

1. Einleitung

Der Embryotransfer ist eine Biotechnik, welche heute in der Rinderzucht routinemäßig zur Anwendung kommt. Ein wesentliches Problem stellt jedoch die große Variabilität der Ovarreaktionen der Spenderkühe dar. Obwohl in den letzten 25 Jahren zahlreiche Untersuchungen durchgeführt wurden um die Ergebnisse zu verbessern, blieb die hohe Variabilität der Superovulation eine Schwachstelle dieses biotechnischen Verfahrens. Etwa ein Drittel der Tiere reagierte unbefriedigend auf die Superovulationsbehandlung (HAHN, 1992).

Von den Einflußfaktoren, welche den Superovulationserfolg bestimmen, kommt dem ovariellen sowie endokrinen Status der Spendertiere zum Zeitpunkt der Superovulationseinleitung maßgebliche Bedeutung zu.

In diesem Zusammenhang wurde in der Literatur der Einfluß des dominanten Follikels (DF) auf den Superovulationserfolg kontrovers diskutiert. Einige Studien zeigten, daß die Existenz eines DF zu Beginn der Hormonbehandlung das Ergebnis der Superovulation beeinträchtigen kann (GRASSO et al., 1989; ROUILLIER et al., 1990; BOTZ, 1991; GUILBAULT et al., 1991; BARTMAN, 1992; HUHTINEN et al., 1992; BUNGARTZ u. NIEMANN, 1994; STOCK et al., 1996; WOLFSDORF et al., 1997), wogegen andere Autoren derartige Effekte nicht feststellten (WILSON et al., 1990; GRAY et al., 1992; MACIEL et al., 1995; LAUNTER et al., 1997). Die widersprüchlichen Ergebnisse waren Anlaß zu der vorgelegten Studie.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb es,

1. Die morphologische Beschaffenheit des DF bei Kühen und Färsen zu charakterisieren.
2. Den funktionellen Charakter des DF, insbesondere am Tag der Superovulationseinleitung, bei Embryotransfer Programmen zu ermitteln.
3. Den Einfluß des DF, insbesondere unter dem Gesichtspunkt seiner hormonellen Aktivität, auf die Follikelpopulation bzw. -reifung nach PMSG -Stimulationsregime aufzuklären.

2. Schrifttum

2.1. Oogenese

Die Oogenese umfaßt die Bildung, Entwicklung und Reifung der weiblichen Gameten. Sie beginnt schon im Embryonalstadium und dauert bis zur Ovulation (BAKER, 1972). Die primordialen Keimzellen liegen im frühen Stadium des Embryos (beim Menschen etwa in der dritten Woche nach der Konzeption) im Epithel des Dottersackes (WITSCHI, 1948; FALIN, 1969). Wenn der Embryo etwa 13-20 Somiten entwickelt hat, sind die Zellen in das Bindegewebe des Enddarmes eingewandert, von dort gelangen sie in das Mesenterium des Darmes. Vom 25-Somiten-Stadium an (etwa 30 Tage nach der Befruchtung) wandern die meisten Zellen in die Region der Nierenanlagen und von dort in die angrenzenden Primordien der Gonaden (Genitalleisten). Diese Zellen vermehren sich. Ob die Vermehrung während der Wanderung oder nur während der Ruhephasen erfolgt, ist unklar. Der Transport erfolgt offensichtlich durch amoeboiden Eigenbewegung. Es wird angenommen, daß das Gonadenfeld einen chemotaktischen Einfluß auf die wandernden Zellen ausübt (STARCK, 1975).

Gegen Ende der Geschlechtsdifferenzierung nimmt die Zahl der primordialen Keimzellen durch mitotische Teilungen sehr stark zu. Im Gegensatz zum Testis nimmt das Ovar schnell die Form der adulten Drüsen an. Die Keimzellen des Ovars werden dann zu Oogonien umgebildet. Die Oogonien nehmen in relativ kurzer Zeit stark zu. BAKER u. HUNTER (1978) beobachteten beim Rind ein Maximum von 1- 3 Millionen Oogonien zwischen dem 60. und 100. Trächtigkeitstag. Nach Ablauf einer offenbar begrenzten Zahl von Mitosen entstehen aus den Oogonien die Oozyten, welche in die Prophase der ersten von zwei meiotischen Teilungen eingehen. Von diesem Zeitpunkt an können sich die Oozyten nicht mehr vermehren. Wenn die Oogonien endgültig aus dem Ovar verschwunden sind, bei den meisten Arten bereits vor der Geburt, kann die Population der Keimzellen mit zunehmendem Alter durch Atresie und Ovulation nur noch abnehmen, so daß z.B. bei einer 8jährigen Kuh nur noch etwa 2500 Follikel vorhanden sind (MICHEL, 1983). ERIKSON (1966a) beobachtete, daß bei Kühen innerhalb von 40 Tagen die Anzahl an Follikeln von ca. 250 000 auf 108 000 abnahm. Weniger als 0,1% der gesamten Zahl von Follikeln, welche zur Zeit der Geburt auf den Ovarien vorhanden sind, haben die Chance zu ovulieren (ERIKSON, 1966a; ERIKSON et al., 1976).

Die Meiose besteht aus zwei Zellteilungen, wobei in der ersten Teilung die Chromosomenzahl halbiert wird. Die zweite Teilung ähnelt der Mitose, obwohl nur der haploide Chromosomensatz daran beteiligt ist (BAKER, 1972). Bei der Zellteilung, ob mitotisch oder meiotisch, wird eine Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase durchlaufen. Die Prophase der ersten meiotischen Teilung dauert sehr lang, ist hoch spezialisiert und wird durch zwei Ruheperioden (das Dictyotän-Stadium und die Metaphase I oder II) unterbrochen. Die meiotische Prophase kann in fünf Stadien unterteilt werden, die von den Zytologen als Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese bezeichnet werden. Beim weiblichen Geschlecht ist die meiotische Prophase bis zum Diplotänstadium, bei den meisten Arten kurz nach der Geburt, abgeschlossen. Die Oozyten treten dann in eine verlängerte "Ruhephase" ein, die kurz vor der Ovulation mit Beginn der präovulatorischen Vorgänge unter dem Einfluß des LH-Peaks im Graafschen Follikel endet.

2.2. Follikulogenese

Kurz nach ihrer Entstehung werden die Oozyten von einem einschichtigen Plattenepithel (ca. 14-29 Granulosazellen) umgeben: Es entstehen die Primordialfollikel (VAN DEN HURK et al., 1997). Ihre Entstehung ist beim Rind vor der Geburt abgeschlossen (HIRSHFIELD, 1991). Primordialfollikel repräsentieren die Mehrheit der Follikelpopulation auf den Ovarien (HANSEL u. COVEY, 1983). Im ruhenden Primordialfollikel ist die Oozyte eine undifferenzierte Zelle mit einem Durchmesser von 25-30 µm, während der gesamte Durchmesser des Follikels beim Rind ca. 30-50 µm beträgt (RÜSSE, 1987; VAN DEN HURK et al., 1997).

Nach der Aktivierung des ruhenden Primordialfollikels, deren Auslösung bis heute nicht bekannt ist, nehmen die wenigen flachen Follikelzellen an Größe zu. Der Übergang der Follikelzellen von der flachen in die isoprismatische Form kennzeichnet den aktivierten Follikel, den Primärfollikel (RÜSSE, 1987). Jeden Tag beginnen zwei bis drei Primordialfollikel beim Schaf (CAHILL u. MAULEON, 1980) oder ca. sechs bei der Kuh (SCARAMUZZI et al., 1980) zu wachsen. Bei der Kuh können Primordialfollikel ab dem 225. Tag der Gravidität bis zum Ende der Reproduktionsdauer aktiviert werden (VAN DER HURK et al., 1997). Der Primärfollikel hat einen Durchmesser von ca. 40-60 µm, während seine Oozyte ca. 30-40 µm mißt. Er ist von ca. 27 bis 58 Granulosazellen umgeben (HULSHOF et al., 1994).

Der Sekundärfollikel ist durch die Mehrschichtigkeit seines Epithels gekennzeichnet. Im Sekundärfollikel des Rindes können sechs (VAN DEN HURK et al., 1997) bis zehn (RÜSSE, 1987) Schichten von Follikelzellen vorhanden sein. Die maximale Größe des Sekundärfollikels vor der Antrumbildung beträgt um 300 µm (RÜSSE, 1987). Die äußersten Follikelzellen formieren sich zu einem dichten Verband von hochprismatischen Zellen, den Basalzellen. Im Sekundärfollikel wächst die Eizelle und ihre Differenzierung beginnt. Zwischen der Oozyte und den unmittelbar umgebenden Follikelzellen wird die Zona pellucida aufgebaut. Die späteren Corona radiata-Zellen entwickeln spezielle Kontaktstellen mit dem Ovum. Sie bilden lange dünne Fortsätze, die mit klobigen Enden die Eioberfläche eindellen. Das Plasmalemm der Eizelle entwickelt Mikrovilli, die sich in die Zona pellucida einbohren und mit den Fortsätzen der Corona radiata-Zellen in Verbindung stehen. Dieser Kontakt ist essentiell zur Übermittlung von Stoffen in die Eizelle.

Die präantralen Stadien der Follikelentwicklung sind für die Differenzierung der Eizelle von großer Bedeutung. Das Wachstum der Eizelle wird im frühen Tertiärfollikel beendet. Reife Eizellen haben einschließlich der Zona pellucida gemessen einen Durchmesser von ca. 180 µm (RÜSSE, 1987). Zwischen den Corona radiata- und den Basalzellen liegen polygonale Intermediärzellen. Diese stellen einen lockeren Zellverband dar. Zwischen ihnen entsteht das Antrum. Dazwischen sammelt sich Flüssigkeit in den Räumen um die Epithelzellen an. Deshalb wird der Follikel als vesikulär bezeichnet. Die Membrana granulosa wird nach weiteren Teilungen der Granulosazellen zwei-, drei- und schließlich vierschichtig. Jetzt dringen Blutkapillaren in die fibröse Zellschicht, welche den Follikel umgibt, ein und bilden eine Gefäßschicht, die Theca interna (BAKER, 1972). Diese wird von Fibroblasten der Theca externa umgeben und bildet die einzige Nahrungsquelle für die Membrana granulosa und für die Oozyte. Die von Hypophysenhormonen abhängige Phase des Follikelwachstums führt zu einer weiteren Vermehrung der Granulosazellen und darüber hinaus zum Eindringen von Flüssigkeit in die interzellulären Räume. Mit zunehmender Flüssigkeitsmenge werden die Zwischenräume größer, fließen zusammen und bilden den Follikelraum (Antrum). In diesem Stadium spricht man vom Graafschen Follikel.

Nach weiterer Ausdehnung des Follikelraumes nimmt die Oozyte eine Position an einer Seite des Follikels ein und ist von zwei oder mehr Lagen Granulosazellen umgeben. Die innerste Zellschicht ist säulenförmig und bildet die Corona radiata oder den Cumulus oophorus, der das Ei auch nach der Ovulation noch eine Zeitlang umgibt.

