

**Untersuchungen zur wiederholten Embryoentnahme beim Rind
durch Einsatz verschiedener zyklusunabhängiger
Superovulationsschemata mit Progesteron-freisetzenden
Vaginalspiralen und terminorientierten Besamungen**

Thorsten Faasch

München 2009

Aus dem
Department für Veterinärwissenschaften
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie
Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Dr. Horst-Dieter Reichenbach
Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
Institut für Tierzucht

**Untersuchungen zur wiederholten Embryoentnahme beim Rind
durch Einsatz verschiedener zyklusunabhängiger
Superovulationsschemata mit Progesteron-freisetzenden
Vaginalspiralen und terminorientierten Besamungen**

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

von
Thorsten Faasch
aus Stolberg

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Wolf
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Mansfeld

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Problemstellung	8
2.	Literatur	10
2.1	Entwicklung und aktueller Stand des Embryo-Transfers beim Rind	10
2.2	Follikelwachstum und Follikeldynamik	14
	2.2.1 Physiologische Grundlagen	14
	2.2.2 Regulation des Follikelwachstums	16
2.3	Möglichkeiten zur Steuerung des Zyklus und des Follikelwachstums	17
	2.3.1 Mechanische Entfernung des Dominanten Follikels	17
	2.3.2 Hormonelle Behandlungen	18
	2.3.2.1 Verkürzung der Gelbkörperphase mit Prostaglandin F _{2α}	18
	2.3.2.2 Ovulationssynchronisation	19
	2.3.2.3 Verlängerung oder Verkürzung der Gelbkörperphase mit Gestagenen	22
	2.3.2.4 Kombinationsbehandlungen mit Gestagenen zur Ovulationssynchronisation	23
2.4	Superovulation	24
	2.4.1 Möglichkeiten zur Superovulation beim Rind	24
	2.4.1.1 Zyklusabhängige Einleitung der Superovulation	25
	2.4.1.2 Zyklusunabhängige Einleitung der Superovulation	26
	2.4.1.3 Wiederholte Superovulation	29
2.5	Untersuchungen zu Faktoren die die Ergebnisse von SO/ET beeinflussen	32
	2.5.1 Tierspezifische (Intrinsische) Faktoren	33
	2.5.1.1 Rasse	33
	2.5.1.2 Parität und Alter	33
	2.5.1.3 Biologische Rastzeit und Geburtsverlauf	34
	2.5.1.4 Gesundheitszustand	35
	2.5.1.5 Körpergewicht	35
	2.5.1.6 Milchleistung und Laktationsstadium	36
	2.5.1.7 Individuelle Veranlagung und Abstammung	36

2.5.2 Umweltbedingte (Extrinsische) Faktoren	37
2.5.2.1 Jahreszeit und Klima	37
2.5.2.2 Stress	38
2.5.2.3 Fütterung	39
2.5.2.4 Haltungssystem	41
2.5.2.5 Besamung	41
3. Material und Methoden	43
3.1 Versuchstiere	43
3.2 Versuchsdurchführung	45
3.2.1 Allgemeine Behandlung der Spender- und Empfängertiere	45
3.2.2 Grundschemata zur Superovulationsbehandlung	46
3.2.3 Besamung der Spendertiere	47
3.2.4 Schemata zur wiederholten Superovulation	48
3.2.5 Embryoentnahme und Beurteilung der Embryonen	52
3.2.6 Beurteilung und Tiefgefrierkonservierung der Embryonen	53
3.2.7 Zwischenkultivierung der Embryonen	55
3.2.8 Zyklussynchronisation der Empfänger und Übertragung der Embryonen	55
3.3 Statistische Auswertung	56
3.3.1 Überprüfung der Normalverteilung	56
3.3.2 Statistische Modelle	57
3.3.3 Schätzung der Varianzkomponenten für die Berechnung der Wiederholbarkeit	59
3.3.4 Statistische Signifikanz eines zufälligen Effekts	59
4. Ergebnisse	60
4.1 Superovulation und Embryoentnahme	60
4.1.1 Gesamtzahl an Superovulationen bzw. Embryoentnahmen	60
4.1.2 Embryoerzeugung	61
4.1.3 Einflussfaktoren auf die Ergebnisse der wiederholten Embryoentnahmen	62
4.1.3.1 Individueller Einfluss	63
4.1.3.1.1 Einfluss des Individuums auf die ersten 5 wiederholten Entnahmen	65
4.1.3.2 Alter der Spendertiere zum Zeitpunkt der ersten Superovulation	66

4.1.3.3	Jahreseinfluss	66
4.1.3.4	Jahreszeit	67
4.1.3.5	Superovulationsschema	67
4.1.3.6	Besamung nach Superovulation	69
4.1.3.6.1	Art der Besamung	69
4.1.3.6.2	Anzahl und Zeitpunkt der Besamungen	69
4.1.3.6.3	Besamungsbulle	71
4.1.3.6.4	Besamungstechniker	72
4.1.4	Wiederholbarkeit der Ergebnisse der Embryoentnahmen	73
4.2	Transvaginale Follikelpunktion im Rahmen der Superovulations- behandlung	81
4.3	Zwischenkultivierung nicht tiefgefriertauglicher Embryonen	82
4.4	Übertragung von Embryonen auf Empfängertiere	82
4.5	Kosten der stationären Embryoerzeugung	82
5.	Diskussion	86
5.1	Zyklusabhängige vs. zyklusunabhängige Superovulation	86
5.1.1	Ergebnisse der zyklusabhängigen Superovulation	87
5.1.2	Ergebnisse der zyklusunabhängigen Superovulation	88
5.2	Bedeutung wiederholter Embryoentnahmen	93
5.3	Wiederholte Superovulationen im Vergleich mit OPU/IVP	95
5.4	Kombination der Superovulation mit den Möglichkeiten des OPU/IVP	96
5.5	Einflüsse verschiedener Faktoren	97
5.5.1	Individueller Einfluss	97
5.5.2	Parität und Alter der Spendertiere	98
5.5.3	Jahr und Jahreszeit	99
5.5.4	Besamung	100
5.6	Zwischenkultivierung nicht TG-tgl. Embryonen	102
5.7	Übertragung von Embryonen auf Empfängertiere	103
5.8	Kostenanalyse	104
6.	Zusammenfassung	107
7.	Summary	110

8.	Literaturverzeichnis	112
9.	Abbildungs- und Tabellennachweis	137

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	- Adrenocorticotropin, Adrenocorticotropes Hormon
ADR	- Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter
AMH	- Anti-Müller-Hormon
BCS	- Body condition score
BHV-1	- Bovines Herpesvirus Typ 1
BSA	- Bovines Serum Albumin
BVDV	- Bovine Virusdiarrhoe-Virus
BVD-MD	- Bovine Virus Diarrhoe -Mucosal Disease
CAP	- Chlor-Acetoxy-Progesteron, Chlormadinonacetat
CIDR	- Controlled Internal Drug Release
CL	- Corpus Luteum, Gelbkörper
DAPI	- 4'6-Diamidino-2-Phenylindol
Deg	- degenerierte Embryonen
DF	- Dominanter Follikel
DFV	- Deutsches Fleckvieh
DNA	- Deoxyribonukleinsäure
E ₂ -17β	- Östradiol-17β
ECP	- Östradiol-Cypionat
eCG	- Equine chorionic gonadotropin
ECP	- Östradiol Cypionat
EG	- Ethylenglykol
EGF	- Epidermal Growth Factor, Epidermaler Wachstumsfaktor
ET	- Embryo-Transfer
ET-tgl.	- transfertaugliche Embryonen
EU	- Europäische Union
FDA	- 3'6-Fluorescein-Diacetyl
FGF	- Fibroblast Growth Factor, Fibroblasten-Wachstumsfaktor

FSH	- Follikelstimulierendes Hormon
GF	- Growth Factors, Wachstumsfaktoren
GnRH	- Gonadotropin Releasing Hormon
GOT	- Gebührenordnung für Tierärzte
hCG	- Humanes Choriongonadotropin
IETS	- International Embryo Transfer Society
IGF	- Insulin-like growth factor, Insulinähnliche Wachstumsfaktoren
i.m.	- intramuskulär
IVP	- In-Vitro-Produktion von Embryonen
KB	- Künstliche Besamung
LH	- Luteinisierendes Hormon
MW	- Murnau Werdenfelser
OBV	- Original Braunvieh
OCS	- Oestrus cow serum (Serum östrischer Kühe)
OPU	- Ovum-Pick-Up (transvaginale Follikelpunktion)
OT	- Pustertaler Sprinze
OVSYNCH [®]	- Verfahren zur Ovulationssynchronisation
P ₄	- Progesteron
PBS	- Phosphatpufferlösung nach Dulbecco`s
PGF _{2α}	- Prostaglandin F _{2α}
PMSG	- Pregnant Mare`s Serum Gonadotropin
Pp	- Post partum
PRID	- Progesteron Releasing Intravaginal Device
SAS	- Statistical Analysis System
SO	- Superovulation

SOF - Synthetic oviduct fluid medium

TGF - Transforming Growth Factor, Transformierender Wachstumsfaktor

TG-tgl. - tiefgefriertaugliche Embryonen

Ufos - unbefruchtete Eizellen

1. Einleitung und Problemstellung

In den letzten Jahren ist die Anzahl an Embryoentnahmen und Embryo-Übertragungen beim Rind weltweit kontinuierlich gestiegen. Nach Angaben der International Embryo Transfer Society (IETS) nahm die Zahl der Embryoentnahmen im Zeitraum 1996-2007 weltweit um 30% und der Embryo-Übertragungen um 50% zu. Diese internationale Entwicklung unterstreicht die Bedeutung des Embryo-Transfers (ET) als festen Bestandteil der Rinderzucht. Durch die Anwendung des ET ist es möglich, den Zuchtfortschritt in Milch- und Mastleistung vor allem auf dem Pfad Bullenmutter-Prüfbulle durch die Erhöhung der Reproduktionsrate und der Selektionsintensität zu beschleunigen. Gleichzeitig führt die Erhöhung der Reproduktionsrate zur Steigerung des Zuchtfortschrittes auf der Mutterseite, wodurch sich die genetische Leistungsbereitschaft der gesamten Population nochmals erhöht. Allerdings hängt dies von der Vermehrungsrate und somit von der Effizienz des ET ab. Durch einmaligen ET liegt der Multiplikator bei etwa 3, d.h. 3 zusätzliche Nachkommen pro Jahr und Spender, wodurch kein wesentlicher Zuchterfolg zu erwarten ist. Hinzu kommt, dass bei einmaligem ET die Ergebnisse der Embryoentnahme schlecht vorhersagbar sind und dadurch oftmals nicht die durchschnittlichen Erwartungen erreichen. Würde der ET jedoch wiederholt in kurzen Zeitabständen bei dem gleichen Spender erfolgreich durchgeführt werden, so könnte die dadurch deutlich erhöhte Vermehrungsrate zu einem schnelleren Zuchtfortschritt führen. Neben dem züchterischen Einsatz wird der ET auch für eine schnellere Vermehrung seltener Individuen oder Rassen genutzt. Der Erfolg hängt auch hier wesentlich von der Anzahl der pro Spender gewonnenen transfertauglichen Embryonen ab. Eine zyklusunabhängige Superovulationsbehandlung beim Rind ist generell durch Einsatz von verschiedenen Hormonkombinationen mit Gestagenen möglich. Dadurch wird der Zeitraum zwischen zwei Superovulationsbehandlungen verkürzt und die Embryoentnahmen können in kurzen Zeitabständen von wenigen Wochen wiederholt am gleichen Spendertier durchgeführt werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit soll es sein, die Möglichkeiten der Durchführung wiederholter Embryoentnahmen in kurzen Zeitabständen unter stationären Bedingungen zu prüfen. Zu diesem Zweck werden verschiedene Behandlungsschemata zur wiederholten Superovulation mit Progesteron-freisetzenden Vaginalpessaren und brunstunabhängigen Besamungen an einer größeren Tierzahl verglichen und die Effekte der wiederholten Superovulation und Embryoentnahme unter Berücksichtigung der am stationären ET beteiligten Einflussfaktoren auf die Anzahl und Qualität der gewonnenen Embryonen ermittelt.

Geschehen ist dies im Rahmen eines Kooperationsprojektes zwischen dem Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der LMU München, der Prüf- und Besamungsstation München Grub e.V. und der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft – Institut für Tierzucht – AG Biotechnik. Durchgeführt wurden die Versuche an der Embryo-Entnahmeeinheit und Embryo-Erzeugungseinheit Badersfeld (DE-ETR 006 EWG) des Lehrstuhls für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der LMU-München in Oberschleißheim.

2. Literatur

2.1 Entwicklung und aktueller Stand des Embryo-Transfers beim Rind

Die Reproduktionsbiotechniken haben die Tierzucht in den letzten Jahrzehnten wesentlich verändert. Seit der Geburt des ersten Kalbes aus der Übertragung eines Embryos (WILLET et al., 1951) wurde in den seither vergangenen mehr als fünf Jahrzehnten, vor allem aber ab den 70er Jahren, ein großer technischer Fortschritt erreicht. Inzwischen wird der ET weltweit in beträchtlichem Umfang durchgeführt und hat sich zu einer anerkannten Reproduktionsbiotechnik im Rahmen der Rinderzucht entwickelt (THIBIER, 2008). Mit Hilfe des ET ist es möglich von genetisch wertvollen Tieren trotz geringer Nutzung der natürlichen Fortpflanzungskapazität, von im Durchschnitt nur 4 auf normalem Wege geborenen Kälbern pro Kuh, mehrere Nachkommen zu erzeugen (MAPLETOFT et al., 2002).

Analysiert man die Statistiken der International Embryo Transfer Society (IETS) zur weltweiten Entwicklung des Embryo-Transfers, dann stellt man fest, dass diese Reproduktionsbiotechnik seit 1991 auf ein zunehmendes Interesse bei den Rinderzüchtern gestoßen ist (THIBIER, 1997-2008). Nach Angaben der IETS nahm die Zahl der Embryoentnahmen im Zeitraum 1996-2007 weltweit um 30% und die der Embryo-Übertragungen um 50% zu. Alleine im Jahr 2007 wurden weltweit 763.467 Rinderembryonen aus konventionellem ET erzeugt (Abbildung 1).

Als weitere biotechnische Maßnahme hat die In-vitro-Produktion von Rinderembryonen (IVP) in der Zuchtpraxis Eingang gefunden. Seit der Geburt des ersten Kalbes aus in vitro Fertilisation in vivo gereifter Eizellen (BRACKETT et al., 1982) im Jahr 1981 wurden die Verfahrensschritte der Eizellgewinnung mittels ultraschallgeleitete Follikelpunktion am Tier (OPU = Ovum Pick Up) und die IVP als praxisreife biotechnische Methoden weiterentwickelt (EYESTONE et al., 1987; FUKUI und ONO, 1988; BERG und BREM, 1989; PIETERSE et al., 1991). Seitdem stoßen auch diese Reproduktionsbiotechniken auf ein zunehmendes Interesse bei den Rinderzüchtern.

Abbildung 1 zeigt, dass neben dem konventionellen ET jährlich ab etwa 2000 weltweit auch kontinuierlich immer mehr Embryonen aus IVP erzeugt wurden und diese Techniken inzwischen einen sehr hohen Stand erreicht haben. Alleine im Jahr 2007 wurden weltweit 434.581 Rinderembryonen aus IVP erzeugt. Diese Techniken zur Embryo-Erzeugung wurden 2007 am häufigsten in Brasilien (211.443 erzeugte und 195.811 transferierte Embryonen, hiervon lediglich 4% tiefgefrorene Embryonen), China und Japan (77.020 erzeugte und

32.462 transferierte Embryonen) angewandt (THIBIER, 2008). In Europa kamen 2007 lediglich 5% (5.832 von 112.116) der insgesamt erzeugten Rinderembryonen aus IVP, die Mehrzahl davon wurde in Italien erzeugt. Von den in Europa erzeugten Embryonen stammten 70% aus OPU (THIBIER, 2008).

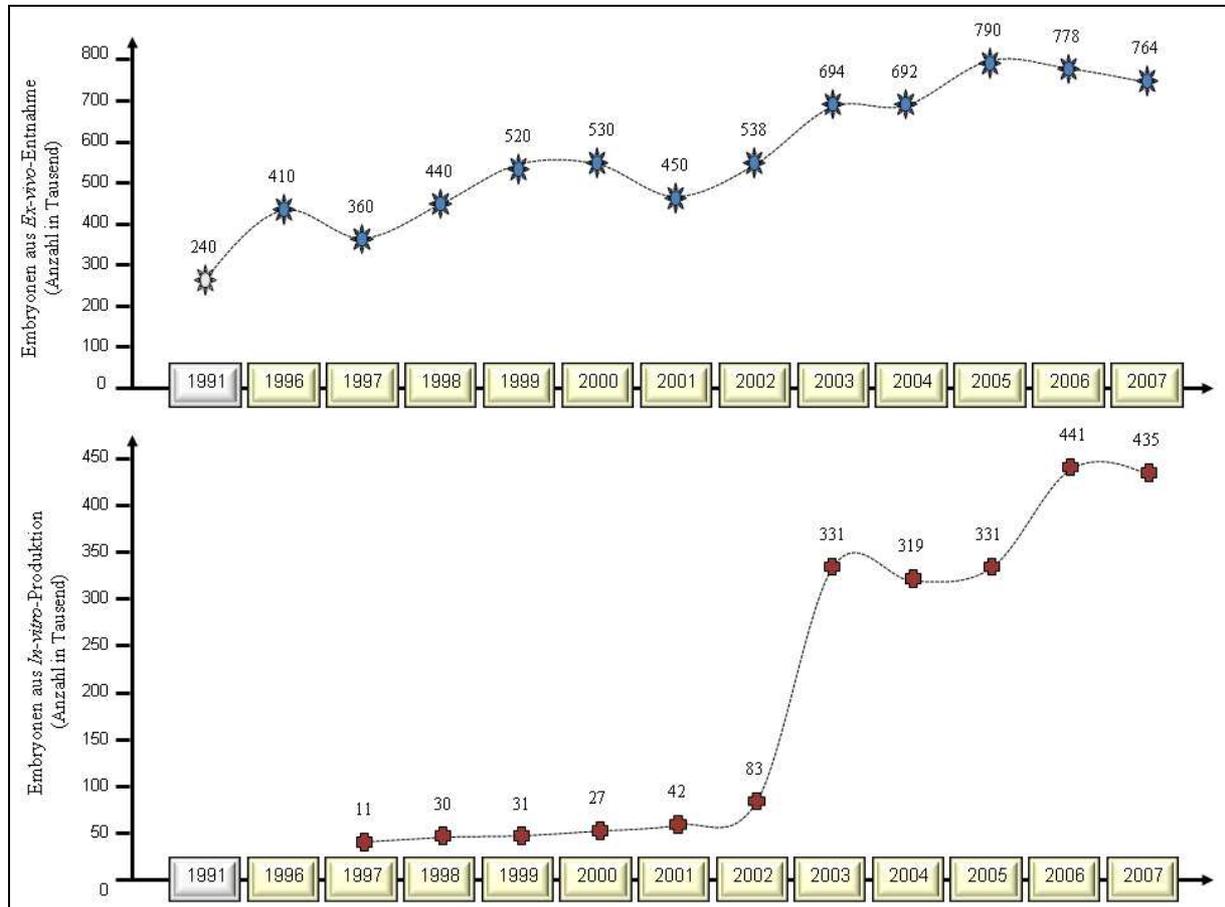


Abb. 1: Weltweit erzeugte Rinderembryonen im Zeitraum 1991-2007 (THIBIER, 1997-2008)

Im Gegensatz zum Aufwärtstrend in der weltweiten Entwicklung, steht die Situation in Deutschland. Seit der erstmaligen Durchführung des ET beim Rind in Deutschland 1974 nahm der ET bis 2000 zunächst einen immer höheren Stellenwert in der Rinderzucht ein.

Abbildung 2 zeigt, dass ab 2001 und in den darauffolgenden Jahren der Trend in Deutschland rückläufig war, mit einem vorläufigen Tiefstand in den Jahren 2003 (Embryo-Übertragungen) und 2007 (Embryoentnahmen). Die Höhepunkte lagen bislang in den Jahren 1999 (4.247 Embryoentnahmen) und 2000 (24.062 Embryo-Übertragungen). Im Zeitraum 2000-2007 ist nach Angaben der IETS die Zahl der Embryoentnahmen beim Rind in Deutschland um 40% zurückgegangen (THIBIER, 2001-2008). Die Gründe für den Rückgang des ET kann in dem Anfang 2001 ausgesprochenen Verbot des Einsatzes von Follikelstimulierendem Hormon (FSH) und die seit Jahren angespannte Situation in der Landwirtschaft auf Grund der

schwierigen Wirtschafts- und Betriebsbedingungen gesehen werden. Auch die Verunsicherung der Tierzüchter durch die BSE-Krise führte zu einem deutlichen Rückgang der Nachfrage nach ET und assoziierten Reproduktionsbiotechniken.

Im Zeitraum 2005-2007 hat zwar die Anzahl der Embryo-Übertragungen in Deutschland nach Jahren des Rückgangs wieder zugenommen (25% gegenüber 2002-2004), erreichte aber nicht das Niveau früherer Jahre (42% weniger Embryo-Übertragungen im 2007 vs. 2000). Dieser Trend scheint jedoch nicht anzuhalten und die Zahl der Embryonentnahmen in Deutschland war 2007 im Vergleich zu den Vorjahren wieder rückläufig.

Wie Abbildung 2 zeigt, beruht dieser Trend ausschließlich auf ex vivo gewonnenen Embryonen während in den Statistiken der IETS für in Deutschland aus IVP erzeugten Embryonen keine Angaben enthalten sind. Deutschland liegt schon seit vielen Jahren auf dem dritten Platz der europäischen Länder mit der höchsten Aktivität im Bereich des ET beim Rind nach Frankreich und den Niederlanden (THIBIER, 2004-2008).

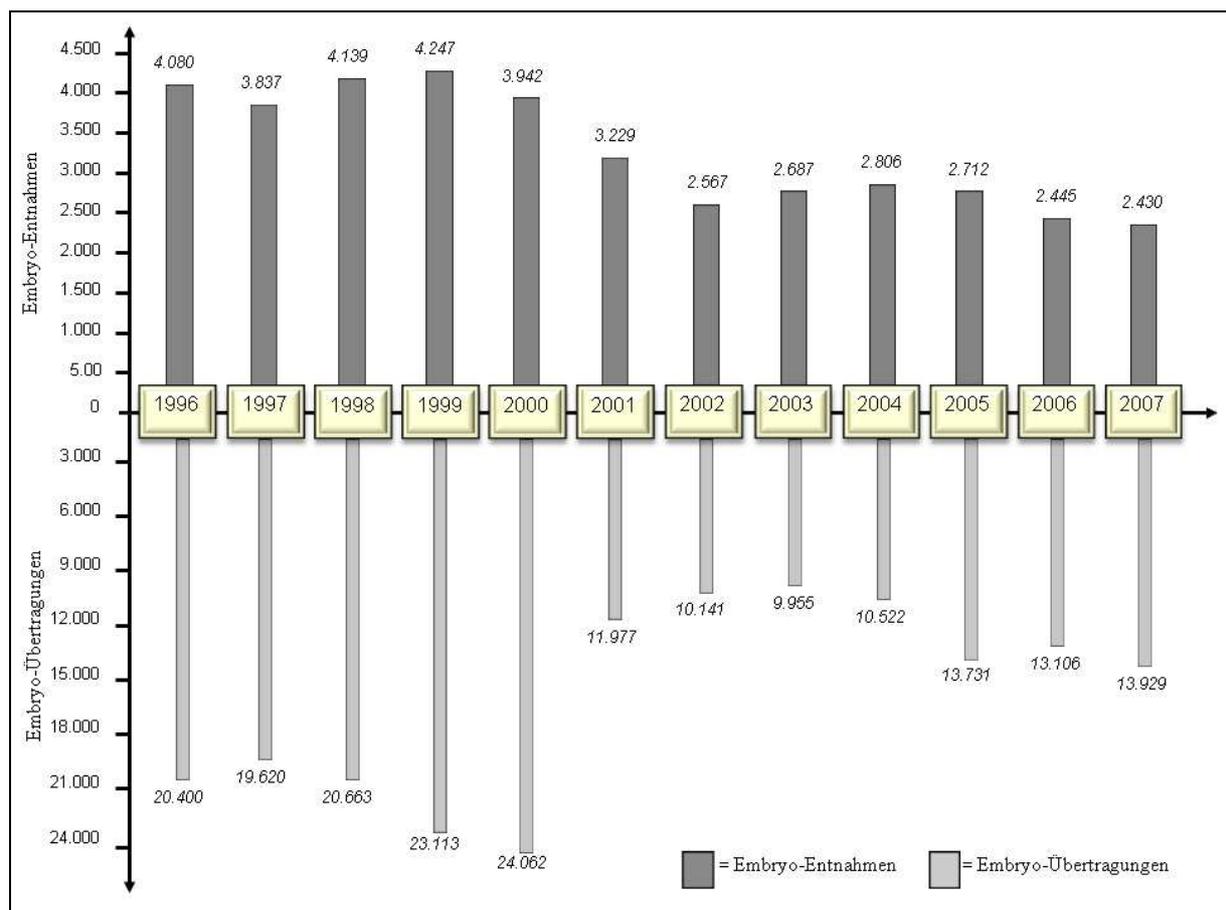


Abb. 2: Gewinnung und Übertragung von Rinderembryonen in Deutschland (THIBIER, 1997-2008)

Einen unberechenbaren Einfluss auf die Ergebnisse der Embryoentnahme beim Rind übt die Superovulation des Spenders aus. Dieses Problem der Superovulation, mit dem sich schon CASIDA et al. (1943) beschäftigten, konnte bis heute nicht zufriedenstellend gelöst werden. Von vielen Spendern lassen sich keine oder nur eine geringe Anzahl transfertaugliche (ET-tgl.) Embryonen gewinnen. Hinzu erschwert die große individuelle Variabilität in den Ergebnissen der Embryoentnahme die Durchführung von ET-Programmen (MAPLETOFT et al., 2002). Diese Variabilität in der Quantität und Qualität der pro Spender gewonnenen Embryonen erschwert jede Kosten-Nutzen-Analyse und wirkt sich negativ auf die Rentabilität des ET aus. Seit langem wird versucht, die Variabilität der Ovarreaktion auf die Superovulationsbehandlung zu verringern und somit die Ergebnisse der Embryoentnahme zu verbessern.

Abbildung 3 zeigt, dass sich trotz aller Bemühungen in den letzten Jahren die durchschnittliche Zahl der ET-tgl. Embryonen weltweit unverändert um die 6 Embryonen pro Embryoentnahme hält.

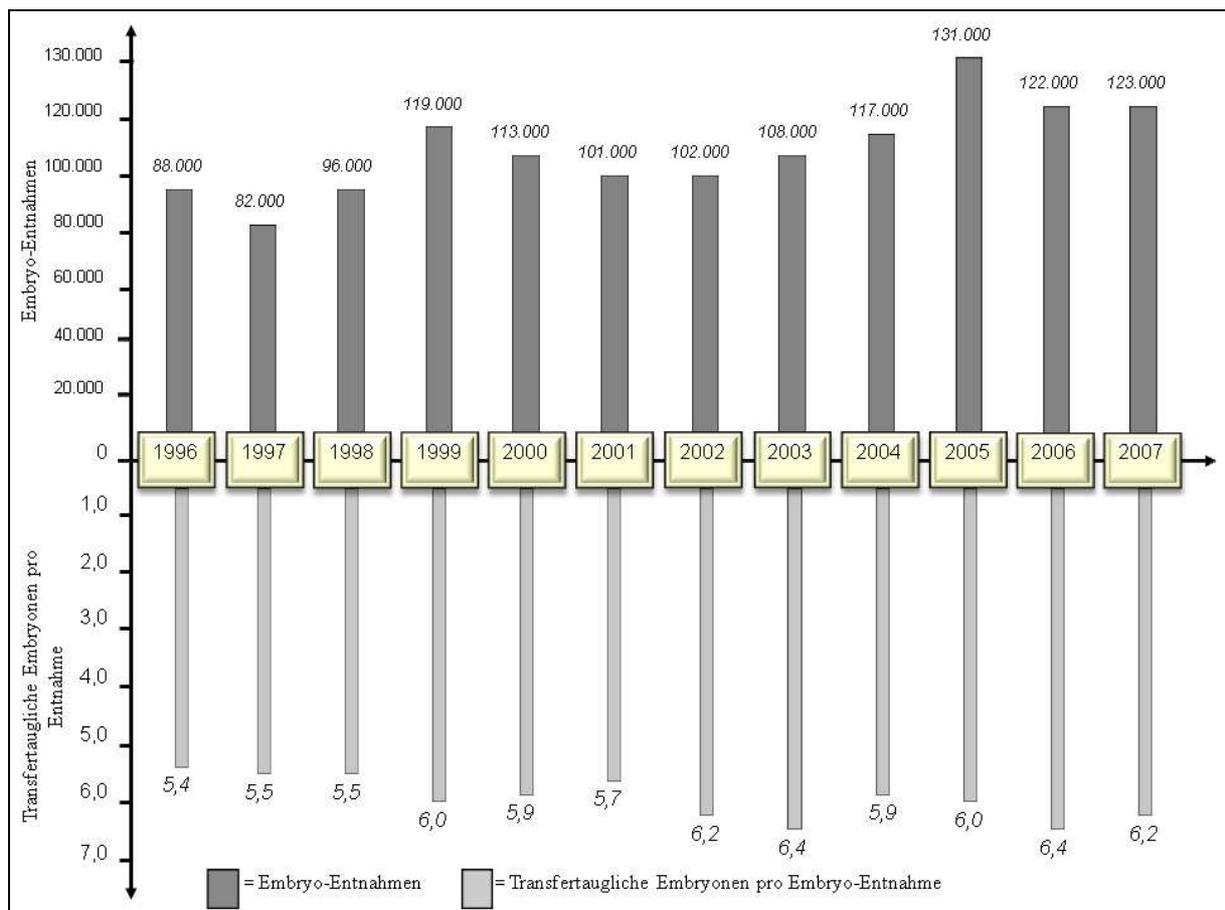


Abb. 3: Anzahl der Embryoentnahmen und der transfertauglichen Embryonen pro Entnahme weltweit (THIBIER, 1997-2008)

2.2 Follikelwachstum und Follikeldynamik

Das Rinderovar stellt ein großes Reservoir an Follikeln bzw. Primordialfollikeln dar. Die Eizellreserve nimmt jedoch bereits pränatal erheblich ab und reduziert sich später altersbedingt weiter (MALHI et al., 2005-2008; ADAMS et al., 2008) von etwa 100.000 Eizellen bei der Geburt auf etwa 21.000 bei 2- bis 3-jährigen und lediglich 2.500 Eizellen bei 12- bis 14-jährigen Kühen (WILKENS, 1982). Von diesem Pool kommen im Laufe des Lebens unter dem Einfluss der gonadotropen Hormone insgesamt nur wenige zur Reife und werden für die natürliche Fortpflanzung genutzt (SCHNORR, 1985).

Bei Nutztieren treten neben individuellen (MALHI et al., 2008) auch rassen- und umweltbedingte Schwankungen in der ovariellen Reserve auf, so dass das Alter alleine kein zuverlässiger Prädiktor zur Abschätzung der Reserve ist (CAHILL und MAULEÛN, 1980; WEBB et al., 1999).

Bei der natürlichen Fortpflanzung ist der Zuchtfortschritt dadurch begrenzt, dass pro Kuh und Jahr in der Regel nur ein Kalb geboren wird. Hierfür setzt das Rinderovar auf physiologischem Wege regelmäßig eine bis zwei Eizellen pro Sexualzyklus frei, wobei sich jedoch nach jedem Zyklus der Follikelpool weiter um mehrere Follikel reduziert. Eine Möglichkeit zur besseren Nutzung dieses Pools für Fortpflanzungszwecke stellt die Superovulation dar, wodurch mehrere Eizellen gleichzeitig heranreifen und später innerhalb desselben Zyklus für die Befruchtung bereitgestellt werden können (BREM, 1997). Eine weitere Alternative bieten die Verfahren der transvaginalen Follikelpunktion und der in vitro Produktion (PIETERSE et al., 1990, 1991; GREVE et al., 1993).

2.2.1 Physiologische Grundlagen

Die Heranbildung von Follikelpopulationen im Rinderovar läuft kontinuierlich und unabhängig vom Alter oder Vorhandensein einer Gravidität in Reifungswellen ab (GINTHER et al., 1996a; JAISWAL et al., 2004). Aktive Reifungswellen werden bereits bei präpuberalen Rindern beobachtet (ADAMS et al., 1994; EVANS et al., 1994).

Die Follikulogenese beim Rind umfasst die Entwicklungsphasen der Rekrutierung, Selektion und Dominanz (WEBB et al., 1999). Aus der anfänglichen Follikelpopulation wird zunächst innerhalb von 1-2 Tagen eine kleinere Population von etwa 20 Follikeln (2-3 mm Durchmesser) rekrutiert, man spricht hier auch von einer Follikelkohorte (GINTHER et al., 1989a, 1989b, 1996a; JAISWAL et al., 2004). Die Eizelle ist zu diesem Zeitpunkt bereits von

einer Granulosazellschicht umgeben (RÜSSE und SINOWATZ, 1991). Die im Laufe der Entwicklung des Primordialfollikels zum Primärfollikel stattfindende Größenzunahme der Eizelle und Vermehrung und Differenzierung der Granulosazellen erfolgen hormonunabhängig (VAN DEN HURK et al., 1992; ADAMS et al., 2008).

Beim Übergang des Primär- zum Sekundärfollikel wird das Follikelepithel mehrschichtig (VAN DEN HURK et al., 1992). Erst ab mehreren Schichten von kubischen Granulosazellen werden Rezeptoren vorgefunden, welche die Follikel für Gonadotropine ansprechbar machen (WEBB und ARMSTRONG, 1998; ADAMS et al., 2008). Nach dem Start einer neuen Welle verläuft das Wachstum aller Follikel in den ersten 1-2 Tagen zunächst synchron unter dem Einfluss von FSH (ADAMS et al., 1992).

Durch fortlaufende Vermehrung der Follikelepithel- und Granulosazellen sowie Spaltbildung entwickeln sich aus den wachsenden Sekundärfollikeln die Tertiärfollikel (Webb et al., 1999). Der Tertiärfollikel besteht aus mehreren Granulosazellschichten und einer Thekaschicht. Die von der Zona pellucida umschlossene Oozyte wird mit der Hohlrumbildung an die Peripherie des Follikels gedrängt und dadurch entsteht der Cumulus oophorus (RÜSSE und SINOWATZ, 1991).

Im Laufe der Entwicklung ist ein Follikel seiner Kohorte anfälliger für FSH bzw. wird stärker als die anderen stimuliert. Dadurch entwickelt er sich zum funktionellen Dominanten Follikel (DF) (JAISWAL et al., 2004). Der Durchmesser des DF reicht von $13,9 \pm 0,4$ mm (Dreiwelleyenzyklen) bis zu $16,5 \pm 0,4$ mm (Zweiwellenzyklen) (GINTHER et al., 1989a, 1989b, 1996a; WEBB et al., 1999).

Zu Ende des Zyklus bildet sich der DF nun als Graaf'scher Follikel mit einem Durchmesser von etwa 20,0 mm zum sprungreifen Follikel an der Oberfläche des Ovars heran. Die Selektion eines DF unterliegt einer strengen hierarchischen Ordnung. Die Entwicklung des DF vollzieht sich zeitnah mit dem Anstieg der FSH-Plasmakonzentration und dauert etwa 5-7 Tage (WEBB et al., 1999; JAISWAL et al., 2004). Die Selektion eines DF ist etwa 3 Tage vor der Ovulation bereits abgeschlossen (QUIRK et al., 1986; SAVIO et al., 1990a, 1990b). Der DF ab etwa 10,0 mm im Durchmesser hemmt das Wachstum der untergeordneten Begleitfollikel und verhindert die Rekrutierung einer neuen Follikelwelle (GUILBAULT et al., 1991; OTOI et al., 1999).

2.2.2 Regulation des Follikelwachstums

Die genauen Regulationsvorgänge, die das Follikelwachstum initiieren und den Prozess der Selektion steuern sind weitgehend unbekannt. FSH spielt jedoch eine entscheidende Rolle für das Follikelwachstum. Eine Follikelwelle wird von einer deutlichen Erhöhung der FSH-Plasmakonzentration etwa 2 Tage vor der Anbildung einer neuen Welle begleitet (JAISWAL et al., 2004).

Eine Hypothese geht davon aus, dass das Wachstum und die Differenzierung von Follikeln durch endokrine Gonadotropine und verschiedene parakrin wirksame Wachstumsfaktoren (GF, Growth Factors) interaktiv stimuliert (EGF, IGF-1, TGF- α , bFGF) oder inhibiert (TGF- β , Cytokine, Aktivin A) werden (RICO et al., 2008). Bei den Wachstumsfaktoren handelt es sich um spezifische Proteine, die in Wechselwirkung mit den Gonadotropinen sowohl die Zellproliferation als auch die Zelldifferenzierung bewirken.

IGF-1, bFGF, Aktivin und Inhibin werden durch die Granulosazellen synthetisiert (NEUFELD et al., 1987; SKINNER et al., 1987a; OLIVER et al., 1989, FINDLAY et al., 1990). EGF wird sowohl in den Granulosazellen als auch in den Follikelthekazellen hergestellt (SKINNER et al., 1987b).

Für die Follikelentwicklung spielen Gonadotropine eine entscheidende Rolle (WEBB und ARMSTRONG, 1998). Das Wachstum und die Reifung der Follikel werden durch FSH unter dem Einfluss von Luteinisierendes Hormon (LH) stimuliert (SIROIS und FORTUNE, 1990; SAVIO et al., 1993a). Nach der Ovulation stimuliert LH die Luteinisierung der Theca granulosa der vormaligen Follikelwand und dadurch die Bildung des Corpus Luteum (CL), der wiederum Progesteron (P_4) synthetisiert. Die P_4 -Sekretion inhibiert die vermehrte Freisetzung von LH durch Reduzierung der Pulsfrequenz der Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH)-Freisetzung. Dies ermöglicht eine Erhöhung der FSH-Freisetzung, was das Auftreten von Follikelwellen bewirkt (GLATZEL und SCHALLENBERGER, 1990; WEBB et al., 1999; JAISWAL et al., 2004).

Beim normozyklischen Rind treten im Regelfall 2-3 Follikelbildungswellen pro Zyklus auf, was mit gleichzeitiger Erhöhung der E_2 -Freisetzung aus den anreifenden Follikeln einhergeht (SAVIO et al., 1988; SIROIS und FORTUNE, 1988; GINTHER et al., 1989a, 1989b; RAJAMAHENDRAN und TAYLOR, 1990). Die Follikelwellen starten bei Zweiwellenzyklen in der Regel an den Zyklustagen 0 und 9-10 und bei Dreiwellenzyklen an den Tagen 0, 8-9 und 15-16 (SIROIS und FORTUNE, 1988, 1990). Diese sich wellenförmig anbildenden Follikel atresieren während der Lutealphase (SIROIS und FORTUNE, 1990).

Bei nicht graviden Tieren startet die physiologische Rückbildung des CL früher bei den Zweiwellenzyklen als bei den Dreiwellenzyklen (Tag 16 bzw. 19) und die Zykluslänge ist entsprechend kürzer (20 bzw. 23 Tage) (MAPLETOFT et al., 2000). Auch die Erhöhung der FSH-Freisetzung, die mit vermehrtem Follikelwachstum korrelierbar ist, und deshalb als Signal für die Rekrutierung einer weiteren Follikelwelle gilt, findet entsprechend 2- (Zweiwellenzyklen) bzw. 3-mal (Dreiwellenzyklen) statt (TURZILLO und FORTUNE, 1990; ADAMS et al., 1992; JAISWAL et al., 2004).

Die durch die heranwachsenden Follikel freigesetzte Menge von E_2 und Inhibin wirkt wiederum über einen negativen Feedback-Mechanismus hemmend auf die Freisetzung von FSH, wodurch die Rekrutierung einer weiteren Follikelwelle verhindert wird (GINTHER et al., 1996b).

Einige selektierte Follikel enthalten bereits 2-3 Tage nach Wellenstart ausreichend LH-Rezeptoren und besitzen gegenüber den kleineren Follikeln eine höhere Sensitivität für FSH, was trotz basaler FSH/LH-Konzentrationen das weitere Follikelwachstum gestattet (GINTHER et al., 1996b). LH bewirkt die Follikelreifung, Ovulation und Luteinisierung der Theka-granulosa-Zellschicht und stimuliert so die P_4 -Synthese (positives Feedback).

Die Ovulation eines DF kann jedoch erst nach erfolgter Luteolyse stattfinden (SIROIS und FORTUNE, 1990; BERGFELT et al., 1991). Solange ein P_4 produzierendes CL vorhanden ist, wird jede Ovulation verhindert und der funktionelle DF verharret zunächst in einer 3- bis 4-tägigen Plateauphase. Anschließend atresiert der DF und schafft dadurch die Voraussetzungen für die Rekrutierung einer weiteren Follikelkohorte (GUILBAULT et al., 1991; BUNGARTZ und NIEMANN, 1994).

2.3 Möglichkeiten zur Steuerung des Zyklus und des Follikelwachstums

2.3.1 Mechanische Entfernung des Dominanten Follikels

Der Einfluss des funktionellen DF auf das Follikelwachstum beim Rind war Gegenstand vieler Untersuchungen in den letzten Jahren (BÓ et al., 2006, 2008). Es wurde gezeigt, dass nach der Ablation des DF der ersten Follikelwelle die nächstgrößeren untergeordneten Follikel der gleichen Welle zu einem DF heranwachsen können. BERGFELT et al. (1997) stellten fest, dass die Entfernung des DF zu einer Erhöhung der FSH-Plasmakonzentration und zwei Tage später zur Rekrutierung einer neuen Follikelwelle führt. Durch die Ablation des DF wird somit das Zeitintervall zwischen zwei Wellen verkürzt (BODENSTEINER et al.,

1996). Die Ablation des DF kann mechanisch mit Hilfe des OPU erfolgen (PIETERSE et al., 1990, 1991; GREVE et al., 1993). So wurde in verschiedenen Untersuchungen das OPU im Rahmen des Embryo-Transfers für die Ablation des DF vor der Einleitung von Superovulationen verwendet (BUNGARTZ und NIEMANN, 1994; BERGFELT et al., 1997; BARACALDO et al., 2000). Nach BÓ et al. (2006) sollte die Superovulationsbehandlung zum Zeitpunkt des Auftretens einer neuen Follikelwelle, 1-2 Tage nach der Entfernung des DF gestartet werden.

2.3.2 Hormonelle Behandlungen

Für die Steuerung des Zyklus und des Follikelwachstums wurden in den letzten Jahren verschiedene Hormonpräparate und Hormonkombinationen eingesetzt. Für die Induktion der Rekrutierung einer neuen Follikelwelle haben sich Hormonbehandlungen mit Estern des Östradiols (E_2 -17 β) (wie E_2 -Benzoat) in Kombination mit Gestagenen als gut geeignet erwiesen (BÓ et al., 2002). E_2 -17 β enthaltende Tierarzneimittel sind jedoch in der EU für Lebensmittel liefernde Tiere nicht mehr zugelassen (LANE et al., 2008).

