

### **3.1.5.2.2. Reaktion des dominanten Follikels am 10. Zyklustag auf eine PGF<sub>2</sub>α-Applikation**

Nach einer täglich vorgenommenen Ultraschallkontrolle, ausgehend vom Tag 0 (Brunst) bis hin zum 10. Zyklustag, wurde bei 14 Kühen am Tag 10 PGF<sub>2</sub>α in einer Dosis von 25 mg/Tier (Dinoprost, Glandin N<sup>®</sup>, Lohmann Animal Health) i.m. appliziert.

An diese PGF<sub>2</sub>α Applikation schloß sich eine tägliche ultraschallgestützte Ovarkontrolle an. Zusätzlich wurden die Tiere mehrmals am Tag auf das Auftreten von Brunstsymptomen hin untersucht.

### **3.1.5.2.3. Beobachtung der Follikeldynamik nach Entfernung des dominanten Follikels und PGF<sub>2</sub>α-Applikation am 10. Zyklustag**

Zeitgleich zur Entfernung des DF am 10. Zyklustag wurde bei 7 Kühen 25mg PGF<sub>2</sub>α pro Tier i.m. appliziert.

Die Tiere wurden nach der Behandlung täglich mittels Ultraschall auf ihre Ovarbefunde hin untersucht. Weiterhin wurde das Auftreten der Brunst überprüft.

### **3.1.5.3. Untersuchungsabschnitt III: Zum Einfluß des dominanten Follikels auf Follikelpopulation bzw. -reifung nach PMSG/PGF<sub>2</sub>α- Stimulation**

#### **3.1.5.3.1. Probenentnahme aus dem dominanten Follikel am 10. Tag des Zyklus**

Auch hier wurde die schon vorher angewandte Methodik der manuell geleiteten transvaginalen Punktion angewandt. Die Vorgehensweise gestaltete sich identisch, wobei abweichend vom unter 3.1.5.2.1. dargestellten Untersuchungsprotokoll nicht der gesamte DF-Inhalt aspiriert wurde, sondern lediglich das festgelegte Volumen von 50 µl. Darüber hinaus kam in diesem Untersuchungsabschnitt eine feinere Punktionskanüle (0.8 × 500mm, Schliffwinkel: 45° Firma Arno Schnorrenberg, Berlin) zum Einsatz. Der Probenentnahme ging in allen Fällen eine sonographische Beurteilung der Ovarien voraus. Dabei wurde insbesondere der Durchmesser des DF mit seiner Lokalisation auf dem Ovar erfaßt.

### 3.1.5.3.2. Follikelpunktion, Follikelstimulation und Superovulation:

Das Protokoll des Untersuchungsabschnitts III wurde in Tabelle 8 durchgeführt.

