

Retrospektivt studie af effekten af hCG ved rutinemæssigt brug til ovulationsinduktion hos travhopper

Fagdyrlægeuddannelsen vedrørende sygdomme hos heste – Hovedopgave 2010

Anna M.W. Bonde, cand. med. vet., Bryrup Hestepraktis

Sammendrag

Humant chorion gonadotropin (hCG) har været almindeligt brugt til ovulationsinduktion hos hopper gennem de sidste 70 år. Formålet med denne undersøgelse var at undersøge effekten af hCG ved rutinemæssigt brug til ovulationsinduktion hos travhopper, ved inseminering med frisk sæd. Studiet er baseret på en retrospektiv gennemgang af journaler fra 223 hopper og 565 brunster i reproduktionssæsonerne 2006 og 2007. To forskellige doseringer af hCG blev brugt; 2250 IE og 1500 IE. Alder, evt. brunstinduktion, follikelstørrelse ved induktion, ovulation ved henholdsvis 24 eller 48 timer, antal hCG behandlinger i den pågældende sæson og drægtighedsresultat er noteret. Ovulationsinduktion er foretaget med det primære formål at optimere udnyttelsen af hingstene. Der er inkluderet 322 brunster, hvor ovulationen er induceret med hCG og 243 brunster, hvor hoppen ikke er behandlet. Der kunne ikke påvises en forskel i antallet af ovulationer < 24 timer mellem de to grupper (14,5 % og 13,7 %, $P > 0,8$), men der var signifikant flere ($P < 0,00001$) af de behandlede hopper (91,4 %), der ovulerede indenfor 48 timer, sammenlignet med de ikke behandlede hopper (40,6 %). Der kunne ikke påvises signifikant forskel ($P > 0,8$) mellem hopper behandlet med 2250 IE og 1500 IE hCG. Der blev vist en tendens til nedsat effektivitet af hCG hos hopper > 16 år ($P = 0,053$) og en signifikant ($P = 0,04$) nedsat effekt af hCG efter mere end to gentagne behandlinger indenfor samme sæson. Disse resultater er i overensstemmelse med tidligere publicerede artikler.

Abstract

Human chorionic gonadotropin (hCG) has been widely used for induction of ovulation in mares for the last 70 years. The objective of this study was to investigate the efficiency of routinely use of hCG for induction of ovulation in standardbred mares, inseminated with fresh semen. Records from 223 mares and 565 oestrous cycles, from the breedingseasons of 2006 and 2007 were reviewed. Two different doses of hCG were used, 2250 IU and 1500 IU. Mare age, possible induction of ovulation, size of follicle at induction, ovulation by either 24 or 48 hours, number of hCG treatments during the specific reproductive season and pregnancy result were recorded. The primary objective for induction of ovulation, was to optimize the use of the stallions. In 322 of the included cycles ovulation was induced with hCG and in 243 cycles the ovulation was not induced. There were no difference in number of ovulations < 24 hours between the two groups (14,5 % and 13,7 %, $P > 0,8$), but a significantly ($P < 0,00001$) higher portion of treated mares (91,4 %) ovulated within 48 hours compared to the non treated mares (40,6 %). There was no significant difference between the two different dosages of hCG. A tendency ($P = 0,053$) for a decreased response to hCG treatment in older mares (> 16 years) was noted and there was a significant ($P = 0,04$) decrease in response after more than two treatments in a given season. These findings are in agreement with previously published studies.

Indledning

Der er tre faktorer der især påvirker resultatet i reproduktionsarbejdet: kvaliteten af den sæd der insemineres med, hoppens reproduktionsstatus og management af hoppen i brunstperioden (Vidament *et al.*, 1997). Hopper har en brunst der er både lang, og i høj grad varierende mellem individer. Dette kan gøre det svært at forudsige hvornår ovulationen sker, og derved hvornår det mest optimale insemineringstidspunkt er. Selv om det er vist at en hoppe kan blive drægtig selv om ovulationen sker flere dage efter bedækning, så er det også vist at drægtighedsprocenten stiger signifikant hvis bedækning/inseminering sker tættere på ovulationen (Woods *et al.*, 1990). Cyklus længde målt som afstanden fra ovulation til ovulation er hos heste ca. 21-22 dage og hos ponyer 24 dage (Ginther, 1992). Det er dog i en undersøgelse af 61 interovulatoriske intervaller hos Quarterheste vist at den interovulatoriske afstand var meget varierende mellem individuelle hopper ($21,0 \pm 2,3$ dage; variation: 16-25 dage) (Ginther & Pierson, 1989). Der er en målbar grad af repeterbarhed fra cyklus til cyklus i den dominerende follikels diameter under de sidste tre dage før ovulation og i intervallet fra ovulation til ovulation hos den enkelte hoppe (Jacob *et al.*, 2009). Cuervo-Arango & Newcombe (2008) finder ligeledes en høj grad af repeterbarhed hvor 17/20 hopper havde en forskel på maksimalt tre mm på den præovulatoriske follikel i to på hinanden følgende ovulationer. Det vil sige, at den præovulatoriske follikel tenderer at nå en størrelse der er karakteristisk for den enkelte hoppe før ovulation, og at den enkelte hoppe tenderer at ovulere med det samme interval mellem ovulationerne. Dette er brugbare mål i det praktiske reproduktionsarbejde, men ikke altid tilgængelige.