2.3.2.1 Verkürzung der Gelbkörperphase mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$

Prostaglandin (PG) $F_{2\alpha}$ und seine Analoga werden seit vielen Jahren als Luteolytikum im Rahmen der Zyklussynchronisation beim Rind verwendet (RATHBONE et al., 1998). Voraussetzung für die Wirkung des $PGF_{2\alpha}$ ist das Vorhandensein eines zyklischen CL (\geq Tag 6). Die Anwendung von $PGF_{2\alpha}$ zur Zyklussynchronisation ist daher kontraindiziert, wenn ein CL nicht feststellbar ist, wie beispielsweise bei der physiologischen Azyklie im Puerperium oder bei präpuberalen Rindern (LANE et al., 2008).

$PGF_{2\alpha}$ stimuliert über einen positiven Feedback-Mechanismus die endogene, intraluteale $PGF_{2\alpha}$ Produktion, welche die Luteolyse im Gang bringt (AURICH, 2002). Dieser Mechanismus kann erst ab dem 6. Zyklustag aktiviert werden, weshalb der CL in den ersten 5 Zyklustagen refraktär gegenüber einer einmaligen Behandlung mit $PGF_{2\alpha}$ ist. Da aber der CL ab dem 2. Zyklustag Rezeptoren für $PGF_{2\alpha}$ besitzt, kann eine Luteolyse bereits zu diesem Zeitpunkt durch 2-mal tägliche (morgen/abends) $PGF_{2\alpha}$ -Gabe ausgelöst werden (ADAMS et al., 1994; NASSER et al., 1993). Durch $PGF_{2\alpha}$ -Applikation zwischen den Zyklustagen 6-17 (Zweiwellenzyklen) oder 6-20 (Dreiwellenzyklen) wird die Gelbkörperphase bzw. der Zyklus verkürzt (KASTELIC und GINTHER, 1991).

Der Brunsteintritt nach $\text{PGF}_{2\alpha}$ ist sehr variabel (2-5 Tage) und hängt in erster Linie von dem Reifungsgrad der heranwachsenden Follikel und des DF zum Zeitpunkt der Behandlung ab. Erfolgt die Behandlung in der Dominanzphase einer Follikelwelle ist das Intervall von der Applikation von $\text{PGF}_{2\alpha}$ bis zum Brunsteintritt kürzer (2-3 Tage) als in der Rekrutierungs- oder Selektionsphase (4-5 Tage) (KASTELIC und GINTHER, 1991; SAVIO et al., 1990a). Das Intervall von der Applikation von $\text{PGF}_{2\alpha}$ bis zum Brunsteintritt ist länger, wenn die Behandlung an den Zyklustagen 10-13 (Zwei- und Dreiwellenzyklen) oder 15-17 (Dreiwellenzyklen) durchgeführt wird (MAPLETOFT et al., 2000).

Das Intervall von der Applikation von $\text{PGF}_{2\alpha}$ bis zum LH-Peak bei nicht superstimulierten Tieren beträgt 55-60 h bei Färsen (SAVIO et al., 1990c) und 84 h bei Kühen (WALTON et al., 1987). Die Ovulation ist im Allgemeinen innerhalb von 24 h nach dem LH-Peak zu erwarten (HYTTEL et al., 1989).

Bei unbekanntem Zyklusstadium der Tiere kann zur Brunstsynchronisation das $\text{PGF}_{2\alpha}$ zweimalig im Abstand von 11 Tagen appliziert werden. Dies ist erforderlich, da einige Tiere sich zum Zeitpunkt der ersten Applikation von $\text{PGF}_{2\alpha}$ außerhalb der Gelbkörperphase befinden. Bei der zweiten Applikation von $\text{PGF}_{2\alpha}$ befinden sich jedoch alle Tiere in der Gelbkörperphase. Nach FOLMAN et al. (1990) werden bessere Synchronisationsergebnisse erzielt, wenn der Abstand zwischen den Behandlungen 14 Tage beträgt.

Die Graviditätsergebnisse nach Synchronisation mehrerer Tiere durch ein- oder zweimalige $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Applikation sind in den meisten Fällen unbefriedigend. Ursache hierfür ist die Streuung des Brunsteintritts und der Ovulationen, was eine optimale Abstimmung von terminorientierten Besamungen erschwert. Die Ergebnisse werden jedoch im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren nicht nachteilig beeinflusst, wenn bei guter Tierbeobachtung gezielt bei Auftreten von Brunst besamt wird (LANE et al., 2008).

2.3.2.2 Ovulationssynchronisation

In den letzten Jahren wurden verschiedene Schemata zur Zyklussynchronisation entwickelt, die sowohl den lutealen als auch den folliculären Status berücksichtigen. Diese Protokolle zielen in erster Linie auf eine Einengung des Ovulationszeitraumes für terminierte Besamungen, ohne die Notwendigkeit von Brunstbeobachtungen ab (THATCHER et al., 2006). Dabei hat sich die Anwendung von GnRH in Kombination mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ besonders bewährt (LANE et al., 2008).

GnRH bewirkt in der Brunst eine rasche FSH/LH-Freisetzung (1-2 h) und den LH-Peak mit anschließender Ovulation, im Allgemeinen innerhalb von 24 h nach der Behandlung (WOLFENSON et al., 1994). Auch in der Dominanzphase des Follikelwachstums kann GnRH zur Ovulation führen. Innerhalb von 1-2 Tagen nach der Behandlung wird das Wachstum einer neuen Follikelwelle stimuliert (WOLFENSON et al., 1994). Die Dominanzphase in dieser Welle wird etwa 5 Tage nach GnRH erreicht (RYAN et al., 1998; ROCHE et al., 1999). GnRH in der frühen oder mittleren Gelbkörperphase führt zur Luteinisierung des DF und zur Anbildung akzessorischer CL (PURSLEY et al., 1995; THATCHER et al., 2006). Dagegen hat die Behandlung in der Rekrutierungs- und Selektionsphase keine Auswirkungen auf das Follikelwachstum (RYAN et al., 1998; ROCHE et al., 1999).

Durch die Induktion von akzessorischen CL nach Behandlung mit GnRH oder hCG an den Zyklustagen 5-7 wurden bessere Graviditätsergebnisse sowohl nach KB als auch nach ET beobachtet (NISHIGAI et al., 2002; THATCHER et al., 2006).

Für die Ovulationssynchronisation wird PGF_{2α} 7 Tage nach GnRH verabreicht (WOLFENSON et al., 1994). Eine zweite GnRH-Gabe erfolgt 48 h nach PGF_{2α} und 15-20 h danach können die terminorientierten Besamungen durchgeführt werden (SCHMITT et al., 1996). Dieses Behandlungsschema zur Steuerung von Follikelwellen und zur Synchronisation von Ovulationen wird OVSYNCH[®] genannt (PURSLEY et al., 1995; FRICKE et al., 1998). Eine Zusammenfassung von Graviditätsergebnissen nach OVSYNCH[®] zeigt Tabelle 1.

In verschiedenen Behandlungsvarianten wurde versucht das OVSYNCH[®] zu verbessern (THATCHER et al., 2002; RABIEE et al., 2005; LANE et al., 2008; OLYNK und WOLF, 2009). So wird beispielsweise im Schema „Heat-Synch“ die zweite GnRH-Applikation durch eine Behandlung mit E₂-Cypionat (ECP), ein Ester des E₂-17β, ersetzt (PANCARCI et al., 2002; SELLARS et al., 2006). Allerdings sind in der EU und in anderen Ländern seit einiger Zeit keine E₂-17β enthaltenden Tierarzneimittel für Lebensmittel liefernde Tiere mehr zugelassen, weshalb eine solche Behandlung bei uns grundsätzlich nicht in Frage kommt (LANE et al., 2008).

Tab. 1: Graviditätsraten nach Ovulationssynchronisation mit OVSYNCH[®]

Rind/Art	Tier- zahl	Graviditätsrate (%) nach KB		Autor(en), Jahr
		Kontrolle	OVSYNCH [®]	
Milchrind/Färsen	187	48,0	45,5	SCHMITT et al., 1996
	155	74,4	35,1	PURSLEY et al., 1997
Milchrind/Kühe	299	41,5	26,5	BURKE et al., 1996
	310	38,9	37,8	PURSLEY et al., 1997
	197	32,0	47,0	BRITT und GASKA, 1998
	404	k.A. ¹	36,9	VASCONCELOS et al., 1999
	1.048	35,0 ²	45,0 ²	TENHAGEN et al., 2004
		36,0 ³	50,0 ³	
	3.559	k.A. ¹	35,7	SHEPHARD, 2005
611	42,4	40,3	WITTKKE et al., 2005	

¹) k.A.= keine Angaben ²) Herde A ³) Herde B

Im Schema „Co-Synch“ werden die terminorientierten Besamungen zeitgleich mit der zweiten GnRH-Applikation durchgeführt, wodurch es zu einer Zeitersparnis durch Arbeitsrationalisierung kommt (DeJARNETTE und MARSHALL, 2003).

NAVANUKRAW et al. (2004) führten vor dem eigentlichen OVSYNCH[®]-Schema eine sogenannte Vorsynchronisation (Pre-Synch) durch. Die Tiere erhielten zunächst 2-mal PGF_{2α} im Zeitabstand von 14 Tagen und das OVSYNCH[®] wurde 14 Tage nach der zweiten PGF_{2α}-Applikation gestartet. Sie erzielten dabei bessere Konzeptionsraten im Vergleich zum klassischen OVSYNCH[®] (49,6 vs. 37,3%).

SOUZA et al. (2008) erzielten im Vergleich zum klassischen OVSYNCH[®] mit einem modifizierten „doppelten“ OVSYNCH[®]-Schema (double-OVSYNCH[®]) bessere Konzeptionsraten bei erstgebärenden Kühen (65,2 vs. 45,2%) aber nicht bei den Mehrgebärenden (37,5 vs. 39,3%). Dabei bekamen die Tiere zu einem beliebigen Zeitpunkt GnRH. Nach 7 Tagen wurde PGF_{2α} appliziert, gefolgt von einer weiteren GnRH-Gabe 3 Tage später. Nach weiteren 7 Tagen wurde schließlich die klassische OVSYNCH[®]-Behandlung durchgeführt.

RABIEE et al. (2005) führten eine Metaanalyse über die Effizienz des klassischen OVSYNCH[®] und von verschiedenen OVSYNCH[®]-Varianten unter Einbeziehung weiterer Zyklussynchronisationsverfahren (ein-, zwei- und dreimalige PGF_{2α}-Applikationen) für die Fruchtbarkeitsleistung in Milchviehherden durch. Sie kommen zum Schluss, dass die Graviditätsergebnisse nach OVSYNCH[®] vergleichbar mit denen nach natürlicher Besamung

oder nach Zyklussynchronisation mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ sind. Auch die OVSYNCH[®]-Varianten beeinflussten nicht die Konzeptionsraten. OVSYNCH[®] und seine Varianten stellen jedoch eine gute Alternative für Betriebe mit suboptimaler Brunsterkennung dar, wobei beim Einsatz arbeitswirtschaftliche und ökonomische Gesichtspunkte abzuwägen sind (TENHAGEN et al., 2004; RABIEE et al., 2005; OLYNK und WOLF, 2009).

2.3.2.3 Verlängerung oder Verkürzung der Gelbkörperphase mit Gestagenen

Als Gestagene werden Steroidhormone bezeichnet, die die Implantation und die Aufrechterhaltung einer Gravidität gestatten. Das wichtigste natürliche Gestagen ist P_4 (GRUNERT und BERCHTOLD, 1995). Um die natürlichen Gestagene von den synthetischen Hormonen zu unterscheiden, werden letztere auch Progestagene genannt (KROKER, 1997). In Deutschland sind als Progestagene für die Brunstinduktion und Zyklussynchronisation beim Rind das Chlormadinonacetat (Chlor-Acetoxy-Progesteron = CAP) und das P_4 zugelassen. Chlormadinon ist ein oral wirksames synthetisches Progestagen mit mehrfach höherer gestagener Wirksamkeit als P_4 (KROKER, 1997).

Als Träger für P_4 können Intravaginalpessare verwendet werden (RATHBONE et al., 1998, 2001). Die in Deutschland für das Rind zugelassenen Intravaginalpessare bestehen aus einem Nylon-Kern (CIDR[®]) oder einer Metallfeder (PRID-alpha[®]) mit Silikon-Ummantelung, in welche P_4 imprägniert ist. Durch das intravaginale Einsetzen der Pessare kann P_4 kontrolliert langsam freigegeben und vom Tierorganismus gut aufgenommen werden (ROCHE, 1978; RATHBONE et al., 1998). Dadurch wird die Freisetzung von LH/FSH in der Hypophyse gehemmt und eine Zyklusblockade (Zyklusverlängerung) bewirkt. Nach dem Entfernen der Spange sinkt der P_4 -Spiegel wodurch es zum Follikelwachstum und anschließend zur Ovulation kommt. Eine $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Applikation um den Zeitpunkt der Entnahme des Pessars bewirkt die Rückbildung eines ggf. vorhandenen CL und ermöglicht eine Verkürzung der Lutealphase (RATHBONE et al., 2001). Bei einem mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ kombinierten Verfahren kann die Behandlung mit dem P_4 -Vaginalpessar bis auf 7 Tage verkürzt und der Synchronisationseffekt verbessert werden (ODDE, 1990).

Eine weitere Indikation der P_4 -Vaginalpessare beim Rind ist die Brunstinduktion bei zuvor über einen längeren Zeitraum anöstrischen Tieren. Die Verwendung der Pessare (PRID[®]) führte bei einem Anteil der Tiere zu eitrigen Vaginitiden, wodurch jedoch die Konzeptionsraten nach künstlicher Besamung gegenüber einer Kontrollgruppe nicht negativ beeinflusst wurden (WALSH et al., 2007a).

2.3.2.4 Kombinationsbehandlungen mit Gestagenen zur Ovulationssynchronisation

Weitere Möglichkeiten zur Brunstsynchronisation bestehen in GnRH-Gestagen-PGF_{2α}- und E₂-Benzoat-Gestagen-PGF_{2α}-Kombinationen (LANE et al., 2001a, 2001b). Dabei wird GnRH oder E₂ beim intravaginalen Einsetzen des Pessars appliziert. Die Verweildauer des Pessars beträgt 7-8 Tage und den Tieren wird 24 h vor der Entnahme PGF_{2α} verabreicht (RYAN et al., 1995). Die mit E₂ kombinierte Behandlung hat sich in vielen Untersuchungen als gut geeignet für die Steuerung von Follikelwellen und zur Ovulationssynchronisation erwiesen (BÓ et al., 1993; BURKE et al., 1999; LANE et al., 2001a, 2001b). Die E₂-17β enthaltenden Tierarzneimittel sind jedoch in der EU seit einiger Zeit für Lebensmittel liefernde Tiere nicht mehr zugelassen (LANE et al., 2008).

Darüber hinaus können die Intravaginalpessare mit guten Ergebnissen in Programmen zur Ovulationssynchronisation eingesetzt werden. Es wurden dadurch meist höhere Graviditätsraten als beim klassischen OVSYNCH[®]-Schema erzielt (Tabelle 2).

Tab. 2: Graviditätsraten nach OVSYNCH[®] und Gestagene zur Ovulationssynchronisation

Rind/Art	Tierzahl	Graviditätsrate (%) nach KB		Autor(en), Jahr
		OVSYNCH [®]	CIDR [®] + OVSYNCH [®]	
Milchrind/Kühe	27	50,0	66,7	MENG CHAO et al., 2008
Milchrind/Färsen	74	21,1	63,9	IWAKUMA et al., 2008
Milchrind/Färsen	201	k.A. ¹	34,8-57,0 ² 54,1-61,8 ³	AMBROSE et al., 2008
Milchrind/Kühe	1.318	36,4	34,5	BICALHO et al., 2007
Milchrind/Kühe	634	33,0	38,0	STEVENSON et al., 2006
Fleischrind/Kühe	107	48,6	70,8	SAKASE et al., 2005
Fleischrind/Kühe	78	47,7	72,5	KAWATE et al., 2004
Milchrind/Kühe	182	20,9	45,1	EL ZARKOUNEY et al., 2004
Fleischrind/Kühe	148	45,1	42,9	MARTÍNEZ et al., 2002
Fleischrind/Färsen	48	39,1	68,0	
Milchrind/Kühe	415	34,9	43,8	WALSH et al., 2007b
Milchrind/Kühe	68	20,6	41,2	KIM et al., 2003

¹) k.A.= keine Angaben

²) In Abhängigkeit vom Zyklustand zu Beginn der Behandlung (höhere Raten im Diöstrus)

³) In Abhängigkeit vom Zeitpunkt der PGF_{2α}-Gabe (höhere Raten PGF_{2α} 24 h vor CIDR[®]-Entnahme)

2.4 Superovulation

2.4.1 Möglichkeiten zur Superovulation beim Rind

Eine erfolgreiche Superovulation beim Rind ist erstmals im Jahr 1943 mit Hypophysenextrakten von Rindern und Schafen gelungen (CASIDA et al., 1943). Für die kommerzielle Anwendung des ET stehen für die Superovulation seit vielen Jahren das equine chorionic gonadotropin (eCG) und das FSH zur Verfügung (MAPLETOFT et al., 2002).

Das aus dem Serum gravider Stuten zwischen den Graviditätstagen 40-150 gewonnene eCG ist ein Glykoprotein, dessen Molekulargewicht im Bereich von 45.000-65.000 liegt und das sowohl FSH- als auch LH-ähnliche Wirkungen entfaltet (MURPHY und MARTINUK, 1991). Wegen der langen Halbwertszeit reicht für die Superovulationsinduktion beim Rind mit eCG eine einmalige Behandlung aus (DIELEMAN et al., 1993). Die lange Halbwertszeit führt zu einem höheren Potential an unerwünschten Nebenwirkungen, wie einer fortgesetzten Rekrutierung von Follikeln, auch nach bereits ausgelöster Superovulation, was zu einer übermäßig lang anhaltenden E_2 -Konzentration im Serum durch die große Anzahl überständiger Follikel führt (DIELEMAN et al., 1993). Als Folge kommt es bei stärkeren Ovarreaktionen zu Störungen des Spermientransports mit negativen Auswirkungen auf die Superovulationsergebnisse und die Embryoqualität (MAPLETOFT et al., 2002).

Durch Verabreichung eines eCG-Antiserums kann der Überstimulation, d.h. der Bildung überständiger Follikel gegengesteuert werden (DIELEMANN et al., 1993; GOULDING et al., 1996).

FSH ist ein dimeres Glykoprotein, dessen Molekulargewicht im Bereich von 35.000 liegt. Zur Induktion einer Mehrfachovulation beim Rind muss es wegen der deutlich kürzeren Halbwertszeit von etwa 5 h ein- bis zweimal täglich über 3-4 Tage, je nach Behandlungsschema appliziert werden (MAPLETOFT et al., 2002). FSH wird aus Hypophysenextrakten gewonnen, die neben FSH noch unterschiedlich hohe Mengen an LH enthalten. FSH fördert die E_2 -Bildung in den präovulatorischen Follikeln. Das auf dem deutschen Markt zurzeit einzige kommerziell zugelassene Präparat Pluset[®] beinhaltet FSH das von den Hypophysen geschlachteter Schweine gewonnen wird. Im Ausland wird dafür gleichermaßen auch kommerziell verfügbares ovines FSH verwendet.

Die kommerziellen FSH-Präparate unterscheiden sich in ihrem Gehalt an LH (YAMAMOTO et al., 1993). Auch innerhalb eines Präparates treten Schwankungen durch die verschiedenen eCG- oder FSH-Chargen in Abhängigkeit vom FSH:LH-Verhältnis auf, was die Konsistenz des Behandlungserfolgs beeinträchtigen kann (REINHARD und ROHN, 1992; YAMAMOTO

et al., 1993). Das LH hat eine positive Wirkung auf die Follikel- und Oozytenreifung vor der Luteolyse. Obwohl ein inhibitorischer Effekt des LH nicht genau bekannt ist, wird vermutet, dass hohe LH-Konzentrationen das Androgen: E₂-Verhältnis verschieben, was den Vorgang der Follikelatresie maßgebend beeinflusst (YAMAMOTO et al., 1993; MAPLETOFT et al., 2002). Ein zu hoher LH-Anteil in den FSH-Präparaten kann zu Befruchtungsstörungen führen (LOPES DA COSTA et al., 2001).

Die Entwicklung von synthetischen PGF_{2α} war ein weiterer Meilenstein in der Optimierung der Superovulationsbehandlung beim Rind (MANNNS und HAFS, 1976). PGF_{2α} wird vom Endometrium gegen Ende der Gelbkörperphase gebildet und freigegeben und führt bei nicht graviden Tieren zur strukturellen Rückbildung des zyklischen CL und somit zur Beendigung der Lutealphase, wodurch die das Wachstum eines präovulatorischen Follikels herbeiführenden Vorgänge angeregt werden. PGF_{2α} wirkt hemmend auf die P₄-Synthese durch den CL, verringert seine Blutversorgung und stimuliert gleichzeitig die luteale Oxytocinproduktion (ACOSTA et al., 2002; SHIRASUNA et al., 2004; MIYAMOTO et al., 2005). Das luteale Oxytocin stimuliert wiederum eine vermehrte Freisetzung von PGF_{2α} durch das Endometrium, was zusätzlich die Luteolyse bewirkt (MILVAE, 2000).

Nach Rückbildung des CL wird in den heranwachsenden Follikeln unter dem Einfluss von FSH über einen Anstieg der LH-Rezeptoren vermehrt E₂-17β produziert. Steigende E₂-Konzentrationen erhöhen durch Rückkopplungsmechanismen die Frequenz der tonischen LH-Sekretion, wodurch es zu einem Anstieg der peripheren LH-Konzentrationen und schließlich zum präovulatorischen LH-Peak kommt. Dadurch werden die Ovulation und anschließend die Luteinisierung der Theka-granulosa Zellen des Follikels herbeigeführt. Die Primäreffekte des FSH werden im Rahmen der Superovulation zur Superstimulierung mehrerer Tertiärfollikel, die sich zu präovulatorischen Follikeln entwickeln und während der gleichen Brunst ovulieren, genutzt (MAPLETOFT et al., 2002).

2.4.1.1 Zyklusabhängige Einleitung der Superovulation

Beim konventionellen Superovulationsschema wird die zyklusabhängige Superovulation mit eCG oder FSH am besten in der Mitte des Zyklus (Zyklustage 8-14) induziert und anschließend durch eine oder zwei Injektionen von PGF_{2α} ausgelöst (MAPLETOFT et al., 2002). Eine Superovulation kann jedoch grundsätzlich auch zu einem früheren Zeitpunkt (Zyklustage 2-6) induziert werden, wenn auch mit schlechteren Ergebnissen (GOULDING et al., 1990).

Als Nachteile der zyklusabhängigen Superovulation gelten u.a die Notwendigkeit von kosten- und zeitaufwendigen Brunstbeobachtungen und die Notwendigkeit der Einhaltung von längeren Zeitintervallen bei wiederholten Superovulationen am gleichen Tier. Desweiteren ist die Variabilität der Ovarreaktion sehr groß und erschwert jegliche Voraussage über den Erfolg beim ET (MAPLETOFT et al., 2002).

2.4.1.2 Zyklusunabhängige Einleitung der Superovulation

Die in den letzten Jahren entwickelten Behandlungsschemata zur Steuerung des Zyklus und zur Ovulationssynchronisation leisteten einen wesentlichen Beitrag für die Optimierung der Superovulation beim Rind (BÓ et al., 2008). Zwar wurden schon in den 70er und 80er Jahren Möglichkeiten zur Zykluskontrolle mit Gestagenen und Östrogenen im Rahmen der Superovulationsbehandlung beim Rind untersucht (MOORE, 1975; Mc GAUGH et al., 1974), das Wissen über das Follikelwachstum und die Follikeldynamik war aber für einen breiteren Einsatz noch zu lückenhaft. Nichtsdestotrotz wurde damals schon gezeigt, dass durch die kombinierte Anwendung von Gestagenen bei jedem beliebigen Zyklusstand eine Superovulation mit eCG oder FSH induziert werden kann (VOSS et al., 1983; TENHUMBERG et al., 1984) und man verwendete zu diesem Zweck bereits damals eine P₄-freisetzende Vaginalspirale (PRID[®]) (SCHILLING et al., 1981).

Von den verschiedenen Faktoren, welche die Ergebnisse des Embryo-Transfers beeinflussen, ist der ovarielle und hormonelle Status der Spender zum Zeitpunkt der Superovulationseinleitung einer der wichtigsten (BÓ et al., 2008). Die Ovarreaktion war besser, wenn die Superovulation zum Zeitpunkt der Anbildung einer neuen Follikelwelle gestartet wurde (NASSER et al., 1993; ADAMS et al., 1994).

Die Steuerung des Zyklus und des Follikelwachstums ermöglicht die Einleitung einer Superovulation zu jedem beliebigen Zeitpunkt im Zyklus (BÓ et al., 2002). Der wesentliche Vorteil liegt darin, dass keine Brunstbeobachtungen notwendig sind (BARUSELLI et al., 2006).

Durch mechanische oder hormonelle Behandlungen kann über die Ablation des DF der Zyklus und das Follikelwachstum gesteuert werden (BÓ et al., 2008). Nach der Ablation des DF kommt es 1-2 Tage später zur Anbildung einer neuen Follikelwelle (ADAMS et al., 1993; BERGFELT et al., 1994). Bei nicht superstimulierten Tieren unterdrückt der DF die Entwicklung untergeordneter Follikel und verhindert die Rekrutierung einer neuen Follikelwelle (ADAMS et al., 2008). Allerdings kam dieser Regelkreis nach Superstimulation

mit FSH nicht zustande, obgleich der DF die Auslösung der Superovulation negativ beeinflusste (STOCK et al., 1996).

Nach der Ablation des DF wird entweder eine neue Follikelwelle rekrutiert oder der größte untergeordnete Follikel der gleichen Welle entwickelt sich zum DF (ADAMS et al., 1993). In verschiedenen Untersuchungen wurde der Frage nachgegangen, ob die Anwesenheit eines DF zu Beginn der Superovulationsbehandlung deren Erfolg beeinträchtigt. Die Ergebnisse waren widersprüchlich und zeigten sowohl negative (GRASSO et al., 1989; GUILBAULT et al., 1991; HUHTINEN et al., 1992; BUNGARTZ und NIEMANN, 1994; STOCK et al., 1996; WOLFSDORF et al., 1997; SHAW und GOOD, 2000; KIM et al., 2001; LIMA et al., 2007) als auch keine Einflüsse (WILSON et al., 1990; GRAY et al., 1992; DIAZ et al., 2001). Die Behandlung führte auch nicht zu der gewünschten Einengung der Variabilität der Ovarreaktion auf die Superovulation (MAPLETOFT et al., 2002).

Nach BÓ et al. (2006) sollte mit der Superovulationsbehandlung 1-2 Tage nach der Eliminierung des DF begonnen werden. Dadurch müsste der Behandlungsbeginn nicht zwangsläufig zwischen Zyklustag 8-14 liegen (BERGFELT et al., 1997), was die Organisation des ET wesentlich erleichtern würde.

Die Eliminierung des DF vor Einleitung der Superovulation kann mechanisch mit Hilfe des OPU erreicht werden (BUNGARTZ und NIEMANN, 1994; BARACALDO et al., 2000). Neben den DF können mittels OPU gleichzeitig alle Follikel ≥ 5 mm entfernt werden (BERGFELT et al., 1997; BARACALDO et al., 2000).

Eine weitere Möglichkeit zur Steuerung des Follikelwachstums besteht im Einsatz von Estern des E₂-17 β (E₂-Benzoat, -Valerat und -Cypionat) in Kombination mit P₄ (BÓ et al., 2006). Obwohl diese Kombinationen sich in verschiedenen Untersuchungen für die Steuerung des Follikelwachstums als gut geeignet erwiesen haben (BÓ et al., 2002), kommen sie wegen des Verbotes der Anwendung von E₂-17 β enthaltenden Tierarzneimitteln bei Lebensmittel liefernden Tieren in der EU und in anderen Ländern nicht mehr in Frage (LANE et al., 2008).

Eine Alternative zum E₂ in Kombination mit P₄ ist die Verwendung von GnRH oder von porcinem Luteinisierendes Hormon (pLH) (BÓ et al., 2008). Durch GnRH kommt es zur Ovulation oder zur Luteinisierung des DF und zwei Tage später zur Anbildung einer neuen Follikelwelle (THATCHER et al., 1993; PURSLEY et al., 1995). Bei den Untersuchungen von PURSLEY et al. (1995) zur Effektivität des GnRH für die Steuerung des Follikelwachstums wurden nach GnRH Ovulationsraten von 85% bei Kühen und von lediglich 54% bei Färsen beobachtet. Bei den restlichen Tieren führte die Behandlung nicht zur Anbildung einer neuen Follikelwelle bzw. es traten keine Ovulationen auf. In einer

anderen Studie zum Vergleich der Anwendung von pLH und GnRH ovulierten lediglich 62% bzw. 44% der behandelten Kühe (COLAZO et al., 2007). Aus diesen Gründen wird die Behandlung mit GnRH oder pLH zur Steuerung des Follikelwachstums für Superovulationszwecke als unsicher angesehen (BÓ et al., 2008).

Gestagene werden seit vielen Jahren für die Brunstinduktion und Brunstsynchronisation eingesetzt (RATHBONE et al., 1998). Sie wurden auch bereits in den 80er Jahren in Superovulationsschemata integriert (SCHILLING et al., 1981). Die Gestagene können auf verschiedene Weise appliziert werden, wobei für Superovulationszwecke meistens die P₄-freisetzenden Vaginalpessare verwendet werden (RATHBONE et al., 1998; BARUSELLI et al., 2006; BÓ et al., 2008). Die Behandlung führt zur Aufrechterhaltung einer gelbkörperähnlichen Phase mit Hemmung der hypophysären Gonadotropin-Ausschüttung. Nach Absetzen des Pessars kommt es über den P₄-Abfall zu einem präovulatorischen Gonadotropinanstieg, so dass anschließend die Brunst und die Ovulation gezielt induziert werden (RATHBONE et al., 2001). An ovariectomierten Kühen wurde beobachtet, dass im Laufe der Behandlung mit P₄-freisetzenden Pessaren die Serumprogesteronkonzentration kontinuierlich abfällt (MUNRO, 1987). Auch bei einer sublutealen P₄-Konzentration wird der LH-Peak während der gesamten Behandlungsdauer erfolgreich unterdrückt (SAVIO et al., 1993b). Durch Einsatz der P₄-freisetzenden Pessare in Kombination mit der Applikation von PGF_{2α} kurz vor oder beim Auszug des Pessars kann die Behandlungsdauer verkürzt werden (RATHBONE et al., 1998). Die P₄-freisetzenden Pessare können für die zyklusunabhängige Einleitung einer Superovulation verwendet werden, wobei die Behandlung mit FSH bereits 2-3 Tage nach dem Einsetzen des Pessars gestartet werden kann (BARUSELLI et al., 2006; BÓ et al., 2008). Die Applikation von pLH oder GnRH nach dem Absetzen des Pessars erlaubt bei superovulierten Tieren die Durchführung von terminorientierten Besamungen, ohne die Notwendigkeit von Brunstbeobachtungen (BARUSELLI et al., 2006; BÓ et al., 2006). Zyklusunabhängige Superovulationsschemata mit Verwendung von Vaginalpessaren konnten von vielen Autoren erfolgreich eingesetzt werden, ohne dass es dabei zu einer Verschlechterung der Ergebnisse gegenüber dem konventionellen ET gekommen wäre. (ANDRADE et al., 2003; TAKEDOMI et al., 2005; BARUSELLI et al., 2006; BARATI et al., 2006; SON et al., 2007a, 2007b)

2.4.1.3 Wiederholte Superovulation

In verschiedenen Untersuchungen wurden die Einleitung von Superovulationen und die Embryoentnahmen in bestimmten Zeitabständen wiederholt an den gleichen Tieren durchgeführt (CHRISTIE et al., 1979; DONALDSON und PERRY, 1983; HASLER et al., 1983; LAMBERSON und LAMBETH, 1986; BASTIDAS und RANDEL, 1987; HAHN et al., 1987; DORN et al., 1991; TOTEY et al., 1992; FRARE et al., 1997; OIKAWA et al., 1998; TONHATI et al., 1999; TROPPMANN, 2000). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse wiederholter Superovulationen zeigt die Tabelle 3.

Tab. 3: Ergebnisse wiederholter Superovulationen und Embryoentnahmen beim Rind

Autor(en), Jahr (Nr. der Embryoentnahme)	Tier- zahl	Zeit- Abstand (Tage)	Anzahl Eizellen u. Embryonen/ ET-tgl. Embryonen pro Embryoentnahme										
			(1.)	(2.)	(3.)	(4.)	(5.)	(6.)	(7.)	(8.)	(9.)	(10.)	
CHRISTIE et al., 1979	14	k.A. ¹	5	2	3	4	3						
DONALDSON und PERRY, 1983	1.192	k.A. ¹	-/6	-/6	-/5	-/6	-/5	-/5	-/5	-/5	-/6	-/5	-/5
HASLER et al., 1983	1.000	k.A. ¹	11/8	11/8	11/8	13/7	9/6	8/4	10/5	10/3	10/5	13/6	
LAMBERSON und LAMBETH, 1986	75	k.A. ¹	9/5	10/5	9/8								
BASTIDAS und RANDEL, 1987	813	65	9/6	8/5	7/4	7/4	3/2	5/3					
HAHN et al., 1987	1.242	k.A. ¹	11/9	13/10	10/7	13/9	(gut geeignete Spender)						
			9/6	9/6	9/6	7/4	(mittelmäßig geeignete Spender)						
			5/3	4/3	5/3	4/2	(schlecht geeignete Spender)						
DORN et al., 1991	5	35	17/11	4/2	9/6	7/5	6/4						
TOTEY et al., 1992	7	90-120	6/2	5/4	3/2	3/2	3/2						
FRARE et al., 1997	62	40	14/6	10/5	12/6	11/6	12/9	10/8	4/4	5/4			
		70	14/8	12/6	19/9	28/11							
OIKAWA et al., 1998	9	63	9/6	11/8	7/5								
TONHATI et al., 1999	2.941	k.A. ¹	-/6	-/6	-/7	-/6	-/7						
TROPPMANN, 2000	10 ²	35-126	27/16	18/9	17/10	18/8	17/10	19/10	17/9	19/10	14/8	17/8	

¹⁾ k.A.= keine Angaben; ²⁾ Nur gut geeignete Spender

Nach Ansicht von LAMBERSON und LAMBETH (1986) werden 2-3 Superovulationen benötigt, um eine Aussage über die Eignung eines Spenders für wiederholte Embryoentnahmen treffen zu können. HAHN et al. (1987) geben die Wahrscheinlichkeit dass bei einem Spender von einer bereits stattgefundenen Superovulation auf das Ergebnis der

nächsten geschlossen werden kann mit 20% an. Nach vier Embryoentnahmen lag diese Wahrscheinlichkeit bei 50% (HAHN et al., 1987). Eine Aufstellung der in verschiedenen Untersuchungen berechneten Heritabilitäten und die Wiederholbarkeiten der Ovarreaktion nach Superovulation und der gewonnenen Eizellen/Embryonen pro Spendertier zeigt die Tabelle 4.

Tab. 4: Heritabilität und Wiederholbarkeit von ET-Ergebnissen beim Rind

Autor(en), Jahr	Tierzahl	Embryo-Entnahme n	Heritabilität		Wiederholbarkeit	
			Ovarreaktion n	Eizellen/ Embryone n	Ovarreaktion n	Eizellen/ Embryonen
TONHATI et al., 1999	2.941	5.387	k.A. ¹	0,03 ²	k.A. ¹	0,13 ²
BÈNYEI et al., 2004	28+28 ³	235	0,234	0,159	0,386	0,301
PEIXOTO et al., 2004	475	1.036	0,47- 0,57	0,20-0,65	0,47- 0,51	0,47-0,51
KÖNIG et al., 2007	2.489	4.196	0,231	0,021 ²		

¹) k.A.= keine Angaben; ²) transfertaugliche Embryonen; ³) Mütter + Töchter

Viele Autoren haben bei den Spendern eine Tendenz zu rückläufigen Ergebnissen mit steigender Anzahl wiederholter Superovulationen beobachtet. Auch die Variabilität der Ovarreaktionen war in diesen Untersuchungen beträchtlich (LUBBADEH et al., 1980; DONALDSON und PERRY, 1983; BASTIDAS und RANDEL, 1987; GRANDKE et al., 1990; TOTEY et al., 1992).

TONHATI et al. (1999) konnten an einer größeren Tierzahl bei bis zu fünfmal wiederholt durchgeführten Superovulationen eine durchweg konstante Anzahl an Eizellen/Embryonen und an transfertauglichen Embryonen pro Embryoentnahme beobachten. Allerdings wurde auch bei dieser Untersuchung eine große Variabilität bei den Ovarreaktionen, sowohl innerhalb eines Spenders, als auch zwischen den Spendern beobachtet. MONNIAUX et al. (1983), LERNER et al. (1986) und GRANDKE et al. (1990) konnten im Laufe wiederholter Embryoentnahmen bei Dauerspendern keine Tendenz zu rückläufigen Ergebnissen mit steigender Anzahl wiederholter Embryoentnahmen feststellen.

Nach HAHN (1988) sollte der Zeitabstand zwischen zwei aufeinander folgenden Embryoentnahmen am gleichen Tier mindestens 50 Tage betragen. Bei FRARE (1997) betrug das Intervall zwischen Embryoentnahmen in einer Spendergruppe, die 5-mal wiederholt behandelt wurde, 60-90 Tage. In einer zweiten Gruppe wurden 8-mal wiederholte Embryoentnahmen im Abstand von 35 Tagen durchgeführt. Die Unterschiede zwischen den

Ergebnissen der Embryoentnahme beider Gruppen waren nicht signifikant. Zu vergleichbaren Ergebnissen kam auch BUSSE (1995), der den Einfluss von Wiederholungen bei Embryoentnahmen am gleichen Tier im 6-wöchigen Rhythmus untersuchte und die Ergebnisse mit einer Kontrollgruppe mit Wiederholungen in längeren Zeitabständen verglich. Bei TROPFMANN (2000) wurden 14 selektierte Dauerspender in 35-126-tägigen Intervallen bis zu 24-mal wiederholt superovuliert. Dabei wurden im Durchschnitt 17,3 Eizellen/Embryonen pro Embryoentnahme gewonnen, davon 8,9 transfertaugliche Embryonen. TROPFMANN (2000) folgerte, dass durch wiederholte Embryoentnahmen im Durchschnitt 80 transfertaugliche Embryonen pro Spender und Jahr gewonnen werden können, wenn das Intervall zwischen den Superovulationsbehandlungen 40 Tage beträgt. Auf der Grundlage ihrer Ergebnisse können nach TROPFMANN (2000) dagegen mittels OPU und IVP pro Jahr und Spender im Durchschnitt 92 transfertaugliche Embryonen erzeugt werden. Nach TROPFMANN (2000) stellt die OPU mit der IVP eine konkurrenzfähige Alternative zu dem konventionellen ET dar.

2.5 Untersuchungen zu Faktoren die die Ergebnisse von SO/ET beeinflussen

Neben der individuellen Veranlagung wird eine Vielzahl anderer Faktoren als Ursache für die erhebliche Variabilität der Ergebnisse des ET gesehen. Grundsätzlich ist hierbei zwischen tierspezifischen (intrinsischen) und umweltbedingten (extrinsischen) Faktoren zu unterscheiden (Tabelle 5). Unter stationären Bedingungen jedoch können Umwelteinflüsse konstant gehalten und verschiedene tierspezifische und behandlungsbedingte Einflüsse besser untersucht werden.

Auf einige dieser Faktoren wurde bereits in vorangegangenen Kapiteln eingegangen, die übrigen sollen hier näher erläutert werden.

Tab. 5: Einflussfaktoren auf die Superovulationsergebnisse beim Rind (modifiziert nach NIEMANN und MEINECKE, 1993; BREM, 1999; KAFI und MCGOWAN, 1997)

Tierspezifische (Intrinsische) Faktoren	Umweltbedingte (Extrinsische) Faktoren
Rasse	Jahreszeit und Klima
Parität und Alter	Stress
Biologische Rastzeit und Geburtsverlauf	Fütterung
Gesundheitszustand	Haltungssystem
Körpergewicht	Besamung
Milchleistung und Laktationsstadium	Verwendetes Gonadotropin ¹
Individuelle Veranlagung und Abstammung	Behandlungsschemata und –zeitraum ¹
Dominanter Follikel (DF) ¹	Wiederholte Superovulationen ¹

¹ Siehe vorangegangene Kapitel

2.5.1 Tierspezifische (Intrinsische) Faktoren

2.5.1.1 Rasse

Tiere einzelner Rinderrassen reagieren unterschiedlich auf die Superovulationsbehandlung. Im Allgemeinen werden die Zweinutzungs- und Fleischrassen im Vergleich zu den milchbetonten Rassen als besser geeignet angesehen (SCHILLING, 1982; LEROY et al., 2005). Nach Angaben in den Jahresberichten der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter (ADR) eignen sich die Rassen Deutsches Fleckvieh (DFV), Rotvieh und Gelbvieh besonders gut für den ET, wobei verhältnismäßig wenige Embryoentnahmen bei Rot- bzw. Gelbvieh stattfanden (Tabelle 6). KING et al. (1995) stellten bei Chromosomenanalysen fest, dass Embryonen der Rasse Holstein-Friesian mehr Erbgutschäden aufwiesen die anderer Rassen.

Bos indicus Rinder unterscheiden sich in einigen, den ET betreffenden, Aspekten von Bos taurus Rindern. So werden häufig kleinere Follikel beobachtet und die Tiere reagieren empfindlicher auf Gonadotropine. Außerdem ist die Brunst beim Bos indicus im Vergleich kürzer und die Brunstsymptome treten nachts stärker hervor (BARUSELLI et al., 2006)

Tab. 6: Durchschnittliche Anzahl der ET-tgl. Embryonen aus konventionellem ET nach Rasse in Deutschland (ADR Jahresbericht, 2004)

Rasse	Anzahl Embryoentnahmen	Durchschnittliche Anzahl ET-tgl. Embryonen pro Embryoentnahme
Holstein-Schwarzbunt	1753	5,3
Holstein-Rotbunt	173	8,2
DFV	672	9,3
Braunvieh	132	7,4
Rotvieh	18	10,7
Gelbvieh	38	9,2

2.5.1.2 Parität und Alter

Ein Faktor mit großem Einfluss auf das Ergebnis der Superovulationsbehandlung ist die Parität des Spendertieres. Färsen produzieren normalerweise weniger ET-tgl. Embryonen als Kühe und reagieren empfindlicher auf die Superovulationsbehandlung (JANOWITZ, 1991). Die Variabilität in den Resultaten ist größer und der Anteil der Embryoentnahmen ohne oder mit nur einem ET-tgl. Embryo ist höher als bei Kühen (JANOWITZ, 1991).

Verschiedene Autoren konnten jedoch keinen Einfluss der Parität auf die Qualität der Embryonen feststellen (HASLER et al., 1983; WALTON und STUBBINGS, 1986) oder erhielten bei Färsen sogar bessere Resultate (SCHILLING, 1982; LOPES DA COSTA et al., 2001; CHAGAS E SILVA et al., 2002; LEROY et al., 2005).

