





Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. R. Stolla

Arbeit angefertigt unter Leitung von  
Prof. Dr. J. Braun

**Die Bedeutung der Embryonenqualität  
im Rahmen des Embryotransfers beim Rind  
– eine Literaturstudie**

**Mit einem Lernprogramm über den Embryotransfer beim Rind**

Inaugural –Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwigs-Maximilians-Universität München

von  
Sabine Maag  
aus  
Backnang

München 2002

Gedruckt mit Genehmigung  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Referent:	Univ.-Prof. Dr. J. Braun
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz

Tag der Promotion: 19.07.02

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Derzeitiger Stand des Embryotransfers	2
<b>2. Faktoren, welche die Embryonenqualität beeinflussen</b>	<b>5</b>
2.1. Jahreszeit	5
2.2. Follikel- und Eizellenreifung	7
2.3. Befruchtungsrate und Besamung	8
2.4. Spendertier	10
2.4.1. Allgemeiner Gesundheitszustand und Konstitution	10
2.4.2. Reproduktionsstatus und gynäkologischer Gesundheitszustand	11
2.4.3. Rastzeit, Zwischenkalbezeit (ZKZ) und Besamungsindex (BI)	13
2.4.4. Einfluss eines dominanten Follikels auf das Superovulationsresultat	13
2.4.5. Entfernen des dominanten Follikels zur qualitativen Verbesserung der Embryonenausbeute	17
2.4.6. Progesteronkonzentration zum Zeitpunkt der Einleitung der Superovulation	22
2.4.7. Einfluss von Parität und Alter	23
2.4.8. Rasse und genetische Ursachen	25
2.4.9. Milchleistung	26
2.4.10. Stress	27
2.4.11. Nutzungsintensität des Spendertieres im Embryotransfer	28
2.4.12. Individuelle Veranlagung der Spendertiere	30
2.5. Brunstsynchronisation	30
2.6. Priming	31
2.7. Superovulation	32
2.7.1. Einfluss des Zeitpunktes der Einleitung der Superovulationsbehandlung	33
2.7.2. Einfluss des Gonadotropins auf die Embryonenqualität	35
2.7.3. Einfluss des Gonadotropin-Präparates auf die Embryonenqualität	38
2.7.4. FSH	38
2.7.4.1. eCG	40
2.7.4.2. hMG	41

2.7.5.	Einfluss der Gonadotropindosierung auf die Embryonenqualität	41
2.7.5.1.	FSH	41
2.7.5.2.	eCG	42
2.7.5.3.	hMG	43
2.7.6.	Einfluss des zeitlichen Regimes auf die Embryonenqualität (FSH)	43
2.8.	Einfluss der Follikelanzahl, Ovulationsrate und Embryonenausbeute	45
2.9.	Handling der Embryonen	48
2.10.	Subjektive Beurteilung der Embryonenqualität	49
<b>3.</b>	<b>Bedeutung der Embryonenqualität</b>	<b>50</b>
3.1.	Bedeutung im Rahmen des Embryotransfers	50
3.1.1.	Trächtigkeitsraten nach Embryotransfer	50
3.1.1.1.	Einfluss der Embryonenqualität auf die Trächtigkeitsraten	51
3.1.1.2.	Einfluss des embryonalen Entwicklungsstandes auf die Trächtigkeitsraten	53
3.1.1.3.	Einfluss des Zeitpunktes der Embryonengewinnung auf die Trächtigkeitsraten	55
3.1.1.4.	Einfluss der Zyklussynchronität zwischen Empfänger- und Spendertier auf die Trächtigkeitsraten	58
3.1.1.5.	Einfluss des Spendertiers auf die Trächtigkeitsraten	61
3.2.	Bedeutung im Rahmen der Tiefgefrierkonservierung von Embryonen	61
<b>4.</b>	<b>Beurteilungsmöglichkeiten für Embryonen</b>	<b>64</b>
4.1.	Embryonenqualität: Definition und Einteilung	64
4.1.1.	„4-Klassen-System“	64
4.1.2.	„6-Klassen-System“	66
4.1.3.	Andere Klassifizierungen	66
4.2.	Beurteilungskriterien	70
4.2.1.	Morphologie	70
4.2.1.1.	Größe und Form	71
4.2.1.2.	Farbe und Transparenz	71
4.2.1.3.	Zellverband	72
4.2.1.3.1.	Blastomeren	72
4.2.1.3.2.	Ausgeschleuste Blastomeren; extraembryonales Zellmaterial	73
4.2.1.3.3.	Zellgrenzen	73

4.2.1.4.	Blastozoele, Embryoblast und Trophoblast	74
4.2.1.5.	Grad der Kompaktierung und Perivitelliner Spalt (PVS)	74
4.2.1.6.	Zona pellucida	75
4.2.1.7.	Degeneration, Lysis, Vakuolisierung und Fragmentation	76
4.2.2.	Entwicklungsstadium	77
4.3.	Beurteilung der Weiterentwicklungsfähigkeit durch Kurzzeitkultivierung	80
4.4.	Fluoreszenzfärbungen zur Beurteilung der Embryonenqualität	82
4.4.1.	3'6'-Fluorescein-Diacetat (FDA, Diacetylfluorescein)	82
4.4.2.	4'6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Hoechst 33324)	83
4.5.	Metabolische Tests an Embryonen	84
4.5.1.	Glukoseverbrauch und –verwertung	84
4.5.2.	Pyruvatverbrauch und Laktatproduktion	86
4.5.3.	Sauerstoffverbrauch Adenosintriphosphat (ATP) -Produktion	87
4.5.4.	Aminosäurenverbrauch und Proteinsynthese	88
4.6.	Nachweis von Enzymen	89
4.6.1.	Laktatdehydrogenase	89
4.6.2.	Succinodehydrogenase, G6PDH und GPDH	89
4.6.3.	Lysosomale Enzyme	89
4.7.	Nachweis von Prostaglandinen (PGF)	90
4.8.	Nachweis von Wachstumsfaktoren	90
4.8.1.	Platelet Activating Factor (PAF)	90
4.8.2.	Trophoblastisches Interferon	91
4.9.	Chromosomenanalyse	92
4.10.	Bestimmung der Zellzahl	94
4.10.1.	Gesamtzellzahl	95
4.10.2.	Zellzahl der inneren Zellmasse (ICM) und des Trophektoderms (TE)	96
4.11.	Nachweis apoptotischer Zellen	99
4.12.	Nachweis von Zellverbindungen	100
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>101</b>
<b>6.</b>	<b>Summary</b>	<b>103</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>105</b>





## **1. Einleitung**

Die züchterische Nutzung des Embryotransfers beim Rind ist darauf ausgerichtet, das Fortpflanzungspotential des weiblichen Rindes maximal auszuschöpfen, um über eine höhere Vermehrungsrate genetisch wertvoller Zuchtrinder zur weiteren Beschleunigung des Zuchtfortschrittes in der Rinderzucht einzusetzen. Über seinen züchterischen Anwendungsbereich hinausgehend, stellt das Verfahren Embryotransfer zugleich eine zentrale Basistechnologie dar, auf deren Grundlage weitreichende Manipulationen am Embryo und Genom möglich geworden sind (Rommel, 1991).

Ein wichtiger Faktor für den Erfolg der Durchführung des Embryotransfers und der assoziierten Biotechniken ist die Selektion der Embryonen anhand ihrer Qualität, da die qualitative Klassifizierung Grundlage der Entscheidung über die spätere Verwendung der Embryonen darstellt (Kauffold und Thamm, 1985). Durch die Klassifizierung von Embryonen können einerseits für den Transfer geeignete Embryonen ausgewählt werden und andererseits wird eine sachgerechte Selektion im Hinblick auf den Verwendungszweck (Tiefgefrier-Konservierung, Sexing, Splitting) gewährleistet (Shea et al., 1976). Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der Bewertung der Qualität von Rinderembryonen im Rahmen des Embryotransfers darzustellen, sowie die Ursachen für das Zustandekommen variabler Embryonenqualitäten und verschiedenen Möglichkeiten zur Beurteilung der Embryonenqualität zu erörtern.

Als Ergänzung zu der vorliegenden Arbeit wurde ein Lernprogramm auf CD entwickelt, welches der Dissertationsschrift beiliegt. Es soll sowohl Studenten und praktischen Tierärzten, wie auch den Besamungstechnikern und Interessierten aus den angrenzenden Fachgebieten das grundlegende Wissen über den Embryotransfer beim Rind und den zwei wichtigsten Biotechnologien, der Kryokonservierung und der In-vitro-Produktion von Embryonen, vermitteln. Obwohl bei diesem Lernprogramm auch auf grundlegende Wissensvermittlung, wie z.B. über den Zyklus des Rindes und seine endokrine Steuerung eingegangen wurde, liegt der Schwerpunkt hier ebenfalls bei der qualitativen Beurteilung von Rinderembryonen, was ausführlich mit reichlich Bildmaterial unterlegt wurde.

## **1.1. Derzeitiger Stand des Embryotransfers**

Das erste durch Embryotransfer produzierte Kalb wurde 1951 geboren (Hasler, 1992). Die kommerzielle Nutzung des Embryotransfers beim Rind begann aber erst in den frühen 70-er Jahren in Nordamerika. Zu dieser Zeit wurden die Embryonen noch auf chirurgischem Weg gewonnen. Unter Vollnarkose wurden die Eileiter durch ventralen Bauchhöhlenzugang zugänglich gemacht. Die hohen Kosten sowie der nicht unerhebliche Aufwand beschränkten die praktische Anwendung des Embryotransfers (Hasler, 1992); zudem führten die chirurgischen Techniken oft zu Adhäsionen im Bereich des Reproduktionstraktes, wodurch die weitere züchterische Nutzung der Tiere beeinträchtigt wurde (Elsden, 1977). Der Embryotransfer bei Milchrindern erfuhr einen entscheidenden Aufschwung in den 70-er Jahren durch die Einführung nichtchirurgischer Techniken zur Embryonengewinnung und gewann mit dem Einsatz des nichtchirurgischen Transfers von Embryonen in den späten 70-ern an Bedeutung (Hasler, 1992).

Heutzutage ist der Embryotransfer eine verbreitete Biotechnik, mit der genetisch wertvolle Rinder weit über die natürlichen Fortpflanzungsraten hinaus reproduziert werden können. Die Anwendung dieser Technik findet immer mehr Verbreitung (s.a. Abb. 2). 1999 wurden auf der gesamten Welt 119164 Rinder gespült und dabei 714356 transfertaugliche Embryonen gewonnen (Thibier, 2000) (s.a. Tab. 1). Nordamerika ist zahlenmäßig weltweit führend auf dem Gebiet des Embryotransfers: 42,9 % der Spülungen und 41,9 % der transfertauglichen Embryonen wurden 1999 in Nordamerika gewonnen. Nur 3,6 % der Spülungen wurden 1999 in der BRD durchgeführt und 4,1 % der transfertauglichen Embryonen stammten 1999 aus der BRD (s.a. Abb. 1). Ein beachtlicher Aufwärtstrend ist auf dem Gebiet der In-vitro-Produktion zu verzeichnen (s.a. Abb. 2). Weltweit wurden 1999 von ca. 50 Teams 26952 Embryonen aus der In-vitro-Produktion übertragen, wobei die Embryonen dabei zu 49,3 % sofort nach ihrer Gewinnung und 50,7 % nach Kryokonservierung übertragen wurden (Thibier, 2000).

Tab. 1: Gewonnene Embryonen im Rahmen des Embryotransfers beim Rind (1999)

	Transfertaugliche Embryonen (Anteil in %)	Nichttransfertaugliche Embryonen (Anteil in %)	Gesamte gewonnene Embryonen	Quelle
Weltweit	714356			IETS-Newsletter Dez. 2000
Europa	145305			AETE, 2000
BRD	29461 (62,9 %)	17400 (37,1 %)	46861	ADR, 2000
Bayern	12898 (65,9 %)	6682 (34,1 %)	19580	Arbeitsgemeinschaft der Besamungsstationen in Bayern e.V., 2000

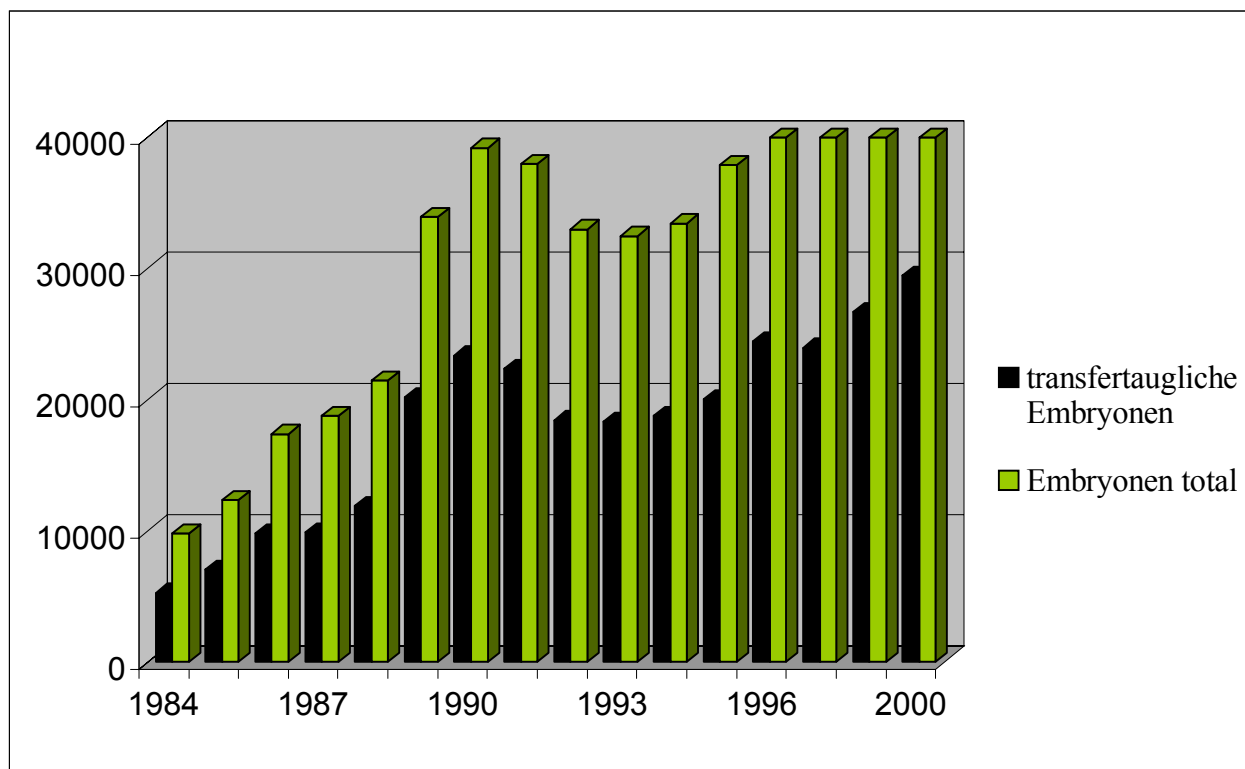


Abb. 1: Anzahl der gewonnenen Embryonen in der BRD (Quelle: ADR-Jahresberichte)

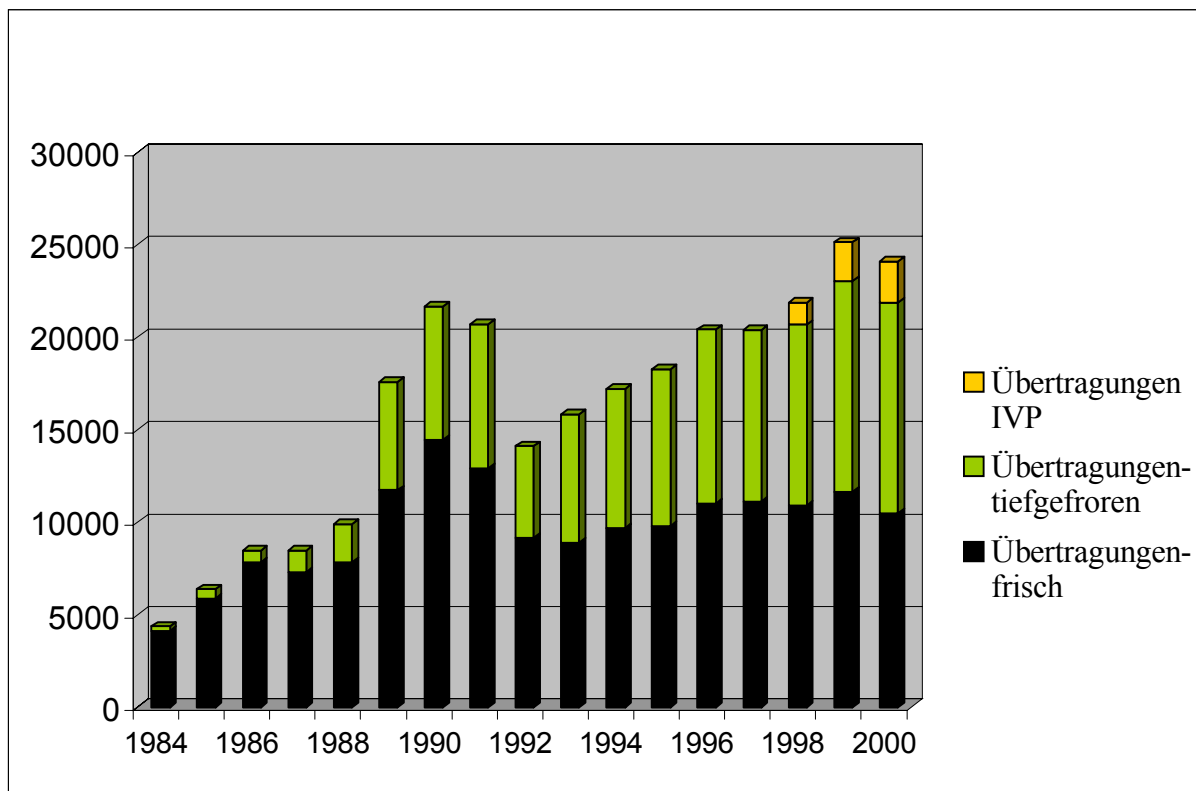


Abb. 2: Anzahl der Embryonenübertragungen in der BRD (Quelle: ADR-Jahresberichte)

## **2. Faktoren, welche die Embryonenqualität beeinflussen**

Der Begriff „Embryoqualität“ bezieht sich in der Regel auf eine Beurteilung der Embryonen anhand ihrer morphologischen Erscheinung. Die Einteilung in verschiedene Qualitätsklassen erfolgt, wenn nicht anders erwähnt, nach Seidel und Seidel (1977) oder anhand des Klassifizierungsschema der I.E.T.S. (Robertson und Nelson, 1991) (s.a. 4.1.).

### **2.1. Jahreszeit**

Obwohl gezeigt werden konnte, dass Temperatur und Photoperiode die Fortpflanzung bei Rindern beeinflussen (Pirchner et al., 1983), wurde bisher wenig über deren Einfluss im Rahmen des Embryotransfers berichtet (Hasler et al., 1983). Die Untersuchung zur Auswirkung der Jahreszeit auf die Embryonenqualitäten nach einer Stimulationsbehandlung gestaltet sich schwierig (Kafi und McGowan, 1997), da die überlagernden Effekte, welche z.B. vom Management, dem Personal, dem Samen oder Rangordnungskämpfe innerhalb der Tierherde sowie von vielen anderen Faktoren ausgehen, bei der Beurteilung solcher Studien berücksichtigt werden müssen (Hasler et al., 1983).

Die vorhandenen Studien liefern widersprüchliche Ergebnisse. Einige Autoren (Church und Shea et al., 1976; Schilling, 1982; Hasler et al., 1983; Bastidas und Randel, 1987) bemerkten signifikante Unterschiede in den Ergebnissen einer Superovulationsbehandlung zu verschiedenen Jahreszeiten, während in anderen Untersuchungen lediglich geringe Abweichungen beobachtet wurden (Betteridge, 1977; Schilling et al., 1980; Hasler et al., 1983). Andere Autoren konnten keinen signifikanten Einfluss der Jahreszeit auf das Resultat einer Superovulationsbehandlung feststellen (Critser et al. 1980; Massey and Oden, 1984; Shea et al., 1984; Misra et al., 1999). Hasler et al. (1983) fanden einen leichten Einfluss der Jahreszeit auf die Embryonenausbeute lediglich bei geschlechtsgesunden Rindern. Die höchste Anzahl Embryonen/Eizellen konnte bei dieser Studie im Winter und Frühling, die niedrigste im Sommer und Herbst gewonnen werden. Glatzel et al. (1999) konnte im Winter (November bis Januar) das tendenziell beste Resultat nach einer Stimulationsbehandlung erzielen. Bastidas und Randel (1987) stellten bei superovulierten Brahman-Kühen zwar keinen Einfluss der Jahreszeit auf die Gesamtanzahl der gewonnenen Embryonen fest, konnten aber eine signifikant höhere Anzahl transfertauglicher Embryonen im Herbst

beobachten (s.a. Abb. 3); auch die Anzahl der gewonnenen Blastozysten pro Spendertier war im Herbst signifikant höher als im Winter. In einer Studie von Schilling et al. (1980) dagegen wurde in den Wintermonaten ein tendenziell höherer Anteil degenerierter Embryonen festgestellt (37,8 % vs. 32,6 %). Schilling (1982) beobachtete die besten Ovarreaktionen in den Frühjahrsmonaten (März bis Juni), was von Church und Shea (1976) und Saumande et al. (1977) bestätigt werden konnte. Saumande et al. (1977) schrieben dies einem veränderten Lichteinfluss zu.

Sommerliche Hitze kann bei den Spendertieren Stressreaktionen auslösen, welche das Ergebnis einer Superovulationsbehandlung beeinträchtigen können (Putney et al., 1989). Zwar wird kein Effekt auf die ovariellen Reaktionen festgestellt, jedoch nimmt der Anteil retardierter Embryonen, sowie der Embryonen der Qualitätsklasse „mäßig“ und „schlecht“ zu (Putney et al., 1989). Insgesamt ergeben sich aus den vorhandenen Studien keine eindeutigen Belege für einen Einfluss der Jahreszeit auf die Qualität der nach Superovulation gewonnenen Embryonen.

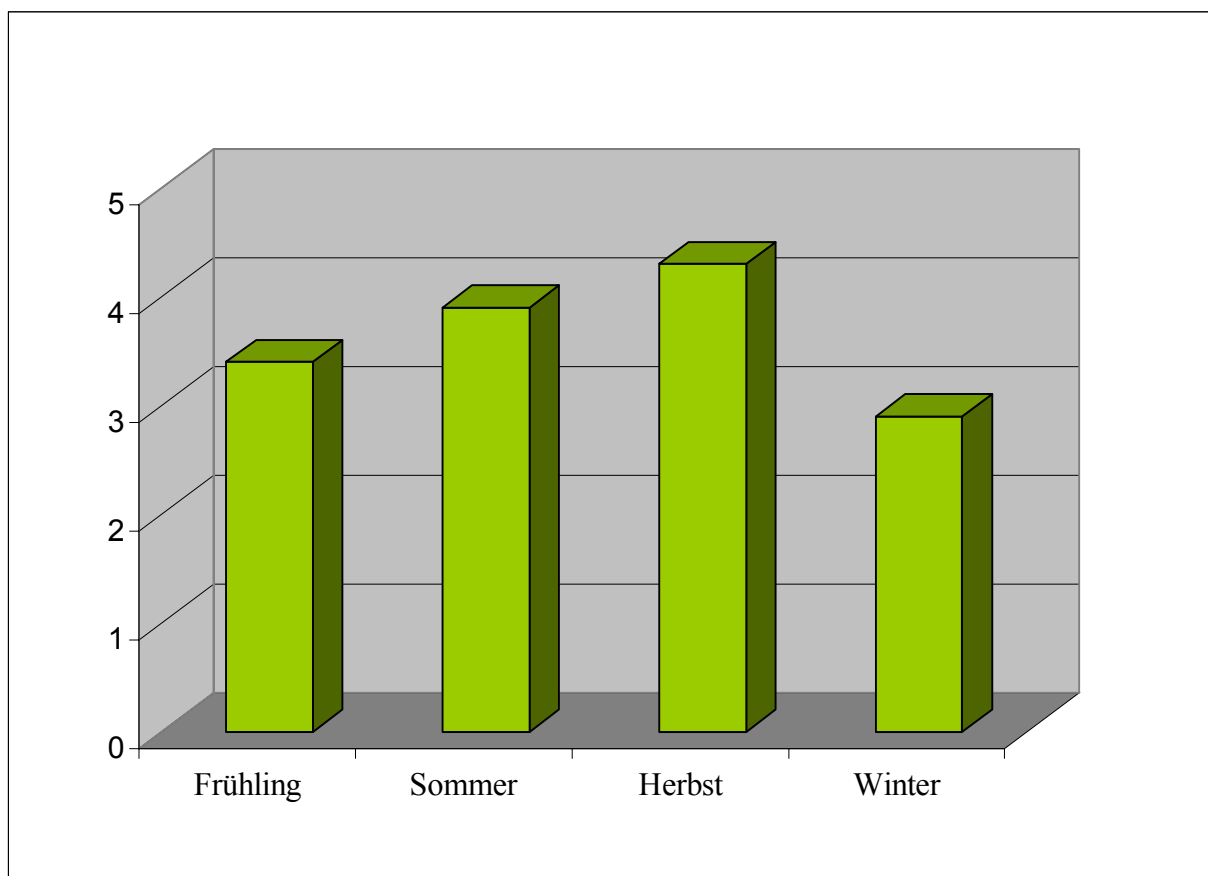


Abb. 3: Anzahl der transfertauglichen Embryonen pro Spülung in Abhängigkeit von der Jahreszeit (modifiziert nach Bastidas und Randel, 1987)

## **2.2. Follikel- und Eizellenreifung**

Die Reifungsvorgänge der Eizellen und Follikel laufen bei superovulierten Tieren oft nicht physiologisch ab, was sich auf die Fertilisationsraten sowie auf die Embryonenqualitäten nach einer Stimulationsbehandlung auswirkt (Callesen et al., 1986; Foote und Ellington, 1988; De Loos et al., 1991; Armstrong, 1993). Die Störungen in der Follikel- bzw. Oozytenmaturation ergeben sich aufgrund der durch die Superovulationsbehandlung ausgelösten Imbalancen in der Östrogen- bzw. Progesteronsekretion (Foote und Ellington, 1988; De Loos et al., 1991; Hyttel et al., 1991). Nach Kauffold und Thamm (1985) können diese hormonellen Fehlsteuerungen für das Entstehen von chromosomalen Anomalien während der Kernreifung, sowie für unreife oder überalterte Gameten zum Zeitpunkt der Befruchtung verantwortlich sein.

Die mitotische Aktivität von Follikeln früher und mittlerer Reifungsstadien der mit Gonadotropinen behandelten Rinder ist signifikant geringer (De Loos et al., 1991). Die Anzahl der Granulosa- und Kumuluszellen, welche eine wichtige Rolle bei der Ernährung der Oozyten spielen, ist bei superovulierten Rindern geringer. Dies könnte metabolische Defizite bei der Ernährung der Eizellen verursachen und damit ihre Maturation beeinträchtigen (Armstrong, 1993). Eine Untersuchung von Eizellen superovulierter Rinder 24 bis 26 Stunden nach dem LH-Peak ergab, dass bei diesen Tieren viele verschiedene Follikel- und Eizellreifungsstadien zu finden sind (De Loos et al., 1991).

Die Abweichungen in der Follikel- und Eizellenreifung sind bei mit eCG behandelten Tieren ausgeprägter als bei mit FSH-P® behandelten Rindern (Foote und Ellington, 1988; Laurincik et al., 1993). Callesen et al. (1986) konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede in der Follikel- und Eizellenreifung bei eCG- oder FSH- behandelten Spendertieren beobachten. Lopes da Costa et al. (2001) vermuten, dass insbesondere Gonadotropine mit einem hohen LH-Anteil den Spermientransport im weiblichen Genitale hemmen und damit der Anteil unbefruchteter Eizellen steigt (s.a. 2.7.3.). Mit LH-gereinigten FSH-Produkten kann die Fertilisationsrate und damit die Produktion von transfertauglichen Embryonen gesteigert werden (Donaldson et al., 1986). Ein zu hoher LH-Anteil in den Präparaten kann prämatüre Ovulationen (Callesen et al., 1986) oder Luteinisierung der stimulierten Follikel bewirken (Foote and Ellington, 1988). Bei mit eCG oder FSH behandelten Rindern produzierten nur 48% der Tiere physiologisch entwickelte Eizellen, bei 25 % wurden sowohl normale als auch

abnorme Oozyten und bei immerhin 27 % der Tiere ausschließlich veränderte Eizellen gefunden. Nur 37 % aller Eizellen dieser Studie waren in ihrer Kernreifung so weit fortgeschritten, wie es zu diesem Zeitpunkt physiologischerweise sein sollte.

### **2.3. Befruchtungsrate und Besamung**

Die Fertilisationsrate bei superovulierten Rindern liegt insgesamt niedriger als bei spontan-ovulierenden Tieren (Elsden et al., 1978; Hawk und Tanabe, 1986). Sie beträgt bei superovulierten Tieren durchschnittlich 60-70 % (Hasler et al., 1993) und 85-95 % bei spontan-ovulierenden Rindern (Roche et al., 1987). Schilling et al. (1982) fanden bei Spendertieren durchschnittlich 15-25 % unbefruchtete Eizellen. Die Gründe für die insgesamt niedrigeren Fertilisationsraten sind vielfältig. Einerseits besteht eine positive Korrelation zwischen Anzahl der Follikel und der Länge des Ovulationszeitraumes (Purwata et al., 1993; 1994), was zu verspäteten Ovulationen und damit zu einer Verschiebung des optimalen Besamungszeitpunktes führen kann. Nach Moncada (1979) kann sich dieser Vorgang u. U. über 24 Stunden hinziehen, weshalb in der superovulatorischen Brunst immer eine zweimalige Besamung am Anfang und am Ende der Brunst zu empfehlen ist (Hahn, 1988). Andererseits werden die niedrigen Befruchtungsraten bei superovulierten Rindern oft durch Veränderungen des Spermientransportes oder der Spermienüberlebensrate im weiblichen Genitaltrakt verursacht (Hawk et al., 1988). Die Veränderungen im tubalen Milieu, welche den Transport der Spermien beeinträchtigen können, werden durch die Gonadotropinbehandlung induziert (Wiley et al., 1982; Hyttel et al., 1991). Lopes da Costa et al. (2001) vermuten, dass insbesondere Gonadotropine mit einem hohen LH-Anteil den Spermientransport im weiblichen Genitale hemmen.

Die Befruchtungsrate bei superovulierten Rindern ist nach künstlicher Besamung niedriger als nach natürlichem Deckakt (Lopes da Costa et al., 2001), was vermutlich darauf zurückgeführt werden kann, dass die im Reproduktionstrakt deponierte Spermienanzahl bei der künstlichen Besamung geringer ist (Hawk et al., 1988). Nach künstlicher Besamung werden ca. 65 % der Eizellen befruchtet und bei ca. 15 % der Spendertiere wird keine der Eizellen befruchtet (Hasler et al., 1983).



Natürlich hat auch die Fruchtbarkeit des zur Besamung eingesetzten Bullen Einfluss auf das Resultat einer Superovulation. Der paternale Effekt des eingesetzten Besamungsbullen auf die Fertilisationsrate darf nicht unterschätzt werden. Manciaux et al. (1999 und 2000) und Ponsart et al. (2001) konnten einen signifikanten paternalen Effekt auf das Spülergebnis feststellen. Es wurde ein signifikanter Einfluss des eingesetzten Besamungsbullen auf die Gesamtanzahl der gewonnenen Embryonen, auf die Zahl der transfertauglichen Embryonen und der unbefruchteten Eizellen, sowie auf die Anzahl der Klasse 1- Embryonen festgestellt (Manciaux et al., 2000). Ponsart et al. (2001) konnten lediglich einen signifikanten Effekt des ausgewählten Besamungsbullen auf die Anzahl der Klasse 1-Embryonen beobachten. Der Anteil unbefruchteter Eizellen ist nach einer Besamung mit dem Samen eines Bullen mit überdurchschnittlicher Fruchtbarkeit signifikant niedriger (Newcomb, 1980).

Der Einsatz von Frischsamen beim Embryotransfer steigert den Anteil transfertauglicher Embryonen (Onuma et al., 1970; Seidel et al., 1978a; Nohner et al., 1996). Durch die Besamung mit Frischsamen kann die durchschnittliche Anzahl von unbefruchteten Eizellen pro Spülung von 9,6 auf 3,5 gesenkt werden (Nohner et al., 1996). Hawk et al. (1988) konnten dagegen keine signifikante Verbesserung der Fertilisationsraten nach Besamung mit Frischsamen feststellen. Der Antibiotikazusatz zum Samen beeinflusst die Fertilisationsrate nicht (Newcomb, 1980).

Die Anzahl der Besamungen im Anschluss an eine Superovulationsbehandlung beeinflusst die Befruchtungsraten positiv (Newcomb, 1980). Es kann ein hochsignifikanter Unterschied in den Fertilisationsraten nach ein- (48 Stunden nach der PGF-Injektion) und zweimaliger Besamung (48 und 72 Stunden nach der PGF-Injektion) beobachtet werden (29,9 % bzw. 5,0 % unbefruchtete Oozyten; Newcomb, 1980). Walton und Stubbings (1986) stellten vergleichbare Befruchtungsraten bei Rindern, welche 60 und 72 Stunden nach der PGF-Injektion und 60, 72 und 84 Stunden nach PGF-Injektion besamt wurden, fest. Hahn (1988) empfiehlt immer eine zweimalige Besamung am Anfang und am Ende der Brunst. Die besten Ergebnisse werden mit zweimaligen Besamungen 55-57 Stunden und 71-73 Stunden nach der ersten PGF-Injektion erzielt (Becker et al., 2000). Critser et al. (1980) konnten dagegen keinen Unterschied in der Embryonengewinnungsrate, sowie dem Anteil befruchteter Eizellen nach ein-, zwei- oder dreimaliger Besamung feststellen. Andere Autoren beobachteten keine verbesserten Befruchtungsraten nach zwei- (West et al., 1984) bzw. dreimaligen (Schiewe et al., 1987; López-Gatius et al., 1988) Besamungen gegenüber der einmaligen Besamung.

Eine gleichzeitig mit der ersten Besamung erfolgende intravenöse hCG-Injektion wirkte sich positiv auf die Embryonengewinnungsrate aus (Newcomb, 1980; Glatzel et al., 1999), während die intramuskuläre Anwendung des Hormons keinen Effekt zeigte (Newcomb, 1980). Eine GnRH-Behandlung 48 Stunden nach der PGF-Injektion hatte dagegen einen signifikant negativen Einfluss auf die Fertilisationsrate (Walton und Stubbings, 1986). Die Anzahl der insgesamt gewonnenen Embryonen/Eizellen steigt zwar nach solch einer Behandlung, jedoch ist dieser Unterschied lediglich auf die signifikante Zunahme des Anteils unbefruchteter Oozyten zurückzuführen (Walton und Stubbings, 1986). Wubishet et al. (1986) beobachteten jedoch einen signifikant positiven Einfluss einer solchen Behandlung auf die Befruchtungsrate und die Anzahl transfertauglicher Embryonen. Savage et al. (1987) stellten keine Unterschiede in der Anzahl und dem Anteil der transfertauglichen Embryonen, jedoch eine signifikante Zunahme der insgesamt gewonnenen Embryonen nach dieser GnRH-Behandlung fest.

## **2.4. Spendertier**

### **2.4.1. Allgemeiner Gesundheitszustand und Konstitution**

Um ein optimales Resultat beim Embryotransfer zu erzielen, sollten die Donoren im Rahmen einer sorgfältigen Allgemeinuntersuchung auf ihren Gesundheitszustand untersucht werden. Schon die allgemeine Belastung der Rinder durch die Hormonbehandlungen beim Embryotransfer erfordert einen guten Gesundheitszustand der Spendertiere (Niemann und Meinecke, 1993). Kachektische Zustände, Durchfälle und Lahmheiten stellen keine guten Voraussetzungen für eine optimale Embryonenausbeute dar (Görlach, 1997). Glatzel et al. (1999) beobachteten, dass jegliche klinische Störung zum Behandlungszeitraum die Quantität und Qualität der gewonnenen Embryonen negativ beeinflusst. Schädigende Einflüsse auf die Embryonenentwicklung können auch durch Futtermittelintoxikationen und Endoparasitenbehandlungen zum Zeitpunkt der Superovulationsbehandlung bewirkt werden (Görlach, 1997). Ebenso können Infektionskrankheiten, wie z.B. eine inapparente BVD/MD-Infektion das Spülresultat beeinträchtigen (Kafi et al., 1994; Kafi et al., 1996). Die Ovulationsrate bei Holstein-Frisian-Kalbinnen, die zum Zeitpunkt der Besamung mit BVD infiziert wurden, war tendenziell niedriger (Kafi et al., 1996) und sie produzierten signifikant weniger transfertaugliche Embryonen (Kafi et al., 1994).

Der Ernährungszustand der Spendertiere, sowie die Höhe der täglichen Energieaufnahme beeinflussen das Ergebnis einer Superovulationsbehandlung (Yaakub et al., 1999). Der Body-Condition-Score (BCS) hatte keinen signifikanten Einfluss auf Ovulationsrate und Embryonengesamtanzahl, sowie auf die Embryonenqualität, jedoch tendierten die im BCS besseren Tiere auch zu besseren Resultaten (Newcomb, 1980). Überernährte Rinder (BCS > 4,0) produzierten in einer Untersuchung von Siddiqui et al. (2002) überhaupt keine Embryonen. Bei diesen Tieren lassen sich oft Ovarialzysten (Siddiqui et al., 2002) oder ein dominanter Follikel zum Zeitpunkt der Superovulationseinleitung (Murphy et al., 1991) beobachten. Durch eine kurzzeitige Reduzierung der Energieaufnahme von Spendertieren kurz vor und während einer Superovulationsbehandlung konnten die Ovarreaktionen und die Embryonenqualität verbessert werden, der Anteil an Blastozysten und die Zellzahl nahm zu (Nolan et al., 1998). Eine abrupte signifikante Verringerung der Nahrungsaufnahme kann jedoch auch die Embryonenqualität negativ beeinflussen (Yaakub et al., 1997). Mantovani et al. (1993) konnten in einer Untersuchung zeigen, dass sich eine ad libitum Fütterung der Spendertiere, verglichen mit einer 100 Tage dauernden restriktive Fütterung, signifikant negativ auf die Anzahl transfertauglicher Embryonen auswirkt.

#### **2.4.2. Reproduktionsstatus und gynäkologischer Gesundheitszustand**

Die Ergebnisse einer Superovulationsbehandlung sind bei geschlechtsgesunden Rindern sowohl in der Quantität, als auch in der Qualität besser als bei Tieren mit Fortpflanzungsstörungen (Schilling et al., 1980). Die spezielle gynäkologische Untersuchung der Spendertiere im Rahmen des Embryotransfers stellt eine unabdingbare Voraussetzung zur Durchführung erfolgreicher Superovulationsbehandlungen dar. Bei der Erhebung des Vorberichts für das Spendertier sollte insbesondere die Fruchtbarkeitslage vor der letzten Trächtigkeit, der Geburtsverlauf inklusive Puerperalstörungen, Ovarialzysten, Endometritiden und Einsetzen der ersten Brunst post partum berücksichtigt werden (Niemann, 1986; Hahn, 1995; Görlach, 1997).

Nach Greve et al. (1995) stellt die Optimierung der physiologischen Vorgänge bei den Spendertieren die einzige Möglichkeit zur Reduktion des Anteils nicht-transfertauglicher Embryonen dar. Donoren, welche keine klinischen Anzeichen einer gynäkologischen Erkrankung zeigen, produzieren signifikant mehr transfertaugliche Embryonen (Mengel,

1988; Busse, 1995). Spendertiere mit Ovarialzysten, Endometritiden oder Verklebungen am Genitale produzieren signifikant mehr unbefruchtete Eizellen als gynäkologisch gesunde Spendertiere und sprechen öfter überhaupt nicht auf eine Superovulationsbehandlung an (Hasler et al., 1983). Ebenso sind die Trächtigkeitsraten nach der Übertragung von Embryonen geschlechtsgesunder Tiere höher (Hasler et al., 1983). Donoren, die an infektiösen Erkrankungen des Geschlechtsapparates leiden, liefern mehr unbefruchtete und degenerierte Embryonen, zudem wird bei diesen Embryonen oft anhaftendes infektiöses Material an der Zona pellucida aufgefunden (Shea, 1981). Bowen et al. (1978) stellten jedoch keine signifikanten Unterschiede in den Anwachsrate der Embryonen von Spendertieren mit und ohne Reproduktionsprobleme fest, solange keine Abweichungen in der Embryonenmorphologie gegeben waren.

Auch klinisch inapparente gynäkologische Erkrankungen, wie z.B. subklinische Endometritiden, können die Transferergebnisse (Müller, 1988; Müller, 1989), sowie die Embryonenqualität (Boos et al., 1989) beeinträchtigen. Biopsieproben des Endometriums von Spendertieren an Tag 7 ergaben, dass die Mikromorphologie des Endometriums mit der Embryonenqualität korreliert ist (Boos et al., 1989). Die Ansprechbarkeit der Ovarien auf eine Gonadotropinbehandlung, die Fertilisationsrate, sowie die Embryonenqualität werden durch das Auftreten von neutrophilen Granulozyten im Endometrium negativ beeinflusst (Boos et al., 1989). Verklebungen der Eileiter können meist nicht klinisch diagnostiziert werden. Nach einer Superovulationsbehandlung fällt bei diesen Tieren auf, dass trotz einer guten ovariellen Reaktion keine Embryonen bzw. Eizellen in der Spülflüssigkeit einer oder sogar beider Seiten gefunden werden können (Bowen et al., 1978).

Das Brunstverhalten nach einer Stimulationsbehandlung kann als orientierendes Kriterium für den zu erwartenden Superovulationserfolg dienen (Scholz, 1987). Spendertiere mit gut ausgeprägten Brunsterscheinungen produzieren qualitativ bessere Embryonen, sowie insgesamt eine höhere Zahl von Embryonen (Münnich und Busch, 1992).

#### **2.4.3. Rastzeit, Zwischenkalbezeit (ZKZ) und Besamungsindex (BI)**

Zur Beurteilung der Fruchtbarkeitslage eines potentiellen Spendertieres kann auch der BI und die ZKZ vorangehender Trächtigkeiten genutzt werden. Im Allgemeinen kann man sagen, dass Tiere mit kurzer ZKZ und niedrigem BI ein besseres Superovulationsresultat liefern (Hanselmann und Koll, 1994; Mengel, 1988; Camp, 1989). Spendertiere mit einer ZKZ von weniger als 365 Tagen und einem BI kleiner 1,5 produzieren einen höheren Prozentsatz an transfertauglichen Embryonen (Mengel, 1988). Die Zuverlässigkeit derartiger Aussagen steigt mit der Anzahl an Abkalbungen vor der ersten Nutzung im Embryotransfer. Camp (1989) errechnete hierzu die durchschnittliche ZKZ aus mindestens drei Abkalbungen. Von Spendertieren mit einer mittleren ZKZ von weniger als 370 Tagen konnten durchschnittlich 6,1 transfertaugliche Embryonen, von Donoren mit einer mittleren ZKZ von 370–389 dagegen nur 3,2 transfertaugliche Embryonen pro Spülung gewonnen werden.

Die besten Resultate nach einer Superovulationsbehandlung konnte Schilling (1982) bei einer Rastzeit von 60 bis 70 Tagen erzielen. Einen signifikanten Einfluss der Rastzeit auf die Embryonenausbeute und die Befruchtungsrate konnten Hasler et al. (1983) lediglich bei „infertilen“ Rinder beobachten; bei den geschlechtsgesunden Tieren wurden die besten Ergebnisse in einem weiten Zeitraum von 151-300 Tagen Rastzeit erzielt. Newcomb (1980) konnte keinen Einfluss der Rastzeit auf Ovulationsrate, Gesamtanzahl, sowie auf die Embryonenqualität beobachten.