Hormonel ovulationsinduktion er en måde at koordinere bedækning/inseminering med ovulation. En enkelt inseminering på det rigtige tidspunkt er ønskværdigt for den mest effektive udnyttelse af hingsten, samt minimeret risiko for kontamination af hoppen. Ovulationsinduktion bruges for at forkorte østrus, minimere antallet af insemineringer og for at optimere brugen af hingsten og den tilgængelige sædmængde. Dette kan øge fertiliteten, men er især en måde at minimere antallet af insemineringer pr.

brunstcyklus. Dette er ønskværdigt blandt andet på grund af en øget efterspørgsel af sæd fra meget populære hingste, begrænset adgang til f.eks. frostsæd og af økonomiske grunde. På større stutier, hingstestationer og lignende, er det også en vigtig faktor at minimere antallet af undersøgelser og behandlinger af hver enkelt hoppe for at effektivisere og økonomisere reproduktionsarbejdet. Derudover er det en nødvendig hjælp for at synkronisere hopper ved embryotransfer og lignende.

Der er hovedsagelig tre muligheder for hormonal ovulationsinduktion hos hest: humant chorion gonadotropin (hCG), gonadotropin releasing hormon (GnRH) agonister og recombinant equint luteiniserende hormon (LH). Den ældste og mest afprøvede metode er induktion ved hjælp af humant chorion gonadotropin (hCG). Valget af et specifikt hormon til induktion kan baseres på effektivitet, pris, årstid, hoppens alder, follikelstørrelse, tidligere brug i samme eller tidligere sæsoner og dyrlægens egne kliniske erfaringer. I Danmark er der kun to præparater der er registreret til brug ved ovulationsinduktion hos hest: Chorulon®Vet. (humant chorion gonadotropin) og Receptal®Vet. (buserelin, GnRH agonist) (Intervet). I litteraturen er der kun lidt beskrevet om buserelins anvendelse til induktion af ovulation hos hopper (Harrison *et al.*, 1991) og i dette studie er ovulation udelukkende induceret ved brug af hCG (Chorulon®Vet.).

Humant chorion gonadotropin (hCG)

Humant chorion gonadotropin er et stort glykoprotein med primær LH-aktivitet, som udvindes fra gravide kvinders urin. Hormonet produceres af cytotrophoblaster i chorions villi i humane placentae og stimulerer corpus luteums funktion og vedligeholdelse af graviditet hos kvinder. Det kan måles i gravide kvinders urin fra et par uger efter befrugtning, topper ved ca. 50 dages graviditet og falder derefter til ikke målbare mængder (McDonald, 1988).

Gennem mange år har humant chorion gonadotropin (hCG) været brugt til at forkorte østrus og for at inducere en mere forudsigelig ovulation. Humant chorion gonadotropin var det første stof der blev beskrevet til induktion af ovulation hos hopper (Day, 1939) og der er efterfølgende publiceret adskillige artikler hvor hCG's evne til at inducere ovulation hos hopper er

undersøgt (Loy and Hughes, 1966; Ginther *et al.*, 1972; Sullivan *et al.*, 1973; Voss *et al.*, 1974; Voss *et al.*, 1975; Webel *et al.*, 1977; Driancourt and Palmer, 1982; Michel *et al.*, 1986; Duchamp *et al.*, 1987; Wilson *et al.*, 1990; Kilicarslan *et al.*, 1996; Rossdale & Lambrecht, 1998). Flere undersøgelser har vist at hCG-behandling af hopper i klinisk brunst kan forkorte østrus længde og forøge antallet af ovulationer indenfor 48 timer efter behandling, se tabel 1. Typisk er induktion foretaget når hoppen er i klinisk brunst og den dominante follikel er ≥ 35 mm, og der er vist et signifikant lavere respons ved brug af hCG til induktion af follikler der er 28 ± 2 mm i forhold til 35 ± 2 mm (Cox *et al.*, 2009).

En vis procentdel af alle hopper responderer ikke på hCG behandling. Mulige årsager kan være: ”umodne follikler” selv om hoppen er i brunst og der er en follikel > 35 mm, hopper med store diøstrale follikler men udenfor brunst og anovulatoriske follikler (McCue, 2000). Visse racer (f.eks. Shire) og visse individuelle hopper ovulerer konsekvent fra større follikler, og her er folliklen ikke nødvendigvis ”moden” selv om den er over 35 mm (Samper, 2001). Samper (1997) foreslår at graden af endometrieødem inkluderes i beslutningen om hvornår hoppen skal behandles med hCG og at man derved kan opnå en højere respons.

Den eksakte mekanisme bag hCG's effekt ved ovulationsinduktion er ikke helt kendt. Tidligere undersøgelser formodede, på grund af lignende molekylstruktur og at hCG binder til LH receptorer, at hCG virker via en direkte effekt der imiterer mekanismen fra den equine LH top (Wilson *et al.*, 1990). Senere undersøgelser tyder dog på at virkningen opstår ved at hCG har en negativ effekt på østradiol niveauet (Gastal, 2006a). Da østradiol har en negativ effekt på LH niveauet, stiger LH hvilket inducerer ovulationen (Ginther *et al.*, 2009). Evans *et al.* (2006) viser at konventionel hCG behandling (1500-2500 IE) resulterer i en LH stigning indenfor 24 timer, denne hCG inducerede stigning ligner den stigning der ses ved spontane ovulationer. Tre nyere undersøgelser viser at hopper behandlede med 1500-2500 IE hCG ovulerer fra signifikant mindre follikler end dem der ikke er behandlede (Gastal *et al.*, 2006a; Cuervo-Arango & Newcombe, 2008; Urquieta *et al.*, 2009). Gastal *et al.* (2006b) finder ligeledes at folliklen holder op

med at vokse umiddelbart efter hCG behandling. Det er dog vist at dette ikke har effekt på corpus luteums udvikling og funktion, idet der ikke var forskel på corpus luteums størrelse eller på plasma progesteronniveauet hos den tidligt drægtige hoppe (Urquieta *et al.*, 2009).