Jedes folliculäre Stadium ist von einem spezifischen Proliferationsverhalten der Granulosa- bzw. Thekazellen gekennzeichnet. Die Proliferationsrate ist eng an die Größe des Follikels gekoppelt (MONNIAUX u. PISSELET, 1992). Sie ist im Primärfollikel gering und steigt auf Maximalwerte im kleinen antralen Follikel. Mit fortschreitender Follikelentwicklung findet eine zunehmende Differenzierung der Granulosazellen statt.

Die Entwicklungsdauer eines Präantralfollikels bis zum ovulatorischen Stadium beträgt beim Rind 80 bis 100 Tage (BRITT, 1992). Die Entwicklungsrate des präantralen Follikels beim Rind ist viel langsamer als die des antralen Follikels (LUSSIER et al., 1993).

CUSHMAN et al. (1999) berichteten von einer positiven Korrelation zwischen der Anzahl von Primordialfollikeln und der Anzahl von Primär- und Tertiärfollikeln. Es bestand auch eine positive Korrelation zwischen der Anzahl oberflächlich kleiner Follikel und der Anzahl von Primordial-, Sekundär- bzw. Tertiärfollikeln. Sie fanden, daß die Follikulogenese ein langer Vorgang ist, der auch die Variabilität in den Follikelklassen bedingt, was wiederum die schlechte Wiederholbarkeit der Superovulation erklärte. ERIKSON (1966b) stellte fest, daß es eine große Variabilität bei Kühen bezüglich der Anzahl von Keimzellen auf beiden Ovarien gibt. Dies sei der Grund dafür, daß die Reproduktionskapazität zwischen Kühen unterschiedlich ist. CUSCHMANN et al. (1999) beobachteten, daß Kühe, welche nach FSH-Stimulation schlecht reagierten, weniger Primordial- bzw. Tertiärfollikel hatten. Außerdem bestanden positive Korrelationen zwischen der Anzahl kleiner Follikel zum Zeitpunkt der Stimulation, der Gesamtzahl der Ova, der transfertauglichen Embryonen und der entstehenden Corpora lutea (GRASSO et al., 1989; KAWAMATA, 1994).

2.3. Follikeldynamik

Vor dem Einsatz der Ultraschalluntersuchung in der Gynäkologie des Rindes versuchten namhafte Wissenschaftler die Follikeldynamik durch transrektale Palpation (GRUNERT 1979; STOLLA u. HIMMER 1980; SCHNEEBELI u. EGGENBERGER, 1985), durch morphologische, histologische oder endokrinologische Untersuchungen an geschlachteten Tieren, nach Ovariectomie (RAJAKOSKI, 1960; CHOUDARY et al., 1968; IRELAND et al., 1979; MATTON et al., 1981; IRELAND u. ROCHE, 1982, 1983a, b, 1987), durch Markieren bestimmter Follikel mittels Tusche (DUFOUR et al., 1972) oder durch Pelviskopie (SCHAMS et al., 1976; TOTH, 1977) zu charakterisieren.

Die Autoren kamen dabei zu zwei unterschiedlichen Meinungen. RAJAKOSKI (1960) postulierte aufgrund einer morphologischen und histologischen Untersuchung eine zweiwellenförmige Follikeldynamik, eine zwischen dem 3. und 12. Zyklustag und die andere zwischen Tag 12 und der Brunst. Ein gewisser Hinweis auf eine zweiwellige Follikelentwicklung leitet sich auch aus den Versuchen von DUFOUR et al. (1972) ab. In diesem Experiment wurden der größte und der zweitgrößte Follikel an verschiedenen Zyklustagen mit Tusche markiert. Allerdings war erst drei Tage vor der Brunst der größte markierte Follikel mit dem Ovulationsfollikel identisch. MATTON et al. (1981) berichteten vom Ablauf einer dreiphasigen Follikelentwicklung während eines Zyklus. Die erste Phase lag zwischen Tag 3 und 12, die zweite zwischen Tag 13 und 18 und die dritte zwischen Tag 18 und der Brunst. Diese Autoren beobachteten gegen Ende des Zyklus eine größere Wachstums- und Regressionsdynamik als am Anfang. SCHNEEBELI u. EGGENBERGER (1985) konnten in ihren Untersuchungen eine gehäufte Neubildung von Follikeln auf dem Rinderovar vom 3. bis 6. und ab dem 12. Zyklustag palpieren. Außerdem stellten die Autoren (1986) dabei regelmäßig neu auftretende Tertiärfollikel während des Zyklus und der Gravidität im Abstand von durchschnittlich acht bis zehn Tagen fest.

IRELAND u. ROCHE (1987) vermuteten dabei, nach dem Auftreten von drei Östradiolpeaks in der V. ovarica ein dreiphasiges Follikelwachstum innerhalb eines Zyklus.

Dagegen berichteten CHOUDARY et al. (1968); DONADSON u. HANSEL (1968) sowie MARION et al. (1968), daß die antralen Follikel kontinuierlich umgesetzt wurden, unabhängig vom Zyklusstadium und ohne bestimmte Phasen von Wachstum und Atresie.

Erst nach Anwendung der Ultraschalldiagnostik in der Gynäkologie beim Rind (PIERSON u. GINTHER, 1984) und nach Verlaufskontrolle der einzelnen Follikel ≥ 5 mm (SAVIO et al., 1988; SIRIOS u. FORTUNE, 1988; KNOPF et al., 1989; FEHRN et al., 1991) konnte das wellenförmige Muster bestätigt werden.

Aufgrund von Ultraschallstudien berichteten einige Autoren vom Charakter einer zweiwelligen Follikelentwicklung (SIRIOS u. FORTUNE, 1988; KNOPF et al., 1989). Andererseits sprachen SAVIO et al., (1988) von der Feststellung eines dreiwelligen Follikelwachstums. Die Wellen beginnen dabei am Tag 2 und 11 bei Färsen mit zwei Wellen und am Tag 2, 10 und 16 bei Tieren mit drei Wellen (SIRIOS u. FORTUNE, 1988). Von einer vierwelligen bzw. einwelligen Follikelentwicklung wurde sehr selten berichtet (SIRIOS u. FORTUNE, 1988). KÄHN (1988, 1989) fand durch tägliche ultrasonographische Untersuchungen sowohl Hinweise für ein zwei- als auch ein dreiphasiges Follikelwachstum.

Jedoch halten IRELAND und ROCHE (1982; 1983a,b; 1987) aufgrund histologischer Studien sowie hormonanalytischer Untersuchungen eine dreiwellige Follikelentwicklung für sehr wahrscheinlich.

In diesem Zusammenhang sprach BAKER (1972) davon, daß die Zahl der präantralen Follikel kaum mit den Phasen des Reproduktionszyklus schwankt. Die Zellpopulation befindet sich demnach in einem "Fließgleichgewicht". Die Follikel gehen nur dann in ein weiteres Entwicklungsstadium ein, wenn die Zahl der Follikel in diesem Stadium vorher vermindert wurde. Dagegen schwankt die Zahl antraler Follikel innerhalb des Zyklus erheblich.

Wie bei normal zyklischen Tieren verhält sich auch die Follikeldynamik bei trächtigen (GINTHER et al., 1989a; KNOPF, 1990) und präpubertären Tieren (EVANS et al., 1994).

Bei trächtigen Tieren begann zwischen dem Tag der Ovulation und Tag 70 der Trächtigkeit eine neue Welle in konstantem Abstand von 8,5 bis 10 Tagen. (KNOPF, 1990).

Färsen ab einem Alter von zwei Wochen zeigen die gleiche wellenförmig Dynamik wie adulte Tiere (EVANS, 1994).

Die Follikeldynamik beim Rind wurde in Rekrutierung, Selektion und Dominanz von Follikeln unterteilt (SIRIOS u. FORTUNE, 1988; SAVIO et al., 1988; GINTHER et al., 1989a,b).

2.3.1. Rekrutierung

Die Rekrutierung wurde als Eintritt eines Pools von Follikeln in das gonadotropinabhängige Stadium definiert (DRIANCOURT, 1991). Es ist bisher unklar, warum einige Follikel in die Wachstumsphase eintreten, während identische Nachbarfollikel unbeeinflusst bleiben. BAKER (1972) stellte eine Germinalselektionshypothese vor. Die frühesten Wachstumssignale stammen wahrscheinlich von der Oozyte selbst. Diese löst die Veränderungen in den Granulosazellen aus. Eine andere Möglichkeit wäre, daß die Oozyten in bestimmter Weise "programmiert" sind. Vielleicht beeinflusst die Zeit des Beginns der meiotischen Prophase in den Keimzellen während des embryonalen oder fetalen Lebens den Zeitpunkt ihrer späteren Wachstumsphase. Die ersten Zellen, welche in die Meiose eingehen, wären damit auch die ersten, die in das Follikelwachstum eintreten. BAKER (1972) hielt es für unwahrscheinlich, daß Hypophysenhormone das Follikelwachstum auslösen, denn die

Anfangsphasen des Wachstumsprozesses laufen auch nach Entfernung der Hypophyse weiter (WANG und GEREENWALD, 1993). Man nimmt allgemein an, daß das Wachstum bis zum Stadium von vier Granulosa-Zelllagen hormonunabhängig ist, während die Vorgänge danach hormonabhängig sind (DRIANCOURT, 1991).

Zahlreiche Autoren vermuten, daß das Signal für die Rekrutierung der Follikel der leichte Anstieg der FSH-Ausschüttung ist. Hinweise dafür sind:

- a) Der leichte FSH-Anstieg vor jeder Follikelwelle (ADAMS et al., 1992; SUNDERLAND et al., 1994; GINTHER et al., 1998),
- b) hemmt man den FSH-Anstieg durch Injektion boviner Follikelflüssigkeit, wurde der Beginn der folliculären Welle verzögert (TURZILLO u. FORTUNE, 1990).

Es ist unklar, welche Faktoren dieses FSH-Signal initiieren.

2.3.2. Selektion

Follikelselektion ist ein physiologischer Vorgang, durch den die Zahl rekrutierter Follikel auf die ovulatorische Follikelzahl reduziert wird (GOODMAN u. HODGEN, 1983). Der Prozeß der Rekrutierung bestimmt einen Pool von Follikeln, aus dem dann die Selektion des DF erfolgt. Im Verlauf der Selektion reduziert sich die Anzahl der rekrutierten Follikel durch Atresie. Der die Atresie umgehende Follikel wird als dominant bezeichnet (SAVIO et al., 1988; SIRIOS u. FORTUNE, 1988).

Jeder rekrutierte Follikel einer Welle hat die gleiche Chance zu dominieren. Hinweise dafür sind:

- a) Die FSH-Applikation am Anfang einer Follikelwelle stimuliert mehrere Follikel den Durchmesser des DF zu erreichen (ADAMS et al., 1993),
- b) bei Eliminierung aller rekrutierter Follikel bis auf einen, der zufällig selektiert wurde, wurde dieser Follikel zum DF (GIBBONS et al., 1996),
- c) wenn der DF schon selektiert ist und eliminiert wird, kann der größte untergeordnete zu einem neuen DF wachsen (KO et al., 1991; ADAMS et al., 1993).