1. Insgesamt wurden zwölf Färsen in diese Untersuchung einbezogen, welche im Rahmen eines IVF- Programmes im Besitzerauftrag behandelt wurden.
2. Ausgehend vom Tag des Programmstartes wurde jedes Tier täglich mittels Ultraschall in Hinblick auf die Follikeldynamik sowie die Anbildung des DF untersucht.
3. Bei Tieren der Gruppe 1 (4 Färsen) wurde am 9. Zyklustag der vorhandene DF vollständig mittels Punktion entfernt (s. 3.1.5.2.1.).
4. An einer Gesamtzahl von acht Tieren wurden am 10. Zyklustag eine Probenentnahme aus dem DF durchgeführt. Die Punktate wurden auf  $E_2$  und  $P_4$  untersucht. Anhand des  $E_2/P_4$ -Verhältnis in der Flüssigkeit des DF wurden die acht Tiere in zwei Gruppen eingeteilt: Gruppe 2  $E_2/P_4 \leq 1$  und Gruppe 3  $E_2/P_4 > 1$ .  
Gleichzeitig wurde all diesen Tieren am 10. Zyklustag PMSG intramuskulär appliziert (Intergonan<sup>®</sup>, Intervet; 2000 I.E. pro Färse).
5. An den folgenden vier Tagen wurde die Follikeldynamik täglich mittels Ultraschall erfaßt.
6. Am Tag 12 erhielt jedes Tiere  $PGF_2\alpha$  intramuskulär (25mg/Tier).
7. Am Tag 14 wurde der Inhalt sonographisch darstellbarer Follikel mittels Punktion aspiriert, wobei versucht wurde den Follikelinhalt möglichst vollständig zu gewinnen.
  - Der Follikelinhalt wurde mittels einer Punktionskanüle (1,2×500 mm, Schliffwinkel 45°)(s. 3.1.5.2.1.) aspiriert. Die gesamte Manipulation wurde im Stall wie unter 3.1.5.2.1. vorgenommen.
  - Um einer Koagulation der gewonnenen Flüssigkeit bei eventueller Aspiration von Blut vorzubeugen, wurden 2ml Medium (NaCl + Heparin 2.2 I.E./ml ) in der Punktionskanüle vorgelegt.
  - Das Punktionsverfahren sah vor, daß jeder zu gewinnende Follikelinhalt separat erfaßt wurde und unmittelbar nach der Punktion in 15 ml Röhrchen (SARSTEDT<sup>®</sup>, Nümbrecht) überführt wurde.
  - Voraussetzung für diese individuelle Punktionstechnik war, daß die Punktionskanüle für jede Punktion vollständig neu in das Tier eingebracht wurde, wobei der als Führung dienende Besamungskatheter intravaginal plaziert bleiben konnte.
  - Während und nach Abschluß der Manipulationen wurde parallel die Situation im Ovar sonographisch dargestellt (Abb. 3).

Tab. 8: Protokoll des Untersuchungsabschnitts III:

Zyklustag	Gruppe 1 (n = 4)	Gruppe 2 & 3 (n = 8)
9	Entfernung des DF	
10	PMSG-Applikation	PMSG-Applikation Entnahme von Flüssigkeit aus DF Hormonanalyse der Punktate (E <sub>2</sub> & P <sub>4</sub> ) Einteilung der Tiere anhand E <sub>2</sub> /P <sub>4</sub> : Gruppe 2: E <sub>2</sub> /P <sub>4</sub> ≤ 1 Gruppe 3: E <sub>2</sub> /P <sub>4</sub> > 1
12	PGF <sub>2</sub> α-Applikation	
14	Aspiration der stimulierten Follikel Hormonanalyse der Follikelflüssigkeit (E <sub>2</sub> & P <sub>4</sub> ) Klassifizierung der COK*	

\*COK: Cumulus Oozyten Komplexe

### 3.1.5.3.3. Oozytenklassifizierung aus stimulierten Follikeln

Im Labor wurde das Sediment des Punktates mittels einer Pasteurpipette abgesaugt und in eine Petrischale überführt.

Unter 15facher Vergrößerung wurde der COK unter dem Stereomikroskop (Semi 2000, Karl ZEISS, Jena) aufgesucht und mit Hilfe einer Unopette in eine zweite Petrischale welche, NaCl (0,9 %) enthielt, überführt.

Im Falle einer durch Blutbeimengung bedingten Trübung des Sediments wurde dieses vorab mit etwas NaCl (0,9 %) ausverdünnt.

Unter Inversoptik (Telaval 31, Karl ZEISS, Jena) erfolgte abschließend die morphologische Klassifizierung der COK anhand eines Bewertungsschlüssels nach De LOOS et al. (1990):

- Kategorie 1                      Kompakter Cumulus:  
    Cumuluszellenverband eng und dicht gelagert  
    (Abb. 4b)

- Kategorie 2

Expandierter Cumulus:

