

Graf-Lehndorff-Institut für Pferdewissenschaften
und
Besamungs- und Embryotransferstation
Veterinärmedizinische Universität Wien

**EFFECTS OF ALTRENOGEST TREATMENT OF EARLY PREGNANT MARES ON
CONCEPTUS DEVELOPMENT, ENDOMETRIAL FUNCTION AND SECRETION
OF REPRODUCTIVE HORMONS**

EINFLUSS EINER BEHANDLUNG MIT DEM GESTAGEN ALTRENOGEST AUF
FRUCHTENTWICKUNG, ENDOMETRIUMSFUNKTIONEN UND SEKRETION
REPRODUKTIONSRELEVANTER HORMONE BEI STUTEN
IN DER FRÜHEN GRAVIDITÄT

INAUGURAL DISSERTATION

Zur Erlangung der Würde eines
DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

vorgelegt von
Tierarzt Conrad Willmann

Wien, Juli 2010

Gefördert von der Mehl-Mülhens-Stiftung, Gestüt Röttgen, Köln

5. Summary

Conrad Willmann (2010)

Effects of altrenogest treatment of early pregnant mares on conceptus development, endometrial function and secretion of reproductive hormones

Treatment with the synthetic progestin altrenogest has been shown to prevent embryonic loss in early pregnant mares after ovariectomy or induction of luteolysis. However, no controlled studies on the efficiency of altrenogest administration for prevention of embryonic loss in fertile and subfertile mares are available so far. The aim of our investigations was thus to determine effects of altrenogest treatment and age of early pregnant mares on embryonic development, endometrial function and secretion of reproductive hormones in two combined studies.

For the first study, 32 pregnant warmblood mares were treated with altrenogest (0.044 mg/kg per os once daily) or placebo (sunflower oil) for 100 days beginning on day 6 after ovulation. In addition, the animals were further grouped by age (mares 4-8 years, n=19; mares >8 years, n=13). From the animals blood was collected for determination of LH, progesterone and eCG concentrations. Furthermore transrectal ultrasound examinations were performed for determination of conceptus growth.

No difference in the per cycle pregnancy rate between altrenogest-treated (75%) and placebo-treated mares (74%) was detected. A significant influence of age and treatment on embryo size between days 30 and 45 was detected ($p < 0.05$). Mean size of the embryo proper on day 30 was 12.4 ± 0.6 mm in control mares aged 4-8 years, 8.9 ± 0.6 mm in control mares older than 8 years, 11.1 ± 0.6 mm in altrenogest-treated mares aged 4-8 years and 10.9 ± 0.8 mm in altrenogest-treated mares older than 8 years. In the control group, size of the embryo proper respective fetus was negatively correlated with age of the mares (e.g. day 30: $r = -0.834$, $p < 0.05$) as well as the number of active breeding seasons per mare (day 30: $r = -0.820$, $p < 0.05$). These correlations were lost in altrenogest-treated mares. Additionally, a significant interac-

tion of age and treatment over time ($p < 0.05$) on eCG concentration was detected but no effects of age or treatment on progesterone and LH secretion were found.

For the second study, 10 pregnant mares of different breed were assigned to placebo or altrenogest (0.044 mg/kg per os once daily) treatments in alternating order. The period of treatment was day 6 to 11 after ovulation. Each mare was included into each experimental group not more than twice. Blood samples were collected daily from day 1 to day 12 after ovulation. After collection of day-11 embryos and performance of endometrial biopsies thereafter, immunohistochemistry, reverse transcriptase PCR and quantitative PCR were performed for determination of factors, potentially involved in conceptus development and maternal recognition of pregnancy.