#### **2.4.4. Einfluss eines dominanten Follikels auf das Superovulationsresultat**

Wie zahlreiche Untersuchungen in den letzten Jahren belegen, läuft die Follikelanbildung beim Rind in ein bis vier Wellen ab (Ko et al., 1991; Adams et al., 1993a ; Adams et al., 1993b; Purwantara et al., 1993; Adams, 1994b; Kastelic et al., 1994; Ireland, 1987; Fortune et al., 1988; Savio et al., 1988; Sirois und Fortune, 1988; Kähn, 1989; Ginther et al., 1989a; Ginther et al., 1989b; Hagemann et al., 1999; Salamone et al., 1999; Medina et al., 2001; Kim et al., 2001). Während einer solchen Welle wächst jeweils ein Follikel zu einem sog. dominanten Follikel heran, welcher einige Tage bestehen bleibt (Plateauphase) und sich anschließend wieder zurück bildet. Das durch die Luteolyse bewirkte Absinken der Plasmalogesteronkonzentration führt zum Wegfall des negativen Feedbacks des

Progesterons auf die LH-Ausschüttung, wodurch der dominante Follikel der letzten Follikelreifungswelle zur Ovulation gelangt (Roche and Boland, 1991; Mihm et al., 1996). Der Follikel ist nur in der Wachstums- bis zur frühen Plateauphase funktionell dominant (Lavoie und Fortune, 1990; Fortune et al., 1991), danach verliert er seine funktionelle Dominanz, obwohl er noch einige Tage größtmäßig die anderen Follikel überragt (Fortune et al., 1991). Dieser dominante Follikel beeinflusst das Wachstum der anderen untergeordneten Follikel, er bewirkt deren Regression und unterdrückt die nächste Follikelwelle (Matton et al., 1981; Staigmiller und England, 1982; Ko et al., 1991). Ist ein Follikel den anderen in seiner Entwicklung voraus, dominiert er höchstwahrscheinlich durch Sekretion von Rückkopplungsreglern, wie Östradiol oder Inhibin, welche einen Konzentrationsabfall des zirkulierenden FSH bewirken (Stock und Stolla, 1995). Histologische Untersuchungen bestätigen die Auswirkungen einer follikulären Dominanz auf die untergeordneten Follikel (Rouillier et al., 1990). Oozyten, die während einer follikulären Dominanzphase gewonnen wurden, zeigten nach in vitro Fertilisation anschließend eine reduzierte Weiterentwicklungsfähigkeit (Hagemann, 1999). Flow-zytometrische Untersuchungen an Follikelzellen zeigen, dass der Anteil apoptotischer Zellen bei untergeordneten Follikeln höher ist (Hagemann, 1999). Sowohl die Follikel des ipsi- als auch des kontralateralen Ovars werden von dem dominanten Follikel in ihrem Wachstum gehemmt (Ginther et al., 1989b; Hagemann, 1999).

Die Anwesenheit eines dominanten Follikels zu Beginn der Behandlung mit Gonadotropinen verschlechtert das Resultat einer Superovulationsbehandlung (Grasso et al., 1989a; Guilbault et al., 1991; Huhtinen et al., 1992; Bungartz und Niemann, 1993; Adams, 1994b; Stock et al., 1996). Dafür gibt es im Wesentlichen zwei Erklärungen: Ist ein dominanter Ovarfollikel zum Zeitpunkt der FSH-Injektionen anwesend, kann es zur asynchronen Anbildung einer inhomogenen Follikelgruppe kommen. Während die untergeordneten Follikel schon atretisch sind, ist die Entwicklung der nächsten Follikelwelle noch nicht weit genug fortgeschritten (Adams, 1994b). Zudem wurde nachgewiesen, dass es zur vorzeitigen Ovulation des dominanten Follikels kommen kann und der nun zusätzlich angebildete Gelbkörper aufgrund seines frühen Entwicklungsstadiums nicht auf die nachfolgenden PGF-Injektionen anspricht, so dass die Tiere anschließend keine Brunst zeigen und die Ovulationen der angebildeten Follikel unterbleiben, weil die unterschwelligen Progesteronkonzentrationen in diesem Fall den für die Ovulationen der angebildeten Follikel notwendigen FSH- und LH-Anstieg verhindern (Stock et al., 1993).

Um die Resultate einer Superovulationsbehandlung sicherer vorhersagen zu können, sollte daher die folliculäre Entwicklung zum Zeitpunkt der Einleitung der Gonadotropinbehandlung genau überwacht werden (Armstrong, 1993) und der Beginn einer Superovulation an einem Zyklusstand begonnen werden, zu dem kein dominanter Follikel existiert (Fricke et al., 1994; Goulding et al., 1990; Stock et al., 1996). Stock et al. (1996) führen die schlechteren Superovulationsergebnisse v.a. auf die geringere Ovulationsrate ( $29,6 \pm 11,9$  vs.  $36,8 \pm 14,5$ ) bei den Spendertieren, welche einen dominanten Follikel zum Zeitpunkt der Superovulationsbehandlung aufwiesen, zurück.

Andere Autoren (Wilson et al., 1990; Calder und Rajamahendran, 1992a; Gray et al., 1992; Rajamahendran et al., 1993) konnten keinen Einfluss des dominanten Follikels auf das Resultat einer Superovulationsbehandlung nachweisen.

Die widersprüchlichen Ergebnisse der Untersuchungen des Einflusses des dominanten Follikels auf das Superovulationsresultat beruhen wahrscheinlich darauf, dass in vielen Untersuchungen nicht zwischen morphologischer und funktioneller Dominanz unterschieden wird (Stock und Stolle, 1995). Der dominante Ovarfollikel wurde zudem bisher unterschiedlich definiert (s.a. Tab. 2).

Tab. 2: Vergleich der Definitionen des dominanten Follikels

Autoren	Definition
Buratini et al., 2000	$\varnothing \geq 5$ mm wachsend
Shaw und Good, 2000	$\varnothing > 8$ mm
Lussier et al., 1987 Grasso et al., 1989a Guilbault et al., 1991 Maciel et al., 1995	$\varnothing > 9$ mm konstant über weniger als 4 Tage oder wachsend
Bungartz und Niemann, 1994	$\varnothing > 9$ mm konstant über weniger als 3 Tage oder wachsend
Hoppe, 1995	$\varnothing > 9$ mm wachsend über 2 Tage
Rouillier et al., 1990 Rouillier et al., 1996	$\varnothing \geq 10$ mm und wachsend oder $\varnothing \geq 10$ mm konstant über weniger als 4 Tage
Huhtinen et al., 1992	$\varnothing > 8$ mm konstant über 3 Tage oder $\varnothing > 9$ mm konstant über 4 Tage
Wilson et al., 1990 Otoi et al., 2000 Baracaldo et al., 2000	Größter Follikel (keine Verlaufsuntersuchung)
Gray et al., 1992	Größter Follikel noch nicht in Regression
Bungartz, 1993	Größter Follikel im Wachstum



#### **2.4.5. Entfernen des dominanten Follikels zur qualitativen Verbesserung der Embryonenausbeute**

Es stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, um den dominanten Follikel vor Beginn einer Superovulationsbehandlung zu entfernen (Armstrong, 1993). Physikalisch lässt er sich eliminieren durch Ovariectomie (Staigmiller und England, 1982), Elektrokauterisation (Ko et al., 1991; Adams et al., 1993a), manuelles Abdrücken (Bartmann, 1992; Stüwe, 1994b) oder durch transvaginale Punktion, welche rektal kontrolliert oder ultraschallgeleitet durchgeführt wird (Gray et al., 1992; Bungartz, 1993; Lindsey et al., 1994; Bo et al., 1995; Maciel et al., 1995; de Ruigh et al., 1996; Nohner et al., 1996; Hill und Kühner, 1996; Bergfelt et al., 1997; Lautner, 1997; Wolfsdorf et al., 1997; Otoi et al., 1998a; Otoi et al., 1998b; Ede et al., 1999; de Ruigh und Mullart, 1999; Gradela et al., 1999; Kim et al., 2000; Kim et al., 2001).

Untersuchungen zur Auswirkung des Entfernens eines dominanten Ovarfollikels beim Rind auf das Superovulationsresultat und die Embryonenausbeute ergaben z.T. widersprüchliche Ergebnisse (s.a. Tab. 3). Die Entfernung des dominanten Follikels vor Beginn der Superovulationsbehandlung führt zu einer erhöhten Anzahl insgesamt gewonnener sowie transfertauglicher Embryonen pro Spülung (Guilbault et al., 1991; Hahn, 1992; Bungartz, 1993; Nasser et al., 1993; Adams, 1994b; Bungartz und Niemann, 1994; Lindsey et al., 1994; Kohram et al., 1995; de Ruigh et al., 1996; Hill und Kühner, 1996; Stock et al., 1996; Shaw und Good, 2000; Kim et al., 2001). Ebenso wurde dadurch die Ovulations- (Wolfsdorf et al., 1997) und Fertilisationsrate (Bo et al., 1995) verbessert, verglichen mit Tieren, die in Anwesenheit eines dominanten Follikels superovuliert wurden. Dies kann damit erklärt werden, dass durch Aspiration des dominanten Follikels der ersten Follikelreifungswelle ein früherer (Tag 6,0 vs. 6,9) und höherer Anstieg der FSH- Konzentration (381 vs. 292 pg/ml) bewirkt wird (Buratini et al., 2000). Shaw und Good (2000) führten die Zunahme der Embryonenausbeute jedoch auf den höheren Anteil an nichttransfertauglichen Embryonen zurück (s.a. Tab. 3).

Baracaldo et al. (2000) stellten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich zwischen Punktion der beiden größten und Punktion aller Follikel  $\geq 5\text{mm}$  fest. Die Befruchtungsrate und der Anteil transfertauglicher Embryonen war bei Spendertieren, von denen nur die zwei größten Follikel punktiert werden, tendenziell höher (Baracaldo et al., 2000). Andere Autoren hingegen stellten keine Zunahme des Anteils an Embryonen und transfertauglichen

Embryonen nach Entfernung des dominanten Follikels fest, obwohl Follikelwachstum und Ovulationen gefördert wurden (Stüwe, 1994b; Gray et al., 1992; Maciel et al., 1995; Otoi et al., 1998a; Otoi et al., 1998b; Wolfsdorf et al., 1997).

Die Entfernung eines dominanten Follikels hatte keinen signifikanten Einfluss auf eine qualitative Verbesserung der Embryonen (Stüwe, 1994b). Die Anteile der Qualitätsklassen 2 und 3 war bei den nichtpunktierten Tieren tendenziell erhöht, während der Anteil der „sehr guten“ Embryonen und der unbefruchteten Eizellen bei den punktierten Donoren tendenziell höher war (Shaw und Good, 2000) (s.a. Abb. 4).

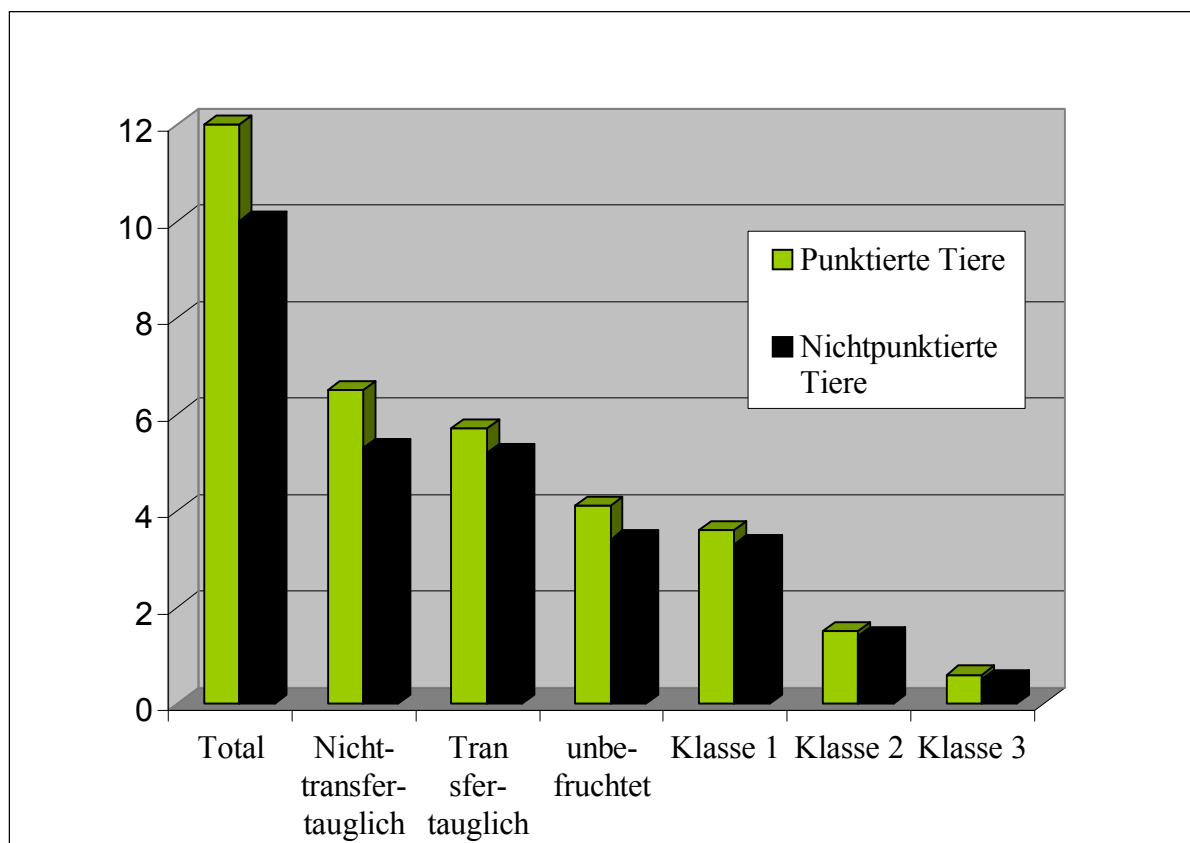


Abb. 4: Vergleich der qualitativen Klassifizierung von Embryonen von punktierten und nichtpunktierten Spendertieren (modifiziert nach Shaw und Good, 2000)

Tab. 3: Einfluss der Entfernung des dominanten Follikels auf das Superovulationsergebnis

Autoren	Methode	Ergebnis
Bartmann, 1992	Manuelles Abdrücken unter sonographischer Kontrolle	Tendenziell mehr Gesamtembryonen und signifikant mehr transfertaugliche Embryonen
Gradela et al, 1999	Transvaginale Punktion	Signifikant höhere Fertilisationsrate
De Ruigh und Mullart, 1999		Tendenziell mehr transfertaugliche Embryonen
Bungartz, 1993 Lindsey et al., 1994 Hill und Kühner, 1996 De Ruigh et al., 1996  Ede et al., 1999  Kim et al., 2000 Kim et al., 2001  Bo et al., 1995  Otoi et al., 1998a Otoi et al., 1998b Gray et al., 1992 Maciel et al., 1995	Ultraschallgeleitete transvaginale Punktion	Signifikant mehr Gesamtembryonen und transfertaugliche Embryonen  Tendenziell mehr Gesamtembryonen  Tendenziell mehr Gesamtembryonen und transfertaugliche Embryonen  Höhere Fertilisationsrate  Kein Unterschied
Otoi et al., 1998b  Calder und Rajamahendran, 1992a Rajamahendran und Calder, 1993	hCG	Signifikant weniger befruchtete Embryonen Signifikant weniger transfertaugliche Embryonen  Kein Unterschied
Bo et al., 1991  Adams et al., 1994 Bo et al., 1995 Baracaldo et al., 2000	Östrogen	signifikant reduzierte Fertilisationsrate  Kein Unterschied
Vos et al., 1995 Macmillan et al., 1997  Kohram et al., 1995 Guilbault et al., 1996 Kohram et al., 1998a Kohram et al., 1998b  D'Occhio et al., 1999	GnRH	Verminderten Anzahl transfertauglicher Embryonen  Signifikanten mehr Gesamtembryonen, degenerierte Embryonen und unbefruchtete Eizellen  Signifikant mehr unbefruchtete Eizellen

Bei den hormonellen Vorgehensweisen zur Follikelentfernung kommt entweder die Anwendung von hCG (Calder und Rajamahendran, 1992a; Rajamahendran und Calder, 1993; Otoi et al., 1998b), Östrogenen (Wu et al., 1988; Bo et al., 1991; Bo et al., 1992; Bo et al., 1993; Bo et al., 1994a; Bo et al., 1994b; Baracaldo et al., 2000) oder GnRH (Kohram et al., 1995; Guiltbault et al., 1996; Macmillan et al., 1997; Kohram et al., 1998a; Kohram et al., 1998b) in Betracht.

Es besteht die Möglichkeit, den dominanten Follikel durch die Verabreichung von GnRH oder hCG auch während der Corpus-luteum-Phase zyklischer Tiere zur Ovulation zu bringen (Stock und Stolle, 1995). Den Donoren wird 7 bzw. 8 Tage nach dem Auftreten der ersten Brunsterscheinungen 1000 I.E. (Calder und Rajamahendran, 1992a; Rajamahendran und Calder, 1993) bzw. 5000 I.E. hCG (Otoi et al., 1998b) injiziert und 2 bzw. 3 Tage danach mit der Superovulationsbehandlung begonnen. Allerdings trat dabei keine signifikante Verbesserung der Embryonenausbeute ein (Rajamahendran und Calder, 1993; Calder und Rajamahendran, 1992a). Andere Untersuchungen ergaben, dass Rinder, denen der dominante Follikel durch Injektion von hCG vor Beginn der Superovulationsbehandlung entfernt wurde, signifikant weniger transfertaugliche Embryonen produzierten und die Fertilisationsrate niedriger war als bei den Kontrollgruppen (58,1% vs. 92,9%), die in Anwesenheit eines dominanten Follikels superovuliert werden (Otoi et al., 1998b). Der hemmende Effekt des hCG's auf die Reifung der untergeordneten Follikel könnte hierfür eine Erklärung sein (Armstrong, 1993).

Die Luteinisierung des dominanten Follikels durch GnRH-Gaben führte zu einer verminderten Anzahl transfertauglicher Embryonen (Vos et al., 1995; MacMillan et al., 1997). Wurde die GnRH-Verabreichung mit transvaginaler Follikelpunktion kombiniert, führte dies zwar zu einer signifikanten Steigerung der Embryonenausbeute, jedoch nahm hauptsächlich der Anteil an degenerierten Embryonen und unbefruchtete Eizellen zu (Kohram et al., 1995; Kohram et al., 1998a). Chronische GnRH-Zufuhren führen zu einer chronischen Desensibilisierung der Adenohypophysenzellen gegenüber endogenem und exogenem GnRH durch „Down-Regulation“ der peripheren LH-Konzentration (Hoppe, 1995; D'Occhio et al., 1999). Der ovulationsauslösende LH-Peak bleibt unter diesen Umständen aus, so dass hCG (Hoppe, 1995) oder LH (D'Occhio et al., 1999) zur Ovulationsinduktion verabreicht werden muss. Chronische GnRH-Zufuhr mittels Deslorelin®-Ohrimplantaten und anschließende Ovulationsauslösung mit LH soll die Anzahl retardierter Follikel reduzieren (D'Occhio et al.,

1997) und den optimalen Besamungszeitpunkt leichter bestimmbar machen (D'Occhio et al., 1998a; D'Occhio et al., 1998b). Trotz sehr guter Ovarreaktionen ist der Anteil unbefruchteter Eizellen bei diesen Tieren jedoch signifikant erhöht (Hoppe, 1995).

Der dominante Ovarfollikel kann auch durch Östrogengaben zur Atresie gebracht werden (Bo et al., 1991; Bo et al., 1992; Wu et al., 1988). Durch Verabreichung von Östrogenvalerat in der Mitte oder am Ende der Wachstumsphase des dominanten Follikels konnte dessen Dominanzphase jedoch nicht verkürzt werden (Bo et al., 1993; Bo et al., 1994a). Der Sinn einer solchen Behandlung ist fraglich, weil die Fertilisationsrate danach signifikant reduziert ist (Bo et al., 1991).

Andere Autoren konnten mit einer kombinierten Behandlung mit Östradiol-17 $\beta$  und Progesteron bei unbekanntem Zyklusstand der Spendertiere vergleichbare Resultate wie bei herkömmlichen Superovulationsbehandlungen bei bekanntem Zyklusstand erzielen (Adams et al., 1994a; Bo et al., 1995; Baracaldo et al., 2000). Die Einleitung einer erfolgreichen Superovulation ohne Kenntnis des Zyklusstandes könnte in manchen Situationen die praktische Durchführung des Embryotransfers erleichtern. Wu et al. (1988) und Baracaldo et al. (2000) konnten nach einer solchen Behandlung keine signifikanten Unterschiede in der durchschnittlichen Anzahl der Gesamtembryonen, der transfertauglichen Embryonen, sowie in der Befruchtungsrate feststellen, verglichen mit den Tieren, die bei bekanntem Zyklusstand superovuliert wurden. Bo et al. (1995; 1996) beobachteten eine Zunahme des Anteils transfertauglicher Embryonen nach kombinierter Östradiol-17 $\beta$ -Progesteron-Behandlung, im Vergleich zu ausschließlich mit Progesteron behandelten Spendertieren.

#### **2.4.6. Progesteronkonzentration zum Zeitpunkt der Einleitung der Superovulation**

Ob Progesteronwerte zum Zeitpunkt der hormonalen Stimulation eine Aussage über den Superovulationserfolg geben können, ist umstritten (Schilling, 1982). Zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginnes mit Gonadotropinen sollte sich auf den Ovarien der potentiellen Spendertiere ein Gelbkörper befinden (Greve et al. 1983; Kafi und McGowan, 1997). Die Existenz eines funktionellen Corpus luteum garantiert für eine synchrone Entwicklung der Follikel und sorgt für den präovulatorischen Sekretionsanstieg von endogenem LH (Greve et al., 1983). Ein Plasmaprogesteorgehalt  $< 0,5$  ng/ml deutet darauf hin, dass kein funktioneller Gelbkörper vorhanden ist und somit keine Luteolyse ausgelöst werden kann. Nach einer PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Injektion steigt bei diesen Spendertieren der LH-Spiegel nicht an, die Tiere zeigen keine Brunsterscheinungen und produzieren auch keine Embryonen/Eizellen (Greve et al., 1983).

Die Progesteronkonzentration ist jedoch nicht positiv korreliert mit der Ovulationsrate oder der Embryonenqualität (Greve et al., 1983). Ein niedriger Progesteronspiegel ( $< 1$  ng/ml) muss nicht zwangsläufig zu einem schlechten Superovulationsresultat führen (Lindsell et al., 1986; Bo et al., 1995). Greve et al. (1984) konnten jedoch eine signifikante Beziehung zwischen dem Auftreten von irregulären Progesteronkonzentrationen, und der Qualität der gewonnenen Embryonen beobachten. Wurde bei den Spendertieren eine Progesteronkonzentration von über 1 ng/ml zum Zeitpunkt der Brunst oder ein niedriger Spiegel ( $< 1$  ng/ml) über mehrere Tage nach dem einer Superovulation anschließendem Östrus beobachtet, konnte bei diesen Tieren auch eine abnormale Embryonenentwicklung festgestellt werden. Prämatüre Ovulationen oder Lutealzysten führten zu diesen Irregularitäten in den Plasmaprogesteorgekonzentrationen (Greve et al., 1984). Abweichungen im Plasmaprogesteorgeverlauf werden bei eCG-behandelten Tieren öfter beobachtet, als bei FSH-behandelten, was den niedrigeren Anteil transfertauglicher Embryonen bei den mit eCG superovulierten Donoren z. T. erklären könnte (Greve et al., 1984). Um die Resultate einer Superovulationsbehandlung sicherer vorhersagen zu können, sollte daher die follikuläre Entwicklung zum Zeitpunkt der Einleitung der Gonadotropin-Verabreichung genau überwacht werden (Armstrong, 1993).

Andere Studien konnten keine Beziehung zwischen der Progesteronkonzentration zum Zeitpunkt der Einleitung der Stimulationsbehandlung und Qualität und Quantität der gewonnenen Embryonen feststellen (Saumande et al., 1977; Walton und Stubbings, 1986).

Der PGF-Injektion folgt ein abrupter Abfall der Progesteronkonzentration unter 3 mmol/l (Jensen et al., 1982). Die Progesteronkonzentration ist bei Tieren, welche eine optimale Embryonenqualität produzieren, zu Beginn der Brunst signifikant geringer als bei Donoren, die nur unbefruchtete Eizellen liefern; sie ist aber auch signifikant höher als bei nichtstimulierten Tieren (Jensen et al., 1982). Schilling (1982) und Elsaesser et al. (1981) konnten eine signifikante Korrelation zwischen dem Progesteronwert am Tag der Einleitung der Superovulation und der Variabilität einer Superovulationsreaktion feststellen.

#### **2.4.7. Einfluss von Parität und Alter**

Einer der wichtigsten Faktoren, welche die Superovulationsergebnisse beeinflussen, ist die Parität des Spendertieres. Jungrinder produzieren im Allgemeinen weniger transfertaugliche Embryonen als Kühe (Hasler et al., 1981; Prado Delgado et al., 1984; Janowitz, 1991; Busse, 1995; Hahn, 1995; Lautner, 1997; Manciaux et al., 1999; Schwab, 2000). Von Kühen können in allen Qualitätsstufen mehr Embryonen bzw. Eizellen gewonnen werden als von nulliparen Tieren (17,8 vs. 8,3); der Anteil unbefruchteter Eizellen (4,2 bzw. 1,4), Morulae (9,3 bzw. 4,1) und der durchschnittliche Anteil transfertauglicher Embryonen (12,0 bzw. 6,0) ist bei Kühen signifikant höher als bei Jungrindern (Schwab, 2000).

Jungrinder reagieren auch oft trotz verringerter Dosis sehr sensibel auf die Gonadotropine. Bei solch einer Überreaktion können dann manchmal überhaupt keine Embryonen/ Eizellen in der Spülflüssigkeit gefunden werden (Janowitz, 1991). Die Variabilität in den Resultaten bei der Superovulation von Jungrinder ist größer als bei Kühen (Janowitz, 1991).

Während in einigen Untersuchungen kein Einfluss der Parität auf die Embryonenqualitäten festgestellt werden konnte (Hasler et al., 1983; Walton und Stubbings, 1986; und Garcia-Winder, 1988), wurde in anderen Untersuchungen beobachtet, dass Kalbinnen bessere Resultate lieferten als Kühe (Lineares, 1981; Schilling, 1982; Lopes da Costa et al., 2001; Chagas et al., 2002).

Lineares (1981) stellte eine signifikant bessere Qualität der von Kalbinnen gewonnenen Blastozysten fest. Lopes da Costa et al. (2001) beobachteten, dass Kühe nach Superovulation zwar mehr Embryonen bzw. Eizellen produzieren, die Anzahl transfertaugliche Embryonen aber signifikant geringer ist, als von den mit dem gleichen Regime behandelten Jungrindern. Die Beobachtung, dass nullipare Rinder zwar weniger Embryonen liefern als Tiere, die wenigstens einmal gekalbt haben, im Vergleich jedoch mehr transfertaugliche Embryonen produzieren, konnte von Callesen et al. (1996) bestätigt werden.

Der Erfolg einer Stimulationsbehandlung wird bei Tieren, die schon einmal gekalbt haben auch vom Alter der Spendertiere beeinflusst (Hausmann, 1983). Es besteht ein Zusammenhang zwischen Spendertieralter und Superovulationsreaktion einerseits, und der Qualität der gewonnenen Embryonen andererseits (Lerner et al., 1986). Zwar lassen sich bereits ein- bis zweijährige Tiere erfolgreich im Embryotransfer als Donoren einsetzen, der Großteil der Tiere befindet sich jedoch in der Altersklasse von drei bis vier Jahren (Glatzel et al., 1999). Die erfolgreichste Tiergruppe ist die im Alter zwischen fünf und sechs Jahren (Glatzel et al., 1999). Lerner et al. (1986) ermittelten ein optimales Alter von 5,6 Jahren. Sehr alte Tiere reagieren meistens schlechter auf Superovulationsbehandlungen (Hasler et al., 1981; Schilling et al. 1982; Donaldson, 1984b; Glatzel et al., 1999). In einer Untersuchung von Donaldson (1984b) konnte zwar kein Effekt des Alters bei bis neunjährigen Kühen auf die insgesamt gewonnenen Embryonen festgestellt werden, der Anteil transfertauglicher Embryonen nahm aber nach dem neunten Lebensjahr signifikant ab. Dieses Phänomen kann darauf zurückgeführt werden, dass die Anzahl der kleinen Follikel, die auf eine Gonadotropinbehandlung ansprechen können, mit zunehmenden Alter abnimmt (Lerner et al., 1986). Der durchschnittliche Anteil transfertauglicher Embryonen ist bei Jungrindern und Kühen der ersten und zweiten Laktation höher als bei Tieren in der dritten oder späteren Laktation (Ponsart et al., 2000). Kühe, die schon öfter als 5 mal gekalbt haben, produzieren einen signifikant höheren Anteil unbefruchteter Eizellen (Manciaux et al., 2000).

In anderen Studien wurde kein Einfluss des Alters auf die Embryonenqualitäten beobachtet (Hasler et al., 1983; Garcia-Winder, 1988). Hasler et al. (1983) konnten nur geringe Unterschiede in der Embryonenausbeute bei zwei- bis vierzehnjährigen Kühen feststellen, jedoch aber einen signifikant negativen Einfluss des Alters auf die insgesamt gewonnenen Embryonen bei „infertilen“ Rindern. Walton und Stubbings (1986) stellten keinen signifikanten Einfluss des Alters auf die Anzahl transfertauglicher Embryonen fest, jedoch



war die Anzahl der Gesamtembryonen und die Ovulationsrate bei älteren Tieren reduziert. Lediglich eine einzige Studie konnte einen positiven Einfluss des Alters auf die Embryonenausbeute nachweisen (Newcomb, 1980). Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten durch unterschiedliche Selektionskriterien in den verschiedenen Studien hervorgerufen worden sein.

#### **2.4.8. Rasse und genetische Ursachen**

Zwischen den einzelnen Rinderrassen bestehen z.T. erhebliche Unterschiede in der Reaktion auf eine Superovulationsbehandlung (Saumande et al., 1978; Donaldson, 1984a; Chupin et al. 1987; Herrler et al., 1991; Estrada et al., 1998) (s.a. Abb. 5). Bindon et al. (1986) führen dies z.T. auf die genetische Veranlagung zurück. Rassen mit einer genetischen Tendenz hin zu hohen Ovulationsraten produzieren mehr Embryonen nach einer Gonadotropinbehandlung (Bindon et al., 1986; Snyder, 1986). Einige Rassen benötigen zudem einen höheren LH-Anteil in den Gonadotropinpräparaten, um optimale Ergebnisse zu erzielen (s.a. 2.7.3.) (Chupin et al. 1987; Herrler et al., 1991).

Im Allgemeinen werden die Fleischrassen als besser geeignet angesehen im Vergleich mit milchbetonten Rassen (Niemann, 1986). Statistisch gesehen können bei den milchbetonten Rinderrassen etwa 2,5 bis 3,0 Kälber pro erfolgreicher Spülung erzeugt werden, bei den fleischbetonten Rinderrassen mit einer besseren Ovarreaktion auf die Superovulationsbehandlung noch ca. 1 bis 2 Kälber mehr (Niemann, 1986).

Die Resultate sind bei den Rassen Fleckvieh und Red Holstein besser als mit Brown Swiss oder Holstein Frisian (Pokorny et al., 1996). Fleckvieh-Rinder haben mit 16,8 Embryonen bzw. Eizellen das beste Spülergebnis, verglichen mit den Rassen Deutsches Gelbvieh und Deutsch Schwarzbunte. Jahresberichte der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter (ADR) bestätigen die besondere Eignung der Rasse Fleckvieh für den Embryotransfer.

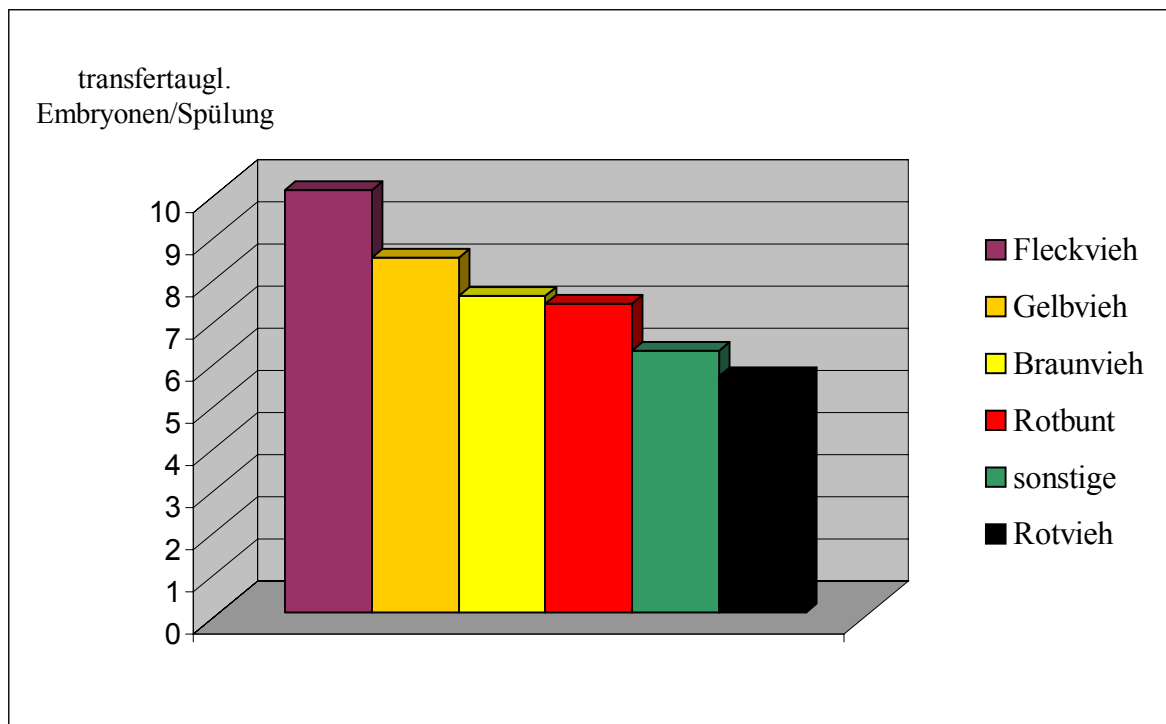


Abb. 5: Einfluss der Rasse auf das Spülresultat (ADR-Jahresbericht 2001)

Europäische Rinderrassen zeigten sich geeigneter für den Embryotransfer als amerikanische Rassen (Brahman-Rinder) (Massey and Oden, 1984). Donaldson (1984a) konnte von den Rassen Simmental und Brangus die größte Anzahl transfertauglicher Embryonen (6,6) gewinnen, der höchste Anteil transfertauglicher Embryonen (68 %) war bei Angus-Rindern zu beobachten. Die insgesamt Anzahl gewonnener Embryonen war bei der Rasse Brangus am höchsten (16,2).

#### 2.4.9. Milchleistung

Der Erfolg einer Superovulationsbehandlung wird u.a. auch durch die Milchleistung der Spendertiere beeinflusst (Schilling, 1982; Glatzel et al., 1999), wobei der Verlauf der Laktationskurve einen größeren Einfluss besitzt als die absolute Milchmenge (Saumande et al., 1978). Dieses Phänomen lässt sich durch die während der frühen Laktation bestehende Diskrepanz zwischen Energiebedarf für die Milchproduktion und Energieaufnahme erklären (Kafi et al., 1997). Der negative Energiemetabolismus bei Hochleistungstieren kann ovarielle Inaktivität zur Folge haben (Kafi et al., 1997). Bei laktierenden Kühe im negativen

Energiestoffwechsel lassen sich weniger große Follikel (>10 mm im Durchmesser) beobachten (Lucy et al., 1992).

Einige Studien konnten den negativen Einfluss von Spitzenleistungen auf Quantität und Qualität der gewonnenen Embryonen nachweisen (Hasler et al., 1983; Mengel, 1988; Camp, 1989; Busse, 1995; Glatzel et al., 1999; Manciaux et al., 2000). Glatzel et al. (1999) stellten einen signifikant negativen Effekt von Milchleistungen von mehr als 40 kg Tagesmilchleistung auf das Spülergebnis fest. Hohe Milchleistungen bei den Spendertieren üben einen signifikant negativen Einfluss auf die Gesamtzahl, die Anzahl transfertauglicher, die Anzahl von Klasse 1- Embryonen und unbefruchteter Eizellen bei Montbeliarde-Kühen aus (Manciaux et al., 2000). Hasler et al. (1983) konnten dagegen lediglich bei geschlechtsgesunden Rindern einen negativen Einfluss der Milchleistung auf die insgesamt gewonnenen Embryonen feststellen. Die signifikant besten Resultate erzielten in dieser Studie Rinder mit einer täglichen Milchproduktion von bis maximal 10 Liter. Schilling et al. (1980) beobachteten eine tendenziell höhere Degenerationsrate bei laktierenden, im Vergleich zu nichtlaktierenden Rindern (36,8 % vs. 33,2 %). Newcomb (1980) konnte keinen Einfluss des Laktationsstadiums auf die Ovulationsrate, die Gesamtanzahl, sowie auf die Embryonenqualität beobachten.

#### **2.4.10. Stress**

Ein zusätzlicher Faktor, welcher die Reaktion auf eine Superovulationsbehandlung beeinflussen kann, ist die Stressexposition der Spendertiere (Edwards et al., 1987). Stress resultiert in einer schnellen Freisetzung von ACTH aus der Adenohypophyse, welches in der Nebenniere eine erhöhte Sekretion von Kortikosteroiden (Stoebel und Moberg, 1982b; Gwazdauskas, 1972), Progesteron (Wagner et al., 1972) und Östrogenen (Lunaas, 1970) bewirkt. Stress unterdrückt die basale Plasmakonzentration von LH und GnRH (Dobson und Smith, 2000) und den präovulatorischen Anstieg von LH (Stoebel und Moberg, 1982a) und führt zu einer reduzierten Östradiolproduktion durch langsamer wachsende Follikel (Dobson und Smith, 2000). Stress-induzierte Ausschüttung von endogenem Cortisol kann damit auch die Ovulation unterdrücken (Matteri et al., 1982), bzw. die Ovulationsrate vermindern (Edwards et al., 1987) und/oder die Empfindlichkeit auf exogene Gonadotropine, und damit die Reaktion auf eine Superovulationsbehandlung, vermindern (Edwards et al., 1987; Tribulo

et al., 1993). Die Stressexposition von Rindern kurz vor dem LH-Anstieg resultiert in einer maximalen Unterdrückung der Gonadotropinsekretion (Dobson und Smith, 2000).

Die durch die Superovulationsbehandlung ausgelösten Stressreaktionen können auch eine verminderte Embryonenqualität und -lebensfähigkeit verursachen (Greve et al., 1995). Tribulo et al. (1993) konnte bei *Bos indicus*- Rindern einen negativen Einfluss des Handlings auf die Superovulationsergebnisse verzeichnen. Eine einmalige Injektion von FSH kann den Stress für die Spendertiere reduzieren und damit das Resultat der Superovulationsbehandlung verbessern (Yamamoto et al., 1992). Rangordnungskämpfe wirken sich ebenfalls negativ auf Quantität und Qualität der gewonnenen Embryonen aus (Glatzel et al., 1999). Eine untergeordnete Stellung der Spendertiere in der Rangordnung der Herde beeinflusst das Resultat einer Superovulationsbehandlung negativ (Glatzel et al., 1999).

Edwards et al. (1987) untersuchten die Auswirkungen von Transportstress während einer Gonadotropinbehandlung auf die Embryonenausbeute. Die Spendertiere wurden während der viertägigen Behandlungszeit mit FSH-P® alle 12 Stunden verladen und transportiert. Der Plasmakortisonspiegel war bei diesen Tieren signifikant höher und die Ovulationsrate signifikant niedriger als bei den nicht-transportierten Donoren. Auch die durch sommerliche Hitze ausgelösten Stressreaktionen können das Ergebnis einer Superovulationsbehandlung beeinträchtigen (Putney et al., 1989). Zwar wird kein Effekt auf die ovariellen Reaktionen festgestellt, der Anteil retardierter Embryonen, sowie der Anteil der Embryonen der Qualitätsklassen „mäßig“ und „schlecht“ nimmt jedoch zu (Putney et al., 1989).

#### **2.4.11. Nutzungsintensität des Spendertieres im Embryotransfer**

Auch die Intensität, mit welcher Rinder als Spendertiere im Rahmen des Embryotransfers genutzt werden, wirkt sich auf die Qualität der gewonnenen Embryonen aus. Die aus praktischen Erfahrungen resultierende Ansicht einiger Embryotransferpraktiker, dass sich die wiederholte Nutzung der Tiere negativ auf das Spülergebnis auswirke, wurde von verschiedenen Autoren bestätigt. Ein bekannter Langzeiteffekt exogener Gonadotropingaben stellt die reduzierte Ansprechbarkeit der Ovarien auf die Behandlungen dar. Diese herabgesetzte ovarielle Reaktionsbereitschaft lässt sich auch nicht durch eine Erhöhung der Gonadotropindosierung kompensieren (Donaldson und Perry, 1983; Moor et al., 1984).

Die Anzahl der gewonnenen Embryonen ist mit der Anzahl der Nutzungen eines Spendertieres korreliert; je öfter ein Rind superovuliert wird, desto weniger Embryonen wird es liefern (Donaldson und Perry, 1983). Die Embryonenproduktion nimmt von der ersten bis zur zehnten Nutzung ab; Kühe, die öfter als dreimal superovuliert wurden, lieferten die besten Ergebnisse immer bei dem ersten Mal (Donaldson und Perry, 1983). In einer Studie von Hahn (1992) war die Wiederholbarkeit der Ergebnisse von öfter genutzten Donoren nicht gegeben. Bei Kühen, die öfter als vier (Ponsart et al., 2001) bzw. fünf (Hasler et al., 1983) mal als Donoren genutzt wurden, war der Anteil unbefruchteter Eizellen signifikant erhöht. Spendertiere können allerdings problemlos mehrmals superovuliert werden, wenn ein Mindestabstand von 60 (Sacher et al., 1987) bzw. 50 Tagen (Hahn, 1988) zwischen zwei aufeinanderfolgenden Superovulationsinduktionen eingehalten wird.

Andere Autoren konnten nach wiederholter Superovulation eines Spendertieres keine signifikanten Unterschiede in der Embryonenausbeute und/oder eine Qualitätsminderung der gewonnenen Embryonen feststellen (Nelson et al., 1979; Lubbaddeh et al., 1980; Hasler et al., 1983; Dorn et al., 1991). In einer Studie von Christie et al. (1980) wurden Rinder ohne signifikante Unterschiede in der Qualität und der Quantität der gewonnenen Embryonen erfolgreich 5 bis 10 mal mit eCG superovuliert. Nach Hahn (1988) kommt es zu keiner Abschwächung der Gonadotropinwirkung, jedoch konnte ein deutlicher Abfall der Milchproduktion der Tiere verzeichnet werden.

Wenn sich auch die Aussagesicherheit für die Eignung als Spendertier von Behandlung zu Behandlung erhöht und nach der vierten Superovulation einen Wert von 50 % erreicht, so wird es im Einzelfall schwierig sein, aufgrund der Ergebnisse der ersten Stimulierung Vorhersagen für die Eignung eines Spendertieres zu machen (Hahn et al., 1987).

#### **2.4.12. Individuelle Veranlagung der Spendertiere**

Bei der Beurteilung des Einflusses verschiedener Faktoren auf das Resultat einer Stimulationsbehandlung wird immer wieder darauf hingewiesen, dass wegen der individuellen Schwankungen in der Quantität und Qualität der gewonnenen Embryonen die Planung eines Embryotransfer-Programms erschwert wird (Glatzel et al., 1999). Dies hat letztendlich auch negative Folgen für die Akzeptanz und die Wirtschaftlichkeit von ET-Programmen. Schilling (1982) führt die variablen Resultate nach Superovulation nicht auf genetische Ursachen zurück. Auch zwischen Nachkommensgruppen fand man sehr variable Ovarreaktionen (Saumande et al., 1977). Vom Ergebnis der ersten Superovulation eines Tieres kann man nicht auf spätere Reaktionen schließen (Schilling, 1982). Allerdings konnten Menard und Martinez (1997) eine signifikante Korrelation zwischen den Resultaten aus Superovulationsbehandlungen eines Jungrindes und den Resultaten desselben Tieres nach der ersten Kalbung feststellen. Andere Autoren konnten einen signifikanten Einfluss der genetischen Abstammung eines Spendertieres auf die Reaktion einer Superovulationsbehandlung nachweisen (Manciaux et al., 2000). Die Auswahl des Spendertiervaters hatte einen signifikanten Effekt auf die Gesamtzahl, die Anzahl transfertauglicher, die Anzahl von Klasse 1- Embryonen und unbefruchteter Eizellen bei superovulierten Montbeliarde-Kühen (Manciaux et al., 2000). Alle Variablen gespülter Rinder wurden von der genetischen Abstammung dieser Spendertiere (Vater und Großvater) beeinflusst, mit Ausnahme des Anteils an degenerierten Embryonen (Ponsart et al., 2001).