Die Faktoren, welche den DF bestimmen, sind bis heute noch nicht genau bekannt. Tabelle 1 zeigt einige Faktoren, die einzeln oder gemeinsam die DF-Selektion definieren könnten.

Tab. 1: Mechanismen assoziiert mit dem Phänomen der Selektion des dominanten Follikels

Mechanismus	Autoren
Abfall des FSH-Peaks	GINTHER et al. (1996) MIHM et al. (1997)
Zunahme in LH-Pulsen	GINTHER et al. (1998)
Anbildung von LH-Rezeptoren an Granulosazellen	GONG et al. (1995) BAO u. GARVERICK (1998) GINTHER et al. (1998)
Veränderungen in der Vaskulisation von Ovargeweben	SPICER u. ECHTERNKAMP (1986) BROWN u. DRIANCOURT (1989)
Verhältnis von intrafollikulären Steroiden	SUNDERLANT et. al. (1994) GINTHER et al.(1997)
Verhältnis intrafollikulärer Proteine	RHODES et al. (1997) EVANS et al. (1997)

2.3.3. Dominanz

Dominanz ist ein Vorgang, welcher den selektierten Follikel unterstützt, weiter zu wachsen. Außerdem werden andere Follikel unterdrückt und fallen der Atresie anheim (GOODMAN u. HODGEN, 1983).

Wenn ein Follikel dominant wird, entwickelt er sich nicht nur morphologisch, sondern er bereitet sich auch funktionell auf die Ovulation vor. Dabei kommt der Sekretion von zunehmenden Mengen an Östradiol eine Schlüsselrolle zu. Dominante Follikel, die während der Lutealphase rekrutiert wurden, steigern während des ersten Stadiums ihre Fähigkeit zur Östradiol 17 β - und Inhibinproduktion (BADINGA et al., 1992).

Es stellte sich die Frage: Wodurch unterdrückt der DF die untergeordneten Follikel ?

Durch Sekretion von Inhibin und Östradiol wird über einen negativen Feedback-Mechanismus der Plasmaspiegel des FSH gesenkt und das Wachstum kleiner Follikel gehemmt. DRIANCOURT (1991) bezeichnet dies als passiven Weg der Einflußnahme. Der aktive Weg einer Beeinflussung des Wachstumsverhaltens kleiner Follikel durch einen großen Follikel ist für ihn beim Rind im Gegensatz zum Schaf ebenfalls möglich. Dabei soll der

reifende Follikel Substanzen freisetzen, welche die Empfindlichkeit kleiner Follikel gegenüber FSH senken. GINTHER et al. (1989b) hypothetisieren, daß der DF die antralen Follikel auf systemischem Wege hemmt, da sie keinen intraovariellen Zusammenhang feststellen konnten. Die Elimination des DF (ADAMS et al., 1992) bzw. die Elektrokauterisierung und Röntgenbestrahlung der Follikel auf beiden Ovarien (VILLAGODOY et al., 1985) führte nach 24 Stunden zu einem Anstieg von FSH und LH. Es ist zu vermuten, daß der DF die Ausschüttung der Gonadotropine hemmt. Nach Eliminierung des DF kommt es ein bis zwei Tage später zu einer neuen Follikelwelle (STAIGMILLER u. ENGLAND, 1982; KO et al., 1991; ADAMS et al., 1993; BERGFELT et al., 1994). Dasselbe gilt auch für die einseitige Ovariectomie (SAIDUDDIN et al., 1970; LUSSIER et al., 1994; STAIGMILLER u. ENGLAND, 1982; MOHAN u. RAJAMAHENDRAN; 1998). Immunisierung gegen Inhibin vermehrt die Ovulationsrate bei Färsen (MORRIS et al., 1993).

Wie kann der DF trotz der geringen pulsierenden Blutkonzentration an FSH weiter wachsen? Im Stadium der Dominanz reift der Follikel trotz der von ihm induzierten Verminderung der peripheren FSH-Konzentration weiter. Dies erreicht er infolge einer gegenüber kleineren Follikeln höheren Sensibilität für FSH. Letztere wird durch autokrine Faktoren wie das IGF verstärkt. Entsprechend findet sich IGF in großen Follikeln in einer vergleichsweise hohen Konzentration (DRIANCOURT, 1991). Auf diese Weise stimuliert der DF sein eigenes Wachstum, während er gleichzeitig das Wachstum und die Differenzierung weiterer Follikel durch die Reduzierung der Verfügbarkeit von FSH unterdrückt. Zusätzlich enthalten die kleinsten Follikel einer Welle die höchste "Epidermal Growth Factor" (EGF)-Konzentration. EGF hemmt die Zelldifferenzierung und damit auch die Wirkung des FSH. Der stimulierende Effekt des FSH ist an größeren Follikeln intensiver (DRIANCOURT, 1991). So besitzt der große heranreifende Follikel einen niedrigeren Schwellenwert für eine FSH-Wirkung.

In jüngerer Zeit wurde akzeptiert, daß die Bildung von LH-Rezeptoren an Granulosazellen ein entscheidender Mechanismus bei der Selektion und Dominanz ist. Granulosazellen bilden LH-Rezeptoren zwischen Tag 2 und 4 nach Eintritt einer Welle (GINTHER et al., 1996). Nach FSH-Abfall wechselt der DF von der FSH- zur LH-Abhängigkeit.

In diesem Zusammenhang stimuliert IGF die Östradiolproduktion (ADASCHI et al., 1985a) und induziert dabei die Synthese von LH-Rezeptoren an Granulosazellen (ADASHI et al., 1985b). So spielt IGF eine große Rolle bei der Follikeldominanz.

Die erhöhten Progesteronspiegel während der Lutealphase erlauben jedoch keine abschließende Reifung des DF. An einem gewissen Punkt erreicht das Wachstum des Follikels ein Plateau, und er atresiert schließlich (FORTUNE et al., 1988). Die abnehmende Östradiolproduktion bewirkt über einen Wegfall der negativen Rückkopplung einen leichten Anstieg von FSH, wodurch die nächste folliculäre Welle anläuft (LAHLOU-KASJA et al., 1984).

2.4. Präovulatorische Follikelreifung

Während der Regression des CI entwickelt sich der DF zu einem Stadium, in welchem er genügend Östradiol bildet, um den LH/FSH-Anstieg und letztendlich die Ovulation auszulösen. Der Beginn der präovulatorischen Reifung ist durch eine plötzliche Ausschüttung von LH (LH-Peak) aus der Hypophyse gekennzeichnet (DE LOOS et al., 1991a; HYTTEL et al., 1997). Die Reifung der Oozyten bzw. der Follikel umfaßt eine Sequenz von Veränderungen am Kern (Kernreifung), am Zytoplasma (zytoplasmatische Reifung) sowie dem Steroidgehalt der Follikel (HYTTEL et al., 1986; BEVERS et al., 1997).

2.4.1. Kernreifung

Zu Beginn der präovulatorischen Reifung ist die Eizelle noch eine primäre Oozyte, deren Meiose durch die lange Entwicklungspause nach dem Diplotän unterbrochen wurde (BAKER, 1972; HYTTEL et al., 1986). Ziel der finalen Maturation ist, eine haploide Oozyte zu bilden. Nach dem LH-Peak beendet die Oozyte die Prophase der ersten meiotischen Teilung. Dann folgen schnell die Metaphase I (MI), Anaphase I und Telophase I. Die Eizelle teilt sich inäqual, denn eine Tochterzelle, die sekundäre Oozyte, erhält die Hauptmenge des Zytoplasmas, während die andere mit nur sehr wenig Ooplasma den abortiven Polkörper bildet. Kurz nach der Bildung des ersten Polkörpers geht die Oozyte in die zweite meiotische Teilung ein. Die Prophase ist sehr kurz oder gar nicht vorhanden. Die Chromosomen kondensieren zu einer halbmondförmigen Masse an der Peripherie der Oozyte. Die Spindelfasern werden gebildet und die Chromosomen ordnen sich in der Metaphasenplatte an. Das Ei tritt nun in das Stadium der Metaphase II (MII) ein. Im Stadium der Metaphase II macht die Eizelle eine Entwicklungspause durch. In diesem Stadium kommt es in der Regel zur Ovulation. Der weitere Ablauf der Meiose ist vom Eindringen des Spermatozoons bei der Befruchtung abhängig.

Die Kernreifung der Oozyte steht in enger Beziehung zum Abstand vom LH-Peak. neun bis elf Stunden nach dem LH-Peak war die Oozyte im Ruhekern-Stadium(GV). Nach 12 bis 17 Stunden ist sie in der Metaphase I und nach 18 bis 20 Stunden in der Metaphase II (CALLESEN et al., 1988).

Eine große Anzahl von Oozyten (37%) zeigte nach der Superovulation eine abweichende Kernreifung (HYTTEL et al., 1991) im Vergleich zu 11% bei nicht stimulierten Tieren (CALLESEN, et al., 1988).

2.4.2. Zytoplasmatische Reifung

HYTTEL et al. (1986, 1997) beschrieben die zytoplasmatischen Veränderungen an den Oozyten vor, während und nach dem LH-Peak. Vor dem LH-Peak zeigte die Oozyte keinen perivitellinen Raum. In ihrem Ooplasma befanden sich zahlreiche gleichmäßig verteilte Blasen. Die Mitochondrien sind in großen Büscheln sichtbar und befanden sich an der Peripherie des Ooplasmas. Die Cortikalgranula sind auch in großen Büscheln zu erkennen und befanden sich ebenfalls an der Peripherie. Auch der Golgi-Apparat befand sich an der Peripherie des Ooplasmas. Nach dem LH-Peak entwickelte sich bald ein perivitelliner Raum. Daraufhin verteilten sich die Mitochondrien gleichmäßig im Ooplasma. Die Cortikalgranula emigrierten entlang dem Oolemm. Hierbei nahm die Anzahl der Golgi-Apparate ab. Im Zentrum der Eizelle waren blasige Gebilde sichtbar.

In dieser Endphase der Follikelreifung nahmen die unmittelbar der Oozyte anliegenden Zellen die charakteristische Säulenform an (LAURINCIK et al., 1992). Anfänglich ist der Cumulus oophorus noch über weite Bereiche mit der Membrana granulosa verbunden. Dieser Bereich wird zunehmend kleiner, teils durch Bewegung und Ablösung der Granulosazellen, aber auch durch Flüssigkeitsansammlungen (BEKER, 1972). Die Verbindung wird schließlich auf einen schmalen Stiel reduziert, und die innerste Lage der Cumulus-Zellen (jetzt Corona radiata genannt) bildet lange dünne Zellen mit distal vom Ei gelegenen Kern. Kurz vor der Ovulation kann das Ei mit seinen umgebenden Corona-Zellen frei in der Follikelflüssigkeit flottieren.

DE LOOS et al. (1991b) nannten drei Parameter als Zeichen für die Reifung der Follikelwand nach der Superovulation:

- 1) Abnahme der Dichte der Granulosazellmembran,
- 2) Abfall des mitotischen Index der Granulosazellen und
- 3) Eintritt von eosinophilen Granulozyten in die Follikelwand.