Den anbefalede dosis af Chorulon®Vet. fra producentens side er 1500-3000 IE injiceret intramuskulært (Lægemedelstyrelsen, 2008). I litteraturen er der brugt 750-5000 IE ved enten intramuskulær eller intravenøs injektion (tabel 1). En dosering på 1500 eller 2500 IE er vist at have ens effekt på ovulationstidspunktet (henholdsvis $44,0 \pm 1,0$ og $43,5 \pm 1,0$ time, efter induktion), mens en dosering på 500 IE resulterede i en senere ($82,6 \pm 8,5$ timer) ovulation, som dog stadigvæk var signifikant tidligere end ovulationerne i kontrolgruppen der ikke var behandlede ($98,2 \pm 5,6$ timer) (Evans *et al.*, 2006; Gastal *et al.*, 2006a). Davies Morel & Newcombe (2008) kunne ikke påvise en signifikant forskel mellem doseringer på 750 IE og 1500 IE og konkluderer at en dosis på 750 IE er lige så effektiv som 1500 IE for at inducere ovulation.

Flere studier har undersøgt hCG's påvirkning på fertiliteten, med vidt forskellige resultater. Flere konkluderer at hCG ikke signifikant påvirker hoppens fertilitet (Loy and Hughes, 1966; Holtan *et al.*, 1977; Squires *et al.*, 1981; Woods *et al.*, 1990). Andre konkluderer at hCG kan forbedre fertiliteten (Day, 1940; Loy and Hughes, 1966; Voss *et al.*, 1974; Michel *et al.*, 1986; Shiner, 1989; Kilicarslan *et al.*, 1996; Grimmert and Perkins, 2001) og en enkelt indikerer at høje doser hCG (4500 eller 6000 IE) kan påvirke fertiliteten negativt (Shilova *et al.*, 1976). Det er usikkert om den forbedrede fertilitet er et resultat af en direkte påvirkning fra hCG eller om det er en effekt af forbedret synkronisering mellem inseminering og ovulation.

Det er vist at behandling med hCG hos hopper med mere end en præovulatorisk follikel giver en højere sandsynlighed for dobbeltovulation (Woods and Ginther, 1983) og tvillingedragtighed (Perkins and Grimmert, 2001). Veronesi *et al.* (2003) viser at der er en forøget risiko (OR = 2,18; P < 0,05) for hopper behandlede med hCG. For hopper som både er brunstinducerede med PGF2 α og har fået hCG er risikoen væsentlig større (OR = 6,37; P < 0,0001).

Andre finder ikke en signifikant effekt af hCG behandling på ovulationsrate, multiple ovulationer, drægtighed og tvillingedragtighed og konkluderer at der med henblik på dette ikke er nogen negative effekter ved kommercielt brug af hCG (Davies Morel and Newcombe, 2008).

For at optimere brugen af hingsten mest muligt er det ønskværdigt kun at, inseminere/bedække hver hoppe en enkelt gang per cyklus. Det er vist at man ved brug af hCG til ovulationsinduktion kan forøge sandsynligheden for at kun bruge en enkelt inseminering/bedækning (Perkins and Grimmett, 2001; Mannfalk, 2007; Urquieta *et al.*, 2009).

Der har i litteraturen været tvivl om hvorvidt gentagne behandlinger med hCG i samme sæson nedsætter effekten af induceret ovulation. Sullivan *et al.* (1973) finder at ved mere end to behandlinger, falder effekten. Wilson *et al.* (1990) viser at tiden fra administration til ovulation i gennemsnit stiger, ved op til 5 behandlinger. McCue *et al.* (2004) finder at antallet af ovulationer indenfor 48 timer efter behandling med hCG falder liniært fra 1. til 5. brunstcyklus.

Andre forfattere finder ikke denne forskel i effekt. Evans *et al.* (2006) og Gastal *et al.* (2006a) viser at effekten af hCG var repeterbar i tre cycli i samme sæson, og Blanchard *et al.* (2003) fandt ingen nedsat effekt i op til 4 gentagne behandlinger i samme sæson. En større retrospektiv undersøgelse af Barbacini *et al.* (2000) finder samme resultat ved 2 behandlinger i samme sæson.

To større retrospektive undersøgelser finder at effekten af ovulationsinduktion med hCG falder signifikant hos ældre hopper. I den ene undersøgelse er der ikke signifikant forskel mellem hopper der er 3-9 år gamle (95 % ovulerer indenfor 48 timer) og hopper der er 10-16 år gamle (90 %), der er dog et signifikant fald mellem disse to grupper og hopper der er > 16 år gamle hvor kun 81 % har en positiv reaktion på hCG behandling (Barbacini *et al.*, 2000). Den anden undersøgelse viser et gradvist fald i respons på hCG behandling for grupperinger af hopper med fem års intervaller fra 92,4 % hos hopper ≤ 5 år til 73,8 % hos hopper > 20 år (McCue *et al.*, 2004).

Tabel 1.

Resultater fra tidligere publicerede undersøgelser af effekt af hCG indenfor 48 timer ved forskellige doseringer.