In engem Zusammenhang mit der Parität der Tiere steht ihr Alter. GLATZEL et al. (1999) konnten die meisten Embryonen bei Spenderkühen im Alter von 5,0-6,0 Jahren gewinnen. LERNER et al. (1986) gaben 5,6 Jahre als das optimale Alter für eine Superovulationsbehandlung an. Mit höherem Alter der Tiere werden die Ergebnisse wieder schlechter (SCHILLING, 1982; DONALDSON, 1984; GLATZEL et al., 1999). HASLER et al. (1983) gaben die Grenze hierfür mit 10 Jahren an. Grund hierfür ist nach LERNER et al. (1986) eine verminderte Antwort auf die Gonadotropinbehandlung, weshalb höhere Mengen an FSH appliziert werden sollten. DESAULNIERS et al. (1995) zeigten, dass mit zunehmendem Alter häufiger Funktionsstörungen an Ovarien und Uterus auftreten können, die ohne eine Superovulationsbehandlung nicht auffallen würden.

AX et al. (2005) zeigten, dass eine Superovulation und Embryoentnahme grundsätzlich bereits ab einem Alter von 10 Monaten möglich ist, ohne negativen Einfluss auf die spätere Fruchtbarkeit und Leistung der Tiere.

2.5.1.3 Biologische Rastzeit und Geburtsverlauf

Der Verlauf der letzten Geburt kann Auswirkungen auf den Erfolg der Superovulationsbehandlung haben. So liefern laut GÖRLACH (1997) Tiere mit niedrigem KB-Index und kurzer Zwischenkalbezeit, nach komplikationsloser Gravidität und Geburtsverlauf sowie einem ungestörten Puerperium und einem regelmäßigen Zyklus mit deutlichen Brunstsymptomen bereits vier Wochen post partum, die besten ET-Ergebnisse.

Die Bedeutung der Rastzeit nach der letzten Geburt wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. SCHILLING (1982) konnte die besten Resultate bei einer Superovulationsbehandlung nach einer Rastzeit von 60-70 Tagen erzielen. SEIDEL et al. (1978) empfehlen eine Rastzeit von 75 Tagen. HASLER et al. (1983) erzielten die besten Ergebnisse nach einer Rastzeit von 151- 300 Tagen. KWEON et al. (1986) dagegen konnten keinen Zusammenhang zwischen der Rastzeit und dem Erfolg der Superovulationsbehandlung feststellen.

2.5.1.4 Gesundheitszustand

Voraussetzung für gute Resultate beim ET ist ein guter Gesundheitszustand der Spendertiere (STROUD und HASLER, 2006). Bereits die für die Superovulation notwendige Hormonbehandlung stellt eine Belastung der Rinder dar (NIEMANN und MEINECKE, 1993) und jegliche weitere klinische Störung im Behandlungszeitraum kann die Quantität und die Qualität der Embryonen negativ beeinflussen (GLATZEL et al., 1999). Auch Futtermittelintoxikationen und Endoparasitenbehandlungen zum Zeitpunkt der Superovulationsbehandlung haben einen schädigenden Einfluss auf die Qualität der Embryonen (GÖRLACH, 1997). KAFI et al. (1994, 1996) untersuchten die Auswirkungen inapparenter BVD/MD-Infektionen auf die Ergebnisse der Embryoentnahme nach Superovulation. Sie fanden heraus, dass die Ovulationsrate bei Färsen der Rasse Holstein-Friesian, die zum Zeitpunkt der Besamung mit BVD infiziert waren, tendenziell niedriger war (KAFI et al., 1996) und diese Tiere signifikant weniger ET-tgl. Embryonen lieferten (KAFI et al., 1994).

Nach BUSSE (1995) stellt eine gynäkologische Untersuchung der Spendertiere ein wichtiges Kriterium für die Auswahl von Spendertieren dar. Tiere mit Fruchtbarkeitsstörungen produzieren signifikant weniger ET-tgl. Embryonen und reagieren teilweise überhaupt nicht auf die Superovulationsbehandlung (HASLER et al., 1983).

Einige Fruchtbarkeitsstörungen werden trotz gründlicher klinischer Untersuchung nicht erkannt, wie beispielsweise Verklebungen der Eileiter, was trotz guter Ovarreaktion zu schlechten Ergebnissen beim ET führen kann (BOWEN et al., 1978).

Eine besondere Stellung kommt den subklinischen Endometritiden zu, die aufgrund ihrer klinischen Inapparenz nicht erkannt werden, und zu schlechten Ergebnissen führen. So lieferten klinisch unauffällige Spendertiere mit subklinischen Infektionen, die histologisch und bakteriologisch an Biopaten bzw. Spülproben diagnostiziert wurden, signifikant weniger ET-tgl. Embryonen (MÜLLER, 1988).

2.5.1.5 Körpergewicht

YAKUUB et al. (1999) kamen zu dem Ergebnis, dass der Ernährungszustand und die Energiebilanz der Spendertiere das Ergebnis einer Superovulationsbehandlung beeinflussen. Tiere mit einem Body condition score (BCS) von 4,0-5,0 lieferten schlechtere Ergebnisse bei der Embryoentnahme und zeigten häufiger zystische Follikel als Spender mit einem BCS von

2,5-3,0 (SIDDQUI et al., 2002). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen KADOKAWA et al. (2008), bei denen sich Tiere mit einem BCS zwischen 2,8 und 3,3 in den Ergebnissen der Embryoentnahme nicht signifikant unterschieden. Erst ab einem BCS von 3,5 wurde ein negativer Effekt auf die Ergebnisse bemerkbar.

2.5.1.6 Milchleistung und Laktationsstadium

Der Einfluss des Laktationsstadiums und der Milchleistung auf die ET-Ergebnisse wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Bei laktierenden Kühen werden mehr ET-tgl. Embryonen als bei trockenstehenden Spendern gewonnen (SCHILLING, 1982; HASLER et al., 1983). Bei hoher Milchleistung wird allerdings das Gegenteil beobachtet. In verschiedenen Untersuchungen wurde ein negativer Einfluss hoher Leistungen auf die Quantität und Qualität der gewonnenen Embryonen festgestellt (BUSSE, 1995; GLATZEL et al., 1999; MANCIAUX et al., 2000; LEROY et al., 2005). Erklären lässt sich dies durch die in der frühen Laktation auftretende Diskrepanz zwischen Energiebilanz und Leistung, was bei einer Hochleistung zu Fertilitätsstörungen führen kann (KAFI und MCGOWAN, 1997). GLATZEL et al. (1999) stellten ab einer Milchleistung von 40kg/Tag einen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis der Embryoentnahme fest. MANCIAUX et al. (2000) erkannten diese Grenze für Montbeliardkühe bei einer 305 Tagesleistung von mehr als 11.000 kg Milch.

Neben der Milchmenge hat auch deren Zusammensetzung einen Einfluss auf das Ergebnis der Embryoentnahme. So fand MÖHRLE (1999) heraus, dass bei Spenderkühen der Rasse DFV anfangs eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der gewonnenen Embryonen und dem Milchfettgehalt bestand (0,5 zusätzliche Embryonen pro 0,1 % höherem Milchfettgehalt). Steigt jedoch der Fettgehalt über 4,5 % oder liegt der Fett-Eiweißquotient über 1,3 so sinkt die Zahl der Eizellen/Embryonen und der ET-tgl. Embryonen.

2.5.1.7 Individuelle Veranlagung und Abstammung

Nach GLATZEL et al. (1999) ist die Variabilität der Ovarreaktion auf die Superovulation beträchtlich, was eine Voraussage über den Erfolg der Behandlung sehr erschwert. Verschiedenen Autoren zufolge lassen die Ergebnisse vorangegangener Superovulationsbehandlungen Rückschlüsse auf die individuelle Eignung der Spender zu (LAMBERSON und LAMBETH, 1986; HAHN, 1987; TROPFMANN, 2000).

Viele Autoren stellten einen genetischen Einfluss auf das Ergebnis der Embryoentnahme fest (SEIDEL et al., 1978; LINDNER und WRIGHT, 1983; MANCIAUX et al., 2000; PONSART et al., 2001). Nach KING et al. (1985) und BROADBENT et al. (1991) ließe sich durch gezielte Selektion auf ET-Eignung der Erfolg von ET-Programmen deutlich steigern.

ALVAREZ et al. (2005) untersuchten die Effekte von Inzucht unter Mantiqueira Rindern auf das Ergebnis der Superovulationsbehandlung. Sie zeigten, dass bei einem Inzuchtkoeffizienten von über 9% die Qualität der Embryonen vermindert war.

TSILIGIANNI et al. (2007) untersuchten den Einfluss der Aktivität von Glycosidasen (Beta-N-Acetyloglucosaminidase, Alpha-Mannosidase und Beta-Galactosidase) im Uterussekret auf die Ergebnisse der Embryoentnahme. Sie erkannten hierbei eine positive Korrelation zwischen der Beta-NAGASE (Beta-N-acetyloglucosaminidase)-Aktivität und der Anzahl gewonnener Eizellen/Embryonen und dem Anteil ET-tgl. Embryonen.

CHORFI et al. (2007) beobachteten, dass hohe Serumkonzentrationen von Mg und K mit einer höheren, eine hohe Aktivität von Kreatininkinase jedoch mit einer niedrigeren Anzahl an ET-tgl Embryonen in Zusammenhang stehen.

Einen neuen Ansatz stellen die Ergebnisse von RICO et al. (2008) dar. Sie versuchten, ähnlich wie in der Humanmedizin, durch Messung des Plasmagehalts an AMH (Anti-Müller Hormon) eine Voraussage über die Reaktion auf die Superovulation zu treffen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Tiere mit einem hohen AMH-Plasmaspiegel auch die höchsten Reaktionen zeigten und umgekehrt diejenigen mit einer niedrigen AMH-Konzentration die schlechtesten. Bei einer wiederholten Untersuchung nach 3 Monaten zeigte sich zudem dass der jeweilige AMH-Plasmaspiegel der einzelnen Tier gleichgeblieben war, also charakteristisch für diese zu sein scheint.

IRELAND et al. (2007) stellten einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Follikel eines Spenders vor Einleitung einer Superovulation und der Ovarreaktion fest.

2.5.2 Umweltbedingte (Extrinsische) Faktoren

2.5.2.1 Jahreszeit und Klima

Der Einfluss von Jahreszeit und Klima auf die Ergebnisse der Superovulation wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Ein Teil der Autoren konnte keinen signifikanten Einfluss auf das Resultat einer Superovulationsbehandlung feststellen (MISRA et al., 1999; BARATI et al., 2006) oder lediglich geringe Abweichungen (HASLER et al., 1983).

Andere Autoren stellten jedoch Unterschiede in den Ergebnissen in Abhängigkeit von der Jahreszeit fest (ROMAN-PONCE et al., 1978; PUTNEY et al., 1989; BÈNYEI et al., 2003; MARQUEZ et al., 2005).

PUTNEY et al. (1989) stellten zwar keinen Effekt der Jahreszeit auf die Ovarreaktion nach Superovulation, jedoch auf die Qualität der gewonnenen Embryonen fest. Als Ursache nennen sie den Hitzestress, der zu einer reduzierten Futteraufnahme und zu energetischen Defiziten führen kann. Als Folge sinkt der Insulin- und Glucosespiegel was sich einerseits negativ auf die Follikelreifung und andererseits positiv auf die Qualität der Eizellen auswirkt (O'CALLAGHAN und BOLAND, 1999). Glucose ist Hauptenergielieferant des Ovars (RABIEE et al., 1997) und besitzt somit ebenfalls einen stimulierenden Einfluss auf das Follikelwachstum. Eine Hypoglykämie unterdrückt zudem die pulsatile LH-Sekretion, wodurch Ovulationsstörungen und Zysten vermehrt auftreten (JOLLY et al., 1995).

MARQUEZ et al. (2005) untersuchten in tropischen Gebieten den Einfluss der Jahreszeit auf die ET-Ergebnisse. Sie kamen zu dem Schluss, dass Embryonen die während der Trockenzeit gewonnen wurden morphologisch schlechter waren als solche die während der Regenzeit gewonnen wurden.

BÈNYEI et al. (2003) untersuchten die Auswirkungen des El Nino Phänomens auf die Reaktion von Spenderkühen auf die Superovulation. Bei hohen Temperaturen wurde durch den Hitzestress ein negativer Einfluss auf Embryonenqualität, Ovarreaktion und Embryonenproduktion ermittelt.

Nach ROMAN-PONCE et al. (1978) bewirken hohe Umgebungstemperaturen eine schlechte Embryonenqualität, was in den Untersuchungen von RIVERA und HANSEN (2001) und (WOLFENSON et al., 1997) vermehrt zum frühen Embryonaltod führte.

2.5.2.2 Stress

Als Stress kann im Allgemeinen jede Umweltveränderung im Lebensraum der Tiere angesehen werden, was zu Fruchtbarkeitsstörungen führt (DOBSON et al., 2001). Sowohl der Transport der Tiere selbst als auch der Umgebungswechsel während einer Superovulationsbehandlung wirken sich negativ auf die Superovulationsergebnisse aus (EDWARDS et al., 1987). Auch die Rangordnung der Spender in der Herde übt einen negativen Einfluss auf die Ergebnisse aus. So erzielten rangniedrigere Tiere die mit ranghöheren zusammen gehalten wurden im Schnitt 2,7 ET-tgl. Embryonen weniger als nach Trennung der rangniederen Spender in einer separaten Gruppe (GLATZEL et al., 1999).

Stress führt zur schnellen Ausschüttung von ACTH, wodurch es zu einer erhöhten Sekretion von Kortikosteroiden in der Nebenniere kommt (STOBEL und MOBERG, 1982b; GWAZDAUSKAS, 1972). Dadurch wird P₄ (WAGNER et al., 1972) und E₂-17β (LUNAAS, 1970) induziert. Die basale Plasmakonzentration von LH und GnRH (DOBSON und SMITH, 2000) und der präovulatorische Anstieg von LH (STOEBEL und MOBERG, 1982a) wird durch den Stress unterdrückt und die E₂-Produktion durch langsamer wachsende Follikel vermindert (DOBSON und SMITH, 2000). Dies kann zu Ovulationsstörungen (MATTERI et al., 1982), bzw. zu einer verminderten Ovulationsrate führen (EDWARDS et al., 1987). DOBSON und SMITH (2000) beobachteten nach Behandlung der Tiere mit exogenem ACTH, dass das aus der Nebenniere freigesetzte Cortisol zu einer verminderten Empfindlichkeit der Ovarien gegenüber exogenen Gonadotropinen führt, was sich laut EDWARDS et al. (1987) und TRIBULO et al. (1993) negativ auf die Ovarreaktion nach Superovulationsbehandlung auswirkt.

2.5.2.3 Fütterung

NOLAN et al. (1998) zeigten, dass eine restriktive Fütterung von Spendertieren kurz vor und während einer Superovulationsbehandlung einen positiven Effekt auf die Ovarreaktionen und die Embryonenqualität ausüben kann. Eine abrupte Verringerung der Nahrungsaufnahme kann sich negativ auf die Qualität der Embryonen auswirken (YAAKUB et al., 1997). Verschiedene Autoren berichteten über negative Auswirkungen einer energetischen Überversorgung der Spender auf das Ergebnis der Embryoentnahme. Bei einem Vergleich von Spendern mit schlechten (< 3 ET-tgl. Embryonen), mittelmäßigen (3-6 ET-tgl. Embryonen) und guten (> 6 ET-tgl. Embryonen) Resultaten stellten NIBART et al. (1997) einen Zusammenhang zwischen der Energieversorgung der Tiere und den Ergebnissen fest. SIDDIQUI et al. (2002) bildeten zwei Gruppen aus Spendern, von denen eine bedarfsgerecht ernährt (Gruppe 1) und die andere überversorgt wurde (Gruppe 2). Bei Beginn der Superovulationsbehandlung lagen BCS und Körpergewicht der Tiere aus Gruppe 2 deutlich über denen der Tiere aus Gruppe 1. Die Tiere in Gruppe 2 lieferten im Gegensatz zu denen in Gruppe 1 keine Embryonen, und neigten vermehrt zu Ovarzysten.

Durch erhöhte Insulinwerte wird die LH-Freisetzung vermindert und es treten vermehrt Ovarialzysten bei Tieren mit hohem BCS auf (DOWNING und SCARAMUZZI, 1997). In engem Zusammenhang mit dem Insulin und dem Ernährungszustand der Tiere stehen die Insulin-like growth factors (O'CALLAGHAN und BOLAND, 1999). Tiere mit einem extrem

niedrigen oder hohen BCS zeigen eine geringere IGF-I Konzentration in der Follikelflüssigkeit als Tiere mit einem durchschnittlichen BCS (RAYAN et al., 1994). IGF-I ist an der Sensibilisierung der Granulosa-Zellen gegenüber Gonadotropinen, an der Reifung der Oozyten und an der frühen Embryonalentwicklung beteiligt (KANE et al., 1997).

GONG et al. (2002) konnten die Ovarreaktionen verbessern, indem sie Jungrinder 3 Wochen vor der Superovulation mit doppeltem Erhaltungsbedarf versorgten. Auch GUTIERREZ et al. (1997) zeigten, dass bei Färsen die Anzahl kleinerer Follikel (< 4 mm) durch eine kurzfristige Steigerung der Energiezufuhr erhöht werden kann.

MIKKOLA et al. (2005) untersuchten die Auswirkung verschiedener Anteile von Rohprotein in der Futtermischung auf das Ergebnis der Superovulationsbehandlung. Finnische Ayrshire Färsen erhielten isoenergetische Rationen mit entweder 14% oder 18% Gehalt an Rohprotein. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass weder die Reaktion auf die Superovulation noch die Gesamtzahl der gewonnenen Embryonen oder die Anzahl der ET-tgl. Embryonen vom Rohproteingehalt des Futters beeinflusst wurden. Allerdings war der Anteil an Embryonen schlechter Qualität in der Gruppe mit dem niedrigeren Rohproteingehalt höher. HUMBLLOT et al. (1998) erkannten eine signifikant negative Korrelation zwischen einer hohen Menge verdaulichen Proteins in der Futtermischung und der Anzahl an ET-tgl. Embryonen.

PETIT et al. (2008) beobachteten, dass die Verfütterung von Leinsamen, die einen erhöhten Gehalt an N-3 Fettsäuren aufweisen, negative Auswirkungen auf die Qualität der Embryonen hat. BADER et al. (2005) gaben Kühen präpartal eine erhöhte Menge an fettreicher Nahrung (Sojabohnen) und überprüften den Effekt auf eine nachfolgende Superovulation. Sie konnten jedoch keine Unterschiede bezüglich der Gesamtzahl gewonnener Embryonen, der Anzahl der ET-tgl. Embryonen, der degenerierten Embryonen oder der unbefruchteten Eizellen feststellen.

Bei einer ausgewogenen Ration, die die Spurenelementversorgung sicherstellt, spielt es keine Rolle, aus welcher Quelle (anorganisch oder organisch) diese Spurenelemente stammen (LAMB et al., 2008).

SALES et al. (2008), behandelten Kühe und Färsen während der Superovulation mit intramuskulären Injektionen von Beta-Carotin in Verbindung mit Tocopherol (800 mg Beta-Carotin und 500 mg Tocopherol sowie 1200 mg Beta-Carotin und 750 mg Tocopherol). Die Behandlung übte bei Kühen einen positiven Einfluss und bei Färsen einen negativen Einfluss auf die Embryonenqualität aus.

2.5.2.4 Haltungssystem

HANSELMANN (1995) verglich die Haltungssysteme Laufstall, Anbindehaltung und Weidegang miteinander und konnte bei Spendertieren mit Weidegang im Schnitt 2,2 mehr ET-tgl. Embryonen pro Behandlung als bei Tieren in Stallhaltung gewinnen.

HOFMANN (2005) dagegen konnte keinen Einfluss der Parameter Bestandsgröße oder Stallsystem auf die Embryonenausbeute erkennen. Er erklärte dies dadurch, dass den Spendertieren innerhalb der Herde eine Sonderstellung zukommt und diese daher durch den Tierhalter verstärkt betreut werden.

2.5.2.5 Besamung

MANCIAUX et al. (2000) beobachteten einen signifikanten Einfluss des eingesetzten Besamungsbullen auf den Anteil der ET-tgl. Embryonen und unbefruchteten Eizellen, sowie auf den Anteil der Klasse-1 Embryonen. PONSART et al. (2001) und HUPKA (2000) beobachteten einen signifikanten Einfluss des Bullen auf die Anzahl der Klasse-1 Embryonen. Es wurden mehr ET-tgl. Embryonen gewonnen, wenn die Besamungen mit Sperma von zwei unterschiedlichen Bullen (Mischbesamung) erfolgte (HUPKA, 2000).

Durch den Einsatz von Frischsperma kann der Anteil ET-tgl. Embryonen gesteigert (ONUMA et al., 1970; SEIDEL et al., 1978; NOHNER et al., 1996) und die durchschnittliche Anzahl unbefruchteter Eizellen pro Embryoentnahme reduziert werden (NOHNER et al., 1996). Dagegen konnten HAWK et al. (1988) durch den Einsatz von Frischsperma keine signifikante Verbesserung der Fertilisationsraten feststellen.

NEWCOMB (1980) stellte einen hochsignifikanten Unterschied in den Befruchtungsraten nach ein- oder zweimaliger Besamungen (48 h bzw. 48 und 72 h nach PGF_{2α}) fest. Bei einmaliger Besamung lag der Anteil unbefruchteter Eizellen bei 29,9%, bei zweimaliger dagegen nur bei 5,0%. BECKER et al. (2000) erzielten ebenfalls die besten Resultate mit einer zweimaligen Besamung. Eine dritte Besamung scheint das Ergebnis jedoch nicht mehr signifikant zu beeinflussen (WALTON und STUBBINGS, 1986). Andere Autoren stellten keine Verbesserung der Befruchtungsrate bei einer zwei- bzw. dreimaligen Besamung gegenüber der einmaligen Besamung fest (WEST et al., 1984; LÓPEZ-GATIUS et al., 1988). IDETA et al. (2007) untersuchten Auswirkungen des Zeitpunktes (48 h oder 56 h nach PGF_{2α}) einer einmaligen Besamung. Sie konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl gewonnener ET-tgl. Embryonen feststellen.

SCHENK et al. (2006) untersuchten den Einfluss der Verwendung gesexten Spermas auf die Anzahl befruchteter Embryonen. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis das bei der Verwendung von Dosierungen von 20×10^6 Spermien pro Portion (bei 90% Reinheit des Spermas nach Auftrennung mittels Flow-Zytometrie) die Resultate vergleichbar denen mit ungesextem Sperma waren. Bei Dosierungen mit weniger Spermien waren die Ergebnisse hingegen schlechter.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an weiblichen, nicht laktierenden Rindern der Embryoentnahme- und Embryoerzeugungseinrichtung Badersfeld des Lehrstuhls für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der LMU-München mit der Registriernummer DE ETR 006-EWG durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte in einem Offenfrontstall mit Tiefstreuboxen und Fressfanggitter in Gruppen à 3-5 Tiere pro Box. Die Tiere wurden mit Grassilage und Heu ad libitum gefüttert und ihnen wurde bedarfsgerecht Mineralstoffkonzentrat angeboten. Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Im Zeitraum 30.03.2006 bis 31.06.2008 wurden insgesamt 307 Embryoentnahmen bei 21 Färsen und 37 trockenstehenden Kühen der Rassen Deutschen Fleckvieh (DFV, n= 58), 1 Färse und 1 Kuh der Rasse Pustertaler Sprinze (OT), 2 Kühen der Rasse Murnau Werdenfelser (MW) und 1 Kuh der Rasse Original Brauvieh (OBV) durchgeführt. Die Färse und die Kuh der Rasse OT waren zum Zeitpunkt der ersten Embryoentnahme 5,0 bzw. 11,0 Jahre alt. Das Alter der zwei Kühe der Rasse MW betrug 9,0 und 14,5 Jahre. Die Kuh der Rasse OBV war 16,0 Jahre alt. Die Verteilung der wiederholten Embryoentnahmen nach Alter der Spender der Rasse DFV zum Zeitpunkt der ersten Embryoentnahme zeigt Tabelle 7.

Tab. 7: Verteilung der Embryoentnahmen nach Alter der Spender der Rasse DFV

Alters- klasse	Alter (Jahre)	Färsen		Kühe		Gesamtzahl Embryo- entnahmen
		Anzahl Tiere	Anzahl Embryo- entnahmen	Anzahl Tiere	Anzahl Embryo- entnahmen	
1	1,5	10	53	0	0	113
	2,0	10	46	0	0	
	3,0	1	9	2	5	
2	4,0	0	0	4	16	55
	5,0	0	0	4	16	
	6,0	0	0	6	23	
3	7,0	0	0	2	14	41
	8,0	0	0	3	14	
	9,0	0	0	3	13	
4	10,0	0	0	3	15	34
	11,0	0	0	3	9	
	12,0	0	0	3	10	
5	13,0	0	0	1	19	28
	14,0	0	0	2	5	
	16,0	0	0	1	4	
Gesamt		21	108	37	163	271

Die Verteilung der wiederholten Embryoentnahmen nach Rasse und Jahr zeigt Tabelle 8.

Tab. 8: Verteilung der wiederholten Embryoentnahmen nach Rasse und Jahr

Rasse	Anzahl Embryoentnahmen			Gesamtzahl Embryoentnahmen
	2006	2007	2008	
DFV	99	104	68	271
OT	4	13	2	19
MW	1	5	1	7
OBV	1	8	1	10
Gesamt	105	130	72	307

Die Verteilung der wiederholten Embryoentnahmen nach Parität des Spenders (Färsen oder Kühe) und Jahr bei Tieren der Rasse DFV zeigt Tabelle 9.

Tab. 9: Verteilung der wiederholten Embryoentnahmen nach Parität des Spenders und Jahr

Rasse	Anzahl Embryoentnahmen			Gesamtzahl Embryoentnahmen
	2006	2007	2008	
Färsen	83	19	6	108
Kühe	16	85	62	163
Gesamt	99	104	68	271

Die Verteilung der wiederholten Embryoentnahmen nach Rasse und Jahreszeit zeigt Tabelle 10.

Tab. 10: Verteilung der wiederholten Embryoentnahmen nach Rasse und Jahreszeit

Rasse	Anzahl Embryoentnahmen				Gesamtzahl Embryoentnahmen
	Frühling	Sommer	Herbst	Winter	
DFV	80	83	61	47	271
OT	4	4	6	5	19
MW	3	1	1	2	7
OBV	3	2	3	2	10
Gesamt	90	90	71	56	307

3.2 Versuchsdurchführung

3.2.1 Allgemeine Behandlung der Spender- und Empfängertiere

Für den Versuch wurden ausschließlich klinisch gesunde Tiere herangezogen. Für die stationäre Aufnahme in der Embryoentnahme- und Embryoerzeugungseinheit Badersfeld müssen die Spender und Empfänger bestimmte seuchenhygienische Anforderungen erfüllen, die Gewähr bieten, dass keine Gefahr einer Ausbreitung von Tierkrankheiten durch die Übertragung der gewonnenen oder erzeugten Embryonen besteht. Der Rinderbestand ist amtlich anerkannt brucellose-, tuberkulose- und BHV-1-frei und leukoseunverdächtig (kein klinischer Fall von enzootischer Rinderleukose seit mindestens drei Jahren). Auf Grund negativer Untersuchungsergebnisse auf das Antigen des BVDV, ist der Bestand als „BVDV-unverdächtiger-Bestand“ (keine virologischen Nachweise) einzustufen. Der Bestand wird laufend auf klinische Erscheinungen einer Infektion überwacht. Alle Neueinstellungen stammen aus freien oder unverdächtigen Beständen, die vorschriftsmäßig amtlich überwacht werden. Die Tiere stammen aus Beständen die seit mindestens einem Jahr vor dem Verbringen amtlich anerkannt BHV-1 frei sind. Frühestens 14 Tage vor einem eventuellen Verbringen werden die Tiere auf den Ursprungsbetrieben auf BHV-1 (serologisch) und BVDV (serologisch und virologisch) untersucht. Die Tiere werden 1-2 Wochen vor dem Verbringen und bei der Einstellung in Badersfeld allgemein und gynäkologisch untersucht. Die Spenderkühe wurden vor dem Verbringen trockengestellt. Nach dem Verbringen erfolgte eine Kontrolluntersuchung auf BHV-1 (frühestens 21 Tage nach der ersten Untersuchung). Bestandsuntersuchungen aller Rinder fanden vorschriftsmäßig 1x jährlich auf BHV-1 und alle 3 Jahre auf Brucellose und Leukose statt. Bei der Einstellung in Badersfeld wurden die Tiere prophylaktisch entwurmt und gegen Endo- und Ektoparasiten (Ivomec[®], Merial) behandelt. Darüber hinaus bekamen sie zwei Kupfer- und Selen-Langzeitboli (Rumifert[®], Boehringer) intraruminal eingegeben. Soweit erforderlich wurden die Tiere enthornt. Alle Tiere erhielten bei der Einstellung in Badersfeld eine interne Ohrmarkennummer (Tier-Nr.), mit Unterscheidung zwischen Spender- (grüne Ohrmarken) und Empfängertieren (rote Ohrmarken). Bei den Spendertieren erfolgte zusätzlich eine DNA Registrierung (Gene Control GmbH, Poing) soweit diese noch nicht vorlag. Die erste Embryoentnahme erfolgte frühestens 30 Tage nach der stationären Aufnahme. Am Tag der Embryoentnahme wurden die Tiere untersucht und waren frei von klinischen Krankheitsanzeichen.

Die Empfängertiere wurden gegen BVD-MD (Bovidec[®], Virbac) zweimal im Abstand von drei Wochen geimpft. Die erste Belegung der Empfänger erfolgte frühestens 6 Wochen nach der Einstellung (Abbildung 4).

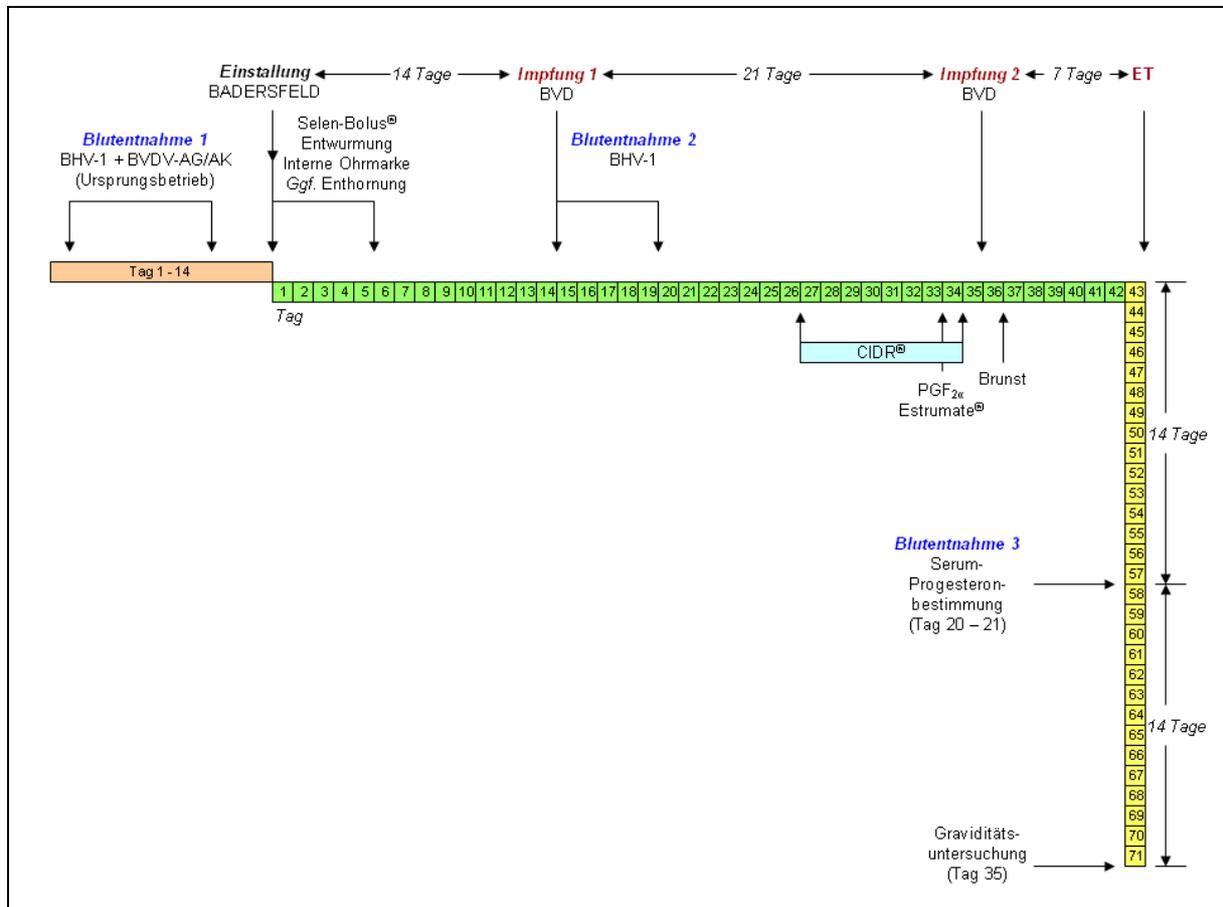


Abb. 4: Vorbereitung und Behandlung der Empfängertiere für den stationären ET

3.2.2 Grundschemata zur Superovulationsbehandlung

Eine erste Superovulationsbehandlung wurde frühestens 50 Tage nach der letzten Abkalbung durchgeführt. Aus arbeitstechnischen Gründen wurde immer eine Gruppe von mindestens vier Spendertieren für einen Embryoentnahmeterrnin vorbereitet. Nach vorhergehender gynäkologischer Untersuchung wurde den Tieren zur Zyklussynchronisation, je nach Behandlungsschema, entweder zyklusabhängig im Diöstrus ein PGF_{2α}-Analog (PGF_{2α}, Estrumate[®], Intervet, 2ml) intramuskulär appliziert oder zyklusunabhängig eine Vaginalspirale (PRID-alpha[®], 1,55 g P₄, Ceva) oder eine Vaginalspange (CIDR[®], 1,38 g Progesteron, Pfizer) verabreicht. Bei den mit PGF_{2α} zyklussynchronisierten Spendern wurde die Superovulationsbehandlung zwischen den Zyklustagen 9-14 gestartet (Tag 0 = Brunst).

Bei den Tieren mit PRID-alpha[®] oder CIDR[®] wurde die Superovulationsbehandlung 5-6 Tage nach dem Einsetzen der Spirale gestartet. Die Tiere bekamen über vier Tage in zwölfstündigen Abständen (7:00 Uhr und 19:00 Uhr) FSH (Pluset[®], Calier, Spanien) in abfallender Dosierung, 7- oder 8-mal je nach Behandlungsschema, intramuskulär injiziert. Die eingesetzten Dosierungsangaben enthält die Tabelle 11.

Tab. 11: Dosierungen (in ml, i.m.) des eingesetzten FSH (Pluset[®]) zur Superovulation

	Anzahl Injektionen	Tag								Gesamt
		1		2		3		4		
		7:00 Uhr	19:00 Uhr							
Färsen	7	2,0	1,5	1,5	1,0	1,0	1,0	0,5	-	8,5
	8	2,0	1,5	1,5	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	
Kühe	7	3,0	2,5	2,0	2,0	1,5	1,5	1,0	-	13,5
	8	3,0	2,0	2,0	1,5	1,5	1,5	1,0	1,0	

Die Auslösung der Superovulation erfolgte je nach Behandlungsschema durch ein- oder zweimalige intramuskuläre Applikation von PGF_{2α} und/oder Entnahme der PRID-alpha[®] oder der CIDR[®] (Tabelle 12)

3.2.3 Besamung der Spendertiere

Die Tiere wurden brunstunabhängig je nach Behandlungsschema 2- oder 3-mal mit Sperma eines (Einzelbesamung) oder zweier (Mischbesamung) Besamungsbullen künstlich besamt (Tabelle 12). Für die Besamung der Spendertiere wurde Sperma unterschiedlicher Besamungsbullen eingesetzt. Die Besamungen wurden durch drei Besamungstechniker durchgeführt. Den Tieren wurde je nach Behandlungsschema entweder 12 h vor der ersten Besamung oder zum Zeitpunkt der ersten oder zweiten Besamung ein GnRH-Analogon (Buserelinacetat, Receptal[®], Intervet) intramuskulär verabreicht (Tabelle 12).

Zur genaueren Bestimmung des optimalen Besamungszeitpunktes wurden bei 4 Färsen der Rasse DFV die Hormonprofile der Ovarsterioide E₂-17β und P₄ sowie des LH im zeitlichen Verlauf nach Auslösung der Superovulation erstellt. Für die Untersuchungen erfolgten die Blutentnahmen aus der Vena caudalis mediana in Intervallen von 3 Stunden im Zeitraum 11-47 h nach der 2. Applikation von PGF_{2α} (Abbildung 5).

Die Serumkonzentrationen von E₂-17β, P₄ und LH wurden durch die Abteilung Physiologie des Lehrstuhls für Physiologie der Technischen Universität München bestimmt. Eine Stunde

dem Einführen des Sondenträgers in die Vagina wurde das jeweilige Ovar transrektal fixiert und vor dem Schallkopf positioniert. Die Punktion erfolgte mit einem Absaugdruck von 100 mmHg unter Sichtkontrolle mit Hilfe von speziell hierfür angefertigten Einmal-Punktionskanülen (Dispomed[®], Gelnhausen, 17 G). Das Absaugsystem bestand aus einer Vakuumpumpe (Cook[®], K-MAR-5000, Mönchengladbach), einem Schlauchsystem (Cook[®], Mönchengladbach) und einem Auffanggefäß (50-ml Falcon[®], Becton & Dickinson, Heidelberg). Als Auffangmedium diente TCM-199 Hapes, dem pro 100 ml 50 mg Gentamycin (Sigma[®], St. Louis, MO), 50 mg BSA (Sigma[®], St. Louis, MO) und 60 mg Heparin (Sigma[®], St. Louis, MO) zugesetzt waren.

Dauerspender nach Schema 7 bekamen unmittelbar im Anschluss zur vorangegangenen Embryoentnahme (ca. 3 Wochen vor dem Einsetzen der PRID-alpha[®]) ein adstringierendes und sekretionsanregendes Phytotherapeutikum (EucaComp[®], PlantaVet, Bad Waldsee, 20%ig) unter Verwendung eines Einmal-Katheters intrauterin appliziert. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die intrauterine Applikation des Phytotherapeutikums zu dem genannten Zeitpunkt die darauffolgende Superovulation und Embryoentnahme nicht negativ beeinflusst, eine eventuell vorhandene subklinische Endometritis jedoch frühzeitig therapiert werden kann.

Tab. 12: Behandlungsschemata zur wiederholten Superovulation bzw. Embryoentnahme

Art der Behandlung	Schema	Superovulationsbehandlung										Zeitabstand 1. KB und Embryo- Entnahme (Tage)
		FSH (Pluset [®])			Intravaginal- spirale bzw. -spange	PGF _{2α} (Estrumate [®])		Besamungen		Zeitpunkt GnRH (Receptal [®])	Besondere Behandlungen	
		Menge (ml)		Anzahl Injektionen		Anzahl Injektionen	Zeitpunkt	Anzahl	Zeitpunkt			
		Färsen	Kühe									
Zyklus- abhängig (Tag 9-13)	1	8,5	13,5	8	-	2	FSH 6 + 7	3	36/48/60 ¹	48 ¹	-	7,5
Zyklus- unabhängig	2	8,5	13,5	8	PRID-alpha [®]	1	FSH 5	3	36/48/60 ²	24 ²	-	7,5
	3	8,5	13,5	8	PRID-alpha [®]	1	FSH 5	2	36/48 ²	24 ²	-	
	4	8,5	13,5	8	PRID-alpha [®]	2	FSH 6 + 7	3	36/48/60 ²	24 ²	-	
	5	8,5	13,5	8	PRID-alpha [®]	2	FSH 6 + 7	2	36/48 ²	24 ²	-	
	6	8,5	13,5	8	PRID-alpha [®]	2	FSH 6 + 7	2	36/48 ²	24 ²	OPU bei PRID [®]	
	7	8,5	13,5	8	PRID-alpha [®]	2	FSH 6 + 7	2	36/48 ²	24 ²	EucaComp [®]	
	8	8,5	13,5	8	PRID-alpha [®]	2	FSH 6 + 7	3	36/48/60 ²	36 ²	-	
	9	8,5	13,5	8	CIDR [®]	2	FSH 6 + 7	3	36/48/60 ²	36 ²	-	
	10	8,5	13,5	7	CIDR [®]	2	FSH 5 + 6	2	36/48 ²	36 ²	-	

¹ Std. nach der zweiten PGF_{2α}-Applikation ² Std. nach Entnahme der PRID-alpha[®]/CIDR[®]

Die Anzahl der wiederholten Embryoentnahmen nach Spender bei den Tieren der Rasse DFV zeigt die Tabelle 13.

Tab. 13: Verteilung der wiederholten Embryoentnahmen nach Spender

Spender Nr.	Anzahl Embryoentnahmen	Kumulative Anzahl Embryoentnahmen	Spender Nr.	Anzahl Embryoentnahmen	Kumulative Anzahl Embryoentnahmen
1	7	7	43	3	175
2	5	12	44	3	178
3	8	20	45	5	183
4	2	22	48	6	189
5	10	32	49	2	191
6	2	34	51	2	193
9	9	43	52	6	199
10	4	47	53	4	203
11	7	54	54	5	208
14	3	57	56	2	210
15	3	60	58	4	214
16	7	67	59	4	218
19	7	74	60	3	221
20	4	78	61	3	224
21	6	84	63	4	228
22	5	89	66	5	233
23	19	108	67	2	235
24	5	113	68	6	241
25	2	115	70	2	243
26	3	118	71	4	247
27	8	126	72	2	249
30	2	128	73	4	253
33	5	133	74	3	256
35	3	136	75	2	258
37	7	143	76	2	260
38	8	151	77	3	263
39	9	160	78	3	266
40	5	165	79	3	269
41	4	169	86	2	271
42	3	172			

Die Verteilung der wiederholten Embryoentnahmen nach Superovulationsschema bei Spendertieren der Rasse DFV zeigt Tabelle 14.

Tab. 14: Verteilung der wiederholten Embryoentnahmen nach Superovulationsschema

Superovulations- schema	Anzahl Embryoentnahmen			Gesamtzahl Embryo- entnahmen
	2006	2007	2008	
1	24	0	0	24
2	33	0	0	33
3	7	0	0	7
4	0	30	0	30
5	35	6	0	41
6	0	28	0	28
7	0	17	2	19
8	0	23	13	36
9	0	0	7	7
10	0	0	46	46
Gesamt	99	104	68	271

3.2.5 Embryoentnahme und Beurteilung der Embryonen

Die Embryonen wurden stationär in einem getrennten Raum entnommen. Die Embryoentnahmen erfolgten je nach Behandlungsschema zwischen Tag 7,0-7,5 (Tag 0 = erste künstliche Besamung). Für die Embryoentnahme wurde die unblutige Methode angewandt. Nach Verabreichung einer kleinen Epiduralanästhesie mit Procainhydrochlorid (Isocain[®], Selectavet, 4,0 ml) und einer gründlichen Reinigung des äußeren Genitale, wurde der durch einen Metall-Mandrin versteifte Spülkatheter (MiniTüb[®], Tiefenbach) sorgfältig unter rektaler Kontrolle intravaginal eingeführt. Die Uterushörner wurden getrennt gespült. Nach Passage der Zervix und dem Erreichen der gewünschten Position im Uterushorn wurde der Ballon am vorderen Ende des Spülkatheters aufgeblasen und der Metall-Mandrin entfernt. Die Luftfüllmenge variierte je nach Hornumfang zwischen 11 und 16 ml Luft, um eine sichere Fixation des Spülkatheters und eine Abdichtung des Uterushorns zu gewährleisten. Im Anschluss an die Embryoentnahme aus dem ersten Uterushorn wurde der Spülkatheter entfernt und wie oben beschrieben in das andere Horn verbracht. Die Uterushörner wurden jeweils mit 250 ml Spülmedium gespült. Als Entnahmemedium diente eine Phosphatpufferlösung nach Dulbecco's (PBS) dem pro 1000 ml 50 mg Gentamycin (Sigma[®], St. Louis, MO) und 50 mg BSA (Sigma[®], St. Louis, MO) zugesetzt war. Das Medium wurde zu Beginn der Embryoentnahme in einem Wasserbad auf 30°C erwärmt und auf dieser

Temperatur gehalten. Das Medium wurde mit Hilfe von sterilen 50 ml Spritzen aus den Uterushörnern zurückgewonnen und in 500 ml Glaszylindern gesammelt.