Die Autoren konnten eine enge Beziehung zwischen Kernreifung und Cumulusexpansion finden. Oozyten in der M II-Stadium wiesen immer einen expandierten Cumulus auf. Oozyten mit kompaktem Cumulus blieben im GV-Stadium stehen. Dabei fanden sie 24 bis 26 Stunden nach dem LH-Peak 72% Oozyten in M II-Stadium und 28% im richtigen Reifungsstadium bezüglich der Reife der Follikelwand. 78% der Follikel standen unter P₄-Dominanz. Oozyten, Cumulus und Follikelwand waren nicht immer in dem entsprechenden Stadium der Maturation nachweisbar. Daraus wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß die Oozyten und Follikel nach der Superovulation nicht immer synchron reifen.

LAURINCIK et al. (1992) stellten fest, daß die Expansion des Cumulus ein effektiver Index für die Beurteilung der Oozytenreifung ist.

2.4.3. Muster der Steroidhormoneveränderungen

Die Wiederaufnahme der Meiose wird durch Steroidhormone gesteuert. Diese Veränderungen des Progesteron- bzw. Östrogengehalts in der Follikelflüssigkeit vor, während und nach der präovulatorischen LH-Ausschüttung wurden intensiv untersucht (IRELAND u. ROCHE, 1982, 1983a,b; FORTUNE u. HANSEL, 1985; CALLESEN et al., 1988; DE LOOS et al., 1991a; WISE et al., 1994; ASSEY et al., 1994). Dabei wurde festgestellt, daß der Progesteron Gehalt direkt nach der LH-Freisetzung leicht zunimmt, dann auf die Stufe vor dem LH-Peak abfällt, um schließlich pulsierend auf seinen höchsten Wert kurz vor der Ovulation anzusteigen. Östrogen nimmt kurz vor der Ovulation deutlich ab. Die Steroide wirken wahrscheinlich eher auf die Cumuluszellen als direkt auf die Oozyten, möglicherweise über ihre Metaboliten.

Nach PGF₂ α -Applikation (IRELAND u. ROCHE, 1982) bzw. ab dem 17. Tag des natürlichen Zyklus (IRELAND u. ROCHE, 1983a) nahm im nicht-atretischen dominanten Follikel der Gehalt an E₂, P₄ und Androgenen ständig zu. Gleichzeitig stieg auch die Bindungskapazität der Granulosazellen für hCG (Human Chorionic Gonadotropin) zu sowie für bovines FSH an. Vor der Ovulation wurde der DF als E₂-inaktiv klassifiziert. Die Autoren kamen dabei zur Schlußfolgerung, daß das E₂/P₄ Verhältnis bzw. Androgene in der Follikelflüssigkeit ein guter Indikator für die potentiell ovulatorischen Follikel sind.

KRUIP et al. (1988) berichteten, daß die hohen E₂-Werte in späteren Reifungsstadien eine schädigende Wirkung auf die Oozyten haben könnten. RIEPE (1997) kam zur Schlußfolgerung, daß Rinder, die kurz vor der Ovulation punktiert wurden, eine größere Zahl an kulturfähigen Oozyten aufwiesen.

FORTUNE u. HANSEL (1985) fanden, daß vor dem LH-Peak bei stimulierten und nicht stimulierten Tieren der E_2 -Wert in der FF sehr hoch (1100 ng/ml) war, wobei der Gehalt an Östron 20mal geringer war als die E_2 -Konzentrationen. Es gab einen Zusammenhang zwischen der Follikelgröße und dem E_2 -Gehalt. Dabei war Androstendion das dominante Androgen (278 ng/ml). Der Testosterongehalt betrug im Schnitt 150 ng/ml. Der Pregnenolonegehalt (40 ng/ml) war höher als der P_4 -Gehalt (25 ng/ml). 15 Stunden nach der Brunst nahm die E_2 -Konzentration in der FF auf 1/6 des Ausgangswerts ab und 24 Stunden nach der Brunst nahm E_2 auf 1/12 ab. Gleichzeitig nahm der P_4 -Gehalt in der FF zu, während der Pregnenolonegehalt abnahm. Sowohl vor als auch nach dem LH-Peak verhielten sich die FSH und LH Konzentrationen in der FF parallel zu den Werten im Plasma. Die stimulierten Follikel unterschieden sich 15 Stunden nach der Brunst durch 6-40mal höher E_2 -Werte von nicht stimulierten Follikel.

HYTTEL et al. (1991) konnten nach einem Stimulationsprogramm einen Zusammenhang zwischen der Kernreifung und den intrafollikulären Steroidhormonwerten feststellen. Oozyten im Ruhekernstadium (GV) stammten weitgehend aus Follikeln mit hohem E_2 und geringem P_4 Gehalt. Oozyten im MI-Stadium stammten aus Follikeln mit mittlerer Konzentration an E_2 und P_4 und Oozyten im MII-Stadium stammten aus Follikeln mit hohem P_4 -Gehalt.

Das Fehlen bzw. die Abweichungen in LH-Peak und/oder Plasma P_4 sind immer mit abnormer Steroidogenese vergesellschaftet (CALLESEN et al., 1988). Nach einem Stimulationsprogramm zeigten 78% der Tiere einen physiologischen und 22% einen veränderten LH-Peak. Tiere ohne LH-Peak zeigten ein E_2/P_4 Verhältnis um 10 (E_2 -dominant). Tiere mit unverdächtigen Plasma P_4 - bzw. LH-Werten zeigten Oozyten mit weitgehend synchroner Kernreifung und unauffälliger Steroidogenese. Tiere mit abweichenden Plasma P_4 - oder LH-Werten wiesen Oozyten mit asynchroner Kernreifung und abnormer Steroidogenese auf. JENSEN et al. (1982); GREVE et al. (1983, 1984); DONALDSON (1985); CALLESEN et al. (1988); WISE et al. (1994) bestätigen, daß das Fehlen des LH-Peaks oft zu einer schlechten Superovulationsreaktion führt.

Nach FORTUNE u. HANSEL (1985); CALLESEN et al. (1988); HYTTEL et al. (1986, 1997) sind die chronologischen Veränderungen am Kern bzw. im Zytoplasma sowie der Hormongehalt der Follikel nach PMSG- oder FSH-Superovulationsprogrammen bei Färsen und Kühen abhängig von LH-Peak (Tabelle 2).

Tab. 2 : Morphologische und hormonelle Charakteristika zur Follikelreifung nach Superovulationsregimen

Verhältnis zum LH-Peak	Kern- reifung	Zytoplasmatische Reifung	E ₂	P ₄
vor LH-Peak	Ruheke rn (GV)	Kein Perivitelliner Raum Zahlreiche Blasen, gleichmäßig verteilt Mitochondrien in großen Büscheln an Peripherie Große Cortikalgranula an Peripherie Große Golgi-Apparate an Peripherie	1100ng/ml	25ng/ml
0-2 Stunden nach LH-Peak	GV	Anbildung des Perivitellinen Raums Blasen an Zentrum von Ooplasma	696ng/ml	52ng/ml
9-12 Stunden nach LH-Peak	GVBD	Abbruch der Verbindung zwischen Cumuluszellen und Oolemm		
15 Stunden nach LH-Peak	M I	Gleichmäßige Verteilung der Mitochondrien-Büscheln in Ooplasma	84ng/ml	88ng/ml
19 Stunden nach LH-Peak	M I, M II	Abschnürung der ersten Polkörper Ansammlung der Mitochondrien an Polkörper		
21-22 Stunden nach LH-Peak	M II	Migration der Cortical-granula in Einzellige Abnahme an Größe der Golgi-Apparate Abnahme des Endoplasmatischen Reticulums	66ng/ml	154ng/ml

2.5. Ovulation

Die Oozyte wird aus dem Graafschen Follikel bei der Ovulation eine bestimmte Zeit nach dem LH-Anstieg freigesetzt. Die Freisetzung der Oozyte ist das Resultat komplexer hormoneller, enzymatischer und mechanischer Prozesse. Der wichtigste hormonelle Mechanismus ist der positive Östrogen-Feedback, der durch die präovulatorisch stark ansteigende Östrogenproduktion des reifenden Follikels ausgelöst wird (DÖCKE, 1994). Dieser wirkt auf das Zentralnervensystem und die Hypophyse und führt dabei zu einem plötzlichen Anstieg der LH Freisetzung (LH-Peak) sowie zur Auslösung der Brunstsymptome. In der Endphase der präovulatorischen Reifung ca. zwei Stunden vor der Ovulation wird ein kleines Gebiet der Wand des Graafschen Follikels und der darüberliegenden Ovarrinde dünn und durchscheinend und bildet das Stigma (DIELEMAN u. BEVERS, 1987). Zur Bedeutung der Veränderungen in der Follikelwand sind mehrere Mechanismen diskutiert worden. Oftmals wurde angenommen, die Ovulation erfolge durch Druckzunahme der Follikelflüssigkeit (ASDELL, 1962). Aber die Ovulation ist kein explosiver Vorgang, und manometrische Messung haben ergeben, daß der intrafollikuläre Druck um einen Wert schwankt, der demjenigen des Kapillardruckes entspricht (BAKER, 1972). Die wahrscheinlichste Theorie beruht auf der Vorstellung, daß das blasenartige Stigma durch Ischämie der Kapillaren zustande kommt (BAKER, 1972). Nekrotische Änderungen in der Granulosamembran, die zur Durchsichtigkeit des Stigmas führen, könnten auf der Wirkung von Enzymen beruhen. ESPEY (1994) vermutet, daß die Ovulation ein entzündlicher Prozeß ist. Das Bindegewebe der Tunica albuginea bzw. der Theca externa würde durch einen entzündlichen Prozeß erweichen. Dieser Prozeß könnte durch LH induziert sein. Ein leichter Anstieg des intrafollikulären Druckes, welcher aus Blutgefäßen in der Theca interna stammt, führt zur Ruptur der Follikelwand und zum Ausstossen der Oozyte aus dem Follikel. Bei der Ovulation reißt die Blase auf, und die Follikelflüssigkeit tropft langsam ab. Der Vorgang verläuft selten explosiv, und das Abtropfen der leicht viskösen Follikelflüssigkeit dauert einige Zeit. Die frei in der Flüssigkeit flottierende Oozyte gelangt passiv mit abgelösten Granulosazellen aus dem Follikel heraus und wird durch einen Zilienstrom zum Eileiter geleitet.

Eine Abweichung im LH-Spiegel ist häufig mit einer Störung der Ovulation des Follikels vergesellschaftet (CALLESEN et al., 1988). Geringe P₄-Konzentrationen im Blut stimulieren den Follikel weiter zu wachsen und verhindern dabei die rechtzeitige Ovulation des Follikels

(FORTUNE et al., 1991). Streß wie beispielsweise hohe Milchleistung, subklinische Krankheiten, Störungen bei Fütterung, Klima oder Transport verhindert oder verzögert den LH-Peak und damit die Ovulation (GLATZEL, 1999).