#### **2.5. Brunstsynchronisation**

Die künstliche Auslösung eines Östrus zur Nutzung des nachfolgenden Zyklus für eine Superovulation ist möglich (Glatzel et al., 1999). Wird die Brunst durch den Einsatz von Gestagenen, z.B. orale Gestagene oder vaginale Applikationsformen, ausgelöst, muss mit einem schlechteren Stimulationserfolg gerechnet werden, wobei insbesondere die Qualität der erzeugten Embryonen leidet (Maurer et al., 1987). Als Grund hierfür wird ein Nachhalleffekt des synthetischen Gestagens vermutet (Niemann et al., 1981a).

Die Qualität von Embryonen von Rindern, bei denen vor der Superovulationsbehandlung keine Brunstsynchronisation durchgeführt wurde, ist signifikant besser (Glatzel et al., 1999).

Die Behandlungsmethode zur Brunstsynchronisation vor Einleitung einer Superovulations-Behandlung hat keinen signifikanten Effekt auf das Spülresultat (Olivera-Angel et al., 1984). Glatzel und Hagerodt (1988) konnten nach Luteolyse mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  keinen negativen Einfluss auf das nachfolgende Superovulationsergebnis feststellen, jedoch nach einer Zyklus-Synchronisationsbehandlung durch eine doppelte  $\text{PGF}_{2\alpha}$  –Verabreichung im Abstand von 9 bis 11 Tagen.

## **2.6. Priming**

Antrale Follikel lassen sich durch eine Applikation von Gonadotropinen vor der eigentlichen Superovulation in ihrer Entwicklung stimulieren (Moor et al., 1984). Die Vorbehandlung der Spendertiere durch eine zusätzliche Gabe von FSH („Priming“, einmalige intramuskuläre Injektion von 10 bis 25 mg FSH am zweiten, dritten oder vierten Zyklustag vor der Superovulationsbehandlung) kann zu einer signifikanten Verbesserung der Embryonenausbeute führen (Rajamahendran et al., 1987; Ware et al., 1987; Petr et al., 1990). Rajamahendran et al. (1987) konnten durch diese Vorbehandlung die Ovulationsrate und die Gesamtzahl der Embryonen signifikant erhöhen, der Anteil der „sehr guten“ und „guten“ Embryonen war lediglich tendenziell erhöht. Petr et al. (1990) beobachteten zwar eine signifikante Zunahme der Ovulationsrate bei den vorbehandelten Tieren, der Anteil befruchteter Eizellen war bei den nicht vorbehandelten Donoren jedoch signifikant erhöht; der Anteil „guter“ Embryonen unterschied sich nicht signifikant (ohne Priming 79,3 % vs. 70,2 % bei den vorbehandelten Spendertieren). Rieger et al. (1988) vermuten, dass die FSH-Behandlung im frühen Zyklus lediglich bei Tieren, die sonst eine eher schlechte Reaktion auf die Superovulationsbehandlung zeigen, von Vorteil sein kann. Saumande (1987) weist darauf hin, dass sich durch diese Vorbehandlung die Zahl der auf Gonadotropine ansprechbaren Follikel erhöhen müsste, jedoch sei die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht gesichert.

Rieger et al. (1988) konnten keinen Einfluss des Primings auf das Resultat einer Superovulationsbehandlung beobachten. Andere Autoren wiesen einen negativen Einfluss dieser Behandlung auf die Ovarreaktion (Lussier und Carruthers, 1989) bzw. Ausbeute an transfertauglichen Embryonen (Glatzel et al., 1999) nach. Lussier und Carruthers (1989) vermuten, dass durch das Priming die endogene FSH-Sekretion gehemmt wird.

## **2.7. Superovulation**

Unter Superovulation versteht man die Auslösung multipler Ovulationen durch die Gabe von exogenen Hormonen in der frühen Follikel- oder in der Lutealphase zur Gewinnung einer größeren Anzahl befruchteter Eizellen (Niemann, 1986). Die Superovulation bildet die Voraussetzung für die gleichzeitige Gewinnung einer größeren Anzahl von Embryonen und damit für die Durchführung eines züchterisch interessanten und kommerziell vertretbaren Embryotransfers beim Rind (Hahn, 1988). Die Superovulation wird beim Rind durch die gonadotropen Hormone FSH, eCG oder hMG ausgelöst (Hahn, 1988). Am häufigsten werden Behandlungen mit eCG durchgeführt, die Verwendung von hMG beschränkt sich bisher auf Einzelfälle, da die Substanz sehr teuer ist (Niemann, 1986). Trotz intensiver Forschungsarbeit ist die variable und unvorhersagbare Superovulations-Reaktion nach wie vor der limitierende Schritt bei der Durchführung des Embryotransfers beim Rind (Saumande und Chupin, 1977; Hahn, 1992; Armstrong, 1993). Ursachen dafür sind die große Variabilität der Ovarreaktionen und die nachfolgende hohe Degenerationsrate bei den Embryonen (Niemann, 1986). Nur etwa 60 % bis 70 % der gewonnenen Rinderembryonen können als entwicklungsfähig angesehen werden (Niemann, 1986).

Die Embryonen superovulierter Rinder weisen öfter morphologische Abnormitäten auf als Embryonen unbehandelter Rinder (Boland et al., 1978). Dies lässt sich hauptsächlich auf die Abweichungen im Hormonprofil, in der Follikelentwicklung und der Reifung und Ovulation der Eizellen, sowie in der ovariellen und uterinen Umgebung der Eizellen, Spermien und Embryonen zurückführen (Schilling et al. 1982, Foote und Ellington, 1988; Kafi und McGowan, 1997). Nach Kauffold und Thamm (1985) können hormonelle Fehlsteuerungen für das Entstehen von chromosomalen Anomalien während der Kernreifung, sowie für unreife oder überalterte Gameten zum Zeitpunkt der Befruchtung verantwortlich sein; zudem treten infolge Superovulationsbehandlungen Veränderungen der Eileiter- und Uterussekrete und ein beschleunigter Transport der Eizellen bzw. jungen Embryonen im Eileiter und damit ein vorzeitiger Eintritt in den Uterus auf. Nach Schrifttumsangaben sind zwischen 13-30 % der Embryonen superovulierter Kühe unbefruchtet (Greve et al., 1978) und durchschnittlich 25-30% degeneriert und/oder in der Entwicklung zurückgeblieben (Schilling et al., 1980).



### **2.7.1. Einfluss des Zeitpunktes der Einleitung der Superovulationsbehandlung**

Der Zyklusstand zum Zeitpunkt der Einleitung einer Stimulation mit Gonadotropinen ist einer der wichtigsten Faktoren, welcher das Resultat einer Superovulationsbehandlung beeinflusst (Armstrong, 1993), was zahlreiche Studien in den letzten Jahren belegt haben (Greve, 1976; Saumande et al., 1977; Schilling, 1982; Greve et al. 1983; Hasler et al., 1983; Lindsell et al., 1986; Kweon et al., 1986; Lerner et al., 1986; Grasso et al., 1989a; Goulding et al., 1990; Boland et al., 1991; Guilbault et al., 1991; Romero et al., 1991; 1992, Calder und Rajamahendran, 1992b; Nasser et al., 1993; Bungartz und Niemann, 1993; Adams, 1994b; Bo et al., 1995; Pokorny et al., 1996; Stock et al., 1996; Armstrong, 1993; Kafi und McGowan, 1997; D'Occhio et al., 1999).

Es hat sich gezeigt, dass die besten Ovarreaktionen erzielt werden, wenn die Spenderkühe in der mittleren Diöstrusphase mit Gonadotropinen behandelt werden und nachfolgend ein Luteolytikum eingesetzt wird (Schilling, 1982). Die folliculäre Entwicklung zum Zeitpunkt der Einleitung der Gonadotropinverabreichung sollte genau überwacht werden, um die Resultate einer Superovulationsbehandlung sicherer vorhersagen zu können (Armstrong, 1993). Einerseits sollte sich zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginnes mit Gonadotropinen ein Gelbkörper auf den Ovarien der potentiellen Spendertiere befinden (Greve et al. 1983, Kafi und McGowan, 1997), weil die Existenz eines funktionellen Corpus luteum eine synchrone Entwicklung der Follikel ermöglicht (Greve et al., 1983), und andererseits sollte kein dominanter Follikel zum Zeitpunkt der Einleitung einer Superovulationsbehandlung auf den Ovarien existieren bzw. sollte die physiologische Selektion des dominanten Follikels noch nicht abgeschlossen sein (Pierson und Ginther, 1988; Adams et al., 1993b). Die Anwesenheit eines dominanten Follikels verschlechtert das Resultat einer Superovulationsbehandlung (Grasso et al., 1989a; Guilbault et al., 1991; Huhtinen et al., 1992, Bungartz und Niemann, 1993; Adams, 1994b; Stock et al., 1996). Deshalb wird empfohlen, die Gonadotropinbehandlung dann einzuleiten, wenn kein dominanter Follikel vorhanden ist (Goulding et al., 1990; Fricke et al., 1994; Stock et al., 1996) (s.a. 2.4.4.).

Die Ovulationsrate und die Embryonenausbeute sind signifikant höher, wenn die Stimulierung unmittelbar zu Beginn einer neuen Follikelwelle (Zyklustag 2 oder 10) eingeleitet wird (Adams, 1994b; D'Occhio et al., 1999).

Die Stimulationsbehandlung kann sowohl während der ersten als auch der zweiten Follikelwelle eines Zyklus begonnen werden (Adams et al., 1994b). Es hat sich jedoch gezeigt, dass bessere Ovarreaktionen erzielt werden, wenn die Spenderkühe in der mittleren Diöstrusphase mit Gonadotropinen behandelt werden, als zu Beginn des Zyklus (Schilling, 1982; Lindsell et al., 1986; Goulding et al., 1990; Boland et al., 1991; Calder und Rajamahendran, 1992b; Kafi und McGowan, 1997). Lerner et al. (1986) konnten nach Einleitung der Superovulationsbehandlung an den Tagen 10 oder 11 die größte Anzahl an Embryonen gewinnen. Vor dem 8. und nach dem 13. Zyklustag werden schlechtere Ergebnisse erzielt (Greve, 1976; Saumande et al., 1977). Nur in einem Fall wurden bei Behandlungsbeginn am Tag 12 signifikant schlechtere Ovulationsraten als an den anderen Tagen beobachtet (Sreenan und Beehan, 1976).

Die Stimulationsbehandlung kann sowohl während der ersten als auch der zweiten Follikelwelle eines Zyklus begonnen werden (Adams et al., 1994b). Die Resultate sind nach Einleitung gegen Mitte (Zyklustag 9 oder 10) jedoch besser als zu Beginn des Zyklus (Lindsell et al., 1986; Goulding et al., 1990; Boland et al., 1991; Calder und Rajamahendran, 1992b; Kafi und McGowan, 1997). Nach Einleitung der Stimulation am Tag 2 werden signifikant weniger und schlechtere Embryonen produziert als nach Start der Superovulation am Zyklustag 10 (Boland et al., 1991). Romero et al. (1991) konnten ein signifikant besseres Resultat nach einem Stimulationsbeginn an Tag 10 gegenüber Tag 13 beobachten. Diese Unterschiede können mit der Dynamik der follikulären Entwicklung beim Rind zusammenhängen.

Andere Autoren hingegen konnten keinen signifikanten Einfluss des Zeitpunktes des Behandlungsbeginnes innerhalb der zweiten Zykluswoche auf die Embryonenausbeute, auf Befruchtungsrate, sowie auf die Embryonenqualität feststellen (Hasler et al., 1983; Donaldson, 1984d; Hill et al., 1984; Kweon et al., 1986; Lindsell et al., 1986; Hasler et al., 1987; Gonzalez et al., 1990; Wilson et al., 1990; Pokorny et al., 1996).

### 2.7.2. Einfluss des Gonadotropins auf die Embryonenqualität

Einer der wichtigsten Faktoren, welche das Ergebnis einer Superovulationsbehandlung beeinflussen, ist das verwendete Gonadotropin (Goulding et al., 1991) (s.a. Abb.6 und 7). Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass das Ergebnis einer Stimulation, also z.B. die Befruchtungsrate, die Gesamtausbeute an Embryonen, oder der Anteil der transfertauglichen Embryonen von der LH-Aktivität des verwendeten Gonadotropins abhängig ist (Humphrey et al., 1979; Murphy et al., 1984; Chupin. et al., 1987; Donaldson und Ward, 1986; Donaldson et al., 1986; Boland et al., 1991; Herrler et al., 1991) (s.a. Abb. 6). Dabei scheint eine gewisse LH-Aktivität für die Follikelreifung (Price et al., 1999) bzw. zur Induktion einer Superovulation (Herrler et al., 1988) notwendig zu sein. Ist der LH-Anteil in den Präparaten jedoch zu hoch, können prämatüre Ovulationen (Callesen et al., 1986) oder Luteinisierung der stimulierten Follikel (Foote and Ellington, 1988) die Folge sein (s.a. 2.7.3.1.). Lopes da Costa et al. (2001) vermuten, dass insbesondere Gonadotropine mit einem hohen LH-Anteil den Spermientransport im weiblichen Genitale hemmen und damit der Anteil unbefruchteter Eizellen steigt.

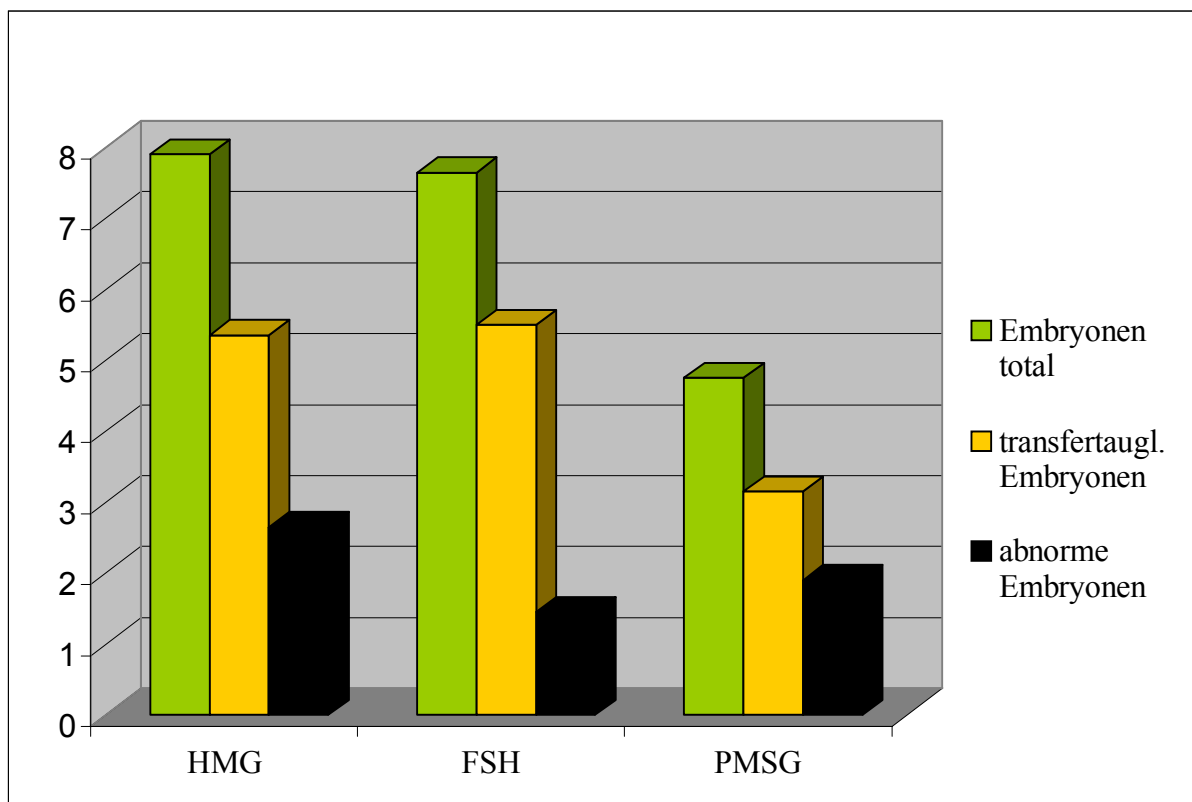


Abb. 6: Embryonenausbeute in Abhängigkeit vom Superovulationsverfahren (modifiziert nach Niemann et al., 1986)

FSH stimuliert das Wachstum der Granulosazellen in kleinen antralen Follikel (Monniaux et al., 1983) und verhindert die Atresie der großen Follikel (Moor et al., 1984). Weil der LH-Anstieg die Wiederaufnahme der Meiose der präovulatorischen Oozyte bewirkt, könnte ein zu hoher LH-Anteil in den Gonadotropinpräparaten die prämatüre Aktivierung der Oozyten während der Superovulation induzieren (Moor et al., 1984).

Die Ergebnisse nach einer Stimulation mit eCG fallen aufgrund der relativ hohen LH-Aktivität dieses Gonadotropins (Schams et al., 1978) in vielen Fällen schlechter aus als bei Verwendung von FSH (Elsden et al., 1978; Hahn 1978; Schams et al., 1978; Critser et al., 1980; Monniaux et al., 1983; Goulding et al., 1991; Glatzel et al., 1999; Lopes da Costa et al., 2001) (s.a. Abb. 6). Die Abweichungen in der Follikel- und Eizellenreifung sind bei den mit eCG behandelten Spendertieren ausgeprägter als bei den mit FSH behandelten Tieren (Greve et al., 1984; Foote und Ellington, 1988; Laurincik et al., 1993). Eine Superovulation mit eCG induziert oft ein weiteres Wachstum von Follikel, auch nach der Ovulation, und der daraus resultierende erhöhte Östrogenspiegel kann die frühe embryonale Entwicklung negativ beeinflussen (Boland et al., 1991). Solch große Follikel werden nach FSH- oder hMG-Applikation zu diesem Zeitpunkt nicht so oft gesehen (Lauria et al., 1982a). Callesen et al (1986) konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede in der Follikel- und Eizellenreifung bei eCG- oder FSH-behandelten Spendertieren beobachten. eCG verursacht aufgrund seiner langen Halbwertszeit eine hohe Anzahl unovulierter Follikel (Boland et al., 1991). Ebenso werden bei mit eCG behandelten Tieren vermehrt hormonelle Imbalancen, wie z.B. ein Anstieg der Östradiolkonzentration in der frühen lutealen Phase oder anhaltend hohe Progesteronspiegel zum Zeitpunkt der Brunst beobachtet (Springmann et al., 1986). Dies könnte den niedrigeren Anteil transfertauglicher Embryonen bei den mit eCG superovulierten Spendertieren z. T. erklären (Greve et al., 1984).

Nach einer Behandlung mit eCG und FSH lassen sich signifikante Unterschiede bezüglich Quantität und Qualität der gewonnenen Embryonen beobachten (Goulding et al., 1991). Die Gesamtzahl der gewonnenen Embryonen ( $8,1 \pm 0,60$  (FSH) bzw.  $12,3 \pm 0,81$  (eCG), der Anteil der Qualitätsklassen I und II ( $3,0 \pm 0,32$  (FSH) bzw.  $4,4 \pm 0,45$  (eCG), sowie der Anteil degenerierter Embryonen (Qualitätsklassen IV und V) ( $3,4 \pm 0,46$  (FSH) bzw.  $5,7 \pm 0,70$  (eCG), ist nach FSH-Superovulation signifikant höher als nach eCG-Stimulation (Goulding et al., 1991) (s.a. Abb. 7). Die Anzahl der unbefruchteten Eizellen unterscheiden sich nicht signifikant ( $1,0 \pm 0,25$  (FSH) bzw.  $2,1 \pm 0,50$  (eCG), wie auch die Anzahl der

transfertauglichen Embryonen ( $1,5 \pm 0,23$  (FSH) bzw.  $2,1 \pm 0,24$  (eCG) (Goulding et al., 1991). Lopes da Costa et al. (2001) und Critser et al. (1980) stellten jedoch eine signifikant höhere Anzahl transfertauglicher Embryonen nach FSH-Behandlung fest.

In einigen älteren Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Qualität und der Quantität der gewonnenen Embryonen nach Superovulation mit FSH oder eCG beobachtet werden (Seidel et al., 1978b; Schams et al., 1979; Schilling, 1982). Techakumphu et al. (2000) stellten nach FSH-Behandlung bei Kälbern zwar eine signifikant bessere Ovarreaktion ( $13,9 \pm 8,6$  Follikel) als nach eCG-Behandlung ( $5,9 \pm 3,3$  Follikel) fest, die Anzahl der aspirierten Oozyten war bei den mit eCG superovulierten Tieren jedoch signifikant höher ( $8,3 \pm 5,0$  vs.  $4,6 \pm 3,2$ ). In dieser Studie wurden keine signifikanten Unterschiede in der Maturation der punktierten Eizellen nach FSH- oder eCG-Stimulation beobachtet.

In einer Untersuchung von Dieleman et al. (1989) wurden nach der Verabreichung von eCG bessere Ergebnisse als nach FSH-Stimulation festgestellt. Dabei wurde allerdings die Wirkung von eCG durch Applikation von eCG-Antikörpern zum Zeitpunkt der Brunst unterbrochen. Nach Superovulation mit eCG/Anti-eCG wurden fast doppelt soviel transfertaugliche Embryonen gewonnen als nach FSH-Stimulation. Während sich die Zahl der „mäßigen“ und „schlechten“ Embryonen kaum unterschied, war die Anzahl der „sehr guten“ und „guten“ Embryonen bei den eCG-behandelten Tieren signifikant höher (9,1 vs. 4,6). Die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen eCG hat sich jedoch, möglicherweise auch wegen der zusätzlichen Kosten, nicht etablieren können.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Ovulationsrate (Lauria et al., 1982a), der Embryonenanzahl, sowie der –Qualität (Newcomb, 1980) beim Vergleich der Resultate nach einer Stimulationsbehandlung mit hMG oder eCG gefunden. Die Variabilität einer Superovulationsreaktion ist nach der Verwendung von hMG geringer als nach eCG-Applikation (Lauria et al., 1982a). Murphy et al. (1984) stellten beim Vergleich der Effizienz einer Stimulationsbehandlung mit hMG oder FSH eine signifikant bessere Ovulationsrate, Ausbeute der Gesamt-, sowie transfertauglichen Embryonen nach FSH-Behandlung fest, während andere Autoren (Critser et al., 1982; Alcivar et al., 1984; Hahn, 1988; MacGowan et al., 1985) keine signifikanten Unterschiede beobachten konnten.

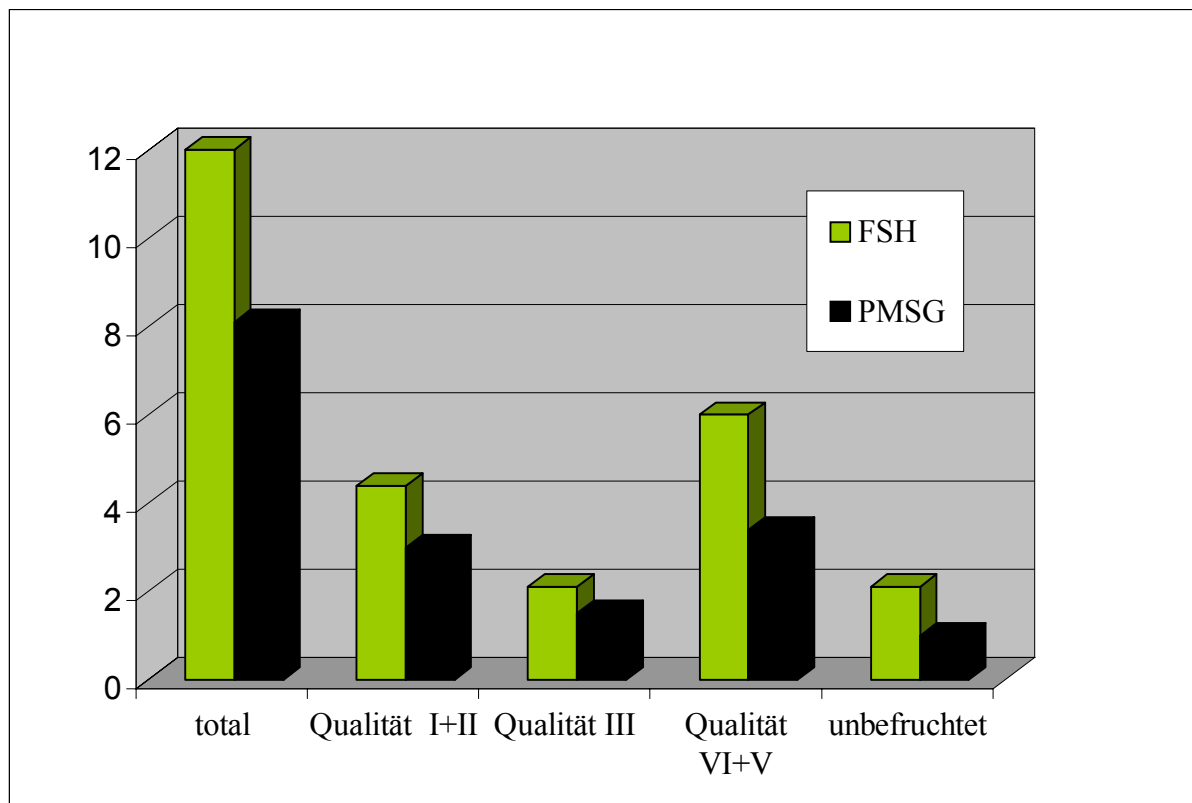


Abb. 7: Embryonenausbeute in Abhängigkeit vom Superovulationsverfahren  
(modifiziert nach Goulding et al., 1991)

### 2.7.3. Einfluss des Gonadotropin-Präparates auf die Embryonenqualität

#### 2.7.3.1. FSH

Bei den FSH-Präparaten handelt es sich um Hypophysenextrakte, die neben FSH auch noch unterschiedlich hohe Mengen an LH enthalten. Man verwendet hierzu Hypophysen von Schweinen (Folltropin®, FSH-P®) oder Schafen (Ovagen®, SUPER-OV®). Zwar wurden die Reinigungsverfahren im Verlauf der Jahre immer weiter verbessert, um Extrakte mit höherer biologischer FSH-Aktivität zu gewinnen, jedoch variiert der LH-Anteil auch heute immer noch beträchtlich.

Die verschiedenen FSH-Präparate, welche im Handel erhältlich sind, können unterschiedliche Reaktionen auf die Superovulationsbehandlungen bewirken (Humphrey et al., 1979; Murphy et al., 1984; Kelly et al., 1997; Donaldson et al., 1986; Boland et al., 1991; Lopes da Costa et al., 2001). Eine naheliegende Erklärung liegt in den verschieden hohen LH-Anteilen der

Präparate, die z. T. beträchtlich variieren können (Hahn, 1988; Herrler et al., 1988). Die LH-Kontamination eines Präparates hat einen signifikanten Einfluss auf das Resultat einer Superovulationsbehandlung (Donaldson et al., 1986; Boland et al., 1991), wobei beachtet werden muss, dass eine gewisse LH-Aktivität für die Follikelreifung (Price et al., 1999) bzw. zur Induktion einer Superovulation (Herrler et al., 1988) benötigt wird. Mit 0,423 I.E. LH/ mg I.E. FSH können optimale Ergebnisse erzielt werden (Herrler et al., 1991). Übersteigt der LH-Anteil in den Gonadotropinpräparaten dieses Optimum, können prämatüre Ovulationen (Callesen et al., 1986) oder Luteinisierung der stimulierten Follikel die Folge sein (Foote and Ellington, 1988). Eine hohe LH-Wirksamkeit eines Produktes bewirkt eine niedrige Fertilisationsrate (Donaldson und Ward 1986), was darauf zurückgeführt werden kann, dass Gonadotropine mit einem hohen LH-Anteil den Spermientransport im weiblichen Genitale hemmen und dadurch der Anteil unbefruchteter Eizellen steigt (Lopes da Costa et al., 2001). Der Erfolg einer Stimulation sinkt mit steigendem LH-Anteil in den Präparaten (Humphrey et al., 1979; Murphy et al., 1984; Donaldson et al., 1986; Chupin et al., 1989), wobei das LH/FSH-Verhältnis in bestimmten Präparaten (FSH-P®) auf bis zu 5:1 steigen kann (Monniaux et al., 1983).

Es wurden zahlreiche Untersuchungen über die Auswirkungen von LH-gereinigten FSH-Präparaten auf die Superovulationsresultate durchgeführt (Beckers et al., 1977; Cheng , 1976; Grimek et al., 1979; Donaldson und Ward 1986; Donaldson et al., 1986; Herrler et al., 1988; Herrler et al., 1991). Mit von LH gereinigten FSH-Produkten können die Fertilisationsraten und damit die Produktion von transfertauglichen Embryonen (Donaldson et al., 1986), sowie die Qualität der gewonnenen Embryonen gesteigert werden (Donaldson und Ward 1986). Herrler et al. (1988) erreichten mit FSH-Präparaten, die zu 40 % mit LH supplementiert waren die höchsten Befruchtungsraten, die meisten transfertauglichen Embryonen, sowie eine signifikant höhere Anzahl an insgesamt gewonnenen Embryonen verglichen mit den Ergebnissen, die mit kommerziell erhältlichem FSH-P® mit einem Anteil von 80 % LH, erzielt wurden. Zur Erzielung optimaler Ergebnisse sollte das FSH-Präparat 0,423 I.E. LH / 40 mg FSH enthalten (Herrler et al., 1991). Herrler et al. (1988) konnten einen Einfluss des FSH-Präparates auf die Quantität, nicht aber auf die Qualität der gewonnenen Embryonen nachweisen.

In mehreren Untersuchungen wurden auch Präparate verschiedener Hersteller eingesetzt, ohne dass der LH-Anteil in diesen Präparaten berücksichtigt worden wäre. In einer Untersuchung

von Lopes da Costa et al. (2001) reagierten signifikant mehr Tiere auf die Behandlung mit FSH-P® im Vergleich mit SUPER-OV® (80% vs. 30%), jedoch war die Gesamtzahl an gewonnenen Embryonen bei den mit SUPER-OV® superovulierten Spendertieren größer ( $5,3 \pm 0,9$  vs.  $2,3 \pm 0,5$ ). Die mit FSH-P® behandelten Tiere produzierten signifikant mehr Embryonen (8,5 vs. 10,0) und eine signifikant geringere Anzahl an unbefruchteten Eizellen (1,6 vs. 6,4) als die mit Folltropin-V® behandelten (Lopes da Costa et al., 2001). Donaldson (1986b) konnte keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der insgesamt gewonnenen Embryonen nach Stimulation mit SUPER-OV® oder FSH-P® feststellen, allerdings produzierten die mit FSH-P® superovulierten Tiere weniger transfertaugliche Embryonen. Mapletoft et al. (1988) konnten keine signifikanten Unterschiede in Qualität und Quantität der gewonnenen Embryonen nach Superovulation mit FSH-P® oder Folltropin® feststellen.

#### **2.7.3.2. eCG**

eCG wird aus dem Serum trächtiger Stuten gewonnen. Die Substanz wird zwischen dem 40. und 150. Trächtigkeitstag in den Endometrial Cups des Uterus gebildet und entfaltet sowohl FSH- als auch LH-ähnliche Wirkungen. Auch bei den im Handel angebotenen eCG-Präparaten konnten unterschiedliche LH-Aktivitäten festgestellt werden, welche sich auf das Resultat einer Stimulation auswirken könnten (Humphrey et al., 1979). Gordon (1975) konnte zwischen verschiedenen eCG-Chargen bei gleicher Dosierung allerdings keine größeren Reaktionsunterschiede feststellen.

Durch die Applikation von eCG-Antiserum (Neutra-PMSG®) kann versucht werden, die nachteiligen Auswirkungen der langen Halbwertszeit (Moyaert et al., 1985; Dieleman und Bevers, 1987; Hahn, 1988; Dieleman et al., 1989; Boland et al., 1991), sowie die Inzidenz ovarieller Überreaktionen (Callesen et al., 1989) zu reduzieren. Die einmalige Verabreichung von eCG-Antiserum soll die Reaktion auf die Superovulationsbehandlung (Dieleman und Bevers, 1987; Hahn, 1988; Boland et al., 1991) und die Embryonenqualität (Saumande et al., 1980; Dieleman et al., 1989) verbessern. Eine Behandlung mit Neutra-PMSG® beeinflusste die Follikelreifung und die Qualität der gewonnenen Embryonen signifikant positiv und resultierte in einer fast doppelt so hohen Ovulationsrate (Dieleman und Bevers, 1987) und Anzahl transfertauglicher Embryonen (Dieleman et al., 1989). Der Zeitpunkt der Injektion von Anti-eCG (12 oder 24 Stunden nach Einsetzen der ersten Brunstsymptome) beeinflusste



weder die Ovarreaktion, noch die Qualität und Quantität der gewonnenen Embryonen (Saumande et al., 1980).

Ein positiver Einfluss dieser Behandlung auf die Qualität und Quantität der gewonnenen Embryonen konnte aber nicht in allen Untersuchungen nachgewiesen werden (Wang et al., 1987; Greve et al., 1988; Alfuraiji et al., 1989; Callesen et al., 1989; Callesen et al., 1990; Boland et al., 1991; Zeitoun et al., 1991; Callesen et al., 1992).

### **2.7.3.3. hMG**

hMG wird aus dem Urin von Frauen in der Menopause gewonnen. Dieses hypophysäre Gonadotropin besitzt ebenfalls sowohl FSH- als auch LH-ähnliche Wirkungen. Die Verwendung von hMG zur Superovulation von Rindern beschränkt sich jedoch bisher auf Einzelfälle, da die Substanz sehr teuer ist (Niemann, 1986) und die vorliegenden Ergebnisse etwa denen von FSH entsprechen (Critser et al., 1982; Alcivar et al., 1984; Hahn, 1988; MacGowan et al., 1985) (s.a. Abb. 6).

## **2.7.4. Einfluss der Gonadotropindosierung auf die Embryonenqualität**

### **2.7.4.1. FSH**

FSH-P® wird in einer Dosierung zwischen 30 und 50 mg (Hahn, 1988) und Folltropin® zwischen 18 und 20 mg (Gonzalez et al., 1990) eingesetzt. Diese Dosis wird morgens und abends über vier Tage verteilt und in gleich großen Dosen (Elsden et al., 1978; Halley et al., 1979; Schneider et al., 1980; Wright und Wright, 1981) oder auch in abfallender Dosierung appliziert (Monniaux et al., 1983; Hahn, 1988).

Zumindest bis zu einem gewissen Grad existiert eine lineare Beziehung zwischen FSH-Dosis und der Anzahl der Ovulationen und die Überschreitung des Dosisoptimums kann zu sehr variablen Ovulationsraten führen (Kanitz et al., 1990) oder sogar negative Auswirkungen haben (Pawlyshyn et al., 1986). Übersteigt die Gesamtdosis 28 mg, sinkt die Gesamtzahl der gewonnenen Embryonen, sowie der Anteil und die Anzahl transfertauglicher Embryonen

(Donaldson, 1984c). Eine individuell zu hohe Gonadotropin-Dosis resultiert in einer Unterdrückung bzw. Verschiebung des präovulatorischen LH-Peaks (Saumande und Chupin, 1982), eine vermehrte Anzahl unbefruchteter Eizellen ist die Folge (Pawlyshyn et al., 1986). Nach Donaldson (1984c) ist weder die abfallende Dosierung, noch ein vier- oder fünftägiges Behandlungsprogramm für den Behandlungserfolg entscheidend, sondern vielmehr die verabreichte Gesamtdosis von FSH-P®.

Walton und Stubbings (1986) beobachteten keinen signifikanten Einfluss der Folltropin®-Dosis (40 vs. 48 mg) auf die Ovulationsrate, jedoch wurden von den mit 48 mg behandelten Tieren mehr lebensfähige Embryonen gewonnen. Andere Autoren konnten keine signifikanten Unterschiede nach Dosiserhöhung in der Qualität (Donaldson, 1984b; Mapletoft et al., 1988; Gonzalez et al., 1990) und Quantität (Donaldson, 1984b; Mapletoft et al., 1988; Estrada et al., 1998) der nach Superovulation mit FSH gewonnenen Embryonen feststellen.

Wird FSH-P® in abfallender Dosierung verabreicht, ist die Gesamtzahl der gewonnenen Embryonen zwar höher, die Zahl der transfertauglichen Embryonen ist jedoch gleich hoch wie nach einem FSH-P®-Behandlungsplan mit gleichbleibenden FSH-Applikationen (Donaldson (1984c). Monniaux et al. (1983) konnten die Ovulationsrate und die Anzahl der „guten“ Embryonen durch Applikation in absteigenden Dosierungen steigern.

#### **2.7.4.2. eCG**

eCG wird in einer einmaligen Dosierung von 2000 bis 3000 I.E. (Hahn, 1988). bzw. 500 I.E. pro 100 kg Körpergewicht (Greve, 1976) zur Superovulationsauslösung eingesetzt. Ähnlich wie bei FSH kann auch bei dem Gonadotropin eCG eine lineare Beziehung zwischen Dosis und der Anzahl der Ovulationen beobachtet werden. Die Dosiserhöhung über das Optimum hinaus führt zu sehr variablen Ovulationsraten (Kanitz et al., 1990) oder wirkt sich sogar negativ aus (Pawlyshyn et al., 1986). Mit steigender Dosierung wird die Embryonenausbeute schlechter (Sreenan und Behan, 1976; Saumande et al., 1977; Greve et al., 1978; Schilling et al., 1980; Zeitoun et al., 1993). Zwar nimmt die Ovulationsrate mit höherer Dosierung zu, aber auch die Variabilität steigt an und es werden mehr persistierende Follikel induziert (Saumande et al., 1977); zudem ist die Wiederfindungsrate geringer und die Embryonenqualität schlechter (Saumande et al., 1977). Sehr hohe Dosen wiederum verursachen eine Verschlechterung der Ovulationsrate (Saumande und Chupin, 1986).

Schilling et al. (1980) beobachteten eine etwas höhere Degenerationsrate nach Applikation von 3000 I.E. eCG gegenüber einer Dosierung von 2500 I.E. (39,0 % vs. 32,5 %). Auch Greve et al. (1978) und Sreenan und Behan (1976) erhielten bei Erhöhung der Hormondosis von 2500 auf 3000 I.E. eCG eine geringere Anzahl normaler Embryonen. Ein negativer Trend bezüglich der Embryonenqualität war sogar schon bei einer Dosiserhöhung von 1500 auf 2500 I.E. eCG nachzuweisen (Sreenan und Beehan, 1976).

#### **2.7.4.3. hMG**

Eine vergleichbare Dosis-Superoovulationsresultat-Beziehung kann auch bei der Verwendung von hMG beobachtet werden (MacGowan et al., 1985; Pawlyshyn et al., 1986). Mit Überschreiten eines Dosis-Optimums wird die Ovulationsrate nicht weiter gesteigert (Pawlyshyn et al., 1986) und die Anzahl der befruchteten und transfertauglichen Embryonen (MacGowan et al., 1985; Pawlyshyn et al., 1986) nimmt ab. Mit einer Dosis von 14 Ampullen Pergonal® (eine Ampulle enthält eine äquivalente Aktivität von 75 I.E. FSH und 75 I.E. LH) wurden die besten Resultate erzielt (MacGowan et al., 1985). Nachteilig ist auch die hohe Anzahl von Injektionen (Injektionsintervall 12 Stunden), die zur Auslösung einer Superovulation notwendig sind (Critser et al., 1982; Lauria et al., 1982b; Alcivar et al., 1984; MacGowan et al., 1985).

#### **2.7.5. Einfluss des zeitlichen Regimes auf die Embryonenqualität (FSH)**

Neben der Auswahl des geeigneten Präparates zur Superovulation spielt die zeitliche Verabreichung des Gonadotropins eine wichtige Rolle (Monniaux et al., 1983). Nach allgemeiner Ansicht liefert die 8-malige Verabreichung von FSH alle 12 Stunden die besten Ergebnisse (Walsh et al., 1993; Lopes da Costa et al., 2001). Die einmal tägliche Verabreichung des Gonadotropins führt zu einer geringeren Anzahl der insgesamt gewonnenen Embryonen und der transfertauglichen Embryonen (Walsh et al., 1993). Walsh et al. (1993) beobachteten einen signifikant positiven Einfluss auf die Qualität und Quantität der gewonnenen Embryonen, wenn anstelle einer einmal täglichen Verabreichung von FSH das Gonadotropins zweimal täglich appliziert wurde (s.a. Abb. 8). Die Embryonengesamtzahl war signifikant erhöht und der Anteil der Klasse 3-Embryonen signifikant reduziert bei den

alle 12 Stunden behandelten Spendertieren. Durch 2- oder 3-mal tägliche Injektion von FSH kann die Ovulationsrate und die Anzahl der „guten“ Embryonen gesteigert werden (Monniaux et al., 1983).

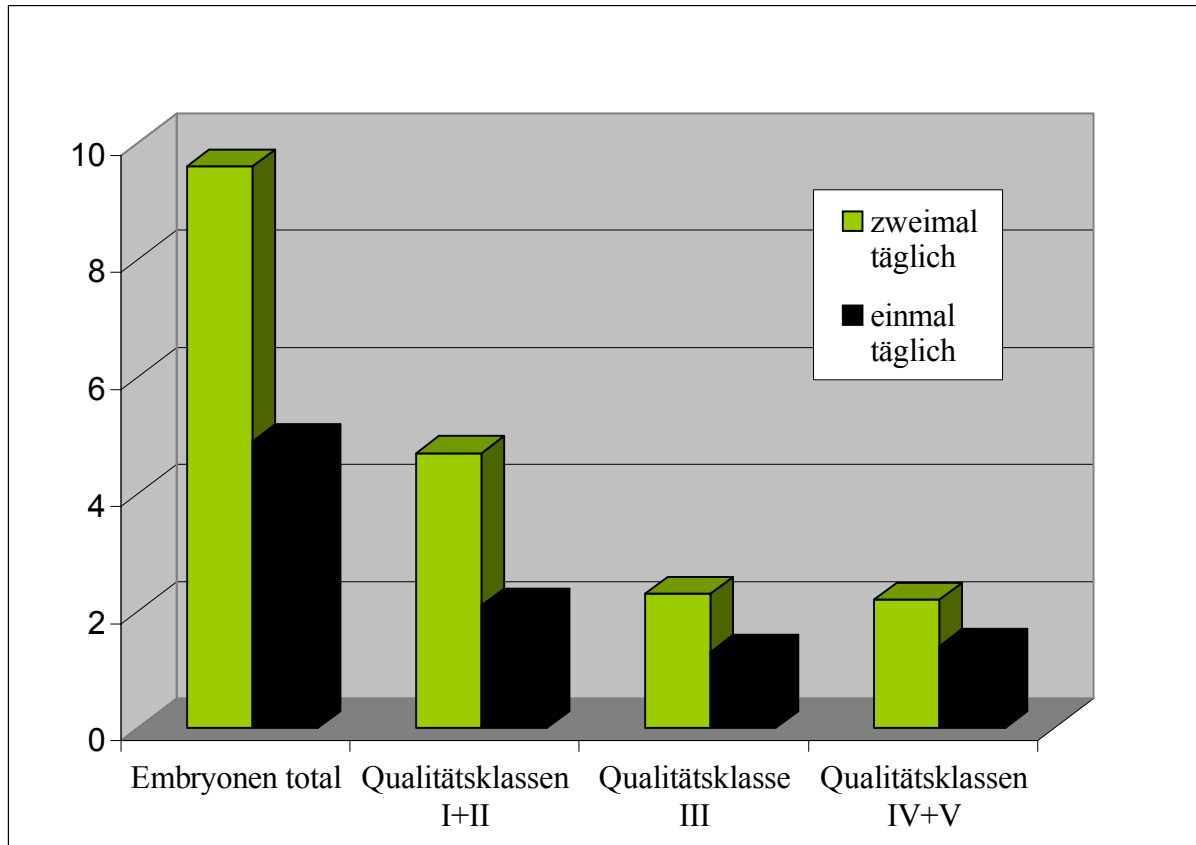


Abb. 8: Embryonenausbeute nach ein- oder zweimaliger FSH-Injektion (modifiziert nach Walsh et al., 1993)

Nach Donaldson (1984c) ist nicht ein vier- oder fünftägiges Behandlungsprogramm für den Behandlungserfolg entscheidend, sondern vielmehr die verabreichte Gesamtdosis von FSH. Der Anteil transfertauglicher Embryonen ist bei den über 5 Tage behandelten Rindern signifikant erhöht, mit dem viertägigem Behandlungsschema werden signifikant mehr Embryonen insgesamt gewonnen, so dass sich letztendlich kein Unterschied in der Anzahl der transfertauglichen Embryonen bei den beiden Behandlungsprogrammen ergibt (Donaldson, 1984c). Walton und Stubbings (1986) stellten nach 3- oder 4-tägiger Behandlungsdauer mit FSH keine signifikanten Unterschiede in der Ovulationsrate fest, die Anzahl transfertauglicher Embryonen war nach der 4-tägigen Stimulationsbehandlung jedoch signifikant erhöht (1,5 vs. 5,8).