Cumuluszellverband aufgelockert,

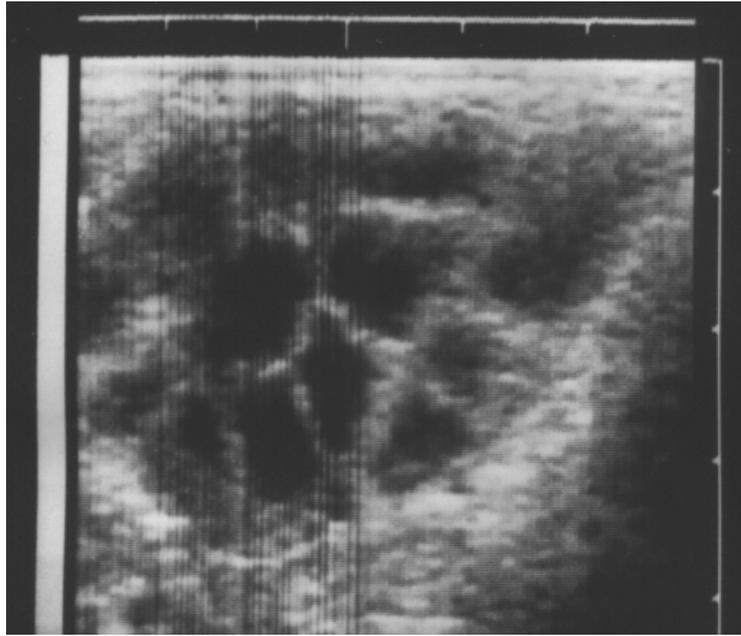
Strahlen- und Spindelförmige Cumuluszellmorphologie

(Abb. 4a)

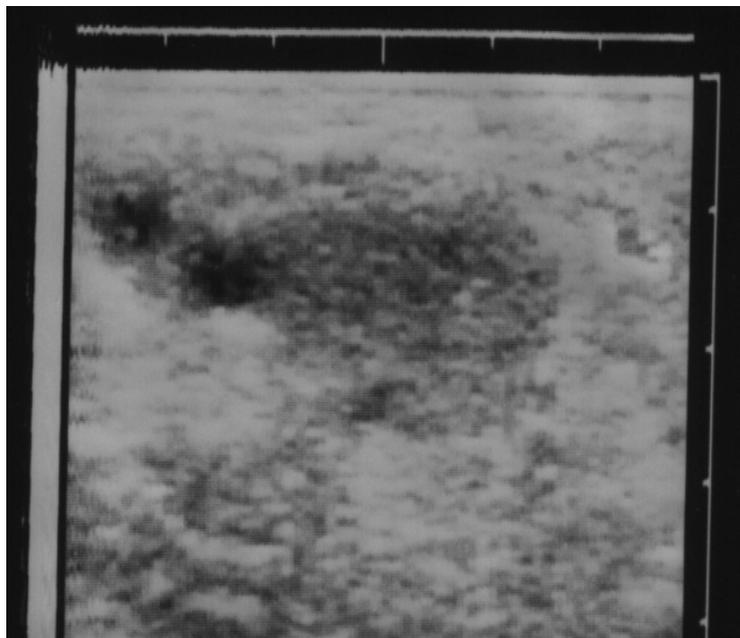
#### **3.1.5.3.4. Hormonanalysen in der Flüssigkeit von stimulierten Follikeln**

Der übrige Teil der gewonnenen Follikelflüssigkeit wurde abschließend bei 1000 U/min. für 10 Minuten zentrifugiert.

Der klare Überstand wurde dreistufig (V:V; 1:10, 1:100 und 1:100) mit einem Medium (NaCl 0,9% + Heparin, 2.2 I.E./ml) verdünnt und bei -20°C gelagert um später auf E<sub>2</sub> und P<sub>4</sub> analysiert zu werden (s. 3.1.5.2.1.).