Literaturangaben zum Auftreten des LH-Peaks bzw. der Ovulation nach $\text{PGF}_2\alpha$ -Applikation bei nicht-stimulierten bzw. stimulierten Tieren sind in Tabellen 3 und 4 aufgeführt. Die stimulierten Tiere zeigten den LH-Peak früher und kamen früher zur Ovulation als die nicht stimulierten (MAURER et al., 1989). Bei einer induzierten Luteolyse steigt der LH-Spiegel bei Färsen schneller an als bei Kühen (NKUUHE u. MANNS, 1985). Der LH-Peak tritt bis zwölf Stunden nach Brunstbeginn ein (WALTON et al., 1987) und bleibt auf diesem Plateau fünf bis elf Stunden (MÜLLER et al., 1982, BERNARD et al., 1984).

Tab. 3: Auftreten des LH-Peak bzw. der Ovulation nach $\text{PGF}_2\alpha$ -Applikation bei nicht stimulierten Tiere

Autoren	Tiere	Intervall (Stunden)	
		$\text{PGF}_2\alpha$ Applikation- LH Peak	LH Peak- Ovulation
MÜLLER et al., 1982	Kühe	48-76	
JACKSON u. FURR, 1983	Färsen	57,5	27,5
NKUUHE u. MANNS, 1985	Färse	62	22
	Kühe	71	28
WALTON, et al., 1987	Kühe	84	
HYTTEL et al., 1989	Färsen u. Kühe		24
SAVIO et al., 1990	Färsen	55-60	
MILDNER u. FREYMANN, 1992	Färsen	57-76	17-23

Tab. 4: Auftreten des LH-Peak bzw. der Ovulation nach PGF₂α- Applikation
bei stimulierten Tieren

Autoren	Tiere	Stimulations- programme	Intervall (Stunden)	
			PGF ₂ α Applikation -LH Peak	LH Peak -Ovulation
SAUMANDE, 1980	Färsen	PMSG	31-59	
YADAV et al., 1985	Färsen	PMSG oder FSH	43	
CALLESEN et al., 1986	Färsen u. Kühe	PMSG oder FSH	38	24
DIELEMAN u. BEVERS, 1987	Färsen	PMSG/ Anti PMSG		22-30
CALLESEN et al., 1988	Färsen u. Kühe	PMSG oder FSH	20-53	
HYTTEL et al., 1989	Färsen u. Kühe	PMSG oder FSH		24-33
DE LOOS et al., 1991a	Färsen	PMSG/ Anti PMSG		22-30
DE LOOS et al., 1991b	Färsen	PMSG/ Anti PMSG		24-26

2.6. Superovulation

Das Prinzip der Superovulation besteht darin, durch eine hormonelle Stimulation ein verändertes Follikelwachstum und entsprechend eine vergrößerte Ovulationsrate zu erreichen. Zur Superovulationseinleitung beim Rind im Rahmen des routinemäßigen Embryotransfers wird weltweit PMSG oder FSH verwendet (GLATZEL et al., 1999).

PMSG ist ein Glucoprotein, das in den "endometrial cups" der Stutenmucosa zwischen dem 37. und dem 150. Tag der Trächtigkeit produziert wird (COLE u. GOSS 1943; ALLEN u. STEWARD, 1978). Beim Rind wird PMSG einmalig in einer Dosierung von 2000 bis 3000 I.E. verabreicht (HAHN, 1992). Kennzeichnend für das PMSG ist seine lange Halbwertszeit (ca. 120 Stunden), die durch den hohen Anteil von Sialinsäure im Molekül bedingt ist (SCHAMS et al., 1978). Die lange Halbwertszeit bringt es jedoch als unerwünschte Nebenwirkung mit sich, daß noch weitere Follikel nach dem LH-Peak und den ersten Ovulationen heranreifen und Östrogen sezernieren, was die frühe embryonale Entwicklung beeinträchtigen kann. Deshalb wird versucht, die Wirkung von PMSG durch die Injektion von PMSG-Antiserum zum Zeitpunkt der Brunst aufzuheben (DIELEMAN et al., 1987). Diese Reduktion führt zu einem Anstieg der Ovulationsrate und zu erhöhten Zahlen an transfertauglichen Embryonen.

Bei den ersten Versuchen, eine Superovulation zu induzieren, wurde das PMSG einige Tage vor dem erwarteten Termin einer spontanen Brunst (am 16. oder 17. Zyklustag) injiziert (UMBAUGH, 1949). Später zeigte sich, daß das Zeitintervall zwischen Hormongabe und Ovulation für die Ovarreaktion sehr wichtig ist. So erzielte BETTERIDGE (1977) die besten Resultate bei einem Intervall von vier Tagen. Wenn das Gonadotropin in der Lutealphase injiziert wird, wird die Brunst mittels Prostaglandin $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) künstlich ausgelöst. Die Prostaglandininjektion zur Brunstauslösung erfolgt 36 bis 60 Stunden nach PMSG (DIELEMAN et al., 1987; HAHN, 1992). Zahlreiche Autoren berichteten, daß der Beginn der Gonadotropinbehandlung zwischen dem 8. und 14. Zyklustag die besten Erfolge bei der Stimulation der Ovarien bringt (GREVE, 1976; SAUMANDE u. CHUPIN, 1977; HAHN, 1992; BUSSE, 1995).

Bei dem follikelstimulierenden Hormon (FSH) handelt es sich um Extrakte aus biologischem Material. Es wird aus Schweine- oder Schafhypophysen gewonnen, so daß Verunreinigungen mit dem luteinisierenden Hormon (LH) bzw. sämtlichen übrigen Hypophysenhormonen zu erwarten sind (DÖCKE, 1994). In kommerziellen FSH-Präparaten variieren die Anteile an FSH und LH stark. CHUPIN et al. (1984) konnten einen signifikanten Anstieg der

Ovulationsrate und der Zahl transfertauglicher Embryonen nachweisen, wenn FSH-Chargen mit geringem LH-Anteil zur Superovulation verwendet wurden. Die Autoren führten diese Resultate darauf zurück, daß der LH-Anteil in den FSH-Präparaten bei einem Teil der Oozyten zu einer frühzeitigen Reifung führt, so daß sie zum eigentlichen Ovulationstermin nicht mehr befruchtungsfähig sind.

Das FSH hat im Gegensatz zum PMSG eine kurze Halbwertszeit von etwa sechs bis zwölf Stunden (DÖCKE, 1994) und wird aus diesem Grund zweimal täglich, an vier bis fünf aufeinander folgenden Tagen appliziert (HAHN, 1992). Die Gesamtdosierung beträgt dabei zwischen 30 und 50 mg.

Die Prostaglandinapplikationen erfolgen zwölf Stunden vor und mit der letzten FSH-Injektion.

Zusammenfassend beurteilen ELDSEN et al. (1978); MONNIAUX et al. (1983, 1984) und GLATZEL et al. (1999) die FSH-Präparationen im Vergleich zum PMSG als geeigneter für die Superovulationseinleitung bei Rind. Dagegen konnten CRITSER et al. (1980) keinen Unterschied in der Effektivität zwischen FSH- und PMSG-Stimulation beobachten.

2.7. Corpus luteum

Der präovulatorische LH-Peak induziert im Follikel schon vor der Ovulation eine Sequenz von morphologischen und biochemischen Veränderungen, welche die Follikelzellen in Cl umwandeln (NISWENDER et al., 1994). Es wird eine endokrine Drüse innerhalb der Ovarrinde gebildet. Zunächst kollabiert der Follikel, und die Membrana Granulosa legt sich in Falten. Die Reste des Follikelraumes werden schnell durch die Proliferation der Granulosazellen verschlossen, die in Luteinzellen umgeformt werden (O'SCHE et al., 1980). Es kommt zu einem Einwachsen von Kapillaren von der Theca interna ausgehend. Einige Thecazellen dringen zusammen mit den Kapillaren ein und bilden Wände, die Trabekel. Es werden im sich anbildenden Corpus luteum (Cl) zwei Luteinzelltypen unterschieden. Dabei gehen aus den Granulosazellen große und aus den Thecazellen kleine Luteinzellen hervor (ALILA u. HANSEL, 1984). Die Hauptkomponente der Drüsen stammt aber von der Granulosaschicht (BAKER, 1972).

Eine wichtige Funktion des Corpus luteum (Cl) besteht in der Sekretion des Steroidhormons, Progesteron, das die Länge des Brunstzyklus kontrolliert und wichtig für die Aufrechterhaltung der Gravidität ist. LH induziert die Progesteronsynthese des Cl (NISWENDER u. NETT, 1988). Die Anzahl von LH-Rezeptoren am Cl erreicht ihre

Maximalzahl bis zur Mitlutealphase (DIEKMAN et al., 1978). Das Cl beginnt zwischen dem Tag 2 und 4 des Brunstzyklus mit der Progesteronproduktion (MÜLLER et al., 1982; TABAN u. HANN, 1984; DIAZ et al., 1986). Diese wird bis zum 16./17. Zyklustag aufrechterhalten. Die Progesteronkonzentration im Plasma und die Fläche an hormonproduzierendem Lutealgewebe sind bei zyklischen wie bei trächtigen Tieren positiv miteinander korreliert (KNOPF, 1990). Eine funktionelle Beeinträchtigung durch den Hohlraum scheint nicht gegeben.

Der Funktionszustand des Cl kann durch Bestimmung des P₄ im Blutplasma oder in der Milch nachgewiesen werden (KOCH u. GLATZEL, 1990). Im Proöstrus und während des Östrus ist die P₄-Konzentration kaum meßbar mit Werten unter 1 ng/ml (MÜLLER et al., 1982; DIAZ et al., 1986). Im frühen Diöstrus beginnt das sich anbildende Cl mit der P₄-Synthese. Bis zum 6. Zyklustag steigen die Werte im Blut nur langsam an (TABAN u. HANN, 1984). Vom 7. bis zum 12./13. Zyklustag steigt das Progesteronniveau wesentlich schneller (DIAZ et al., 1986). Die höchsten P₄-Werte werden zwischen dem 10. und 17. Zyklustag gemessen (STEVENSON et al., 1984; DIAZ et al., 1986). Ab dem 16./17. Tag ist bis zum Eintreten der Brunst eine drastische P₄-Abnahme zu verzeichnen (SCHALLENBERGER et al., 1985; DIAZ et al., 1986; KOCH u. GLATZEL, 1990).

Das Cl hat eine begrenzte Lebensdauer, die davon abhängt, ob eine Gravidität eintritt oder nicht. Am Ende der Cl-Funktion hört die Sekretion des Progesterons auf, und die Luteinzellen degenerieren (NISWENDER et al., 1994). Das grundsätzliche luteolytische Signal beim Rind ist ProstaglandinF₂α .

Die Sekretion von PGF₂α wird durch die Oxytocinausschüttung vom Cl gesteuert (BRITT, 1992). Beim Vorhandensein einer großen Anzahl von Oxytocinrezeptoren am Uterus kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von PGF₂α. Die Bildung von Oxytocinrezeptoren ist von der Östrogenkonzentration bzw. von der Progesteronkonzentration im Laufe des Zyklus beeinflusst. Die Rückbildung wird durch die Infiltration von Fibroblasten vollendet, die ein Narbengewebe bilden (Corpus albicans).