Yamamoto et al. (1992) beobachteten eine signifikant höhere Anzahl der insgesamt gewonnenen, sowie der transfertauglichen Embryonen nach einfacher subkutaner Injektion von FSH und führten diesen Effekt auf die reduzierte Stressexposition der Tiere durch die einmalig durchgeführte Superovulationsbehandlung zurück. Andere Autoren konnten keine signifikanten Unterschiede in der Ovarreaktion (Misra et al., 1992; Bo et al., 1996), Qualität und Quantität der gewonnenen Embryonen (Hockley et al., 1992; Kasiraj et al., 1992; Fernández et al., 1993; Schallenberger et al., 1994; Bo et al., 1995; Bo et al., 1996) nach ein- oder mehrfacher Injektion von FSH feststellen. Die Effektivität einer einmaligen subkutanen FSH-Applikation kann vermutlich auf die langsamere Resorption eines subkutanen Depots zurückgeführt werden (Kelly et al., 1997). Durch die einmalige Applikation dieses Gonadotropins kann der Zeitaufwand und die Belastung der Tiere vermindert werden (Fernández et al., 1993). Kelly et al. (1997) stellten dagegen nach einfacher Verabreichung von FSH eine verminderte Anzahl transfertauglichen Embryonen fest.

## **2.8. Einfluss der Follikelanzahl, Ovulationsrate und Embryonenausbeute**

Die Reaktion eines Spendertieres auf eine Superovulationsbehandlung ist beeinflusst durch den ovariellen Befund vor Einleitung der Gonadotropinverabreichung. Eine hohe Anzahl an wachsenden Follikeln wirkt sich positiv auf das Resultat einer Superovulation aus (Cushman et al., 1999). Cushman et al. (1999) konnten durch histologische Untersuchungen der Eierstöcke von Tieren, die einen Tag vor Beginn der Superovulation einseitig ovariectomiert worden waren, belegen, dass die Anzahl der kleinen ( $< 1\text{ mm}$  im Durchmesser) und mittelgroßen (3 bis 7 mm im Durchmesser) Follikel auf dem Ovar positiv mit der Superovulationsreaktion dieser Tiere korreliert ist. Bei den Spendertieren, die auf die Gonadotropingaben sehr gut reagierten ( $> 14$  Corpora lutea), wurden mehr als 250 Follikel mit maximal 1mm Durchmesser auf dem entfernten kontralateralen Eierstock mikroskopisch nachgewiesen, während bei Tieren mit suboptimalen Ergebnissen höchstens 100 Follikel beobachtet worden waren (Cushman et al., 1999). Ein ähnliches Ergebnis hatten auch Untersuchungen mittels Ultraschall bei Spendertieren (Schwab, 2000). Die bei der Untersuchung der Spendertiere zum Zeitpunkt der Besamung festgestellte Anzahl der Follikel korreliert mit der Anzahl der gewonnenen Embryonen bzw. Eizellen (Schwab, 2000). Von Tieren, bei denen viele (16-20) Follikel auf den Ovarien gezählt wurden, war die Anzahl der insgesamt gewonnenen Embryonen bzw. Eizellen, sowie der Anteil an transfertauglichen

Embryonen signifikant höher, als bei Rinder, die wenig (1-5) Ovarfollikel aufwiesen (Schwab, 2000). Auch in einer anderen Untersuchung wurde beobachtet, dass die Anzahl kleiner Follikel (3-6 mm im Durchmesser) zum Zeitpunkt der Einleitung der Gonadotropinbehandlung mit dem Superovulationsergebnis korreliert (Romero et al., 1991). Singh et al. (1996) dagegen konnten keine Beziehung zwischen Ovarreaktion und der Anzahl der Follikel zum Zeitpunkt des Beginns der Superovulation feststellen. Umgekehrt gibt es Hinweise, dass die Zahl „großer“ Follikel negativ mit den quantitativen und qualitativen Parametern der Embryonenentwicklung korreliert ist. Kohram et al. (1995) beobachteten eine höhere Anzahl gut entwickelter Embryonen, wenn die Superovulation in der Anwesenheit höchstens eines großen Follikels (7-10 mm Ø) eingeleitet wird, als wenn mehr als zwei große Ovarfollikel vorhanden sind.

Die Anzahl der kleinen antralen Follikel lässt sich durch eine Behandlung mit rekombinanten bovinen Somatotropin (rBST) steigern (Gong et al., 1991; Gong et al., 1993a; Gong et al., 1993b; Gong et al., 1997; Buratini et al., 2000; Cushman et al., 2001). Somatotropin bewirkt eine gesteigerte Produktion des Insulin-like-Growth-Faktors 1 (IGF-1) in den Ovarfollikeln (Herrler et al., 1994), der IGF-1-Blutspiegel wird durch solch eine Behandlung signifikant erhöht (Gong et al., 1991; Buratini et al., 2000). IGF regt das Wachstum immaturer Follikel an (Armstrong, 1993). rBST-behandelte Rinder wiesen eine doppelt so hohe Anzahl an Follikeln mit einem Durchmesser über 4 mm auf als nichtbehandelte Tiere und produzierten signifikant mehr Embryonen nach einer Superovulation (Herrler et al., 1994). Andere Autoren konnten durch eine rBST-Behandlung zwar die Anzahl der insgesamt gewonnenen Embryonen erhöhen, jedoch ließ sich dies auf eine Zunahme der unbefruchteten Oozyten zurückführen, die Anzahl der transfertauglichen Embryonen unterschied sich nicht signifikant (Gong et al., 1993b) bzw. war sogar erhöht im Vergleich zu den nichtbehandelten Tieren (Rieger et al., 1991). Der Anteil der Spendertiere, die überhaupt nicht auf eine Gonadotropinapplikation reagieren, war nach einer rBST-Verabreichung signifikant reduziert (Herrler et al., 1994).

Die Ovarreaktion nach einer Superovulationsbehandlung (Anzahl der Ovulationen und Follikel  $\geq 10$ mm) beeinflusst die Qualität und Quantität der gewonnenen Embryonen signifikant (Boland et al., 1978). Olivera-Angel et al. (1984) beobachteten einen Zusammenhang zwischen Ovulationsrate und Embryonenqualität. Tiere mit hohen Ovulationsraten produzierten tendenziell qualitativ schlechtere Embryonen. Goulding et al.

(1991) bemerkten dagegen einen proportionalen Anstieg des Anteils und der Anzahl der Embryonen der Qualitätsklasse I und II mit Steigerung der Ovulations- und Embryonen-Gewinnungsrate. Es bestand ein positiver Zusammenhang zwischen Ovulationsrate und der Anzahl der transfertauglichen Embryonen. Der prozentuale Anteil sank jedoch mit zunehmender Ovulationsrate (Goulding et al., 1991).

Andere Autoren stellten zudem eine positive Korrelation zwischen der Ovulationsrate und dem Anteil abnormaler Embryonen fest (Church und Shea, 1976; Boland et al., 1978; Olivera-Angel et al., 1984; Goulding et al., 1991). Bei sehr gutem Resultat (>30 Ovulationen) stieg dieser Anteil signifikant an. Rowson (1971) vermutet, dass es für ein optimales Resultat in der Embryonenausbeute/-Qualität eine optimale Ovulationsrate von ungefähr 20 Ovulationen gibt. Church und Shea (1976) postulierten ein Optimum von 8-10 Ovulationen pro Ovar.

Rinder, die zum Zeitpunkt der Spülung Follikelzysten auf den Ovarien aufweisen, produzieren einen höheren Prozentsatz unbefruchteter Eizellen und degenerierter Embryonen (Schilling et al., 1980). Auch persistierende Follikel zum Zeitpunkt der Spülung können die Befruchtung und die frühembryonale Entwicklung stören. Das Östrogen-/ Progesteronverhältnis wird durch von hormonell aktiven Follikeln und den sich anbildenden Gelbkörpern gleichzeitig produzierten Steroidhormonen gestört (Janowitz, 1991). Embryonale Mortalität kann auch durch die durch persistierende Follikel bedingten erhöhten Östrogenwerte bewirkt sein (Ahmad et al., 1994). Der Anteil der transfertauglichen Embryonen an den insgesamt gewonnenen Embryonen bzw. Eizellen ist bei Rindern mit vielen persistierenden bzw. neuangebildeten Follikeln signifikant reduziert (Schwab, 2000). Die Anzahl unbefruchteter Eizellen steigt mit der Anzahl diagnostizierter Follikel zum Zeitpunkt der Spülung signifikant an (Schwab, 2000).

Rinder, die ein sehr gutes Resultat in der Embryonenausbeute zeigen, weisen einen tendenziell geringeren Anteil transfertauglicher Embryonen und einen höheren Anteil unbefruchteter Eizellen auf (Schilling et al., 1982). Tiere mit einem Spülergebnis von über 36 Embryonen/Eizellen haben tendenziell den höchsten Anteil an unbefruchteten Eizellen (36%) und tendenziell einen geringeren Anteil an transfertauglichen Embryonen (56%).

Es bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Fertilisationsrate und dem Anteil transfertauglicher Embryonen zwischen Rindern mit niedriger oder hoher Embryonen- bzw. Eizellenausbeute. Die durchschnittlich meisten transfertauglichen Embryonen (16,0) kann man von Tieren erhalten, die insgesamt zwischen 16 und 20 Embryonen/Eizellen liefern und einen Anteil von 1 – 20% unbefruchtete Eizellen aufweisen (Schwab, 2000).

## **2.9. Handling der Embryonen**

Behandlungen und Manipulationen, die im Zuge der Embryonengewinnung und –beurteilung erfolgen, beeinflussen die Qualität der Embryonen (Kauffold und Thamm, 1985). Je mehr mit einem Embryo bei den erforderlichen Manipulationen hantiert wird, desto größer ist die Inzidenz embryonaler Sterblichkeit nach Transfer (King, 1985). Mechanische Einwirkungen während der Gewinnung und Manipulation in vitro, intensive Lichteinwirkung, osmotischer und pH-Schock, sowie die Dauer der Aufbewahrung können die Weiterentwicklungsfähigkeit von Rinderembryonen beeinflussen (Kauffold und Thamm, 1985). Ein Teil der nach direktem Transfer von Blastozysten auftretenden embryonalen Mortalität wird auf das Handling der Embryonen zurückgeführt (Heyman, 1985).

Insbesondere an der Zona pellucida können bei den erforderlichen Manipulationen Beschädigungen verursacht werden. Durch den bei der Spülprozedur auftretende hydrostatischen Druck kann der Verlust (Shea, 1981) oder Schäden an der Zona pellucida verursacht werden (Kauffold und Thamm, 1985). Vorhandene Risse in der Zona pellucida können auf die Einwirkung schädigender Faktoren hinweisen, welche evtl. auch andere, morphologisch nicht nachweisbare Defekte, zur Folge haben können (Kauffold und Thamm, 1985). Partikel an der Oberfläche der Zona pellucida deuten auf die Möglichkeit einer bakteriellen Kontaminierung (Kauffold und Thamm, 1985).



## **2.10. Subjektive Beurteilung der Embryonenqualität**

Bei der morphologischen Beurteilung von Rinderembryonen sollte immer auch berücksichtigt werden, dass es sich bei der visuellen Beurteilung um eine subjektive Einschätzung handelt (Robertson und Nelson, 1991). Der personelle Faktor bei der qualitativen Klassifizierung von Embryonen ist nicht zu unterschätzen; es konnten erhebliche Variationen zwischen den einzelnen Laboren und Personen nachgewiesen werden (Sreenan und Diskin, 1987). Die Übereinstimmung der von verschiedenen Beurteilern gelieferten Klassifizierungen ist bezüglich des embryonalen Entwicklungsstandes (89,2 %) höher als bei der qualitativen Einstufung (68,5 %) der Embryonen (Farin et al, 1995). Die Beurteilung von Embryonen sehr guter Qualität sowie eindeutig degenerierter Embryonen fällt einheitlicher aus, als bei Klasse 2- und 3- Embryonen (Farin et al, 1995).

Übung und Erfahrung im Beurteilen von Rinderembryonen spielen eine große Rolle, um gute Ergebnisse beim Embryotransfer zu erzielen (Seidel und Seidel, 1977). Ein geübtes Personal kann mit dem Lichtmikroskop bei 30- bis 40-facher Vergrößerung über 95 % der Embryonen reproduzierbar klassifizieren (Seidel und Seidel, 1977). Embryotransfer-Teams sollten regelmäßig einer „Schulung“ unterzogen werden (Van Wagtendonk-de Leeuw, 1996). Beim Vergleich von 29 Personen, welche unabhängig voneinander auf Video aufgezeichnete Embryonen nach morphologischen Kriterien, angelehnt an Linder und Wright (1983), beurteilten, lieferten 5 Personen signifikant abweichende Ergebnisse bei der qualitativen Klassifizierung (Van Wagtendonk-de Leeuw, 1996). Die Anwendung der vergleichenden qualitativen Untersuchung anhand von Videoaufnahmen bei Embryotransfer-Teams kann sowohl Fehleinschätzungen einzelner Personen in der Zukunft vermindern, als auch die Motivation im Team erhöhen (Van Wagtendonk-de Leeuw, 1996).

### **3. Bedeutung der Embryonenqualität**

Die qualitative Klassifizierung ist Grundlage der Entscheidung über die spätere Verwendung der Embryonen (Kauffold und Thamm, 1985). Man versucht dadurch einerseits für einen Transfer geeignete Embryonen auszuwählen und andererseits eine sachgerechte Selektion im Hinblick auf den Verwendungszweck (Tiefgefrier-Konservierung, Sexing, Splitting) zu gewährleisten (Shea et al., 1976). Bei der morphologischen Beurteilung von Rinderembryonen sollte jedoch immer bedacht werden, dass es sich bei der visuellen Beurteilung stets um eine subjektive Einschätzung eines biologischen Systems, und nicht um eine exakte Wissenschaft handelt (Robertson und Nelson, 1991) (s.a. 2.10.). Weiterhin sind andere Faktoren, wie z.B. Umwelteinflüsse, Qualität der Rezipienten und die technischen Möglichkeiten ebenfalls sehr bedeutend bei der Erzeugung von Trächtigkeiten nach dem Transfer von Embryonen (Robertson und Nelson, 1991).

#### **3.1. Bedeutung im Rahmen des Embryotransfers**

##### **3.1.1. Trächtigkeitsraten nach Embryotransfer**

Der Erzielung einer Trächtigkeit gehen viele komplexe Beziehungen zwischen Embryo, seiner uterinen Umgebung und dem Gelbkörper voraus (Sreenan und Diskin, 1987). Embryonen produzieren Proteine, Steroide und Prostaglandine, welche sowohl luteotrophe und anti-luteolytische Effekte bewirken, wie auch regulative Wirkung auf den uterinen Blutfluss, auf die Verteilung von Nährstoffen, die Embryonenmigration und andere Geschehnisse, die mit der Erzielung und Aufrechterhaltung einer Trächtigkeit assoziiert sind, ausüben (Bazer et al., 1986). Ein wichtiger Faktor zur Erzielung einer Trächtigkeit ist die Fähigkeit der Embryonen, die uterine Sekretion von PGF2 $\alpha$  durch Bildung von Interferon- $\tau$  zu hemmen (s.a. 4.8.2.) (Thatcher et al., 2001). Die Trächtigkeitsraten steigen mit Anzahl der übertragenen Embryonen (Heyman, 1985; Betteridge, 1977). Durch den Transfer von zwei Embryonen auf ein Empfängertier kann die Trächtigkeitsrate von 57,7 % auf 68,7 % gesteigert werden (Heyman, 1985). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Großteil der Ursachen für die frühe embryonale Mortalität eher mit Faktoren, die vom Embryo ausgehen, als mit uterinen Faktoren des Empfängertieres assoziiert sind (Sreenan und Diskin, 1987).

Die durchschnittliche Trächtigkeitsrate nach nichtchirurgischem Embryotransfer liegt etwa gleich hoch oder sogar höher als nach künstlicher Besamung (Niemann, 1986). Nach chirurgischem Transfer ergeben sich keine signifikant unterschiedliche Trächtigkeitsraten wie nach nichtchirurgischer Übertragung der Embryonen (Hasler, 2001). Hasler et al. (1987) stellten in den eigenen Untersuchungen nach nichtchirurgischem Transfer von Rinderembryonen eine durchschnittliche Trächtigkeitsrate von 71,3 % und damit keine signifikanten Abweichung der Werte gegenüber dem Transfer von Embryonen von nicht-superovulierten Rindern fest. Elsdén et al. (1978) beobachteten allerdings eine höhere Trächtigkeitsrate nach Transfer von Embryonen von superovulierten Rindern (71 % vs. 59 %). Nach Literaturangaben werden die Trächtigkeitsraten neben der Embryonenqualität auch von der Transfermethode, dem Management der Empfängertiere (Heyman, 1985) und dem Zeitpunkt der Embryonengewinnung (Hasler et al., 1987) beeinflusst. Die embryonale Mortalität nach direktem Transfer von Blastozysten beträgt ungefähr 30 % und tritt meistens kurz vor oder während der Implantation der Embryonen ein und kann u.a. auf das Handling der Embryonen zurückgeführt werden (Heyman, 1985) (s.a. 2.8.). Embryonale Sterblichkeit nach Embryotransfer tritt zu 28 % zwischen Tag 35 und 60 (Curtis et al., 1981; Christie et al., 1980), 25 % zwischen Tag 45 und 90 (Jillella und Baker, 1978; Tervit et al., 1980) und 29 % zwischen Tag 21 und 60 (Renard et al., 1980b) auf.

Tervit et al (1980) konnten eine lineare Beziehung zwischen der Zeit, die für einen Transfer benötigt wird und der Trächtigkeitsrate beobachten (Tervit et al., 1980). Je schneller ein Embryo nach seiner Gewinnung übertragen wurde (durchschnittlich benötigte Zeit: 1,8 Minuten), desto wahrscheinlicher resultierte aus diesem Transfer eine Trächtigkeit (Tervit et al., 1980).

#### **3.1.1.1. Einfluss der Embryonenqualität auf die Trächtigkeitsraten**

Die Embryonenqualität hat einen größeren Einfluss auf die Trächtigkeitsrate als der embryonale Entwicklungsstand (Lindner und Wright, 1983). Im Allgemeinen korrespondieren die Trächtigkeitsraten mit der qualitativen Klassifizierung der Rinderembryonen (Elsden et al., 1978; Schneider et al., 1980; Tervit et al., 1980; Shea, 1981; Wright und Wright, 1981; Linder und Wright, 1983; Donaldson, 1985; Donaldson, 1986a; Takeda et al., 1986; Coleman et al., 1987; Hasler et al., 1987; Misra et al., 1999; Hasler, 2001) (s.a. Abb. 9).

Die Trächtigkeitsraten steigen mit Anzahl und Qualität der übertragenen Embryonen (Heyman, 1985). Signifikante Unterschiede ergeben sich v.a. zwischen „guten“ und „schlechten“ Embryonen, nicht aber zwischen „sehr guten“ und „guten“ (Elsden et al., 1978; Linder und Wright, 1983; Spell et al., 2001). Wright und Wright (1981) berichteten von Trächtigkeitsraten von 33 % für Klasse 1-Embryonen, 45 % für Klasse 2-Embryonen und 64 % für Embryonen der Qualitätsklasse 3. Eine hochsignifikante Zunahme der Trächtigkeitsraten kann mit zunehmender Embryonenqualität von an Tag 7, 7,5, sowie 8 gewonnenen Embryonen verzeichnet werden (Donaldson, 1986a) (s.a. Tab. 4). Qualitativ hochwertigere Embryonen (Klasse 1 und 2) sollen toleranter gegenüber Abweichungen in der Zyklussynchronität als Klasse 3- und 4- Embryonen sein (Nelson et al., 1982; Hasler et al., 1987). Es wurde jedoch keine Beziehung zwischen Embryonenqualität und dem Anteil an Rezipienten, welche nach dem Embryotransfer abortierten, festgestellt (King et al., 1985).

Tab. 4: Trächtigkeitsraten in Abhängigkeit von Embryonenqualität und Entwicklungsstand (Donaldson, 1985)

Klasse	frühe Morula	späte Morula	frühe Blastozyste	späte Blastozyste	geschlüpfte Blastozyste	kollabierte Blastozyste	alle Stadien
I	59,4	53,0	56,2	55,9	52,5	60,4	56,1
II	49,1	44,0	50,2	49,2	42,1	48,4	48,9
III	22,0	38,0	34,1	33,3	22,2	31,8	40,1
IV	12,5	30,6	32,4	-	66,7	50,0	32,5
alle	44,3	47,0	52,0	54,3	44,2	41,0	-

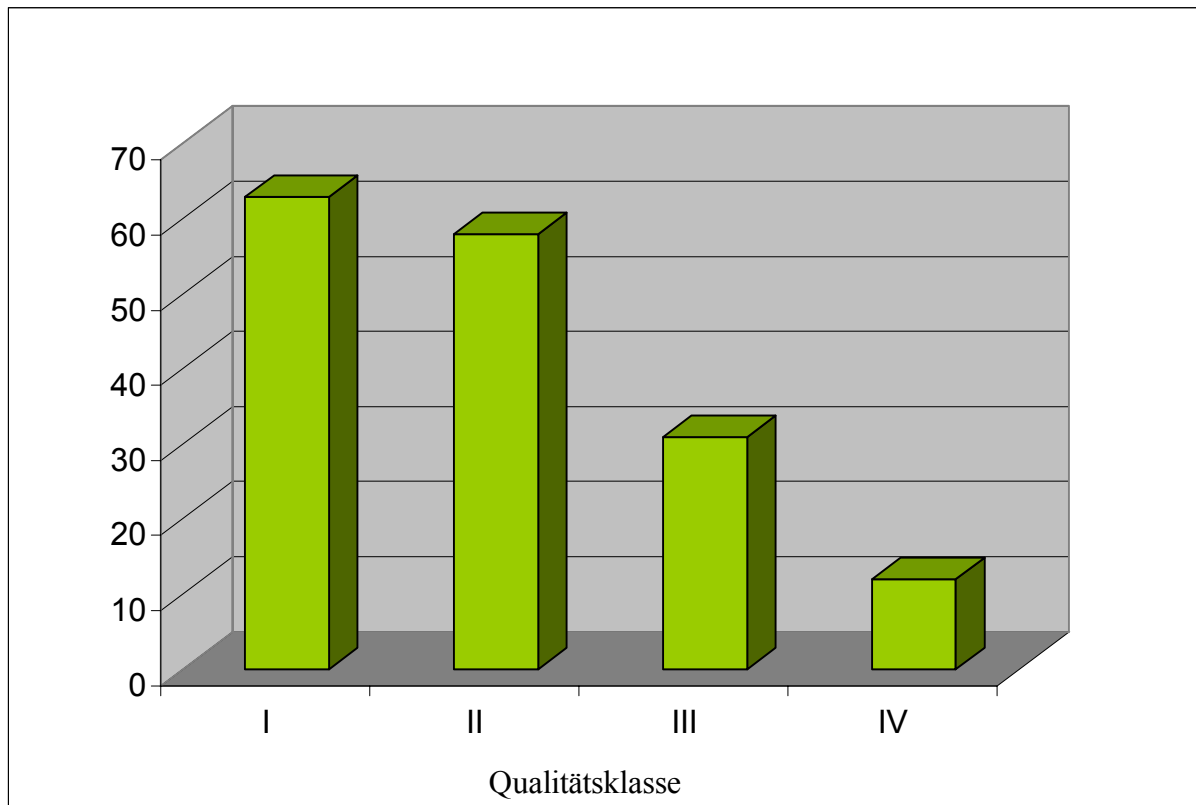


Abb. 9: Trächtigkeitsraten in Abhängigkeit von der Embryonenqualität (in %)  
(modifiziert nach Seidel et al., 1978b)

### 3.1.1.2. Einfluss des embryonalen Entwicklungsstandes auf die Trächtigkeitsraten

Bei superovulierten Rindern werden immer unterschiedliche Entwicklungsstadien aufgefunden (Betteridge et al., 1980; Purwata et al., 1993; Donaldson, 1984c; Purwata et al., 1994; Donaldson, 1986a) (s.a. Abb. 15). Das embryonale Entwicklungsstadium übt einen signifikanten Einfluss auf die resultierenden Trächtigkeiten aus (Shea et al., 1976; Halley et al., 1979; Schneider et al., 1980; Wright und Wright, 1981; Linder und Wright, 1981; Donaldson, 1986a; Hasler et al., 1987; Spell et al., 2001) (s.a. Tab. 4 und Abb. 10), verglichen mit der Bedeutung der Embryonenqualität übt der Entwicklungsstand jedoch einen geringeren Effekt aus (Lindner und Wright, 1981; Hasler, 2001). Vermutlich können nach Transfer von Rinderembryonen bessere Trächtigkeitsraten erzielt werden, wenn nicht das Alter, sondern der tatsächliche Entwicklungsstand der Embryonen berücksichtigt wird (Kunkel und Stricklin, 1978). Linder und Wright (1983) bestimmten den Begriff Entwicklungsalter, welches mit dem erwarteten Alter eines Embryonen korrespondiert, unabhängig vom Zeitpunkt seiner

Gewinnung. Das Entwicklungsalter wird benutzt, um die Embryonen-Rezipienten-Synchronität abschätzen zu können, welche einen größeren Einfluss auf die Trächtigkeitsraten besitzt, als die Synchronität zwischen Spender- und Empfängertieren.

Der Großteil der an Tag 7 gewonnenen Rinderembryonen befindet sich im Entwicklungsstadium der späten Morula oder der frühen Blastozyste (Shea, 1981). Die Überlebensraten von Morulae sind niedriger als die von Blastozysten (Kunkel und Stricklin, 1978; Halley et al., 1979; Schneider et al., 1980; Wright und Wright, 1981; Looney et al., 1984; Donaldson, 1985; Hasler et al., 1987; Spell et al., 2001). Spell et al. (2001) konnten die höchsten Trächtigkeitsraten nach dem Transfer von frühen Blastozysten (73,1%) und die niedrigsten nach der Übertragung von frühen Morulae (50,0%) verzeichnen.

Hasler et al. (1987) erzielten mit frühen und mittleren Blastozysten die meisten Trächtigkeiten, und mit Morulae weniger als mit (allen Stadien von) Blastozysten (71 % vs. 75 %). Kunkel und Stricklin (1978) stellten nach dem Transfer von frühen und expandierten Blastozysten die größten Überlebensraten fest. Diese Ergebnisse sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass Morulae einerseits schwieriger in der Morphologie zu beurteilen sind (Hasler et al., 1987) und andererseits in diesen Untersuchungen die Morulae von Donoren, die am Tag 7 und später gespült wurden, in ihrer Entwicklung zurückgeblieben sein könnten (Hasler et al., 1987). Elsdon et al. (1978) klassifizierten Embryonen, welche ihrem erwarteten Entwicklungsalter hinterher stehen, als retardiert. Retardierte Embryonen produzieren geringere Trächtigkeitsraten als normal entwickelte. Die weiter entwickelten „normalen“ Embryonen führen zu prozentual mehr Trächtigkeiten, vermutlich aufgrund der Tatsache, dass morphologische Abnormalitäten in weiter entwickelten Rinderembryonen leichter festgestellt werden können (Donaldson, 1986a). Nach dem Transfer von geschlüpften Blastozysten werden signifikant niedrigere Trächtigkeitsraten erzielt als mit anderen Entwicklungsstadien, was vermutlich auf mechanische Beschädigung während des Gewinnungsvorganges oder inadäquate Kultursysteme zurückzuführen sein könnte (Hasler et al., 1987).

Andere Autoren konnten keinen signifikanten Einfluss des embryonalen Entwicklungsstandes (Lindner und Wright, 1983; Shea, 1981; Misra et al., 1999; Hasler, 2001) bzw. des Alters der Embryonen (Sreenan, 1978; Tervit et al., 1980; Hasler, 2001) auf die Trächtigkeitsraten feststellen.

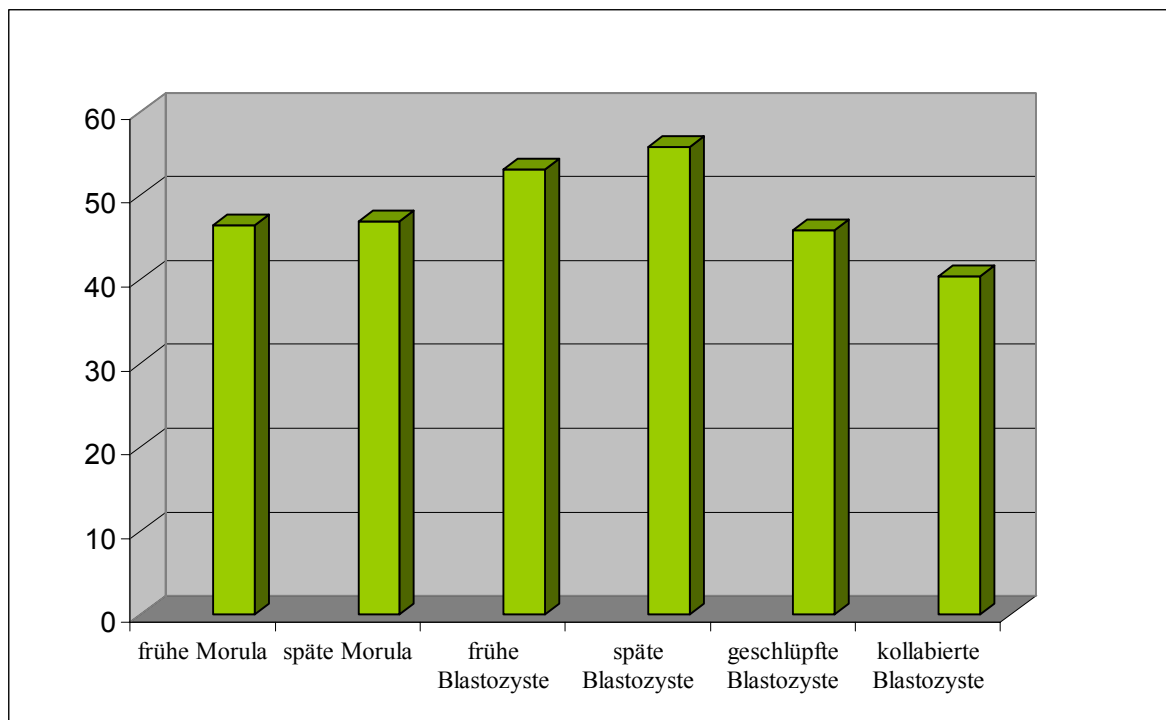


Abb. 10: Trächtigkeitsraten (in %) in Abhängigkeit vom embryonalen Entwicklungsstand (modifiziert nach Donaldson, 1986a)

### 3.1.1.3. Einfluss des Zeitpunktes der Embryonengewinnung auf die Trächtigkeitsraten

Der Zeitpunkt der Embryonengewinnung übt einen signifikanten Einfluss auf die Trächtigkeitsrate der übertragenen Embryonen aus (Elsden et al., 1978; Hasler et al., 1987) (s.a. Abb. 11), jedoch können nach dem Transfer von Rinderembryonen bessere Trächtigkeitsraten erzielt werden, wenn der tatsächliche Entwicklungsstand der Embryonen berücksichtigt wird (Kunkel und Stricklin; Hasler et al., 1987). Der Großteil der an Tag 6 bis 8 gewonnenen Embryonen befindet sich im Stadium der Morula, frühen Blastozyste und späten Blastozyste (Donaldson, 1986a). Hasler et al. (1987) beobachteten niedrigere Trächtigkeitsraten nach der Übertragung von an Tag 9 gewonnenen Embryonen, als bei 6 bis 8 Tage alten Embryonen. Die mit frühen und späten Blastozysten erzielten Trächtigkeitsraten sind mit an Tag 7 (54,4 und 60,2 %) und Tag 7,5 (53,6 und 53,1 %) gewonnenen Embryonen am höchsten (Donaldson, 1986a).

Signifikante Unterschiede lassen sich in der Trächtigkeitsrate zwischen den Embryonenstadien von Tag 7 und 7,5 feststellen (Donaldson, 1986a) (s.a. Tab. 5). Bei den

frühen und späten Morulae, bei den geschlüpften, sowie den kollabierten Blastozysten konnte kein signifikanter Einfluss des Zeitpunktes ihrer Gewinnung auf die Trächtigkeitsraten verzeichnet werden (Donaldson, 1986a).

Eine signifikante Zunahme der Trächtigkeitsrate kann mit verbesserter Embryonenqualität von an Tag 7, 7,5, sowie 8 gewonnenen Embryonen verzeichnet werden (Donaldson, 1986a). Bei den an Tag 6 und 6,5 gewonnenen Embryonen dagegen tritt keine signifikant höhere Trächtigkeitsrate ein, wenn Embryonen übertragen werden, die weniger morphologische Mängel aufweisen (Donaldson, 1986a) (s.a. Tab. 5). Morphologisch normal erscheinende Embryonen, die an Tag 5 bis 6 gewonnen und übertragen werden, resultieren in signifikant mehr Trächtigkeiten (75 %) als morphologisch normale Embryonen von Tag 8 bis 9 (56 %) (Elsden et al., 1978). Keine signifikanten Unterschiede bestehen zwischen den Trächtigkeitsraten bei den zwischen Tag 6,5 und 7,5 gewonnenen morphologisch normalen Embryonen (Elsden et al., 1978).

Andere Autoren konnten keinen signifikanten Einfluss des Zeitpunktes der Embryonengewinnung auf die Trächtigkeitsrate nachweisen, solange die Embryonen zwischen Tag 7 und 9 (Tervit et al., 1980) bzw. 6,5 und 8 (Wright und Wright, 1981) bzw. 5 bis 8 (Hasler et al., 1987) gewonnen wurden.



Tab. 5: Trächtigkeitsraten (in %) in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium und Tag der Embryonengewinnung (Tage nach der Brunst) (Donaldson et al., 1986a)

Tag der Gewinnung	frühe Morula	späte Morula	frühe Blastozyste	späte Blastozyste	geschlüpfte Blastozyste	kollabierte Blastozyste	Alle Stadien
6	39,1	46,2	40,0	-	-	-	43,3
6,5	36,6	49,7	46,6	51,6	-	-	47,7
7	52,7	47,5	54,4	60,2	33,3	43,5	52,0
7,5	25,0	43,9	53,6	53,1	61,1	53,1	51,1
8	50,0	43,5	46,6	52,2	43,5	33,3	47,5
total	46,4	46,9	53,1	55,8	45,8	40,3	

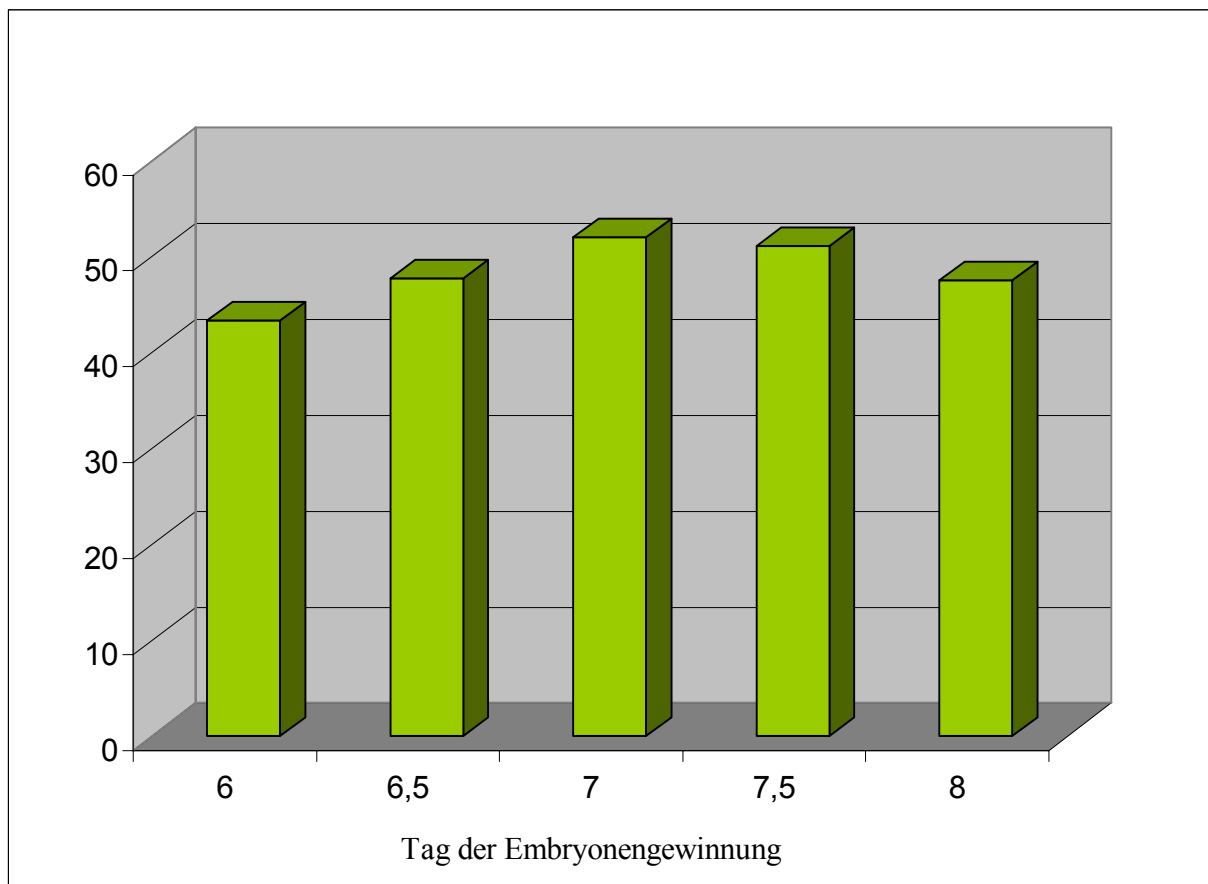


Abb. 11: Trächtigkeitsraten (in %) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Embryonengewinnung (modifiziert nach Donaldson, 1986a)

#### **3.1.1.4. Einfluss der Zyklussynchronität zwischen Empfänger- und Spendertier auf die Trächtigkeitsraten**

Die Zyklussynchronität zwischen Empfänger- und Spendertieren ist ein weiterer wichtiger, die Trächtigkeitsraten beeinflussender Faktor (Kunkel und Stricklin, 1978; Lindner und Wright, 1983; Donaldson, 1985; Hasler et al., 1987; Hasler, 2001; Spell et al., 2001) (s.a. Abb. 12 und 13). Linder und Wright (1983) bemerkten jedoch, dass die Synchronität zwischen dem Embryo und dem Rezipienten einen größeren Einfluss auf die Trächtigkeitsraten besitzt, als die Synchronität zwischen den Spender- und Empfängertieren. Mit Tag 7-Rezipienten werden die höchsten Trächtigkeitsraten erzielt (Hasler et al., 1987).

Qualitativ hochwertige Embryonen (Qualitätsklasse 1 und 2) sind gegenüber Abweichungen in der Zyklussynchronität toleranter als qualitativ schlechte (Qualitätsklasse 3 und 4) Rinderembryonen (Nelson et al., 1982; Hasler et al., 1987). Eine Studie von Donaldson (1985) lieferte jedoch genau gegenteilige Ergebnisse bezüglich der Empfindlichkeit verschiedener Embryonenqualitäten auf die Zyklussynchronität.

Es hat sich als günstig erwiesen, wenn die Spendertiere etwas früher in Brunst kommen als die Empfängertiere (Donaldson, 1985; Seidel, 1980), weil man davon ausgeht, dass die Embryonen superovulierter Rinder zum Zeitpunkt der Spülung weniger weit entwickelt sind als die unbehandelten Tiere (Hasler et al., 1987). Die Trächtigkeitsraten sind am höchsten, wenn der Donor 12 bis 24 Stunden vor den Rezipienten in Brunst kommt (Spell et al., 2001) und am schlechtesten, wenn das Spendertier später als 12 Stunden nach den Empfängertier rindert (Hasler et al., 1987; Spell et al., 2001). Schneider et al. (1980) stellten die höchsten Trächtigkeitsraten nach dem Transfer auf Empfängertiere, die exakt oder bis 12 Stunden später in Brunst waren als die Spender, fest. Halley et al. (1979) dagegen berichteten von besseren Trächtigkeitsraten bei Rezipienten, die vor den Spendertieren in Brunst kamen.



Abb. 12: Trächtigkeitsraten (in %) in Abhängigkeit von der Zyklussynchronität (alle Entwicklungsstadien) (modifiziert nach Donaldson, 1985)

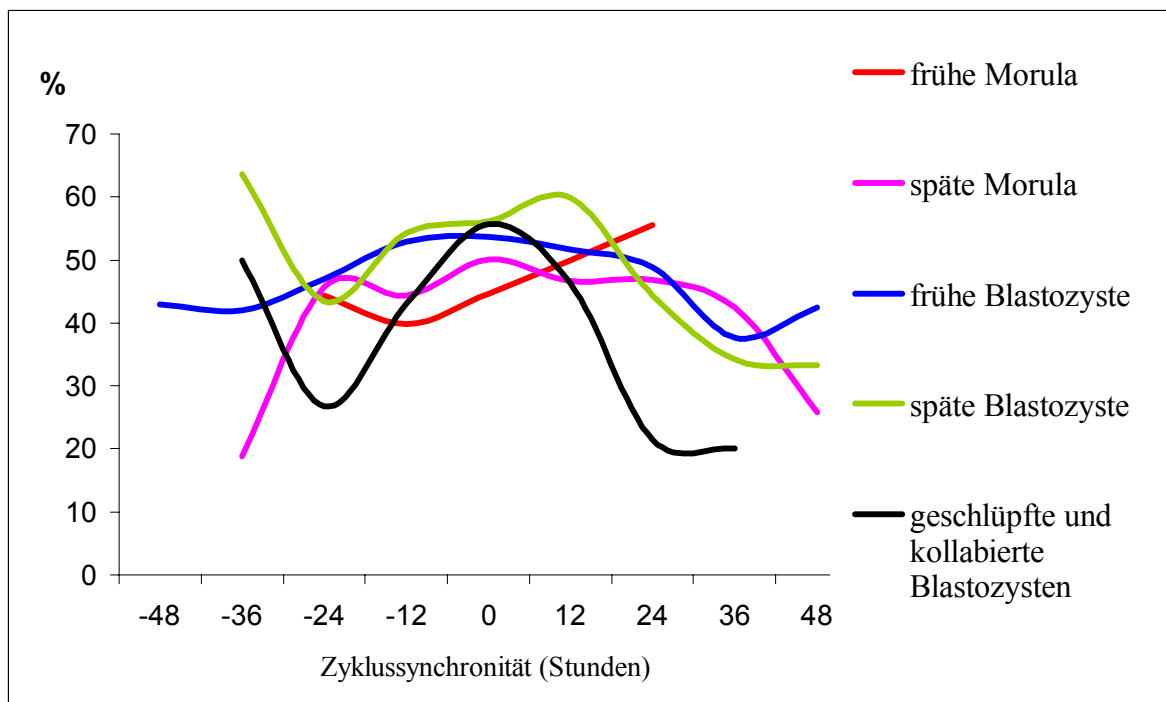


Abb. 13: Trächtigkeitsraten (in %) in Abhängigkeit von der Zyklussynchronität und dem embryonalen Entwicklungsstand (modifiziert nach Donaldson, 1985)

Andere Studien hingegen konnten keinen signifikanten Unterschied bei den Trächtigkeitsraten feststellen, solange die Brunstsynchronität zwischen Empfänger- und Spendertier innerhalb 24 Stunden (Donaldson, 1985; Lester et al., 1999; Hasler, 2001), innerhalb 48 Stunden (Lindner und Wright, 1983) bzw. zwischen +12 Stunden und –36 Stunden (Tervit et al., 1980) lag. Seidel (1980) und Sreenan und Diskin (1987) halten eine Abweichung von  $\pm 36$  Stunden noch für tolerierbar. Die besten Trächtigkeitsraten bei Büffeln erzielte man mit  $\pm 12$  Stunden synchronisierten Spendern und Empfängern (41%). Lagen die Brunsteintritte mehr als 12 Stunden auseinander, konnten nur noch 18 % Trächtigkeiten erreicht werden, lagen sie mehr als 24 Stunden auseinander, konnten überhaupt keine Trächtigkeiten mehr festgestellt werden (Misra et al., 1999).