Forfatter	Dosering (IE)	Antal hopper/ Antal cycli	Ovulation indenfor 48 timer (%)
Roser <i>et al.</i> , 1979	2644	12/72	100
Samper, 1997	2500	414/414	98
Sieme <i>et al.</i> , 2003	1500	401/401	97,5
Gastal <i>et al.</i> , 2006b	1500/2500	18/45	95,5
Davies Morel & Newcombe, 2008	750/1500	739/739	92,4
Barbacini <i>et al.</i> , 2000	2000	559/1040	91
Blanchard <i>et al.</i> , 2002	2500	11/11	91
McCue <i>et al.</i> , 2007	2500	113/128	88,3
Mannfalk, 2007	3000	50/50	88
Niswender <i>et al.</i> , 2006	2500	7/7	86
Morris <i>et al.</i> , 2003	1500/3000	113/113	84
Samper <i>et al.</i> , 2002	2500	12/12	83,3
Berezowski <i>et al.</i> , 2004	2500	29/29	83
McCue <i>et al.</i> , 2004	2500	797/1321	78,4
Wilson <i>et al.</i> , 1990	2500	14/98	75,5

Materiale og metoder

Dette studie er baseret på en retrospektiv gennemgang af journaler fra 223 hopper og 565 brunstcykli i reproduktionssæsonerne 2006 og 2007. Alle hopper er travheste i varierende alder (2-22 år) og opstaldede på det samme stutteri i brunstperioderne. De er hver gang undersøgt af den samme dyrlæge og under de samme forhold. Hopperne er undersøgt fire gange i ugen (man., ons., fre., lør.) fra medio marts til primo august. Ved hver enkelt undersøgelse er de kontrolleret ved rektal palpation og transrektal ultralydsscanning. Scanning er foretaget med den samme ultralydsmaskine ved alle undersøgelser (Honda HS-2000, 7,5 MHz lineær probe) og folliklerne er målt ved hjælp af scanneren. Hver enkelt hoppe indgår i undersøgelsen med det antal brunster den er undersøgt i, de forskellige år. Det vil sige, at en enkelt hoppe kan bidrage med flere brunstcykli både indenfor det samme år og efterfølgende år.

Alle hopper er insemineret med frisk sæd, tappet på stationen fra en af i alt fire hingste. To af hingstene har deltaget i to sæsoner, de andre to i en sæson hver. Sædkvaliteten fra hingstene har været af meget varierende kvalitet og der har været stor forskel i antal insemineringsdoser tilgængelige pr. spring. Ligeledes har der været stor forskel i efterspørgsel af sæd fra de forskellige hingste. Insemineringsdosis er så vidt muligt holdt over 500×10^6 progressivt motile sædceller. Inseminering er enten foretaget samtidig med ovulationsinduktion, eller op til 24 timer senere. De hopper der blev induceret med hCG inkluderes i undersøgelsen fra den dag de behandles. Kontrollhopperne bliver inkluderet den dag de første gang bliver insemineret. Hopperne er som udgangspunkt behandlet med hCG så snart de har vist klinisk brunst og har mindst en follikel der måler over 35 mm i diameter. Hvis der ikke har været nok sæd tilgængelig den pågældende dag er behandlingen udsat til næste undersøgelse. Ovulationsinduktion er foretaget med det primære formål at optimere udnyttelsen af hingstene og er derfor brugt mere eller mindre rutinemæssigt ved de hingste hvor antallet insemineringsdoser pr. dag har været en begrænsende faktor. Udelukket er dog hopper i følbrunst, hvor induktion kun undtagelsesvist har været brugt.

Data fra alle de hopper der er insemineret med fersk sæd fra de pågældende hingste, og hvor dataregistreringen er tilstrækkelig, er inkluderet i undersøgelsen. Derfor indgår både reproduktionsmæssigt klinisk raske hopper og hopper med forskellige reproduktionsmæssige problemer. Hopperne er efter behov behandlet med skylninger, antibiotika, hormoner og caslickoperationer.

For hver brunst er hoppens alder, evt. brunstinduktion, follikelstørrelse (diameter af den største follikel målt i mm) ved induktion/inseminering, ovulation ved henholdsvis 24 timer eller 48 timer, antal behandlinger med hCG i den pågældende sæson og drægtighedsresultat noteret. Hopperne blev undersøgt enten 24 (± 4) timer eller 48 (± 4) timer efter henholdsvis ovulationsinduktion eller første inseminering. De to grupper er ikke udvalgt efter andre kriterier end ugedag for induktion/første inseminering (induktion/inseminering fredag giver undersøgelse efter et døgn, induktion/ inseminering alle andre dage giver undersøgelse efter to døgn) hvorfor de to grupper vurderes at være sammenlignelige. Ved beregning af forskellen i effekt ved flere behandlinger med hCG i samme sæson, er der kun inkluderet hopper der er undersøgt efter 48 timer.

Data er analyseret vha. χ^2 test med Yates korrektion. Hvis grupper med en forventet værdi mindre end 5 resultater indgår, er Fisher's exact test anvendt. Forskelle mellem resultater er vurderet som signifikante ved en P-værdi $< 0,05$.

Resultater

Generelt

Ud af de i alt 565 brunster, er der behandlet med hCG i 322 brunster (57,0 %) og ikke behandlet i 243 brunster (43,0 %). Alderen i den hCG behandlede gruppe var fordelt fra 3-21 år med et gennemsnit på 10,5 år (hos 45 hopper er alderen ukendt) og i den ikke behandlede gruppe fra 2-22 år med et gennemsnit på 11,3 år (hos 38 hopper er alderen ukendt). Follikelstørrelsen ved induktion varierede hos de ovulationsinducerede hopper fra 32-60 mm med et gennemsnit på 41 mm. For de ikke ovulationsinducerede hopper varierede follikelstørrelsen ved første inseminering fra 34-58 mm med et gennemsnit på 43 mm.

Tabel 2.

Resultater vedrørende drægtighedsprocent og ovulationstidspunkter.

	Antal cykli	Inducerede	Ikke inducerede	P-værdi
Drægtighedsprocent	555	48,4% (156/322)	54,9% (128/233)	0,15
Ovulation < 24 timer	106	14,5% (8/55)	13,7% (7/51)	0,87
Ovulation < 48 timer	459	91,4% (244/267)	40,6% (78/192)	< 0,00001
Ovulation > 24 <72 timer	91	95,7% (45/47)	68,2% (30/44)	<0,001

Dosis

Efter 48 timer har 92,3% af hopper behandlet med 2.250 IE ovuleret og 90,7% af hopper behandlet med 1.500 IE, forskellen er ikke signifikant ($P > 0,8$).