Per cycle pregnancy rates and embryonic growth were not influenced by treatment (altrenogest 7.0 ± 2.5 mm, placebo 6.5 ± 1.7 mm, n.s.). Irrespectively of treatment a significant positive correlation between osmolarity and size of the embryonic vesicle ($r = 0.791$, $p < 0.001$) was found. The number of luminal epithelial cells, superficial glandular epithelial cells and interstitial cells of endometrial tissue with nuclei stained positively for the progesterone receptor was significantly higher in placebo-treated than in altrenogest-treated mares. In endometrial biopsies from altrenogest-treated mares, a slight but significant increase in the number of PMN was seen (ALT: 0.8 ± 0.5 PMN/field, C: 0.3 ± 0.3 PMN/field; $p < 0.05$). The relative gene expression of aquaporin-3, a protein particularly involved in blastocyst growth, was significantly higher in embryos after altrenogest treatment compared to control treatments.

In conclusion, embryonic growth was not influenced by altrenogest treatment in the early luteal phase of pregnant mares. However, down-regulation of progesterone receptors in the luminal and superficial glandular epithelium and in connective tissue of the endometrium was advanced by altrenogest treatment. This might enhance the production of secretory proteins in the glandular epithelium and/or the synthesis of growth factors. Together with the finding of markedly upregulated gene expression of aquaporin 3 in embryos, this indicates effects on regulatory pathways, involved in the maintenance of pregnancy. In contrast to day-11 embryos, development and growth of the embryo or fetus around the beginning of placentation

was positively influenced by altrenogest-treatment. In addition, retarded development of the conceptus in fertile broodmares older than 8 years was completely overcome by altrenogest substitution. This may justify altrenogest-treatment of older mares or those with a history of early embryonic death to support development of their conceptus, especially around the time of placentation.

6. Zusammenfassung

Conrad Willmann (2010)

Einfluss einer Behandlung mit dem Gestagen Altrenogest auf Fruchtentwicklung, Endometriumsfunktionen und Sekretion reproduktionsrelevanter Hormone bei Stuten in der frühen Gravidität

Eine Behandlung mit dem Gestagen Altrenogest verhindert Trächtigkeitsverluste bei frühtragenden Stuten sowohl nach einer Ovariectomie als auch nach einer medikamentell induzierten Luteolyse. Bisher sind jedoch keine Studien über die Wirkung einer Altrenogestbehandlung bei fertilen und subfertilen Stuten verfügbar. Das Ziel unserer Studie war es, in zwei aufeinander aufbauenden Untersuchungen die Effektivität einer Altrenogestbehandlung auf embryonale Entwicklung, Endometriumsfunktionen und Sekretion reproduktionsrelevanter Hormone bei Stuten in der frühen Gravidität zu bestimmen. Hierbei wurde im ersten Versuch das Alter der Stuten mit berücksichtigt.

In der ersten Studie wurden jeweils 16 Warmblutstuten entweder mit Altrenogest (0,044 mg/kg per os einmal täglich) oder Sonnenblumenöl als Plazebo, an Tag 6 nach der Ovulation beginnend, über 100 Tage behandelt. Zusätzlich wurden die Stuten ihrem Alter nach in zwei Gruppen unterteilt (4-8 jährig, n=19, >8 jährig, n=13). Zur Bestimmung der LH-, Progesteron- und eCG-Konzentration im Blut wurden in regelmäßigen Abständen Blutproben gewonnen. Über wiederholte transrektale Untersuchungen wurden Entwicklungsschritte und genaue Größenzunahmen der Embryonen bzw. Föten dokumentiert. Es konnte mit 75% bei den Altrenogest behandelten und 74% bei den Kontrollstuten kein Unterschied zwischen den Trächtigkeitsraten beider Gruppen festgestellt werden. Ein signifikanter Einfluss zwischen Alter und Behandlung auf die Embryogröße bestand zwischen Tag 30 und 45 der Trächtigkeit ($p < 0,05$). Die durchschnittliche Embryonengröße am Tag 30 war $12,4 \pm 0,6$ mm bei 4-8 jährigen und $8,9 \pm 0,6$ mm bei über 8 jährigen Kontrollstuten, $11,1 \pm 0,6$ mm bei 4-8 jährigen mit Altrenogest behandelten und $10,9 \pm 0,8$ mm bei über 8 jährigen mit Altrenogest behandelten Stuten. Bei der Kontrollgruppe waren die Fruchtgrößen negativ mit dem Alter der Stuten (z.B. Tag 30: $r = -0,834$, $p < 0,05$) und mit der Anzahl an aktiven Zuchtsaisons pro Stute korreliert

(Tag 30: $r=-0,820$, $p<0,05$). Bei Altrenogest-behandelten Stuten war dieser Effekt nicht zu sehen. Während kein Medikamenteneinfluss auf die Konzentration von Progesteron und LH im Blut zu erkennen war, bestand bezüglich der eCG-Konzentration im Blut eine signifikante Interaktion zwischen Alter und Behandlung über die Zeit.