Keine signifikanten Unterschiede aus von verschiedenen Entwicklungsstadien resultierenden Trächtigkeitsraten wurden beobachtet, wenn die Zyklussynchronität zwischen den Donoren und Rezipienten zwischen +36 Stunden und -12 Stunden lag; überstieg die Synchronität jedoch mehr als –12 Stunden, sanken die Trächtigkeitsraten aller Entwicklungsstadien, außer die der frühen Blastozysten (Hasler et al., 1987). Ältere Entwicklungsstadien sind toleranter gegenüber Abweichungen in der Synchronität (Kunkel und Stricklin 1978; Seidel, 1980; Wright und Wright, 1981; Hasler et al., 1987). Donaldson (1985) konnte dagegen bei jungen Morulae die geringste Empfindlichkeit gegenüber Abweichungen in der Zyklussynchronität zwischen Spender- und Empfängertier beobachten.

Bei exakter Übereinstimmung der Brunstzyklen des Donoren und des Rezipienten wurden die besten Überlebensraten nach dem Transfer von Morulae (Kunkel und Stricklin, 1978) und frühen Blastozysten (Donaldson, 1985) festgestellt. Bei den frühen Morulae wurden bei Rezipienten, die nach dem Donor in Brunst kamen, die höchsten Überlebensraten beobachtet (Donaldson, 1985). Kunkel und Stricklin (1978) erzielten mit frühen Blastozysten die höchsten Trächtigkeitsraten bei exakter bis negativer Rezipientensynchronität. Nach dem Transfer von späten, geschlüpften und kollabierten Blastozysten auf Empfängertiere, die genau mit oder 12 Stunden nach dem Spendertier in Brunst kommen, wurden prozentual die meisten Trächtigkeiten erzielt (Donaldson, 1985).

### **3.1.1.5. Einfluss des Spendertiers auf die Trächtigkeitsraten**

In einer Untersuchung von Hasler et al. (1987) wurde gezeigt, dass das Alter, die Rasse, der Laktationsstand und die Anzahl der Embryotransfer-Nutzungen des Spendertieres, sowie die Anzahl der gewonnenen Embryonen keinen Einfluss auf die Trächtigkeitsraten ausübten. Embryonen von über 15 Jahren alten Donoren resultierten allerdings in niedrigeren Trächtigkeitsraten (Hasler et al., 1987). Auch sind die Trächtigkeitsraten nach der Übertragung von Embryonen geschlechtsgesunder Tiere höher (Hasler et al., 1983). Bowen et al. (1978) und Hasler et al. (1987) stellten jedoch keine signifikanten Unterschiede in den Anwachsrate der Embryonen von Spendertieren mit und ohne Reproduktionsprobleme fest, solange keine Abweichungen in der Embryonenmorphologie gegeben waren.

Der Zeitpunkt der ersten FSH-Injektion bei Spendertieren, die zwischen dem 8. und 14. Zyklustag zu stimulieren begonnen werden, übt keinen Einfluss auf die resultierenden Trächtigkeitsraten aus (Hasler et al., 1987). Trächtigkeitsraten werden ebenfalls nicht signifikant beeinflusst von der Superovulationsreaktion eines Donoren, jedoch sind sie am höchsten bei Tieren, die zwischen 16 und 25 Embryonen liefern (Hasler et al., 1987).

### **3.2. Bedeutung im Rahmen der Tiefgefrierkonservierung von Embryonen**

Die schlechte Voraussagbarkeit der Embryonenproduktion eines Spendertieres, die Notwendigkeit der Donor-Rezipienten-Brunstsynchrisation, sowie die oftmals begrenzte Anzahl an Empfängertieren machen es notwendig, die gewonnenen Embryonen über einen längeren Zeitraum zu konservieren (Hasler, 1992). Die Tiefgefrierkonservierung ermöglicht es, Embryonen, die nicht sofort übertragen werden können, noch zu einem späteren Zeitpunkt zu verwenden. Die Trächtigkeitsraten liegen nach dem Transfer von tiefgefrorenen (58,4 %) niedriger als nach der Übertragung von frischen (68,3 %) Embryonen (Hasler, 2001) (s.a. Abb. 14).

Es ist notwendig, die für die Kryokonservierung in Frage kommenden Embryonen auf ihre Qualität hin zu untersuchen, um die Effizienz dieser Technik zu garantieren. Die Überlebensraten nach Kryokonservierung werden durch die Embryonenqualität beeinflusst. 94,4 % von als „sehr gut“ beurteilten Embryonen waren in einer Untersuchung von Niemann

(1989) nach dem Auftauen vital, während die als „gut“ beurteilten Embryonen nur zu 77,2 % überlebten. Sowohl die In-vitro-Entwicklung als auch die Trächtigkeitsraten korrespondieren mit der qualitativen Embryonenbeurteilung vor dem Tiefgefrieren und nach dem Auftauen (s.a. Tab. 6 und 7). Das Tiefgefrieren kann somit ebenfalls zur Beurteilung der Embryonenqualität genutzt werden (Furnos et al., 1998) und die Ergebnisse der Tiefgefrierkonservierung spiegeln somit indirekt die Beurteilung der morphologischen Embryonenqualität wider.

Tab. 6: Embryonenqualität vor dem Tiefgefrieren und Trächtigkeitsraten (Niemann, 1989)

Beurteilung vor Tiefgefrieren	Trächtigkeitsraten
Sehr gut	41,7 %
Gut	15,0 %

Tab. 7: Embryonenqualität nach dem Auftauen und Entwicklungsfähigkeit in vitro und in vivo (Niemann, 1989)

Beurteilung nach Auftauen	In-vitro-Entwicklung	Trächtigkeitsraten
Sehr gut	93,8 %	38,1 %
Gut	62,5 %	30,9 %
Mäßig	33,3 %	40,0 %

Die Gefrierempfindlichkeit von Embryonen hängt von ihrem Entwicklungsstand und von den Konditionen, unter welchen sie sich entwickelt haben, ab (Pollard und Leibo, 1994). Blastozystenstadien sind weniger empfindlich beim Tiefgefrieren (Lehn-Jensen und Greve, 1978) bzw. Kühlen (Trounson et al., 1976; Pollard und Leibo, 1994) und somit besser geeignet für die Kryokonservierung als die jüngeren Morulastadien. In einer Untersuchung von Niemann (1989) wurden bei Morulae signifikant bessere Überlebensraten festgestellt als bei expandierten Blastozysten (90 % vs. 78,4 %).

Auch wurden Unterschiede in der Gefrierempfindlichkeit zwischen in vitro- und in vivo-produzierten Embryonen beobachtet, welche vermutlich auf Unterschiede in der Zusammensetzung der Membranen zurückzuführen sein könnten (Pollard und Leibo, 1994). Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an intrazellulären Lipiden und der Kühl- bzw. Gefrierempfindlichkeit von (in vitro produzierten) Rinderembryonen (Leibo et al., 1993).

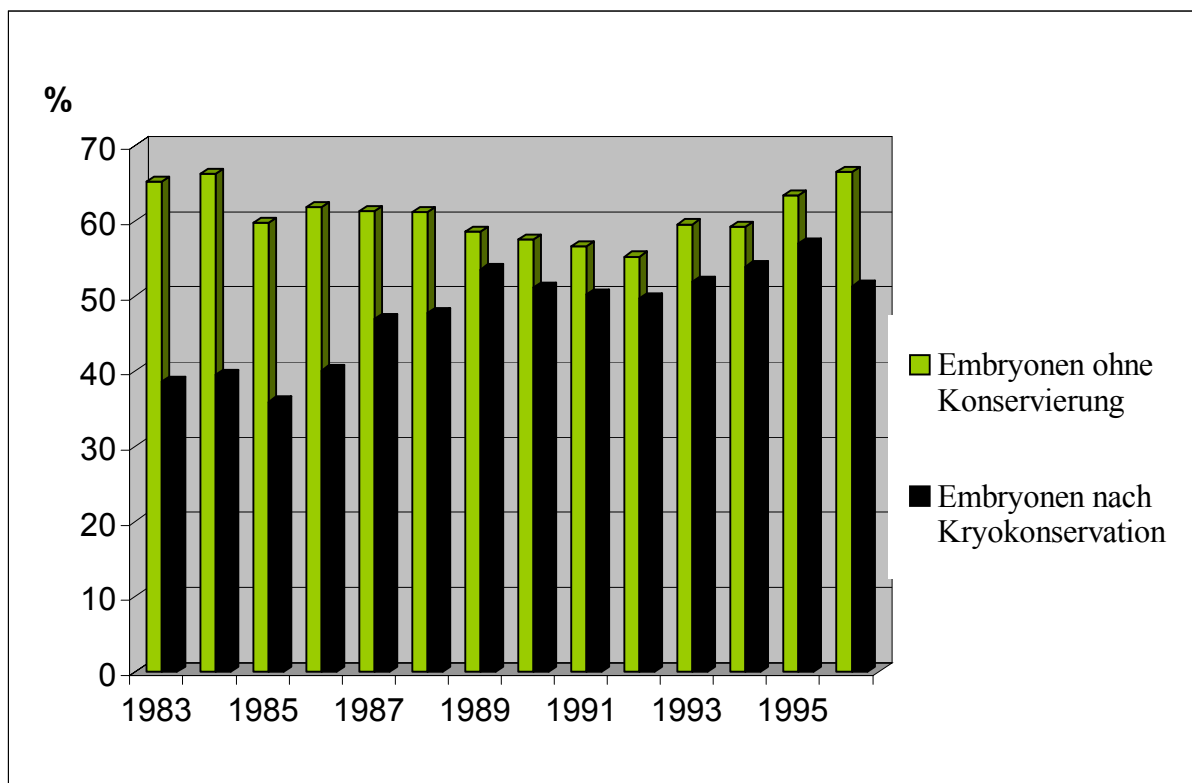


Abb. 14: Vergleich der Trächtigkeitsraten (in %) nach dem Transfer von frischen und kryokonservierten Embryonen (Quelle: Bericht der Arbeitsgemeinschaft der Besamungsstationen in Bayern e.V. 1999)

## **4. Beurteilungsmöglichkeiten für Embryonen**

### **4.1. Embryonenqualität: Definition und Einteilung**

Die Qualität eines Embryos kann als dessen Fähigkeit, zu einer Trächtigkeit zu führen, definiert werden (Shea, 1981). Kauffold und Thamm (1985) beschrieben den Zustand eines Embryonen anhand morphologischer Zustandskriterien, die eine physiologische Entwicklung oder davon abweichende Zustände kennzeichnen und Hinweise auf die vorhandene, eingeschränkte oder fehlende Entwicklungsfähigkeit geben. Damit werden Rinderembryonen entsprechend ihrer Qualität in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Die qualitative Klassifizierung ist Grundlage der Entscheidung über die spätere Verwendung der Embryonen (Kauffold und Thamm, 1985). Man versucht dadurch, die daraus resultierenden Trächtigkeiten besser vorhersagen zu können, da die Trächtigkeitsraten v.a. durch diesen Faktor beeinflusst werden (Shea et al., 1976) (s.a. 3.1.1.1.). Es wurden viele verschiedene Systeme zur Klassifizierung von Embryonen entwickelt, wobei sehr unterschiedliche Abstufungen benutzt werden (Robertson und Nelson, 1991). Im Folgenden werden die zwei bedeutendsten Einteilungen („4- und 6-Klassen-System“) gesondert von den zahlreichen anderen Schemata dargestellt.

#### **4.1.1. „4-Klassen-System“**

Ein grobes Schema zur qualitativen Klassifizierung von Rinderembryonen wurde von Lindner und Wright (1983) entwickelt. Sie teilten Rinderembryonen in vier Qualitätsklassen ein:

- „sehr gut“: Ein „idealer“ Embryo: rund und symmetrisch mit in Größe, Farbe und Struktur einheitlichen Zellen bzw. Blastomeren.
- „gut“: Embryo mit geringfügigen Abweichungen, z.B. mit einigen ausgeschleusten Blastomeren, unregelmäßiger Form oder einigen Vesikeln.
- „mäßig“: Es bestehen gut zu erkennende Veränderungen der morphologischen Struktur, wie z.B. ausgeschleuste Blastomeren, Vesikulation oder einige degenerierte Zellen.
- „schlecht“: Schwerwiegende Veränderungen sind vorhanden, wie z.B. zahlreiche ausgeschleuste Zellen, unterschiedlich große Zellen, eine große Anzahl von Vesikeln, aber mit einer lebensfähig erscheinenden Embryonenmasse.



Um die Qualitätsklassen präziser zu definieren, wurde von der I.E.T.S. ein weiter entwickeltes Klassifizierungsschema entwickelt (s.a. Tab. 8). Hierbei wurden die toten, degenerierten und unbefruchteten Embryonen mit berücksichtigt. Es stellt das heute gebräuchliche Schema zur Einteilung der Qualität von Rinderembryonen dar.

Tab. 8: Einteilung der Qualitätsklassen durch die I.E.T.S. (Robertson und Nelson, 1991)

Klasse	Bezeichnung	Definition
1	Sehr gut oder gut	Symmetrischer und runder Embryo mit einzelnen in Größe, Farbe und Dichte einheitlichen Blastomeren (Zellen). Dieser Embryo stimmt mit dem erwarteten Entwicklungsstadium überein. Mindestens 85 % des zellulären Materials sollte intakt und lebensfähig sein. Diese Einteilung sollte auf dem prozentualen Anteil der Embryonenzellen, gemessen am ausgeschleusten Material im perivitellinen Spalt, bestimmt werden. Die Zona pellucida sollte dünn sein und keine konkaven oder flachen Oberfläche besitzen, was dem Embryo die Adhäsion an der Wand einer Petrischale oder einer Paillette ermöglichen könnte.
2	mäßig	Mäßige Abweichungen in der groben Form des Embryos oder in der Größe, Farbe und Dichte einzelner Zellen. Mindestens 50 % des zellulären Materials sollte intakt und lebensfähig sein.
3	schlecht	Große Abweichungen in der Form des Embryos oder in der Größe, Farbe und Dichte einzelner Zellen. Mindestens 25 % des zellulären Materials sollte intakt und lebensfähig sein.
4	tot oder degeneriert	Degenerierte Embryonen, Oozyten oder 1-Zell-Embryonen: nicht lebensfähig

#### **4.1.2. „6-Klassen-System“**

Seidel und Seidel (1977) teilten die Embryonen in sechs Qualitätsklassen ein:

- „Sehr gut“: Ein perfekter Embryo im erwarteten Entwicklungsstadium.
- „Gut“: Es sind Triviale Abweichungen in der Morphologie vorhanden, wie z.B. eine ovale Zona pellucida, einige kleine ausgeschleuste Zellen oder eine leicht unregelmäßige Form.
- „Mäßig“: Definitive aber nicht starke Abweichungen, wie z.B. eine geringe Anzahl ausgeschleuster Zellen, kleine Größe, ein kleiner degenerierter Anteil oder bis zu einem Tag in der Entwicklung retardiert.
- „Schlecht“: Beträchtlich degeneriert, einige vesikulierte Zellen, große Unterschiede in der Zellgröße, nicht abgeschlossene Kompaktierung, sehr klein und/oder in der Entwicklung 2 Tage retardiert.
- „Degeneriert“: Stark degeneriert, nicht transfertauglicher Embryo.
- Unbefruchtete Eizellen und 1- bis 3-Zeller

#### **4.1.3. Andere Klassifizierungen**

Unter praxisbezogenen Gesichtspunkten ist es relevant, transfertaugliche von nichttransfertauglichen Embryonen zu differenzieren. Dies stellt das einfachste Schema zur Klassifizierung der Embryonenqualitäten dar. Boos et al. (1989) bezeichneten Morulae oder Blastozysten, die keine oder nur geringgradige Defekte aufwiesen, als transfertauglich. Alle anderen Embryonen wurden von diesen Autoren als degeneriert oder als nicht befruchtete Eizellen eingestuft.

Durch Berücksichtigung von Degenerationserscheinungen und morphologischen Abweichungen lässt sich eine weitere Unterteilung vornehmen. Hasler et al. (1987) und Nelson et al. (1982) teilten die Embryonen in drei Kategorien ein: Als „gut“ wurden Embryonen ohne größere morphologische Defekte bezeichnet und „mäßige“ Embryonen haben offensichtliche Defekte aufzuweisen, wie z.B. zahlreiche ausgeschleuste Zellen, Vesikulation oder einige degenerierte Blastomeren. „Schlechten“ Embryonen sind oft in ihrer Entwicklung retardiert und mehr als 50 % der Zellen sind degeneriert.

Hasler et al. (1987) entwickelten ein Schema, bei dem nichttransfertaugliche Embryonen in Qualitätsklasse V zusammengefasst wurden. In Klasse I wurden Embryonen, welche dem erwarteten Entwicklungsstadium entsprechen und die keine feststellbaren Defekte aufwiesen, eingeteilt. Geringfügige Defekte führten zur Einteilung in Klasse II, Embryonen mit offensichtlichen Abweichungen, wie z.B. zahlreiche ausgeschleuste Zellen, Vesikulation und/oder einige degenerierte Blastomeren teilten diese Autoren in Klasse III ein. Wurde 40 % oder mehr Degeneration beobachtet, die Zellmasse dennoch als lebensfähig beurteilt, oder waren die Embryonen in ihrer Entwicklung zurückgeblieben, führte dies zur Klassifizierung in Qualitätsklasse IV.

Van Soom et al. (1997b) teilten die Embryonen nach dem Grad der Fragmentierung ein. Embryonen ohne Fragmentation wurden als „sehr gut“ beurteilt. Bis 25 % Fragmentation wurde noch als „gut“, 25-50 % als „mäßig“ und über 50 % als „schlechte“ bezeichnet. Kauffold und Thamm (1985) teilten die Embryonen u.a. anhand des Anteils an freien, defekten oder retardierten Blastomeren in fünf Kategorien ein (s. a. Tab. 9).

Tab. 9: Einteilung in Qualitätsklassen nach Kauffold und Thamm (1985)

		Anteil an freien, defekten oder retardierten Blastomeren
Klasse 0	unbefruchtete Eizellen	
Klasse 1	sehr gute bis gute Qualität	< 5 %
Klasse 2	mäßige Qualität	5 – 10 %
Klasse 3	geringe Qualität	< 50 %
Klasse 4	schlechte Qualität	< 50 %

Boland et al. (1978) verglichen die morphologische Erscheinung der mittels Superovulation gewonnenen Rinderembryonen mit der von nicht hormonell behandelten Tieren und teilten sie anhand der Abweichungen davon in drei Klassen ein. Als „normal“ wurden dabei Embryonen bezeichnet, die dem erwarteten Entwicklungsalter entsprachen und deren Blastomeren eine gut definierte äußere Grenze aufwies. Wurden Abweichungen in der Morphologie und/oder dem Entwicklungsstand festgestellt, führte dies je nach Ausmaß zur Klassifizierung „geringe Abnormalitäten aufweisend“ oder „große Abnormalitäten aufweisend“. Verschwommene äußere Begrenzungen der Blastomeren oder ein geringer Anteil degenerierter Blastomeren, die z.B. Granulation oder Fragmentation aufweisen, stellten lediglich „geringe „Abweichungen“ dar, während Embryonen, welche in der Degeneration so weit fortgeschritten waren, so dass die genaue Zuordnung zu einem Teilungsstadium unmöglich geworden ist und die Blastomerenmembran nicht bzw. kaum sichtbar waren, als „große Abnormalitäten“ eingestuft wurden.

Auch Shea (1981) teilte die Embryonen anhand eines Vergleiches mit einer „durchschnittlichen Erscheinung“ in vier verschiedene Klassen ein, wobei Qualitätsklasse 3 diese „durchschnittliche Erscheinung“ repräsentiert. Embryonen mit überdurchschnittlicher Erscheinung, d.h. mit perfekt symmetrischer Form, gleichmäßiger Granulation und ohne sichtbare Deformierungen der Zona pellucida und ohne ausgeschleuste Blastomeren wurden in Klasse 4 eingestuft. Eine unterdurchschnittliche Morphologie der Embryonen, d.h. mit ungleich großen Blastomeren, ausgeprägter Ausschleusung von Blastomeren und Spuren von Membranrupturen führte zur qualitativen Abwertung und Einteilung in Klasse 2, Qualitätsklasse 1 wurde nicht genauer definiert.

Andere Autoren berücksichtigten bei der qualitativen Beurteilung von Rinderembryonen neben der morphologischen Beschaffenheit v.a. den embryonalen Entwicklungsstand. Greve et al. (1979) teilten die Embryonen in vier Kategorien ein:

- Klasse 1: Embryonen mit normaler Entwicklung (frühe Morula bis expandierte Blastozyste)
- Klasse 2: Embryonen mit verzögerter Entwicklung (4 bis 16 Zellen)
- Klasse 3: Degenerierte Embryonen
- Klasse 4: Unbefruchtete Eizellen

Elsden et al. (1978) differenzierten das „6-Klassen-System“ nach Seidel und Seidel (1977) noch weiter anhand der zeitlichen Definition des erwarteten Entwicklungsstandes. „Sehr gute“ Embryonen zeigen hierbei eine normale Entwicklung und „gute“ sind lediglich leicht retardiert. Stehen die Embryonen in ihrer Entwicklung 1 bis 2 Tage hinterher, klassifizierten die Autoren diese als „mäßige Qualität“. Als „schlecht“ wurden sie bezeichnet, wenn sie in ihrer Entwicklung 2 oder mehr Tage zurückgeblieben waren.

Eine weitere Einteilung anhand des Entwicklungsstandes wurde von Niemann et al. (1981b) getroffen. Sie teilten in 4 Gruppen ein, wobei in Gruppe 1 und 2 die Embryonen, welche dem Entwicklungsstand entsprechen, zusammengefasst wurden und durch morphologische Kriterien weiter differenziert werden. Zur Gruppe 3 wurden Embryonen gerechnet, die dem Entwicklungsstand nicht entsprachen (bis max. 16 Zellen) mit und ohne morphologisch erkennbare Abnormalitäten, in Gruppe 4 wurden die unbefruchteten Eizellen eingeteilt.

## **4.2. Beurteilungskriterien**

Die gebräuchlichste Methode zur Beurteilung der Lebensfähigkeit von Rinderembryonen ist die morphologische Beurteilung unter dem Mikroskop bei entsprechender Vergrößerung. Nach Niemann (1986) ist das Entwicklungsstadium, in dem sich die Embryonen befinden, das wichtigste Kriterium.

### **4.2.1. Morphologie**

Die Embryonen superovulierter Rinder weisen öfter morphologische Abnormitäten auf als Embryonen unbehandelter Rinder (Boland et al., 1978). Nach Schrifttumsangaben können nur etwa 60 % bis 70 % der gewonnenen Rinderembryonen als entwicklungsfähig angesehen werden (Niemann, 1986), 13-30 % der Eizellen superovulierter Kühe sind unbefruchtet (Greve et al., 1978) und durchschnittlich 25-30 % degeneriert und/oder in der Entwicklung zurückgeblieben (Schilling et al., 1980). Die am häufigsten beobachteten morphologischen Abweichungen bei Embryonen, die von superovulierten Rindern gewonnen werden, sind Defekte der Blastomerenmembranen (Boland et al., 1978). Seltener treten atypische Embryonen auf, die – sofern es sich um Blastozysten handelt – durch Abweichungen oder Missbildungen im Bereich von Embryo- und Trophoblast gekennzeichnet sind (Kauffold und Thamm, 1985).

Kauffold und Thamm (1985) unterscheiden zwischen Primär- und Folgeschäden. Primärdefekte umfassen alle am nativen Objekt nicht feststellbare Schäden, wie z.B. Chromosomen- oder Befruchtungsanomalien. Es muss also immer damit gerechnet werden, dass Embryonen morphologisch intakt sind, jedoch aber verborgene letale Defekte tragen können sind. Dieses Risiko ist allerdings nicht so groß, da die natürliche Selektion defekter Embryonen bereits vor der Bildung der Blastozyste beginnt; der Übergang von Morula zur Blastozyste gilt als besonders kritischer Schritt. An Tag 7, dem bevorzugten Tag für die Embryonengewinnung, sind bereits viele nicht entwicklungsfähige Embryonen an den Folgeschäden deutlich erkennbar (Kauffold und Thamm, 1985).

Zur morphologischen Zustandsbeurteilung werden die Embryonen nach ihrer Gewinnung unter einem Stereomikroskop aufgesucht und bei 50- bis 125-facher Vergrößerung anhand des Entwicklungsstandes und ihrer Morphologie beurteilt (Schilling et al., 1980). Morphologische Kriterien bei der Embryonenbeurteilung sind Umfang, Färbung, Anordnung der Zellen, Größe des perivitellinen Spaltes (PVS), Zahl und Größe von Vesikeln, sowie das Aussehen der Zona pellucida (Niemann, 1986). Insbesondere wird auf die Morphologie der Blastomeren (Lysis, Vakuolisierung, Unterschiede in Größe und Form) und die allgemeine Beschaffenheit des Embryonalgewebes und seiner Grenzlinie zur Zona pellucida (Schilling et al., 1980) geachtet. Der ideale Embryo sollte kompakt und rund, mit Zellen von gleicher Größe und einheitlicher Färbung sein, die Zona pellucida eben und gleichmäßig geformt und der perivitelline Saft Raum mit einem regelmäßigen Durchmesser und ohne Einschlüsse sein (Niemann, 1986). Je älter ein Embryo ist, desto schwieriger ist er morphologisch auf seine Qualität hin zu beurteilen (Donaldson, 1985). Die vielzelligen Morulastadien sind wegen ihrer komplizierten Struktur nur sehr unsicher zu beurteilen (Schilling, 1980).

#### **4.2.1.1. Größe und Form**

Rinderembryonen sollten in ihrer Form rund bis eiförmig (Seidel und Seidel, 1977) bzw. symmetrisch rund (Robertson und Nelson, 1991) sein. Der ideale Embryo sollte kompakt und rund und mit Zellen von gleicher Größe sein (Niemann, 1986). Eine asymmetrische Form führt zu qualitativen Abwertung (Elsden et al., 1978), leichte Unregelmäßigkeiten werden toleriert (Seidel und Seidel, 1977). Der Durchmesser der Embryonen sollte zwischen 150 und 190 µm liegen (Lindner und Wright, 1983).

#### **4.2.1.2. Farbe und Transparenz**

Rinderembryonen sollten nicht zu hell oder zu dunkel in der Farbe sein (Seidel und Seidel, 1977), die Färbung sollte insgesamt einheitlich sein (Niemann, 1986). Zeigen die Embryonen eine dunklere oder hellere Farbe als morphologisch unauffällig eingestufte Embryonen, wird die Qualität als „mäßig“ bezeichnet (Elsden et al., 1978). Die Durchsichtigkeit der Embryonen ist ohne besondere optische Hilfsmittel jedoch kaum abzustufen; extraembryonale Blastomeren fallen durch eine dunklere Farbe auf (Kauffold und Thamm, 1985).

#### **4.2.1.3. Zellverband**

##### **4.2.1.3.1. Blastomeren**

Bei der visuellen Embryonenbeurteilung werden die Morphologie (Schilling et al., 1980), die Anordnung (Niemann, 1986), Umfang und Färbung der Zellen (Niemann, 1986), die Vakuolisierung und die Unterschiede in Größe und Form (Schilling et al., 1980) beurteilt. Als nicht lebensfähig beurteilt werden Embryonen, die ein Zellmaterial aufweisen, welches sehr stark in seiner Erscheinung variiert, von einer unförmigen opaken Masse bis hin zu einer kompakten Masse (Boland et al., 1978).

Die Blastomeren sollten in Größe, Farbe und Dichte einheitlich sein (Robertson und Nelson, 1991). Größenunterschiede von bis zu 2:1 sind jedoch als normal zu bewerten (Kauffold und Thamm, 1985) weil die Embryonen gelegentliche während des Ablaufes der Teilungszyklen zur Untersuchung gelangen. Stärkere Größenunterschiede (4:1 und größer) entstehen, wenn einzelne Blastomeren ihre Teilungsaktivitäten einstellen. Schrumpfung der Blastomeren ist meist Folge hypertotonischer Belastungen (Kauffold und Thamm, 1985). Die Blastomeren sollten eine polygonale Form aufweisen und im Stadium der Morula eine sehr dicht aneinanderliegende Masse bilden (Elsden et al., 1978). Exakt runde Blastomeren führen nach Elsden et al. (1978) zur Einstufung in die Qualitätsklasse „mäßig“. Deformationen entsteht bei verändertem Innendruck der Zellen bzw. im Ergebnis von Defekten an Zellmembranen (Kauffold und Thamm, 1985). Bei späteren Morulae bleibt die Beurteilung der Blastomeren auf die randständigen Zellen beschränkt (Kauffold und Thamm, 1985). Embryonen mit einigen abgestorbenen Blastomeren kommen sehr häufig vor (Kauffold und Thamm, 1985), was jedoch mit den gewöhnlichen Mikroskopen kaum erkannt werden kann (Schilling, 1980). Embryonen mit derartigen Teilschädigungen entwickeln sich nur in ganz wenigen Fällen weiter (Schilling, 1980). Das Absterben einzelner Blastomeren kann in jedem beliebigen Entwicklungsstadium auftreten (Shea, 1981), solange einige Blastomeren sich jedoch physiologisch weiterentwickeln, kann ein solcher Embryo dennoch eine Trächtigkeit produzieren (Seidel und Seidel, 1977; Shea, 1981). Defekte Blastomeren werden meist aus dem intakten Zellverband ausgeschleust und erscheinen als extraembryonales Zellmaterial (Kauffold und Thamm, 1985). Andere Autoren sahen einzelne sich nicht weiterentwickelnde Blastomeren nicht unbedingt als Qualitätsmangel an (Seidel und Seidel, 1977) und konnten keinen Einfluss einzelner abgestorbener Blastomeren auf die Trächtigkeitsraten feststellen (Shea, 1981).



#### **4.2.1.3.2. Ausgeschleuste Blastomeren; extraembryonales Zellmaterial**

Ausgeschleuste Blastomeren führen zu einer qualitativen Abwertung der Embryonen (Shea, 1981; Nelson et al., 1982; Hasler et al., 1987), jedoch haben diese Embryonen eine sehr gute Chance, eine Trächtigkeit zu produzieren, wenn sich der Großteil der Zellen normal weiterentwickelt (Seidel und Seidel, 1977). Fast 20-30 % der „guten“ Embryonen weisen einige ausgeschleuste Blastomeren auf (Seidel und Seidel, 1977).

Kauffold und Thamm (1985) bezeichnen Embryonen, bei denen sich lediglich ein Teil der Zellen weiterentwickelt, andere jedoch degenerieren, als Teilembryonen. Teilmorulae und Teilblastozysten entstehen, wenn neben den intakten noch wechselnde Anteile defekter Blastomeren vorkommen, welche außerhalb des kompaktierten Verbandes der intakten Blastomeren liegen. Mehr oder minder umfangreiche Ansammlungen von Zellmaterial im perivitellinen Spalt (PVS) entstehen beim Zellverfall und sind die Reste dieser schadhafte Blastomeren. Da Blastomeren mit Defekten während der Furchung in unterschiedlicher Anzahl und zu verschiedenen Zeitpunkten entstehen bzw. ihre Teilung einstellen, können vielfältige Formen und Größen entstehen. Gleichgroß sind die defekten Blastomeren, wenn sie nur während eines Teilungsschrittes auftreten und aus der Entwicklung ausscheiden, unterschiedlich große Defektblastomeren erscheinen dagegen, wenn sich der Vorgang der Ausschleusung während mehrerer Furchungsteilungen wiederholt (Kauffold und Thamm, 1985).

#### **4.2.1.3.3. Zellgrenzen**

Die am häufigsten beobachteten morphologischen Abweichungen bei den Embryonen superovulierter Rinder sind Defekte an den Blastomerenmembranen, die erst im Morulastadium sichtbar werden (Boland et al., 1978). Spuren von Membranrupturen führen zur qualitativen Abwertung der Embryonen (Shea, 1981). Embryonen mit verschwommenen äußeren Begrenzungen ihrer Blastomeren werden als „geringe Abnormalitäten aufweisend“, und mit kaum sichtbarer bzw. nicht vorhandener Blastomerenmembran als „große Abnormalitäten aufweisend“ eingestuft (Boland et al., 1978).

#### **4.2.1.4.    Blastozoe, Embryoblast und Trophoblast**

Bei der Entwicklung der Blastozyste wird das Blastozoe etwa an Tag 7 geformt. Sie entsteht durch Ansammlung der von den Blastomeren sezernierten Flüssigkeit (Shea, 1981). Mit der weiteren Entwicklung an Tag 8 dehnt sich die Blastozystenöhle aus (expandiert) und die Zellen beginnen sich zu Zellen der inneren Zellmasse und Trophektodermzellen zu differenzieren (Shea, 1981).

Bei expandierten Blastozysten kann eine geschrumpfte (kollabierte) Blastozystenöhle auf eine Schädigung der Zona pellucida hinweisen (Shea, 1981). Das Kollabieren des Blastozoels geschieht häufig in dem Zeitraum, in dem die Embryonen bis zum Transfer gelagert werden oder während sich die Embryonen noch im Spülmedium befinden. Dieser Zustand kann als unmittelbare Folge einer Funktionsstörung im Trophoblastenbereich angesehen werden, ist jedoch zumeist reversibel (Kauffold und Thamm, 1985). Wenn gleichzeitig eine deutliche Desaggregation von Trophoblastzellen nachgewiesen wird, ist die Reexpansion der Blastozystenöhle nicht zu erwarten (Kauffold und Thamm, 1985). Missbildungen am Trophoblasten treten selten auf, die diagnostische Bedeutung einer unscharfen Abgrenzung der inneren Zellmasse gegen den Trophoblasten ist noch unsicher (Kauffold und Thamm, 1985).

#### **4.2.1.5.    Grad der Kompaktierung und Perivitelliner Spalt (PVS)**

Morphologische Kriterien bei der Embryonenbeurteilung sind u.a. auch die Größe des perivitellinen Raumes (Niemann, 1986). Bei einem normal entwickelten Embryo sollte der perivitelline Raum mit einem regelmäßigen Durchmesser und ohne Einschlüsse sein (Niemann, 1986). Mehr oder minder umfängliche Ansammlungen von Zellmaterial im PVS entstehen beim Zellverfall und sind die Reste schadhafter Blastomeren; das Ausfließen von Zytoplasma in den perivitellinen Spalt kann auf lytische Vorgänge oder defekte Blastomerenmembranen zurück zu führen sein (Kauffold und Thamm, 1985).

Die Kompaktierung der Morula ist eine Voraussetzung zur Bildung einer Blastozystenöhle (Van Soom et al., 2001), sie kann als eine progressive Zunahme in der Komplexität der interzellulären Adhäsionssysteme (Tight junctions und Punkt-Desmosomen) der Zellen

definiert werden (Van Soom et al., 2001). Eine nicht eingetretene Kompaktierung bei späten Morulae kann daher als qualitativer Mangel angesehen werden. Seidel und Seidel (1977) teilten die Embryonen mit nicht abgeschlossener Kompaktierung in die Qualitätsklasse „schlecht“ ein.

#### **4.2.1.6. Zona pellucida**

Die Zona pellucida (ZP) ist eine extra-zelluläre Matrix, welche die Oozyte und den jungen Embryo umgibt (Seidel und Seidel, 1977). Sie besitzt Rezeptoren für Spermien, welche nach der Befruchtung inaktiviert sind und hält die Zellen der präkompaktierten Embryonen zusammen und schützt diese jungen Zellen vor dem Immunsystem und Pathogenen (Seidel und Seidel, 1977). Bei der mikroskopischen Beurteilung der Embryonen sollte neben dem Aussehen der ZP (Niemann, 1986) auch auf die Grenzlinie des Embryonalgewebes zur ZP (Schilling et al., 1980) geachtet werden. Die Zona sollte eben und gleichmäßig geformt, der perivitelline Raum sollte einen regelmäßigen Durchmesser besitzen und frei von Einschlüssen sein (Niemann, 1986). Bei der morphologischen Embryonenbeurteilung wird darauf geachtet, dass die Zona pellucida dünn ist, maximal 12 - 15 µm in ihrer Stärke (Lindner und Wright, 1983), und keine konkave oder flache Oberfläche besitzt, was dem Embryo die Adhäsion an der Wand einer Petrischale oder einer Paillette ermöglichen könnte (Robertson und Nelson, 1991).

Zonarisse bei Morulae und frühen Blastozysten sind morphologische Abweichungen vom Normalzustand (Kauffold und Thamm, 1985) und führen zur qualitativen Abwertung der Embryonen. Wird die ZP von präkompaktierten Embryonen entfernt, gehen die Zellen während des Embryotransfers verloren und degenerieren anschließend (Seidel und Seidel, 1977). Bei der Anwendung der Tiefgefrierkonservierung haben Embryonen mit Zonarissen verminderte Überlebenschancen (Kauffold und Thamm, 1985). Experimentell wurde jedoch gezeigt, dass sich Rinderembryonen mit eröffneter Zona pellucida in der Zellkultur und nach Transfer weiterentwickeln, weshalb der allseitige Verschluss der Zona ohne nachweisbare funktionelle Bedeutung sein soll (Kauffold und Thamm, 1985). Immerhin weisen vorhandene Risse in der Zona auf die Einwirkung schädigender Faktoren hin, die auch andere, morphologisch nicht nachweisbaren Defekte zur Folge haben könnten. Zonarisse können die Übertragung von Krankheitserregern, wie z.B. des BVD-Virus begünstigen (Stringfellow und

Givens, 2000), weshalb tierseuchenrechtlich vorgeschrieben ist, dass die für den Export bestimmten Embryonen eine intakte ZP aufweisen müssen und frei von anhaftendem Gewebe zu sein haben. In der Richtlinie 89/556/EWG, Anhang A ist die Untersuchung der Embryonen auf diese Kriterien bei 50-facher Vergrößerung vorgeschrieben.

Anzeichen für eine Schädigung der Zona pellucida bei expandierten Blastozysten ist eine geschrumpfte (kollabierte) Blastozystenhöhle; werden Embryonen kurz nach dem Schlüpfvorgang gewonnen, kann es sein, dass dieser Mangel expandierter Blastozysten übersehen wird und für einen physiologisch geschlüpften Embryo gehalten wird (Shea, 1981). Es ist möglich, dass diese Embryonen ihre Zona durch die Spülprozedur (Ruptur durch hydrostatischen Druck) verloren haben (Shea, 1981). Keinen Einfluss auf die Trächtigkeitsraten hat an der Zona pellucida anhaftendes Material (Shea, 1981). Partikel an der Oberfläche der Zona pellucida deuten jedoch auf die Möglichkeit einer bakteriellen Kontaminierung hin (Kauffold und Thamm, 1985).

#### **4.2.1.7. Degeneration, Lysis, Vakuolisierung und Fragmentation**

Degenerierte Embryonen als solche zu diagnostizieren ist schwierig und von verschiedenen Untersuchern werden unterschiedliche Kriterien zugrundegelegt (Church und Shea, 1976; Seidel und Seidel, 1977; Elsden et al., 1978; Boland et al., 1978; Greve et al., 1979; Shea, 1981; Niemann, 1986; Lindner und Wright, 1983; Robertson und Nelson, 1991).

Degenerationsprozesse laufen zudem meist langsam ab, indem zunächst einzelne Zellen degenerieren, was lichtmikroskopisch schwierig zu beurteilen ist (Schilling, 1980). Des öfteren kann es auch Schwierigkeiten bereiten, zwischen unbefruchteten Eizellen und degenerierten Embryonen zu unterscheiden (Seidel und Seidel, 1977). Als unbefruchtete Oozyten werden alle ungefurchten Oozyten angesehen, die z.T. auch Schrumpfungen oder lytischen Vorgängen unterlegen sind. Der fragmentarische Zerfall des Zytoplasmas unbefruchteter Eizellen kann zur Bildung von Pseudoblastomeren führen, was die sichere Abgrenzung zu degenerierten Embryonen erschwert (Kauffold und Thamm, 1985).

Embryonen, bei denen die Granulation oder Fragmentation beobachtet werden kann, werden von Boland et al. (1978) als „geringe Abnormalitäten aufweisend“ eingestuft. Es sollte eine

gleichmäßiger Granulation vorhanden sein (Shea, 1981). Hasler et al. (1987) und Nelson et al. (1982) teilten die Rinderembryonen in die Kategorie „mäßig“ ein, wenn eine offensichtliche Vesikulation zu beobachten ist. Umfang, Zahl und Größe der Vesikel sollten bei der morphologischen Embryonenbeurteilung beachtet werden (Niemann, 1986). Van Soom et al. (1997b) klassifizierten die Embryonen qualitativ nach dem Grad der Fragmentierung. Embryonen ohne Fragmentation wurden als „exzellent“ beurteilt. Ein Anteil von 25 % Fragmentation wurde noch als „gute“, 25-50 % als „mäßige“ und über 50 % als „schlechte Qualität“ klassifiziert.

#### **4.2.2. Entwicklungsstadium**

Der embryonale Entwicklungsstand ist das wichtigste visuell feststellbare Charakteristikum zur Beurteilung der Lebensfähigkeit (Shea, 1981) und ist ein zuverlässiger Indikator für die Lebensfähigkeit der Embryonen (Butler und Biggers, 1989). In den Spülflüssigkeiten superovulierter Rinder finden sich stets unterschiedliche Entwicklungsstadien (s.a. Tab. 10 und Abb. 15). Dafür gibt es mehrere Erklärungen (Betteridge et al., 1980). Einerseits erfolgen die Ovulationen der angebildeten Ovarfollikel nicht gleichzeitig, je mehr Follikel angebildet werden, desto länger ist der insgesamt Ovulationszeitraum (Purwata et al., 1993; Purwata et al., 1994), andererseits finden die Befruchtungen ebenfalls nicht synchron statt (Donaldson, 1984c). Sogar wenn zwei Oozyten exakt zum gleichen Zeitpunkt fertilisiert werden sollten, können sich die Teilungsgeschwindigkeiten der Zygoten immer etwas unterscheiden (Donaldson, 1986a). Der Großteil der an Tag 7 gewonnenen Rinderembryonen befindet sich im Entwicklungsstadium der späten Morula oder der frühen Blastozyste (Shea, 1981). Morulae bilden den größten Anteil bei den Embryonen, welche am Tag 6 und 6,5 gewonnen werden (Donaldson, 1986a). Je älter ein Embryo ist, desto schwieriger ist er morphologisch auf seine Qualität hin zu beurteilen (Donaldson, 1985), jedoch sind die vielzelligen Morulastadien wegen ihrer komplizierten Struktur ebenfalls sehr unsicher zu beurteilen (Schilling, 1980). Junge Morulae werden oft mit unbefruchteten Eizellen verwechselt (Seidel und Seidel, 1977), zudem bereitet es oft Schwierigkeiten, zwischen degenerierten Embryonen und unbefruchteten Eizellen zu unterscheiden (Kauffold und Thamm, 1985).

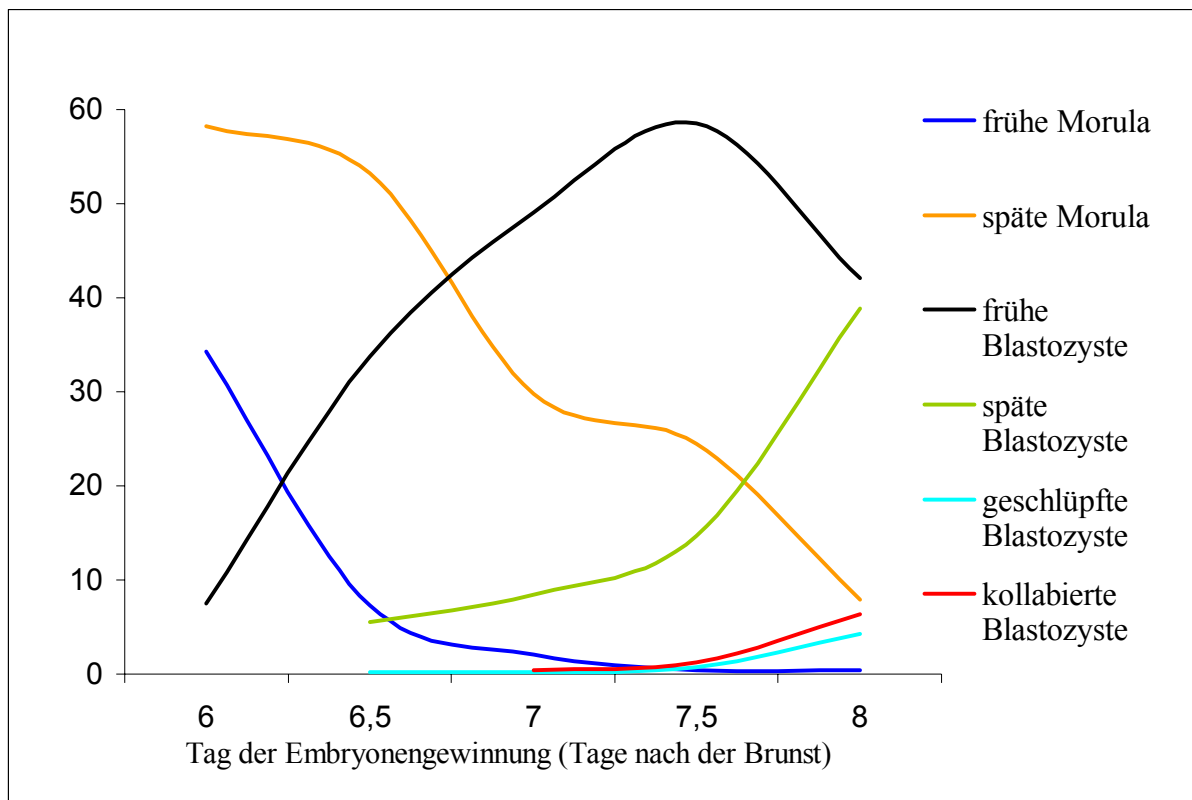


Abb. 15: Anteilmäßige Verteilung der embryonalen Entwicklungsstadien (Anteil in %) (modifiziert nach Donaldson, 1986a)

Es sollte beachtet werden, dass sich männliche Embryonen schneller entwickeln als weibliche (Avery, 1989; Avery et al., 1989; Avery et al., 1991; Xu et al., 1992). Diese Unterschiede in der Entwicklung sind bei in vitro produzierten Rinderembryonen signifikant, bei in vivo produzierten Rinderembryonen jedoch nur geringfügig (Avery et al., 1989), was vermutlich auf die begrenzte Anzahl der gewonnenen Embryonen und der asynchronen Ovulationen zurückgeführt werden kann (Avery et al., 1989). Die Ovulationen bei Gonadotropin-behandelten Tieren beginnen spätestens 24 Stunden nach Einsetzen der ersten Brunsterscheinungen, und nach 48 Stunden hat die erste Teilung bereits stattgefunden (Shea, 1981). 72 Stunden nach der Brunst weist der Embryo ca. 8 Zellen auf (Shea, 1981). Werden in den Spülflüssigkeiten von am Tag 7 gespülten Spendertieren Embryonen mit 8-12 Zellen gefunden, können verschiedene Ursachen dafür verantwortlich sein: 1. Die Embryonen sind degeneriert, 2. Die Ovulation war verzögert, 3. Die embryonale Entwicklung war stark verzögert (retardiert) (Shea, 1981). Fünf Tage nach der Brunst ist die Entwicklung zum 16- bis 32- Zellstadium fortgeschritten und der Embryo wird als Morula bezeichnet.