Unmittelbar im Anschluß an die Ovulation ist das sich neu formierende Corpus luteum ultrasonographisch nicht zu erkennen (PIERSON u. GINTHER 1984, 1988; EDMONDSON et al., 1986; KÄHN, 1986; FIGUBEIREDO et al., 1997). Mit zunehmender Luteinisierung kann das junge Cl nach KÄHN (1986) ab dem 2. Zyklustag nach der Brunst echographisch ermittelt werden. Während PIERSON und GINTHER (1984, 1988) dies erst am 3. Zuklustag gelingt, nennen EDMONDSON et al. (1986) den 4. Tag nach der Brunst als Zeitpunkt des ersten Nachweises eines neuen Cl. Bis zur Zyklusmitte stellt KÄHN (1988) eine stetige

Längen- und Volumenzunahme des CI fest, danach wird eine Verringerung beider Werte deutlich. Im Rahmen einer natürlichen oder durch PGF₂α-Applikation induzierten Luteolyse verringert sich der Durchmesser des CI rasch (MÜLLER, 1985; QUIRK et al., 1986). In diesem Zusammenhang werden die Grenzen des CI zum Ovarstroma undeutlich und ab 52 Stunden nach Applikation von PGF₂α kann das CI sonographisch nicht mehr identifiziert werden (MÜLLER, 1985).

Der Einfluß des CI auf die Follikelaktivität wurde in der Literatur kontrovers diskutiert. IRELAND et al. (1979); KÄHN, (1988); KNOPF (1990) berichteten von einem fehlenden Zusammenhang zwischen dem CI und den Follikeln während des Zyklus. MATTON et al. (1981) beobachtete, daß der Einfluß des CI auf den DF sich während des Zyklus verändert. Zwischen dem 8. und 13. Zyklustag war der DF größer, wenn er kontralateral zum CI lag. STAGMILLER u. ENGLAND (1982) fand, daß der DF größer war, wenn er ipsilateral zum CI lag. PIERSON u. GINTHER (1987) berichteten, daß der DF der ersten Welle häufiger auf dem rechten Ovar anzutreffen war. Bei Rindern konnte bisher eine deutliche Beeinflussung der Follikelentwicklung durch das CI nur nach einer Geburt festgestellt werden. Auf dem graviden Uterushorn bzw. dem zum CI graviditatis gleichseitig gelegenen Ovar waren Anzahl und Wachstum der nicht-atretischen Follikel gering (DUFOUR u. ROY, 1985). Der DF konnte in den meisten Fällen auf dem Ovar gefunden werden, welches dem Corpus albicans der letzten Trächtigkeit gegenüberlag (SPICER et al., 1986; NATION et al., 1999). Dieser hemmende Effekt des alten Trächtigkeits-CI auf die Follikelentwicklung scheint nur in den ersten Wochen nach der Geburt aufzutreten. Nach einem Stimulationsprogramm erfolgten die Ovulationen auf den CI-tragenden Ovarien früher als auf dem gegenüberliegenden (FEHRN et al., 1990).

2.8. Endokrinologie des dominanten Follikels

2.8.1. Steroidbiosynthese

Die Steroidbiosynthese des DF bedingt das Zusammenspiel zwischen folliculären Zellen und Gonadotropinen. Östrogene bauen Rezeptoren auf. Rezeptoren für hypophysäre Hormone entstehen erst nach der Antrumbildung. Mit dem Wachstum des Tertiärfollikels nehmen die Gonadotropinrezeptoren ständig zu (CHANNIG u. KAMMERMAN, 1974). FSH-Rezeptoren sind dabei nur an den folliculären Granulosazellen zu finden, während LH-Rezeptoren an Theca- und Granulosazellen vorhanden sind. Nach der Interaktion der Gonadotropine mit ihren Rezeptoren auf der Oberfläche der Granulosa- und Thekazellen wird der cAMP-abhängige Prozeß der Steroidbiosynthese speziell des Östradiol gesteigert (MERZ et al., 1981; ENGLAND et al., 1981; WEBB u. ENGLAND, 1982; IRELAND u. ROCHE, 1987; DÖCKE, 1994). Es wird in den Thekazellen sowie den Granulosazellen aus Cholesterin Progesteron gebildet (HILLIER, 1981). Dieses wird umgewandelt in 17α -Hydroxyprogesteron, woraus die Androgene (Androstendion, Testosteron) synthetisiert werden. Androgene können die Basalmembran der Granulosazellen penetrieren (Zweizell-Zweihormon-Theorie) und werden dort zu Östrogenen umgewandelt (HANSEL u. FORTUNE, 1978; DÖCKE, 1994).

Die Voraussetzung für die steroidale Biosynthese ist die vorherige Synthese von Enzymen. Diese Enzymsynthese wird durch LH und FSH auf genexpressivem Weg induziert.

Cytochrom P450_{sc} ist ein Enzym, welches Cholesterin zu Pregnenolon umwandelt. Sein Gehalt ist in präovulatorischen Follikeln größer als in kleinen antralen Follikeln.

Die weitere Metabolisierung des Pregnenolons in Progesteron wird durch 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3β -HSD) gesteuert, welche durch LH sowohl in Granulosa- als auch in Thekazellen synthetisiert wird.

Die 17α -Hydroxylase P450 ($P450_{17\alpha}$) ist ein Peptid, welches nur in den Thekazellen festgestellt wird. Es ist entscheidend für die Metabolisierung von Progesteron zu Androstendion. Die basale LH-Konzentration stimuliert die $P450_{17\alpha}$ -Aktivität. Mit der Luteinisierung verlieren die Thekazellen die LH-vermittelte $P450_{17\alpha}$ -Aktivität.

Der limitierende Schritt der Östradiol- 17β -Synthese wird in den Granulosazellen durch Cytochrom P450 katalysiert. Die Aromatasesaktivität wird insbesondere durch FSH und Östradiol selbst gesteigert. Östradiol wirkt somit als Regulator der gesamten Steroidsynthese (FORTUNE u. HANSEL, 1979; FORTUNE, 1986; FORTUNE u. QUIRK, 1988; DÖCKE,

1994) und wirkt als Mitosestimulator für die Granulosazellen und fördert gemeinsam mit FSH die Ausbildung von LH-Rezeptoren. Darüber hinaus hemmt es dosisabhängig die Progesteronsekretion durch Hemmung der 3 β -HSD.

FSH steigt zwei Tage vor Eintritt jeder Follikelwelle an (ADAMS et al., 1992; RHODES et al., 1995) und nimmt 16 bis 32 Stunden nach DF-Divergenz wieder ab (GINTHER et al., 1998). Während der Entwicklung des DF ist FSH im Plasma minimal (SUNDERLAND et al., 1994). Deswegen vermuteten MIHM et al. (1995), daß die Entwicklung des DF wahrscheinlich FSH unabhängig ist. Dagegen sprachen TURZILLO u. FORTUNE (1990) von der essentiellen Bedeutung der minimalen FSH-Ausschüttung für die Entwicklung des DF.

Pulsfrequenz und Konzentration des LH sind hoch während der Entwicklung des DF der ersten Follikelwelle. Hohe Östradiol (E₂)- und niedrige Progesteron (P₄)- Werte am Anfang und am Ende des Zyklus modulieren dabei den Anstieg in der Pulsfrequenz und damit auch der Konzentration von LH (RHODES et al., 1995; BERGFELT et al., 1996). LH nimmt 16 bis 32 Stunden nach DF-Divergenz zu (GINTHER et al., 1998). Die LH- Pulsfrequenz bleibt bis zum 4. Tag nach der Ovulation hoch, dann nimmt sie zur Mitte der Lutealphase ab (RAHE et al., 1980; WALTER u. SCHALLENBERGER, 1984). Eine Zunahme in der P₄-Konzentration führt zur Abnahme der LH- Pulsfrequenz bzw. LH-Konzentration (RHODES et al., 1995).

2.8.2. Wachstumsfaktoren

In jüngerer Zeit bewiesen einige Autoren, daß intrafollikuläre Substanzen, so genannte Wachstumsfaktoren, die Follikulogenese beeinflussen können (MONNIAUX et al., 1997). Solche Substanzen sind spezifische Proteine und bewirken im Zusammenhang mit Gonadotropinen eine Zellproliferation bzw. -differenzierung. Die Substanzen wurden anhand ihrer Struktur bzw. biologischen Wirkungen in bestimmte Familien unterteilt: Epidermal Growth Faktor (EGF), Fibroblast Growth Faktor (FGF), Platelet-Derived Growth Faktor (PDGF), Insulin-Like Growth Faktor (IGF) und Transformation Growth Faktor- β (TGF- β), welcher Inhibin und Aktivin umfaßt.

Die Granulosazellen produzieren IGF (HERNANDEZ et al., 1989; OLIVER et al., 1989), FGF (NEUFELD et al., 1987), Inhibin (FINDLAY et al., 1990) und Aktivin (NEUFELD et al., 1987). Von den Follikelthekazellen wird EGF (SKINNER et al., 1987) erzeugt. TGF β kommt sowohl in den Granulosazellen als auch in den Thekazellen vor (SKINNER et al., 1987).

Bindungsproteine (BP) modifizieren intrafollikulär die Bioaktivität der Wachstumsfaktoren (MONNIAUX, et al., 1997).

FSH induziert die Aromatisierung in den Granulosazellen (McNATTY et al., 1985). IGF1 (ADASHI et al., 1985c), TGF β (ADASHI u. RESNIK, 1986) und Aktivin (FINDLAY et al., 1990) unterstützen hierbei die FSH-Wirkung bei der Aromatisierung. Dagegen hemmen EGF (HUEH et al., 1981) und IGF-Bindungsproteine (BICASAK et al., 1990) die aromatisierende Wirkung des FSH.

Auch die Wirkung des LH wird durch diese Wachstumsfaktoren modifiziert. Während IGF1 unterstützt, hemmt EGF die Wirkung des LH bei gleichzeitiger Produktion von Androgenen in den Thekazellen (CAUBO et al., 1989). Inhibin fördert die Reaktion des LH, während Aktivin sie hemmt (FINDLAY et al., 1990).

IGF, EGF und TGF α unterstützen das Wachstum der kleinen antralen Follikel durch Steigerung der Proliferation von Granulosazellen (MONNIAUX et al., 1997).

Der Insulin-Like Growth Faktor-1 (IGF-1) modulierte sowohl die Proliferations- als auch die Differenzierungsprozesse der Granulosazellen und kooperiert mit FSH und LH bei der Regulation der Steroidsynthese (ADASHI et al., 1985b; SCHAMS et al., 1988). Die Synthese des IGF-I und IGF-II erfolgt über genexpressive Wege in den Follikelzellen (SPICER und APLIZOR, 1993). Nach ihrer Synthese erfolgt die Bindung an IGF-Bindungsproteine, welche den Transport zu den Rezeptoren vermitteln und gleichzeitig die Wirkung und Halbwertszeit der IGF verlängern. Es gibt verschiedene Klassen dieser Bindungsproteine mit sowohl stimulierender als auch inhibierender Wirkungsvermittlung. ERICHSON et al. (1992) konnten nachweisen, daß IGFBP-4 nur in atretischen Granulosazellen Graafscher Follikel vorhanden ist und zyklusabhängigen Veränderungen unterliegt. ADASHI et al. (1985a) bestätigen, daß FSH die Produktion von IGFBP in Granulosazellen hemmt.