Die 500 ml Glaszylinder wurden anschließend zur weiteren Bearbeitung in ein Laborraum verbracht, der neben, aber getrennt von dem Raum liegt, in dem sich die Spendertiere während der Entnahme aufhielten. Im Labor wurde zunächst der Überstand im Glaszylinder auf 30-50 ml mit Hilfe eines Schwimfilters (MiniTüb[®], Tiefenbach) abgelassen. Das im Glaszylinder verbleibende Entnahmemedium wurde in 50 ml Petrischalen umgesetzt und unter einem Stereomikroskop bei 50-80-facher Vergrößerung auf Eizellen/Embryonen untersucht. Ermittelt wurde die Anzahl der Eizellen/Embryonen, der unbefruchteten Eizellen (Ufos), der degenerierten Embryonen (Deg.), der transfertauglichen Embryonen (ET-tgl.) und der tiefgefrier-tauglichen Embryonen (TG-tgl.).

3.2.6 Beurteilung und Tiefgefrierkonservierung der Embryonen

Der Entwicklungsstand (Tabelle 15) und die Qualität der Embryonen (Tabelle 16) wurden aufgrund morphologischer Kriterien nach dem Standard der International Embryo Transfer Society (IETS) beurteilt.

Tab. 15: Einteilung der embryonalen Entwicklungsstadien durch die IETS (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

Tab. 16: Klassifizierung von Embryonen nach IETS (ROBERTSON und NELSON, 1991)

Klasse	Beurteilung	Kriterien
1	sehr gut oder gut	Symmetrischer und runder Embryo mit einzelnen in Größe, Farbe und Dichte einheitlichen Blastomeren. Embryo stimmt mit dem erwarteten Entwicklungsstadium überein. Mindestens 85% der Blastomeren sind intakt und lebensfähig. Die Zona pellucida ist intakt, dünn und ihre Oberfläche ist weder konkav noch flach.
2	mäßig	Mäßige Abweichungen in der groben Form des Embryos oder in der Größe, Farbe und Dichte einzelner Blastomeren. Mindestens 50% des zellulären Materials ist intakt und lebensfähig.
3	schlecht	Starke Abweichungen in der Form oder in der Größe des Embryos, in der Farbe und in der Dichte einzelner Blastomeren. Mindestens 25% des zellulären Materials ist intakt und lebensfähig.
4	degeneriert	Degenerierte Embryonen, Eizellen oder Zygoten: Nicht lebensfähig.

Jeder Embryo wurde unmittelbar nach der Entnahme zehnmal in einem jedes Mal erneuertem Embryo-Kulturmedium bei 25°C nacheinander gewaschen, wobei der Verdünnungsgrad der Waschflüssigkeit jedes Mal mindestens 1:100 betrug und vor jeder Verdünnung eine frische sterile Glaskapillare verwendet wurde. Als Embryo-Kulturmedium diente PBS dem pro 100 ml 5 mg Gentamycin (Sigma[®], St. Louis, MO) und 400 mg BSA (Sigma[®], St. Louis, MO) zugesetzt war. Die Waschvorgänge Nr. 4 und 5 bestanden aus einer Trypsinlösung 1:250 (0,25%ig Trypsin in PBS ohne Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺). Es wurden gemeinsam ausschließlich Embryonen eines Spenders und gleichzeitig maximal 10 Embryonen pro Waschgruppe behandelt. Jeder Embryo wurde nach dem letzten Waschen unter dem Stereomikroskop bei 50-80-facher Vergrößerung auf der ganzen Oberfläche morphologisch untersucht. Es wurden ausschließlich Embryonen der Klassen 1-2 (Tabelle 16) tiefgefroren. Die Embryonen wurden unmittelbar nach der Entnahme mittels eines konventionellen Tiefgefrierprotokolls (DT-Methode, „Direkt Transfer“) in 1,5M Ethylenglykol (EG) als Gefrierschutzmittel in Pailletten (0,25 ml, Minitüb, Tiefenbach) tiefgefroren. Die Befüllung der Paillette mit Embryo und Tiefgefriermedium erfolgte in getrennten Säulen mit Kulturmedium (Syngro[®], Agtech, USA) und Embryo in 1,5M EG (ViGro[®], Agtech, USA) bei Raumtemperatur. Der Embryo wurde dabei in den Pailletten so aufgezogen, dass er durch Luftblasen getrennt in der Mitte der Paillette in einem Segment mit 1,5M EG positioniert war. Die Kennzeichnung der Pailletten erfolgte nach der Binnenmarkt-Tierseuchenschutz-VO (BmTierSSchVO). Für die Tiefgefrierkonservierung wurde ein halbautomatisches, computergesteuertes Einfriergerät (Consarctic[®], Göttingen) verwendet. Nach der Konfektionierung und Anpassung der

Embryonen an das Kryoprotektivum für 10-15 min erfolgte das Einsetzen der beladenen Pailletten in das vorher auf $-7,0^{\circ}\text{C}$ eingestellte Einfriergerät. Die kontrollierte Kristallisation („seeding“) wurde nach 5 min mit einem vorgekühlten Wattestäbchen ausgelöst. Nach weiteren 5 min erfolgte eine langsame ($0,3^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) Abkühlung bis auf $-32,0^{\circ}\text{C}$. Danach wurden die Pailletten direkt in flüssigen Stickstoff umgelagert. Die nach der DT-Methode tiefgefrorenen Pailletten mit Embryonen werden 6 sec in der Luft und weitere 15 sec bei 25°C im Wasserbad aufgetaut und möglichst schnell auf geeignete Empfängertiere übertragen.

3.2.7 Zwischenkultivierung der Embryonen

Ein Teil der zum Zeitpunkt der Embryoentnahme nicht tiefgefriertauglichen Embryonen (Klasse 3) wurden für 18-24 h *in vitro* kultiviert und erst anschließend tiefgefroren. Für die *in vitro* Zwischenkultivierung der Embryonen wurde das synthetic oviductal fluid medium (SOF) verwendet, dem pro 1 ml 40 μl essentielle Aminosäuren, 10 μl nicht essentielle Aminosäuren und 100 μl OCS (Serum östrischer Kühe) zugesetzt war. Die Kultivierung erfolgte bei 39°C in einer Gasatmosphäre von 5% CO_2 , 5% O_2 und 90% N_2 bei maximaler Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Heraeus[®]).

3.2.8 Zyklussynchronisation der Empfänger und Übertragung der Embryonen

Nicht tiefgefriertaugliche Embryonen der Klasse 3 wurden zum Teil auf Empfängertiere übertragen. Nach vorhergehender gynäkologischer Untersuchung wurde den Empfängertieren zur Zyklussynchronisation je nach Behandlungsschema entweder zyklusabhängig im Diöstrus ein $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analog ($\text{PGF}_{2\alpha}$, Estrumate[®], Intervet, 2ml) intramuskulär appliziert oder zyklusunabhängig eine Vaginalspange (CIDR[®], 1,38 g P_4 , Pfizer) verabreicht. Zur Brunstsynchronisation von Empfängertieren mit CIDR[®] verblieb die Vaginalspange über einen Zeitraum von 7 Tagen und 24 Stunden vor Entfernen wurde $\text{PGF}_{2\alpha}$, (Estrumate[®], Intervet, 2ml) intramuskulär verabreicht. Sowohl bei den mit $\text{PGF}_{2\alpha}$, als auch bei den mit CIDR[®] zyklussynchronisierten Empfängern, die auf die Behandlung ansprachen, setzte die Brunst (Tag 0) im Allgemeinen innerhalb von 48-72 h nach $\text{PGF}_{2\alpha}$, oder nach Entfernen der Spange ein. In beiden Schemata erfolgte die Embryoübertragung am Tag 7. Für die Embryoübertragung wurden die Empfänger im Stall in einem Fressfanggitter fixiert und bekamen eine kleine Epiduralanästhesie mit Procainhydrochlorid (Isocain[®], Selectavet, 4,0 ml). Nach der Reinigung des äußeren Genitale wurde die vordere Spitze des Embryo-Transfer-Katheters (IMV[®], L'Aigle, Frankreich) transzervikal unter rektaler Kontrolle

behutsam intravaginal eingeführt und der Embryo ipsilateral zum zyklischen CL im Uterushorn abgesetzt.

3.3 Statistische Auswertung

Für die in der vorliegenden Arbeit zahlenmäßig unterrepräsentierten Spendertiere der Rassen OT, MW und OBV wurden bei den Ergebnissen nur die Durchschnittswerte dargestellt. Für statistische Auswertungen wurden nur Tiere der Rasse DFV herangezogen. Für eine genauere Auswertung des Alterseffektes wurden Klassen für das Alter bei der ersten Embryoentnahme gebildet. Diese Einteilung in Klassen verringert die Anzahl der Stufen eines fixen Effektes und somit die Anzahl an verwendeten Freiheitsgraden und führt somit zu geringeren Standardfehlern. Da sich die Färsen nicht über die Altersklassen verteilen, wurde die Auswertung bezüglich des Einflusses des Alters bei der ersten Embryoentnahme für Färsen und Kühe getrennt durchgeführt und bei Färsen das Alter und nicht die Altersklasse verwendet. Für die Auswertung des Einflusses der Besamungsbullen auf die Ergebnisse der wiederholten Embryoentnahmen wurden nur die am häufigsten eingesetzten Bullen 1-15 (Einsatz bei ≥ 7 Embryoentnahmen) berücksichtigt.

Ein neu berechnetes Merkmal ist die Befruchtungsrate. Dieses wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Befruchtungsrate (\%)} = (\text{Eizellen} + \text{Embryonen}) / (\text{Deg.} + \text{ET-tgl. Embryonen}) * 100$$

Zur Schätzung der Varianzkomponenten und zur Schätzung der Einflüsse der fixen Effekte wurde SAS Version 8e verwendet.

3.3.1 Überprüfung der Normalverteilung

Alle verwendeten Datensätze wurden auf Normalität und Heterogenität mit SAS Version 8e und proc univariate geprüft.

3.3.2 Statistische Modelle

Für die Auswertung der Ergebnisse der Embryoentnahmen wurde ein gemischtes Modell verwendet. Als fixe Effekte wurden das Jahr, die Saison, die Parität des Spenders (Färse oder Kuh), der Besamungsbulle, der Besamungstechniker, die Art der Besamung (Einzel- oder Mischbesamung) und das Superovulationsschema nach folgendem Modell eingesetzt. Als zufälliger Effekt wurde das Spendertier einbezogen. Die Auswertung wurde mit SAS (Proc mixed) durchgeführt.

Für das Merkmal Gesamtzahl Eizellen/Embryonen wurde ein weiteres Modell verwendet, da der Besamungsbulle, die Art der Besamung (Einzel- oder Mischbesamung) und der Besamungstechniker keinen Einfluss auf die Gesamtzahl Eizellen/Embryonen ausübten:

$$Y_{ijkopq} = \mu + \text{Tier}_i + \text{Jahr}_j + \text{Saison}_k + \text{FK}_o + \text{SO-Schema}_p + \varepsilon_{ijkopq}$$

Für die Merkmale Ufo., Deg., ET- und TG-tgl. Embryonen und Befruchtungsrate wurde folgendes Modell mit dem entsprechenden Datensatz verwendet:

$$Y_{ijklmnopq} = \mu + \text{Tier}_i + \text{Jahr}_j + \text{Saison}_k + \text{FK}_l + \text{Art}_m + \text{Bulle}_n + \text{Besamer}_o + \text{SO-Schema}_p + \varepsilon_{ijklmnopq}$$

mit:

$Y_{ijklmnopq}$ = Messwert des Tieres i , im Jahr j , der Saison k , Parität des Spenders (Färse oder Kuh) l , mit Art der Besamung (Einzel- oder Mischbesamung) m , dem Besamungsbullen n , dem Besamungstechniker o , mit Superovulationsschema (1 bis 10) p ,

μ = gemeinsame Konstante für alle Y-Werte,

Tier_i = Abweichung der Messung $Y_{ijklmnopq}$ von μ , durch die wiederholten Embryoentnahmen der Tiere i bedingt (zwischen den Tieren),

Jahr_j = fixer Effekt des Jahres j , $j = 1, 2$ und 3 ,

Saison_k = fixer Effekt der Saison k , $k = 1$ bis 4 ,

FK_l = fixer Effekt der Parität des Spenders (Färse oder Kuh) l , $l = 1$ und 2 ,

Art_m = fixer Effekt der Art der Besamung (Einzel- oder Mischbesamung) m , $m = 1$ und 2 ,

Bulle_n = fixer Effekt des Besamungsbullen n , $n = 1$ bis 15 ,

Besamer_o = fixer Effekt des Besamungstechnikers o , $o = 1$ und 2 ,

SO-Schema_p = fixer Effekt des Superovulationsschemas p, p = 1 bis 10,
 $\varepsilon_{ijklmnopq}$ = zufallsbedingte Abweichung der Merkmale $Y_{ijklmnopq}$ von $\mu + \text{Tier}_i$.

Bei der statistischen Auswertung des individuellen Einflusses auf die Zielvariablen Eizellen/Embryonen, ET- und TG-tgl. Embryonen bei 9 Färsen und 9 Kühen mit mindestens 5 wiederholten Embryoentnahmen wurde folgendes Modell verwendet:

$$Y_{iko} = \mu + \text{Tier}_i + \text{Embryoentnahme-Nummer}_k + \varepsilon_{iko}$$

mit:

Y_{iko} = Messwert des Tieres i mit der Embryoentnahme-Nummer k,
 μ = gemeinsame Konstante für alle Y-Werte,
 Tier_i = fixer Effekt des Tieres i, i = 1 bis 9,
 Spülnr_k = fixer Effekt der Embryoentnahme-Nummer k, k = 1 bis 5,
 ε_{iko} = zufallsbedingte Abweichung der Merkmale Y_{iko}

Bei der statistischen Auswertung der Einflussfaktoren auf die Zielvariablen Eizellen/Embryonen, ET- und TG-tgl. Embryonen der ersten 9 Embryoentnahmen wurde folgendes Modell verwendet:

$$Y_{ijkop} = \mu + \text{Tier}_i + \text{Jahr}_j + \text{Embryoentnahme-Nummer}_k + \text{SOSchema}_o + \varepsilon_{ijkop}$$

mit:

Y_{ijkop} = Messwert des Tieres i im Jahr j, der Embryoentnahme-Nummer k und dem Superovulationsschema o,
 μ = gemeinsame Konstante für alle Y-Werte,
 Tier_i = Abweichung der Messung Y_{ijkop} von μ , die durch wiederholten Embryoentnahmen der Tiere i bedingt ist, (zwischen den Tieren),
 Jahr_j = fixer Effekt des Jahres j, j = 1, 2 und 3,
 Spülnr_k = fixer Effekt der Embryoentnahme-Nummer k, k = 1 bis 9,
 SOSchema_o = fixer Effekt des Superovulationsschemas o, o = 1 bis 10,
 ε_{ijkop} = zufallsbedingte Abweichung der Merkmale Y_{ijkop} von $\mu + \text{Tier}_i$.

3.3.3 Schätzung der Varianzkomponenten für die Berechnung der Wiederholbarkeit

Für die Schätzung der Wiederholbarkeit wurden die Varianzkomponenten mit Hilfe von SAS 8e, proc mixed und den voran beschriebenen Modellen geschätzt.

Die Wiederholbarkeiten (w) wurden nach folgender Gleichung berechnet:

$$w = \frac{\sigma^2_B}{\sigma^2_B + \sigma^2_W}$$

mit:

σ^2_B = Varianz zwischen den Gruppen (B = between)

σ^2_W = Varianz innerhalb der Gruppen (W = within)

Es gelten folgende Beziehungen:

$E(\text{Tier}_i) = 0$,

$\sigma^2(\text{Tier}) = E(\text{Tier}_i)^2 =$ Varianzkomponente von $\sigma^2(Y)$, die auf die Variation der einzelnen Tier-Effekte zurück gehen,

$E(\varepsilon_{ij}) = 0$,

$\sigma^2(\varepsilon) = E(\varepsilon_{ij})^2 =$ Varianzkomponente von $\sigma^2(Y)$, die auf die Variation der ε -Effekte zurückgeht,

$\sigma^2(Y) = \sigma^2(\text{Tier}) + \sigma^2(\varepsilon)$

3.3.4 Statistische Signifikanz eines zufälligen Effekts

Durch die Schätzung von Varianzkomponenten entstehen Log likelihood Werte. Durch die Schätzung der Varianzen mit dem kompletten Modell (zu testender Effekt einbezogen) und dem reduzierten Modell (Effekt ausgeschlossen) zeigt die Differenz der beiden Log likelihood Werte multipliziert mit -2 die Signifikanz des zu testenden zufälligen Effekts. Diese Differenz zeigt eine χ^2 -Verteilung mit Erwartungswerten gleich der Anzahl an zu testenden zufälligen Effekten. Liegt diese nun unter dem kritischen χ^2 -Wert (für $p < 0,05$; 1 Freiheitsgrad (FG) = 3,84; $p < 0,01$, 1 FG = 6,63) so hat der getestete zufällige Effekt keinen Einfluss auf die zu berechnenden Varianzen.

4. ERGEBNISSE

4.1 Superovulation und Embryoentnahme

4.1.1 Gesamtzahl an Superovulationen bzw. Embryoentnahmen

Im Zeitraum 30.03.2006 bis 30.06.2008 wurden insgesamt 324 Embryoentnahmen bei 64 Spendern verschiedener Rassen durchgeführt. Bei 17 Embryoentnahmen (5%) wurden weniger als drei Eizellen/Embryonen pro Entnahme erzielt und als negative Reaktion auf die Superovulation bewertet. Bei 307 (95%) Embryoentnahmen mit mindestens drei Eizellen/Embryonen pro Entnahme wurden die Reaktionen als positiv bewertet. Bei der Rasse DFV wurden 286 Entnahmen durchgeführt. Davon verliefen 271 (95%) positiv (Tabelle 17).

Tab. 17: Embryoentnahmen mit positiver Reaktion auf die wiederholten Superovulationen

Reaktion bei wiederholten Superovulationen	Anzahl Embryo- Entnahmen	
	Alle Rassen	Deutsches Fleckvieh
positiv (> 2 Eizellen/Embryonen pro Embryoentnahme)	307 (95%)	271 (95%)
negativ (≤ 2 Eizellen/Embryonen pro Embryoentnahme)	17 (5%)	15 (5%)
Gesamt	324	286

Die Verteilung der wiederholten Embryoentnahmen in Abhängigkeit von der Verwendbarkeit der Embryonen zeigt Tabelle 18. 85% (275 von 324) der wiederholten Embryoentnahmen lieferten ET-tgl. Embryonen. Bei Embryoentnahmen an Spendertieren der Rasse DFV waren es 84% (239 von 286). Bei 67% (185 von 275) der wiederholten Embryoentnahmen waren die ET-tgl. Embryonen zu über 70% auch tiefgefriertauglich. Bei der Rasse DFV waren es 70% (168 von 239). Bei 72% (197 von 275) der Embryoentnahmen mit ET-tgl. Embryonen waren über 70% der ET-tgl. Embryonen in den Stadien der Blastozyste und der expandierten Blastozyste. Bei 28% (78 von 275) der Embryoentnahmen mit ET-tgl. Embryonen waren über 70% der ET-tgl. Embryonen in den Stadien der kompaktierten Morula und der frühen Blastozyste. Bei der Rasse DFV waren es 69% (166 von 239) der Embryoentnahmen mit über 70% der ET-tgl. Embryonen in den Stadien der Blastozyste und der expandierten Blastozyste

und 31% (73 von 239) der Embryoentnahmen mit über 70% der ET-tgl. Embryonen in den Stadien der kompaktierten Morula und der frühen Blastozyste.

Tab. 18: Verwendbarkeit und Entwicklungsstadium der gewonnenen Embryonen

Verwendbarkeit der Embryonen	Anzahl Embryo-Entnahmen	
	Alle Rassen	Deutsches Fleckvieh
Embryoentnahmen ohne ET-tgl. Embryonen	49 (15%)	47 (16%)
Embryoentnahmen mit ET-tgl. Embryonen	275 (85%)	239 (84%)
Hiervon Embryoentnahmen mit:		
> 30% der Embryonen nicht tiefgefriertauglich (Klasse 3)	90 (33%)	71 (30%)
≥ 70% der Embryonen tiefgefriertauglich (Klasse 1 + 2)	185 (67%)	168 (70%)
≥ 70% Morulae und frühe Blastozysten	78 (28%)	73 (31%)
≥ 70% Blastozysten und expandierten Blastozysten	197 (72%)	166 (69%)
Gesamt	324	286

4.1.2 Embryoerzeugung

Die Verteilung der Embryoentnahmen pro Rasse und die durchschnittliche Anzahl der Eizellen/Embryonen, der Ufos, der Deg., der ET-tgl. und der TG-tgl. Embryonen pro Embryoentnahme zeigt Tabelle 19. Die durchschnittliche Anzahl an Eizellen/Embryonen betrug 14,2 pro Embryoentnahme, davon waren 7,1 ET-tgl. Embryonen und 5,0 TG-tgl. Embryonen. Die durchschnittliche Befruchtungsrate lag bei 64,8%.

Tab. 19: Eizellen/Embryonen pro Embryoentnahme in Abhängigkeit von der Rasse

	Deutsches Fleckvieh (DFV)		Pustertaler Sprinzen (OT)		Murnau-Werdenfelser (MW)		Original Braunvieh (OBV)		Gesamt	
Anzahl Tiere	58		2		2		1		63	
Embryoentnahmen	288		19		7		10		324	
	\bar{x}	\pm	\bar{x}	\pm	\bar{x}	\pm	\bar{x}	\pm	\bar{x}	\pm
Eizellen/Embryonen	15,5	8,3	9,6	3,2	19,3	8,7	7,0	2,6	14,2	8,6
Ufos	6,1	6,7	1,5	1,4	6,9	8,8	0,6	1,0	5,4	6,6
Deg.	1,8	2,8	0,7	1,9	2,7	2,9	1,7	1,8	1,7	2,6
ET-tgl.	7,5	6,6	7,4	3,2	9,7	8,0	4,7	2,6	7,1	6,4
TG-tgl.	5,3	5,6	5,9	3,7	4,6	5,4	0,9	1,5	5,0	5,4
Befruchtungsrate (%)	62,2	34,2	83,4	16,4	62,1	35,2	92,7	10,2	64,8	33,9

4.1.3 Einflussfaktoren auf die Ergebnisse der wiederholten Embryoentnahmen

Bei der Untersuchung der verschiedenen Einflussfaktoren auf die Ergebnisse der wiederholten Embryoentnahmen, wie Jahr und Saison, Parität des Spenders (Färse oder Kuh), Besamungsbulle, Art der Besamung (Einzel- oder Mischbesamung), Besamungstechniker und Superovulationsschema wurden die in Tabelle 20 dargestellten Signifikanzen ermittelt. Effekte die nicht im Modell berücksichtigt wurden sind mit einem Minus gekennzeichnet.

Tab. 20: Darstellung der fixen Effekte mit Angaben zu den Signifikanzen

Merkmale	Einflussfaktoren (fixe Effekte)							Zufälliger Effekt
	Jahr	Saison	Färse/Kuh	Besamungsbulle	Art der Besamung	Besamungstechniker	SO-Schema	Spender-tier
Eizellen/Embryonen	✓**	ns	ns	-	-	-	✓**	✓**
Ufos	ns	ns	✓**	ns	ns	ns	ns	✓**
Deg.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	✓**
ET-tgl.	✓*	ns	ns	ns	ns	ns	✓*	✓**
TG-tgl.	✓*	ns	ns	ns	ns	ns	✓*	✓**
Befruchtungsrate	ns	ns	✓*	ns	ns	ns	ns	✓**

✓* = $p < 0,05$; ✓** = $p < 0,01$; ns = nicht signifikant; - = Effekt nicht im Modell

4.1.3.1 Individueller Einfluss

Die Tabelle 21 und die Tabelle 22 enthalten die Anzahl der durchgeführten Embryoentnahmen pro Spendertier und die durchschnittlichen Ergebnisse bei den einzelnen Färsen und Kühen der Rasse DFV. Die Färsen zeigten im Durchschnitt eine geringere Reaktion auf die Superovulation als Kühe. Durch die besseren Befruchtungsraten wurden jedoch bei Färsen im Durchschnitt eine höhere Anzahl ET- und TG-tgl. Embryonen als bei Kühen (8,0 vs. 7,3 bzw. 5,9 vs. 5,0) erzielt. Die Befruchtungsrate war im Durchschnitt signifikant höher bei Färsen als bei Kühen (72,3% vs. 55,5%) ($p < 0,05$). Bei Färsen wurden im Durchschnitt weniger Ufos als bei Kühen (4,0 vs. 7,5) gewonnen ($p < 0,01$).

Tab. 21: Ergebnisse wiederholter Embryoentnahmen bei Färsen der Rasse DFV

Tier-Nr.	Anzahl Embryoentnahmen	Eizellen/Embryonen							Befruchtungsrate (%)
		pro Embryoentnahme					pro Woche		
		Gesamt	Ufos	Deg.	ET-tgl.	TG-tgl.	ET-tgl.	TG-tgl.	
1	7	8,3	0,6	0,9	6,9	6,1	1,4	1,3	95,1
2	5	8,0	1,2	1,4	5,4	1,8	1,1	0,6	76,5
3	8	7,3	0,4	0,6	6,3	5,9	1,3	1,2	95,3
4	2	8,0	5,5	1,5	1,0	0,0	0,2	0,0	31,3
5	10	23,5	11,6	1,4	10,5	7,5	2,1	1,7	49,6
6	2	17,0	11,0	4,0	2,0	0,0	0,4	0,4	25,0
9	9	16,0	3,1	2,7	10,2	6,3	2,0	1,4	82,2
10	4	7,5	1,3	1,3	5,0	3,8	1,0	0,9	76,4
11	7	16,6	3,6	4,4	8,6	5,6	1,7	1,1	72,4
14	3	5,7	1,3	0,3	4,0	2,7	0,8	0,5	75,0
15	3	12,3	7,3	2,3	2,7	1,3	0,5	0,3	43,7
16	7	14,4	4,9	0,7	8,9	7,1	1,8	1,5	70,3
19	7	14,3	3,1	1,9	9,3	6,4	1,9	1,4	84,5
20	4	11,8	5,8	2,8	3,3	1,8	0,7	0,5	49,6
25	2	6,5	3,5	0,5	2,5	2,5	0,5	0,5	56,3
26	3	8,0	0,7	3,0	4,3	4,3	0,9	0,9	77,8
27	8	21,3	3,8	3,1	14,4	9,8	2,9	2,1	81,8
39	9	18,3	4,2	2,2	11,9	10,1	2,4	2,1	76,5
63	4	8,3	4,0	0,5	3,8	3,3	0,8	0,7	64,3
67	2	7,0	5,0	0,5	1,5	1,0	0,3	0,2	35,6
Gesamt	106	13,9	4,0	1,9	8,0	5,9	1,6	1,2	72,3

Die Tabelle 22 enthält die Anzahl der durchgeführten Embryoentnahmen pro Spendertier und die durchschnittlichen Ergebnisse bei den einzelnen Kühen der Rasse DFV.

Tab. 22: Ergebnisse wiederholter Embryoentnahmen bei Kühen der Rasse DFV

Tier-Nr.	Anzahl Embryoentnahmen	Eizellen/Embryonen							Befruchtungsrate (%)
		pro Embryoentnahme					pro Woche		
		Gesamt	Ufos	Deg.	ET-tgl.	TG-tgl.	ET-tgl.	TG-tgl.	
21	6	9,5	5,3	1,0	3,2	1,5	0,6	0,3	52,0
22	5	22,6	12,2	2,6	7,8	1,0	1,6	0,6	44,1
23	19	18,8	8,4	1,2	9,3	6,9	1,9	1,5	58,6
24	5	17,2	12,2	1,4	3,6	2,8	0,7	0,6	36,0
30	2	9,0	9,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
33	5	16,4	5,2	4,2	7,0	4,2	1,4	1,1	57,9
35	3	11,0	11,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
37	7	21,9	9,0	4,6	8,3	5,7	1,7	1,3	59,2
38	8	17,5	9,3	1,1	7,1	4,4	1,4	1,0	43,3
40	5	11,4	8,2	1,4	1,8	1,0	0,4	0,2	17,8
41	4	24,5	6,5	2,5	15,5	12,3	3,1	2,5	67,7
42	3	20,0	19,0	0,3	0,7	0,7	0,1	0,1	12,5
43	3	11,3	7,0	0,3	4,0	2,0	0,8	0,5	43,0
44	3	12,7	4,7	0,7	7,3	5,3	1,5	1,1	61,1
45	5	16,6	11,4	1,6	3,6	1,2	0,7	0,2	36,9
48	6	8,8	1,7	0,2	7,0	6,7	1,4	1,3	83,5
49	2	18,0	6,0	0,5	11,5	10,5	2,3	2,1	71,4
52	6	14,5	3,5	1,5	9,5	7,0	1,9	1,4	75,2
53	4	9,0	3,8	1,3	4,0	2,5	0,8	0,5	56,7
54	5	22,2	5,6	1,8	14,8	12,2	3,0	2,8	74,2
56	2	22,5	22,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
58	4	22,0	0,8	3,5	17,8	12,8	3,6	3,2	96,3
59	4	11,5	1,5	0,5	9,5	7,3	1,9	1,7	89,4
60	3	12,0	9,0	0,0	3,0	2,0	0,6	0,4	36,3
61	3	10,3	3,7	2,0	4,7	0,7	0,9	0,1	56,1
66	5	19,2	1,8	3,4	14,0	10,8	2,8	2,2	87,0
68	6	12,5	1,8	1,8	8,8	8,0	1,8	1,6	84,2
70	2	34,5	30,5	0,0	4,0	0,5	0,8	0,1	12,4
71	4	23,3	16,0	0,8	6,5	4,8	1,3	1,0	28,1
72	2	21,0	5,5	3,5	12,0	8,5	2,4	1,7	73,8
73	4	15,3	7,0	0,3	8,0	5,3	1,6	1,1	50,8
74	3	13,3	2,0	2,7	8,7	6,0	1,7	1,2	82,2
75	2	27,0	12,0	14,0	1,0	0,0	0,2	0,0	53,2
76	2	16,0	13,5	0,0	2,5	0,0	0,5	0,0	18,4
77	3	15,0	5,7	4,0	5,3	1,3	1,1	0,3	62,1
78	3	10,7	0,7	2,0	8,0	6,0	1,6	1,2	94,4
79	3	22,3	14,3	2,3	5,7	1,3	1,1	0,3	37,7
86	2	6,5	1,0	2,0	3,5	2,5	0,7	0,5	83,3
Gesamt	163	16,6	7,5	1,8	7,3	5,0	1,5	1,1	55,5

4.1.3.1.1 Einfluss des Individuums auf die ersten 5 wiederholten Entnahmen

Abbildung 6 zeigt die statistischen Signifikanzen der Unterschiede zwischen den ersten 5 Embryoentnahmen von 9 Färsen und 9 Kühen hinsichtlich der durchschnittlichen Anzahl an Eizellen/Embryonen und an TG- und ET-tgl. Embryonen. Die Auswertung der Daten wurde getrennt für Färsen und Kühe vorgenommen

Spender Nr.	1		2		3		4		5		6		7		8		9	
	F 01	K 21	F 03	K 23	F 05	K 37	F 09	K 38	F 11	K 40	F 16	K 48	F 19	K 52	F 27	K 54	F 39	K 68
1	F 01				*		*								**/ +		*	
	K 21			*		**								°	**/ ++/°°			°
2	F 03				*		*								**/ +		*	
	K 23		*								*					°		
3	F 05	*		*														
	K 37		**					*		**	**		*					**
4	F 09	*		*														
	K 38						*							°		+/ °°		°
5	F 11														+			
	K 40						**							+/ °	**/ ++/°°			°
6	F 16														+			
	K 48				*		**									**		
7	F 19																	
	K 52		°				*		°		+/ °					*		
8	F 27	**/ +		**/ +						+		+						
	K 54		**/ ++/°°		°				+/ °°		**/ ++/°°	**		*				*
9	F 39	*		*														
	K 68		°				**		°		°					*		

Abb. 6: Individuelle Unterschiede zwischen den Ergebnissen der ersten fünf Entnahmen

(F=Färsen; K=Kühe)

Eizellen/Embryonen *(p<0,05); ** (p<0,01)

ET-tgl. Embryonen + (p<0,05); ++ (p<0,01)

TG-tgl. Embryonen ° (p<0,05); °° (p<0,01); ANOVA

4.1.3.2 Alter der Spendertiere zum Zeitpunkt der ersten Superovulation

In Tabelle 23 sind die durchschnittlichen Ergebnisse in Abhängigkeit vom Alter der Spendertiere zum Zeitpunkt der ersten Embryoentnahme beim DFV dargestellt.

Tab. 23: Einfluss des Alters der Spender auf die wiederholten Embryoentnahmen

Alter (Jahre)	Anzahl Embryoentnahmen	Eizellen/Embryonen pro Embryoentnahme					
		Gesamt	Ufos	Deg.	ET-tgl.	TG-tgl.	Befruchtungsrate (%)
1,5 – 3,0	113	13,8	4,0*	1,9	7,8	5,7	72,2**
4,0 – 6,0	55	17,3	7,2	2,3	7,8	4,8	56,4
7,0 – 9,0	28	18,2	8,5	2,3	7,5	5,8	53,7
10,0 – 12,0	37	14,5	5,8	1,2	7,5	5,5	66,6
13,0 – 16,0	38	16,9	9,5	1,0	6,4	4,4	42,8
Gesamt	271	15,5	6,1	1,8	7,5	5,3	62,2

*p<0,05; **p<0,01; ANOVA

Das Alter der Tiere hatte keinen signifikanten Einfluss auf die durchschnittliche Anzahl der Eizellen/Embryonen und auf die Anzahl der degenerierten Embryonen. Bei den Tieren im Alter von 1,5-3,0 Jahren wurden jedoch im Durchschnitt weniger Ufos ($p<0,01$) und höhere Befruchtungsraten ($p<0,05$) erzielt. Die Unterschiede zwischen den Altersgruppen bezüglich der durchschnittlichen Anzahl an ET- und TG-tgl. Embryonen waren nicht signifikant.

4.1.3.3 Jahreseinfluss

Die Tabelle 24 zeigt die Anzahl der durchgeführten Embryoentnahmen und die durchschnittlichen Ergebnisse in Abhängigkeit vom Jahr der Embryoentnahme beim DFV. Im Jahr 2007 wurden im Durchschnitt mehr Eizellen/Embryonen pro Embryoentnahme als in den Jahren 2006 ($p<0,01$) und 2008 ($p<0,05$) gewonnen. Im Jahr 2006 wurden im Durchschnitt weniger ET-tgl. ($p<0,01$) und TG-tgl. Embryonen ($p<0,05$) pro Entnahme als 2007 erzielt.

Tab. 24: Einfluss des Jahres auf die wiederholten Embryoentnahmen beim DFV

Jahr	Anzahl Embryoentnahmen	Eizellen/Embryonen pro Embryoentnahme					
		Gesamt	Ufos	Deg.	ET-tgl.	TG-tgl.	Befruchtungsrate (%)
2006	99	13,6 ^b	4,5	1,9	7,3 ^a	4,9 ^a	68,6
2007	104	17,2 ^a	7,4	1,7	8,1 ^c	6,0 ^b	56,4
2008	68	15,5 ^{b,c}	6,5	1,9	7,1	4,9	61,8
Gesamt	271	15,5	6,1	1,8	7,5	5,3	62,2

a:b (p<0,05); a:c (p<0,01) verschiedene Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (ANOVA)

4.1.3.4 Jahreszeit

In Tabelle 25 sind die Ergebnisse der Embryoentnahmen nach Saison beim DFV dargestellt. Zwischen den Jahreszeiten wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Tab. 25: Einfluss der Jahreszeit auf die Ergebnisse wiederholter Embryoentnahmen

Saison	von - bis	Anzahl Embryoentnahmen	Eizellen/Embryonen pro Embryoentnahme					
			Gesamt	Ufos	Deg.	ET-tgl.	TG-tgl.	Befruchtungsrate (%)
Frühling	20.03. - 20.06.	80	16,4	7,3	1,8	7,4	5,4	55,3
Sommer	21.06. - 21.09.	83	15,3	6,8	1,4	7,1	5,2	61,1
Herbst	22.09. - 20.12.	61	13,8	4,3	1,9	7,6	5,1	70,9
Winter	21.12. - 19.03.	47	16,5	5,5	2,5	8,6	6,0	64,6
Gesamt		271	15,5	6,1	1,8	7,5	5,3	62,2

4.1.3.5 Superovulationschema

Die Superovulationsbehandlungen erfolgten zyklusabhängig (Schema 1) oder zyklusunabhängig (Schemata 2-10). Tabelle 26 zeigt die Ergebnisse der wiederholten Embryoentnahmen unter Berücksichtigung der angewandten Superovulationsschemata. Sowohl die durchschnittliche Anzahl an Eizellen/Embryonen als auch die Aufteilung in ET- und TG-tgl. Embryonen wurden durch die Behandlungsschemata unterschiedlich beeinflusst (Abbildung 7).

Tab. 26: Einfluss des Superovulationschemas auf die wiederholten Embryoentnahmen

SO-Schema	Anzahl Embryoentnahmen	Eizellen/Embryonen pro Embryoentnahme					
		Gesamt	Ufos	Deg.	ET-tgl.	TG-tgl.	Befruchtungsrate (%)
1	24	17,9	7,1	5,7	8,1	5,0	57,5
2	33	13,3	3,4	1,6	8,3	5,8	73,4
3	7	16,6	3,7	1,7	11,1	8,4	81,5
4	30	18,3	8,7	1,9	7,6	5,4	48,3
5	41	12,2	4,2	1,8	6,2	4,1	70,1
6	28	16,6	8,0	1,6	7,0	5,2	55,0
7	19	14,4	5,8	1,5	7,2	5,1	62,4
8	36	15,3	5,2	1,4	8,8	7,0	63,7
9	7	17,9	2,9	2,4	12,6	9,7	83,5
10	46	16,3	8,2	2,0	6,1	3,9	55,7
Gesamt	271	15,5	6,1	1,8	7,5	5,3	62,2

Abbildung 7 zeigt die statistischen Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Superovulationsschemata bezüglich der durchschnittlichen Anzahl an Eizellen/Embryonen und an ET- und TG-tgl. Embryonen.

SO-Schema	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1				**/+ ^o	**/+	**/+ ^o	**/+ ^o	**/+		
2				**/+ ^{oo}	*/+ ^o	**/+ ^{oo}	**/+ ^o	**/+ ⁺⁺		+
3				*/+ ^{oo}	+ ^{oo}	*/+ ^{oo}	**/+ ^{oo}	*/+ ^o		+ ^o
4	**/+ ^o	**/+ ^{oo}	*/+ ^{oo}		*/+				+	
5	**/+	*/+ ^o	+ ^{oo}	*/+			*/+			
6	**/+ ^o	**/+ ^{oo}	*/+ ^{oo}						+ ^o	
7	**/+ ^o	**/+ ^o	**/+ ^{oo}		*/+				*/+ ^o	*
8	**/+	**/+ ⁺⁺	*/+ ^o							
9				+		+ ^o	*/+ ^o			
10		+	+ ^o				*			

Abb. 7: Vergleich der Ergebnisse wiederholter Embryoentnahmen je nach SO-Schema

Eizellen/Embryonen *(p<0,05); ** (p<0,01)

ET-tgl. Embryonen ⁺(p<0,05); ⁺⁺(p<0,01)

TG-tgl. Embryonen ^o(p<0,05); ^{oo}(p<0,01); ANOVA

Mit Schemata 1 und 2 wurden im Durchschnitt gegenüber Schemata 4 bis 8 mehr Eizellen/Embryonen und ET-tgl. Embryonen gewonnen. Mit Schema 1 wurden gegenüber Schemata 4, 6, und 7 mehr TG-tgl. Embryonen erzielt. Darüber hinaus wurden mit Schema 2 mehr ET-tgl. Embryonen als mit Schema 10 beobachtet. Schema 3 führte zu durchschnittlich mehr Eizellen/Embryonen als Schemata 4, 6, 7 und 8 und mehr ET-tgl. Embryonen als Schemata 4 bis 8 und 10. Mit Schemata 2 und 3 wurden durchschnittlich mehr TG-tgl. Embryonen als mit Schemata 4 bis 7 erzielt. Darüber hinaus führte Schema 3 zu durchschnittlich mehr TG-tgl. Embryonen als Schemata 8 und 10. Mit Schema 5 wurden durchschnittlich mehr Eizellen/Embryonen und ET-tgl. Embryonen als mit Schemata 4 und 7 erreicht. Schema 9 ermöglichte durchschnittlich mehr Eizellen/Embryonen als Schema 7 und mehr ET-tgl. Embryonen als Schemata 4, 6 und 7. Darüber hinaus wurde mit Schema 9 durchschnittlich mehr TG-tgl. Embryonen als mit Schemata 6 und 7 gewonnen. Schema 10 führte zu durchschnittlich mehr TG-tgl. Embryonen als Schema 7 (Abbildung 7)

4.1.3.6 Besamung nach Superovulation

4.1.3.6.1 Art der Besamung

In Tabelle 27 sind die durchschnittlichen Ergebnisse in Abhängigkeit von der Art der Besamung beim DFV dargestellt. Zwischen den Ergebnissen der wiederholten Entnahmen nach Einzel- oder Mischbesamungen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Tab. 27: Ergebnisse wiederholter Embryoentnahmen je nach Art der Besamung

Art der Besamung	Anzahl Embryoentnahmen	Eizellen/Embryonen pro Embryoentnahme					
		Gesamt	Ufos	Deg.	ET-tgl.	TG-tgl.	Befruchtungsrate (%)
Einzelbesamung	228	15,2	5,8	1,8	7,7	5,4	64,3
Mischbesamung	43	16,8	7,8	2,0	7,0	4,8	51,1
Gesamt	271	15,5	6,1	1,8	7,5	5,3	62,2

4.1.3.6.2 Anzahl und Zeitpunkt der Besamungen

Die Hormonprofile der Ovarsteroiden $E_2-17\beta$ und P_4 sowie des LH im Zeitraum 11-47 h nach der 2. $PGF_{2\alpha}$ -Applikation bei 4 superstimulierten Färsen zeigt die Abbildung 8. Bei allen Tieren wurde im Untersuchungszeitraum ein kontinuierlicher Anstieg der $E_2-17\beta$ -Freisetzung festgestellt. Bei den Tieren 1-3 kam es unmittelbar nach der GnRH-Applikation zu einem

deutlicheren Anstieg von $E_2-17\beta$. Bei den Tieren 1 und 2 wurde der präovulatorische LH-Peaks 5 Stunden nach der GnRH-Applikation beobachtet. Bei dem Tier Nr. 2 wurde der Anstieg von $E_2-17\beta$ 8 Stunden nach GnRH beobachtet. Ein Anstieg des LH wurde jedoch nicht beobachtet. Das Tier Nr. 4 zeigte im Untersuchungszeitraum weder erhöhte $E_2-17\beta$ - noch erhöhte LH-Werte. Alle Tiere wiesen im Beobachtungszeitraum basale Serumprogesteronwerte auf. Tabelle 28 zeigt die Ergebnisse der Follikelpunktion und der in vitro Produktion (IVP) in Abhängigkeit der Größe der Follikel nach der Schlachtung der in Abbildung 6 dargestellten Färsen. Zum Zeitpunkt der Schlachtung waren noch keine der Follikel gesprungen.