Ungünstige Milieubedingungen und Defekte verursachen die Verzögerung oder den Stillstand der Entwicklung (Kauffold und Thamm, 1985). Elsdon et al. (1978) klassifizierten Embryonen, die in ihrer Entwicklung um 24 Stunden zurückgeblieben sind, als „leicht retardiert“. Embryonen mit einem Entwicklungsrückstand von 48 Stunden oder mehr werden als „stark retardiert“ bezeichnet (Kauffold und Thamm, 1985). Retardierte Embryonen führen zu geringeren Trächtigkeitsraten als normal entwickelte (Schilling, 1980). Sind die Embryonen mehr als 24 Stunden in der Entwicklung zurückgeblieben, sind diese mit großer Wahrscheinlichkeit nicht mehr entwicklungsfähig und sollten nicht übertragen werden (Schilling, 1980). Bei der Beurteilung morphologisch intakter, aber retardierter Embryonen sollte jedoch der Zustand und das Entwicklungsstadium der anderen von demselben Spender gewonnenen Embryonen berücksichtigt werden (Kauffold und Thamm, 1985).

Tab. 10: Einteilung der embryonalen Entwicklungsstadien durch die I.E.T.S. (Robertson und Nelson, 1991)

Nr.	Entwicklungsstadium	Zeitliches Auftreten (Tage nach der Brunst)
1	Unbefruchtet / 1-Zeller	1
2	2- Zeller	2
2	4- Zeller	3
2	8- Zeller	4
2	16- Zeller	5
3	Frühe Morula	5-6
4	Morula	6
5	Frühe Blastozyste	7
6	Blastozyste	7-8
7	Expandierte Blastozyste	8-9
8	Geschlüpfte Blastozyste	9
9	Expandierte geschlüpfte Blastozyste	9-10

#### **4.3. Beurteilung der Weiterentwicklungsfähigkeit durch Kurzzeitkultivierung**

Die Beurteilung der Embryonenentwicklung in der Kultur kann als Indikator für die weitere Entwicklungsfähigkeit genutzt werden (Shea et al., 1976; Renard und Heyman, 1979; Schilling, 1980; Shea, 1981; Schilling et al., 1982; Kauffold und Thamm, 1985; Walker et al., 1992; Bavister, 1995). Lediglich Niemann (1989) konnte keinen Einfluss der Embryonenqualität auf die Entwicklung in der In-vitro-Kultur nachweisen.

Die Kurzzeitkultivierung ermöglicht eine auf morphologischen Kriterien basierende Selektion durch Eliminierung der Embryonen, welche sich nicht weiterentwickeln (Renard und Heyman, 1979). Die Einbeziehung einer kurzzeitigen Kultivierung in die Zustandsbeurteilung ist geeignet, die Klassifizierung in unklaren Fällen zu sichern und morphologisch veränderte, aber entwicklungsfähige Embryonen erkennen zu können (Kauffold und Thamm, 1985). Um sicher zu gehen, nur lebensfähige Embryonen zu übertragen, kann man die Embryonen etwa 18 bis 24 kultivieren; danach wird mikroskopisch überprüft, ob eine Weiterentwicklung erfolgt ist (Schilling, 1980). Schilling et al. (1982) beurteilten die Weiterentwicklung von Rinderembryonen in einer Kultur im PBS-Medium mit 20 % Kälberserum bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> über einen Zeitraum von 12 bis 18 Stunden. 85 % bis 90 % der als lebend beurteilten Embryonen entwickelten sich in der Kurzzeitkultur weiter, während die als abgestorben beurteilten Embryonen sich in keinem Falle weiter entwickelten.

Ein anderes, allerdings nicht für die Praxis des Embryotransfers geeignetes Verfahren zur Überprüfung der Weiterentwicklungsfähigkeit von Rinderembryonen besteht darin, die Embryonen in den Eileiter von Kaninchen zu übertragen (Boland, 1984). Hierzu kann man zyklische oder pseudogravide Kaninchen verwenden (Donaldson, 1984a). Nach der zwei- bis dreitägigen Kultur der Embryonen im ligierten Kanincheneileiter werden die Tiere getötet und die Embryonen in vitro zurückgewonnen oder sie werden ex vivo gespült und die Kaninchen erneut zur Embryonenkultivierung benutzt (Donaldson, 1984a). Zwischen „normalen“ und „geringgradig degenerierten“ Embryonen bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Weiterentwicklungsfähigkeit (Boland et al., 1978). Die Trächtigkeitsraten verringerten sich nach Kultivierung der Embryonen im Kanincheneileiter nicht, in einigen Fällen waren sie sogar höher, was auf die intensivere Selektion der Embryonen nach der Kultivierung im Eileiter zurückzuführen sein könnte (Donaldson, 1984a).



Die Selektion von Rinderembryonen durch Kurzzeitkultur erhöht einerseits den Aufwand und damit die Kosten für den Embryotransfer und andererseits muss mit dem Verlust eines bestimmten Prozentsatzes (15-30 %) der Embryonen bei Kultur im Eileiter (Boland, 1984; Butler und Biggers, 1989) oder mit einer Zunahme der embryonalen Mortalität bei in vitro-kultivierten Embryonen (Renard et al., 1980b) gerechnet werden. Schneider et al. (1980) stellten jedoch keine signifikanten Unterschiede bei Trächtigkeitsraten nach Transfer von kultivierten oder am selben Tag übertragenen Embryonen fest. Um Abstriche bei den Trächtigkeitsraten zu vermeiden, sollte die Dauer der Kultivierung in vitro 24 Stunden nicht überschreiten (Kauffold und Thamm, 1985).

Der Vorteil dieser Methode zur Beurteilung der Lebensfähigkeit liegt darin, dass Embryonen mit nur einem Teil abgestorbener Blastomeren, was sehr häufig vorkommt und mit den gewöhnlichen Mikroskopen kaum erkannt werden kann, identifiziert werden können. Ebenso können mit der Kurzzeitkultivierung morphologisch intakt erscheinende Embryonen mit eingeschränkter Entwicklungsfähigkeit erkannt werden.

#### **4.4. Fluoreszenzfärbungen zur Beurteilung der Embryonenqualität**

Mit den FDA- und DAPI- Fluoreszenzverfahren sind schnelle und hinreichende Tests für die Übertragungsfähigkeit von frischen und tiefgefrorenen Embryonen gegeben, welche die Lebensfähigkeit der Embryonen nicht beeinträchtigen, wenn die methodischen Bedingungen eingehalten werden (Schilling, 1980). Die DAPI- und FDA-Tests stellen eine wertvolle Hilfe bei der mikroskopischen Beurteilung der Entwicklungsfähigkeit von Embryonen vor dem Transfer dar (Niemann et al., 1981b) (s.a. Tab. 11). Bei der praktischen Anwendung der Fluoreszenztests erscheint es sinnvoll, diese parallel und vergleichend zur lichtmikroskopischen Beurteilung durchzuführen (Niemann et al., 1981b).

##### **4.4.1. 3'6'- Fluorescein-Diacetat (FDA, Diacetylfluorescein)**

Der Farbstoff FDA ist im veresterten Zustand eine farblose Substanz und fluoresziert erst nach Hydrolyse der Esterbindung durch entsprechende Hydrolasen (Rotman und Papermaster, 1966). Diese Enzyme kommen nur in lebenden Zellen vor, die Umwandlung des Farbstoffes in die fluoreszierende Form erfolgt also nur in intakten Blastomeren. Somit leuchten nur die lebenden Blastomeren (Schilling, 1982). Dieser Test untersucht damit sowohl die Esteraseaktivität, wie auch die Membranintegrität der Embryonen (Mohr und Trounson, 1980).

Die Embryonen werden 3 Minuten bei Raumtemperatur in der FDA-Lösung inkubiert und anschließend beurteilt (Renard et al., 1982). Unter einem Fluoreszenzmikroskop fluoreszieren lebende Embryonen oder einzelne Blastomeren grün, abgestorbene dagegen bleiben unsichtbar (Schilling, 1980) (s.a. Tab. 11). Die Ergebnisse entsprechen mit wenigen Ausnahmen den Resultaten der morphologischen Beurteilung (Renard et al., 1982). Bei 86,4% der FDA-positiven Embryonen konnten Metaphasen festgestellt werden, während FDA-negative Embryonen in keinem Falle mitotische Aktivität aufwiesen (Niemann et al., 1981b). Partiell fluoreszierende Embryonen zeigten nur in geringem Anteil (10-15 %) noch mitotische Aktivität (Niemann et al., 1981b). Renard et al. (1982) beobachteten eine signifikante Korrelation zwischen den Resultaten nach der FDA-Färbung und der Weiterentwicklung in vitro, sowie den Trächtigkeitsraten nach anschließendem Transfer der untersuchten Embryonen. Hell fluoreszierende Embryonen produzierten zu 75 % eine Trächtigkeit, während teilweise fluoreszierende nur zu 33 % zu einer Trächtigkeit führten.

Tab. 11: DAPI- und FDA-Fluoreszenztest (Schilling et al., 1979)

	Embryonen mit mitotischer Aktivität	FDA-Test
DAPI-positiv	0 %	negativ
DAPI-negativ	90 %	positiv
DAPI-partiell	25 %	partiell positiv

#### 4.4.2. 4'6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Hoechst 33324)

Diamidino-2-Phenyl-Indol (DAPI) ist ein nichttoxischer Farbstoff, welcher spezifisch an die DNA der Zellen bindet (Renard et al., 1982). Es fluoreszieren im Gegensatz zum FDA nur die toten Embryonen oder Blastomeren, weil dieser Farbstoff bei der angegebenen Konzentration und Inkubationszeit nur durch die Zellmembran abgestorbener Zellen eindringen kann und dort deren Kerne zum gelblichen Leuchten bringt (Schilling, 1989). Die Embryonen werden 3 Minuten bei Raumtemperatur in der DAPI-Lösung inkubiert und anschließend beurteilt (Renard et al., 1982). Lediglich bei 3,5 % der Embryonen wurden in einer Untersuchung von Renard et al. (1982) Abweichungen der Resultate gegenüber den Ergebnissen der morphologischen Beurteilung beobachtet. Metaphasen ließen sich bei 84,9 % der DAPI-negativen Embryonen feststellen. Bei teilweise fluoreszierenden Embryonen wurde noch bei 10 bis 15 % Teilungsaktivitäten beobachtet; die DAPI-positiven Embryonen zeigten nie mitotische Aktivität (Niemann et al., 1981b).

Die Anwendung dieses Fluoreszenzfarbstoffes ist weniger effektiv als die morphologische Beurteilung (Renard et al., 1982). Zwar leuchten alle als degeneriert eingestuft Embryonen, die als „gut“ beurteilten Embryonen, welche auch anschließend Trächtigkeiten produzierten bzw. sich in vitro weiterentwickelten, fluoreszierten jedoch auch zu 50 % (Renard et al., 1982). Werden die Farbstoffe FDA und DAPI miteinander kombiniert, erfolgt zunächst eine Inkubation mit dem DAPI und erst anschließend mit FDA (Schilling, 1980) (s.a. Tab. 11). Man kann neben dem leuchteten Zellplasma der lebenden Zellen die fluoreszierenden Kerne in den dunklen abgestorbenen Zellen ausmachen, wobei unter Umständen die Genauigkeit der Beurteilung noch weiter verbessert werden kann (Schilling, 1980).

#### **4.5. Metabolische Tests an Embryonen**

Die morphologische Beurteilung von Embryonen gibt keinen Aufschluss über deren Stoffwechselfähigkeit, durch die alleinige visuelle Beurteilung sind einige funktionelle Defekte nicht feststellbar. Die Messung von Stoffwechselfparametern kann die grobe morphologische Beurteilung ergänzen und die Selektion der Embryonen vor dem Transfer verbessern (Rondeau et al., 1995). Jede Methode zur Beurteilung der Lebensfähigkeit von Embryonen durch Ermittlung der Stoffwechselleistungen setzt voraus, dass die Tests empfindlich genug sein müssen, um den Metabolismus einzelner Embryonen erfassen zu können (Rieger, 1984).

Der Stoffwechsel früher Embryonen weist Besonderheiten auf, die Annäherung an die Vorgänge in Körperzellen geschieht allmählich (Kauffold und Thamm, 1985). Brenztraubensäure (Pyruvat) wird von Embryonen in frühen Furchungsstadien als energielieferndes Substrat bevorzugt. Glukose und Pyruvat stellen essentielle Energiesubstrate für Rinderembryonen dar (Takahashi und First, 1992), wobei Glukose jedoch erst nach dem Block-Stadium (Übergang vom 8- zum 16-Zellstadium) ein geeignetes Substrat für den Stoffwechsel darstellt. Bei Blastozysten steigen Aufnahme und Verwertung von Glukose zugunsten von Pyruvat sprunghaft an (Kauffold und Thamm, 1985). Glukose stellt die vorherrschende Energiequelle bei Blastozysten dar (Leese und Barton, 1984).

##### **4.5.1. Glukoseverbrauch und –verwertung**

Obwohl unter bestimmten Kulturbedingungen Glukose nicht unbedingt für die Weiterentwicklung benötigt wird, wenn hohe Konzentrationen von Laktat im Kulturmedium gegeben sind (Rosenkrans et al., 1993; Takahashi und First, 1993), kann der Glukoseverbrauch in der In vitro Kultur für die Beurteilung der Lebensfähigkeit herangezogen werden (Renard et al., 1980a; Butler et al., 1988 ; Hardy et al., 1989b; Kim et al., 1993; Rondeau et al., 1995).

Der Glukoseverbrauch wird vor und nach der Kultur der Embryonen entweder mittels radioaktiv markierter  $^3\text{H}$ -Glukose und/oder  $^{14}\text{C}$ -Glukose ermittelt, indem die gebildete Menge von  $^{14}\text{CO}_2$  (Rieger, 1984; Javed et al., 1991) und/oder  $^3\text{H}_2\text{O}$  (Rieger und Guay, 1988; Rieger

et al., 1989) gemessen wird: Hierzu bedient man sich der Hexokinase-Methode (Glucoquant®, Boehringer) (Renard et al., 1980a) oder es wird ein Glukose-Assays durchgeführt, welcher die gebildete Menge an Nicotinsäureamidadenindinucleotid (NADPH) im Kulturmedium nach einer bestimmten Kulturzeit photometrisch ermittelt (Hardy et al., 1989b). Liegt die Differenz der Glukosekonzentration im Medium nach 20-stündiger Kultur unter 50 µg/ml (entspricht einer Glukoseaufnahme von <2,5 µg/Embryo/Stunde), wird kein Glukoseverbrauch des Embryos vermutet (Renard et al., 1980a).

Es wird vermutet, dass die verschiedenen Substratverwertungsraten auf Unterschiede in der Lebensfähigkeit der Embryonen zurückzuführen sind (Overström, 1996). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass eine positive Korrelation zwischen Glukoseverwertung und anschließender Entwicklung *in vitro* und *in vivo* besteht. Embryonen mit hohem Glukoseverbrauch zeigten anschließend eine bessere Weiterentwicklung (Renard et al., 1980a; Renard et al., 1982; Gardner und Leese, 1987; Leese, 1987; Butler und Biggers, 1989; Hardy et al., 1989b; Rieger und Loskutoff, 1994; Rondeau et al., 1995). Der Glukoseverbrauch steht jedoch nicht unbedingt mit der morphologischen Erscheinung der Embryonen in Beziehung (Renard et al., 1980a), was sich damit erklären lässt, dass morphologisch intakt erscheinende Embryonen visuell nicht beobachtbare Defekte aufweisen können, welche sich allerdings durch metabolische Tests feststellen lassen (Rondeau et al., 1995). Bei morphologisch einwandfreien Blastozysten stand der Glukoseverbrauch in einer eindeutigen Beziehung zum Transferresultat (Renard et al., 1982).

Andere Autoren konnten jedoch eine signifikant positive Korrelation zwischen der morphologischen Qualität von Embryonen und der Aufnahme von Glukose feststellen (Javed et al., 1991; Leese, 1987; Butler et al., 1988 ; Rondeau et al., 1995). Die Glukoseaufnahme ist bei *in vitro*- und *in vivo*- produzierten Rinderembryonen nicht signifikant unterschiedlich (Thompson et al., 1996a; Thompson et al., 1996b). Auch wurden keine signifikanten Unterschiede im Glukoseverbrauch zwischen Blastozysten und Morulae (Butler et al., 1988), sowie zwischen frühen und expandierten Blastozysten (Thompson et al., 1996b) festgestellt.

Die Beurteilung der Glukoseverwertung von Rinderembryonen *in vitro* erfordert eine Standardisierung der Kulturbedingungen. Wird die Ermittlung der Glukoseaufnahme von Embryonen in der Kultur durchgeführt, kann jedoch gleichzeitig auch die Weiterentwicklungsfähigkeit *in vitro* beurteilt werden.

#### 4.5.2. Pyruvatverbrauch und Laktatproduktion

Die Pyruvataufnahme bzw. Laktatproduktion von Embryonen in der In-vitro-Kultur kann als nichtinvasive Methode zur Beurteilung der Lebensfähigkeit von Embryonen genutzt werden (Leese, 1987). Pyruvat stellt ein essentielles Substrat für den Stoffwechsel von Säugetierembryonen dar (Gardner und Leese, 1986) und wird von den mitochondrialen Enzymen des Krebs-Zyklus verstoffwechselt (Rieger und Guay, 1988). Der Pyruvatverbrauch und die Laktatproduktion von in vitro produzierten Embryonen unterscheiden sich signifikant unter den verschiedenen Entwicklungsstadien (Thompson et al., 1996a) (s.a. Tab. 12). Morphologisch intakt erscheinende Embryonen verbrauchen signifikant mehr Pyruvat als degenerierte Embryonen (Leese, 1987; Hardy et al., 1989b). Die Pyruvataufnahme ist ebenfalls positiv korreliert mit der Trächtigkeitsrate (Conaghan et al., 1992). Der Pyruvatverbrauch kann mittels radioaktiv markiertem [ $^{14}\text{C}$ ] Pyruvat ermittelt werden, indem die gebildete Menge von  $^{14}\text{CO}_2$  gemessen wird (Rieger und Guay, 1988; Javed et al., 1991) oder mit der Pyruvat-Assay-Technik durch photometrische Feststellung der gebildeten NADH-Menge im Kulturmedium nach einer bestimmten Kulturzeit (Leese, 1987):



Tab. 12: Pyruvatverbrauch und Laktatproduktion pro Embryo und Stunde  
(Thompson et. al., 1996a)

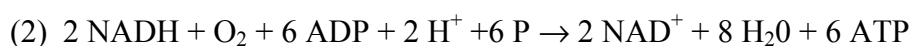
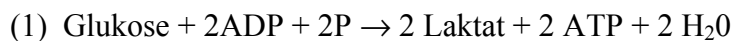
Kultur-tag	Entwicklungs-stadium	O <sub>2</sub> -Aufnahme (nl)	Pyruvat-Aufnahme (pmol)	Glukose-Aufnahme (pmol)	Laktat-Produktion (pmol)	ATP-Produktion (pmol)
0	1-Zeller	0,24±0,22	2,8±0,7	1,5±0,4	1,1±0,5	60±10
1	2- bis 4-Zeller	0,21±0,02	6,0±0,9	2,6±0,9	3,0±0,9	58±6
2	8-Zeller	0,19±0,02	5,7±0,7	3,1±0,5	4,6±1,4	54±6
4	16-Zeller	0,27±0,06	10,5±0,7	3,0±0,4	6,2±0,2	85±4
5	Kompakte Morula	0,39±0,07	9,9±2,6	10,6±3,3	-	124±23
6	Blastozyste	0,90±0,13	20,5±2,4	14,6±0,9	31,1±4,6	221±32

#### 4.5.3. Sauerstoffverbrauch und Adenosintriphosphat (ATP) -Produktion

Der Sauerstoffverbrauch ist ein möglicher Indikator bei der nichtinvasiven Beurteilung der Lebensfähigkeit von Rinderembryonen in vitro (Overström, 1992 ; Overström et al., 1992 ; Thompson et al., 1995; Thompson et al., 1996a). Der Sauerstoffgehalt wird gemessen, indem eine fettlösliche Substanz (Pyrene) zugesetzt wird und photometrisch die Fluoreszenz, welche bei 340 nm proportional zur Sauerstoffkonzentration sinkt, ermittelt wird (Houghton et al. 1996). Overström et al. (1992) haben den Sauerstoffbedarf 30 Minuten lang direkt nach der Gewinnung gemessen.

In Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen und der Methode zur Sauerstoffbestimmung ergeben sich unterschiedliche Werte für den Sauerstoffverbrauch. Die Aufnahme von Sauerstoff durch die Embryonen ist nicht mit der Glukoseaufnahme korreliert (Thompson et al., 1996b). Nach Overstrom et al. (1992) wird ein Umsatz von  $1,47 \pm 0,44$  nl O<sub>2</sub> pro Tag 7-Blastozyste und Stunde gemessen. Thompson et al. (1995) stellten bei in vivo produzierten Rinderblastozysten eine Sauerstoffaufnahme von durchschnittlich 0,8 nL (0,5 bis 0,7 nl) und bei in vitro produzierten Embryonen 0,9 nL pro Embryo und Stunde fest. Keine signifikanten Unterschiede im Sauerstoffverbrauch wurden zwischen Blastozysten und Morulae (Overstrom et al., 1992), jedoch zwischen frühen und expandierten Blastozysten (0,84 vs. 0,51 nl pro Stunde und Embryo) (Thompson et al., 1996b) festgestellt. Der Sauerstoffverbrauch korreliert nicht mit der morphologischen Klassifizierung der Embryonen, Rinderembryonen mit höherem Sauerstoffverbrauch (>2,0 nl /Embryo und Stunde) haben jedoch eine um 9 % höhere Chance, zu einer Trächtigkeit zu führen (Overström et al., 1992).

Mit der ATP-Produktion wird der Energiebedarf/-umsatz von Embryonen beschrieben (Thompson et al, 1996a). Sie wird indirekt durch Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs und Bestimmung des Verhältnisses von Glukoseaufnahme zu Laktatproduktion festgestellt (Newsholme et al, 1983):



Maximal 85 % des von den Embryonen gebildeten ATP stammt aus der oxidativen Phosphorylierung (Thompson et al., 1996b), der Rest wird durch Glykolyse gebildet (Rieger und Guay, 1988). Die ATP-Produktion von in vitro produzierten Tag 7-Blastozysten beträgt  $205 \pm 23$  pmol pro Embryo und Stunde, die Werte für in vivo und in vitro produzierte Embryonen sind vergleichbar (Thompson et al., 1996a). Signifikante Unterschiede im Sauerstoffverbrauch wurde zwischen frühen und expandierten Blastozysten (262,1 vs. 159,9 pmol pro Stunde und Embryo) festgestellt (Thompson et al., 1996b).

#### **4.5.4. Aminosäurenverbrauch und Proteinsynthese**

Die Aufnahme einiger Aminosäuren von Embryonen ist energieabhängig (Di und Tasca, 1977), deren Messung könnte somit eine bessere Methode zur Ermittlung der Stoffwechselleistung von Embryonen darstellen als die Messung glukeolytischer Vorgänge (Rieger, 1984). Die Aminosäureaufnahme kann durch HPLC (Partridge et al., 1986) oder durch den Einsatz radioaktiv markierter Substanzen (Frei et al., 1989) und anhand der Bildung von CO<sub>2</sub> (Rieger, 1984) bestimmt werden. Sie unterscheidet sich bei in vivo- und in vitro-produzierten Embryonen signifikant (Partridge et al., 1986). In einer Untersuchung von Partridge et al. (1986) wurden durchschnittlich 3,51 bzw. 2,66 pmol Aspartat, 3,22 bzw. 4,6 pmol Alanin und 1,86 bzw. 0,15 pmol Arginin pro Embryo und Stunde aufgenommen (Partridge et al., 1986).

Der Nachweis des Glutamin-Metabolismus bei Rinderembryonen kann hilfreich bei der Beurteilung der Lebensfähigkeit sein (Rieger et al., 1989). Glutamin wird von den mitochondrialen Enzymen des Krebs-Zyklus verstoffwechselt, sein Metabolismus reflektiert somit die Aktivität des Krebs-Zyklus (Rieger und Guay, 1988). Die Glutaminaufnahme wird durch den Einsatz radioaktiv markierter Substanzen (<sup>14</sup>C-Glutamin) ermittelt (Rieger et al., 1989). Carney und Bavister (1987) haben gezeigt, dass Glutamin für die Entwicklung von Hamsterembryonen essentiell ist.

Die Methioninaufnahme in der In-vitro-Kultur kann ebenfalls als biochemischer Indikator zur Beurteilung der Lebensfähigkeit von Rinderembryonen genutzt werden (Rondeau et al., 1995). Die Konzentration von [<sup>35</sup>S]-Methionin wird vor und nach einer 18-bis 36-stündigen Inkubation gemessen. In einer Untersuchung von Rondeau et al. (1995) nahmen morphologisch intakt erscheinende Embryonen signifikant mehr Methionin auf als Embryonen, welche morphologische Abweichungen zeigten.



#### **4.6. Nachweis von Enzymen**

##### **4.6.1. Laktatdehydrogenase (LDH)**

Durch den Nachweis des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) im Kulturmedium der Rinderembryonen können degenerierte Embryonen ausfindig gemacht werden (Renard et al., 1982). Der Nachweis des Enzyms erfolgt im Medium nach 20-stündiger In-vitro-Inkubation. Im Kulturmedium der in der morphologischen Beurteilung als degeneriert eingestuften Embryonen wurde LDH immer nachgewiesen (Renard et al., 1982). Bei Embryonen, die nach der Kultur übertragen wurden und eine Trächtigkeit produzierten, wurde nie Laktatdehydrogenase nachgewiesen (Renard et al., 1982).

##### **4.6.2. Succinodehydrogenase, G6PDH und GPDH**

Die Enzyme Succinodehydrogenase, G6PDH (Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase) und GPDH (Glukose-Phosphat-Dehydrogenase) können nicht als Indikator für die Lebens- bzw. Weiterentwicklungsfähigkeit von Rinderembryonen betrachtet werden (Renard et al., 1982). Sie wurden nach 20-stündiger Kultur sowohl von morphologisch normal erscheinenden, als auch von als degeneriert eingestuften Rinderembryonen freigesetzt (Renard et al., 1982).

##### **4.6.3. Lysosomale Enzyme**

Der Nachweis lysosomaler Enzyme, wie z.B. der  $\beta$ -Hexosaminidase, kann nicht als Indikator für die Lebens- bzw. Weiterentwicklungsfähigkeit von Rinderembryonen betrachtet werden (Renard et al., 1982). In einer Untersuchung von Renard et al. (1982) wurde  $\beta$ -Hexosaminidase von Tag 8-Rinderembryonen, die nach 48-stündiger Kultur geschlüpft sind, ebenso wie von Embryonen, welche anschließend degenerierten, freigesetzt.

#### **4.7. Nachweis von Prostaglandinen (PGF)**

Das Verhältnis der PGF E<sub>2</sub> -/PGF<sub>2α</sub>-Produktion kann als Indikator für die Embryonenqualität genutzt werden (Nadeau et al., 1994). Nadeau et al. (1994) inkubierten Tag 6-Rinderembryonen nach ihrer Gewinnung 8 bis 24 Stunden und ermittelten den PGF-Gehalt des Kulturmediums mittels Radioimmunoassay (RIA) oder Enzymimmunoassay (EIA). Die Prostaglandinproduktion war bei „sehr guten“ und „guten“ Embryonen signifikant höher als bei „mäßigen“ und „schlechten“ Embryonen. Bei „sehr guten“ Embryonen stieg die PGF E<sub>2</sub> – Produktion innerhalb 8 bis 24 Stunden von 0,37 bis 1,1pg/Embryo an, während die Bildung von PGF<sub>2α</sub> bei 0,65 pg sistiert. Bei „guten“, „mäßigen“ und „schlechten“ Embryonen stieg die Produktion beider Substanzen in der gleichen Zeitspanne (Nadeau et al., 1994).

#### **4.8. Nachweis von Wachstumsfaktoren**

##### **4.8.1. Plateled Activating Factor (PAF)**

Der Plateled Activating Factor (PAF) stellt einen essentiellen autokrinen Wachstumsfaktor bei frühen Embryonen dar (O'Neill et al., 1989). PAF wurde bei Mäuseembryonen, welche sich zu einer Trächtigkeit entwickelten, nachgewiesen, nicht aber bei Embryonen, die später degenerierten (Spinks et al., 1990). Die Ermittlung der PAF-Produktion früher Embryonen kann als objektive und nichtinvasive Methode zur Beurteilung ihrer Lebensfähigkeit und ihres Entwicklungspotentials eingesetzt werden (Collier et al., 1990). Man verwendet hierzu gewaschene Kaninchen-Thrombozyten; die Aggregation wird durch das hinzugefügte Kulturmedium ausgelöst, in dem die Embryonen zuvor 18 Stunden kultiviert werden. Die von den Embryonen gebildete PAF-Menge ist positiv korreliert mit deren Fähigkeit, später zu einer Trächtigkeit zu führen (s.a. Tab. 13) (Collier et al., 1990). Embryonen von Menschen, die sich nicht weiterentwickelten, produzierten signifikant weniger PAF (75 nM) als Embryonen, die zu einer Schwangerschaft führten (durchschnittlich 295 nM) (Collier et al., 1990). Amiel et al. (1989) konnten dagegen keine Beziehung zwischen der gebildeten PAF-Menge und der Embryonenqualität nachweisen.

Tab. 13: Beziehung zwischen Embryonenmorphologie, Blastomerenzahl und PAF-Produktion (Collier et al., 1990)

		PAF-Konzentration (nM)
Qualitätsklasse	A	67,4
	B	101,1
	C	57,4
Blastomerenzahl	2	29,6
	3	45,7
	4	68,0
	5	478,8

#### 4.8.2. Trophoblastisches Interferon

Interferon- $\tau$  (IFN- $\tau$ ), früher auch als Bovines Trophoblastprotein-1 (bTBP-1) bekannt, spielt eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung (Hernandez-Ledezma et al., 1993). Ein wichtiger Faktor zur Erzielung einer Trächtigkeit ist die Fähigkeit der Embryonen, die uterine Sekretion von PGF2 $\alpha$  durch Bildung von IFN- $\tau$  zu hemmen (Thatcher et al., 2001). Beim Kotransfer mehrerer Embryonen auf ein Empfängertier kann die additive Wirkung der embryonalen IFN-Produktion qualitative Mängel der übertragenen Embryonen kompensieren (Heyman et al., 1987). Ebenso können die Trächtigkeitsraten durch Kotransfer von IFN-produzierenden Trophoblastvesikeln oder die alleinige Applikation von IFN verbessert werden (Heyman et al., 1987). Die Ermittlung der gebildeten Menge an IFN kann dazu genutzt werden, um die Embryonenqualität objektiv zu beurteilen (Hernandez-Ledezma et al., 1993).

Die IFN- $\tau$ -Expression der trophektodermen Zellen (Bazer et al., 1986) beginnt ungefähr um den Zeitpunkt der Blastozoelformation, d.h. ca. an Tag 7 bis 8 nach der Befruchtung (Hernandez-Ledezma et al., 1992) und erreicht ein maximales Level kurz vor der Implantation der Embryonen (Roberts et al., 1992). Quantitativ können diese Proteine durch deren antivirale Aktivität (Hernandez-Ledezma et al., 1993) mittels eines Immunoassays

(Ashworth und Bazer, 1989), basierend auf der hemmenden Wirkung des IFN auf den zytopathischen Effekt von Vesikulärem Stomatitisvirus auf Rindernierenzellen (Stojkovic et al., 1995; Stojkovic, 1996), bestimmt werden.

Hernandez-Ledezma et al. (1992) stellten bei Blastozysten mit  $115 \pm 22$  Zellen eine durchschnittliche Sekretion von  $1,0 \pm 0,1$  Einheiten Interferonaktivität pro Tag fest. Sowohl Entwicklungsstand, wie auch die morphologische Qualität der Embryonen beeinflussten die IFN-Expression. Rinderembryonen, die anhand ihrer morphologischen Erscheinung als qualitativ besser eingestuft wurden, bildeten auch mehr IFN (Hernandez-Ledezma et al., 1993). Am Tag 8 geschlüpfte Blastozysten produzierten signifikant mehr Interferon- $\tau$  als nicht geschlüpfte 8 Tage alte Blastozysten (Stojkovic, 1996). Signifikante Unterschiede ergaben sich bei geschlüpften Blastozysten der Qualitätsklasse „mäßig“ und „gut“; bei frühen Blastozysten bestand zwar eine Korrelation zwischen der Qualität und der gebildeten IFN-Menge, die Unterschiede waren jedoch nur gering. Frühe Blastozysten bildeten weniger IFN als späte und geschlüpfte Blastozysten (Hernandez-Ledezma et al., 1993). In einer Untersuchung von Stojkovic et al. (1999) wurde von in vitro- produzierten Rinderembryonen signifikant weniger IFN gebildet, als von in vivo- produzierten Embryonen.

#### **4.9. Chromosomenanalyse**

Unter den vom Embryo ausgehenden Faktoren, welche bei Menschen dafür bekannt sind, die embryonale Sterblichkeit zu beeinflussen, sind chromosomale Abnormalitäten und einzelne Genmutationen bekannt (Simpson, 1980). Chromosomale Abnormalitäten sind bei Säugetieren ebenfalls eine bekannte Ursache für embryonale Sterblichkeit (King, 1990; Jacobs, 1990). Einzelne Genmutationen, die sich letal auswirken und welche die embryonale Entwicklung während der ersten Teilung zu beeinflussen beginnen, sind bei Mäusen identifiziert worden (Magnuson und Epstein, 1981). Die Inzidenz chromosomaler Abweichungen bei Embryonen domestizierter Tiere wird auf insgesamt 7-10 % geschätzt (King, 1990). Yoshizawa et al. (1999) stellten lediglich bei 60,6 % der untersuchten Rinderembryonen und 43,8 % der Blastomeren keine chromosomalen Anomalien fest. Die am häufigsten beobachteten Abweichungen sind Aneuploidie und Polyploidie (Kawarsky et al., 1996).

Chromosomale Abweichungen sind ererbt oder ereignen sich während der Gametogenese, Befruchtung und frühen Teilungsstadien (Hamerton, 1971). Nach Kauffold und Thamm (1985) können die durch Superovulationsbehandlungen ausgelösten hormonellen Imbalancen für das Entstehen von chromosomalen Anomalien während der Kernreifung verantwortlich sein. Unausgeglichene chromosomale Anomalien verursachen bei Menschen spontane Aborte oder kongenitale Missbildungen (Simpson, 1980). Bei Haustieren sind sie als Ursache für „Umrindern“ bekannt (King et al., 1981). eCG kann bei Schafen eine Zunahme der Polyspermierate (Williams und Long, 1980) und bei Rindern eine vermehrte Inzidenz der Mixoploidie verursachen (King, 1985). Bei ca. einem Drittel aller nach Superovulation produzierten Embryonen sind zytogenetisch feststellbare chromosomale Abnormalitäten feststellbar, viele dieser Embryonen sterben frühzeitig (King, 1985).

Weniger chromosomale Abnormalitäten werden bei älteren, intakten Embryonen gefunden (King, 1985). Die Anzahl mixoploider Zellen nimmt mit fortgeschrittener Entwicklung der Blastozysten zu (Viuff et al., 1999; Hyttel et al., 2001). Bei 41,5 % der 12- bis 15 Tage alten Embryonen können mixoploide Blastozysten beobachtet werden (Hare et al., 1980), während 7-8 Tage alte Embryonen nur zu 25 % Mixoploidie aufweisen (Viuff et al., 1999). In vitro produzierte Rinderembryonen weisen einen signifikant höheren Anteil chromosomaler Abnormalitäten auf, als in vivo produzierte (King, 1991; Hyttel et al., 2001; Van Soom et al., 2001), was sich jedoch nicht signifikant auf die Trächtigkeitsraten auswirkt (Viuff et al., 1999). 72 % der in-vitro-produzierten morphologisch unauffälligen Tag 7- und Tag 8-Blastozysten sind mixoploid bzw. sind eine Mischung aus normalen, diploiden und polyploiden Zellen. Ein signifikant geringerer Anteil der in vivo produzierten Embryonen weist Mixoploidie auf (25 %) (Viuff et al., 1999).

Sowohl morphologisch normale, als auch abnormale Embryonen können chromosomale Abweichungen aufweisen (Viuff et al., 1999). King et al. (1987) dagegen konnten nur bei Embryonen mit abweichender morphologischer Erscheinung Anomalien im Chromosomenstatus feststellen. Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind vermutlich auf die Anzahl der untersuchten Blastomeren zurückzuführen (Viuff et al., 1999).

Bei Rinderembryonen sind chromosomale Abweichungen mit Verzögerungen in der Entwicklung assoziiert (Kawarsky et al., 1996). Die In-vitro-Entwicklungsrate kann daher als Indikator für chromosomale Abnormalitäten genutzt werden und als nichtinvasives Hilfsmittel

zur Elimination chromosomal abnormer Embryonen dienen (Kawarsky et al., 1996). Haploide und polyploide Embryonen entwickeln sich signifikant langsamer als diploide Embryonen (Kawarsky et al., 1996), was vermutlich auf das reduzierte Level der Genprodukte, das veränderte Kern-Zytoplasma-Verhältnis und/oder auf metabolische Abweichungen zurückzuführen sein könnte (Kawarsky et al., 1996).

Die zytogenetische Analyse von Embryonen ist ein wichtiger Aspekt, seit festgestellt wurde, dass durch die In-vitro-Kultur chromosomale Abnormalitäten verursacht werden können (Van Soom et al., 2001). Eine sehr empfindliche zytogenetische Methode zur Feststellung von chromosomalen Anomalien ist die Untersuchung des Tochterchromatid-Austausches (King, 1985). Eine nichtinvasive Methode zur Genomanalyse stellt die Biopsieprobe mittels Mikroinjektion eines einzelnen Blastomeren bei 16- bis 32-Zellen-Embryonen dar. Die Weiterentwicklung der Embryonen wird durch die Zellentnahme nicht beeinträchtigt (Chrenek et al., 2001). Bei dieser Technik werden durch die Entnahme eines einzelnen Blastomeren jedoch lediglich sehr geringe Mengen an DNA gewonnen, welche nur für die anschließende Untersuchung mit PCR ausreichen (Chrenek et al., 2001). Größere DNA-Mengen (10 bis 20% der zellulären Masse bei Morulae oder Blastozysten) sind für die Untersuchung mit der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisation (FISH) erforderlich (Bandioli et al., 1989). Durch die Anwendung dieser Technik kann das Maß der chromosomalen Abnormalitäten bei Embryonen ermittelt werden (Viuff et al., 1999; Hyttel et al., 2001).

#### **4.10. Bestimmung der Zellzahl**

Der Nachweis der Zellzahl der Gesamtzellen, der Zellen der inneren Zellmasse (ICM) und des Trophektoderms (TE), sowie die verhältnismäßige Verteilung der Zellen liefern weitere detaillierte Informationen über die Qualität eines Embryonen (Van Soom et al., 1996). Obwohl es ohne die Anwendung embryonenschädigender Methoden nicht möglich ist, die Anzahl der einzelnen Zellen und ihre Verteilung auf die zwei Zellpopulationen, die inneren Zellmasse (ICM) und das Trophektoderm (TE), bei post-kompaktierten Embryonen vor dem Transfer zu ermitteln, ist es nützlich, die Zellzahl zu schätzen (Seidel und Seidel, 1977).

#### 4.10.1. Gesamtzellzahl

Die embryonale Zellzahl ist ein weiterer Indikator für die Embryonenqualität (Papaioannou und Ebert, 1986). Morphologische Kriterien allein gewährleisten keine ausreichende Beurteilung der Lebensfähigkeit von Embryonen (Papaioannou und Ebert, 1986). Die Gesamtzellzahl korrespondiert mit der qualitativen Klassifizierung der Embryonen (Wurth et al., 1988). In einer Untersuchung von Wurth et al. (1988) wiesen ex vivo gewonnene Blastozysten mit abnehmender morphologischer Qualität kleinere Zellzahlen auf. Die Implantation von Rinderembryonen mit einer großen Zellzahl tritt mit größerer Wahrscheinlichkeit ein, als die von Embryonen mit einer geringeren Gesamtzellzahl (Van Soom et al., 1997b) (s.a. Tab. 14). Degeneriert ein Teil der Embryonenmasse bei jungen Embryonen, führt dies zu einer geringeren Zellzahl bei den späteren Entwicklungsstadien (Van Soom et al., 1997b). Während morphologisch normal erscheinende Blastozysten durchschnittlich 109 Zellen aufweisen, können bei leicht degenerierten lediglich 60 Zellen beobachtet werden (Lineares, 1981). In einer Untersuchung von Van Soom et al. (1997b) entwickelten sich Morulae sehr guter Qualität zu geschlüpften Blastozysten mit signifikant höherer Gesamtzellzahl als Morulae schlechter Qualität. Die durchschnittliche Anzahl an Zellen bei frühen Blastozysten und expandierten Blastozysten beträgt 100 bzw. 160 (Ushijima et al., 1988) und bei Morulae 75 (Wurth et al., 1994). Iwasaki et al. (1990) ermittelten eine durchschnittliche Zellzahl von 115 bis 160 bei allen Blastozystenstadien.

Die Gesamtzellzahl ist bei in vitro- produzierten Blastozysten geringfügig vermindert, im Vergleich mit Embryonen, die in vivo produziert wurden (Bavister, 1995). Fukui und Ono (1989) beobachteten jedoch bei in vitro- produzierten Rinderembryonen Gesamtzellzahlen zwischen 100 und 150 und damit keine signifikanten Unterschiede zu in vivo- produzierten Embryonen. Es ist jedoch zu bemerken, dass verschiedene Medien, verschiedene Kultursysteme und -bedingungen, wie auch die jeweilige Färbemethode sich auf das Ergebnis der Zellzahlbestimmung auswirken können (Stojkovic, 1996).

Ermittelt wird die Gesamtzellzahl von Rinderembryonen durch Färbung mit bestimmten Fluoreszenzfarbstoffen. Die kombinierte Anwendung der Fluoreszenzfarbstoffe Bibenzimid (BIS, Hoechst 33342) und Propidium Jodid (PI) ermöglicht es, eine genauere Aussage über die zellulären Beschädigungen zu treffen und kann nützlich bei der Beurteilung der Embryonenqualität sein (Kaidi et al., 1999). Die Färbungen mit BIS und PI erfordern eine

vorhergehende 24-stündige Fixierung der Embryonen in 70%-igem Alkohol (Kaidi et al., 1999). BIS kann intakte Membranen penetrieren und bindet spezifisch an die DNA intakter und beschädigter Zellen, die Kerne fluoreszieren blau; PI kann nur beschädigte Membranen passieren und bewirkt eine rote Kernfluoreszenz beschädigter Zellen (Kaidi et al., 1999). Ushijima et al. (1988) und Fukui und Ono (1989) stellten die Zellen von Rinderembryonen durch Färbung mit 10 %-iger Giemsa-Lösung dar.