Inhibin ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 58 kD (FINDLAY, 1986). Als Heterodimer gehört es gemeinsam mit Aktivin zur TGF-Superfamilie. Inhibin besteht aus α - und β -Untereinheiten, während Aktivin aus β -Einheiten aufgebaut ist.

Inhibin kommt in hoher Konzentration in der Follikelflüssigkeit landwirtschaftlicher Nutztiere vor (MARTIN et al., 1991; SUNDERLAND et al., 1996).

Die Applikation von Inhibin bei Schafen (FINDLAY et al., 1986) und bei Rindern (BEARCH, et al., 1989) senkt die Syntheserate von mRNA für die β -Untereinheit des FSH in der Hypophyse und die Konzentration von FSH im Blutkreislauf. FINDLAY et al. (1986) konnten eine dosisabhängige Unterdrückung von FSH durch rekombinantes humanes Inhibin

in ovariectomierten Schafen nachweisen. Eine LH-Beeinflussung war nicht nachzuweisen (FINDLAY, 1986; YING et al., 1988).

MARTIN et al. (1988) konnten einen synergistisch hemmenden Effekt von Östradiol und Inhibin bei Schafen feststellen. MANN et al. (1989) stellten fest, daß während der Follikelwachstumsphase Östradiol der Hauptregulator der FSH-Ausschüttung ist. Zwischen der Östradiol-Sekretion und der FSH-Konzentration bestand über den gesamten Zyklus eine negative Korrelation. Ähnlich verhalten sich Inhibin und FSH in der frühen Zyklusphase, um im späteren Zyklusverlauf parallel zu verlaufen (BAIRD et al., 1991). Die Autoren schlußfolgern daraus, daß Inhibin mit einer wesentlich längeren Halbwertszeit als Östradiol für den allgemeinen negativen Feedback-Mechanismus ab einem bestimmten Schwellenwert verantwortlich ist.

2.8.3. Hormongehalt des dominanten Follikels in Abhängigkeit von

2.8.3.1. Follikelgröße

Die E_2 -Konzentration war immer in großen höher als in kleinen Follikeln (IRELAND et al., 1979, SILVAN et al., 1993, BADINGE et al., 1992). KRUIP u. DIELEMAN (1985) fanden, daß der nicht atretische Follikel über 8 mm Durchmesser immer E_2 dominiert war. STAIGMILLER et al. (1982) berichteten, daß von den großen Follikeln nur ein Follikel hohe E_2 -Konzentration (> 500 ng/ml) zeigte. TSONIS et al. (1984b) berichteten von 8-10mal höheren Aromataseaktivitäten in großen als in kleinen Follikeln. Dagegen fanden SUNDERLAND et al. (1994), daß am 12. Zyklustag die E_2 Konzentration in kleinen Follikeln höher als im DF war. Dabei bestanden positive Zusammenhänge zwischen der Follikelgröße und dem E_2/P_4 Verhältnis in der Follikelflüssigkeit (GLATZEL, 1992).

P_4 war in untergeordneten Follikeln höher als im DF (IRELAND et al., 1979; SUNDERLAND et al., 1994). P_4 nimmt zwischen Tag 5 und 12 in untergeordneten Follikeln linear zu. Dagegen sprachen HENDERSON et al. (1982) und HUSS (1991) von keiner Korrelation zwischen Größe bzw. Volumen der Follikel und ihrem P_4 Gehalt. P_4 in der Follikelflüssigkeit (FF) verhält sich immer gegenläufig zu den entsprechenden Östradiolkonzentrationen (GLATZEL u. HUSS, 1989; HUSS, 1991).

Nicht atretische Follikel kleiner als 8 mm Durchmesser sind allgemein androgen dominant (KRUIP u. DIELEMAN, 1985).

2.8.3.2. Entwicklungsstatus des dominanten Follikels

Während der Entwicklung des non- bzw. ovulatorischen dominanten Follikels zeigt sich ein hoher Gehalt an E_2 (HENDERSON et al., 1982; MARTIN et al., 1991, BECKER, 1994). Wenn der DF seine Maximalgröße erreichte, nahm das E_2 in der FF ab. Das E_2 nahm in der FF vom Beginn des Wachstums bis zur späteren Plateauphase ab (PRICE et al., 1995; SINGH et al., 1998). Eine Atresie bedingte einen fortschreitenden Abfall von E_2 im DF (GINTHER et al., 1997). Die DF, welche sich in Regression befanden, wiesen histologisch Anzeichen der Atresie aber keine Östrogen Dominierung auf (GUILBAULT et al., 1993; PRICE et al., 1995). Das E_2 und E_2/P_4 Verhältnis unterscheiden sich nicht bei Follikeln über 5 mm am Tag nach der Ovulation. Erst wenn die Wachstumsrate zwischen dem DF und den untergeordneten Follikeln sich unterscheidet, fängt die Abweichung im E_2 -Gehalt zwischen dem DF und den untergeordneten Follikeln an (SUNDERLAND et al., 1994). Das E_2 nahm in untergeordneten Follikeln nach dem 2. Zyklustag nicht mehr zu (GINTHER et al., 1997).

Während der Entwicklung des DF nimmt sein P_4 -Gehalt ständig zu (MATRIN et al., 1991). Dagegen berichteten SINGH et al. (1998), daß der DF einen konstanten P_4 -Gehalt während seiner Entwicklung zeigte. Eine Atresie des DF führt zur stufenweisen Zunahme seines P_4 -Gehaltes (GINTHER et al., 1997; SINGH, 1998). Außer im Fall des präovulatorischen Stadiums, bei dem eine hohe P_4 -Konzentration ein Zeichen für einen reifen Follikel ist, ist ein hoher P_4 -Wert ein Merkmal für einen degenerierten Follikel (KRUIP u. DIELEMAN, 1985). Wenn der dominante Follikel an Größe zunimmt, sinkt sein Gehalt an Androgenen und Testosteronen (HENDERSON et al., 1982). Der Androgengehalt ist in nicht atretischen DF immer gering (FORTUNE, 1994).

Während der Entwicklung des nicht-ovulatorischen DF nimmt sein Gehalt an Inhibin zu (MARTIN et al., 1991). Beim Wachsen des ovulatorischen DF nimmt jedoch sein Inhibin Gehalt ab. Eine Atresie des DF führt zum Abfall seines Inhibingehaltes (SUNDERLAND et al., 1996).

2.8.3.3. Zyklusstadium

Die Aromataseaktivität und der E₂-Gehalt des DF waren am 5. Zyklustag höher als am 8. oder am 12. (BADINGA et al., 1992). Die E₂-Konzentration in DF verhält sich kurvilinear als Sequenz des langsamen Anstiegs zwischen Tag 2 und 3 und mit schnellem Anstieg zwischen Tag 3 und 4 des Zyklus (GINTHER et al., 1997). Der größte Follikel in der frühen Lutealphase hatte einen E₂-Gehalt ähnlich dem eines Follikels während einer folliculären Phase (KRUIP u. DIELEMAN, 1985). Der DF wurde als Östrogen-aktiv am 1., 3. und 6. Zyklustag und Östrogen-inaktiv am 12. Zyklustag bezeichnet (SUNDERLAND et al., 1994). Zwischen dem 5. und 8. Zyklustag sank der E₂-Gehalt des DF auf ein Drittel und fiel zum 11. Tag weiter ab. Das E₂/P₄ Verhältnis kann Auskunft über einen potentiellen dominanten und atretischen Follikel geben, aber nicht die Follikelgröße allein (IRELAND et al., 1979; IRELAND u. ROCHE, 1982, 1983a,b, 1987; SUNDERLAND et al., 1994).

2.9. Biotechnische Bedeutung des dominanten Follikels

2.9.1. Bei Brunstsynchronisation mit

2.9.1.1. PGF₂α

Die häufigste Methode, beim Rind die Brunst einzuleiten oder zu synchronisieren, ist die Injektion von PGF₂α während der Lutealphase (INSKEEP, 1973; GLATZEL et al., 1980; GLATZEL et al., 1983; ODDE, 1990; LARISON u. BALL, 1992). Trotz umfangreicher Anwendung von PGF₂α unterliegen die Ergebnisse der Behandlung deutlichen Variationen (GLATZEL et al., 1983; WATTES u. FUGUAY, 1985; TABAN u. HAHN, 1984; KANITZ et al., 1996). Literaturangaben zum Intervall zwischen der PGF₂α-Behandlung und dem Eintritt der Brunst in Abhängigkeit vom Tag der Verabreichung sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tab. 5: Intervall bis zum Brunsteintritt nach PGF₂α-Injektion an verschiedenen Zyklustagen

Autoren	Zyklustage zur Zeit der PGF ₂ α-Injektion	Intervall (Stunden) PGF ₂ α-Brunsteintritt
GLATZEL et al., 1980	11	48-72
KING et al., 1982	5-9	47
	10-15	59
	3	0
MOMNT u. SEGUIN, 1982	5	50
	10	78
	17	48
	7	59
	11	71
TABANE u. HAHN, 1984	15	72
	5-7	59
	8-11	71
WATTS u. FUQAY, 1985	12-15	72
	7	48-120
	5	57
MILDNER u. FREYMANN, 1992	8	63
	11	76
	14	70

Frühere Studien führten zur Annahme, daß die Reifung des Cl zur Zeit der PGF₂α-Applikation die Luteolyse beeinflussen könnten (MOMENT u. SEGUIN, 1982). Das Cl reagiert erst ab Tag 5 oder 6 des Brunstzyklus auf PGF₂α. Bei Kühen, bei denen die Luteolyse erfolgreich induziert wurde, verteilte sich die Brunst über 5 Tage (GLATZEL et al., 1980; SEGUIN, 1987). Warum ein Teil der Tiere, denen PGF₂α in der Lutealphase verabreicht wurde, in den ersten zwei bis drei Tagen nach der Behandlung keine Brunsterscheinungen zeigten obwohl die Luteolyse erfolgreich induziert worden war, konnte bis vor kurzem noch nicht erklärt werden. Untersuchungen über die folliculäre Dominanz haben gezeigt, daß das Entwicklungsstadium des DF bei PGF₂α-Applikation den Zeitpunkt bestimmte, zu dem das Tier wieder in Brunst kam (KASTELIC et al., 1990; SAVIO et al., 1990; DRIANCOURT et al., 1991). Wenn PGF₂α während der Wachstumsphase oder der frühen Plateauphase des DF

der ersten Welle injiziert wird, dann ovuliert dieser Follikel nach ca. drei bis vier Tagen. Werden dagegen Prostaglandine während der späteren Plateauphase injiziert, so scheint der DF seine funktionelle Dominanz bereits verloren zu haben. Er ist nicht in der Lage zu ovulieren, entwickelt sich zurück und ein Follikel der nächsten Welle wird angebildet, um fünf bis sechs Tage nach der PG-Injektion zu ovulieren (STOCK u. STOLLA, 1995).