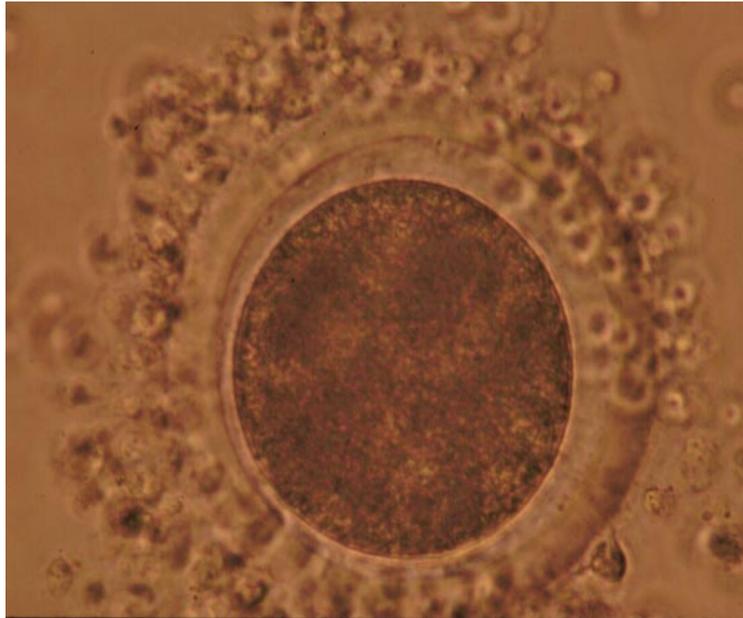


a: Vor der Punktion

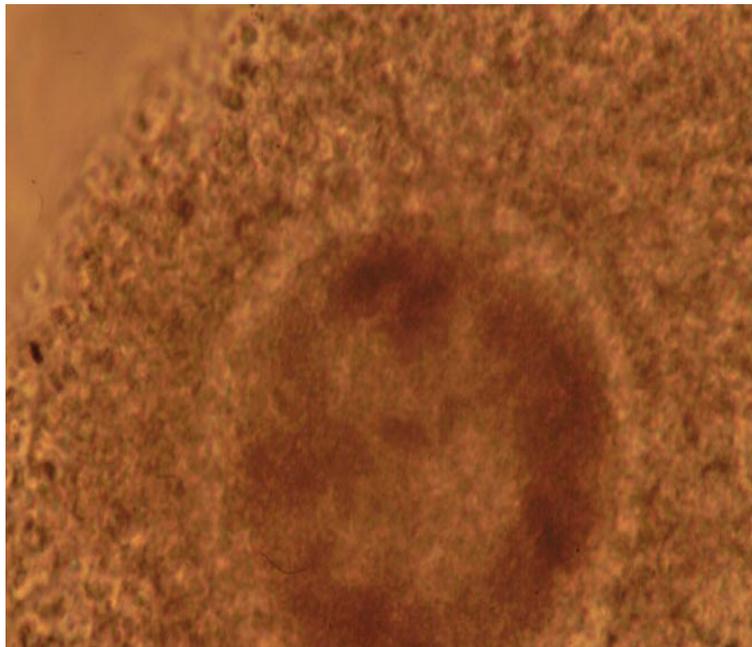


b: Nach der Punktion

Abb. 3: Sonographische Darstellung eines stimulierten Ovars vor bzw. nach der Follikelpunktion



a: Expandierter COK



b: Kompakter COK

Abb. 4: Morphologie der Cumulus Oozyten Komplexe (COK)

### **3.1.6. Statistische Auswertung**

Die Verarbeitung der Meßwerte sowie die Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung sowie von Median und 1. bzw. 3. Quartil erfolgte weitgehend mit einem Personalcomputer unter Anwendung des Tabellenkalkulationsprogramms Excel 5.0. Zur Auswertung der Daten wurde das Programm SPSS 6.0 verwendet. Die Daten wurden zunächst auf ihre Normalverteilung geprüft. Bei nicht Normalverteilung (Follikelpopulation und Hormongehalt des DF) wurden die Daten mit dem Mann-Whitney Test (2 Stichproben), Wilcoxon Test (gepaarte 2 Stichproben) oder Kruskal-Wallis Test (3 Stichproben) ausgewertet. Bei der Normalverteilung (Durchmesser des DF, des guF, des CI) wurden die Daten mit Students t-Test geprüft. Um Zusammenhänge zwischen verschiedenen Parametern zu prüfen, wurde deren Korrelation berechnet. Häufigkeitsverteilungen werden mit dem  $\chi^2$ -Test überprüft. Das Signifikanzniveau wird auf  $\alpha = 0.05$  festgelegt.