#### **4.10.2. Zellzahl der inneren Zellmasse (ICM) und des Trophektoderms (TE)**

Die kombinierte Analyse der Gesamt-, sowie der ICM- und TE-Zellzahl kann eine wertvolle Methode zur detaillierten Beurteilung der Qualität von Embryonen darstellen (Iwasaki et al., 1990; Du et al., 1996; Van Soom et al., 1996). Ungefähr ab dem fünften Tag nach der Befruchtung beginnen sich die Embryonalzellen funktionell zu differenzieren und trennen sich in Zellen des Trophektoderms (TE) und der inneren Zellmasse (ICM) auf. Aus den Zellen des ICM geht das Embryonalgewebe, sowie ein Teil der extraembryonalen Membranen hervor, welche zu späterem Zeitpunkt der Trächtigkeit zusammen mit Zellen des TE die Plazenta bilden. Beide Zelllinien sind für das embryonale und fötale Überleben essentiell (Van Soom et al., 1997a). Das Verhältnis der Anzahl der Zellen der ICM zu der Zellzahl des TE ist wichtig für die weitere Entwicklung der Embryonen (Giles und Foote, 1995). Die Ermittlung der Verteilung der Zellen zum TE und ICM kann für den Praktiker wertvoll sein, weil eine minimale Anzahl an ICM-Zellen zur Erzeugung einer Trächtigkeit notwendig ist (Van Soom et al., 2001) und eine ausgeprägte Zuteilung der Zellen zum TE vermutlich für Trächtigkeitsanomalien, wie z.B. eine erhöhte Inzidenz von Hydroallantois, verantwortlich gemacht werden kann (Hasler, 1998).

Es existieren mehrere verschiedene Methoden zur Ermittlung der Zellzahlen des TE und der ICM, alle hier beschriebenen Techniken setzen die Entfernung der Zona pellucida voraus. Dies kann auf chemischen Weg (Acid-Tyrode-Lösung), durch enzymatische Behandlung (3-8-minütige Inkubation in 0,5 %-iger Pronase) (Iwasaki et al., 1990; Van Soom et al., 1997a) oder auf mikromanipulativem Weg (Van Soom et al., 2001) erfolgen. Obwohl es möglich ist, die Zellen der ICM und TE durch Beurteilung von mikroskopischen Schnitten (Barlow et al., 1972) oder durch mikromanipulative Trennung der Zellen (Gardner et al., 1973) zu unterscheiden, hat sich die Zellzahlbestimmung durch den Einsatz von Immunkomplexen und fluoreszierenden Farbstoffen durchgesetzt.



Durch die Kombination von Zelllysis der TE-Zellen und bestimmten Färbemethoden können die ICM-Zellen gesondert dargestellt werden (Van Soom et al., 2001). Die äußeren Zellen einer Blastozyste formen eine durch Tight junctions gebildete Schutzschicht, welche nach Beschichtung mit Antikörpern Komplement-vermittelt selektiv aufgelöst werden kann. Die inneren Zellen sind durch diese Schutzschicht vor der Antikörper-vermittelten Lysis geschützt (Van Soom et al., 2001). Die TE-Schutzschicht kann durch Beschichtung mit Antikörpern (Handyside und Hunter, 1984) oder Trinitrobenzosulfonsäure (Hardy et al., 1989a) Komplement-vermittelt selektiv aufgelöst werden oder durch chemische Substanzen (De la Fuente und King, 1997; De la Fuente und King, 1998) permeabel gemacht werden.

Einige Autoren verwendeten zum Auflösen der TE-Schicht ein hitzeinaktiviertes Serum gegen Mäusemilzzellen und Komplement (Handyside und Hunter, 1984), Kaninchen-Antiserum gegen Rindermilzzellen (Iwasaki et al., 1990; Van Soom et al., 1996) oder Antisera gegen IFN (Stojkovic et al., 1995; Stojkovic, 1996; Stojkovic et al., 1998). Die äußeren Zellen wurden durch das Komplement aufgelöst und die Kerne der lysierten Zellen wurden durch PI, welches der Komplementlösung zugegeben wurde, angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. ICM-Zellen wurden durch die von den TE-Zellen gebildete Schutzschicht nicht lysiert und mit PI angefärbt und wurden anschließend durch Färbung mit Bibenzimid dargestellt. Die Kerne der ICM erschienen blau und die der TE pink (Du et al., 1996). Diese Methode ist zwar schnell in ihrer Anwendung, jedoch ist die Herstellung des Serums sehr aufwendig (Van Soom et al., 2001).

Um die aufwendige Produktion des spezifischen Antiserums zu vermeiden, wurde versucht, die TE-Zellen künstlich zu beschichten (Hardy et al., 1989a). Dies wird erreicht durch eine 10-minütige Inkubation mit Trinitrobenzosulfonsäure, welches auch von unspezifischen Antisera erkannt werden kann und kommerziell erhältlich ist (Van Soom et al., 2001). Dieses Verfahren erfordert dagegen drei statt nur zwei Arbeitsschritte (Van Soom et al., 2001). Anschließend erfolgt ebenfalls eine Komplement-vermittelte Lysis und Färbung mit PI und BIS.

De la Fuente und King (1997, 1998) erreichten die Permeabilität der TE-Zellen durch den Zusatz chemischer Substanzen. Sie benutzten anstelle der Immunkomplexe  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophore A23187 in Kombination mit DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen; die Zelllysis trat dabei aufgrund des osmotischen Gefälles, ausgelöst durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophore auf (De la Fuente

und King, 1997). Die Anwendung dieses Verfahrens ist zwar von geringem Arbeitsaufwand, bei Überdosierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophores können jedoch auch die ICM-Zellen geschädigt werden (Van Soom et al., 2001).

De la Fuente und King (1998) verwendeten Lektine zur Markierung der TE. Sie kennzeichneten die äußeren Zellen mit Fluorescein-5-Isothiocyanat (FITC)- beschichteten Weizenkeimagglutinin. Nach anschließender Fixation, Permeabilisation und Färbung mit Propidium Jodid fluoreszierten das Zytoplasma der TE grün und die TE-Kerne rot, während die ICM nur rote Kerne zeigten. Diese Methode ist nach Van Soom et al. (2001) die effektivste.

Es wurde gezeigt, dass Embryonen schlechter Qualität sich mit signifikant größerer Wahrscheinlichkeit zu geschlüpften Blastozysten mit geringer Gesamt- und ICM-Zellzahl entwickeln (Van Soom et al., 1997b). Keine signifikanten Unterschiede werden jedoch beim Verhältnis der ICM- zur Gesamtzellzahl unter Embryonen verschiedener Qualitätsklassen beobachtet (Van Soom et al., 1997b) (s.a. Tab. 14). In einer Untersuchung von Iwasaki et al. (1990) wurden bei den in vitro- produzierten frühen und expandierten Blastozysten signifikant niedrigere ICM-Anteile ermittelt als bei den in vivo- produzierten Embryonen

Die Gesamt- und die ICM-Zellzahl sind bei Embryonen, die später (Tag 8) ein Blastozoele entwickeln, signifikant niedriger als bei Rinderembryonen, welche früher (Tag 6 oder 7) eine Blastozystenhöhle entwickeln (Van Soom et al., 1997b). Eingefrorene und wieder aufgetaute Embryonen wiesen in einer Untersuchung von Du et al. (1996) eine signifikant geringe Anzahl der gesamten Zellen, der ICM-Zellen und des ICM-Anteiles auf.

Tab. 14: Beziehung zwischen Embryonenmorphologie (zum Zeitpunkt des Morulastadiums) und Zellzahl bei geschlüpften Blastozysten (Van Soom et al., 1996)

Qualitätsklasse	Gesamtzellzahl	ICM-Zellzahl	Verhältnis ICM-/ Gesamt-Zellzahl
Sehr gut	212	34	0,16
Gut	173	30	0,19
Mäßig	128	25	0,21
Schlecht	101	16	0,16

#### 4.11. Nachweis apoptotischer Zellen

Wenn der Kernstatus untersucht wird, sollte auch auf den Mitose-, Pyknose- und Apoptoseindex geachtet werden (Byrne et al., 1999). Mit der TUNEL-Technik (Desoxynukleotid-Transferase- vermitteltes dUTP nick end-labelling) kann fragmentierte DNA festgestellt werden (Long et al., 1998). Byrne et al. (1999) stellten mit dieser Technik apoptotische Zellen bei in vitro- produzierten Rinderembryonen dar und ermittelten den Apoptoseindex, indem zusätzlich noch die Gesamtzellzahl durch Fluoreszenzfärbung mit Propidium Jodid nach Behandlung mit RNase 1 ermittelt wurde.

Der Apoptoseindex bei Tag 7-Blastozysten ist negativ mit der Gesamtzellzahl korreliert und liegt zwischen 1 und 10 %. Die Gesamtzellzahl wiederum korrespondiert mit der qualitativen Klassifizierung der Embryonen (Van Soom et al., 1997b), somit besteht auch eine Beziehung des Apoptoseindex zur morphologischen Erscheinung der Embryonen (Byrne et al., 1999), obwohl Apoptose sowohl bei morphologisch intakten, wie auch bei degenerierten Embryonen beobachtet werden kann (De la Fuente und King, 1998). Der programmierte Zelltod tritt v.a. bei Zellen der inneren Zellmasse auf (Byrne et al., 1999).

#### **4.12. Nachweis von Zellverbindungen**

Der Nachweis von Zellverbindungen zwischen den einzelnen Blastomeren kann nicht unbedingt als Indikator für die Lebensfähigkeit von Rinderembryonen genutzt werden (Prather und First, 1993). Zur Darstellung der Zellverbindungen (Gap junctions) wird 5%-iges Fluorescein in einzelne Blastomeren mikroinjiziert und dessen Verteilung beurteilt (Prather und First, 1993). Bei in vitro- produzierten Blastozysten konnten, im Gegensatz zu in vivo- produzierten, keine Zellverbindungen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen zwar, dass Embryonen ohne bzw. mit wenig nachweisbaren Zellverbindungen nicht so weit entwickelt sind wie normal, sprechen aber nicht gegen die weitere Entwicklungsfähigkeit der Embryonen.

## **5. Zusammenfassung**

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der Bewertung der Qualität von Rinderembryonen im Rahmen des Embryotransfers darzustellen, sowie die Ursachen für das Zustandekommen variabler Embryonenqualitäten nach Superovulation und die verschiedenen Möglichkeiten zur Beurteilung der Qualität von Embryonen zu erörtern.

Nach Superovulation werden stets variable Embryonenqualitäten beobachtet. Ein wichtiger, das Resultat einer Superovulationsbehandlung beeinflussender Faktor, ist das Spendertier. Sowohl die individuelle Veranlagung, das Alter, wie auch Gesundheitszustand und die Stressexposition der Tiere spielen eine wichtige Rolle. Ganz wesentlich werden die Ovarreaktionen von dem Vorhandensein eines dominanten Follikels zum Zeitpunkt der Einleitung einer Superovulationsbehandlung beeinflusst. Durch Entfernen des dominanten Follikels können die Ergebnisse signifikant verbessert werden. Ein weiterer Faktor ist die Art des Gonadotropins für die Superovulation. Die Reaktion auf eine Superovulationsbehandlung ist aber nicht nur von der Auswahl des gonadotropen Hormons, sondern auch von der Zusammensetzung der Präparate, der Dosierung und der Art der Verabreichung abhängig. Da die morphologische Beurteilung der Qualität subjektiven Einflüssen unterliegt, sollte mehr Wert auf die Schulung dieses Personenkreises gelegt werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Die Bedeutung der Beurteilung der Embryonenqualität für die Selektion von Embryonen ist erheblich. Die Erfolge des Embryotransfers, d.h. die Trächtigkeitsraten, hängen ganz wesentlich von der Qualität der übertragenen Embryonen ab. Ebenso wird die Überlebensrate von Embryonen nach Tiefgefrierkonservierung durch die Embryonenqualität beeinflusst.

Die Embryonenqualität kann durch verschiedene Ansätze beurteilt werden: soll der ausgewählte Embryo übertragen werden, darf die Methode zur Beurteilung seiner Qualität nicht invasiv sein. In der Praxis des Embryotransfers wird die Embryonenqualität vor der Übertragung anhand der Embryonenmorphologie beurteilt. Bei dieser Methode handelt es sich jedoch um eine subjektive Möglichkeit zur Beurteilung der Embryonenqualität. Genauere Ergebnisse können nur durch den Einsatz invasiver Techniken gewonnen werden. Metabolische Tests zur Bewertung der Lebensfähigkeit von Embryonen schließen die Bestimmung der Nährstoffaufnahme, des Energiemetabolismus und der Sauerstoffaufnahme

ein. Enzym-, Hormon- oder Wachstumsfaktorenproduktion können ebenfalls weitere Details über die Embryonenqualität liefern.

Techniken, welche teilweise den Embryo schädigen können, sind die Bestimmung der Gefrierempfindlichkeit und die Lebendfärbung. Mit den Färbungen können die Membranintegrität, welche wichtig für das Überleben von Embryonen ist, durch die Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen bestimmt werden. Die verbreitetsten Färbemethoden sind DAPI und FDA. Diese zwei Fluoreszenzfarbstoffe schädigen die Embryonen nicht, so dass sie nach diesen Untersuchungen noch übertragen werden können. Invasive Bewertungen der Embryonenqualität schließen meist eine Fixierung oder Färbung des Embryos mit ein und sind daher nicht für den praktischen Einsatz im Embryotransfer geeignet. Zytogenetische Analysen von Embryonen sind ein wichtiges Instrument für die Untersuchung des Chromosomenstatus. Chromosomale Abweichungen können für die frühe embryonale Mortalität bei Rinder verantwortlich sein. Die Gesamtzellzahlbestimmung und die Untersuchung der Verteilung dieser Zellen zur inneren Zellmasse (ICM) und des Trophektoderms (TE) nach Differentialfärbung liefern weitere detaillierte Informationen über die Qualität eines Embryonen.

## **6. Summary**

### **The importance of embryo quality in embryo transfer in cattle – a literature study. With a computer assisted learning program.**

The aim of this work was to describe the importance of the estimation of the quality of cattle embryos in embryo transfer as well as to discuss the causes of the appearance of the variable embryo qualities after superovulation and the different possibilities to assess the embryo quality.

After superovulation there are always variable embryo quality observed. The reasons for this are versatile. An important, the result of a superovulation treatment influencing factor, is the donor cow. Both the individual disposition, the age and as well healthy status and the stress-exposition of the animals are playing an important role. The ovary reactions are rather essentially influenced by the existence of a dominant follicle at the moment of introduction of a superovulation treatment. By removal of dominant follicle the results can significant be improved. Another important factor is the sort of a gonadotrophin used for superovulation. The reaction to a superovulation treatment is not just depending on the selection of the gonadotroph hormone, but also on the composition of the preparations, the doses und the way of application. Because the morphological evaluation of embryo quality is subjected to subjective influences, it should attach importance to the training of the evaluating persons, to receive comparable results.

The importance of assessment of embryo quality to select embryos is considerable. The results of embryo transfer, the pregnancy rates, are essentially depending on the quality of the transferred embryos. The survival of embryos after kryopreservation is also influenced by the embryo quality.

Embryo quality can be evaluated by different approaches: if the selected embryo has to be transferred, the technique to estimate embryo quality must not be invasive. In the practice of the embryo transfer embryo quality is estimated before transfer by gross embryo morphology. However, this method is a rather subjective possibility for assessment of the embryo quality. More accurate date can be obtained by the use of invasive techniques. Metabolic tests to evaluate embryo viability include measurement of nutrient uptake, energy metabolism and

oxygen uptake. Enzyme leakage and hormone or growth factor production can also give more details on the quality of embryos.

Techniques which might partially be able to affect the embryo are the determination of the freezing resistance and vital staining. With vital staining, membrane integrity, which is critical for embryo survival, can be assessed by means of fluorescent probes. The most common staining methods for evaluating embryo quality are DAPI and FDA. These two fluorescent probes do not alter the embryo, so that you can still transfer the embryo after these examinations. Invasive assessment of the embryo quality mostly involves a kind of fixation or staining of the embryo and so they are not suitable for the practical use of the embryo transfer. Cytogenetic analysis of embryos is an important issue for caryotyping. Chromosomal deviations are known to cause early embryonic mortality in cattle. Determination of the total cell number and the allocation of these cells to the inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) after differential staining of these cells give more details on the quality of an embryo.



## 7. Literaturübersicht

Abe A, Yamashita S, Itoh T, Satoh T, Hoshi H (1999): Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and –fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Mol Reprod Dev* 53, 325-335

Adams GP, Kot K, Smith CA, Günther OJ (1993a): Effect of a dominant follicle on its subordinates in heifers. *Canadian Journal of Animal Science* 73, 267-275

Adams GP, Kot K, Smith CA, Günther OJ (1993b): Selection of dominant follicle and suppression of follicle growth in heifers. *Animal Reproduction Science* 30, 259-271

Adams PG (1994): Control of ovarian follicle wave development in cattle: implications for synchronisation and superovulation, *Theriogenology* 41, 19-24

Adams GP, Bo GA, Martinez M, Caccia M, Tribulo H, Pierson RA, Mapletoft RJ (1994a): The effect of Estradiol-17 $\beta$  and progestogen treatment on superovulatory response in beef cows. *Theriogenology* 41, 153

Adams GP, Bo GA, Martinez M, Caccia M, Tribulo H, Pierson RA, Mapletoft RJ (1994b): Superovulatory response of ovarian follicles of wave 1 versus wave 2 in heifers. *Theriogenology* 42, 1103-1113

Ahmad N, Schrick FN, Butcher RL, Inskeep EK (1994): Fertilization rate and embryo development in relation to persistent follicles and peripheral Estradiol-17 $\beta$  in beef cows. *Biology of Reproduction* Vol. 50 (Suppl.) 1, 65

Alcivar AA, Maurer RR, Anderson LL (1984): Superovulatory responses in FSH- or Pergonal-treated heifers. *Theriogenology* 22, 635-642

Alfurajji MM, Broadbent PJ, Hutchinson JSM, Dolman DF, Atkinson T (1989): Effect of time of administration of monoclonal anti-PMSG on superovulatory response and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 31, 165 (Abstrakt)

Amiel ML, Duquenne C, Benveniste J, Testart J (1989): Platelet aggregating activity in human embryo culture media free of PAF-acether. *Human Reproduction* 4, 327-330

Armstrong DT (1993): Recent advantages in superovulation of cattle. *Theriogenology* 39, 7-24

Ashworth CJ, Bazer FW (1989): Changes in ovine conceptus and endometrial function following asynchronous embryo transfer or administration of progesterone. *Biology of Reproduction* 40, 425-434

Avery B (1989): Impact of asynchronous ovulations on the expression of sex- dependent growth rate in bovine preimplantation embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 87, 627-63

Avery B, Bak A, Schmith M (1989): Differential cleavage and sex determination in bovine embryos. *Theriogenology* 32, 139-147

Avery B, Madison V, Greve T (1991): Sex and development in bovine in-vitro fertilized embryos. *Theriogenology* 35, 953

Bandioli KR, Ellis SB, Pryor JH, Williams MW, Harpold MM (1989): The use of male-specific chromosomal DNA fragment to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* 31, 95-104

Baracaldo M, Martinez MF, Adams GP, Mapletoft RJ (2000): Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology* 53, 1239-1250

Barlow P, Owen DAJ, Graham C (1972): DAN-synthesis in the preimplantation mouse embryo. *J Embryol Exp Morph* 27, 431-445

Barnes FL, Eyestone WH (1990): Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology* 33, 141-152

Barnett DK, Clayton MK, Kimura J, Bavister BD (1997): Glucose and phosphate toxicity in hamster preimplantation embryos involves disruption of cellular organization, including distribution of active mitochondria. *Molecular Reproduction and Development* 48, 227-237

Bartmann CP (1992): Untersuchungen zur Verbesserung der Superovulationsergebnisse beim Rind durch Entfernung des dominanten Follikels am Eierstock mit Hilfe der Sonographie. *Vet.Med.Diss.*, Tierärztliche Hochschule Hannover

Bastidas P, Randel RD (1987): Seasonal effects on embryo transfer results in Brahman cows. *Theriogenology* 28, 531-540

Bavister BD, Rose-Hellekant TA, Pinyopummintr T (1992): Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* 37, 127-146

Bavister BD (1995): Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction Update* 1, 91-148

Bazer FW, Vallet JL, Roberts RM, Sharp DC, Thatcher WW (1986): Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 76, 841-850

Becker F, Kanitz W, Schneider F, Kanitz E (2000): Application and results of a fixed time insemination schedule in superovulated dairy cattle. *A.E.T.E. Newsletter* No. 12, S. 6-9

Beckers JF, Closet J, Maghuin-Rogister G, Hennen G (1977): Bovine folltropin: isolation and characterization of the native hormone and its alpha and beta subunits. *Biochemie* 59: 825-831

Bergfelt DR, Bo GA, Mapletoft RJ, Adams GP (1997): Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrus cycle in cattle. *Animal Reproduction Science* 49, 1-12

Betteridge KJ (1977): Techniques and results obtainable in embryo transfer. In: Embryo transfer in farm animals. Betteridge KJ (Hrsg.), Monograph Nr. 16, Agriculture Canada

Betteridge KJ, Eaglesome MD, Randall GCB, Mitchell D (1980): Collection, description and transfer of embryos from cattle 10-16 days after oestrus. *Journal of Reproduction and Fertility* 67, 474-475

Bindon BM, Piper LP, Cahill LP, Driancourt MA, O'Shea T (1986): Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology* 25, 53-70

Bo GA, Pierson RA, Mapletoft RJ (1991): The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Synchro-Mate-B implants. *Theriogenology* 36, 169-183

Bo GA, Adams GP, Nasser LF, Pierson RA, Mapletoft RJ (1992): Estrogen suppression of the dominant follicle in heifers. *Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction*. The Hague, S. 1103-1105

Bo GA, Adams GP, Nasser LF, Pierson RA, Mapletoft RJ (1993): Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology* 40, 225-239

Bo GA, Caccia M, Martinez M, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ (1994a): The use of estradiol 17 $\beta$  and progesterone treatment for the control of follicular wave emergence in beef cattle. *Theriogenology* 41, 165

Bo GA, Martinez M, Caccia M, Tribulo H, Pierson RA, Mapletoft RJ (1994b): Effect of estradiol 17 $\beta$ - and progesterone-treatment on superovulation response in beef heifers. *Theriogenology* 41, 153

Bo GA, Caccia M, Martinez M, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ (1995): Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43, 31-40

Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ (1996): Effect of progestogen plus estradiol 17 $\beta$ -treatment on superovulation response in beef cattle. *Theriogenology* 45, 897-910

Boland MP, Crosby TF, Gordon I (1978): Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. *Theriogenology* 10, 175-180

Boland MP (1984): Use of rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology* 21, 126- 137

Boland MP, Goulding D, Roche JF (1991): Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology* 35, 5-17

Boos A, Müller C, Müller R, Schwarz R, Hahn J (1989): Qualität gewonnener Embryonen und Eizellen in Bezug auf die Mikromorphologie des Endometriums von Spenderkühen. *Fertilität* 5, 192-196

Bostedt H, Okyere K (1988): Auswirkungen einer singulären GnRH-Injektion am 12. Tag post inseminationem auf die periphere LH- und Progesteronkonzentration bei wiederholt besamten Kühen. *Tierärztliche Umschau* 43, 421-429

Bowen RA, Elsdon RP, Seidel GE Jr. (1978): Embryo transfer for cows with reproductive problems. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 172, 1303-1307

Bungartz L (1993): Experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung des dominanten Follikels für die Superovulationsantwort beim Rind mittels ultrasonographischer Methoden. *Vet.Med.Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover*

Bungartz L, Niemann H (1994): Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination, *Journal of Reproduction and Fertility* 101, 583-591

Buratini J Jr., Price CA, Visintin JA, Bo GA (2000): Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology* 53, 421-431

Busse T (1995): Untersuchungen über die Auswirkungen verschiedener Einflüsse auf die Spülergebnisse superovulierter Kühe beim Embryotransfer. Vet. Med. Diss., FU Berlin

Butler JE, Lechene C, Biggers JE (1988): Noninvasive measurement of glucose uptake by two populations of murine embryos. *Biology of Reproduction* 39, 779-786

Butler JE, Biggers JD (1989): Assessing the viability of preimplantation embryos in vitro. *Theriogenology* 31, 115-126

Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ (1999): Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *Journal of Reproduction and Fertility* 117, 97-105

Calder M, Rajamahendran R (1992a): Does elimination of dominant follicle before superovulation treatment improve ovulation and embryo recovery rate? *Proceedings of the 12<sup>th</sup> Congress on Animal Reproduction*. The Hague, S. 196-198

Calder M, Rajamahendran R (1992b): Follicular growth, ovulation and embryo recovery in dairy cows given FSH at the beginning or middle of the oestrus cycle. *Theriogenology* 38, 1163-1174

Callesen H, Bak A, Greve T, Avery B, Gotfredsen P, Holm P, Hyttel P, Pedersen JO, Schmidt M, Smith S, Svanborg N (1989): Use of PMSG antisera in superovulated dairy heifers. *Theriogenology* 31, 179 (Abstrakt)

Callesen H, Greve T, Hyttel P (1986): Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology* 25, 71-86

Callesen H, Greve T, Hyttel P, Bak A, Gotfredsen P, Holm P (1990): Preovulatory plasma estradiol-17 $\beta$  concentrations and ovulation rates in PMSG/anti-PMSG treated heifers. *Theriogenology* 34, 251-258

Callesen H, Bak A, Greve T (1992): Use of PMSG antiserum in superovulated cattle? *Theriogenology* 38, 959-968

Camp H (1989): Untersuchungen über Einflußfaktoren auf den Embryotransfer beim Rind. Vet. Med. Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover.

Carney EW, Bavister BD (1987): Stimulatory and inhibitory effects of amino acids on the development of eight-cell embryos in vitro. J. In Vitro Fert. Emb. Trans. 4, 162-167

Chagas e Silva J, Lopes da Costa L, Silva R (2002): Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers. Animal Reproduction Science 69, 1-8

Cheng KW (1976): Purification and properties of bovine pituitary Folttropin. Biochem. Journal 159, 651-659

Chrenek P, Boulanger L, Heyman Y, Uhrin P, Laurincik J, Bulla J, Renard JP (2001): Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. Theriogenology 55, 1071-1081

Christie WB, Newcomb R, Rowson LEA (1980): Non-Surgical transfer of bovine eggs: Investigation of some factors affecting embryo survival. The Veterinary Record 106, 190-193

Chupin D, Cognie Y, Combarous Y, Procureur R, Saumande J (1987): Effect of purified LH and FSH on ovulation in the cow and ewe. In Roche JF and O'Callaghan D (Hrsg.), Follicular growth and ovulation rate in farm animals. Martin Nijhoff, The Hague, The Netherlands, 1987; 66-72

Church RB, Shea BS (1976): Some aspects of bovine embryo transfer. In: LEA Rowson (Hrsg.), Egg transfer in cattle. Commission of the European Communities. Luxembourg, Seite 73-86

Coleman DA, Daily RA, Leffel RE, Baker RD (1987): Estrous synchronization and establishment of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. J. Dairy Sc. 70, 858-866

Collier M, O'Neill C, Ammit AJ, Saunders DM (1990): Measurement of human embryo-derived platelet-activating factor (PAF) using a quantitative bioassay of platelet aggregation. Human Reproduction 5, 323-328

Conaghan J, Hardy K, Winston RML, Leese HJ (1992): Pyruvate uptake in relation to pregnancy outcome after human IVF. *Journal of Reproduction and Fertility*, Abstract series 9, 27

Critser JK, Rowe MP, Del Campo MR, Ginther OJ (1980): Embryo transfer in cattle. Factors affecting superovulatory response, number of transferable embryo and length of post-treatment oestrous cycle. *Theriogenology* 13, 397-406

Curtis JL, Elsdon RP, Seidel GE (1981): Non-surgical transfer of bovine embryos. *Theriogenology* 15, 124 (Abstrakt)

Cushmann RA, De Souza JC, Hedpeth VS, Britt JH (1999): Superovulation response of one ovary is related to the micro- and macroscopic population of follicle in the contralateral ovary of the cow. *Biology of Reproduction* 60, 349-354

Cushman RA, DeSouza JC, Hedgpeth VS, Britt JH (2001): Effect of long-term treatment with recombinant bovine somatotropin and estradiol on hormone concentrations and ovulatory response of superovulated cattle. *Theriogenology* 55, 1533-1547

D'Occhio MJ, Sudha G, Jillella D, Whyte T, Maclellan LJ, Walsh J, Trigg TE, Miller D (1997): Use of GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: A new model for Superovulation. *Theriogenology* 47, 601-613

D'Occhio MJ, Jillella D, Whyte T, Trigg TE, Miller D (1998a): Tight synchrony of ovulation in superstimulated heifers induced to ovulate with LH: Embryo recovery after a single insemination. *Theriogenology* 49, 376

D'Occhio MJ, Sudha G, Jillella D, Whyte T, Maclellan LJ, Walsh J, Trigg TE, Miller D (1998b): Close synchrony of ovulation in superstimulated heifers that have a downregulated anterior pituitary gland and are induced to ovulate with exogenous LH. *Theriogenology* 49, 637-644



D'Occhio MJ, Jillella D, Lindsey BR (1999): Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. *Theriogenology* 51, 9-35

De la Fuente R, King WA (1997): Use of a chemically defined system for the direct comparison of inner cell mass and trophectoderm distribution in murine, porcine and bovine embryos, *Zygote* 5, 309-320

De la Fuente R, King WA (1998) : Developmental consequences of karyokinesis without cytokinesis during the first mitotic cell cycle of bovine parthenotes. *Biology of Reproduction* 58, 952-962

De Loos FAM, Bevers MM, Dieleman SJ, Kruip TAM (1991): Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation. *Theriogenology* 35, 537-546

De Ruigh L, van de Streek G, van Wagendonk-de Leeuw AM (1996) : The effect of removal of the dominant follicle prior to superovulation on embryo yield. *Theriogenology* 45, 363

De Ruigh L, Mullart E (1999) : Removal of dominant follicle of heifers prior to superovulation. 15 e Réunion A.E.T.E. Lyon, S. 226

Di Zio S, Tasca RJ (1977): Sodium-dependent amino acid transport in pre-implantation mouse embryos. III Na-K-ATPase-linked mechanisms in blastocysts. *Dev. Biol.* 59, 198-205

Dieleman SJ, Bevers MM (1987): Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the preovulatory LH surge on time and number of ovulations in PMSG/PG- treated cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 81, 533-542

Dieleman SJ, Bevers MM, Wurth YA, Gielen JTh, Willemse AH (1989): Improved embryo yield and condition of donor ovaries in cows after PMSG superovulation with monoclonal anti-PMSG administered shortly after preovulatory LH peak. *Theriogenology* 31, 473-487

Dobson H, Smith RF (2000): What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science* 60-61, 743-752

Donaldson LE, Perry B (1983): Embryo production by repeated superovulation of commercial donor cows. *Theriogenology* 20, 163-168

Donaldson LE (1984a): Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. *Theriogenology* 21, 1013-1018

Donaldson LE (1984b): The effect of age of the donor cow on embryo production. *Theriogenology* 21, 963-967

Donaldson LE (1984c): Dose of FSH-P as a source of variation in embryo production from superovulated cows. *Theriogenology* 22, 205

Donaldson LE (1984d):. The day of estrous cycle that FSH is started and superovulation in cattle. *Theriogenology* 22, 97-99

Donaldson LE (1985): Matching of embryo stages and grades with recipient oestrus synchrony in bovine embryo transfer. *Veterinary Record* 117, 489-491

Donaldson LE (1986a): Day of embryo collection, quality and pregnancy rates in cattle. *Veterinary Record* 118, 661-663

Donaldson LE (1986b): Embryo production by SUPER-OV and FSH-P. *Theriogenology* 33, 214 (Abstrakt)

Donaldson LE, Ward DN (1986): Effects of luteinizing hormone on embryo production in superovulated cows. *Veterinary Record* 119, 625-626

Donaldson LE , Ward DN, Glenn SD (1986) : Use of porcine follicle stimulating hormone after chromatographic purification in superovulation of cattle. *Theriogenology* 25, 747-757

Du F, Looney CR, Yang X (1996): Evaluation of bovine embryos produced in vitro vs. in vivo by differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells. *Theriogenology* 45, 211

Ede P, Florin B, Khodja S, Humblot P (1999): Effect of the puncture of the largest follicle on embryo yield after superovulation in dairy cattle. 15 e Réunion A.E.T.E. Lyon, S. 148

Edwards LM, Rahe CH, Griffin JL, Wolfe DF, Marple DN, Cummins KA, Pitchett JF (1987) : Effect of transportation stress on ovarian function in superovulated Hereford heifers. *Theriogenology* 28, 291-299

Elsaesser F, Sacher B, Haupt P, v. Schutzbar W, Schmidt D (1981): Relationship between the concentration of progesterone in milk and ovarian response to superovulation treatment in the cow. *Zuchthygiene* 16, 193-200

Elsden RP (1977): Embryo collection by surgical methods. In: Embryo transfer in farm animals. A review of techniques and applications. Monogr. No. 16. Agric. Canada, Ottawa, ON, S.10

Elsden RP, Nelson LD, Seidel GE (1978): Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotropin. *Theriogenology* 9, 17-26

Estrada JL, Pachón LA, Olivera M, Piedrahita J, Westhusin M (1998): Superovulatory response of Colombian Creole cattle to two doses of FSH. *Theriogenology* 49, 377

Farin PW, Britt JH, Shaw DW, Sleening BD (1995): Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology* 44, 339-350

Ferguson EM, Leese HJ (1999): Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 116, 272-278

Fernández M, Sánchez L, Alvarez FS, Vázquez C, Iglesias A (1993): Superovulation in Rubia Gallega cows with a single subcutaneous injection of FSH. *Theriogenology* 39, 217 (Abstrakt)

Foote RH, Ellington JE (1988): Is a superovulated oocyte normal? *Theriogenology* 29, 111-123

Fortune JE, Sirois J, Quirk SM (1988): The growth and difference of ovarian follicle during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 29, 95-109

Fortune JE, Sirois J, Turzillo AM, Lavoie M (1991): Follicle selection in domestic ruminants. *Journal of Reproduction in Domestic Animals. (Suppl.)* 43, 187-198

Frei RE, Schultz GA, Church RB (1989): Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 86, 637-641

Fricke PM, Kirsch JD, Reynolds LP, Redmer DA (1994): Studies of FSH-P induced follicular growth in cows. *Theriogenology* 422, 43-53

Fukui Y, Ono H (1989): Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilisation, cleavage and development of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 86, 501-506

Furnos CC, de Matos DG, Martinez AG (1998): Effect of hyaluronic acid on development of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 49, 1489-1499

Garcia-Winder M, Lewis PE, Bryner RW, Baker RD, Inskeep EK, Butcher RL (1988): Effect of age and norgestomet on endocrine parameters and production of embryos in superovulated beef cows. *Journal of Animal Science* 66, 1974-(1981)

Gardner DK, Leese HJ (1986): Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured pre-implantation mouse embryos. *Human Reproduction* , 25-27

Gardner DK, Leese HJ (1987): Assessment of embryo viability prior to transfer by the noninvasive measurement of glucose uptake. *J Exp Zool* 242, 103-105

Gardner RL, Papaioannou VE, Barton SC (1973): Origin of the ectoplacental cone and secondary giant cells in mouse blastocyst reconstituted from isolated trophoblast and inner cell mass. *J Embryol Exp Morph* 30, 561-572

Giles JR, Foote RH (1995): Rabbit blastocysts: Allocation of cells to the inner cell mass and trophectoderm. *Molecular Reproduction and Development* 41, 204-211

Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L (1989a): Composition and characteristics of follicle waves during bovine estrous cycle. *Animal Reproduction Science* 20, 187-200

Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L (1989b): Intraovarian relationship among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. *Theriogenology* 32, 787-795

Glatzel PS, Hagerodt H (1988): Zur Fruchtbarkeitskontrolle von Milchrindern im Prae-Service und perikonzeptionellen Zeitraum. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 101, 239-242

Glatzel PS (1992): Zur Problematik von Biotechniken in der Fortpflanzungsbiologie und der Veterinärmedizin. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 110, 166-170

Glatzel PS, Busse T, Görlach A (1999): Superovulation und Embryonenausbeute in Embryotransferprogrammen bei Milchrindern. *Tierärztliche Praxis* 27 (G), 219-222

Goncalves PBD, Gregory RM, Rodrigues JL (1987): The efficiency of 2 nonsurgical techniques for bovine embryo recovery on days 6 and 7 of the estrous cycle. *Theriogenology* 38, 25-30

Gong JG, Bramley TA, Webb R (1993a): The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 97, 247-254

Gong JG, Bramley TA, Wilmut I, Webb R (1993b): Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biology of Reproduction* 48, 1141-1149

Gong JG, Baxter G, Bramley TA, Webb R (1997): Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: A dose-response study. *Journal of Reproduction and Fertility* 110, 91-97

Gonzalez A, Lussier JG, Carruthers TD, Murphy BD, Mapletoft RJ (1990): Superovulation of beef heifers with Folltropin: a new preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology* 33, 519-529

Görlach A (1997): Embryotransfer beim Rind. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

Goulding D, Williams DH, Duffy P, Boland MP, Roche JF (1990): Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. *Theriogenology* 34, 767-778

Goulding D, Williams DH, Roche JF, Boland MP (1991): Superovulation in heifers using either pregnant mare's serum gonadotropin or follicle stimulating hormone during the mid luteal stage of the estrous cycle. *Theriogenology* 36, 949-958

Gradela A, Matos SPM, Lanza JA, Deragon LAG, Barbosa JC, Esper CR (1999): A dominant follicle does not affect the superovulatory response in Nelore Cattle but decreases the rate of embryonic viability. 15 e Réunion A.E.T.E. Lyon, S. 148

Grasso F, Guilbault LA, Roy GL, Matton P, Lussier JG (1989a): The influence of the presence of a dominant follicle at the time of initiation of a superovulatory treatment on superovulatory responses in cattle. *Theriogenology* 31, 199

Grasso F, Guilbault LA, Roy GL, Lussier JG (1989b): Ultrasonographic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. *Theriogenology* 31, 1209-1220

Gray BW, Cartee RE H, Stringfellow DA, Riddell MG, Riddell KP, Wright JC (1992): The effect of FSH-priming and dominant follicle – regression on the superovulatory response in cattle. *Theriogenology* 37, 631-639

Greve T (1976): Egg transfer in the bovine: Effect of injecting PMSG on different days. *Theriogenology* 5, 15-19

Greve T, Lehn-Jensen H, Rasbech NO (1978): Control of Reproduction in the cow, S. 363 (EEC Symposium, Galway, Ireland). Sreenan JM (Hrsg.), Commission of the European Communities, Luxembourg

Greve T, Lehn-Jensen H, Rasbech NO (1979): Morphological evaluation of bovine embryos collected surgically from superovulated dairy cows on day 6 – 7,5: A field study. *Ann.Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 19, 1599-1611

Greve T, Callesen H, Hyttel P (1983): Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. *Nord. Vet. Med.* 35, 408-421

Greve T, Callesen H, Hyttel P (1984): Plasma progesterone profiles and embryo quality in dairy cows. *Theriogenology* 21, 238

Greve T, Callesen H, Hyttel P, HØier R, Assey R (1995): The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43, 41-50

Grimek HJ, Gorski J, Wentworth BC (1979): Purification and characterization of bovine follicle stimulating hormone: Comparison with ovine follicle stimulation hormone. *Endocrinology* 104, 140-147

Guilbault LA, Grasso F, Lussier JG, Rouillier P, Matton P (1991): Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *Journal of Reproduction and Fertility* 91, 81-89

Guilbault LA, Kohram H, Twagiramungu H, Bousquet D, Dufour JJ (1996): Control of follicular dominance and synchronization of follicular waves to improve superovulation in cattle. 12e Réunion A.E.T.E. Lyon, S. 61-71

Gwazdauskas FSW (1972): Adrenocorticotropin alteration of bovine peripheral plasma concentration of cortisol, corticosterone and progesterone. *Journal of Dairy Science* 55, 1165-1169

Hagemann LJ (1999): Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology* 51, 449-459

Hahn J (1978): Superovulation, Embryotransfer und Teilung von Embryonen. *Züchtungskunde* 60, 174-184

Hahn J, Michaelis M, Roselius R, Lederer JA (1987): Untersuchungen über die Eignung von Spenderkühen für den Embryotransfer. *Rinderproduktion* 83, 8-9

Hahn J (1988): Superovulation, ET und Teilung von Embryonen. *Züchtungskunde* 60, 174-184

Hahn J (1992): Attempts to explain and reduce variability of superovulation. *Theriogenology* 43, 41-50

Hahn J (1995): Embryotransfer – Auswahl der Spendertiere. In: E. Grunert (Hrsg.), *Buiatrik*. Verlag M.&M. Schaper, Hannover, S. 284

Halley SM, Rhodes III RC, McKellar LD, Randel RD GE (1979): Successful superovulation, nonsurgical collection and transfer in embryos from Brahman Cows. *Theriogenology* 12, 97-108

Hamerton JL (1971): *Human Cytogenetics*. Vol. 1, General Cytogenetics. Academic Press Inc. New York

Handyside AH, Hunter S (1984): A rapid procedure for visualising the inner cell mass and trophectoderm nuclei of mouse blastocysts in situ using polynucleotide-specific flouorochromes. *J Exp Zool* 231, 429-434



Hanselmann D, Koll H (1994): Einfluß verschiedener Faktoren auf den Superovulationserfolg bei Spenderkühen und Auswirkungen der Superovulation auf Produktionsmerkmale. ET-Tagung (ET-D). Mariensee

Hardy K, Handyside AH, Winston RH (1989a): The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development* 107, 597-604

Hardy K, Hooper MAK, Handyside AH, Rutherford AJ, Winston RML, Leese HJ (1989b): Non-invasive measurement of glucose and Pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction* 4, 188-191

Hare WCD, Singh EL, Betteridge KJ, Eaglesome MD, Randall GCB, Mitchell D, Bilton RJ, Trounson AO (1980): Chromosomal analysis of 159 bovine embryos collected 12 to 18 days after estrus. *Can J Genet Cytol* 22, 615-626

Hasler JF, Brooke GP, McCauley AD (1981): The relationship between age and response to superovulation in Holstein cows and heifers. *Theriogenology* 15, 109

Hasler JF, McCauley AD, Schernerhorn EC, Foote RH (1983): Superovulation rates in holstein cows. *Theriogenology* 19, 83-99

Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF, Foote RH (1987): Effect of donor-embryo-recipient-interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* 27,139-168

Hasler JF (1992): Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *Dairy Sci* 75, 2857-2879

Hasler JF (1998): The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. *Journal of Animal Science* 76 (Suppl.3), 52-74

Hasler JF (2001): Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56, 1401-1415

Hawk HW, Tanabe TY (1986): Effect of unilateral cornual insemination upon fertilization rate in superovulating and single-ovulating cattle. *Journal of Animal Science* 63, 51

Hawk HW, Conley HH, Wall RJ, Whitaker RO (1988): Fertilization rates in superovulating cows after deposition of semen on the infundibulum, near the uterotubal junction or after insemination with high numbers of sperm. *Theriogenology* 29, 1131-1142

Hernandez-Ledezma JJ, Sikes JD, Murphy CN, Watson AJ, Schultz GA, Roberts RM (1992): Expression of bovine trophoblast interferon in conceptus derived by in vitro techniques. *Biology of Reproduction* 47, 374-380

Hernandez-Ledezma JJ, Mathialagan N, Villanueva C, Sikes JD, Roberts RM (1993): Expression of bovine trophoblast interferons by in vitro-derived blastocysts is correlated with their morphological quality and stage of development. *Molecular Reproduction and Development* 36, 1-6

Herrler A, Beckers JF, Donnay JV, Niemann H (1988): Purified FSH supplemented with defined amounts of LH for superovulation in dairy cattle. *Theriogenology* 29, 260 (Abstrakt)

Herrler A, Elsaesser F, Parvizi N, Niemann H (1991): Superovulation of dairy cows with purified FSH supplemented with defined amounts of LH. *Theriogenology* 35, 655-643

Herrler A, Einspanier R, Schams D, Niemann H (1994): Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular IGF-1 contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology* 41, 601-611