In der zweiten Studie wurden 10 gravide Stuten in abwechselnder Reihenfolge entweder einer Altrenogest (0,044 mg/kg per os einmal täglich) oder einer Kontrollbehandlung zugeteilt. Die Behandlung begann an Tag 6 und endete an Tag 11 nach der Ovulation. Jede Stute gehörte nicht häufiger als zweimal der Altrenogestgruppe bzw. der Kontrollgruppe an. Von Tag 1 bis 12 der Trächtigkeit wurden Blutproben gewonnen. Am elften Tag der Gravidität wurde der Embryo aus dem Uterus gespült und kurz darauf eine Endometriumsbiopsie gewonnen. Zuerst wurden die Proben histologisch und immunohistochemisch untersucht, danach bestimmten wir die Genexpressionen von für die Entwicklung des Embryos und die maternale Trächtigkeitserkennung relevanten Faktoren über eine reverse transcriptase und quantitative PCR. Trächtigkeitsrate und embryonales Größenwachstum waren durch eine Altrenogestbehandlung nicht beeinflusst. (Altrenogest $7,0\pm 2,5$ mm, Kontrolle $6,5\pm 1,7$ mm, $P>0,05$). Unabhängig von der Medikamentengabe bestand eine signifikante Korrelation zwischen Osmolarität und Größe der Embryonen. ($r=0,791$, $p<0,001$). Die Anzahl der positiv gefärbten, luminalen Epithelzellen, oberflächlichen Drüsenzellen und Bindegewebszellen des Endometriums war bei der Kontrollgruppe, verglichen mit der behandelten Gruppe, signifikant erhöht.

In Endometriumsbiopsien der Altrenogest-behandelten Stuten waren signifikant mehr PMN pro Gesichtsfeld zu sehen (Altrenogest: $0,8\pm 0,5$ PMN/Feld, Kontrolle: $0,3\pm 0,3$ PMN/Feld; $p<0,05$). Die relative Genexpression von Aquaporin-3, einem Protein, das in das Größenwachstum der Blastozyste involviert ist, war im Vergleich zur Kontrollgruppe in der behandelten signifikant erhöht.

Schlußfolgernd wurde die Größe der Embryonen durch eine Altrenogestbehandlung in der frühen Lutealphase nicht beeinflusst. Die Herunterregulierung der Progesteronrezeptoren in luminalen Epithelzellen, oberflächlichen Drüsenzellen und Bindegewebszellen des Endometriums war durch eine Gestagensupplementierung beschleunigt. Dieser Vorgang könnte die Sekretion von Proteinen aus dem Drüsenepithel unterstützen und/oder die Freisetzung von

Wachstumsfaktoren stimulieren. Da auch die Genexpression von Aquaporin-3 deutlich erhöht war, sprechen die Ergebnisse für eine regulierende Wirkung von Altrenogest auf den Trächtigkeitserhalt. Im Gegensatz zu Tag-11- Embryonen wurden Fruchtentwicklung und Größenzunahme zum Zeitpunkt der Plazentation durch eine Altrenogestbehandlung offensichtlich positiv beeinflusst. Zusätzlich wurde eine verzögerte Fruchtentwicklung bei fertilen Kontrollstuten mit einer Gestagensubstitution vollkommen ausgeglichen. Daraus folgernd kann die Gravidität älterer Zuchtstuten oder Stuten mit herabgesetzter Fruchtbarkeit durch eine Altrenogestbehandlung - besonders zum Beginn der Plazentation - positiv beeinflusst werden.