Ovulationstidspunkt

Af de hopper der er undersøgt et døgn efter ovulationsinduktion ($n=106$) havde 14,5% ovuleret sammenlignet med 13,7% i den ubehandlede gruppe, der er ikke signifikant forskel ($P = 0,87$). Efter to døgn har 91,4% af de behandlede hopper ovuleret sammenlignet med 40,6% i den ubehandlede gruppe, og her er tydelig signifikans ($P < 0,00001$). Af de hopper der ikke havde ovuleret efter et døgn, havde 95,7% ovuleret efter yderligere to døgn hvis de var behandlet med hCG sammenlignet med 68,2% af dem der ikke var behandlet ($P < 0,001$). (Tabel 2)

Alder

Resultaterne for de forskellige aldersgrupper kan ses i tabel 3, der kan ikke påvises en signifikant forskel i effekt af hCG behandling ($P = 0,053$).

Tabel 3.

Antal ovulationer indenfor 48 timer efter hCG behandling fordelt efter alder.

Alder (år)	Antal cykli	Ovulation < 48 timer
3 - 9	119	87,4 % (104)
10 - 16	92	95,7 % (88)
> 16	22	81,8 % (18)

Drægtighed pr. brunst

Drægtighedsprocenten pr. brunst for de ovulationsinducerede hopper er 48,4% hos de ikke inducerede er den 54,9% (Tabel 2). Forskellen er ikke signifikant ($P=0,15$). Drægtighedsprocenten pr. brunst for de enkelte hingste kan ses i tabel 4. Forskellen er tydeligt signifikant ($P<0,0000001$)

Tabel 4.

Drægtighed pr. brunst for de forskellige hingste.

Hingst	Antal cykli	Antal drægtige	Drægtige/brunst (%)
A	63	20	31,7
B	238	100	42,0
C	154	95	61,7
D	103	70	68,0

Gentagne ovulationsinduktioner

Dette studie fandt en signifikant nedsat ($p = 0,04$) effekt af hCG ved anvendelse mere end 2 gange i samme sæson. Efter 1. og 2. behandling ovulerede 92,8% inden for 48 timer mens 81,8% ovulerede indenfor 48 timer ved 3. og efterfølgende behandling. (Tabel 5)

Tabel 5.

Resultat efter gentagne behandlinger i samme sæson

Antal behandlinger	Antal cykli	Ovulationer < 48 timer
1. behandling	172	159 (92,4%)
2. behandling	64	60 (93,8%)
≥3. behandling	33	27 (81,8%)

Diskussion

Drægtighedsprocenten pr. brunst er i dette studie forholdsvis lav for inseminering med frisk sæd, endvidere er drægtighedsprocenten lavere hos de inducerede hopper (48,4 %) i forhold til de ikke inducerede (54,9 %). Forskellen er ikke statistisk signifikant ($P=0,15$). Resultatet er markant lavere end de 76 % respektive 74 % for henholdsvis inducerede og kontrolhopper i den eneste tidligere danske undersøgelse (Mannfalk, 2007). Forskellen mellem de to undersøgelser er dog forventet, idet hopper der skulle insemineres med sæd af ringe kvalitet, ligesom hopper med væske i uterus blev

udelukket fra den tidligere undersøgelse. Endvidere er der i denne undersøgelse især brugt hCG ved inseminering med sæd fra de hingste der havde en kendt suboptimal sædkvalitet, og kun undtagelsesvis til de hingste der har en normal sædkvalitet. Der er signifikant forskel i drægtighedsresultatet mellem de fire hingste der er brugt, og det kunne have været interessant at analysere hver enkelt hingst for sig. Dette har dog ikke været muligt med det talmateriale der er til rådighed.

Der er sat spørgsmålstegn ved effektiviteten af hCG efter gentagne behandlinger i samme sæson, eller på hinanden følgende sæsoner. Flere undersøgelser har vist at det er et fald i respons på hCG behandling efter gentagne behandlinger i samme sæson (Sullivan *et al.*, 1973; Wilson *et al.*, 1990; McCue *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2007). Som resultat af dette er der publiceret anbefalinger om at hCG ikke skal gives mere end to gange til hver enkelt hoppe i samme sæson (Voss, 1993; Chavatte & Palmer, 1998). Denne undersøgelse finder ligeledes et signifikant fald i respons efter mere end to behandlinger pr. sæson. Der er dog stadigvæk, ved tre eller flere behandlinger, over 80 % der ovulerer indenfor 48 timer. Det synes derfor ikke at være en umiddelbar grund til at undgå mere end to behandlinger pr. sæson, hvis bare man husker at tage hensyn til at effekten eventuelt er reduceret. Andre ser også en nedsat effekt efter behandlinger flere sæsoner efter hinanden (Green *et al.*, 2007) dette har dog ikke været muligt at undersøge med dette materiale. I udlandet, hvor der er andre muligheder for ovulationsinduktion, kan det være relevant at anbefale brug af f.eks. deslorelin i stedet for hCG, ved mere end to gentagne induktioner i samme sæson. Dette kan p.t. dog ikke bruges under danske forhold. Den nedsatte effekt, efter flere gentagne behandlinger, må siges primært at have betydning hvis man bruger ovulationsinduktion med hCG uden opfølgende kontrol indtil ovulation, hvis man bruger det til inseminering med frostsæd på faste tidspunkter eller ved synkronisering af hopper til embryotransfer.