Zwischen den Befruchtungsergebnissen nach 2 (36/48 h nach der 2. $PGF_{2\alpha}$ -Applikation) oder 3 Besamungen (36/48/60 h nach der 2. $PGF_{2\alpha}$ -Applikation) wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

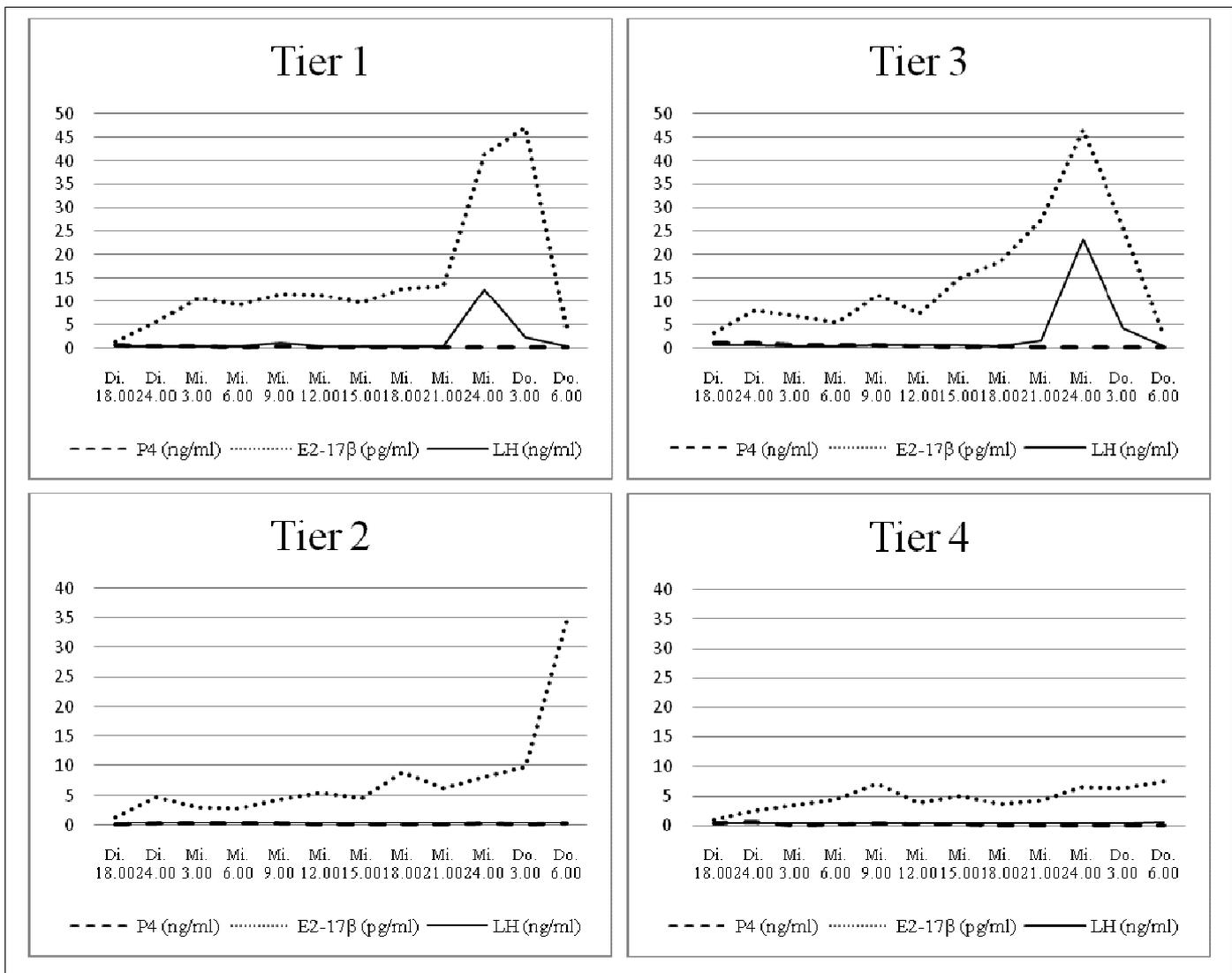


Abb. 8: Hormonprofile von P_4 , E_2 und LH 11-47 h nach Superovulationsauslösung

Tab. 28: Gewinnung von in vivo gereiften Eizellen nach Superstimulation

Tier-Nr.	Follikel Gesamt	OPU + IVP Kleine Follikel (≤ 6 mm)					OPU + IVP Große Follikel (> 6 mm)				
		Follikel Gesamt	Eizellen		Embryonen		Follikel Gesamt	Eizellen		Embryonen	
			Gesamt	IVP-tgl.	Gesamt	ET-tgl. ²		Gesamt	IVP-tgl.	Gesamt	ET-tgl. ²
1	38	6	2	0	0	0	32	12	12	8	0
2	36	2	0	0	0	0	34	19	18	1	0
3	103	15	4	0	0	0	88	54	54	11	0
4	65	5	2	0	0	0	60	39	39	11	0
Summe	242	28 (12%)	8 (29%)	0	0	0	214 (88%)	124 (58%)	123 (99%)	31 (25%)	0
Kontrolle ¹		212	161 (76%)	142 (88%)	109 (68%)	65 (40%)	-	-	-	-	-

¹ OPU an Ovarien nicht superstimulierter Rinder (Schlachthof) ² Tag 7-8 (Tag 0 = IVF)

4.1.3.6.3 Besamungsbulle

In Tabelle 29 sind die durchschnittlichen Ergebnisse in Abhängigkeit von den eingesetzten Besamungsbullen der Rasse DFV dargestellt. Zwischen den Befruchtungsraten der eingesetzten Besamungsbullen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Tab. 29: Befruchtungsergebnisse der am häufigsten eingesetzten Besamungsbullen

Besamungs-Bulle	Anzahl Embryo-entnahmen	Eizellen/Embryonen pro Embryoentnahme					Befruchtungsrate (%)
		Gesamt	Ufos	Deg.	ET-tgl.	TG-tgl.	
A	26	17,3	6,0	2,1	9,2	7,0	63,2
B	21	13,5	5,9	2,1	5,5	4,0	62,8
C	21	16,6	7,9	1,4	7,3	5,1	54,1
D	17	11,7	4,1	0,8	6,8	4,2	73,6
E	17	18,3	6,1	2,2	10,1	6,4	64,2
F	14	13,9	8,7	0,7	4,5	3,5	51,9
G	12	15,6	7,3	1,0	7,3	4,8	62,5
H	8	10,3	2,9	2,8	4,6	2,6	69,0
I	11	19,4	7,5	4,1	7,7	5,7	65,8
J	9	11,4	4,0	0,4	7,0	5,4	66,6
K	10	13,8	5,9	1,2	6,7	4,3	58,4
L	8	14,9	2,9	2,8	9,3	5,8	77,9
M	7	15,0	7,1	0,4	7,4	6,4	48,7
N	7	13,4	4,9	1,7	6,9	5,0	46,8
O	7	17,6	3,6	2,6	11,4	7,9	75,0
Andere (< 7 KBs)	76	16,4	6,6	2,0	7,8	5,6	61,4
Gesamt	271	15,5	6,1	1,8	7,5	5,3	62,2

4.1.3.6.4 Besamungstechniker

In Tabelle 30 sind die durchschnittlichen Ergebnisse wiederholter Embryoentnahmen bei Spendern der Rasse DFV in Abhängigkeit von dem Besamungstechniker dargestellt. Besamungstechniker 3 erzielte geringere Befruchtungsergebnisse als die Besamungstechniker 1 und 2. Auch die gleichzeitigen Besamungen durch Techniker 2 und 3 führten zu schlechteren Befruchtungsraten. Auf Grund der relativ kleinen Anzahl an Besamungen durch Techniker 3 konnten die Ergebnisse statistisch nicht abgesichert werden. Die Besamungsergebnisse von den Technikern 1 und 2 waren nicht signifikant unterschiedlich.

Tab. 30: Ergebnisse wiederholter Embryoentnahmen je nach Besamungstechniker

Besamungs- techniker	Anzahl Embryo- entnahmen	Eizellen/Embryonen pro Embryoentnahme					
		Gesamt	Ufos	Deg.	ET- tgl.	TG- tgl.	Befruchtungs- rate (%)
1	143	15,4	5,4	2,1	8,0	5,3	65,4
2	100	15,4	6,4	1,8	7,2	5,3	62,2
3	6	12,7	8,8	0,3	3,5	3,2	35,9
2 + 3	22	17,2	8,8	0,9	7,5	6,2	49,0
Gesamt	271	15,5	6,1	1,8	7,5	5,3	62,2

4.1.4 Wiederholbarkeit der Ergebnisse der Embryoentnahmen

Die durchschnittlichen Ergebnisse der ersten 9 wiederholten Embryoentnahmen bei Färsen und Kühen der Rasse DFV zeigt die Tabelle 31.

Tab. 31: Ergebnisse der ersten 9 wiederholten Embryoentnahmen bei Färsen und Kühen

Nummer der Embryo-Entnahme	Färsen						Kühe					
	Anzahl Tiere	Eizellen/Embryonen pro Embryoentnahme					Anzahl Tiere	Eizellen/Embryonen pro Embryoentnahme				
		Gesamt	Ufos	Deg.	ET-tgl.	TG-tgl.		Gesamt	Ufo.	Deg.	ET-tgl.	TG-tgl.
1.	19	17,0	5,3	3,1	8,6	6,1	38	18,7	8,2	2,3	8,3	5,7
2.	19	14,6	3,2	2,2	9,2	6,8	37	17,9	9,2	2,0	6,7	4,3
3.	16	13,7	3,4	1,2	9,1	6,8	28	17,3	7,4	1,9	8,0	5,2
4.	14	12,4	5,3	1,2	5,9	4,4	22	12,2	4,9	0,9	6,5	4,5
5.	11	12,1	3,0	1,7	7,4	6,0	14	10,0	4,3	1,4	4,3	3,1
6.	10	12,8	2,5	2,4	7,9	5,1	8	15,6	7,1	2,3	6,3	5,1
7.	9	8,4	2,4	0,6	5,4	4,7	3	14,0	6,3	2,0	5,7	3,7
8.	7	12,9	2,3	2,3	8,3	5,9	2	25,5	16,5	2,0	7,0	4,5
9.	3	19,3	7,3	1,0	11,0	7,0	1	33,0	2,0	1,0	30,0	26,0

Abbildung 9 zeigt die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den ersten 9 Embryoentnahmen bei Färsen und Kühen im Hinblick auf die Anzahl an Eizellen/Embryonen und an ET-tgl. Embryonen. Die Auswertung der Daten wurde getrennt für Färsen und Kühe vorgenommen. Die Unterschiede bezüglich der TG-tgl. Embryonen waren nicht signifikant.

Nr. der Embryo-Entnahme		1		2		3		4		5		6		7		8		9	
		F	K	F	K	F	K	F	K	F	K	F	K	F	K	F	K	F	K
1	F																		
	K							**		**/+				*					
2	F											**		*					
	K							**		**									
3	F											*							
	K							**		**/+									
4	F											*							
	K	**		**		**									*				
5	F																		
	K	**/+		**		**/+					*				*				
6	F																		
	K									*									
7	F		**		*		*												
	K	*																	
8	F		*																
	K						*		*										
9	F																		
	K																		

Abb. 9: Vergleich der Ergebnisse der ersten 9 wiederholten Embryoentnahmen

(F=Färsen; K=Kühe)

Eizellen/Embryonen *($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$)

ET-tgl. Embryonen ⁺ ($p < 0,05$); ANOVA

In den Abbildungen 10-15 sind die Ergebnisse der Tabelle 31 bezüglich der ersten 9 wiederholten Embryoentnahmen bei Färsen und Kühen graphisch dargestellt.

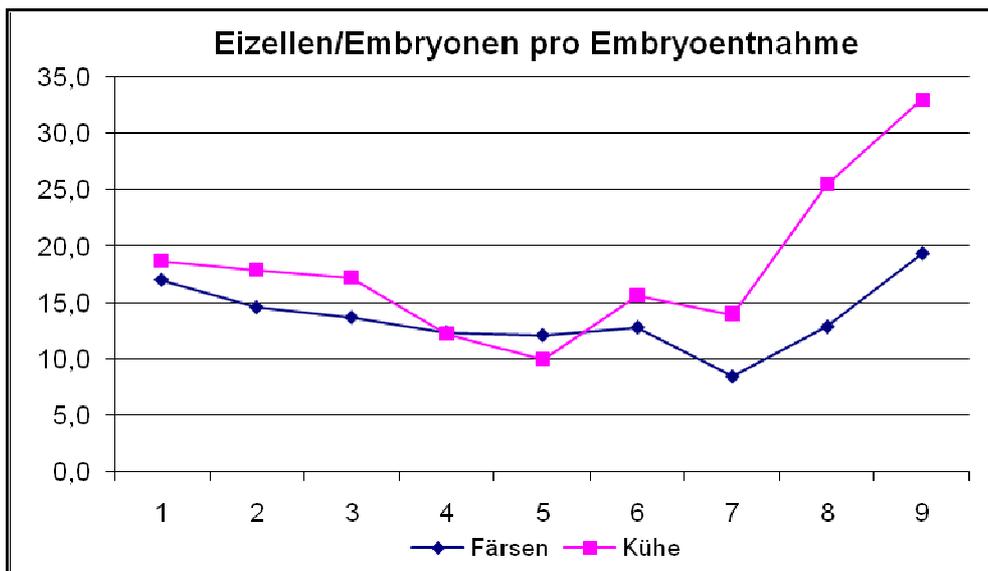


Abb. 9: Vergleich der Ergebnisse der ersten 9 wiederholten Embryoentnahmen

Bei Färsen wurden im Durchschnitt bei der 7. Embryoentnahme signifikant weniger Eizellen/Embryonen als bei der 2. ($p < 0,01$), 3. und 4. ($p < 0,05$) Entnahmen gewonnen. Bei Kühen wurden im Durchschnitt bei der 4. und 5. Embryoentnahmen signifikant weniger Eizellen/Embryonen als bei der 1., 2. und 3. ($p < 0,01$), 6. und 8. ($p < 0,05$) Entnahmen gewonnen. Bei der 7. Embryoentnahme wurden im Durchschnitt signifikant weniger Eizellen/Embryonen als bei der 1. ($p < 0,05$) Entnahme gewonnen (Abbildung 10).

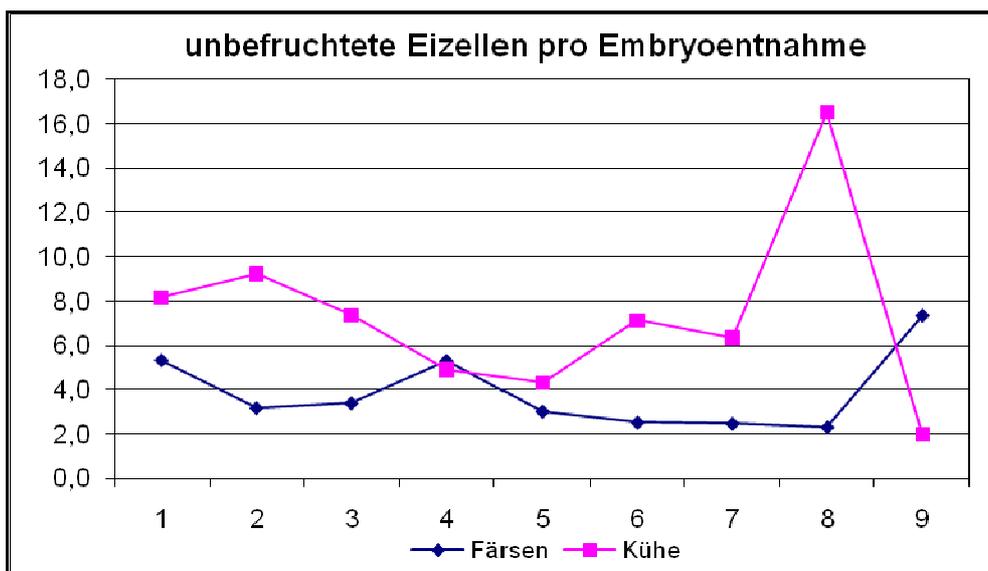


Abb. 11: Unbefruchtete Eizellen pro Embryoentnahme bei den ersten 9 Entnahmen

Bei Färsen wurden bei der 4. Embryoentnahme signifikant weniger unbefruchtete Eizellen als bei der 6., 7. und 8. ($p < 0,05$) Entnahmen gewonnen. Bei Kühen wurden im Durchschnitt bei

der 8. Embryoentnahme signifikant weniger unbefruchtete Eizellen als bei der 1., 3. ($p < 0,05$), 4., 5. ($p < 0,01$) und 6. ($p < 0,05$) Entnahmen gewonnen (Abbildung 11).

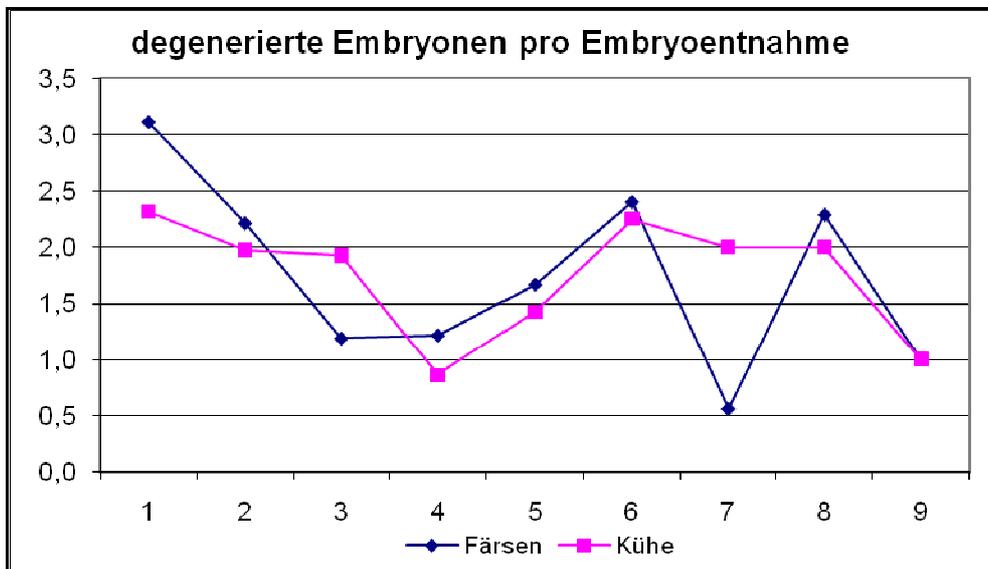


Abb. 12: Degenerierte Embryonen pro Embryoentnahme bei den ersten 9 Entnahmen

Bei Färsen wurden keine Unterschiede bezüglich der Anzahl degenerierter Embryonen pro Embryoentnahme zwischen den ersten 9 Entnahmen festgestellt. Bei Kühen wurden im Durchschnitt bei der 4. Embryoentnahme signifikant weniger degenerierte Embryonen als bei der 1. ($p < 0,05$) Entnahme gewonnen (Abbildung 12).

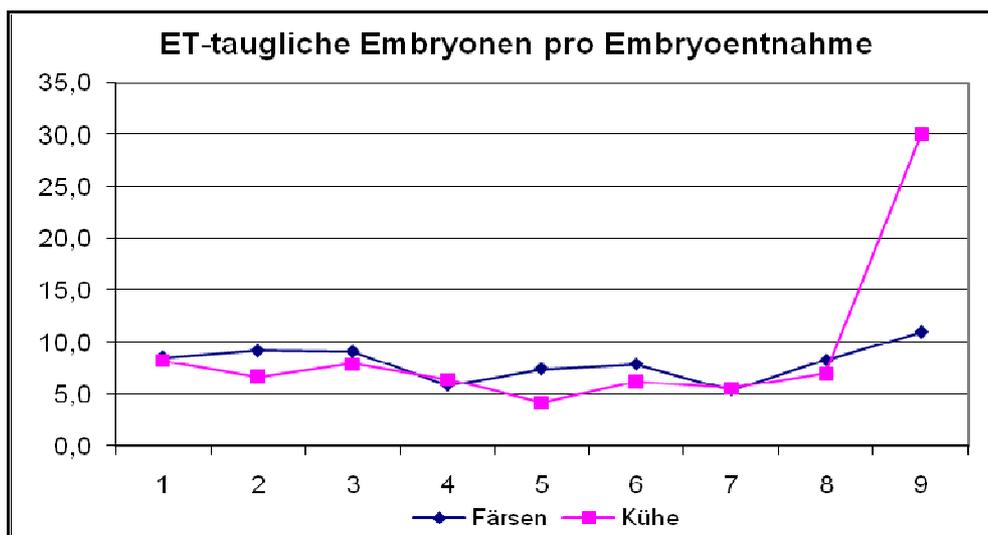


Abb. 13: ET-tgl. Embryonen pro Embryoentnahme bei den ersten 9 Entnahmen

Bei Färsen wurden keine Unterschiede bezüglich der Anzahl ET-tgl. Embryonen pro Embryoentnahme zwischen den ersten 9 Entnahmen festgestellt. Bei Kühen wurden im

Durchschnitt bei der 5. Embryoentnahme signifikant weniger ET-tgl. Embryonen als bei der 1. und 3. ($p < 0,05$) Entnahmen gewonnen (Abbildung 13).

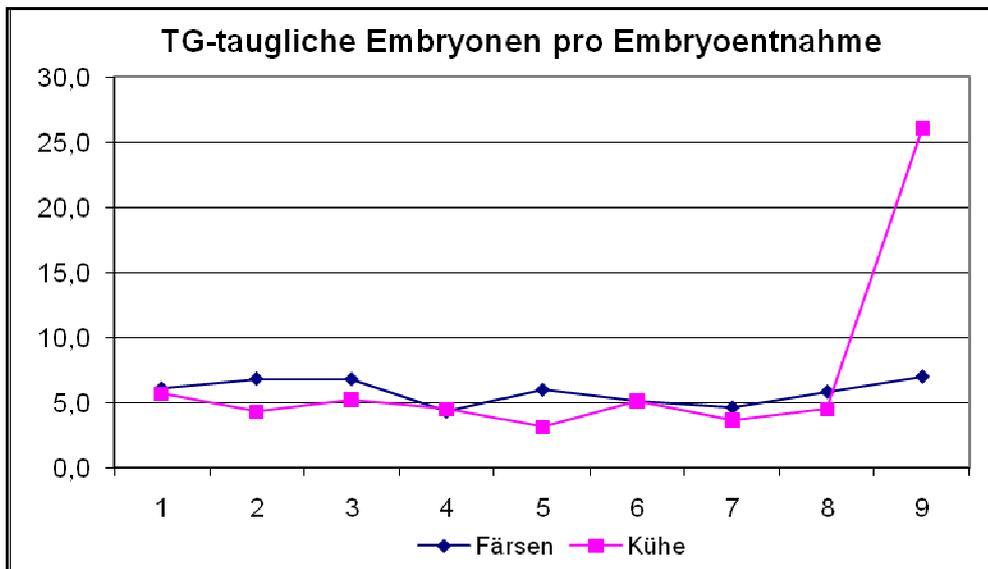


Abb. 14: TG-tgl. Embryonen pro Embryoentnahme bei den ersten 9 Entnahmen

Bezüglich der durchschnittlichen Anzahl TG-tgl. Embryonen wurden weder bei Färsen noch bei Kühen Unterschiede zwischen den ersten 9 Entnahmen festgestellt (Abbildung 14).

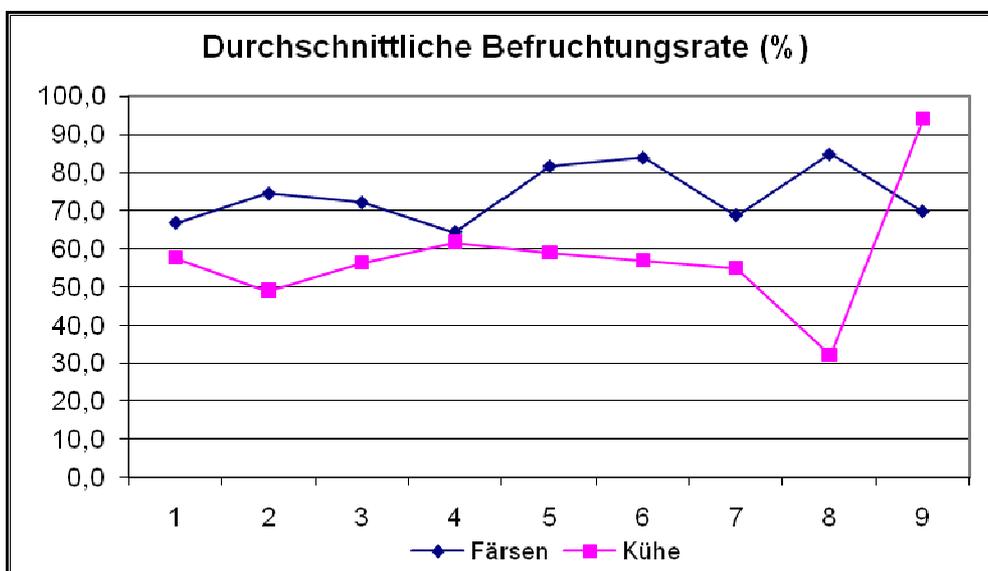


Abb. 15: Durchschnittliche Befruchtungsrate (%) bei den ersten 9 Embryoentnahmen

Bezüglich der durchschnittlichen Befruchtungsrate wurden weder bei Färsen noch bei Kühen signifikante Unterschiede zwischen den ersten 9 Entnahmen festgestellt (Abbildung 15).

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der wiederholten Embryoentnahmen beim Spender Nr. 23.

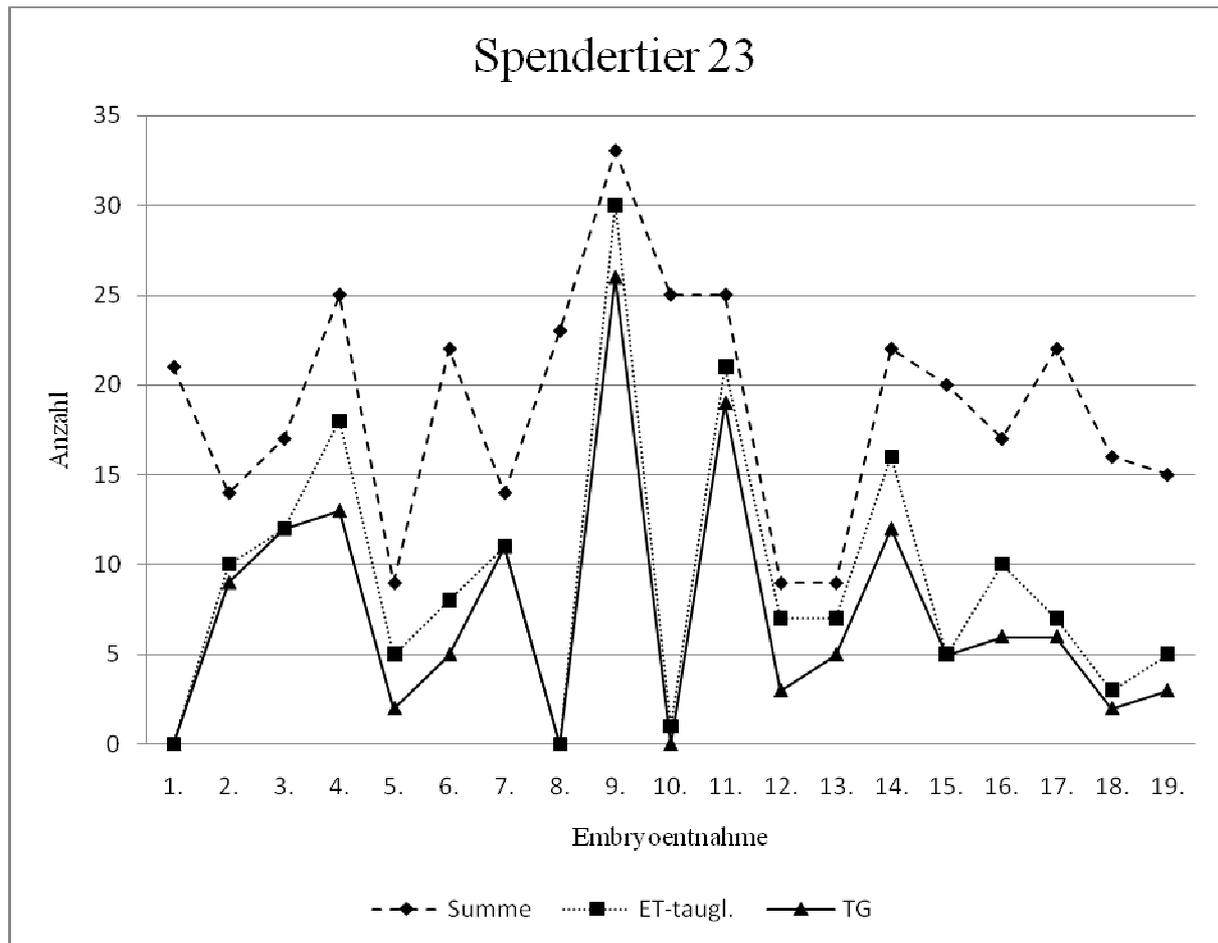


Abb. 16: Verlauf der wiederholten Embryoentnahmen bei der Spenderkuh Nr. 23

Beim Spendertier 23 wurden bislang 19 Entnahmen im 5-wöchigen Rhythmus durchgeführt. Im Durchschnitt wurden dabei pro Entnahme 18,8 Eizellen/Embryonen gewonnen, davon waren 9,3 ET-tgl. und 6,9 TG-tgl. Embryonen. Das ergibt über den Gesamtzeitraum von 22 Monaten im Durchschnitt 1,9 ET-tgl. und 1,5 TG-tgl. Embryonen pro Woche (Abbildung 16).

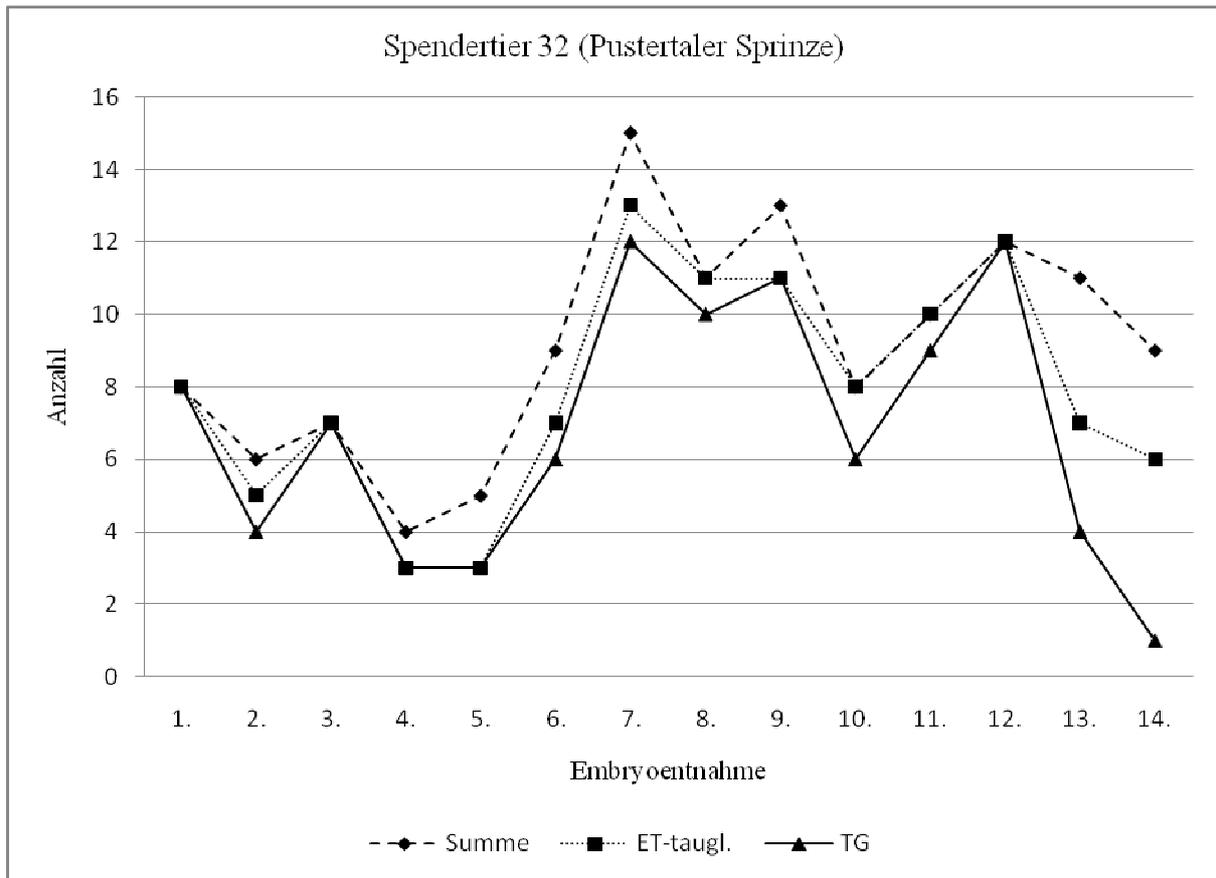


Abb. 17: Verlauf der wiederholten Embryoentnahmen bei der Spenderkuh Nr. 32

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der wiederholten Embryoentnahmen beim Spender Nr. 32 und die Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der Embryoentnahmen bei der Färse Nr. 39.

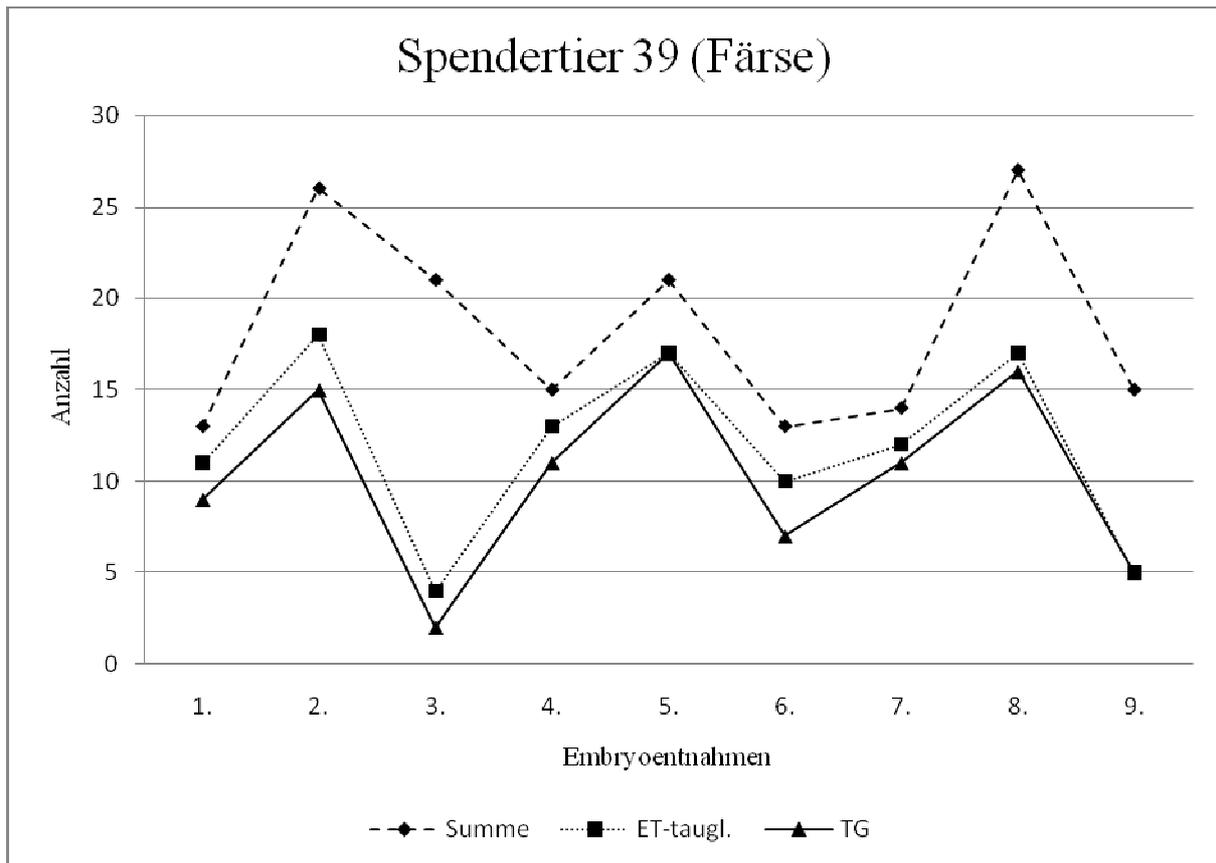


Abb. 18: Verlauf der wiederholten Embryoentnahmen bei der Färse Nr. 39

Beim Spendertier 32 (Abbildung 17) wurden 14 Embryoentnahmen im 5-wöchigen Rhythmus durchgeführt. Im Durchschnitt wurden dabei pro Embryoentnahme 9,1 Eizellen/Embryonen gewonnen, davon waren 7,9 ET-tgl. und 6,8 TG-tgl. Embryonen. Das ergibt über den Gesamtzeitraum von 16 Monaten im Durchschnitt 1,6 ET-tgl. und 1,4 TG-tgl. Embryonen pro Woche. Bei der Färse 39 (Abbildung 18) wurden 9 Embryoentnahmen im 5-wöchigen Rhythmus durchgeführt. Im Durchschnitt wurden dabei pro Embryoentnahme 18,3 Eizellen/Embryonen gewonnen, davon waren 11,9 ET-tgl. und 10,1 TG-tgl. Embryonen. Das ergibt über den Gesamtzeitraum von 11 Monaten im Durchschnitt 2,4 ET-tgl. und 2,1 TG-tgl. Embryonen pro Woche.

Die unter Verwendung der Summe der quadrierten Y-Werte berechneten Wiederholbarkeiten der Ergebnisse der Embryoentnahmen zeigt die Tabelle 32.

Tab. 32: Wiederholbarkeit der Ergebnisse der Embryoentnahmen

Merkmal	Zufällige Effekte (Varianzen)			Wiederholbarkeit (w)	-2 Res Log L	H _A H _O	[H _O -H _A]
	Tier						
	σ^2_w Varianz innerhalb der Gruppen	σ^2_B Varianz zwischen den Gruppen	Summe geschätzter Varianzen				
Eizellen/ Embryonen	23,0430	43,5395	66,5825	0,654	1796,4	H _A	34,8
	-	63,6149	63,6149		1831,2	H _O	
Ufos	17,3107	28,9722	46,2829	0,626	1615,1	H _A	27,7
	-	41,8694	41,8694		1642,8	H _O	
Deg.	1,3140	6,3399	7,6539	0,828	1226,4	H _A	6,2
	-	7,3627	7,3627		1232,6	H _O	
ET-tgl.	13,0129	31,6804	44,6933	0,709	1623,9	H _A	15,4
	-	41,2492	41,2492		1639,3	H _O	
TG-tgl.	8,0299	23,7053	31,7352	0,747	1549,8	H _A	13,0
	-	29,8296	29,8296		1562,8	H _O	
Befruchtungsrate	354,80	849,22	1204,02	0,705	2400,5	H _A	16,3
	-	1112,15	1112,15		2416,8	H _O	

Die Berechnung der Wiederholbarkeit als Faktor zur Gleichheit der Beobachtungswerte an wiederholten Spülungen der gleichen Tiere ergab eine Wiederholbarkeit von 62,6-82,8%.

4.2 Transvaginale Follikelpunktion im Rahmen der Superovulationsbehandlung

Bei den Spendern (n=28) behandelt nach Superovulationsschema 6 wurde zum Zeitpunkt des Einsetzen der PRID-alpha[®] ein OPU durchgeführt. Von den 28 Tieren wurde bei 19 (68%) Tieren ein DF beobachtet. Es wurden 7,3 Follikel pro Spender punktiert und 2,6 (36%) Eizellen pro Tier gewonnen.

4.3 Zwischenkultivierung nicht tiefgefrier-tauglicher Embryonen

In Tabelle 33 sind die Ergebnisse der 18-24stündige Zwischenkultivierung von Embryonen der Klasse 3 zu tiefgefrier-tauglichen Embryonen der Klasse 2 dargestellt.

Tab. 33: Weiterentwicklung nach 18-24 h Zwischenkultur von Embryonen der Klasse 3

	Stadium bei Embryoentnahme						Gesamt	
	Morula		Frühe Blastozyste		Blastozyste			
	n	%	n	%	n	%	n	%
Embryonen	39		32		28		99	
Weiterentwicklung	33	85	32	100	28	100	93	94
Tiefgefrier-tauglich nach Kultur	19	58	14	44	10	36	43	43

4.4 Übertragung von Embryonen auf Empfängertiere

Die Graviditätsergebnisse nach der Übertragung von Embryonen Klasse 3 auf Empfänger in Abhängigkeit von dem verwendeten Verfahren zur Zyklussynchronisation der Empfängertiere zeigt Tabelle 34.

Tab. 34: Graviditäten (Tag 35) nach ET je nach Zyklussynchronisationsverfahren

Zyklus-synchronisation	Anzahl Embryo-Transfers	Graviditäten (Tag 35)	
		Anzahl	%
Brunstabhängig (PGF _{2α})	39	22	56
Brunstunabhängig (CIDR [®])	28	21	75
Summe	67	43	64

Die brunstunabhängige Zyklussynchronisation der Empfängertiere mit CIDR[®] führte mit 75% (21 von 28) zu höheren Graviditätsergebnissen im Vergleich zur brunstabhängigen Behandlung der Tiere mit PGF_{2α} (56%, 22 von 39).

4.5 Kosten der stationären Embryoerzeugung

Die Aufstellung der Kosten (inkl. MwSt.) für die Gewinnung von Embryonen auf Station zeigt Tabelle 35. Für die Ermittlung der Kosten von tierärztlichen Leistungen wurde der einfache Satz der Gebührenordnung für Tierärzte (GOT) zugrunde gelegt.