Heyman Y (1985): Factors affecting the survival of whole and half-embryos transferred in cattle. *Theriogenology* 23, 63-75

Heyman Y, Chesne I, Chupin D, Menezo Y (1987): Improvement of survival rate of frozen cattle blastocysts after transfer with trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 27, 477-484

Hill JT, Kuehner LF (1996): Follicle aspiration prior to Superovulation in cattle. *Theriogenology* 45, 324

Hill KG, Looney CR, Schiewe CR, Godke RA (1984): Effect of different lot numbers of follicle stimulating hormone (FSH-P®) on superovulation response of donor cattle. Theriogenology 21, 241 (Abstrakt)

Hockley DK, Bo GA, Palasz AT, Del Campo MR, Mapletoft RJ (1992): Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: effect of dose and site of injection. Theriogenology 37, 244 (Abstrakt)

Hoppe M (1995): Experimentelle Untersuchungen zur Eingrenzung der superovulatorischen Variabilität beim Rind mittels ultrasonographischer Bestimmung des optimalen Zeitpunktes der Superovulationsinduktion sowie durch chronische GnRH-Zufuhr (Buserelin®). Vet.Med.Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover

Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ (1996): Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. Molecular Reproduction and Development 43, 222-231

Huhtinen M, Rainio V, Aalto J, Bredbacka P, Mäki-Tanila A (1992): Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. Theriogenology 37, 457-463

Humphrey WD, Murphy BD, Rieger D, Mapletoft RJ, Manns J, Fretz PD (1979): Effects of FSH/LH ratio of PMSG on ovulatory responses. Theriogenology 11, 101 (Abstrakt)

Hyttel P, Callesen H, Greve T, Schmidt M (1991): Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. Theriogenology 35, 91-107

Hyttel P, Viuff D, Fair T, Laurincik J, Thomsen PD, Callesen H, Vos PLAM, Hendriksen PJM, Dieleman SJ, Schellander K, Besenfelder U, Greve T (2001): Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. Journal of Reproduction and Fertility 122, 21-30

Ireland JJ (1987): Control of follicular growth and development. Journal of Reproduction and Fertility 34, 39-54

Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T (1990): Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *Journal of Reproduction and Fertility* 90, 279-284

Jacobs PA (1990): The role of chromosome abnormalities in reproductive failure. *Repr Dev Suppl* 1: 63-74

Janowitz U (1991): ET beim Jungrind: Chancen und Risiken. *Der Tierzüchter* 43, 4-15

Javed MH, Wright RW Jr. (1991): Determination of pentose phosphate and Embden-Meyerhof pathway activities in bovine embryos. *Theriogenology* 35, 1029-1037

Jensen AM, Greve T, Madej A, Endquist LE (1982): Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF<sub>2α</sub> - treated cow. *Theriogenology* 18, 33-44

Jillella D, Baker AA (1978): Transcervical transfer of bovine embryos. *The Veterinary Record* 103, 574-576

Kafi M, McGowan MR, Jillella D, Davies F, Johnston S, Kirkland PD (1994): The effect of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) during follicular development on the superovulatory response of cattle. *Theriogenology* 41, 223

Kafi M, McGowan MR, Jillella D, Fenwick D, Johnston S, Kirkland PD (1996): The effect of Bovine Pestivirus on ovulation in superovulated fresian heifers. *Theriogenology* 45, 317

Kafi M, McGowan MR (1997): Factors associated with variation in the superovulation of cattle. *Animal Reproduction Science* 48, 137-157

Kahn W (1989): Die Entwicklung von Follikeln beim Rind. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* 102, 44-49

Kaidi S, Van Longendonck A, Massip A, Dessy F, Donnay I (1999): Cellular alteration after dilution of cryoprotective solutions used for the vitrification of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 52, 515-525

Kanitz E, Kanitz W, Delzer W, Schmidt HE, Kitzig M, Schneider F (1990): Die Nutzung der LH-Analytik zur Bestimmung des optimalen Besamungszeitraumes nach Superovulationsbehandlungen. Monatshefte für Veterinärmedizin 45, 123-125

Kasiraj R, Mutha Rao M, Rangareddi NS, Misra AK (1992): Superovulatory response in buffaloes following single subcutaneous or multiple intramuscular FSH administration. Theriogenology 37, 234 (Abstrakt)

Kastelic JP (1994): Understanding ovarian follicle development in cattle. Veterinary Medicine 89, 44-49

Kauffold P, Thamm I (1985): Zustandsbeurteilung von Rinderembryonen. Landeszentrum für Tierproduktion Dummerdorf-Rostock

Kawarsky SJ, Basur P, Stubbings RB, Hansen PJ, King WA (1996): Chromosomal abnormalities in bovine embryos and their influence on development. Biology of Reproduction 54, 53-95

Kelly P, Duffy P, Roche JF, Boland MP (1997): Superovulation in cattle – effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. Animal Reproduction Science 46, 1-14

Kim IH, Choi SH, Yean SH, Park SB, Suh GH, Lee BW, Ryu IS, Lee CS, Son DS (2000): Removal of dominant follicle prior to superstimulation promotes follicular growth and ovulation rate in holstein cows. Theriogenology 53, 498

Kim IH, Son DS, Yeon SH, Choi SW, Park SB, Ryu IS, Suh GH, Lee DW, Lee CS, Lee HJ, Yoon JT (2001): Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. Theriogenology 55, 937-945

Kim JH, Funahashi H, Niwa K, Lim JM, Okuda K (1993): Glucose requirement at different developmental stages of in vitro fertilised bovine embryos cultured in semi-defined medium. Theriogenology 39, 875-886

King WA, Gustavsson I, Popescu P, Lineares T (1981): Gametic products transmitted by RCP (13q+; 14q-) translocation heterozygous pigs and resulting embryonic loss. *Hereditas* 99, 257-268

King WA (1985): Intrinsic factors that may affect survival after transfer. *Theriogenology* 23, 161-169

King WA, Seidel JG Jr., Elsdon RP (1985): Bovine embryo transfer pregnancies. I. Abortion rates and characteristics of calves. *Journal of Animal Science* 61, 747-757

King WA, Guay P, Picard L (1987): A cytological study of 7-day-old bovine embryos of poor morphological quality. *Genome* 29, 160-164

King WA (1990): Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. McFeely RA (Hrsg.), *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. San Diego, CA: Academic Press; 34, 229-250

King WA, Yadav BR, Xu KP, Picard L, Sirard MA, Supplizi AV, Betteridge KJ (1991): The sex ratios of bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Theriogenology* 36, 779-788

Ko JHC, Kastelic JP, Cang MRD, Ginther OJ (1991): Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 91, 511-519

Kohram H, Bouquet D, Durocher J, Guilbault LA (1995): Follicular status and superovulation in cattle: a field trial. *Theriogenology* 43, 252

Kohram H, Bouquet D, Durocher J, Guilbault HLA (1998a): Alteration of follicle dynamics and superovulatory response by GnRH and follicle puncture in cattle. *Theriogenology* 49, 1165-1174

Kohram H, Bouquet D, Burocher J, Guilbault HLA (1998b): Ovarian superstimulation after follicle wave synchronisation with GnRH at 2 different stages of estrous cycle in cattle, *Theriogenology* 49, 1175-1186

Kunkel RN, Stricklin WR (1978): Donor-recipient asynchrony, stage of embryo development and post-transfer survival of bovine embryos. *Theriogenology* 9, 96

Kweon OK, Kanagawa H, Takahashi Y, Yamashina H, Seiko N, Ivezumi Y, Aoygagi Y, Ono H (1986): Factors affecting superovulatory response in cattle. *Japanese Journal of Veterinary Science* 48, 495-503

Lauria A, Genazzani AR, Oliva O, Inaudi R, Cremonesi F, Monittola C, Aureli G (1982a): Clinical and endocrinological investigation on superovulation induced in heifers by human menopausal gonadotrophin. *Journal of Reproduction and Fertility* 66, 219-225

Lauria A, Oliva O, Genazzani AR, Cremonesi F, Crotti S, Barbetti M (1982b): Improved method to induce superovulation in cattle using Human Menopausal Gonadotropin (HMG). *Theriogenology* 18, 357-364

Laurincik J, Oberfrance M, Hyttel P, Grafenau P, Tomanek M, Pirko J (1993): Characterisation of the ovulatory period in superovulated heifers. *Theriogenology* 39, 537-544

Lautner M (1997): Embryonenausbeute beim Rind nach Aspiration der Flüssigkeit großer Follikel mit Hilfe einer Ovarpunktionskanüle vor der Superovulationseinleitung unter besonderer Berücksichtigung von Progesteron, Östradiol und IGF-1 Werten in den Punktaten. *Vet. Med. Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover*

Lavoie M, Fortune JE (1990): Follicular dynamics in heifers after Injection of PGF<sub>2α</sub> during the first wave of follicular development. *Theriogenology* 33, 270

Leese HJ, Barton AM (1984): Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 72, 9-13

Leese HJ (1987): Analysis of embryos by non-invasive methods. *Human Reproduction* 2, 37-40

Lehn-Jensen H, Greve T (1978): Low temperature preservation of cattle blastocysts. *Theriogenology* 9, 313-321

Leibo SP, Pollard JW, Martino A (1993): Chilling and freezing sensitivity of 'reassembled' in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology* 39, 265 (Abstrakt)

Lerner SP, Thayne WV, Baker RD, Henschen T, Meredith S, Inskip EK, Dailey RA, Lewis PE, Butcher RL (1986): Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *Journal of Animal Science* 63, 176-183

Lester TD, McNew RW, Rorie RW (1999): Use of electronic estrous detection to evaluate the effect of embryo-recipient synchrony on pregnancy rate in cattle. *Theriogenology* 51, 265 (Abstrakt)

Lindner GM, Wright RW Jr. (1983): Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20, 407-416

Lindsell CE, Murphy RD, Mapletoft RJ (1986): Superovulation and endocrine response in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 26, 209-219

Lindsey BR, Looney CR, Funk DJ, Faber DC (1994): The effect of apparent dominant follicle removal (DFR) prior to FSH treatment on superstimulated response in problem donors. *Theriogenology* 41, 238

Lineares T (1981): A morphological study of the blastocysts collected from repeat breeder heifers. *Theriogenology* 15, 128

Long CR, Dobrinsky JR, Garrett WM, Johnson LA (1998) : Dual labeling of the cytoskeleton and DNA strand breaks in porcine embryos produced in vivo and in vitro. *Mol Reprod Dev* 51, 59-65



Looney CR, Oden AJ, Massey JM, Johnson CA, Godke RA (1984): Pregnancy rates following HCG administration at the time of transfer in embryo-recipient-cattle. *Theriogenology* 21, 246 (Abstrakt)

Lopes da Costa L, Chagas e Silva J, Silva R (2001): Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology* 56, 65-77

López-Gatius F, Camón-Urgel J, Angula A, Asensio E (1988): Effects of single deep insemination on transferable embryo recovery rates in superovulated dairy cows. *Theriogenology* 30, 877

Lucy MC, Savio JD, Badinga L, Sota RLDL, Thatcher WW (1992): Factors that affect ovarian follicle dynamics in cattle. *Journal of Animal Science* 70, 3615-3626

Lunaas T (1970): Urinary oestrogens in ovariectomized cows after administration of ACTH. *Acta Vet. Scand.* 11, 329-330

Lussier JG, Matton P, Dufour JJ (1987): Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 81, 301-307

Lussier JG, Carruthers TD (1989): Endocrine and superovulatory response in heifers protreated with FSH or bovine follicle fluid. *Theriogenology* 31, 775-794

Maciel M, Gustafsson H, Rodriguez-Martinez H (1995): Superovulatory response in lactating cows with different follicular dynamics. *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, A42, 123-125

MacMillan KL, Taufa VK, Hayman DL (1997): Effects of injecting GnRH seven days before using FSH to superovulate cows. *Theriogenology* 47, 157

MacMillan KL, Thatcher WW (1991): Effects of an agonist of gonadotropin releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biology of Reproduction* 45, 883-889

Magnuson T, Epstein CJ (1981): Genetic control of very early mammalian development. *Biol. Rev.* 56, 369-408

Manciaux L, Ponsart C, Grisouard D, Humblot P (1999) : Paternal influence on embryo yield following superovulation in the Montbeliarde Breed. 15 e Réunion A.E.T.E. Lyon, S. 200.

Manciaux L, Ponsart C, Grisouard D, Humblot P (2000) : Sources of Variation in Embryo production following superovulation in the Montbeliarde Breed. *Theriogenology* 53, 502

Mantovani R, Enright WJ, Keane MG, Roche JF, Boland MO (1993): Effect of nutrition on follicle stimulating hormone (FSH) on superovulatory response in beef heifers. *Proc. 9<sup>th</sup> A.E.T.E. (1993), S. 234 (Abstrakt)*

Mapletoft RJ, Gonzalez A, Lussier JG (1988): Superovulation of beef heifers with Folltropin or FSH-P. *Theriogenology* 29, 274 (Abstrakt)

Massey JM, Oden A.J (1984): No seasonal effect on embryo donor performance in the southwest region of the USA. *Theriogenology* 21, 196-217

Matteri RL, Moberg GP (1982): Effect of cortisol or adrenocorticotrophin on release of luteinizing hormone induced by luteinizing hormone releasing hormone in the dairy heifer. *J. Endocrinol.* 92, 141-146

Matton P, Adalakoun V, Couture Y, Dufour JJ (1981): Growth and replacement of the bovine follicles during the estrus cyclus. *Journal of Animal Science* 52, 813-820

Maurer RR, Suss U, Wise TH (1987): Oocyte quality in superovulated beef heifers with and without Norgestomet implants. *Theriogenology* 27, 256

McGowan MR, Braithwaite M, Jochle W, Mapletoft RJ (1985): Superovulation of beef heifers with Pergonal (hMG): A dose response trial. *Theriogenology* 24, 173-184

Medina MJ, Basualdo M, Ferré LB, Brogliatti GM (2001): Embryo recipient estrous synchronisation in a commercial bovine embryo transfer program. *Theriogenology* 55, 365

Menard DP, Martinez D (1997): We can identify our better donor cows by collecting them as heifers. 13 e Réunion A.E.T.E Lyon, S. 178.

Mengel T (1988): Untersuchungen zur Auswahl von Spendertieren für den Embryotransfer unter Berücksichtigung des Vorberichts und verschiedener Blutparameter. Vet. Med. Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover.

Mihm M, Diskin MG, Roxhe JF (1996): Regulation of follicle wave growth in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 31, 531-538

Misra AK, Chaubal SA, Krishna Kishore G, Rajeshwaran S, Joshi BV, Jaiswal RS (1992): Superovulatory response to single subcutaneous injection of Folltropin in Holstein and Sahiwal cows. *Theriogenology* 37, 260 (Abstrakt)

Misra AK, Rao MM, Kasiraj R, Reddy NS, Pant HC (1999): Factors affecting pregnancy rate following nonsurgical embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*): a retrospective study. *Theriogenology* 52, 1-10

Mohr LR, Trounson AO (1980): The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse. *Journal of Reproduction and Fertility* 58, 189-196

Moncada Angel AH (1979): Endoskopische Untersuchungen beim Rind mit besonderer Berücksichtigung der Superovulation. Vet.Med.Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover

Monniaux D, Chupin D, Saumande J (1983): Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19, 55-64

Moor RM, Kruip Th. AM, Green D (1984): Intraovarian control of folliculogenesis: Limit to superovulation. *Theriogenology* 21, 103- 116

Moyaert I, Bouters R, Schonherr OT, Wilderbeek ATM, Coert A, Coryn M, Vandelplassche M (1985): The use of monoclonal PMSG antibody in cows superstimulated with PMSG. *Zuchthygiene* 20, 49-53

Müller C (1988): Untersuchungen zur Feststellung der Eignung von Spenderkühen für den Embryotransfer. Vet. Med. Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover

Müller R (1989): Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Embryonenqualität und Versuche zur chromosomalen Geschlechtsbestimmung von Rinderembryonen. Vet. Med. Diss. Tierärztliche Hochschule Hannover

Münnich A, Busch W (1992): Klinische und endokrinologische Untersuchungen nach Auslösung von Mehrfachovulationen beim Rind. Monatshefte für Veterinärmedizin 47, 289-296

Murphy WD, Mapletoft RJ, Manns J, Humphrey WD (1984): Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. Theriogenology 21, 117-125

Murphy MG, Enright WJ, Crowe MA, McConnell, Spicer LJ, Boland MP, Roche JF (1991): Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle on beef heifers. Journal of Reproduction and Fertility 92, 333-338

Nadeau Y, Sirard MA, Lacouline L, Fortier MA (1994): Prostaglandin production as a indicator of bovine embryo quality at the early blastocyst stage. Theriogenology 41, 263

Nasser LE, Adams GP, Bo GA, Mapletoft RJ (1993): Ovarian superstimulatory response relative to follicle wave emergence in heifers. Theriogenology 40, 713-714

Negrão S, Nibart M, Humblot P (1997): Negative effects of overfeeding on superovulatory response and embryo production in dairy heifers. 13 e Réunion A.E.T.E. Lyon (1997), S. 186

Nelson LD, Elsdon RP, Seidel GE Jr. (1982): Effect of synchrony between estrous cycles of donors and recipients on pregnancy rates in cattle. Theriogenology 17, 101

Newcomb R, Rowson LEA, Trounson AO (1976): The entry of superovulated eggs into the uterus. In: Egg transfer in Cattle. Rowson LEA (Hrsg.). Commission of the European Communities. Eur. 5491, S. -15

Newcomb R (1980): Investigation of factors of superovulation and non-surgical embryo recovery from lactating British Friesian cows. The Veterinary Record 106, 48-52

Newsholme EA, Leech AR (1983): Biochemistry for the medical science. John Wiley & Sons, Chichester

Niemann E, Schilling E, Sacher B (1981a): Einfluß eines Progesteron Depots (PRID) auf das Superovulationsergebnis bei Kühen. Zuchthygiene 16, 86

Niemann H, Schilling E, Sacher B, Schmidt D (1981b): Der FDA- und DAPI-Test- Ein Beitrag zur Vitalitätsbeurteilung von Rinderembryonen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 94, 441-445

Niemann H (1986): Möglichkeiten und Grenzen des Embryotransfer bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Tierärztliche Umschau 41, 625-633

Niemann H (1989): Biotechnologische Studien an präimplantatorischen Embryonen von Rind und Schwein. Enke-Verlag, Stuttgart

Niemann H, Meinecke (1993): Auswahl der Spendertiere und Auslösung der Superovulation. In: H. Niemann, B. Meinecke (Hrsg.), ET und assoziierte Biotechniken bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Friedrich Enke Verlag, Stuttgart, S. 8.

Nohner HP, Hahn J, Hahn R (1996): Optimierung der Embryonenausbeute beim Rind durch Aspiration der Flüssigkeit großer Follikel vor Einleitung der Superovulation mit Hilfe einer Ovalpunktionskanüle. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 103, 302-305

Nolan R, O'Callaghan D, Duby RT, Lonergan P, Boland MP (1998): The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. Theriogenology 50, 1263-1274

O'Neill C, Collier M, Ryan JP, Spinks NR (1989): Embryo-derived Platelet activating factor. Journal of Reproduction and Fertility 51, 19-27

Olivera-Angel M, Voss HJ, Holtz W (1984): Recovery rate and quality of embryos collected from suckled cows and beef heifers after superovulation with PMSG. Theriogenology 22, 553-562

Onuma H, Hahn J, Foote RH (1970): Factors affecting superovulation, fertilization and recovery of superovulated ova in prepuberal cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 21, 119-126

Otoi T, Koyama N, Yamamoto K, Tachikawa S (1998a): Superovulatory response in beef cows following removal of the largest ovarian follicle. *The Veterinary Record* 142, 402-403

Otoi T, Koyama N, Yamamoto K, Tachikawa S (1998b): Superovulatory response in Japanese black beef cows following largest follicle aspiration or hCG treatment. *Journal of Veterinary Medical Science* 60, 961-963

Overström EW (1992): Manipulation of early embryonic development. *Animal Reproduction Science* 28, 277-285

Overstrom EW, Duby RT, Dobrinsky J, Roche JF, Boland MP (1992): Viability and oxidative metabolism of bovine blastocysts. *Theriogenology* 37, 269 (Abstrakt)

Overström EW (1996): In vitro assessment of embryo viability. *Theriogenology* 45, 3-16

Papaioannou VE, Ebert KM (1988): The preimplantation embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst in vivo and in vitro. *Development* 102, 793-803

Partridge RJ, Pullar D, Wrathall AE, Leese HJ (1996): Consumption of amino acids by in vivo and in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 45, 181 (Abstrakt)

Pawlyshyn V, Lindsell CE, Braithwaite M, Mapletoft RJ (1986): Superovulation of beef cows with FSH-P: a dose-response trial. *Theriogenology* 25, 179

Petr J, Mika J, Jilek F (1990): The effect of PMSG-priming on subsequent superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology* 33, 1151-1155

Pierson RA, Ginther OJ (1988): Follicular populations during estrous cycle in heifers. Time of selection of the ovulatory follicle. *Animal Reproduction Science* 16, 81-95

Pirchner P, Zwiauer D, Butler JV, Claus R (1983): Environmental and genetic influences on post partum milk progesterone profiles of cows. *Z Tierzüchtg Züchtungsbiol* 100, 304-315

Pokorny R, Saner R, Zürcher A, Pokorny B (1996): Einfluss des Zyklustages zu Beginn der Superovulation auf das Spülergebnis. ET-Tagung, Marktredwitz.

Pollard JW, Leibo SP (1994): Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 41, 101-106

Ponsart C, Govignon A, Rohou A, Manciaux L, Delcroix P, Grisouard D, Humblot P (2001): Effect of the paternal origin of the donor cow on embryo production after superovulation in the prim holstein and Montbeliarde breeds. *Theriogenology* 55, 369

Prado Delgado AR, Elsden RP, Seidel Jr. GE (1984): Effects of GnRH on response to superovulation in cattle. *Theriogenology* 21, 254

Prather RS, First NL (1993): Cell-to-cell coupling in early-stage bovine embryo: a preliminary report. *Theriogenology* 39, 561-567

Price CA, Carriere PD, Goselin N, Kohram H, Guilbault LA (1999): Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle and consequences for embryo production. *Theriogenology* 51, 37-46

Purwantara B, Schmidt M, Greve T, Callesen H (1993): Follicle dynamics prior to and during superovulation in heifers. *Theriogenology* 40, 913-921

Purwata B, Callesen H, Greve T (1994): Characterisation of ovulation in superovulated cattle. *Animal Reproduction Science* 37, 1-5

Putney DJ, Drost M, Thatcher WW (1989): Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology* 31, 765-778

Rajamahendran R, Causeco RS, Denbw CJ (1987): Effect of low dose of FSH given at the beginning of the estrous cycle and subsequent superovulatory response in Holstein cows. *Theriogenology* 28, 59-64

Rajamahendran R, Sianangama PC (1992): Effect of human chorionic gonadotrophin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates. *Journal of Reproduction and Fertility* 95, 577-584

Rajamahendran R, Calder MD (1993): Superovulatory response in dairy cows following ovulation of the dominant follicle of the first wave. *Theriogenology* 40, 99-109

Renard JP, Heyman Y (1979): Variable development of superovulated ovine embryos between day 6 and 12. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 19, 1589-1598

Renard JP, Phillippon A, Menezo Y (1980a): In-vitro uptake of glucose by bovine blastocysts. *Journal of Reproduction and Fertility* 58, 161-164

Renard JP, Heyman Y, Ozil JP (1980b): Importance of gestation losses after non-surgical transfer of cultured and non-cultured bovine blastocysts. *Theriogenology* 13, 109 (Abstrakt)

Renard JP, Menezo Y, Heyman Y (1982): Alternative tests to assess viability of bovine embryos. *Theriogenology* 17, 106 (Abstrakt)

Rieger D (1984): The measurement of metabolic activity as an approach to evaluating viability and diagnosing sex in early embryos. *Theriogenology* 21, 138-149

Rieger D, Desaulnier D, Goff AK (1988): Ovulatory response and embryo yield in superovulated Holstein heifers given a priming dose of FSH-P at day 2 of the estrous cycle. *Theriogenology* 30, 695-699

Rieger D, Guay P (1988): Measurement of the metabolism of energy substrates in individual bovine blastocysts. *Journal of Reproduction and Fertility* 83, 581-591



Rieger D, Palmer E, Langeau D, Tiffin G (1989): Simultaneous measurement of the metabolism of two energy substrates in individual horse and cow embryos. *Theriogenology* 31, 249 (Abstrakt)

Rieger D, Walton JS, Goodwin ML, Johnson WH (1991): The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotrophin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 35, 863-868

Rieger D, Loskutoff NM (1994): Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 100, 257-262

Roberts RM, Cross JC, Leaman DW (1992): Interferons as hormones of pregnancy. *Endocr. Rev.* 13, 432-452

Robertson I, Nelson RE (1991): Certification and identification of the embryo. *IETS Manual* 3<sup>rd</sup> edition, Kapitel 9

Roche JF, O'Callaghan D (Hrsg.) (1987): Follicular growth and ovulation rate in farm animals. Martin Nijhoff, The Hague, The Netherlands

Roche JF, Boland MP (1991): Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. *Theriogenology* 35, 81-89

Romero A, Albert J, Brink Z, Seidel GE Jr. (1991): Number of small follicles in ovaries affect superovulatory response in cattle. *Theriogenology* 35, 265

Rommel P (1991): Embryotransfer. In: *Künstliche Besamung bei Nutztieren*. Busch W, Löhle K, Winfried P (Hrsg.). Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart

Rondeau M, Guay P, Goff AK, Cook GM (1995): Assessment of embryo potential by visual and metabolic evaluation, *Theriogenology* 45, 351-366

Rosenkrans CF Jr, Zeng GQ, McNamara GT, Schoff PK, First NL (1993): Development of bovine embryos in vitro is affected by energy substrates. *Biology of Reproduction* 49, 459-462

Rotman B, Papermaster BW (1966): Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Pro.Natl.Acad.Sci.* 55, 134-141

Roullier P, Matton P, Guilbault L, Grasso F, Lussier J (1990): Influence of a dominant follicle atresia and estradiol release by ovarian follicle during superovulation in cattle. *Theriogenology* 33, 313

Roullier P, Matton P, Guilbault L, Grasso F, Lussier J (1996): Changes in morphological appearance and functional capacity of recruited follicle in cows treated with FSH in the presence or absence of a dominant follicle. *Theriogenology* 46, 1053-1061

Rowson LEA (1971): Egg transfer in domestic animals. *Nature* 233, 379-381

Sacher B, Niemann H, Schilling E, Schmidt D (1987): Auswirkungen wiederholter Superovulation auf Embryonengewinnung und Fruchtbarkeit. *Rinderproduktion* 83, 10

Salamone DF, Adams GP, Mapletoft RJ (1999): Changes in the cumulus-oocyte-complex of subordinate follicles relative to follicle wave status in cattle. *Theriogenology* 52, 549-561

Saumande J, Chupin D (1977): Superovulation: A limit to egg transfer in cattle. *Theriogenology* 7, 144-149

Saumande J, Chupin D, Mariana JC, Ortovant R, Mauleon P (1978): Factors affecting the variability of ovulation rates after PMSG stimulation. In: JM Sreenan (Hrsg.), *Control of reproduction in the cow*. Martin Nijhoff, The Hague, S. 195-225

Saumande J, Chupin D (1982) : The relationship in the response of ovaries of superovulated heifers. *Theriogenology* 17, 107

Saumande J, Procureur R, Chupin D (1984) : Effect of injection time of anti-PMSG antiserum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cows. *Theriogenology* 21, 727-731

Saumande J, Chupin D (1986) : Induction of superovulation in cyclic heifers: the inhibitory effect of large doses of PMSG. *Theriogenology* 25, 233-247

Saumande J (1987): Superovulation des les bovines: Actualities et perspectives. Report of the 3rd Scientific Meeting, A.E.T.E., Lyon (1987), S. 97-141

Savage NC, Howell W, Mapletoft RJ (1987): Superovulation in the cow using estradiol 17 $\beta$  or GnRH in conjunction with FSH-P. *Theriogenology* 27, 383-394

Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF (1988): Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 83, 663-671

Schallenberger E, Ulrich P, Mostl E, Fuchs S, Tenhumberg H (1994): Induction of superovulation in cattle comparing single subcutaneous and repeated epidural with standard intramuscular administration of FSH. *Theriogenology* 41, 290

Schams S, Menzer CH, Schallenberger E, Hoffman B, Hahn J, Hahn R (1978): Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In Sreenan JM (Hrsg.), *Control of reproduction in the cow*. Martin Nijhoff, The Hague, The Netherlands, S. 122-143

Schams D, Menzer C, Schallenberger E, Hoffman B, Prokopp A, Hahn R (1979): Superovulation beim Rind: Hormonprofile bei Stimulation mit Serumgonadotropin (PMSG) bzw. hypophysärem FSH. *Zuchthygiene* 14, 11-25

Schiewe MC, Looney CR, Johnson CA, Hill KG, Godke RA (1987): Transferable embryo recovery rates following different insemination schedules in superovulated beef cattle. *Theriogenology* 28, 395

Schilling E, Niemann H, Cheng SP, Doepke HH (1979): DAPI- a further fluorescence test for diagnoses the viability of early cow and rabbit embryos. *Zuchthygiene* 79, 170-172

Schilling E (1980): Methoden zur Beurteilung der Eignung von Rinderembryonen für die Transplantation. *Der Tierzüchter* 32, 277-279

Schilling E, Sacher B, Schmidt D (1980): Qualität von Eiern und Embryonen superovulierter Kühe. *Zuchthygiene* 15, 30-34

Schilling E (1982): Ergebnisse von Superovulationsbehandlungen – Variabilität und deren Ursachen. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 89, 88-92

Schneider HJ Jr., Castleberry RS, Griffin JL (1980): Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology* 13, 73-85

Scholz G (1987): Untersuchungen zur Induktion von Polyovulationen beim Rind mit dem Ziel der Erzeugung von Zwillingssträchtigkeiten. *Vet. Med. Diss.*, Humboldt-Universität, Berlin

Schwab J (2000): Der Einsatz von Ultraschall zur Untersuchung von Spenderkühen im Embryotransfer. *Diss. Med. Vet.*, München

Seidel GE Jr., Seidel SM (1977): Evaluation of embryos. In: *FAO-Animal production and health paper 1977*, S. 51-66

Seidel GE Jr., Elsden RP, Nelson LD, Hasler JF (1978a): Methods of ovum recovery and factors affecting fertilization of superovulated bovine ova. In: Sreenan JR (Hrsg.), *Control of Reproduction in the Cow*. M. Nijhoff, The Hague, 1978, S. 268-280

Seidel GE Jr., Elsden RP, Nelson LD, Hasler JF (1978b): Superovulation of cattle with pregnant mare's serum gonadotropin and follicle stimulating hormone. In: Sreenan JR (Hrsg.), *Control of Reproduction in the Cow*. M. Nijhoff, The Hague, 1978, S. 159-168

Seidel GE (1980): Critical review of embryo transfer procedures with cattle. In: Mastrianni L Jr., and Briggers JD (Hrsg.): *Fertilization and embryonic development in vitro*. Plenum Press, New York, NY 323-353

Shaw DW, Good TE (2000): Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cows. *Theriogenology* 52, 1521-1528

Shea BF, Hines DG, Lightfoot DE, Ollis GW, Olsen SM (1976): Egg transfer in cattle. LEA Rowson (Hrsg.). Commission of the European Communities, Luxemburg

Shea BF, Janzen RE, McDermid DP (1984): Seasonal variation in response to stimulation and related embryo transfer procedures in Alberta over a nine year period. *Theriogenology* 21, 186-195

Shea DF (1981): Evaluation of the bovine embryo. *Theriogenology* 15, 31-35

Siddiqui MAR, Shamsuddin M, Bhuiyan MMU, Akbar MA, Kamaruddin KM (2002): Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. *Reproduction in Domestic Animals* 37, 37-41

Simpson JL, (1980): Genes, chromosomes and reproductive failure. *Fertility and Sterility* 33, 107-116

Singh SP, Broadbent PJ, Hutchinson JSM, Watt RG, Dolman DF (1996): Follicular dynamics and superovulatory response in heifers. *Animal Reproduction Science* 43, 183-190

Sirois J, Fortune JE (1988): Ovarian Follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction* 39, 308-317

Snyder DA (1986): Superovulation of cows and heifers selected for twinning. *Theriogenology* 25, 200 (Abstrakt)

Spell AR, Beal WE, Corah LR, Lamb GC (2001): Evaluation recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology* 56, 287-297

Spinks NR, Ryan JP, O'Neill C (1990): Antagonists of embryo-derived platelet activating factor act by inhibiting the mouse embryos capacity for implantation. *Journal of Reproduction and Fertility* 88, 241-248

Springmann K, Holtz W, Zerobin K (1986): Hormonal imbalances after superovulation of beef heifers with PMSG. *Theriogenology* 25, 201

Squirrell JM, Wokosin DL, White JG, Bavister BD (1999): Long term two photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability. *Nature Biotechnol* 17, 763-767

Sreenan JM, Beehan D (1976): Methods of induction of superovulation in the cow and transfer results. In: *Egg transfer in Cattle*. Rowson LEA (Hrsg.). Commission of the European Communities. Eur. 5491, S. 19-34

Sreenan JM (1978): Non-surgical embryo transfer in the cow. *Theriogenology* 9, 69-83

Sreenan JM, Diskin MG (1987): Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. *Theriogenology* 27, 99-113

Staigmiller RB, England BG (1982): Folliculogenesis in the bovine. *Theriogenology* 17, 42-52

Stojkovic M, Wolf E, Büttner M, Berg U, Charpagny G, Schmitt A, Brem G (1995): Secretion of biologically active interferon tau by in vitro-derived bovine trophoblastic tissue. *Biology of Reproduction* 53, 1500-1507

Stojkovic M (1996): Untersuchungen zur in vitro Produktion von Rindertrophoblastvesikeln. *Vet. Med. Dis., München*

Stojkovic M, Büttner M, Zakhartchenko V, Brem G, Wolf E (1998): A reliable procedure for differential staining of in vitro produced bovine blastocysts: comparison of tissue culture medium 199 and Ménézo's B2 medium. *Animal Reproduction Science* 50, 1-9

Stojkovic M, Büttner M, Zakhartchenko V, Riedl J, Reichenbach HD, Wenigerkind H, Brem G, Wolf E (1999): Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long-term culture: comparison of in vivo derived, in vitro produced, nuclear transfer and demi-embryos. *Animal Reproduction Science* 55, 151-162

Stringfellow DA, Givens MD (2000): Infectious agents in bovine embryo production: hazards and solutions. *Theriogenology* 53, 85-94

Stock AE, Axtell R, Jones H, Jones G, Hansel W (1990): Evaluation of human and bovine embryos by measurements of PAF in the culture medium. *Theriogenology* 33, 222

Stock AE, Stolla R (1995): Der dominante Ovarfollikel beim Rind - physiologische Zusammenhänge und praktische Bedeutung. *Tierärztliche Umschau* 50, 543-550

Stock AE, Ellington JE, Fortune JE (1996): A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. *Theriogenology* 45, 1091-1102

Stoebel DP, Moberg GP (1982a): Effect of adrenocorticotrophin and cortisol on luteinizing hormone surge and estrous behaviour of cows. *Journal of Dairy Science* 65, 1016-1024

Stoebel DP, Moberg GP (1982b): Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 65, 92-96

Stüwe S (1994a): Klinisch-experimentelle Untersuchungen zur Superovulation nach Eliminierung des dominanten Follikels bei Färsen. *Vet.Med.Diss, FU Berlin*

Stüwe S (1994b): Superovulation von Färsen nach Ausschaltung des dominanten Follikels im frühen Östrus. *Reproduction in Domestic Animals* 29, 212

Takahashi Y, First NL (1992): In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, Pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37, 963-978

Takahashi T und First NL (1993): In vitro culture of bovine one-cell embryos fertilized in vitro using synthetic oviduct fluid medium with and without glucose and supplemented with fetal calf serum. *Animal Reproduction Science* 31, 33-47

Takeda T, Hallowell SV, McCauley AD, Hasler JF (1986): Pregnancy rates with intact and split bovine embryos transferred surgically and non-surgically. *Theriogenology* 25, 204

Techakumphu M, Lohachit C, Tantasuparak W, Intaramongkol C, Intaramongkol S (2000): Ovarian responses and oocyte recovery in prepuberal swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) calves after FSH or PMSG treatment. *Theriogenology* 53, 305-312

Tervit HR, Cooper MW, Goold PG, Haszard GM (1980): Non-surgical embryo transfer in cattle. *Theriogenology* 13, 63-72

Thatcher WW, Guzeloglu A, Mattos R, Binelli M, Hansen TR, Pru JK (2001): Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology* 56, 1435-1450

Thibier M, IETS-Newsletter 2000, 18, S. 24-28

Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Kennedy CJ, Pullar D, Wrathall AE, Leese HJ (1995): Preliminary observations on the uptake of oxygen by day 7 bovine blastocysts. *Theriogenology* 43, 337

Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI, Leese HJ (1996a): Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 196, 299-306

Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Kennedy C, Pullar D, Leese HJ (1996b): Oxygen consumption by day 7 bovine blastocysts: determination of ATP production. *Animal Reproduction Science* 43, 241-247

Tribulo H, Jofre F, Carcedo J, Alonso A, Tribulo R, Bo GA (1993) : Superovulation in *Bos indicus* cattle with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extracts. *Theriogenology* 39, 331 (Abstrakt)

Trounson AO, Willadsen SM, Rowson LEA (1976): The influence of in-vitro culture and cooling on the survival and development of cow embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 47, 367-370



Van Soom A, Vanroose G, Bols PEJ, Boerjan ML, Ysebaert MT, de Kruif A (1996): Morphology and / or hatching ability of in vitro produced be is no reliable indicator of inner cell mass cell number. *Theriogenology* 47, 302

Ushijima M, Okuda T, Nakayama A, Moji K, Ishida K, Murate H, Iguchi A, Etoh T (1988): Relationship between the cell number and quality of day-8 bovine blastocysts. *Proc. 3<sup>rd</sup> East. Jpn. Soc. Anim. Embryo Trans.*, No. 9, S. 37-38

Van Soom A, Boerjan ML, Bols PEJ, Vanroose G, Lein A, Coryn M, de Kruif A (1997a): Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. *Biology of Reproduction* 57, 1041-1049

Van Soom A, de Kruif A, Ysebaert MT (1997b): Relationship between timing of development, morula morphology and cell allocation to inner cell mass and trophoctoderm in vitro produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 47, 47-56

Van Soom A, Vanroose G, de Kruif A (2001): Blastocyst evaluation by Means of differential staining: a practical approach. *Reproduction in Domestic Animals* 36, 29-35

Van Wagtendonk-de Leeuw AM (1996): Evaluation of uniformity among persons in embryo grading from video recordings. *Theriogenology* 45, 230

Viuff D, Rickords L, Offenbergh H, Hyttel P, Avery B, Greve T, Olsaker I, Williams JL, Callesen H, Thompson PD (1999): A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. *Biology of Reproduction* 60, 1273-1278

Vos PLAM, Bevers MM, Willemse AH, Dieleman SJ (1995): Does postponement of preovulatory LH surge affect ovulation rate and embryo yield in superovulated Holstein heifers? *Theriogenology* 43, 344 (Abstrakt)

Wagner WC, Strohbehn RE, Harris PA (1972): ACTH, corticoids, and luteal function in heifers. *Journal of Animal Science* 35, 789-793

Walker SK, Heard TM, Bee CA, Fransham AB, Warnes DM, Seamark RF (1992): Culture of embryos of farm animals. In: Embryonic Development and Manipulation in Animal Production. (Herausgeber: Lauria A und Gandolfi F) pp. 77-92. (Portland Press: London)

Walsh JH, Mantovani R, Duby RT, Overstrom EW, Dobrinsky JR, Enright WJ, Roche JF, Boland MP (1993): The effects of once or twice daily injections of pFSH on superovulatory response in heifers. *Theriogenology* 40, 313-321

Walton JS, Stubbings RD (1986): Factors affecting the yield of viable embryos by superovulated Holstein-friesian-cows. *Theriogenology* 36, 167-175

Ware CB, Northey DL, First NL (1987): Effect of administration of FSH at the beginning of the cycle on the subsequent response to superovulation treatment in heifers. *Theriogenology* 27, 292 (Abstrakt)

West G, West C, Risley D, Donaldson L (1984): Effect of breeding regime on percent ova fertilized in superovulated cows. *Theriogenology* 21, 273

Wiley HE, Bowen MJ, Massey JM, Amoss MS, Blake RW, Kraemer DC (1982): The effect of FSH on sperm transport in cattle. *Theriogenology* 17, 113

Williams CV, Long SE (1980): Effect of superovulation on the chromosome complement of early sheep embryo. Proc. 4<sup>th</sup> Europ. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim. Uppsala, S. 168-171

Wilson JM, Fones AL, Miller DR (1990): Influence of a dominant follicle on the superovulation response. *Theriogenology* 33, 349

Wolfsdorf KE, Diaz T, Schmitt EJP, Thatcher MJ, Drost M, Thatcher WV (1997): The dominant follicle exerts an intraovarian inhibition on FSH-induced follicular development. *Theriogenology* 48, 435-447

Wright JM, Wright RW Jr. (1981): Non-surgical embryo transfer in cattle, embryo-recipient interactions. *Theriogenology* 15, 43-56

Wu M, Wang H, Xu K, Mapletoft RJ (1988): The effect of Estradiol with Synchro-Mate-B in superovulation of beef heifers with FSH-P. *Theriogenology* 29, 333

Wubishet A, Graves CN, Spahr SL, Kesler DJ, Favero RJ (1986): Effects of GnRH treatment on superovulatory response of dairy cows. *Theriogenology* 25, 423-237

Wurth YA, van der Zee-Kotting, Kruip TAM, Dieleman SJ, Bevers MM (1988): Relation between macroscopic qualification of bovine embryos and number of blastomeres. *Proc. 11<sup>th</sup> Int Congr, Dublin* 352

Wurth YA, van der Zee-Kotting W, Dieleman SJ, Bevers MM, Kruip TAM (1994): Presence of mitotic cells: a parameter of embryo quality. *Animal Reproduction Science* 35, 173-182

XU KP, Yadav BR, King WA, Betteridge KJ (1992): Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 31, 249-252

Yaakub H, Williams SA, O'Callaghan D, Boland MP (1997): Effect of dietary intake and glucose infusion on ovulation rate and embryo quality in superovulated ewes. *Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series* (1997); 19, 151 (Abstrakt)

Yaakub H, O'Callaghan D, Boland MP (1999): Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology* 52, 1259-1266

Yamamoto M, Ooe M, Kawaguchi M, Suzuki T (1992): Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 37, 325 (Abstrakt)

Yoshizawa M, Konno H, Zhu S, Kageyama S, Fukui E, Muramatsu S, Kim S, Araki Y (1999): Chromosomal diagnosis in each individual blastomere of 5- to 10-cell bovine embryos derived from in vitro fertilization. *Theriogenology* 51, 1239-250

Zeitoun MM, Yassen AM, Hassan AA, Fathelbab AZ, Echternkamp SE, Wise TH, Maurer RR (1991): Superovulation and embryo quality in beef cows using PMSG and monoclonal anti-PMSG. *Theriogenology* 35, 653-667

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. J. Braun möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung und die gute und stets freundliche Betreuung bedanken.

Herrn Prof. Rudolf Stolla danke ich für den Arbeitsplatz in der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Leidl für die Einführung in die Geheimnisse der Bildbearbeitung, seine persönliche Unterstützung, sowie für die langen, sehr inspirierenden Gespräche und die anregenden Getränke bedanken.

Bei der Firma Minitüb möchte ich mich für die großzügige Bereitstellung einer kompletten EDV-Ausrüstung und für die Überlassung einiger Bilder für den Einsatz in dem Lernprogramm bedanken.

Herrn Dr. C. Leiding möchte ich mich für die Unterkunft und die Möglichkeit, beim BVN praktische Erfahrungen zu sammeln und Bilder für das Lernprogramm anzufertigen, bedanken. Besonders herzlichen Dank schulde ich Herrn Dr. H.-P. Nohner und den anderen Mitgliedern des ET-Teams für ihre geduldige und freundliche Unterstützung.

Meinen Mit-DoktorandInnen Frau W. Stranek, Frau U. Domes, Frau S. Schmauder und E. Keller und Herrn B. Pogorzelski möchte ich mich für die persönliche Unterstützung bedanken.

Meinen aufrichtigen Dank gilt allen Mitarbeitern der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik, insbesondere Frau Dr. B. Santl, Frau Dr. J. Reischl, Frau A. Haenisch-Woehrl, Frau P. Wolf und Frau B. Ferlings.

Mein wichtigster Dank gilt jedoch meiner Familie, ohne deren Vertrauen, Geduld und Unterstützung dies nicht möglich gewesen wäre.