Dette studie har fundet at der ikke er signifikant forskel i antallet af hopper der ovulerer indenfor 48 timer ved ovulationsinduktion med henholdsvis 2250 IE og 1500 IE hCG. Andre undersøgelser finder heller ikke en signifikant

forskel mellem doseringer på henholdsvis 1500 og 2500 IE (Gastal *et al.*, 2006b) respektive 750 og 1500 IE (Davies Morel. & Newcombe, 2008). Blandt øvrige publicerede undersøgelser er en dosering på 2500 IE hCG oftest brugt mens enkelte bruger doseringer fra 1500-3000 uden at dette giver afvigende resultater (Tabel 1). Davies Morel & Newcombe (2008) overvejer om den lave dosis (750 IE) ville give en mindre antistofproduktion og dermed mindske risikoen for en nedsat effekt ved gentagne behandlinger. Ud fra Davies Morel & Newcombe (2008) kan det anbefales at bruge en dosis på 750 IE til induktion af ovulation, det er dog vist at en dosering på 500 IE giver et markant længere interval til ovulation (Evans *et al.*, 2006; Gastal *et al.*, 2006b). Indtil flere undersøgelser har vist en god effekt af 750 IE synes det rimeligt at anbefale en dosis på 1500 IE. Under praktiske forhold vil en dosis på 750 IE i forhold til 1500 IE give en meget begrænset økonomisk besparelse pr. induktion, ligesom det i Danmark registrerede præparat Chorulon®Vet. kun kommer i glas med 1500 IE.

I dette studie ovulerede i alt 91,4 % af alle inducerede hopper indenfor 48 timer efter induktion og 14,5 % ovulerede indenfor 24 timer efter induktion. Fra disse resultater kan det estimeres at ca. 77 % af alle hopper ovulerer mellem 24 og 48 timer efter ovulationsinduktion med hCG. Disse resultater ligger meget tæt på de resultater Barbacini *et al.* (2000) finder (henholdsvis 91 % < 48 timer; 75 % 24-48 timer og 16 % < 24 timer), og indenfor hvad andre undersøgelser har vist (Tabel 1). Responset varierer i disse undersøgelser fra 75,5 – 100 % ovulation indenfor 48 timer.

Det er i andre undersøgelser fundet en forringet respons af hCG hos ældre hopper (Barbacini *et al.*, 2000; McCue *et al.*, 2004), hvor de finder at henholdsvis hopper over 15 og over 16 år har en større spredning i ovulationstidspunkt og at færre ældre hopper ovulerer indenfor 48 timer. Denne undersøgelse finder at 81,8 % af hopper > 16 år ovulerer indenfor 48 timer efter induktion. Forskellen mellem aldersgrupperne er tæt på signifikant ($P = 0,053$) og det er muligt at et større materiale ville give et signifikant resultat. Disse resultater ligger meget tæt på de andre to undersøgelser hvor responset er henholdsvis 81 % af hopper > 16 (Barbacini *et al.*, 2000) og 79,4 % af hopper fra 16-20 år (McCue *et al.*, 2004). Det

kan overvejes om dette fald i respons skyldes at de ældre hopper har været behandlet med hCG i tidligere sæsoner eller om der sker forandringer i den endokrine funktion hos ældre hopper. Ligesom hos hopper der er behandlet med hCG gentagne gange under en sæson, er effekten hos de ældre hopper dog stadigvæk omkring de 80 %. Dette betyder at hCG i praksis også er brugbart hos ældre hopper.

Flere undersøgelser har vist en øget forekomst af tvillingedrægtigheder ved brug af hCG (Bruck *et al.*, 1993, Veronesi *et al.*, 2003), og yderligere en endnu højere forekomst ved behandling med både PGF2 α og hCG (Veronesi *et al.*, 2003). Det kunne være interessant at undersøge dette, men på grund af den meget varierende sædkvalitet er det ikke gjort i dette materiale. Undertegnede har dog en klar fornemmelse af at der var en øget frekvens af tvillingedrægtigheder hos de hingste der har en god sædkvalitet, når hopper til disse blev induceret med hCG.

Svagheden med en retrospektiv undersøgelse er at data ikke er indsamlet med henblik på analyse. Det havde været ønskværdigt at alle hopper var undersøgt mindst en gang dagligt for at registrere et mere eksakt ovulationstidspunkt, og dermed have mulighed for at mere præcist følge responset

på hCG behandlingerne. Derudover kunne det have været interessant at undersøge effekten af rutinemæssigt brug af hCG i arbejdet med subfertile hingste.

Behandling af hopper med hCG er generelt uden alvorlige bivirkninger, og der er ved de udførte behandlinger ikke set reaktioner ud over hvad der kan forventes ved enhver injektion. Der er i produktinformationen oplyst at allergiske reaktioner kan forekomme, dette er dog ikke set ved hverken de i artiklen gennemførte behandlinger eller andre af forfatteren behandlede hopper. Det er heller ikke beskrevet i nogen af de artikler der omhandler brug af hCG hos hopper.

Humant chorion gonadotropin har været almindeligt brugt for at inducere ovulation hos hopper i klinisk brunst gennem de sidste ca. 70 år. Det er et lægemiddel der er økonomisk i brug, uden alvorlige bivirkninger og nemt at administrere. Selv i de grupper der har det laveste respons på hCG behandling, er effekten stadigvæk omkring 80 %. Fra undertegnedes synspunkt er det et meget brugbart og relevant stof der både effektiviserer og økonomiserer reproduktions arbejdet både for hingsteholdere, hoppeejere og dyrlæger.