Auch nach einer zweimaligen $\text{PGF}_2\alpha$ -Applikation im Abstand von elf Tagen, wie sie üblicherweise angewendet wird, muß man damit rechnen, daß der Brunsteintritt relativ variabel ist (GLATZEL et al., 1980, 1983; ODDE, 1990). Das Ausbleiben der Brunst nach der zweiten $\text{PGF}_2\alpha$ -Applikation bei einem Teil der behandelten Tiere wurde früher vor allem darauf zurückgeführt, daß solche Tiere nach der ersten Behandlung verspätet ovulieren und dann eine verzögerte Gelbkörperanbildung durchmachen. Deshalb soll das CI bei der zweiten Behandlung noch nicht ansprechbar sein (STOCK und STOLLA, 1995; GLATZEL, 1997).

2.9.1.2. Progesteron

Seit Jahren werden beim Rind das natürliche Progesteron oder synthetische Gestagene zur Brunstinduktion und -synchronisation eingesetzt (WILTBANK et al., 1965). Die Präparate können auf verschiedene Weise appliziert werden, und zwar per i.m. Injektionen (Progestagene), subkutan mittels eines Implantants (Norgestomat), oral (Melengesterol Acetat) oder intravaginal mit Hilfe einer Spirale (Progesterone Releasing Intravaginal Device, PRID). Unabhängig von der Art der Verabreichung ist das Ziel dieser Behandlung, eine künstliche Lutealphase mit Hemmung der hypophysären Gonadotropin-Ausschüttung zu schaffen (für ≥ 14 Tage), und durch Absetzen der Gestagenbehandlung den lutealen Regressionprozeß nachzunehmen (STOCK u. STOLLA, 1995; GLATZEL, 1997). Infolge des Progesteronabfalls steigen die Konzentrationen der Gonadotropine FSH und LH an "Rebound Effekt", so daß Brunst und Ovulation induziert werden. Obwohl die meisten Tiere nach dem Absetzen von Progesteron deutliche Brunstsymptome zeigen, sind die Konzeptionsraten nach einer solchen Behandlung niedrig (CUSTER et al., 1994; MIHM et al., 1994). Durch einige Untersuchungen unter Verwendung von Progesteron-Spiralen wurde nachgewiesen, daß dabei das verlängerte Wachstum des dominanten Follikels eine wichtige Rolle spielt (SAVIO et al., 1993; STOCK u. FORTUNE, 1993; CUSTER, et al., 1994). Die Untersuchungen ergaben, daß nach natürlicher Luteolyse des CI nur subluteale Progesteronspiegel, welche aus der Spirale produziert wurde, erreicht wurden. Diese sublutealen Konzentrationen reichten schon aus um Brunstsymptome bzw. LH-Peak zu

inhibieren (GLATZEL, 1992). Sie reichten jedoch nicht aus um die LH-Pulsfrequenz zu hemmen (SAVIO et al., 1993; STOCK u. FORTUNE, 1993). LH-Pulse stimulieren den DF sich weiter zu entwickeln. Daraus resultiert der sogenannte persistierende DF (SAVIO, et al. 1993, STOCK u. FORTUNE, 1993). Persistierende DF können nach Entfernung der Spirale bzw. nach einem Rebound-Effekt mit LH-Ausschüttung ovulieren. Es ist jedoch nicht gewährleistet, daß der Follikel fertil ist. Färsen mit einem verlängerten Follikelwachstum hatten niedrigere Trächtigkeitsraten (STOCK u. FORTUNE 1993, SAVIO et al. 1993, MIHM et al., 1994, AUSTIN et al., 1998). Als eigentliche Ursache der reduzierten Fertilität nach Gestagenbehandlung werden eine Entwicklungsstörung der Oozyten in Follikeln mit verlängerter Dominanz diskutiert (AHMAD et al., 1995, MIHM et al., 1999).

Durch den Einsatz von Östradiol in Kombination mit Progesteron (Synchro-Mate-B) konnte die Behandlungsdauer auf neun Tage verkürzt werden (WILTBANK, 1997). Östradiol hat sowohl einen luteolytische Effekt auf das CI (WILTBANK et al., 1961) als auch einen hemmenden Einfluß auf das Wachstum des DF (BO et al., 1994) sowie eine LH-Wirkung (GLATZEL u. SCHALLENBERGER, 1990).

In Jüngerer Zeit konnte durch den Einsatz von $\text{PGF}_2\alpha$ (bei Auszug der Implantante) und GnRH (30 h nach Auszug der Implantante) eine Trächtigkeitsrate wie nach einer natürlichen Brunst erreicht wurden (KASTELIC et al., 1996; WILTBANK, 1997; MCDOWELL et al., 1998).

2.9.1.3. Gonadotropin Releasing Hormon

Der Effekt von Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) auf die Follikeldynamik wurde von MACMILLAN u. THATCHER (1991); PURSLEY et al. (1995); VAN STRAATEN (1996) SEGUIN (1997) studiert. Die GnRH-Behandlung induzierte die Ovulation oder Luteinisierung des größten Follikels, der zur Zeit der Injektion vorhanden war (THATCHER et al., 1993). Zwei Tage nach der Behandlung wurde eine neue Follikelwelle rekrutiert mit einem DF. Der DF entwickelte sich ca. sieben Tage nach der Behandlung. Dieser DF ovulierte in mehr als 85% der Fälle nach $\text{PGF}_2\alpha$ -Applikation (PURSLEY et al., 1995). Eine aktuelle Modifikation wurde durch den Einsatz einer zweiten GnRH-Applikation nach der $\text{PGF}_2\alpha$ -Gabe (48h nach $\text{PGF}_2\alpha$) etabliert (SEGUIN, 1997). Die zweite GnRH-Applikation sicherte die Ovulation des vorhandenen DF und erlaubte eine Besamung ohne Brunstbeobachtung. Das System scheint jedoch für Färsen nicht geeignet zu sein (PURSELY et al., 1995). Nur 54% der Färsen ovulierten im Vergleich zu 85% der Kühe nach dieser

Behandlung (PURSELY, et al., 1995). Die Ursache für diesen Unterschied ist noch nicht klar (ADAMS, 1998).

2.9.1.4. Follikelablation

Eine transvaginale ultraschallgestützte Follikelaspiration wurde bei Färsen, welche in einem unbekannte Zyklusstadium selektiert wurden, für die Ovulationsynchronisation angewendet (BERGFELT et al., 1994). Nach Entfernung aller Follikel ≥ 5 mm wurde innerhalb von zwei Tagen eine neue Follikelwelle rekrutiert. Bei $\text{PGF}_2\alpha$ -Injektion vier Tage nach der Follikelentfernung ovulierte der DF der neu rekrutierten Welle bei allen Tieren. Zwei Tiere zeigten eine doppelte Ovulation. Die Variabilität zwischen den Tieren bezüglich des Zeitpunktes der Ovulation war geringer als bei den Kontrollen.

In jüngerer Zeit konnte durch den Einsatz von LH oder GnRH am Tag der Ablation oder einen Tag später der Abstand zwischen der Ablation und der Ovulation verkürzt und die Variabilität noch verringert werden (BROGLIATTI et al., 1998).

2.9.2. Bedeutung des dominanten Follikels bei Superovulation

Seit nachgewiesen wurde, daß der DF das Wachstum der untergeordneten Follikel hemmt, wird diskutiert, ob bei der Superovulation durch eben diesen Mechanismus auch solche Follikel, die durch Stimulation angebildet werden sollen, unterdrückt werden. Diese Fragestellung wurde in einigen Experimenten in den letzten Jahren untersucht. Die Ergebnisse waren jedoch widersprüchlich, wobei einige Studien zeigten, daß die Existenz eines DF zu Beginn der Hormonbehandlungen das Ergebnis der Superovulation beeinträchtigt, andere dagegen berichten von keinem Effekt. Die Literaturangaben über den Einfluß des DF auf den Erfolg des Superovulation in Abhängigkeit von seiner Definition sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tab. 6: Einfluß des dominanten Follikels auf den Erfolg der Superovulation in Abhängigkeit von seiner Definition

Autoren	Tiere	DF-Definition	DF-Einfluß
GRASSO et al., 1989	Färsen	Follikel > 9 mm, im Wachstum oder auf Plateau ≤ 4 Tage	1- kein Einfluß auf Anzahl von Follikeln in der Größe 2-3 und 4-6 mm 2- negativer Einfluß auf Anzahl von Follikeln in der Größe 7-9 und > 9 mm 3- negativer Einfluß auf Anzahl von Corpora lutea
ROUILLIER et al., 1990; 1996	Kühe	Follikel ≥ 10 mm, im Wachstum oder auf Plateau ≤ 4 Tage	1- kein Einfluß auf Follikelanzahl 2- vermehrt die Atresie in der Follikelklasse 4.5-8 mm
WILSON et al., 1990	Kühe	Follikel ≥ 9 mm während Lutealphase	kein Einfluß auf Anzahl von Cl und von Embryonen
BOTZ, 1991	Kühe	größter Follikel, im Wachstum	negativer Einfluß auf Spülergebnisse und Anteil der transfertauglichen Embryonen
GUILBAULT et al., 1991	Färsen	Follikel > 9 mm, im Wachstum oder auf Plateau 4 Tage	negativer Einfluß auf Follikelwachstum, Ovulationsrate und Anzahl von Cl
BARTMAN, 1992	Kühe	größter Follikel, ≥ 10mm, in Wachstum oder auf Plateau ≤ 3 Tage	negativer Einfluß auf Spülergebnisse und Anteil der transfertauglichen Embryonen
GRAY et al., 1992	Kühe	größter Follikel in Regression seit 2 Tage	kein Einfluß auf transfertaugliche Embryonen

Fortsetzung

HUHTINEN et al., 1992	Kühe	1-Follikel >8mm, auf Plateau ≤ 3 Tage 2-Follikel >9mm, auf Plateau ≤ 4 Tage	negativer Einfluß auf transfertaugliche Embryonen
ADAMS et al., 1993	Färsen	größter Follikel am Tag 5 des Zyklus	negativer Einfluß auf Ovulationsrate
BUNGARTZ u. NIEMANN, 1994	Kühe	Follikel >9 mm, im Wachstum oder auf Plateau < 3 Tage	negativer Einfluß auf Anzahl von Cl und Ova/Embryonen sowie Anteil der transfertauglichen Embryonen
MACIEL et al., 1995	Kühe	Follikel >9 mm im Wachstum oder auf Plateau ≥ 4 Tage	1- positiver Einfluß auf Follikelwachstum 2- kein Einfluß auf Anzahl der transfertauglichen Embryonen
STOCK et al., 1996	Färsen	größter Follikel am Tag 6	1- kein Einfluß auf Anzahl der rekrutierten Follikel 2- negativer Einfluß auf Ovulationsrate
LAUNTER et al., 1997	Kühe	Follikel >8 mm zwischen Tag 7 u.12	kein Einfluß auf Spülergebnisse und Anteil der transfertauglichen Embryonen
WOLFSDORF et al., 1997	Färsen	größter Follikel ≥ 10 mm, in Wachstum	1- negativer Einfluß auf Follikelanzahl und Anzahl von Cl 2- kein Einfluß auf Anzahl von Embryonen