijkomen van FSH en LH [1] wordt gestimuleerd. Indien er grote follikels op de ovaria aanwezig zijn op dag 0 worden deze door de LH secretie gelutheniseerd en kunnen ze gaan ovuleren [2] en zo ontstaat er een nieuw CL [3]. Wanneer er een CL aanwezig op dag 0 neemt het aantal grote luteale cellen (LLC) toe [5]. De FSH secretie [6] stimuleert de andere aanwezige follikels uit klasse 1 tot groei en leidt voornamelijk tot artresie [7] van follikels uit klasse 2. Binnen 3 tot 4 dagen na de GnRH injectie is een nieuw dominant follikel gevormd [8]. Wanneer de PGF injectie [9] leidt tot een complete luteolyse zal de dominante follikels een ovulatoir follikel [10] worden en door de toegenomen concentraties van oestradiol en LH zal deze ovuleren [11]. Indien de luteolyse incompleet is zal de pink niet ovuleren [12] en wordt er geen oestrus waargenomen.

6.2 Bijlage 2

Omreken tabel van volume in μl naar diameter in mm. Berekend met behulp van de volgende formule:

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3$$

. Waarin V staat voor volume en r voor de straal.

Volume (μl)	diameter (mm)
300	8,3
400	9,1
500	9,8
600	10,6
700	11,0
800	11,5
900	12,0
1000	12,4
1100	12,8
1200	13,2
1300	13,5
1400	13,9
1500	14,2
1600	14,5
1700	14,8
1800	15,1
1900	15,4
2000	15,6
2100	15,9
2200	16,1
2300	16,4
2400	16,6
2500	16,8

7. Referenties

- Aardema H., Vos P.L.A.M., Lolicato F., Roelen B.A.J., Knijn H.M., Vaandrager A.B., Helms J.B., Gadella B.M., 2011, Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence, *Biology of reproduction*, **85**: 62-69
- CRV jaarverslag 2010-2011, via www.cr-delta.nl geraadpleegd op 14-03-2012
- Dieleman S.J., Bevers M.M., Van Tol H.T.M., Willemsse A.H., 1986, Peripheral plasma concentrations of oestradiol, progesterone, cortisol, LH en prolactin during the oestrus cycle in the cow emphasis on the peri-oestrus period, *Animal Reproduction Science*, **10**: 275-292
- van der Drift S.G.A., Jorritsma R. 2012, veel variatie in ketose, *Veeteelt*, **2**: 44-45
- Jorritsma R., Wensing T., Kruip T.A.M., Vos P.L.A.M., Noordhuizen J.P.T.M., 2003, Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows, *Veterinary research*, **34**: 11-26
- Jorritsma R., M. W. de Groot , P. L. Vos , T. A. Kruip , T. Wensing , J. P. Noordhuizen, 2003. Acute fasting in heifers as a model for assessing the relationship between plasma and follicular fluid NEFA concentrations. *Theriogenology*, **60**: 151-161.
- Knijn H.M., Fokker W., Van der Weijden G.C., Dieleman S.J., Vos P.L.A.M., 2008, Effects of superovulation with oFSH and Norgestomet/GnRH-controlled release of the LH surge on hormone concentrations, and yield of oocytes and embryos at specific development stages. *Reproduction of domestic animals*, **15**:1493-1499
- Kohram H., Twagiramungu H., Bousquet D., Durocher J., Guilbault L.A., 1997, Ovarian superstimulation after follicular wave synchronization with GnRH at two different stages of the oestrus cycle in cattle, *Theriogenology*, **49**: 1175-1186
- Kohram H., Bousquet D., Durocher J. and Guilbault L.A., 1998, Alteration of follicular dynamics and superovulatory responses by gonadotropin releasing hormone and follicular puncture in cattle: a field trial, *Theriogenology*, **49**: 1165-1174
- Kuhla B., Kuhla S., Rudolph P.E., Albrecht D., Metges C.C., 2007, Proteomics analysis of hypothalamic response to energy restriction in dairy cows, *Preteomics*, **7**: 3602-3617
- Leroy J.L.M.R., Vanholder T., Mateusen B., Christophe A., Opsomer G., De Kruif A., Genicot G., Van Soom A., 2005, Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their developmental capacity of bovine oocytes in vitro, *Reproduction*, **130**: 485-495
- Matoba S, O'Hara L. , Carter F, Kelly A.K. , * T. Fair T., Rizos D., Lonergan P., 2012, The association between metabolic parameters and oocyte quality early and late postpartum in Holstein dairy cows, *Journal of Dairy Science*, **95**: 1257-1266
- Pieterse M.C., Kappen K.A., Kruip T.A. and Taverne M.A.M., 1988, Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries, *Theriogenology*, **30**: 751-762
- Sakha M., Ameri M., Rohbakhsh A., 2006, Changes in blood B-hydroxybutyrate and glucose concentrations during dry and lactation periods in Iranian Holstein cows, *Comparative Clinical Pathology*, **15**: 221-226
- Twagiramungu H., Guilbault L.A., Dufour J.J., 1995, Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review, *Journal of Animal Science*, **73**: 3141-3151
- Vos P.L.A.M., Bevers M.M., Willemsse A.H. and Dieleman S.J., 1994 Effects of suppression by a progesterone-releasing intravaginal device and subsequent induction by GnRH of the preovulatory LH surge on follicular function on PMSG/PG-treated heifers. *J Reprod and Fertil*, **101**: 43-49

Wiltbank M.C., Souza A.H., Carvalho P.D., Bender R.W., Nascimento A.B., 2012, Improving fertility to timed insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle, *Reproduction, Fertility and Development*, **24**: 238-243

Wildman E.E., Jones G.M., Wagner P.E., Boman R.L., Troutt H.F., Lesch T.N., 1982, A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics, *Journal of Dairy Sciences*, **65**: 495-501