Litteraturliste

- Barbacini, S., Zavaglia, G., Gulden, P., Marchi, V., Necchi, D. (2000) Retrospective study on the efficacy of hCG in equine artificial insemination programme using frozen semen. *Equine Vet. Educ.* **12**, 312–317.
- Berezowski, C.J., Stitch, K.L., Wendt, K.M., Vest, D.J. (2004) Clinical comparison of 3 products available to hasten ovulation in cyclic mares. *J. Equine Vet. Sci.* **24**, 231-233.
- Blanchard, T.L., Varner, D.D., Schumacher, J., Love, C.C., Brinsko, S.P., Rigby, S.L. (2003) Manual of equine reproduction, 2nd ed. Mosby, St., Louis, pp. 25-26.
- Bruck, I., Anderson, G.A., Hyland, J.H. (1993) Reproductive performance of thoroughbred mares on six commercial stud farms. *Aust. Vet. J.* **70**, 299-303.
- Chavatte, P. and Palmer, E. (1998) Induction of ovulation in the mare. *Equine vet. Educ.* **10**, 26-30.
- Cox, T.J., Squires, E.L., Carnevale, E.M. (2009) Effect of follicle size and follicle-stimulating hormone on ovulation induction and embryo recovery in the mare. *J. Equine Vet. Sci.*, **29**, 213-218.
- Cuervo-Arango, J. and Newcombe, J.R. (2008) Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. *Theriogenology* **69**, 681-687.
- Davies Morel, M.C.G. and Newcombe, J.R., (2008). The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: Ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. *Anim. Reprod. Sci.* **109**, 189-199.
- Day, F.T. (1939) Ovulation and the descent of the ovum in the fallopian tube of the mare after the treatment with gonadotrophic hormones. *J. Agric. Sci.*, **29**, 459-469.
- Day, F.T. (1940) Clinical and experimental observations on reproduction in the mare. *J. Agric. Sci.*, **30**, 244-261.
- Driancourt, M.A. and Palmer, E. (1982) Seasonal and individual effects on ovarian and endocrine response of mares to a synchronisation treatment with progestagen-impregnated vaginal sponges. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **32**, 283-291.
- Duchamp, G., Bour, B., Combarrous, Y. and Palmer, E. (1987) Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **35**, 221-228.
- Evans, M.J., Gastal, E.L., Silva, L.A., Gastal, M.O., Kitson, N.E., Alexander, S.L., Irvine, C.H.G., (2006) Plasma LH concentrations after administration of human chorionic gonadotrophin to oestrous mares. *Anim. Reprod. Sci.* **94**, 191–194.
- Gastal, M.O., Gastal, E.L., Ginther, O.J. (2006a) Effects of hCG on characteristics of the wall of the developing preovulatory follicle evaluated by B-mode and color-Doppler ultrasonography and interrelations with systemic estradiol concentrations in mares. *Anim. Reprod. Sci.* **94**, 195-198.
- Gastal, E.L., Silva, L.A., Gastal, M.O., Evans, M.J. (2006b) Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares. *Anim. Reprod. Sci.* **94**, 186–190.
- Ginther, O.J. (1992) Reproductive Biology of the Mare: Basic and applied aspects, 2nd ed., Equiservices, Cross Plains, Wisconsin.
- Ginther, O.J., Whitmore, H.C., Squires, E.L. (1972) Characteristics of estrus, diestrus and ovulation in mares and effects of season and nursing. *Am. J. Vet. Res.* **33**, 1935-1939.
- Ginther, O.J., Beg, M.A., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Cooper, D.A. (2009) Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17 β -estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. *Anim. Reprod. Sci.* **114**, 311-317.

- Ginther, O.J., Pierson R.A. (1989) Regular and irregular characteristics of ovulation and the interovulatory interval in mares. *J. Equine Vet., Sci.* **9**, 4-12
- Green, J.M., Raz, T., Epp, T., Carley, S.D., Card, C.E. (2007). Relationships between utero-ovarian parameters and the ovulatory response to human chorionic gonadotrophin (hCG) in mares. *Proc. Am. Ass. Equine Pract.* **53**, 563-367.
- Grimmett, J.B., Perkins, N.R. (2001). Human chorionic gonadotropin (hCG): the effect of dose on ovulation and pregnancy rate in thoroughbred mares experiencing their first ovulation of the breedingseason. *New Zealand Vet. J.*, **49**, 88-93.
- Harrison, L.A., Squires, E.L., McKinnon, A.O., 1991. Comparison of hCG, buserelin and luprostiol for induction of ovulation in cycling mares. *J. Equine Vet. Sci.* **11**, 163-166.
- Holtan, D.W., Douglas, R.H., Ginther, O.J., 1977. Estrus, ovulation and conception following synchronisation with progesterone, prostaglandin F2 alpha and human chorionic gonadotrophin. *J. Anim. Sci.* **44**, 431-437.
- Jacob, J.C., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Carvalho, G.R., Beg, M.A., Ginther, O.J. (2009) Temporal relationships and repeatability of follicle diameters and hormone concentrations within individuals in mares. *Reprod. Dom. Anim.* **44**, 92-99.
- Kilicarslan, M.R., Horoz, H., Senunver, A., Konuk, S.C., Tek, C., Carioglu, B. (1996) Effect of GnRH and hCG on ovulation and pregnancy in mares. *Vet. Rec.* **139**, 119-120.
- Loy, R.G. and Hughes, J.P. (1966) The effect of human chorionic gonadotrophin on ovulation, length of estrus and fertility in the mare. *Cornell Vet.* **56**, 41-50.
- Lægemiddelstyrelsen (2008) Produktresumé for Chorulon Vet.
- Mannfalk, M. (2007) Ovulationsinduktion med humant chorion gonadotropin (hCG) under danske forhold. *Hovedopgave, Fagdyrlægeuddannelsen vedrørende sygdomme hos hest, København.*
- McCue. P.M. (2000) Ovarian pathology in the mare. *Proc. Bluegrass Equine Reprod. Symp.* Lexington, Kentucky.
- McCue, P.M., Hudson, J.J., Bruemmer, J.E., Squires, E.L. (2004) Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. *Proc. Am. Ass. Equine Pract.* **50**, 510-513.
- McCue, P.M., Magee, C., Gee, E.K. (2007) Comparison of compounded Deslorelin and hCG for induction of ovulation in mares. *J. Equine Vet. Sci.* **27**, 58-61.
- McDonald, L.E. (1988) Hormones of the pituitary gland. In: Booth, N.H., McDonald, L.E. (Eds.), *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 6th ed., Iowa State University Press.
- Michel, T.H., Rossdale, P.D. and Cash, R.S.G. (1986) Efficacy of human chorionic gonadotrophin and gonadotrophin releasing hormone for hastening ovulation in Thoroughbred mares. *Equine vet. J.* **18**, 438-442.
- Morris, L.H. (2003) Pregnancy rates in mares after a single fixed-time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction. *Equine Vet. J.* **35**, 197-201.
- Niswender, K.D., Roser, R.F., Boime, I., Colgin, M. (2006) Induction of ovulation in the mare with recombinant equine luteinizing hormone. *Proc. Am. Ass. Equine Pract.* **52**, 387-388.
- Perkins, N.R., Grimmett, J.B., 2001. Pregnancy and twinning rates in Thoroughbred mares following administration of human chorionic gonadotrophin (hCG). *N. Z. Vet. J.* **49**, 94-100.
- Rossdale, P.D. and Lambrecht, P. (1998) Comparison of the interval between administration of hCG or GnRH implant and ovulation in oestrus mares. *Equine vet. Educ.* **10**, 76-79.
- Roser, J.F., Kiefer, B.L., Evans, J.W., Neely, D.P. and Pacheco, C.A. (1979) The development of antibodies to human chorionic gonadotrophin following its repeated injection in the cyclic mare. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **27**, 173-179.