Tab. 35: Vereinfachte Aufstellung der Embryoerzeugungskosten im Versuchszeitraum

Pos.	Leistung	Kosten (€ inkl. MwSt.)	Fälligkeit
(1)	Im Herkunftsbetrieb:		
	Bestimmung des BHV1-/BVD-Status (Blutentnahme und Labor)	20	einmalig
	Untersuchung eines Spenders inkl. Fahrtkostenpauschale	60	
	Zukauf eines Spendertieres (nur Schlachtwert)	1.200	
	Transportkostenpauschale eines Spenders	50	
	Summe (1):	1.330	
(2)	Stationäre Aufnahme und Eingewöhnung:		
	Untersuchung und Behandlung des Spenders	35	einmalig
	Tierarzneimittel, Verbrauchsmaterialien	30	
	DNA-Registrierung (Blutentnahme und Labor)	35	
	Bestimmung des BHV1-Status (Blutentnahme und Labor)	15	
	Tierhaltung (5 Wochen)	105	
	Summe (2):	220	
(3)	Biotechnische Behandlung und Embryonengewinnung:		
	Untersuchung und Superovulationsplan	35	pro Embryo- entnahme
	Tierarzneimittel und Hormone	65	
	Künstliche Besamungen (inkl. Tiefgefriersperma)	50	
	Embryoentnahme (inkl. Verbrauchsmaterialien)	120	
	Embryonensuche und -beurteilung (inkl. Verbrauchsmaterialien)	80	
	Verpacken und Tiefgefrieren (inkl. Verbrauchsmaterialien)	80	
	Lagerung von Tiefgefrierembryonen (5 Stück pro 5 Wochen)	15	
	Tierhaltung (5 Wochen)	105	
	Summe (3):	550	
(4)	Gesamt (1) + (2) + (3):	2.100	
(5)	Verkaufserlös eines Spenders (nur Schlachtwert):	1.000	
	Embryoerzeugungskosten bei der ersten Embryoentnahme (4) – (5):	1.100	
	Jede weitere Embryoentnahme im 5wöchigen Rhythmus (3):	550	

Die Tabelle 36 zeigt die Kosten der stationären Embryoerzeugung in Abhängigkeit der Anzahl wiederholter Embryoentnahmen bei einer gleichen Spenderkuh unter Berücksichtigung der im Durchschnitt zu erwartenden 7,0 ET-tgl. und davon 5,0 TG-tgl. Embryonen pro wiederholte Embryoentnahme im 5-wöchigen Entnahme-Rhythmus und bei einer Nutzung des Spenders von einem Jahr.

Tab. 36: Embryoerzeugungskosten (€ inkl. MwSt.) je nach Anzahl wiederholter Entnahmen

Anzahl wiederholter Embryoentnahmen pro Spender	Stationärer Aufenthaltsdauer (Wochen)	Kumulative Erzeugungskosten	Kumulative Anzahl ET-tgl. Embryonen	Kosten pro ET-tgl. Embryo	Kumulative Anzahl TG-tgl. Embryonen	Kosten pro TG-tgl. Embryo
		(a)	(b)	(a/b)	(c)	(a/c)
1	7	1.100	7	157	5	220
2	12	1.650	14	118	10	165
3	17	2.200	21	105	15	147
4	22	2.750	28	98	20	138
5	27	3.300	35	94	25	132
6	32	3.850	42	92	30	128
7	37	4.400	49	90	35	126
8	42	4.950	56	88	40	124
9	47	5.500	63	87	45	122
10	52	6.050	70	86	50	121

Aus der Tabelle 36 ist zu entnehmen, dass im Laufe wiederholter Embryoentnahmen im 5-wöchigen Entnahme-Rhythmus und über einem Zeitraum von einem Jahr die durchschnittlichen Erzeugungskosten eines TG-tgl. Embryos schrittweise um 55-99 € sinken. Darüber hinaus kann jeder im Durchschnitt zusätzlich erzeugte TG-tgl. Embryo in Abhängigkeit der Anzahl wiederholter Embryoentnahmen die Erzeugungskosten eines jeden TG-tgl. Embryos um weitere 18-32 € verringern.

Die Tabelle 37 zeigt eine vereinfachte Aufstellung der Kosten für die stationäre Haltung eines Empfängertieres vom Zukauf bis zur positiven Graviditätsdiagnose (Tag 35). In Abhängigkeit vom Übertragungserfolg variieren die reinen Erzeugungskosten einer Gravidität aus Embryo-Transfer auf Station zwischen 450 € (erster Embryo-Transfer führt zur Gravidität) und 910 €, wenn für die Erzeugung einer Gravidität bei einem gleichen Empfängertier drei Übertragungsversuche durchgeführt werden müssen.

Tab. 37: Vereinfachte Aufstellung der Erzeugungskosten einer Gravidität auf Station

Pos.	Leistung	Kosten (€ inkl. MwSt.)	Fälligkeit
(1)	Im Herkunftsbetrieb:		
	Bestimmung des BHV1-/BVD-Status (Blutentnahme und Labor)	20	einmalig
	Untersuchung eines Empfängers inkl. Fahrtkostenpauschale	30	
	Zukauf eines Empfängers (nur Schlachtwert)	830	
	Transportkostenpauschale eines Empfängers	40	
	Summe (1):	920	
(2)	Stationäre Aufnahme und Eingewöhnung:		
	Untersuchung und Behandlung des Empfängers	13	einmalig
	Tierarzneimittel, Verbrauchsmaterialien	22	
	Bestimmung des BHV1-Status (Blutentnahme und Labor)	15	
	Tierhaltung (5 Wochen)	80	
	Summe (2):	130	
(3)	Biotechnische Behandlung und Embryoübertragung:		
	Untersuchungskosten	15	pro Embryo- Transfer
	Tierarzneimittel und Hormone	20	
	Embryoübertragung (inkl. Verbrauchsmaterialien)	15	
	Durchschnittliche Erzeugungskosten eines ET-tgl. Embryos	100	
	Tierhaltung bis zum Tag 35 der Gravidität (5 Wochen)	80	
	Summe (3):	230	
(4)	Gesamt (1) + (2) + (3):	1.280	
(5)	Verkaufserlös eines Empfängers (nur Schlachtwert):	830	
	Erzeugungskosten einer Gravidität aus ET auf Station:		
(6)	Erste Übertragung führt zur Gravidität (4) – (5):	450	
(7)	Zweite Übertragung führt zur Gravidität (6) + (3):	680	
(8)	Dritte Übertragung führt zur Gravidität (7) + (3):	910	

5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Möglichkeiten der Durchführung wiederholter Embryoentnahmen in kurzen Zeitabständen unter stationären Bedingungen zu prüfen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Behandlungsschemata zur wiederholten Superovulation mit Progesteron-freisetzenden Vaginalpessaren und brunstunabhängigen Besamungen an einer größeren Tierzahl verglichen. Für die Beurteilung wurden verschiedene Einflussfaktoren auf die Ergebnisse der Embryoentnahme unter den relativ konstant bleibenden Bedingungen einer stationären Embryotransfereinrichtung untersucht und auch eine Kostenanalyse durchgeführt.

Die untersuchten Faktoren waren: Individueller Einfluss, Alter und Parität der Spender, Jahr und Saison, Behandlungsschema, und verschiedene Aspekte der Besamung der Spender.

Außerdem wurden Versuche bezüglich der weiteren Verwendung der gewonnenen Embryonen durchgeführt. Dazu wurden Embryonen, die zum Zeitpunkt der Gewinnung transfer-, aber nicht tiefgefriertauglich waren, kultiviert und auf eine mögliche Weiterentwicklung untersucht, die ein späteres Einfrieren ermöglichen sollte. Für die Übertragung frischer Embryonen wurden Empfängertiere auf zwei unterschiedliche Arten zyklussynchronisiert und die beiden Methoden miteinander verglichen.

Als Merkmale für den Erfolg der Superovulationsbehandlung und der Embryonengewinnung dienten die Gesamtzahl gewonnener Eizellen und Embryonen, die Anzahl unbefruchteter Oozyten, sowie der Anteil transfer- bzw. tiefgefriertauglicher Embryonen.

Grundlage für die Arbeit waren die Daten die durch die an der Embryo-Entnahmeeinheit und Embryo-Erzeugungseinheit Badersfeld (DE-ETR 006 EWG) des Lehrstuhls für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der LMU-München in Oberschleißheim im Zeitraum vom 30.03.2006 bis zum 30.06.2008 durchgeführten Embryoentnahmen gewonnen wurden.

5.1 Zyklusabhängige vs. zyklusunabhängige Superovulation

Zu Beginn der vorliegenden Untersuchung stellte sich die Frage, welchem Superovulationsschema der Vorzug zu geben wäre, da hierfür seit vielen Jahren verschiedene Schemata zur Verfügung stehen. Grundsätzlich kann hierbei zwischen dem konventionellen, zyklusabhängigen ET und dem zyklusunabhängigen ET unterschieden werden. Beim zyklusabhängigen ET kann die hormonelle Behandlung mit FSH zwischen den Zyklustagen

9-14 gestartet werden (MAPLETOFT, 2002). Zwar ist auch ein früherer Start der Behandlung am Zyklustag 2-6 möglich, führt aber zu schlechteren Ergebnissen (GOULDING et al., 1990). Wenn mehrere Spendertiere für einen Termin eingeplant werden, ist eine Vorsynchronisation erforderlich, sofern die Brunsten der Tiere nicht schon zufällig eng beieinander liegen. Beim zyklusabhängigen ET muss sich der Zyklus nach einer bereits stattgefundenen Superovulation wieder normalisieren, bevor eine weitere Superovulation eingeleitet werden kann. Bei jeder Planung und Vorbereitung der Dauerspender sollte man sich möglichst nach den Zyklen der Tiere richten, und hin und wieder sind hierfür weitere Vorsynchronisationen unerlässlich. Dies führt dazu, dass eine Superovulation nach diesem althergebrachten Behandlungsschema trotz sachgerechter Anwendung nur in größeren Zeitabständen von ca. 2-3 Monaten wiederholt durchgeführt werden kann, was nicht im Sinne der vorliegenden Untersuchung war. Ein weiterer Punkt ist die hohe Variabilität der Ergebnisse. So liegen Ergebnisse zwischen 0 und 30 ET-tgl. Embryonen pro Behandlung innerhalb der Norm und bis zu 2/3 der Spenderkühe liefern weniger als die durchschnittlich erwarteten ET-tgl. Embryonen pro Superovulationsbehandlung. Außerdem stellte sich die Frage, ob bei der zyklusabhängigen Superovulation die maximale Effizienz nicht bereits erreicht ist, denn die Zahl der pro Embryoentnahme zu erwartenden ET-tgl. Embryonen stagniert seit vielen Jahren weltweit um die 6 Embryonen (THIBIER, 1997-2008).

5.1.1 Ergebnisse der zyklusabhängigen Superovulation

In der vorliegenden Arbeit wurden bei der zyklusabhängigen Superovulation zwischen den Zyklustagen 9-14 (SO-Schema 1) im Durchschnitt 17,9 Eizellen/Embryonen pro Embryoentnahme gewonnen, von denen 7,1 Ufos, 5,7 Deg., 8,1 ET-tgl. und 5,0 TG-tgl. waren. Die durchschnittliche Anzahl der ET-tgl. Embryonen lag somit über dem erwarteten internationalen Durchschnitt (THIBIER, 1997-2008). Im Vergleich zu den Ergebnissen beim DFV (ADR Jahresbericht, 2004; Tabelle 6) waren die Ergebnisse jedoch leicht unterdurchschnittlich. Das kann daran liegen, dass bei den Besamungen keine Rücksicht auf die superovulatorische Brunst genommen wurde (terminorientierte Besamungen). Die superovulatorische Brunst tritt jedoch nicht immer zum vorbestimmten Zeitpunkt ein oder die äußeren Brunstsymptome bleiben völlig aus, was bei brunstabhängigen Besamungen zu schlechteren Befruchtungsergebnissen führen kann. Deshalb bekamen die superstimulierten Spender in allen SO-Schemata ein GnRH-Analogon 48 h nach der zweiten PGF_{2α}-Applikation (SO-Schema 1) oder 24-36 nach der Entnahme der Vaginalspirale (SO-Schemata 2-10;

Tabelle 12) appliziert. Dadurch sollte die Auslösung der Superovulation zeitlich fixiert werden, d.h. innerhalb von etwa 24 h nach der GnRH-Behandlung gestartet werden.

Gegenüber den Schemata 4, 6, und 7 wurden mit SO-Schema 1 mehr TG-tgl. Embryonen erzielt. Eine wichtige Grundvoraussetzung für die Durchführung dieses SO-Schemas war eine zuverlässige Brunstbeobachtung, wobei mindestens zwei aufeinander folgende Brunstperioden im Zeitabstand von 20-21 Tagen als optimal für den Start der SO-Behandlung angesehen wurden. Eine Vorsynchronisation der Spender wurde hierfür nicht durchgeführt. Ebenfalls als wichtig wurden deutliche Brunstsymptome betrachtet. Sie traten jedoch nicht immer zum vorbestimmten Zeitpunkt ein und hin und wieder blieben die äußeren Brunstsymptome völlig aus, worauf eine Superovulation nicht eingeleitet werden konnte. Die Ovulationsraten variierten sehr stark zwischen den Spendern, trotz Verwendung des gleichen Behandlungsschemas und der gleichen FSH-Dosierungen bei gleichbleibenden Umweltbedingungen. Diese große Variabilität der Ovarreaktion nach Superovulation wird als Hauptproblem des ET erachtet und erschwert jegliche Voraussage über deren Erfolg (MAPLETOFT et al., 2002).

5.1.1 Ergebnisse der zyklusunabhängigen Superovulation

Eine erfolgreiche zyklusunabhängige Superovulation mit gleichzeitiger Vorsynchronisation aller für den ET geplanten Spendertiere kann mit Hilfe von Progesteron-freisetzenden Vaginalspiralen erreicht werden (BÓ et al., 2008). Für wiederholte Embryoentnahmen in kürzeren Zeitabständen von 5 Wochen beschloss man die Durchführung von zyklusunabhängigen Superovulationsschemata (SO-Schemata 2-10) unter Verwendung von zwei verschiedenen Progesteron-freisetzenden Vaginalspiralen. Die Verwendung von Vaginalspiralen für die zyklusunabhängige Superovulation wurde zwar früh untersucht, (SCHILLING et al., 1981; VOSS et al., 1983; TENHUMBERG et al., 1984), die Ergebnisse waren damals jedoch nicht zufriedenstellend. So wurde viele Jahre bei den praktisch orientierten ET-Programmen weiterhin die zyklusabhängige Superovulation angewandt. Erst ein besseres Verständnis des Follikelwachstums und die Möglichkeiten der Ovulationssynchronisation erlaubten die erfolgreiche Entwicklung von zyklusunabhängigen SO-Schemata (BÓ et al., 2002, 2008). Heutzutage kann diese einfache, schnelle und komplikationslos ausführbare Möglichkeit der Einleitung einer Superovulation als eine effiziente Alternative zur Embryoproduktion betrachtet werden. Bei dem Vergleich der

angewendeten zyklusunabhängigen SO-Schemata (2-10) sollte eine möglichst hohe Anzahl an ET-tgl. und TG-tgl. Embryonen pro Embryoentnahme gewonnen werden.

Beim SO-Schema 2 wurde den Tieren eine einzelne Dosis PGF_{2α} (Estrumate®) zum Zeitpunkt der 5. FSH Injektion verabreicht. Es erfolgten 3 Besamungen, 36, 48 und 60 h nach Entnahme der PRID-alpha®. GnRH (Receptal®) wurde 24 h nach Entnahme der PRID-alpha® appliziert. Insgesamt fanden 33 Embryoentnahmen nach diesem Superovulationsschema statt. Die durchschnittliche Gesamtzahl gewonnener Eizellen/Embryonen betrug dabei 13,3; die Anzahl ET-tgl. Embryonen 8,3 und die der TG-tgl. Embryonen 5,8. Damit wurden im Durchschnitt gegenüber den SO-Schemata 4 bis 8 mehr Eizellen/Embryonen und ET-tgl. Embryonen gewonnen. Darüber hinaus wurden mit SO-Schema 2 mehr ET-tgl. Embryonen als mit Schema 10 beobachtet. Es wurden mehr TG-tgl. Embryonen gewonnen als mit den SO-Schemata 4 bis 7.

SO-Schema 3 unterschied sich von SO-Schema 1 durch die verringerte Anzahl an durchgeführten Besamungen (2 vs. 3), die 36 und 48 h nach Entnahme der PRID-alpha® durchgeführt wurden. Ansonsten waren die SO-Schemata 2 und 3 identisch. Mit diesem Schema wurden 7 Superovulationsbehandlungen durchgeführt. Die durchschnittliche Zahl an gewonnenen Eizellen/Embryonen betrug dabei 16,6. Der Anteil ET-tgl. Embryonen lag bei 11,1, und der TG-tgl. bei 8,4. SO-Schema 3 führte zu durchschnittlich mehr Eizellen/Embryonen als die SO-Schemata 4, 6, 7 und 8 und mehr ET-tgl. und TG-tgl. Embryonen als die SO-Schemata 4 bis 8 und 10.

Beim SO-Schema 4 wurde die Anzahl der PGF_{2α} Injektionen auf 2 erhöht, die zusammen mit der 6. und 7. FSH Anwendung verabreicht wurden. Es erfolgten wieder 3 Besamungen, GnRH wurde 24 h nach Entfernung der PRID-alpha® appliziert. Mit diesem Schema wurden 30 Embryoentnahmen durchgeführt, bei denen im Schnitt 18,3 Eizellen/Embryonen pro Entnahme gewonnen wurden. Die durchschnittliche Anzahl ET-tgl. Embryonen lag bei 7,6, die der TG-tgl. bei 5,4.

So-Schema 5 war identisch mit SO-Schema 4, allerdings wurde die Anzahl der Besamungen von 3 auf 2 reduziert. Es wurden 41 Embryoentnahmen durchgeführt, bei denen im Schnitt 12,2 Eizellen/Embryonen, 6,2 ET-tgl. und 4,1 TG-tgl. Embryonen gewonnen werden konnten. Mit SO-Schema 5 wurden durchschnittlich mehr Eizellen/Embryonen und ET-tgl. Embryonen als mit den SO-Schemata 4 und 7 erreicht.

SO-Schema 6 war identisch mit Schema 5, allerdings wurde hier zusätzlich zum Zeitpunkt des Einsetzens der PRID-alpha® eine Follikelpunktion durchgeführt. Bei den 28 nach diesem Schema durchgeführten Embryoentnahmen konnten, ohne Einbeziehung der durch die

Punktion gewonnenen Eizellen, im Schnitt 16,6 Eizellen/Embryonen gewonnen werden. Davon waren 7,0 ET-tgl. und 5,2 TG-tgl. Von den 28 Tieren wurde bei 19 (68%) Tieren ein dominanter Follikel beobachtet und punktiert.

Verglichen mit den anderen Behandlungsschemata konnte durch die Ablation des dominanten Follikels kein erkennbarer positiver Effekt auf das Ergebnis der Superovulationsbehandlung festgestellt werden. Bezüglich der Anzahl der erhaltenen Ufos, der ET-tgl. und TG-tgl. Embryonen waren die Ergebnisse tendenziell sogar eher schlechter als der Durchschnitt. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen eines Großteils der anderen Autoren, die einen negativen Einfluss der Anwesenheit eines dominanten Follikels auf das Ergebnis der Superovulationsbehandlung feststellten (GRASSO et al., 1989; GUILBAULT et al., 1991; HUHTINEN et al., 1992; BUNGARTZ und NIEMANN, 1994; STOCK et al., 1996; WOLFSDORF et al., 1997; SHAW und GOOD, 2000; KIM et al., 2001; LIMA et al., 2007). Eine mögliche Erklärung hierfür ist das die Entfernung des dominanten Follikels zu früh stattfand. Nach BÓ et al. (2006) sollte mit der Superovulationsbehandlung 1-2 Tage nach der Eliminierung des dominanten Follikels begonnen werden, wodurch sich eine neue Follikelwelle an bilden kann (ADAMS et al., 1993; BERGFELT et al., 1994).

SO-Schema 7 war ebenfalls identisch mit dem SO-Schema 5, jedoch wurde hier unmittelbar nach der erfolgten Embryogewinnung eine Uterusinfusion mit EucaComp[®] durchgeführt, davon ausgehend, dass die intrauterine Applikation des Phytotherapeutikums die darauffolgende Superovulation und Embryoentnahme nicht negativ beeinflussen würde, eine eventuell vorhandene subklinische Endometritis jedoch frühzeitig therapiert werden könnte. Insgesamt wurde dies bei 19 Embryoentnahmen durchgeführt, bei denen durchschnittlich 14,4 Eizellen/Embryonen gewonnen wurden, von denen 7,2 ET-tgl. und 5,1 TG-tgl. waren. Bezüglich der Anzahl der erhaltenen ET-tgl. und TG-tgl. Embryonen unterschieden sich die Ergebnisse nicht signifikant. Ein positiver oder negativer Effekt auf das Ergebnis der Superovulationsbehandlung durch die Behandlung mit EucaComp[®] konnte nicht beobachtet werden.

Bei SO-Schema 8 wurde PGF_{2α} zweimalig zum Zeitpunkt der 6. und 7. FSH Gabe angewendet. Es erfolgten 3 Besamungen. GnRH wurde erst 36 h nach Entfernung der PRID-alpha[®] appliziert. Angewandt wurde dieses Schema bei 36 Embryoentnahmen. Die durchschnittliche Gesamtzahl gewonnener Eizellen/Embryonen betrug dabei 15,3, der Anteil ET-tgl. Embryonen lag bei 8,8, der der TG-tgl. Embryonen bei 7,0.

SO-Schema 9 war identisch mit dem SO-Schema 8, jedoch wurde statt der PRID-alpha[®] Vaginalspirale eine CIDR[®] Vaginalspange eingesetzt. Dieses Schema kam bei 7

Embryoentnahmen zum Einsatz, bei denen im Schnitt 17,9 Eizellen/Embryonen gewonnen werden konnten, von denen 12,6 ET-tgl. und 9,7 TG-tgl. waren. SO-Schema 9 erbrachte durchschnittlich mehr Eizellen/Embryonen als SO-Schema 7 und mehr ET-tgl. Embryonen als Schemata 4, 6 und 7. Darüber hinaus wurden durchschnittlich mehr TG-tgl. Embryonen als mit den SO-Schemata 6 und 7 gewonnen.

Bei SO-Schema 10 wurde, wie schon bei SO-Schema 9, eine CIDR[®] Vaginalspange verwendet. Die Anzahl an FSH-Injektionen wurde von 8 auf 7 reduziert. PGF_{2α} wurde zweimal appliziert, zum Zeitpunkt der 5. und 6. FSH Gabe. Es wurden 2 Besamungen durchgeführt, GnRH wurde 36h Stunden nach Entfernung der CIDR[®] angewendet. Der Zeitabstand zwischen der ersten Besamung und der Embryoentnahme wurde von 7,5 Tagen (SO-Schemata 1-9) auf 7,0 Tage verkürzt. Dies geschah, da bei den SO-Schemata 2-9 überwiegend Blastozysten gewonnen wurden. Es sollten dadurch mehr Embryonen im Stadium der Morula für das von uns verwendete Tiefgefrierverfahren mit Ethylenglykol gewonnen werden. Zum Einsatz kam das SO-Schema 10 bei 46 Embryoentnahmen. Im Schnitt wurden dabei 16,3 Eizellen/Embryonen gewonnen, von denen 6,1 ET-tgl. und 3,9 TG-tgl. waren. Schema 10 führte zu durchschnittlich mehr Eizellen/Embryonen als SO-Schema 7, schnitt aber im Hinblick auf die Anzahl gewonnener ET-tgl. und TG-tgl. Embryonen von allen Schemata am schlechtesten ab. Eine Verringerung der FSH-Dosen von 8 auf 7 und eine Vorverlegung der Embryoentnahme um einen halben Tag scheinen daher nicht sinnvoll zu sein.

Ein Vergleich der beiden Vaginalpessare die zu Anwendung kamen, die CIDR[®] Vaginalspange und die PRID-alpha[®] Vaginalspirale, gestaltet sich schwierig. Die PRID-alpha[®] Vaginalspirale kam bei den Schemata 2-8 zum Einsatz, die CIDR[®] Vaginalspange nur bei den Schemata 9 und 10. Schema 9 zeigte im Vergleich mit den anderen Schemata die höchste Anzahl an gewonnen ET-tgl. und TG-tgl. Embryonen. Bei Schema 10 fielen die Ergebnisse jedoch stark ab, verglichen mit den Resultaten der übrigen Behandlungsschemata waren es die schlechtesten der Versuchsreihe. Da bei diesem Schema aber im Vergleich zu den übrigen auch die umfangreichsten Änderungen vorgenommen wurden kann eine mögliche Ursache auch hierin begründet sein. Für eine bessere Aussagekraft der Ergebnisse müssten mehr Behandlungen nach Schema 9 erfolgen als die bisher durchgeführten 7. Beim Handling und in der Anwendung zeigte sich die CIDR[®] Vaginalspange der PRID-alpha[®] Vaginalspirale jedoch überlegen. Durch den geringeren Durchmesser war das Einsetzen einfacher, was sich gerade bei Färsen bemerkbar machte. Es traten seltener Verluste während

der Behandlung auf, d.h. die Vaginalspange saß sicherer als die Spirale. Beim Entfernen der CIDR[®] wurden zudem weniger Vaginitiden beobachtet.

Bei den SO-Schemata 2 und 3 wurde eine einzige Dosis PGF_{2α} appliziert, während bei den übrigen 2 Dosen angewandt wurden. Bei einem Vergleich der Ergebnisse der SO-Schemata zeigt sich das durch die zweite Dosis keine Verbesserung der Ergebnisse erreicht werden konnte.

Bei den SO-Schemata 2-7 wurde GnRH 24 h nach Entnahme der PRID-alpha[®] Vaginalspirale appliziert, bei den SO-Schemata 8-10 36 h nach Entnahme der PRID-alpha[®] Vaginalspirale bzw. der CIDR[®] Vaginalspange. GnRH bewirkt eine rasche Freisetzung von FSH/LH und in der Regel den LH-Peak mit anschließender Ovulation innerhalb von 24 h nach der Behandlung (WOLFENSON et al., 1994). Nicht superovulierte Tiere werden für gewöhnlich 15 bis 20 h nach der GnRH Applikation besamt (WOLFENSON et al., 1994, SCHMITT et al., 1996). Ein Vergleich fällt hier, ähnlich wie bei dem Vergleich PRID-alpha[®] vs. CIDR[®] schwer, da das SO-Schema 9 die besten Ergebnisse hinsichtlich der Anzahl gewonnener ET-tgl. und TG-tgl. Embryonen lieferte, SO-Schema 10 dagegen die schlechtesten. Allerdings gilt auch hier wieder, dass die schlechteren Ergebnisse auch durch andere vorgenommene Änderungen bedingt sein können. SO-Schema 8 lieferte durchschnittliche Ergebnisse. Ausgehend von den Erkenntnissen die bei den Versuchen hinsichtlich des optimalen Besamungszeitpunktes gewonnen wurden ist allerdings eher eine frühe Applikation von GnRH zu empfehlen.

Zusammenfassend kann man als gut geeignet für wiederholte Superovulationen bzw. Embryoentnahmen bei Dauerspendern folgendes SO-Schema ansehen: 8 FSH-Injektionen, eine einmalige PGF_{2α}-Injektion, 2 Besamungen, eine GnRH-Applikation 24 h nach Entfernung der Vaginalspirale und 7,5 Tage Zeitabstand zwischen der ersten Besamung und der Embryogewinnung. Die entspricht dem SO-Schema 3, bei dem neben dem SO-Schema 9 die besten Resultate erzielt wurden. Allerdings wäre hier, ausgehend von den Resultaten bei der Bestimmung des optimalen Besamungszeitpunktes eine spätere Besamung in Betracht zu ziehen. Auch wären Versuche in denen das SO-Schema 3 mit einer CIDR[®] Vaginalspange anstelle einer PRID-alpha[®] Vaginalspirale durchgeführt werden von Interesse.

Eine vorstellbare Möglichkeit zur weiteren Verbesserung der Ergebnisse bei Dauerspendern wäre eine Verkürzung des Intervalls zwischen aufeinanderfolgenden SO-Behandlungen von 5 auf 4 Wochen. Dabei ist zu beachten, dass bei wiederholten Embryoentnahmen in kurzen Zeitabständen ein sehr schonendes und hygienisches Vorgehen wichtig ist. Kommt es dennoch zu Verletzungen des Endometriums durch zu derbe Handhabung beim Einführen

oder Platzieren des Entnahme-Katheters, beispielsweise bei sehr unruhigen Dauerspendern, dann sollten längere Zeitabstände zwischen Embryoentnahmen eingehalten werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass die Einleitung einer Superovulation mit gutem Erfolg zu jedem Zeitpunkt im Zyklus, ohne jegliche Rücksicht auf die Follikeldynamik möglich ist. Nach BÓ et al. (2008) werden bessere Ergebnisse erwartet, wenn die SO-Behandlung zum Zeitpunkt der Anbildung einer neuen Follikelwelle gestartet wird. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Punktion und Entfernung des dominanten Follikels hatte keinen positiven Effekt auf die Ergebnisse der Embryoentnahme. In weiterführenden Untersuchungen ist zu klären, ob sich durch eine Synchronisation der Follikelwellen mit GnRH oder HCG vor der ersten FSH-Gabe die Ergebnisse weiter verbessern lassen.

Im Zeitraum 30.03.2006 bis 30.06.2008 wurden mit den aufgeführten SO-Schemata insgesamt 324 Embryoentnahmen bei 64 Spendern verschiedener Rassen durchgeführt (Tabellen 18-20).

Wie die vorliegende Untersuchung zeigt, können im Durchschnitt 1,6 ET-tgl. (Färsen) bzw. 1,5 ET-tgl. (Kühe) Embryonen pro Tier und Woche erzeugt werden und die Behandlungen in kurzen Zeitabständen wiederholt am gleichen Tier mit guten Ergebnissen durchgeführt werden.

TROPPMANN (2000) erzeugte im Durchschnitt mehr ET-tgl. Embryonen pro Tier und Woche, aber ihre Versuchstiere waren auf ET-Eignung vorselektiert. Bei den schlecht geeigneten Spendern erzielte TROPPMANN (2000) schlechtere Ergebnisse.

Voraussetzung für die Anwendung der zyklusunabhängigen Superovulation in kurzen Zeitabständen ist die Wiederholbarkeit der Ergebnisse der Embryoentnahmen. Die Ergebnisse waren zwar sowohl bei Färsen als auch bei Kühen ab der 4. bzw. 5. Entnahme zunächst rückläufig, erholten sich jedoch im Laufe weiterer Entnahmen. Die berechneten Wiederholbarkeiten als Faktor für die Gleichheit der Beobachtungswerte an wiederholten Embryoentnahmen bei den gleichen Tieren waren hoch bis sehr hoch (Tabelle 32). Die Variabilität der Ergebnisse der Embryo-Entnahme war bei den zyklusunabhängigen SO-Schemata, wie auch bei der zyklusabhängigen SO-Behandlung, beträchtlich (Tabelle 19).

5.2 Bedeutung wiederholter Embryoentnahmen

Grundsätzliches Ziel des Embryotransfers ist die Erhöhung der Vermehrungsrate ausgewählter Zuchttiere, v.a bezogen auf die maternale Seite. Beim konventionellen ET mit

zyklusabhängiger Superovulation wird diese Möglichkeit durch die Leistung einzelner Embryoentnahmen sehr eingeschränkt, da im Allgemeinen nur 6 entwicklungsfähige Embryonen pro Spender und Entnahme gewonnen werden können (THIBIER, 1997-2008). Die sich hieraus ergebende Leistung von 3-4 Nachkommen nach Übertragung der Embryonen auf Empfängertiere kann durch die in kurzen Zeitabständen wiederholte Embryoentnahmen am gleichen Tier vervielfacht werden. Wenn auch die Erhöhung der Vermehrungsrate auf der weiblichen Seite durch ET im Vergleich zur KB deutlich geringer ist, kann durch ET eine deutlichere zusätzliche Vermehrung realisiert werden, desto mehr Embryonen von einem wertvollen Spender gewonnen werden. Durch wiederholte Embryoentnahmen in möglichst kurzen Zeitabständen am gleichen Tier ist dies im Vergleich zu Einzelentnahmen durchaus möglich, wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt haben.

Eine weitere Anwendung besteht in der Rationalisierung der Genreservehaltung durch Langzeitlagerung tiefgefrorener Embryonen und Erhaltung des Zuchtmaterials bei Sanierungsmaßnahmen. Die wiederholte Embryoentnahme erlaubt die intensive Nutzung des Fortpflanzungspotentials älterer Spender von Rassen die vom Aussterben bedroht sind als Dauerspender.

Die Möglichkeit der wiederholten Embryoentnahme am gleichen Tier in kurzen Abständen eröffnet dem Tierzüchter eine Reihe neuer Möglichkeiten der Vermehrung wertvollen Zuchtmaterials, der Zuchtwertprüfung und der Selektion und erschließt neue zuchtorganisatorische Wege, durch den Im- und Export einer größeren Anzahl tiefgefrorener Embryonen eines wertvollen Spendertieres. Auch für die Umsetzung innovativer Zuchtstrategien und Zuchtprogramme, inklusive der markergestützten Selektion, bietet die Bereitstellung einer größeren Anzahl ET-tgl. Embryonen erweiterte Möglichkeiten.

Abschließend lässt sich sagen, dass durch die erzielte Rationalisierung der Behandlung und die terminorientierten Besamungen und die somit erreichte Praktikabilität der Behandlung ein vereinfachtes Instrument für die Tierzucht zur Verfügung steht. Durch wiederholte Embryoentnahmen kann die Zahl der ET-tgl. Embryonen bedeutend gesteigert werden wodurch sich die Selektionsintensität weiter erhöhen lässt. Mit der Erhöhung der Embryonenzahl pro Spender und bei einem gleichbleibenden Transfererfolg von 60-70% erhöht sich der errechnete zusätzliche Zuchtfortschritt pro Jahr. Darüber hinaus eröffnet die wiederholte Embryoentnahme die Möglichkeit deutlich mehr Embryonen hervorragender weiblicher Zuchttiere für Exportzwecke zu gewinnen. Der Export von Embryonen anstelle lebender Zuchttiere ist mit der Senkung von Transportkosten, der Erfüllung

veterinärhygienischer Anforderungen und der Reduzierung von Akklimatisationsproblemen verbunden.

5.3 Wiederholte Superovulationen im Vergleich mit OPU/IVP

Zwar gelten heute die OPU und die IVP als Methoden der Wahl zur Erzeugung einer größeren Zahl an Embryonen von einem gleichen Tier, die wiederholte, zyklusunabhängige Superovulation bzw. Embryoentnahme ist aber durchaus eine konkurrenzfähige Alternative mit Vorteilen.

So lassen sich zum einen größere Tiergruppen einfacher vorbereiten, da der Behandlungsbeginn zyklusunabhängig ist und somit zu jedem Zeitpunkt gestartet werden kann. Allerdings sollte die Brunst vermieden werden, da hier der Muttermund geöffnet und die Gebärmutter zugänglicher für ascendierende Infektionen ist, insbesondere da die Vaginalspangen bzw. -spiralen mitunter eine lokale Vaginitis verursachen können. Durch die Bildung größerer Gruppen ist es möglich, eine größere Anzahl von Empfängertieren gezielt für einen Termin vorzubereiten. Auch die Bereitstellung von Frischsperma selektierter Bullen durch die Besamungsstationen für die Besamung der superovulierten Spender, was bei vielen Autoren zu einer reduzierten Zahl unbefruchteter Eizellen (NOHNER et al., 1996) und einer höheren Anzahl an ET-tgl. Embryonen nach Superovulation führte (ONUMA et al., 1970; SEIDEL et al., 1978; NOHNER et al., 1996), wird dadurch vereinfacht.

Bei Spendern mit klinisch unauffälliger Fruchtbarkeitslage, jedoch wiederholt schlechten Ergebnissen nach Superovulation und Embryoentnahme mit der Verdachtsdiagnose einer subklinischen Endometritis oder einer Eileitererkrankung, sind unter Umständen durch OPU und IVP mehr Embryonen als nach Superovulation und konventionellem Embryotransfer zu erwarten. Die Tiefgefriertauglichkeit von Embryonen aus IVP ist jedoch im Vergleich zu ex vivo gewonnenen Embryonen schlechter. Möglicherweise werden deshalb IVP Embryonen in der Praxis noch vorzugsweise frisch und nicht tiefgefroren übertragen.

Im Regelfall wird OPU und damit auch die IVP zweimal wöchentlich durchgeführt. Die anfallenden Laborarbeiten bei der IVP sind, verglichen mit denen die bei der Embryonenspülung anfallen, sehr aufwendig und zeitfordernd. Zudem werden Spezialisten benötigt, die diese Arbeiten ausführen. Bei der Superovulation ist es zwar notwendig die Tiere 7-8-mal mit FSH über 4 Tage zu behandeln, allerdings können diese Arbeiten durch die Gruppenbildung gebündelt werden. Zudem ist hierfür kein Fachpersonal nötig. Unter

Umständen können die FSH-Gaben auch vom Tierbesitzer durchgeführt werden, falls die Behandlung nicht stationär erfolgt.

5.4 Kombination der Superovulation mit den Möglichkeiten des OPU/IVP

Zu Beginn der Untersuchungen war zunächst eine kombinierte Anwendung von ET und OPU/IVP vorgesehen. Grundlage hierfür war die in der Vergangenheit oft vermutete „individuelle Eignung des Spenders“, die auch in neueren Untersuchungen bestätigt wurde. Vorhergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass schlechte Spendertiere, die bei den ersten zwei Superovulationen weniger als 6 ET-tgl. Embryonen pro Embryoentnahme liefern, auch bei den darauf folgenden ETs meist unterdurchschnittlich reagieren (TROPFMANN, 2000). Es handelt sich dabei um sog. „ET schlecht geeignete Spender“. Dagegen reagieren Spender, die bei den ersten zwei ETs mindestens 6 ET-tgl. Embryonen pro Embryoentnahme liefern, weiterhin gut („ET gut geeignete Spender“). Diese Eignung kann durch klinische, gynäkologische oder sonstige Untersuchungen nach wie vor nicht vorausgesagt werden. Nach TROPFMANN (2000) wäre jedoch die Identifizierung eines „ET gut geeigneten Spenders“ durch mindestens zwei ETs, durchgeführt im Abstand von mindestens 5 Wochen, durchaus möglich. Dadurch können die Spender je nach Behandlungserfolg in verschiedenen Behandlungsgruppen zusammengefasst werden. So war es auch in der vorliegenden Arbeit angedacht gewesen. Als Richtwert für den Behandlungserfolg wurden die im Durchschnitt zu erwartenden 4,0 ET-tgl. Embryonen bei Färsen bzw. 6,0 ET tgl. Embryonen pro Embryoentnahme bei Kühen festgelegt. Hätten die Spender mindestens mit den erwarteten durchschnittlichen Ergebnissen bei den zwei ersten Embryoentnahmen reagiert, wären sie als „ET gut geeignete Dauerspender“ im Programm aufgenommen worden. Alle anderen Spender, mit weniger als der festgelegten Mindestzahl an ET-tgl. Embryonen bei der ersten und zweiten Embryoentnahme („ET schlecht geeignete Spender“) wären in die OPU/IVP-Gruppe als „OPU/IVP Dauerspender“ aufgenommen worden (Abbildung 19).

Das Vorhaben einer kombinierten Anwendung scheiterte jedoch zunächst, weil die Erfolge beim konventionellem ET in der vorliegenden Arbeit besser als erwartet waren. So verblieben nur wenige Spender für die OPU/IVP. Das Schema auf Abbildung 19 stellt jedoch eine denkbare Strategie für die kombinierte Gewinnung (ET) und Erzeugung (OPU/IVP) von Embryonen dar.

Eine weitere Kombinationsmöglichkeit zur Verbesserung der Embryoproduktion auf Station war die Durchführung des OPU zum Zeitpunkt des Einsetzens der PRID-alpha[®]

Vaginalspirale (SO-Schema 6). Die Ergebnisse bei der OPU in der vorliegenden Arbeit waren jedoch unterdurchschnittlich, weil die verwendeten Punktionskanülen sich als ungeeignet erwiesen und die für das an der Station vorhandene Punktionsystem besser geeigneten Punktionskanülen nicht mehr kommerziell verfügbar sind.

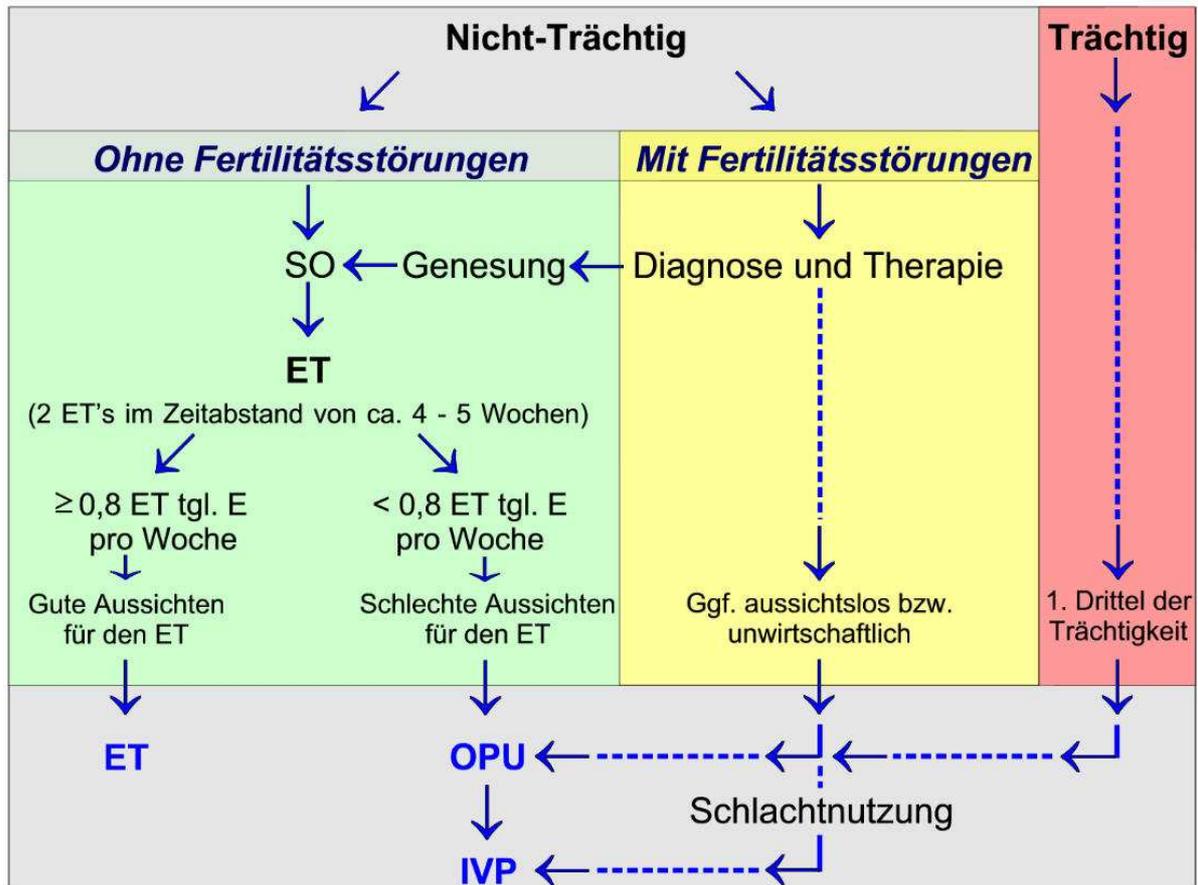


Abb. 19: Konzept zur stationären Embryoproduktion

5.5 Einflüsse verschiedener Faktoren

5.5.1 Individueller Einfluss

Die Tabellen 22-23 zeigen die Ergebnisse bezüglich der Gesamtzahl der durchgeführten Embryoentnahmen und der dabei durchschnittlich pro Behandlung bzw. pro Woche gewonnenen Eizellen/Embryonen für jeden Spender. Die Tabelle 21 zeigt die Signifikanzen des individuellen Einflusses des Spenders auf die Faktoren Gesamtzahl gewonnener Eizellen/Embryonen, unbefruchtete Eizellen, degenerierte Embryonen, ET-tgl. und TG-tgl. Embryonen. Der Einfluss des Spenders war für alle Merkmale statistisch hoch signifikant.

Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren wie GLATZEL et al. (1999) und MAPLETOFT et al. (2002) überein, denen zufolge der Einfluss des Individuums einen erheblichen Einfluss auf das Ergebnis der Superovulationsbehandlung hat.

5.5.2 Parität und Alter der Spendertiere

Die Parität der Tiere wird vom überwiegenden Teil der Autoren als Faktor mit großem Einfluss auf das Ergebnis der Superovulationsbehandlung gesehen, nur wenige konnten keinen Einfluss auf die Qualität der Embryonen feststellen (HASLER et al., 1983; WALTON und STUBBINGS, 1986).

Bei den eigenen Untersuchungen zeigten Färsen im Durchschnitt eine geringere Reaktion auf die Superovulationsbehandlung als Kühe. Durch die signifikant besseren Befruchtungsraten (72,3% vs. 55,5%) wurde jedoch im Durchschnitt eine höhere Anzahl ET- und TG-tgl. Embryonen als bei Kühen (8,0 vs. 7,3 bzw. 5,9 vs. 5,0) gewonnen. Bei Färsen wurden im Durchschnitt weniger Ufos als bei Kühen (4,0 vs. 7,5) gewonnen (siehe Tabelle 14 und 15).

Dies deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen von SCHILLING (1982), LOPES DA COSTA et al. (2001), CHAGAS et al. (2002) und LEROY et al. (2005), die ebenfalls bei Färsen die besseren Resultate erzielten.

Ein Großteil der Untersuchungen ging jedoch in die entgegen gesetzte Richtung, und die Autoren konnten die besseren Ergebnisse bezüglich Quantität und/oder Qualität der gewonnenen Embryonen bei Kühen erzielen (JANOWITZ, 1991; LAUTNER, 1997; MACIAUX et al., 1999; SCHWAB, 2000).

Eine Erklärung hierfür ist das die Tiere nicht vorselektiert wurden, d.h. es wurden keine Tiere aufgrund einer möglichen schlechten Eignung für den ET von den Superovulationsbehandlungen ausgeschlossen. Hierfür würden verschiedene vorberichtlich oder während einer vorangegangenen Untersuchung festgestellte Befunde in Frage kommen. Als Beispiel seien hier mehrere erfolglos durchgeführte Besamungen, rezidivierende Ovarzysten, Geburtskomplikationen oder anatomische Abweichungen von der Norm (z.B. Urovagina) genannt.

Den Einfluss des Alters der Tiere auf das Ergebnis der Superovulationsbehandlung und der Embryonengewinnung zeigt Tabelle 24. Das Alter der Tiere hatte hierbei keinen signifikanten Einfluss auf die durchschnittliche Anzahl der gewonnenen Eizellen/Embryonen. Bei den Tieren im Alter von 1,5-3,0 Jahren wurden jedoch im Durchschnitt weniger Ufos und höhere Befruchtungsraten erzielt. Dies deckt sich mit den Untersuchungen bezüglich des Einflusses

der Parität, da der überwiegende Teil der Gruppe im Alter von 1,5 bis 3 Jahren von Färsen ausgemacht wird. Die Ergebnisse in der Altersgruppe von 13 bis 16 Jahre waren tendenziell schlechter. So wurde im Vergleich zu den anderen Altersgruppen die niedrigste Anzahl an ET-tgl. und Tg-tgl. Embryonen gewonnen und die Befruchtungsrate war ebenfalls die niedrigste. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen der meisten anderen Autoren (SCHILLING, 1982; HASLER et al. 1983; DONALDSON, 1984; GLATZEL et al. 1999), die von einem Abfall der Leistung in den späteren Lebensjahren ausgehen, bedingt durch eine verminderte Antwort auf die Gonadotropinbehandlung bei älteren Tieren (LERNER et al., 1986). DESAULNIERS et al. (1995) zeigten zudem, dass mit zunehmendem Alter häufiger Funktionsstörungen an Ovarien und Uterus auftreten können, die ohne eine Superovulationsbehandlung nicht auffallen würden.

5.5.3 Jahr und Jahreszeit

Ein Einfluss des Jahres konnte bei dieser Arbeit zwar festgestellt werden (Tabelle 24), im Jahr 2007 wurden signifikant mehr Eizellen/Embryonen als 2006 und 2008 gewonnen (17,2 vs. 13,6 bzw. 15,5), die Aussagekraft eines solchen Parameters ist allerdings eingeschränkt. Bei einer Beobachtung der Ergebnisse über einen Zeitraum von mehreren Jahren könnte dieser Parameter allerdings eventuell zu Zwecken der „Selbstkontrolle“ herangezogen werden. Bei einem Abfall der Ergebnisse gilt es dann mögliche betriebsbedingte Ursachen zu untersuchen und, soweit möglich, zu beseitigen. Als Beispiel seien hier Umstellungen bei der Fütterung, dem Personal sowie Mängel beim technischen Equipment genannt.

Das Ausmaß des Einflusses der Jahreszeit und damit in Verbindung stehender Faktoren wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Tageslänge wird von den verschiedenen Autoren kontrovers diskutiert.

Die Tabelle 26 zeigt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Im Frühling (20.03. – 20.06.) wurden 80 Embryoentnahmen durchgeführt, im Sommer (21.06. – 21.09.) 83, im Herbst (22.09. – 20.12.) 61 und im Winter (21.12. – 19.03.) 47.

Obwohl die Tiere während des gesamten Jahres und der gesamten Dauer der Superovulationsbehandlungen in einem Offenstallsystem gehalten wurden, bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Jahreszeiten, weder im Hinblick auf die durchschnittliche Anzahl gewonnener Embryonen, noch in Bezug auf deren Qualität oder die Befruchtungsrate.

Dies deckt sich mit den Aussagen von HASLER et al. (1983), MISRA et al. (1999) und BARATI et al. (2006) die ebenfalls keinen signifikanten Einfluss der Jahreszeit feststellen konnten, bzw. nur geringe Abweichungen (HASLER et al., 1983), widerspricht jedoch den Untersuchungen von ROMAN-PONCE et al. (1978), PUTNEY et al. (1989), BÈNYEI et al. (2003) und MARQUEZ et al. (2005). Eine mögliche Ursache für die Variabilität der Untersuchungen mag darin liegen, dass sie in unterschiedlichen Klimazonen durchgeführt wurden, die sich bezüglich des Ausmaßes der jahreszeitlichen Temperaturschwankungen, der Niederschläge etc. erheblich unterscheiden können.

Außerdem ist zu bedenken, dass mit der Jahreszeit auch immer andere Faktoren in Zusammenhang stehen, die wiederum die Ergebnisse beeinflussen bzw. eventuell auftretende saisonale Effekte überlagern können. Als Beispiel seien hier die Art der Haltung (Wechsel zwischen Weide- und Stallhaltung zum Wechsel der Jahreszeiten) oder variable Qualität des Grundfutters (Heu, Silage) je nach Schnittzeitpunkt genannt.

5.5.4 Besamung

Die Besamung spielt eine nicht zu unterschätzende Rolle bei der Embryonengewinnung, die großen Einfluss auf das Ergebnis der Superovulationsbehandlung nimmt. Ohne ein optimales Besamungsergebnis nützt auch eine sehr gute Reaktion des Spendertieres auf die Behandlung wenig. So konnten HAHN et al. (1980) in Herden mit Non-return-Raten über 50 % einen höheren Anteil an transfertauglichen Embryonen gewinnen, als in Herden mit Non-return-Raten unter 50 %. Hauptursache für mangelnden Besamungserfolg sind Mängel in der Brunsterkennung, Wahl des falschen Besamungszeitpunktes, mangelhafte Besamungstechnik, Mängel in der Fütterung und schlechte Haltungsbedingungen (DE KRUIF et al. 1998). Durch die bei uns durchgeführten brunstunabhängigen Besamungen konnte der Faktor Brunsterkennung eliminiert werden. Die stationäre Haltung und Versorgung der Spendertiere wurden überwacht und konnten somit als limitierende Faktoren für den Besamungserfolg ausgeschlossen werden. Dies ermöglichte die Untersuchung weiterer Faktoren. Die hier untersuchten waren: Art der Besamung (Einzel- oder Mischbesamung), Anzahl der durchgeführten Besamungen, Besamungsbulle und Besamungstechniker.

In Tabelle 28 sind die durchschnittlichen Ergebnisse in Abhängigkeit von der Art der Besamung beim DFV dargestellt. Insgesamt wurden 271 Embryoentnahmen durchgeführt. Bei 228 dieser Embryoentnahmen wurde eine Einzelbesamung durchgeführt, bei 43 Embryoentnahmen erfolgte eine Mischbesamung. Die durchschnittliche Befruchtungsrate

bezogen auf die Gesamtzahl durchgeführter Embryoentnahmen betrug 62,2%. Für die Gruppe in denen Einzelbesamungen durchgeführt wurden lag sie bei 64,3%, für die in denen zwei verschiedene Bullen zum Einsatz kamen bei 51,1%.

Zwischen den Ergebnissen der wiederholten Entnahmen nach Einzel- oder Mischbesamungen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt, tendenziell waren die Ergebnisse bei Einzelbesamungen jedoch besser. Auch HUPKA (2000) konnte keinen signifikanten Einfluss der Anzahl unterschiedlicher Bullen die für die Besamung nach Superovulation eingesetzt wurden feststellen, erzielte jedoch tendenziell bessere Ergebnisse bezüglich der Gesamtzahl gewonnener Embryonen und des Anteils transfertauglicher Embryonen bei Mischbesamungen.

Wichtig bei den Besamungen ist es auch den richtigen Zeitpunkt zu treffen. Vor allem bei starken Ovarreaktionen kann die Länge des Ovulationszeitraumes zunehmen, wodurch einige Ovulationen eventuell nicht zeitgerecht im Verhältnis zum Besamungszeitpunkt stattfinden können (PURWANTARA et al., 1994). Die verwendeten Schemata zur Superovulation unterschieden sich unter anderem auch in der Anzahl der jeweils durchgeführten Besamungen. Bei den Schemata 1, 2, 4, 8 und 9 wurden 3 Besamungen durchgeführt, bei den Schemata 3, 5, 6, 7 und 10 jeweils 2 Besamungen. Zwischen den Befruchtungsergebnissen nach 2 (36/48 h nach der 2. PGF_{2α}-Applikation) oder 3 Besamungen (36/48/60 h nach der 2. PGF_{2α}-Applikation) wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen und Empfehlungen anderer Autoren, die ebenfalls mit zwei Besamungen die besten Ergebnisse erzielten bzw. keine Verbesserungen der Ergebnisse bei einer dreimaligen Besamung gegenüber einer zweimaligen feststellen konnten (HAHN, 1988; BECKER et al., 2000 und WALTON und STUBBINGS, 1986). Versuche mit einer einmaligen Besamung, die von WEST et al. (1984) und LÓPEZ-GATIUS et al. (1988) als ausreichend angesehen wurde, wurden nicht durchgeführt. Zur genaueren Bestimmung des optimalen Besamungszeitpunktes wurden bei 4 Färsen der Rasse DFV die Hormonprofile der Ovarsteroidoide E₂-17β und P₄ sowie des LH im zeitlichen Verlauf nach Auslösung der Superovulation erstellt. Für die Untersuchungen erfolgten Blutentnahmen in Intervallen von 3 Stunden im Zeitraum 11-47 h nach der 2. Applikation von PGF_{2α} (Abbildung 5). 48 h Stunden nach Entnahme der CIDR[®] bzw. 12 h nach der GnRH-Applikation erfolgte die Schlachtung der Tiere und es wurde die Anzahl der an der Oberfläche sichtbaren Follikel ermittelt. Bei 2 Tieren konnte ein LH-Peak 5 Stunden nach der GnRH-Applikation ermittelt werden. Bei den Tieren 3 und 4 konnte kein LH-Peak beobachtet werden. Im Allgemeinen ist die Ovulation 24 h nach dem LH-Peak zu erwarten (HYTTEL et al., 1989). Der LH-Peak erfolgt in der Regel innerhalb von 1-2 h nach

GnRH-Applikation (WOLFENSON et al., 1994). Zum Zeitpunkt der Schlachtung waren bei den untersuchten Tieren noch keine Follikel gesprungen. Hiervon ausgehend kann gesagt werden, dass die von uns durchgeführten Besamungen zeitlich eher zu früh angesetzt waren.

In Tabelle 30 sind die durchschnittlichen Ergebnisse in Abhängigkeit von den eingesetzten Besamungsbullen der Rasse DFV dargestellt. Zwischen den Befruchtungsraten der eingesetzten Besamungsbullen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Dies widerspricht teilweise den Ergebnissen von MANCIAUX et al. (1999 und 2000), HUPKA (2000) und PONSART et al. (2001).

In Tabelle 31 sind die durchschnittlichen Ergebnisse der wiederholten Embryoentnahmen bei Spendern der Rasse DVF in Abhängigkeit von dem Besamungstechniker dargestellt. Besamungstechniker 3 erzielte geringere Befruchtungsergebnisse als die Besamungstechniker 1 und 2 (Befruchtungsrate 35,9% vs. 65,4% bzw. 62,2%). Auch die gleichzeitigen Besamungen durch Techniker 2 und 3 führten zu schlechteren Befruchtungsraten (Befruchtungsrate 49%). Auf Grund der relativ kleinen Anzahl an Besamungen durch Techniker 3 konnten die Ergebnisse statistisch jedoch nicht abgesichert werden. Die Besamungsergebnisse von den Technikern 1 und 2 waren nicht signifikant unterschiedlich. Erklärbar sind diese Unterschiede mit der geringeren Erfahrung die Besamungstechniker 3 im Vergleich zu Besamungstechniker 1 und 2 hatte, die diese Tätigkeit schon mehrere Jahre ausüben.

5.6 Zwischenkultivierung nicht TG-tgl. Embryonen

Ein Teil der zum Zeitpunkt der Embryoentnahme nicht tiefgefriertauglichen Embryonen (Klasse 3) wurden für 18-24 h in vitro kultiviert und erst anschließend tiefgefroren.

Der Zweck dieser Kultivierung war es den Embryonen die Möglichkeit zur „Erholung“ und zur Weiterentwicklung zu geben und somit doch noch eine eventuelle Tiefgefriertauglichkeit zu erreichen.

In Tabelle 34 sind die Ergebnisse der Zwischenkultivierung von Embryonen der Klasse 3 zu tiefgefriertauglichen Embryonen der Klasse 2 dargestellt. Von 99 Embryonen entwickelten sich 93 (94%) in der Kultur weiter. 43 (43%) Embryonen wurden nach der Kultur als tiefgefriertauglich beurteilt. Diese Ergebnisse zeigen dass die Zwischenkultivierung nicht gefriertauglicher Klasse 3 Embryonen eine gute Möglichkeit der Weiterbehandlung dieser Embryonen darstellt, in besonderem Maße falls nicht genügend Empfängertiere bereit stehen auf die die Embryonen in frischem Zustand übertragen werden könnten.

5.7 Übertragung von Embryonen auf Empfängertiere

Ein Teil der nicht tiefgefriertauglichen Embryonen wurde auf Empfängertiere übertragen, soweit diese in ausreichender Zahl zur Verfügung standen. Zur Zyklussynchronisation wurde dazu entweder PGF_{2α} appliziert oder eine Vaginalspange (CIDR[®]) verwendet. Bei beiden Methoden erfolgte die Embryoübertragung am Tag 7 (Abb. 4).

Das angewandte Schema ermöglichte die Anwendung eines Rein/Raus-Verfahrens zur Nutzung der Empfängertiere, was einige Vorteile mit sich brachte. Dadurch dass die Tiere gruppenweise (in der Regel 5 oder 10 Tiere) eingestallt, untersucht und behandelt wurden konnte der Arbeitsaufwand erheblich verringert und die Kosten gesenkt werden. Auch die Einhaltung der veterinärhygienischen Anforderungen, die aufgrund der Tatsache dass ein Großteil der gewonnenen Embryonen für den Export bestimmt war besonders hoch waren, wurde so erleichtert.

Die brunstunabhängige Zyklussynchronisation mittels Vaginalspange führte im Vergleich zur brunstabhängigen Variante mit PGF_{2α} zu höheren Graviditätsraten (75% vs. 56%). Dies ist durch die größere Streuung des Brunsteintrittes bei der Synchronisation mittels PGF_{2α} erklärbar (KASTELIC und GINTHER, 1991; SAVIO et al., 1990a; LANE et al., 2008). Durch die zyklusunabhängigen Synchronisation war es zudem möglich eine größere Anzahl an potentiellen Empfängertieren für den jeweiligen Embryoentnahme- bzw. Übertragungstermin zur Verfügung zu stellen, da auf den aktuellen Zyklusstand keine Rücksicht genommen werden musste. Die Anwendung von PGF_{2α} zur Synchronisation dagegen ist nur möglich wenn ein zyklischer Gelbkörper (mindestens Tag 6) vorhanden ist (LANE et al., 2008). Die besten Übertragungsergebnisse werden erzielt, wenn am Tag der Übertragung zuverlässige Aufzeichnungen zur Brunst vorliegen. Für die endgültige Auswahl der Empfänger war jedoch eine gynäkologische Untersuchung der Empfänger vor der Embryoübertragung unerlässlich.

Bei der Vorbereitung von Empfängertieren auf Station ist zu beachten, dass die Tiere von der Einstallung bis zur Graviditätsuntersuchung in ihrer neuen Umgebung möglichst keinen Stress verursachenden Situationen ausgesetzt werden. Als Empfänger eignen sich am besten zuchtreife und geschlechtsgesunde Färsen, die aus Herden mit guter bis sehr guter Fruchtbarkeitslage stammen. Das im Rahmen der vorliegenden Untersuchung ausgearbeitete Schema zur Vorbereitung und Behandlung der Empfängertiere für den stationären ET (Abbildung 4) sieht eine Eingewöhnungszeit bis zur Übertragung eines Embryos von 6

Wochen vor. Die Grundvoraussetzung für die Erzielung guter Graviditätsergebnisse ist neben dem Zyklussynchronisationsverfahren und der Qualität der Embryonen bei der Übertragung das Wohlbefinden des Empfängers. Zu einer guten Haltung zählt auch eine angemessene Fütterung mit einer ausreichenden Versorgung mit Mineralstoffen, Spurenelementen und Vitaminen. Durch die guten Haltungsbedingungen auf der Station konnten trotz der schlechteren Qualität der frisch übertragenen Embryonen (Klasse 3) gute Graviditätsergebnisse in der vorliegenden Arbeit erzielt werden. Auch jede belastende Situation ist nach der Übertragung der Embryonen bis hin zur Graviditätsuntersuchung zu vermeiden, da sonst die Aufrechterhaltung der Gravidität gefährdet wird.

Empfängertiere die in vorausgegangenen Übertragungsterminen belegt, jedoch nicht gravid geworden sind, können erneut als Empfänger genutzt werden. Allerdings ist eine mehrfach Verwendung als Empfänger nach einer zweiten Embryoübertragung abzuraten. Eine schnellere Identifizierung nicht gravidier Empfänger bieten die Brunstbeobachtung ab 7 Tage und die Progesteronbestimmung im Blut etwa 14 Tage nach der Übertragung (Abbildung 4). Die klinische Graviditätsuntersuchung sollte, um Störungen in der Frühgravidität zu vermeiden frühestens 28 Tage nach der Übertragung mittels Ultrasonographie erfolgen.

5.8 Kostenanalyse

Die Embryoproduktion sollte optimal gestaltet werden, so dass bei möglichst geringem Aufwand und Kosten der höchst mögliche Ertrag erzielt werden kann. Die wiederholte Embryoentnahme auf Station erlaubt eine Rationalisierung und Intensivierung der Embryoerzeugung mit Reduzierung von Produktionskosten. Die Kosten für die stationäre Produktion von tiefgefrorenen Embryonen für den Export oder für die Erhaltung in Genbanken liegen bei 220 € pro Embryo (Tabelle 36). Bei der Kostenberechnung wurde eine Effizienz von im Durchschnitt 7,0 ET-tgl. und davon 5,0 TG-tgl. Embryonen pro Entnahme unterstellt. Im Laufe wiederholter Embryoentnahmen im 5wöchigen Entnahme-Rhythmus und über einem Zeitraum von einem Jahr reduzieren sich die durchschnittlichen Erzeugungskosten eines TG-tgl. Embryos schrittweise um 55-99 €. Darüber hinaus kann jeder im Durchschnitt zusätzlich erzeugter TG-tgl. Embryo in Abhängigkeit der Anzahl wiederholter Embryoentnahmen die Erzeugungskosten eines jeden TG-tgl. Embryos um weitere 18-32 € verringern. Die Kosten für die Produktion eines Embryos für die direkte Übertragung als frischer Embryo auf Empfängertier liegen um 29% unter den Kosten für

einen tiefgefrorenen Embryo. Bei wiederholten Embryoentnahmen über einen längeren Zeitraum reduzieren sich diese Kosten entsprechend (Tabelle 36).

Die Erstellung von Graviditäten aus ET kann am kostengünstigsten erfolgen, wenn die Empfängertiere nicht stationär sondern im Stall des Tierbesitzers untergebracht sind. In diesem Fall behält der Tierhalter alle Rechte und Risiken. Es werden jedoch von der Embryoentnahme-Einrichtung regelmäßig Empfängertiere angekauft und stationär gehalten um diese später als gravide Empfänger an Landwirte anbieten zu können, die selber hierfür über keine oder nur wenige weiblichen Tiere verfügen. Bei diesem System werden alle ET- und Haltungskosten von der Station getragen und müssen später auf das Endprodukt umgesetzt werden. Diese Alternative verursacht zwar höhere Kosten, sie wird von den Tierbesitzern jedoch gut akzeptiert, wenn diese Kosten durch den höheren Wert der produzierten Kälber und später in Form einer höheren Leistung gedeckt werden können.

Bei einer Bereitstellung und Haltung der Empfängertiere auf Station entstehen die niedrigsten Kosten, wenn die Tiere möglichst schnell belegt und gravid werden (Tabelle 37). Die reinen Transferkosten verursachen nur einen geringen Anteil der Gesamtkosten. Als sehr gut geeignet erwies sich hier das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Vorbereitungs- und Behandlungsschema für stationär untergebrachte Empfängertiere (Abbildung 4). Mit diesem Schema wurden Graviditätsergebnisse nach Übertragung von Embryonen der Klasse 3 von 75% erzielt. Die Graviditätsraten mit Embryonen Klasse 3 nach Zyklussynchronisation der Empfänger mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ lagen hingegen bei 57% (Tabelle 34). Durch den Einsatz der Progesteron-freisetzenden Vaginalspiralen konnten die Empfängertiere zyklusunabhängig besser als mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf den Transfertermin vorbereitet werden. Nicht außer acht gelassen werden dürfen hierbei die durch die Synchronisation der Empfänger entstehenden Kosten. Arbeitsaufwand und benötigtes Verbrauchsmaterial sind bei beiden Methoden vergleichbar und relativ gering. Unterschiede zeigen sich allerdings beim für die Synchronisation benötigten Präparat. So kostet eine einzelne Progesteron-freisetzende Vaginalspange etwa das Dreifache einer $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Dosis. Trotzdem wären, bedingt durch die höheren Trächtigkeitsraten, die entstehenden Kosten für die Bereitstellung trächtiger Empfängertiere niedriger als bei einer Synchronisation mittels $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Je höher die Graviditätsrate nach einer ersten Belegung und geringer die Aufenthaltsdauer des Empfängers auf Station, desto niedriger die Kosten für die Produktion von ET-Graviditäten. Mit dem Vorbereitungs- und Behandlungsschema für stationär untergebrachte Empfängertiere erreicht man hohe und gesicherte Erfolgsquoten, die vergleichbar mit denen einer guten Non-Return-Rate bei KB sind (etwa 70%). Der Transfer auf Empfänger nach natürlicher Brunst

wäre eine Alternative mit dem Vorteil, dass keine Kosten für die Zyklussynchronisation anfallen würden. Allerdings ist hierfür eine gute Brunstbeobachtung wichtig, die wiederum mit Personalkosten verbunden ist. Die Nutzung von Empfängern nach natürlicher Brunst könnte jedoch kostengünstiger sein, wenn mehrere Tiere als Empfänger gleichzeitig zur Verfügung stehen.

6. Zusammenfassung

Untersuchungen zur wiederholten Embryoentnahme beim Rind durch Einsatz verschiedener zyklusunabhängiger Superovulationsschemata mit Progesteron-freisetzenden Vaginalspiralen und terminorientierten Besamungen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung von Superovulationsschemata (SO-Schemata) für die wiederholte Embryoentnahme in kurzen Zeitabständen mit Vaginalspiralen und terminorientierten Besamungen. Dabei wurden unter stationären Bedingungen die Einflussfaktoren auf die Ergebnisse der Embryoentnahmen ermittelt.

Innerhalb eines Zeitraums von 27 Monaten wurden bei 64 Spendern verschiedener Rassen insgesamt 324 Embryoentnahmen durchgeführt. Bei 17 Entnahmen (5%) wurden weniger als drei Eizellen/Embryonen (E/E) pro Entnahme und bei 307 (95%) wurden mindestens drei E/E pro Entnahme erzielt. 271 Entnahmen wurden bei Spendern der Rasse Deutsches Fleckvieh (DFV) durchgeführt. 85% (DFV 84%) der wiederholten Entnahmen lieferten ET-taugliche (ET-tgl.) Embryonen. Bei 67% (DFV 70%) aller Entnahmen konnten $\geq 70\%$ ET-tgl. Embryonen der Klassen 1 (sehr gut) oder 2 (gut) gewonnen werden. 72% (DFV 69%) aller Entnahmen lieferten $\geq 70\%$ ET-tgl. Embryonen älterer Stadien (Blastozysten und expandierte Blastozysten). Die durchschnittliche Anzahl an E/E betrug 14,2 pro Entnahme, davon waren 7,1 ET-tgl. und 5,0 tiefgefriertaugliche (TG-tgl.) Embryonen. Die durchschnittliche Befruchtungsrate lag bei 64,8%. Beim DFV wurden im Durchschnitt 15,5 E/E, 6,1 Ufos, 1,8 degenerierte (deg.), 7,5 ET-tgl., 5,3 TG-tgl. Embryonen gewonnen und die Befruchtungsrate lag bei 62,2%. Bei den Pustertaler Sprinzen wurden 9,8 E/E; 1,5 Ufos, 0,7 deg., 7,4 ET-tgl., 5,9 TG-tgl. Embryonen gewonnen und die Befruchtungsrate lag bei 83,4%. Bei den Murnau Werdenfelsern wurden 19,3 E/E, 6,9 Ufos, 2,7 deg., 9,7 ET-tgl., 4,6 TG-tgl. Embryonen gewonnen und die Befruchtungsrate lag bei 62,1%. Bei der Kuh der Rasse Original Braunvieh wurden 7,0 E/E, 0,6 Ufos, 1,7 deg., 4,7 ET-tgl., 0,9 TG-tgl. Embryonen gewonnen und die Befruchtungsrate lag bei 92,7%.

Als mögliche Einflussfaktoren (fixe Effekte) auf das Superovulationsergebnis wurden das Jahr, die Saison, die Parität des Spenders (Färse oder Kuh), der Besamungsbulle, die Art der Besamung (Einzel- oder Mischbesamung), der Besamungstechniker, und das SO-Schema untersucht. Der Einfluss des Spenders als zufälliger Effekt war für alle Merkmale statistisch hoch signifikant. Statistisch signifikant auf die E/E waren das Jahr und das SO-Schema. Die Anzahl der Ufos und die Befruchtungsrate wurden durch die Parität des Spenders beeinflusst.

Bezüglich der deg. Embryonen war nur der Effekt des Spenders signifikant. Die Anzahl der ET-tgl. und TG-tgl. Embryonen wurde durch das Jahr und das SO-Schema beeinflusst. Färsen zeigten im Schnitt eine schlechtere Reaktion auf die SO als Kühe, durch die besseren Befruchtungsraten (72,3% vs. 55,5%) wurden jedoch bei Färsen mehr ET-tgl. und TG-tgl. Embryonen als bei Kühen (8,0 vs. 7,3 bzw. 5,9 vs. 5,0) gewonnen. Das Alter der Spender übte keinen Einfluss auf die E/E aus, jedoch wurden bei den jüngeren Tieren (1,5-3,0 Jahre) weniger Ufos und eine höhere Befruchtungsrate ermittelt. Im Jahr 2007 wurden signifikant mehr E/E als 2006 und 2008 gewonnen (17,2 vs. 13,6 bzw. 15,5). Bezogen auf die Jahreszeit wurden keine Unterschiede in den Ergebnissen festgestellt. Als gut geeignet im Hinblick auf die Anzahl gewonnener ET-tgl. und TG-tgl. Embryonen für wiederholte Superovulationen bzw. Embryoentnahmen erwies sich folgendes SO-Schema: 8 FSH-Injektionen, eine einmalige PGF_{2α}-Injektion, 2 Besamungen, eine GnRH-Applikation 24 h nach Entfernung der Vaginalspirale und 7,5 Tage Zeitabstand zwischen der ersten Besamung und der Embryogewinnung.

Nach Mischbesamung war die Befruchtungsrate mit 51,1% tendenziell schlechter als nach Einzelbesamungen (64,3%). Der Besamungstechniker und der eingesetzte Bulle übten keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse der Embryoentnahme aus.

Die Wiederholbarkeit der Ergebnisse der Embryoentnahmen war hoch. Die Ausbeuten an Embryonen waren zwar sowohl bei Färsen als auch bei Kühen ab der 4. bzw. 5. Entnahme zunächst rückläufig, sie erholten sich jedoch im Laufe weiterer Entnahmen. Die berechneten Wiederholbarkeiten als Faktor für die Gleichheit der Beobachtungswerte an wiederholten Embryoentnahmen bei den gleichen Tieren waren hoch bis sehr hoch (E/E 65,4%, Ufos 62,6%, deg. 82,8%, ET-tgl. 70,9%, TG-tgl. Embryonen 74,7% und Befruchtungsrate 70,5%). Bei der transvaginalen Follikelpunktion im Rahmen der SO-Behandlung wurde bei 19 von 28 (67,9%) Tieren ein dominanter Follikel beobachtet. Im Schnitt wurden 7,3 Follikel punktiert und 2,6 Eizellen gewonnen. Die Zwischenkultivierung von insgesamt 99 Embryonen ergab eine Verbesserung der Qualität bis zur TG-Tauglichkeit bei 43 (43%) Embryonen. Bei der Übertragung von nicht TG-tgl. Embryonen der Klasse 3 wurden bei der zyklusabhängigen Zyklussynchronisation (PGF_{2α}) 56% und bei der zyklusunabhängigen Zyklussynchronisation (CIDR[®]) 75% Graviditäten erzielt. Die Kostenberechnung für die stationäre Embryoerzeugung ergab für die erste Embryoentnahme Kosten von 1.100 € und für jede weitere 550 € unter der Annahme, dass 7,0 ET-tgl. und davon 5,0 TG-tgl. Embryonen in einem 5-Wochen-Rhythmus erzeugt werden. Für die erste Embryoentnahme würden sich die Kosten pro TG-tgl. Embryo auf 220 € belaufen. Werden nun Tiere über einen Zeitraum von einem

Jahr als Dauerspender genutzt, sinken die Erzeugungskosten pro TG-tgl. Embryo schrittweise um 55 € (2. Entnahme) bis 99 € (10. Entnahme). Die reinen Erzeugungskosten einer Gravidität aus ET auf Station belaufen sich für den ersten Transfer mit Gravidität auf 450 €. Wird der gleiche Empfänger erst beim 2. ET gravid entstehen Kosten von 680 €, sind 3 Ets für eine Gravidität erforderlich, belaufen sich die Kosten auf 910 €.

7. Summary

Investigations of the repeated embryo collection in cattle using different superovulation protocols by intravaginal progesterone device and fixed time insemination

The present study aimed to compare different superovulation protocols (SO-protocols) by progesterone-releasing intravaginal devices allowing estrous cycle-independent repeated superovulation in short time intervals and the use of fixed time inseminations. Furthermore, the effects of different factors on the results of repeated embryo collection performed on-station were investigated.

Over a 27-month period a total of 324 embryo collections were performed from 64 donors of different breeds. 17 (5%) embryo collections resulted in less than 3 ova/embryos (O/E) per collection and 307 (95%) collections produced at least three O/E per collection. 271 collections were carried out using German Simmental (DFV) donors. 85% (DFV 84%) of the repeated embryo collections produced transferable embryos (TE) and 67% (DFV 70%) of the collections produced more than 70% TE classified as excellent (1) or good (2) by morphological criteria. 72% (DFV 69%) of the collections resulted in more than 70% of TE in the blastocyst and expanded blastocyst stages. The average number of O/E was 14.2 per collection; of these 7.1 were TE and 5.0 freezable embryos (FE). The average fertilization rate was 64.8%. DFV donors produced on average 15.5 O/E; of these 6.1 were unfertilized ova (UO), 1.8 degenerated embryos (DE), 7.5 TE, 5.3 FE and the fertilization rate (FR) was 64.8%. German Pustertaler Sprinzen donors yielded on average 9.8 O/E; of these 1.5 were UO, 0.7 DE, 7.4 TE, 5.9 FE and the FR was 83.4%. Murnau-Werdenfelser donors yielded 19.3 O/E; of these 6.9 were UO, 2.7 DE, 9.7 TE, 4.6 FE and the FR was 62.1%. The cow of the Original Braunvieh breed had 7.0 O/E; of these 0.6 were UO, 1.7 DE, 4.7 TE, 0.9 FE and the FR was 92.7%.

In this study the fixed effects year, season, donor parity (heifer or cow), AI bull, type of insemination (single bull or two bulls insemination), AI technician and SO-protocol were analyzed. The random effect of the donor was highly significant for all traits. O/E was significantly affected by the collection year and the so-protocol. UO and FR were influenced by the donor parity. DE was significantly influenced by the random effect of the donor. TE and FE were influenced by the collection year and the SO-protocol. Heifers showed on average a lower superovulation response than cows. However, due to a higher FR (72.3% vs. 55.5%) they had on average more TE and FE than cows (8.9 vs. 7.3 and 5.9 vs. 5.0). The age

of the donor had no influence on O/E. However younger animals (1.5-3.0 years old) had less UO and showed a higher FR. Significantly more O/E were obtained in the collection year 2007 than in 2006 and 2008 (17.2 vs. 13.6 and 15.5) but no differences were observed between seasons. Regarding the total number of FE and TE gained through repeated superovulation/embryo collection the following SO-protocol was found to be best suited: 8 injections of FSH, a single application of PGF_{2α}, 2 AIs, one injection of GnRH 24 h after removal of the intravaginal device and 7.5 days interval between the first AI and the embryo recovery.

FR for donors inseminated by different bulls was lower than, but not significantly different from that for single bull inseminations (51.1% vs. 64.3%). The AI technician had no effect on embryo collection results. Repeatabilities of embryo collections were high for heifers and cows; the results declined with the 4th and 5th collection, respectively, but recuperated in subsequent embryo collections. Estimated repeatabilities as a factor for equality of results on repeated embryo collection performed in the same animal were high to very high (O/E 65.4%, UO 62.5%, DE 82.8%, TE 70.9%, FE 74.7% and FR 70.5%). A dominant follicle was observed in 19 of 28 (67.9%) donors that received a transvaginal ultrasound guided ovum pick-up to remove the dominant follicle before starting the superovulatory treatment. From these animals on average 7.3 follicles were aspirated and 2.6 oocytes obtained. The in vitro culture for 24 h of 99 embryos classified at collection by morphological criteria as poor (class 3) resulted in 43 (43%) FE (class 1-2). The transfer of poor embryos (class 3) resulted in a pregnancy rate of 56% by recipients synchronized by a single application of PGF_{2α} and of 75% by recipients synchronized using CIDR[®].

A calculation to estimate the cost of production of embryos using repeated collections was performed. The cost of embryo production on station was 1100 € for the first collection and 550 € for all subsequent collections that produced on average 7.0 TE and 5.0 FE per repeated collection performed on a 5-week time interval basis. For the first embryo collection the cost for each FE was 220 €. The cost of FE declines stepwise by 55 € (2nd collection) up to 99 € (10th collection) if the donors were subjected to repeated embryo collections over a year period. The costs of a pregnancy on station was 450 € after a successful first embryo transfer. If a second or a third embryo transfer was needed to obtain a pregnancy, the costs increased to 680 € and 910 € per recipient, respectively.

8. Literaturverzeichnis

Acosta TJ, Yoshizawa N, Ohtanim M, Miyamoto A (2002)

Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F₂ α injection in the cow.

Biol Reprod. 66: 651-8

Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ (1992)

Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers.

J Reprod Fert. 94: 177-88

Adams GP, Smith CA, Günther OJ (1993)

Selection of dominant follicle and suppression of follicle growth in heifers.

Anim Reprod Sci. 30: 259-71

Adams GP, Bo GA, Marinez M, Caccia M, Tribulo H, Pierson RA, Mapletoft RJ (1994)

Superovulatory response of ovarian follicles of wave 1 versus wave 2 in heifers.

Theriogenology. 42: 1103-13

Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P (2008)

Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle.

Theriogenology. 69 (1): 72-80

Alvarez RH, da Silva MV, de Carvalho JB, Binelli M (2005)

Effects of inbreeding on ovarian responses and embryo production from superovulated Mantiqueira breed cows.

Theriogenology. 64: 1669-76

Ambrose DJ, Emmanuel DG, Colazo MG, Kastelic JP (2008)

Pregnancy rates to timed artificial insemination in Holstein heifers given prostaglandin F₂ α twenty-four hours before or concurrent with removal of an intravaginal progesterone-releasing insert.

J Dairy Sci. 91(7): 2678-83

Andrade JC, Oliveira MA, Lima PF, Guido SI, Bartolomeu CC, Tenório Filho F, Pina VF, Iunes-Souza TC, Paula NR, Freitas JC (2003)

The use of steroid hormones in superovulation of Nelore donors at different stages of estrous cycle.

Anim Reprod Sci. 77: 117-25

Aurich JE (2002)

Endokrinpharmakologie.

In: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin (HH Frey & W. Löscher, eds), Enke Verlag, Stuttgart, 2. Edition: pp 280-317

Ax RL, Armbrust S, Tappan R, Gilbert G, Oyarzo JN, Bellin ME, Selner D, McCauley TC (2005)

Superovulation and embryo recovery from peripubertal Holstein heifers.
Anim Reprod Sci. 85: 71-80

Bader JF, Kojima FN, Wehrman ME, Lindsey BR, Kerley MS, Patterson DJ (2005)

Effects of prepartum lipid supplementation on FSH superstimulation and transferable embryo recovery in multiparous beef cows.
Anim Reprod Sci. 85: 61-70

Baracaldo MI, Martinez MF, Adams GP, Mapletoft RJ (2000)

Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle.
Theriogenology. 53(6):1239-50

Barati F, Niasari-Naslaji A, Bolourchi M, Sarhaddi F, Razavi K, Naghzali E, Thatcher WW (2006)

Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer.
Theriogenology. 66: 1149-55

Baruselli PS, de Sá Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MF, Barros CM, Bó GA (2006)

Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle.
Theriogenology. 65(1):77-88

Bastidas P, Randel RD (1987)

Effects of repeated superovulation and flushing on reproductive performance of *bos indicus* cows.
Theriogenology. 28: 827-35

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 12: 6-9

Bényei B, Gáspárdy A, Cseh S (2003)

Effect of the El Nino phenomenon on the ovarian responsiveness and embryo production of donor cows.
Acta Vet Hung. 51: 209-18

Bényei B, Gáspárdy A, Komlósi I, Pécsi A (2004)

Repeatability and heritability of ovulation number and embryos in dam-daughters pairs in superovulated Holstein-Friesian cows.
Reprod Domest Anim. 39(2):99-102

Berg U, Brem G (1989)

In vitro production of bovine blastocysts by in vitro maturation and fertilization of oocytes and subsequent in vitro culture.
Zuchthyg. 24: 134-9.

Bergfelt DR, Kastelic JP, Ginther OJ (1991)

Continued periodic emergence of follicular waves in nonbred progesterone-treated heifers.
Anim Reprod Sci. 24: 193-204

Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP (1994)

Ovarian dynamic following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers.
Theriogenology. 42: 895-907

Bergfelt DR, Bo GA, Mapletoft RJ, Adams GP (1997)

Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle.
Anim Reprod Sci. 49(1):1-12

Bicalho RC, Cheong SH, Warnick LD, Guard CL (2007)

Evaluation of progesterone supplementation in a prostaglandin F2alpha-based presynchronization protocol before timed insemination.
J Dairy Sci. 90(3): 1193-200

Bó 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(2):225-39.

Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R, Tríbulo H, Mapletoft RJ (2002)

The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle.
Theriogenology. 57(1): 53-72.

Bó GA, Baruselli PS, Chesta PM, Martins CM (2006)

The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle.
Theriogenology. 65(1):89-101.

Bó GA, Guerrero DC, Adams GP (2008)

Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation.
Theriogenology. 69(1): 81-87.

Bodensteiner KJ, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ (1996)

Synchronization of emergence of follicular waves in cattle.
Theriogenology. 45(6):1115-28

Bowen RA, Elsdon RP, Seidel GE (1978)

Embryo transfer for cows with reproductive problems.
J Am Vet Med Assoc. 172: 1303-7

Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA (1982)

Normal development following in vitro fertilization in the cow.
Biol Reprod. 27(1):147-58

Brem G (1997)

Reproduktionsbiotechnik.

In: Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre für Tiermediziner

Hrsg. Kräußlich H, Brem G, Enke Verlag, Stuttgart, pp. 110-44

Brem G (1999)

Embryotransfer und assoziierte Biotechniken.

In: Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind, E. Grunert und M. Berchthold

Paul Parey Verlag, Berlin

Britt JS, Gaska J (1988)

Comparison of two estrus synchronization programs in a large, confinement-housed dairy herd.

J Am Vet Med Assoc. 212(2): 210-2

Broadbent PJ, Stewart M, Dolman DF (1991)

Recipient management and embryo transfer.

Theriogenology. 35: 125-39

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.

J Reprod Fert. 101(3): 583-91

Burke JM, Sal Sota RL, de la Risco CA, Staples CR, Schmitt EJ, Thatcher WW (1996)

Evaluation of timed insemination using a gonadotropin-releasing hormone agonist in lactating dairy cows.

J Dairy Sci. 79(8): 1385-93

Burke CR, Boland MP, Macmillan KL (1999)

Ovarian responses to progesterone and oestradiol benzoate administered intravaginally during dioestrus in cattle.

Anim Reprod Sci. 55(1): 23-33

Busse T (1995)

Untersuchungen über die Auswirkungen verschiedener Einflüsse auf die Spülergebnisse superovulierter Kühe beim Embryotransfer.

Vet. Med. Diss., FU Berlin

Cahill LP, Mauléon P (1980)

The population of primordial and small follicles in the sheep.