- Samper, J.C. (2001) Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Anim. Reprod. Sci.* **68**, 219–228.
- Samper, J.C. (1997) Ultrasonographic appearance and the use of uterine edema to time ovulation in mares. *Proc. Am. Ass. Equine Pract.* **43**, 41-43.
- Samper, J.C., Jensen, S., Sergeant, J., Estrada, A. (2002) Timing of induction of ovulation in mares treated with Ovuplant or Chorulon. *J. Equine Vet. Sci.* **22**, 320–323.
- Shilova, A.V., Platov, E.M., Lebedev, S.G. (1976) The use of human chorionic gonadotropin for ovulation date regulation in mares. *Proc. VIIIth International congress on animal reproduction and artificial insemination, Krakow.* 331
- Shiner, K.A. (1989) A review of clinical applications of hCG on breeding farms. *Proc. Am. Ass. Equine Pract.* **35**, 197-201.
- Sieme, H., Schäfer, T., Stout, T.A.E., Klug, E., Waberski, D. (2003) The effects of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology* **60**, 1153-1164.
- Squires, E.L., Wallace, M.S., Voss, J.L., Pickett, B.W., Shideler, R.K. (1981) The effectiveness of PGF₂ α , hCG and GnRH for appointment breeding of mares. *J. Equine Vet. Sci.* **1**, 5-9.
- Sullivan, J.J., Parker, W.G. and Larson, L.L. (1973) Duration of estrus and ovulation time in non lactating mares given human chorionic gonadotrophin during three successive estrus period. *J. Am. vet. med. Ass.* **162**, 895-898.
- Urquieta, B., Durán, M.C., Coloma, I., Parraguez, V.H. (2009) hCG-induced ovulation in thoroughbred mares does not affect *Corpus luteum* development and function during early pregnancy. *Reprod. Dom. Anim.* **44**, 859-864.
- Veronesi, M.C., Battocchio, M., Faustini, M., Gandini, M., Cairoli, A. (2003) Relationship between pharmacological induction of estrous and/or ovulation and twin pregnancy in the Thoroughbred mares. *Domest. Anim. Endocrinol.* **25** 133-140.
- Vidament, M., Dupere, A.M., Julienne, P., Evain, A., Noue, P., Palmer, E. (1997) Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* **48**, 907-917.
- Voss, J.L. (1993) Human chorionic gonadotrophin In: McKinnon, A.O., Voss, J.L. (Eds.), *Equine Reproduction*. Lea and Febiger, Philadelphia, pp 325-328.
- Voss, J.L., Pickett, B.W., Burwash, L.D., Daniels, W.H. (1974) Effect of human chorionic gonadotropin on duration of oestrous cycle and fertility of normally cycling, nonlactating mares. *JAVMA* **165**, 704-706
- Voss, J.L., Sullivan, J.J., Pickett, B.W., Parker, W.G., Burwash, L.D. and Larson, L.L. (1975) The effect of hCG on duration on oestrus, ovulation time and fertility in mares. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **23**, 297-301.
- Webel, S.K., Franklin, V., Harland, B. and Dzuik, P.J. (1977) Fertility, ovulation and maturation of eggs in mares injected with hCG. *J. Reprod.* **51**, 337-328.
- Wilson, C.G., Downie, C.R., Hughes, J.P. and Roser, J.F. (1990) Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares. *Equine Vet. Sci.* **10**, 301-308.
- Woods, J., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J. (1990) Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic loss in mares. *Equine Vet. J.* **22**, 410-415.
- Woods, G., Ginther, O.J. (1983) Induction of multiple ovulations during the ovulatory season in mares. *Theriogenology*, **20**, 347-355.