J Reprod Fert. 61: 201-6

Casida LE, Meyer RK, McShan WH, Wisnicky W (1943)

Effects of pituitary gonadotropins on the ovaries and the induction of superfecundity in cattle.

Am J Vet Res. 4: 76

Chagas e Silva, J., L. Lopes da Costa und R. Silva (2002)

Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers.

Anim Reprod Sci. 69: 1-8

Chorfi Y, Lanevski A, Dupras R, Girard V, Tremblay A (2007)

Serum biochemical parameters and embryo production during superovulatory treatment in dairy cattle.

Res Vet Sci. 83: 318-21

Christie WB, Newcomb R, Rowson LEA (1979)

Ovulation rate and egg recovery in cattle treated repeatedly with pregnant mare serum gonadotrophin and prostaglandin.

Vet Rec. 104: 281-3

Christie WB, Newcomb R, Rowson LEA (1980)

Non-Surgical transfer of bovine eggs: Investigation of some factors affecting embryo survival.

Vet Rec. 106: 190-3

Colazo MG, Kastelic JP, Small JA, Wilde RE, Ward DR, Mapletoft RJ (2007)

Pregnancy rates to timed-AI in dairy cows treated with pLH or GnRH.

J Dairy Sci. 90:328

DeJarnette JM, Marshall CE (2003)

Effects of pre-synchronization using combinations PGF(2alpha) and (or) GnRH on pregnancy rates of Ovsynch- and Cosynch-treated lactating Holstein cows.

Anim Reprod Sci. 77(1-2): 51-60

Diaz T, Pancarci SM, Drost M, Schmitt EJ, Ambrose JD, Fredriksson WE, Thatcher WW (2001)

Effects of the persistent dominant follicle on the ability of follicle stimulating hormone to induce follicle development and ovulatory responses.

J Dairy Sci. 84(1):88-99

Dielemann SJ, Bevers MM, Vos PLAM, de Loos FAM (1993)

PMSG/anti-PMSG in cattle: A simple and efficient superovulatory treatment.

Theriogenology. 39: 25-42

Dobson H, Smith RF (2000)

What is stress, and how does it affect reproduction.

Anim Reprod Sci. 60: 743-52.

Dobson H, Tebble JE, Smith RF, Ward ER (2001)

Is stress really all that important?

Theriogenology. 55: 65-73

Donaldson LE, Perry B (1983)

Embryo production by repeated superovulation of commercial donor cows.

Theriogenology. 20: 163-8

Donaldson LE (1984)

Dose of FSH-P as a source of variation in embryo production from superovulated cows.

Theriogenology. 22: 205

Dorn CG, Baker JF, Lunt DK, Kraemer DC (1991)

Repeated, short interval superovulation in virgin heifers.
Theriogenology. 35: 302

Downing JA , Scaramuzzi RJ (1997)

The effect of the infusion of insulin during the luteal phase of the oestrus cycle on the ovulation rate and on plasma concentrations of LH, FSH and glucose in ewes.
Theriogenology. 47: 747-59

Driancourt MA (1991)

Follicular dynamics in sheep and cattle.
Theriogenology. 35: 55-79

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: 291-9.

El-Zarkouny SZ, Cartmill JA, Hensley BA, Stevenson JS (2004)

Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimens with or without presynchronization and progesterone.
J Dairy Sci. 87: 1024-37

Evans ACO, Adams GP, Rawlings NC (1994)

Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers.
J Reprod Fert.100: 187-94

Eyestone WH, Vignieri J, First NL (1987)

Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium.
Theriogenology. 27: 228

Findlay JK, Sai X, Shaukviski L (1990)

Role of inhibin related peptides as intragonadal regulators.
Reprod Fertil Dev. 2: 205-18

Folman Y, Kaim M, Herz Z, Rosenberg M (1990)

Comparison of methods for the synchronisation of estrous cycles in dairy cows. 2. Effects of progesterone and parity on conception.
J Dairy Sci. 73: 2817-25

Frare J, Fazzano C, Leffers R (1997)

Maximum use of donors by collecting bovine embryos in intervals of 35 days in an embryo transfer program.
Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre, 25 (1): 230-1

Fricke PM, Guenther JN, Wiltbank MC (1998)

Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows.
Theriogenology. 50(8): 1275-84

Fukui Y, Ono H (1988)

In vitro development to blastocyst of in vitro matured and fertilized bovine oocytes.
Vet Rec. 122: 282

Ginther OJ, Knopf L, Kaestlic JP (1989a)

Temporal associations among ovarian events in cattle during the oestrous cycles with two and three follicular waves.
J Reprod Fert. 87: 223-30

Ginther OJ, Kaestlic JP, Knopf L (1989b)

Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle.
Anim Reprod Sci. 20: 187-200

Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Martin S, Wiltbank MC (1996a)

Relationship between FSH and follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle.
J Reprod Fert. 108: 271-9

Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K (1996b)

Selection of the dominant follicle in cattle.
Biol Reprod. 55: 1187-94

Glatzel PS, Schallenberger E (1990)

Klinische und endokrinologische Untersuchung zur Ovarfunktion von Rindern mit Fruchtbarkeitssörungen.
Berl Münch Tiertärtzl Wschr. 103: 202-6

Glatzel PS, Busse T und A. Görlach (1999)

Superovulation und Embryonenausbeute in Embryotransferprogrammen bei Milchrindern.
Tierärztliche Praxis. 27: 219-22

Gong JG, Armstrong DG, Baxter G, Hogg CO, Garnsworthy PC, Webb R (2002)

The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers.
Theriogenology. 57: 1591-1602

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(4):767-78

Goulding D, Williams DH, Roche JF, Boland MP (1996)

Factors affecting superovulation in heifers treated with PMSG.
Theriogenology. 45(4):765-73

Grandke R, Herrmann M, Beuing R, Wassmuth R, Gehing W (1990)

Der Einfluss von ausgewählten Leistungsparametern auf das Spülergebnis von MOET.
Dtsch Tiertärtzl Wschr. 97(9): 346-8

Grasso F, Guilbault LA, Roy GL, Lussier JG (1989)

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

Gray BW, Cartee RE, Stringfellow DA, Ridell MG, Ridell KP, Wright JC (1992)

The effects of FSH-priming and dominant follicular regression on the superovulatory response of cattle.

Theriogenology. 37: 631-9

Greve T (1976)

Egg transfer in the bovine: Effect of injecting PMSG on different days.

Theriogenology. 5: 5-19

Greve T, Madison V, Avery B, Callesen H, Hyttel P (1993)

In vitro production of bovine embryos: A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations.

Anim Reprod Sci. 33: 51-69

Grunert E, Berchtold M (1995)

Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind.

Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin; 522 pp

Guilbault LA, Grasso F, Lussier JG, Rouillier P, Matton P (1991)

Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle.

J Reprod Fert. 91: 81-9

Gutierrez CG, Oldham J, Bramley TA, Gong JG, Campbell BK, Webb R (1997)

The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers.

J Anim Sci. 75: 1876-84

Gwazdauskas FSW. (1972)

Adrenocorticotropin alteration of bovine peripheral plasma concentration of cortisol, corticosterone and progesterone

J Anim Sci. 55: 1165-69

Hahn J, Michaelis U, 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: 174-84

Hanselmann D (1995)

Woran es hakt, wenn die Ergebnisse nicht stimmen. Was beeinflusst den Erfolg bei der Superovulation?

Der Tierzüchter 47: 28-9

Hasler JF, McCauley AD, Schermerhorn EC, Foote RH (1983)

Superovulatory responses of Holstein cows.
Theriogenology. 19: 83-9

Hawk HW, Conley HH, Wall RJ, Whitaker RO (1988)

Fertilization rates in superovulating cows after deposition of semen on the infundibulum, near the uterine junction or after insemination with high numbers of sperm.
Theriogenology. 29: 1131-42

Hofmann J (2005)

Die Bedeutung verschiedener extrinsischer Faktoren für die Embryonengewinnung beim Rind.
Vet. Med. Diss., München

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: 457-63

Humblot P, Negrao S, Nibart M (1998)

Effects of high energy supply and metabolic status on superovulatory response and embryo production in dairy heifers.
Theriogenology. 49: 378

Hupka S (2000)

Erfolgsbeeinflussende Faktoren im Rahmen der Embryonengewinnung beim kommerziellen ET des Rindes unter besonderer Berücksichtigung verschiedener Superovulationsschemata und Besamungstypen.
Vet. Med. Diss., Hannover

Hyttel P, Greve T, Callesen H (1989)

Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle.
J Reprod Fert. 38: 35-47

Ideta A, Hayama K, Urakawa M, Jung YG, Lim KT, Lee WY, Song HB, Aoyagi Y (2007)

Relationships among estrous behavior, superovulatory response and grade 1 embryo sex ratio in superovulated Holstein heifers.
J Reprod Dev. 53: 1015-21

Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Smith GW, Lonergan P, Evans AC (2007)

Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle.
Hum Reprod. 22: 1687-95

Iwakuma A, Narahashi T, Kitahara G, Ohkubo M, Kamimura S (2008)

Efficacy of intravaginal progesterone administration as an additional treatment on two types of timed AI protocols in a commercial herd of Holstein heifers.
J Vet Med Sci. 70(3): 243-9

Jaiswal RS, Singh J, Adams GP (2004)

Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary.
Biol Reprod. 71 (4): 1244-51

Janowitz U (1991)

ET beim Jungrind: Chancen und Risiken.
Der Tierzüchter 43: 4-15

Jolly PD, McDougall S, Fitzpatrick LA, Macmillan KL, Entwistle K (1995)

Physiological effects of under nutrition on postpartum anoestrus in cows.
J Reprod Fert. 49: 477-92

Kadokawa H, Tameoka N, Uchiza M, Kimura Y, Yonai M (2008)

A field study on the relationship between body condition and embryo production in superovulated Holstein yearling heifers.
J Dairy Sci. 91: 1087-91

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 MD, 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 superovulatory response of cattle.
Anim Reprod Sci. 48: 137-57

Kane MT, Morgan PM, Coonan C (1997)

Peptide growth factors and preimplantation development.
Hum Reprod Update. 3: 137-57

Kastelic JP, Ginther OJ (1991)

Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis.
Anim Reprod Sci. 26: 13-24

Kawate N, Itami T, Choushi T, Saitoh T, Wada T, Matsuoka K, Uenaka K, Tanaka N, Yamanaka A, Sakase M, Tamada H, Inaba T, Sawada T (2004)

Improved conception in timed-artificial insemination using a progesterone-releasing intravaginal device and Ovsynch protocol in postpartum suckled Japanese Black beef cows.
Theriogenology. 61(2-3): 399-406

Kim IH, Son DS, Yeon SH, Choi SH, 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. 1;55(4):937-45

Kim IH, Suh GH, Son DS (2003)

A progesterone-based timed AI protocol more effectively prevents premature estrus and incomplete luteal regression than an Ovsynch protocol in lactating Holstein cows. *Theriogenology*. 60: 809-17

King WA, Seidel JG, Elsdon RP (1985)

Bovine embryo transfer pregnancies. *J Anim Sci*. 61: 747-57

King WA, Supplizi AV, Diop H, Bousquet D (1995)

Chromosomal analysis of embryos produced by artificially inseminated cattle. *Gen Sel Evolution* 65: 189-94

König S, Bosselmann F, von Borstel UU, Simianer H (2007)

Genetic analysis of traits affecting the success of embryo transfer in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 90(8):3945-54

Kroker R (1997)

Hormone und hormonell wirksame Pharmaka.
In: *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren* (W Löscher, FR Ungemach & R Kroker, eds), Parey, Berlin; pp 308-318

Kweon OK, Kanagawa H, Takahashi Y, Yamashina H, Seiko N, Ivezumi Y, Aoyagi Y, Ono H (1986)

Factors affecting superovulatory response in cattle. *Jpn J Vet Sci*. 48: 495-503

Lamb GC, Brown DR, Larson JE, Dahlen CR, Dilorenzo N, Arthington JD, Dicostanzo A (2008)

Effect of organic or inorganic trace mineral supplementation on follicular response, ovulation and embryo production in superovulated Angus heifers. *Anim Reprod Sci*. 106: 221-3

Lamberson WR, Lambeth VA (1986)

Repeatability of response to superovulation in Brangus cows. *Theriogenology*. 26: 643-9

Lane EA, Austin EJ, Roche JF, Crowe MA (2001a)

The effect of estradiol benzoate on synchrony of estrus and fertility in cattle after removal of a progesterone-releasing intravaginal device. *Theriogenology*. 55(9): 1807-18

Lane EA, Austin EJ, Roche JF, Crowe MA (2001b)

The effect of estradiol benzoate or a synthetic gonadotropin-releasing hormone used at the start of a progesterone treatment on estrous response in cattle. *Theriogenology*. 56(1): 79-90

Lane EA, Austin EJ, Crowe MA (2008)

Oestrous synchronisation in cattle - current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: A review. *Anim Reprod Sci*. 109(1-4):1-16

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.
J Anim Sci. 63(1):176-83

Leroy JL, Opsomer G, De Vliegher S, Vanholder T, Goossens L, Geldhof A, Bols PE, de Kruif A, Van Soom A (2005)

Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows.
Theriogenology. 64: 2022-36

Lima WM, Vieira AD, Thaller Neto A, Mezzalira A, Matos RC, Gregory RM (2007)

Improved superovulatory response in beef cattle following ovarian follicular ablation using a simplified transvaginal device.
Anim Reprod Sci. 100(3-4):364-70

Lindner GM, Wright RW (1983)

Bovine embryo morphology and evaluation.
Theriogenology. 20: 407-16

Lopes da Costa L, Chages e Silva J, Silva R (2001)

Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotropins in cattle.
Theriogenology. 6: 65-77

Lòpez-Gatius F, Camòn-Urgel J, Angula A, Asensio E (1988)

Effects of single deep insemination on transferable embryo recovery rates in superovulated dairy cows.
Theriogenology. 30: 877

Lubbadeh WF, Graves CN, Spahr, SL (1980)

Effect of repeated superovulation on ovulatory response of dairy cows.
J Anim Sci. 50: 124-7

Lunaas T (1970)

Urinary oestrogens in ovariectomized cows after administration of ACTH.
Acta Vet Scand. 11: 329-30

Malhi PS, Adams GP, Singh J (2005)

Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal and endocrine characteristics.
Biol Reprod. 73 (1): 45-53

Malhi PS, Adams GP, Pierson RA, Singh J (2006)

Bovine model of reproductive aging: response to ovarian synchronisation and superstimulation.
Theriogenology. 66 (5): 1257-66

Malhi PS, Adams GP, Mapletoft RJ, Singh J (2007)

Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging.
Reproduction 134(2): 233-239

Malhi PS, Adams GP, Mapletoft RJ, Singh J (2008)

Superovulatory response in a bovine model of reproductive aging.
Anim Reprod Sci. 109: 100-109

Manciaux L, Ponsart C, Grisouard D, Humblot P (2000)

Sources of Variation in Embryo production following superovulation in the Montbeliarde Breed.
Theriogenology. 53: 502

Manns JG, Hafs HD (1976)

Controlled breeding in cattle - A review.
Can J Anim Sci. 56: 121-31

Mapletoft RJ, Bó G, Adams GP (2000)

Avanços na manipulação do ciclo estral de doadoras e receptoras nos programas de transferência de embriões em bovinos.
Arq. Fac. Vet. UFRGS, 28 (1): 24-51

Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP (2002)

Recent advances in the superovulation in cattle.
Reprod Nutr Dev. 42(6): 601-11

Marquez YC, Galina CS, Moreno N, Ruiz H, Ruiz A, Merchant H (2005)

Seasonal effect on zebu embryo quality as determined by their degree of apoptosis and resistance to cryopreservation.
Reprod Domest Anim. 40: 553-58

Martínez MF, Kastelic JP, Adams GP, Cook B, Olson WO, Mapletoft RJ (2002)

The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle.
Theriogenology. 57(3):1049-59

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

Mc Gaugh JW, Olds D, Kratzer DD (1974)

Ovum recovery in superovulated cows and cleavage rates in the fertilized ova.
Theriogenology. 1: 213-7

Medina MJ, Basualdo M, Ferrè LB, Brogliatti GM (2001)

Embryo recipient estrous synchronisation in a commercial bovine embryo transfer program.
Theriogenology. 55: 3653

Meng Chao L, Sato S, Yoshida K, Kawano Y, Kojima T, Kubota C. (2008)

Comparison of oestrous intensity between natural oestrus and oestrus induced with Ovsynch based treatments in Japanese Black cows.
Reprod Domest Anim. 2008 [Epub ahead of print]

Mikkola M, Mäntysaari P, Tammiranta N, Peippo J, Taponen J (2005)

Effect of dietary protein on embryo recovery rate and quality in superovulated heifers. *Anim Reprod Sci.* 87: 193-202

Milvae RA (2000)

Inter-relationships between endothelin and prostaglandin F₂alpha in corpus luteum function. *Rev Reprod.* 5: 1-5

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

Miyamoto A, Shirasuna K, Wijayagunawardane MP, Watanabe S, Hayashim M, Yamamoto D, Matsui M, Acosta TJ (2005)

Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Domest Anim Endocrinol.* 29, 329-39

Möhrle E (1999)

Untersuchungen zur Auswahl geeigneter Spenderkühe für den Embryotransfer im Rahmen der Fruchtbarkeitsbetreuung auf Herdenbasis
Vet. Med. Diss., München

Monniaux D, Chupin D, Saumande J (1983)

Superovulatory response of cattle. *Theriogenology.* 19: 55-64.

Moore NW (1975)

The control of time of oestrus and ovulation and the induction of superovulation in cattle. *Austr Agric Res.* 26: 295-304

Müller C (1988)

Untersuchungen zur Feststellung der Eignung von Spenderkühen für den Embryotransfer. *Vet. Med. Diss., Hannover*

Munro RK (1987)

Concentration of plasma progesterone in cows after treatment with 3 types of progesterone pessaries. *Aust Vet J.* 64: 385-6

Murphy BD, Martinuk SD (1991)

Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Rev.* 12(1): 27-44

Nasser L, Adams GP, Bó GA, Mapletoft RJ (1993)

Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology.* 40: 713-24

Navanukraw C, Redmer DA, Reynolds LP, Kirsch JD, Grazul-Bilska AT, Fricke PM (2004)

A modified presynchronisation protocol improves fertility to timed artificial insemination in lactating dairy cows.

J Dairy Sci. 87(5): 1551-7

Neufeld G, Ferrara N, Schweigere L, Mitchell L, Gospodarowics D (1987)

Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor.

Endocrinology. 121: 597-603

Newcomb R (1980)

Investigation of factors of superovulation an non-surgical embryo recovery from lactating british Fresian cows.

Vet Rec. 106: 48-52

Nibart M, Marquant le Guienne, Humblot P, Guerin B (1997)

The application of new reproductive technologies in France.

Arquivos da Faculdade de Veterinària, UFRGS Porto Alegre 25: 21-35

Niemann H, Meinecke B (1993)

Embryotransfer und assoziierte Biotechniken bei landwirtschaftlichen Nutztieren.

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y (2002)

Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos.

Theriogenology. 58(8):1597-606

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 Ovarpunktionskanüle.

Dtsch Tierärztl Wochenschr. 103: 302-5

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: 1263-74

O'Callaghan D, Boland MP (1999)

Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants.

Anim Sci. 68: 299-314

Odde KG (1990)

A review of synchronisation of estrus in postpartum cattle.

J Anim Sci. 68: 817-30

Oikawa T, Numabe T, Kikuchi T, Watanabe G, Taya K (1998)

Repeated induction program of superovulation in cattle throughout one-year using progesterone device and porcine FSH.
Theriogenology. 49 (1): 382

Oliver JE, Aitman TJ, Powell JF, Wilson CA, Clayton RN (1989)

Insulin-like growth factor I gene expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of the developing follicles.
Endocrinology. 124: 2671-9

Olynk NJ, Wolf CA (2009)

Stochastic economic analysis of dairy cattle artificial insemination reproductive management programs.
J Dairy Sci. 92(3):1290-9

Onuma H, Hahn J, Foote RH (1970)

Factors affecting superovulation, fertilization and recovery of superovulated ova in prepuberal cattle.
J Reprod Fert. 21: 119-26

Otoi T, Koyama K, Yamamoto TY, Tachikawa S (1999)

Superovulatory response in beef cows following removal of the largest ovarian follicle.
Vet Rec. 142 (15): 402-3

Pancarci SM, Jordan ER, Risco CA, Schouten MJ, Lopes FL, Moreira F, Thatcher WW (2002)

Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle.
J Dairy Sci. 85(1):122-31

Peixoto MG, Pereira CS, Bergmann JA, Penna VM, Fonseca CG (2004)

Genetic parameters of multiple ovulation traits in Nellore females.
Theriogenology. 62(8):1459-64

Petit HV, Cavalieri FB, Santos GTD, Morgan J, Sharpe P (2008)

Quality of embryos produced from dairy cows fed whole flaxseed and the success of embryo transfer.
J Dairy Sci. 91: 1786-90

Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, Willemse AH, Taverne MAM (1990)

Characteristics of bovine estrous cycles during repeated transvaginal ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up.
Theriogenology. 35(2): 401-13

Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, Wurtt YA, Beneden ThH, Willemse AH, Taverne MAM (1991)

Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes.
Theriogenology. 35 (1): 19-24

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

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

Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC (1995)

Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ α and GnRH.

Theriogenology. 44: 915-23

Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS, Ottobre JS, Garverick HA, Anderson LL (1997)

Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus.

J Dairy Sci. 80(2): 295-300.

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: 765-78

Quirk SM, Hickey GJ, Fortune JE (1986)

Growth and regression of ovarian follicles during the follicular phase of the oestrous cycle in heifers undergoing spontaneous and PGF-2 alpha-induced luteolysis.

J Reprod Fert. 77(1): 211-19

Rabiee AR, Lean IJ, Gooden JM, Miller BJ, Scaramuzzi RJ (1997)

An evaluation of transovarian uptake of metabolites using arterio-venous difference methods in dairy cattle.

Anim Reprod Sci.48: 9-25

Rabiee AR, Lean IJ, Stevenson MA (2005)

Efficacy of Ovsynch program on reproductive performance in dairy cattle: a metaanalysis.

J Dairy Sci. 88(8): 2754-70

Rajamahendran R, Taylor C (1990)

Characterization of ovarian activity in postpartum dairy cows using ultrasound imaging and progesterone profiles.

Anim Reprod Sci. 22: 171-80

Rathbone MJ, Macmillan KL, Inskeep K, Burggraaf S, Bunt CR (1998)

Fertility regulation in cattle.

J Control Release. 54(2):117-48

Rathbone MJ, Kinder JE, Fike K, Kojima F, Clopton D, Ogle CR, Bunt CR (2001)

Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle.

Adv Drug Deliv Rev. 50(3): 277-320

Rayan DP, Spoon RA, Griffith MK, Williams GL (1994)

Ovarian follicular recruitment, granulosa cell steroidogenic potential and growth hormone / insulin-like growth factor-I relationship in suckler beef cows consuming high lipid diets: effect of graded differences in body condition maintained during the puerperium.

Domest Anim Endocrinol. 11: 161-74

Reinhard H-J, Rohn K (1992)

Die Anwendung Follikel-stimulierender Hormone (FSH-P) zur Auslösung der Superovulation beim Rind.

Dtsch Tierärztl Wochenschr. 99: 95-9

Rico C, Fabre S, Médigue C, di Clemente N, Clément F, Bontoux M, Touzè JL, Dupont M, Briant E, Remy B, Beckers JF, Monniaux D (2008)

Anti-Mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow.

Biol Reprod. 80 (1): 50-9

Rivera RM, Hansen PJ (2001)

Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range.

Reproduction 121: 107-15

Robertson I, Nelson RE (1991)

Certification and identification of the embryo.

IETS Manual, 3rd edition, Kap. 9

Roche JF (1978)

Control of oestrus in cattle using progesterone coils.

Anim Reprod Sci. 1: 145-54

Roche JF, Austin EJ, Ryan M, O'Rourke M, Mihm M, Diskin MG (1999)

Regulation of follicle waves to maximize fertility in cattle.

J Reprod Fert. 54:61-71

Roman-Ponce H, Thatcher WW, Canton D, Barron DH, Wilcox CJ (1978)

Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows.

J Anim Sci. 46: 175-80

Rüsse I, Sinowatz F (1991)

Lehrbuch der Embryologie der Haustiere

Verlag Paul Parey, Berlin

Ryan DP, Snijders S, Yaakub H, O'Farrell KJ (1995)

An evaluation of estrus synchronization programs in reproductive management of dairy herds.

J Anim Sci. 73(12): 3687-95

Ryan M, Mihm M, Roche JF (1998)

Effect of GnRH given before or after dominance on gonadotrophin response and the fate of that follicle wave in postpartum dairy cows.

J Reprod Fert. 21: 28

Sacher B, Niemann H, Schilling E, Schmidt D (1987)

Auswirkungen wiederholter Superovulation auf Embryonengewinnung und Fruchtbarkeit. Rinderproduktion 83: 10

Sakase M, Seo Y, Fukushima M, Noda M, Takeda K, Ueno S, Inaba T, Tamada H, Sawada T, Kawate N (2005)

Effect of CIDR-based protocols for timed-AI on the conception rate and ovarian functions of Japanese Black beef cows in the early postpartum period.

Theriogenology. 64(5):1197-211

Sales JN, Dias LM, Viveiros AT, Pereira MN, Souza JC (2008)

Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with beta-carotene and tocopherol.

Anim Reprod Sci. 106: 77-89

Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF (1988)

Patterns of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers.

J Reprod Fert. 83: 663-71

Savio JD, Boland MP, Roche JF (1990a)

Development of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers.

J Reprod Fert. 88: 581-91

Savio JD, Boland MP, Roche JF (1990b)

Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows.

J Reprod Fert. 88: 569-79

Savio JD, Thatcher WW, Badinga L, de la Sota RL, Wolfenson D (1993a)

Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle of cows.

J Reprod Fert. 97: 197-203

Savio JD, Thatcher WW, Moris GR, Entwistle K, Drost M, Mattiacci MR (1993b)

Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle.

J Reprod Fert. 98: 77-84

Savio JD, Boland MP, Hynes N, Mattiacci MR, Roche JF (1990c)

Will the dominant follicle of the estrous cycle of the heifers ovulate following luteolysis on day 7?

Theriogenology. 33:677-8

Schenk JL, Suh TK, Seidel GE Jr. (2006)

Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm.

Theriogenology. 65: 299-307

Schilling E, Niemann E, Elsaesser F, Smidt D, Sacher B (1981)

Die Wirkung eines Depot-Progesterons (PRID) auf den Superovulationserfolg von Spenderkühen.

Berl Münch Tierärztl Wschr. 94: 401-4

Schilling E (1982)

Ergebnisse von Superovulationsbehandlungen – Variabilität und deren Ursachen.

Dtsch Tierärztl Wochenschr. 89: 88-92

Schmitt EJ, Diaz T, Drost M, Thatcher WW (1996)

Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle.

J Anim Sci. 74(5): 1084-91

Schnorr B (1985)

Embryologie der Haustiere.

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

Seidel GE, Elsdon RP, Nelson LD, Hasler JF (1978)

Methods of ovum recovery and factors affecting fertilization of superovulated bovine ova.

Control of reproduction in the cow.

J.M. Sreenan. The Hague, The Netherlands, Martin Nijhoff: 268-80

Sellars CB, Dalton JC, Manzo R, Day J, Ahmadzadeh A (2006)

Time and incidence of ovulation and conception rates after incorporating estradiol cypionate into a timed artificial insemination protocol.

J Dairy Sci. 89(2):620-6

Shaw DW, Good TE (2000)

Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle.

Theriogenology. 53(8):1521-8

Shephard RW (2005)

A comparison of performance of the Ovsynch treatment program between cycling and non-cycling cows within seasonally-calving dairy herds.

Aust Vet J. 83(12):751-7

Shirasuna K, Asaoka H, Acosta TJ, Wijayagunawardane MP, Ohtani M, Hayashi KG, Matsui M, Miyamoto A (2004)

Real-time dynamics of prostaglandin F₂α release from uterus and corpus luteum during spontaneous luteolysis in the cow.

Reproduction 128: 189-95

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.

Reprod Domest Anim. 37: 37-41

Sirois J, Fortune JE (1988)

Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography.

Biol Reprod. 39: 308-17

Sirois J, Fortune JE (1990)

Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance.

Endocrinology. 127: 916-25

Skinner MK, Lobb D, Dorrington JH (1987a)

Ovarian thecal/interstitial cells produce an epidermal growth factor like substance.

Endocrinology. 121: 1892-9.

Skinner MK, Keskioja J, Osteen KG, Moses HL (1987b)

Ovarian thecal cells produce transforming growth factor β which can regulate granulosa cell growth.

Endocrinology. 121: 786-92

Son DS, Choe CY, Cho SR, Choi SH, Kim HJ, Kim IH (2007a)

The effect of reduced dose and number of treatments of FSH on superovulatory response in CIDR-treated Korean native cows.

J Reprod Dev. 53: 1299-1303

Son DS, Choe CY, Choi SH, Rae-Cho S, Kim HJ, Han MH, Ryu IS, Suh GH, Kim UH, Kim IH (2007b)

Effect of estradiol benzoate or GnRH treatment prior to superstimulation in CIDR-treated, Korean native cows (*Bos taurus*).

Anim Reprod Sci. 100: 14-21

Souza AH, Ayres H, Ferreira RM, Wiltbank MC (2008)

A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows.

Theriogenology. 70 (2): 208-15

Stevenson JS, Pursley JR, Garverick HA, Fricke PM, Kesler DJ, Ottobre JS, Wiltbank MC (2006)

Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch.

J Dairy Sci. 89(7): 2567-78

Stoebel DP, Moberg GP (1982a)

Effect of adrenocorticotrophin and cortisol on luteinizing hormone surge and estrous behaviour of cows.

J Dairy Sci. 65: 1016-24

Stoebel DP, Moberg GP (1982b)

Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers.

J Dairy Sci. 65: 92- 6

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(6):1091-102

Stroud B, Hasler JF (2006)

Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others.

Theriogenology. 65: 65-76

Takedomi T, Kishi H, Medan MS, Aoyagi Y, Konishi M, Itoh T, Yazawa S, Watanabe G, Taya K (2005)

Active immunization against inhibin improves superovulatory response to exogenous FSH in cattle.

J Reprod Dev. 51: 341-6

Tenhagen BA, Drillich M, Surholt R, Heuwieser W. (2004)

Comparison of timed AI after synchronized ovulation to AI at estrus: reproductive and economic considerations.

J Dairy Sci. 87(1): 85-94.

Tenhumberg H, Szilvassy B, Kruff B, Pokorny R, Hunziker F (1984)

Different methods of synchronizing ET-donor cows.

Theriogenology. 21: 267

Thatcher WW, Drost M, Savio JD (1993)

New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle.

Anim Reprod Sci. 33: 27-49

Thatcher WW, Moreira F, Pancarci SM, Bartolome JA, Santos JE (2002)

Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function.

Domest Anim Endocrinol. 23(1-2):243-54.

Thatcher WW, Bilby TR, Bartolome JA, Silvestre F, Staples CR, Santos JE (2006)

Strategies for improving fertility in the modern dairy cow.

Theriogenology. 65(1):30-44

Thibier M (1997-2008)

Data Retrieval Committee Statistics of Embryo Transfer – Years 1996-2007.

In: Embryo Transfer Newsletter, International Embryo Transfer Society, 1997-2008;

http://www.iets.org/data_retrieval.htm

Tonhati H, Lôbo RB, Oliveira HN (1999)

Repeatability and heritability of response to superovulation in Holstein cows.

Theriogenology. 51: 1151-6

Totey SM, Gurpreet K, Singh G, Taneja M, Gurcharan G, Singh M, Schillar R (1992)

Effects of repeated superovulation and flushing on embryo recovery in crossbred cows.

J Anim Reprod. 13(2): 117-20

Tribulo, H., F. Jofre, J. Carcedo, A. Alonso, R. Tribulo und G. A. Bo (1993)

Superovulation in *Bos indicus* cattle with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extracts.

Theriogenology. 39: 331

Troppmann, AT (2000)

Vergleich zwischen der Embryogewinnung an mehrfach superovulierten Dauerspenderkühen und der Embryoerzeugung durch in vitro Produktion nach transvaginaler Follikelpunktion.

Diss. Med. Vet., München, 115 pp

Tsiligianni T, Amiridis GS, Vainas E (2007)

Activity of glycosidases (beta-N-acetylglucosaminidase, alpha-mannosidase, and beta-galactosidase) in the uterine luminal fluid of cows after multiple ovulation.

Can J Vet Res. 71: 300-4

Turzillo AM, Fortune JE (1990)

Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers.

J Reprod Fert. 89: 643-53

Van den Hurk R, Spek E R, Dijkstra G, Van Vorstenbosch CJ, Hulshof SC, Dieleman SJ (1992)

Effect of pregnant mares' serum gonadotrophin on the micromorphology of antral follicles in heifers, with special reference to atypical granulosa cells.

J Reprod Fert. 95 (3): 903-13

Vasconcelos JL, Silcox RW, Rosa GJ, Pursley JR, Wiltbank MC (1999)

Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows.

Theriogenology. 52(6): 1067-78

Voss H-J, Olivera-Angel M, Holtz W (1983)

Superovulation in beef cattle with PMSG und prostaglandins or progestins.

Theriogenology. 20: 615-25

Wagner, W. C., R. E. Strohbehn und P. A. Harris (1972)

ACTH, corticoids and luteal function in heifers.

J Anim Sci. 35: 789-93

Walsh RB, LeBlanc SJ, Duffield TD, Kelton DF, Walton JS, Leslie KE (2007a)

Synchronization of estrus and pregnancy risk in anestrous dairy cows after treatment with a progesterone-releasing intravaginal device.

J Dairy Sci. 90(3):1139-48

Walsh RB, Leblanc SJ, Duffield TF, Kelton DF, Walton JS, Leslie KE (2007b)

The effect of a progesterone releasing intravaginal device (PRID) on pregnancy risk to fixed-time insemination following diagnosis of non-pregnancy in dairy cows.

Theriogenology. 67(5): 948-56

Walton JS, Stubbings RD (1986)

Factors affecting the yield of viable embryos by superovulated Holstein-friesian-cows.
Theriogenology. 36: 167-75

Walton JS, Veenhuizen LP, King GJ (1987)

Relationships between time of day, estrous behavior, and the preovulatory luteinizing hormone surge in Holstein cows after treatment with cloprostenol.
J Dairy Sci. 70(8):1652-63

Webb R, Armstrong DG (1998)

Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review.
Livestock Production Sciences. 53: 95-112

Webb R, Gosden RG, Telfer EE, Moor RM (1999)

Factors affecting folliculogenesis in ruminants.
Anim Sci. 68: 257-84

West G, West C, Risley D, Donaldson L (1984)

Effect of breeding regime on percent ova fertilized in superovulated cows.
Theriogenology. 21: 273

Wilkens H (1982)

Embryologie und Anatomie des weiblichen Genitale.
In: Fertilitätsstörungen beim Weiblichen Rind
Hrsg. Grunert E, Berchtold M, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, pp. 25-48.

Willet EL, Black WG, Casida LE, Stone WH, Buckner PJ (1951)

Successful transplantation of a bovine ovum.
Science. 113: 247

Wilson JM, Fones AL, Miller DR (1990)

Influence of a dominant follicle on the superovulatory response.
Theriogenology. 33: 349

Wittke M, Drillich M, Tenhagen BA, Heuwieser W (2005)

Comparison of ovulation synchronization (OVSYNCH) with the selective induction of oestrus using PGF₂alpha after rectal palpation in a dairy herd.
Dtsch Tierarztl Wochenschr. 112(10): 368-74.

Wolfenson D, Thatcher WW, Savio JD, Badinga L, Lucy MC (1994)

The effect of a GnRH analogue on the dynamics of follicular development and synchronization of estrus in lactating cyclic dairy cows.
Theriogenology. (4): 633-44

Wolfenson D, Lew BJ, Thatcher WW, Grabner Y, Meidan R (1997)

Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cow.
Anim Reprod Sci. 47: 9-19

Wolfsdorf KE, Diaz T, Schmitt EJ, Thatcher MJ, Drost M, Thatcher WW (1997)

The dominant follicle exerts an interovarian inhibition on FSH-induced follicular development.

Theriogenology. 48(3):435-47

Yamamoto M, Ooe M, Fujii C, Suzuki T (1993)

Superovulation of Japanese Black Heifers Treated with FSH-P and FSH-R.

J Vet Med Sci. 55(1): 134-5

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: 1259-66

9. Abbildungs- und Tabellennachweis

Abb. 1:	Weltweit erzeugte Rinderembryonen im Zeitraum 1991-2007	11
Abb. 2:	Gewinnung und Übertragung von Rinderembryonen in Deutschland	12
Abb. 3:	Anzahl der Embryoentnahmen und der transfertauglichen Embryonen pro Entnahme weltweit	13
Abb. 4:	Vorbereitung und Behandlung der Empfängertiere für den stationären ET	46
Abb. 5:	Zeitpunkt der Blutentnahmen zur Bestimmung von E ₂ , P4 und LH	48
Abb. 6:	Individuelle Unterschiede zwischen den Ergebnissen der ersten fünf Entnahmen	65
Abb. 7:	Vergleich der Ergebnisse wiederholter Embryoentnahmen je nach SO-Schema	68
Abb. 8:	Hormonprofile von P4, E ₂ und LH 11-47 h nach Superovulationsauslösung	70
Abb. 9:	Vergleich der Ergebnisse der ersten 9 wiederholten Embryoentnahmen	74
Abb. 10:	Eizellen/Embryonen pro Embryoentnahme bei den ersten 9 Entnahmen	75
Abb. 11:	Unbefruchtete Eizellen pro Embryoentnahme bei den ersten 9 Entnahmen	75
Abb. 12:	Degenerierte Embryonen pro Embryoentnahme bei den ersten 9 Entnahmen	76
Abb. 13:	ET-tgl. Embryonen pro Embryoentnahme bei den ersten 9 Entnahmen	76
Abb. 14:	TG-tgl. Embryonen pro Embryoentnahme bei den ersten 9 Entnahmen	77
Abb. 15:	Durchschnittliche Befruchtungsrate (%) bei den ersten 9 Embryoentnahmen	77
Abb. 16:	Verlauf der wiederholten Embryoentnahmen bei der Spenderkuh Nr. 23	78
Abb. 17:	Verlauf der wiederholten Embryoentnahmen bei der Spenderkuh Nr. 32	79
Abb. 18:	Verlauf der wiederholten Embryoentnahmen bei der Färse Nr. 39	80
Abb. 19:	Konzept zur stationären Embryoproduktion	97
Tab. 1:	Graviditätsraten nach Ovulationssynchronisation mit OVSYNCH [®]	21
Tab. 2:	Graviditätsraten nach OVSYNCH [®] und Gestagene zur Ovulations-synchronisation	23
Tab. 3:	Ergebnisse wiederholter Superovulationen und Embryoentnahmen beim Rind	29
Tab. 4:	Heritabilität und Wiederholbarkeit von ET-Ergebnissen beim Rind	30
Tab. 5:	Einflussfaktoren auf die Superovulationsergebnisse beim Rind	32
Tab. 6:	Durchschnittliche Anzahl der transfertauglichen Embryonen aus in vivo Produktion bei verschiedenen Rassen in Deutschland	33
Tab. 7:	Verteilung der Embryoentnahmen nach Alter der Spender der Rasse DFV	43
Tab. 8:	Verteilung der wiederholten Embryoentnahmen nach Rasse und Jahr	44

Tab. 9:	Verteilung der wiederholten Embryoentnahmen nach Parität des Spenders und Jahr	44
Tab. 10:	Verteilung der wiederholten Embryoentnahmen nach Rasse und Jahreszeit	44
Tab. 11:	Dosierungen (in ml, i.m.) des eingesetzten FSH (Pluset [®]) zur Superovulation	47
Tab. 12:	Behandlungsschemata zur wiederholten Superovulation bzw. Embryoentnahme	50
Tab. 13:	Verteilung der wiederholten Embryoentnahmen nach Spender	51
Tab. 14:	Verteilung der wiederholten Embryoentnahmen nach Superovulationsschema	52
Tab. 15:	Einteilung der embryonalen Entwicklungsstadien durch die IETS	53
Tab. 16:	Klassifizierung von Embryonen nach IETS	54
Tab. 17:	Embryoentnahmen mit positiver Reaktion auf die wiederholten Superovulationen	60
Tab. 18:	Verwendbarkeit und Entwicklungsstadium der gewonnenen Embryonen	61
Tab. 19:	Eizellen/Embryonen pro Embryoentnahme in Abhängigkeit von der Rasse	62
Tab. 20:	Darstellung der fixen Effekte mit Angaben zu den Signifikanzen	62
Tab. 21:	Ergebnisse wiederholter Embryoentnahmen bei Färsen der Rasse DFV	63
Tab. 22:	Ergebnisse wiederholter Embryoentnahmen bei Kühen der Rasse DFV	64
Tab. 23:	Einfluss des Alters der Spender auf die wiederholten Embryoentnahmen	66
Tab. 24:	Einfluss des Jahres auf die wiederholten Embryoentnahmen beim DFV	67
Tab. 25:	Einfluss der Jahreszeit auf die Ergebnisse wiederholter Embryoentnahmen	67
Tab. 26:	Einfluss des Superovulationschemas auf die wiederholten Embryoentnahmen	68
Tab. 27:	Ergebnisse wiederholter Embryoentnahmen je nach Art der Besamung	69
Tab. 28:	Gewinnung von in vivo gereiften Eizellen nach Superstimulation	71
Tab. 29:	Befruchtungsergebnisse der am häufigsten eingesetzten Besamungsbullen	71
Tab. 30:	Ergebnisse wiederholter Embryoentnahmen je nach Besamungstechniker	72
Tab. 31:	Ergebnisse der ersten 9 wiederholten Embryoentnahmen bei Färsen und Kühen	73
Tab. 32:	Wiederholbarkeit der Ergebnisse der Embryoentnahmen	81
Tab. 33:	Weiterentwicklung nach 18-24 h Zwischenkultur von Embryonen der Klasse 3	82
Tab. 34:	Graviditäten (Tag 35) nach ET je nach Zyklussynchronisationsverfahren	82
Tab. 35:	Vereinfachte Aufstellung der Embryoerzeugungskosten im Versuchszeitraum	83

Tab. 36:	Embryoerzeugungskosten (€ inkl. MwSt.) je nach Anzahl wiederholter Entnahmen	84
Tab. 37:	Vereinfachte Aufstellung der Erzeugungskosten einer Gravidität auf Station	85

Danksagung

Danken möchte ich Prof. Dr. Eckhard Wolf für die Überlassung des Themas und die Anstellung im Moorversuchsgut.

Bei den Mitarbeitern der Prüf- und Besamungsstation München-Grub e.V., allen voran Dr. Thomas Grupp, möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Bei Dr. Susanne E. Ulbrich von der Technischen Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Lehrstuhl für Physiologie möchte ich mich für die Hormonanalysen und die Erstellung der Hormonprofile bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Myriam Reichenbach und Dr. Horst-Dieter Reichenbach für die Zusammenarbeit und die Betreuung während der Zeit der Promotion bedanken.

Weiterer Dank gilt den Kollegen mit denen ich während meiner Zeit am Moorversuchsgut zusammen arbeiten durfte: Christian Prantler, Peter Rieblinger, Elisabeth Pistory, Marieke Matthiesen, Christoph Gschoederer und allen anderen die hier nicht namentlich erwähnt werden.

Besonders danken möchte ich meiner Familie und meinen Freunden, ohne die vieles nicht möglich gewesen wäre.