

Aus der  
**Tierklinik für Fortpflanzung**  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Einfluss unterschiedlicher Behandlungsprotokolle mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  während  
eines 7 d-Ovsynchprotokolls auf ausgewählte Fruchtbarkeitsparameter.**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Ilona Dorothea Steinmetz**  
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2024

Journal-Nr.: 4340

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

<b>Dekan:</b>	Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
<b>Erster Gutachter:</b>	Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Heuwieser
<b>Zweiter Gutachter:</b>	Univ.-Prof. Dr. Heiner Bollwein
<b>Dritter Gutachter:</b>	PD Dr. Bernd-Alois Tenhagen

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

cattle, dairy cows, dinoprost, prostaglandins, cloprostenol, ovulation, oestrus cycle,  
synchronization, synchronizes females, insemination, animal reproduction

Tag der Promotion: 06.03.2024

Für meine Lieben



# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	1
2.	Literatur .....	3
2.1	Ovsynchprotokoll: Grundsätzlicher Ablauf .....	3
2.2	Grenzen für das Ovsynchprotokoll .....	4
2.2.1	Zyklussynchronisation .....	4
2.2.2	Zyklusstand.....	4
2.2.3	Progesteron während der Follikelentwicklung.....	5
2.2.3.1	Vorsynchronisation.....	6
2.2.3.2	Steigerung der Ovulationsrate zur ersten GnRH-Gabe.....	7
2.3	Luteolyse.....	8
2.3.1	Progesteron zur Besamung.....	8
2.3.2	Inzidenz der unvollständigen Luteolyse nach einmaliger PGF <sub>2α</sub> -Gabe. ....	9
2.3.3	Einfluss auf die Luteolyse.....	9
2.3.3.1	Ansprechbarkeit des Gelbkörpers .....	9
2.3.3.2	Progesteron zur PGF <sub>2α</sub> -Gabe .....	10
2.3.3.3	Unterschiedliche PGF <sub>2α</sub> -Analoga.....	10
2.4	Methoden um die Luteolyserate zu erhöhen.....	11
2.4.1	Vergleichende Studien .....	12
3.	Material und Methoden.....	13
3.1	Versuchsziel.....	13
3.2	Fallzahlplanung .....	13
3.3	Experiment 1 .....	14
3.3.1	Tiere.....	14
3.3.2	Betriebsinformationen .....	14
3.3.2.1	Haltung und Fütterung.....	14
3.3.2.2	Fruchtbarkeitskennzahlen .....	18
3.3.2.3	Fruchtbarkeitsmanagement.....	18

3.3.2.4	Milchleistung und -inhaltsstoffe .....	21
3.3.3	Datenerfassung.....	21
3.3.4	Versuchsablauf .....	21
3.3.4.1	Durchführung .....	21
3.3.4.2	Zuordnung zu den Gruppen .....	22
3.3.4.3	Tierärztliche Untersuchung an Tag 0.....	23
3.3.4.4	Trächtigkeitsuntersuchung .....	23
3.4	Experiment 2.....	24
3.4.1	Tiere.....	24
3.4.2	Betriebsinformationen .....	24
3.4.2.1	Haltung und Fütterung.....	24
3.4.2.2	Fruchtbarkeitskennzahlen .....	26
3.4.2.3	Fruchtbarkeitsmanagement.....	26
3.4.2.4	Milchleistung und -inhaltsstoffe .....	27
3.4.3	Datenerfassung.....	27
3.4.4	Versuchsablauf .....	28
3.4.4.1	Durchführung sowie Zuordnung zu den Gruppen .....	28
3.4.4.2	Blutprobenentnahme zur Bestimmung der Konzentration von Progesteron. .....	28
3.4.4.3	Trächtigkeitsuntersuchung .....	29
3.5	Statistische Analysen .....	29
3.5.1	Statistische Analysen Experiment 1 .....	29
3.5.2	Statistische Analysen Experiment 2 .....	30
3.5.3	Statistische Analysen Experiment 1 und 2 kombiniert .....	30
4.	Ergebnisse .....	31
4.1	Experiment 1 .....	31
4.2	Experiment 2.....	33
4.3	Gemeinsame Auswertung der Experimente 1 und 2.....	39

5. Diskussion.....	41
5.1 Experiment 1 .....	41
5.2 Experiment 2.....	45
5.3 Gemeinsame Auswertung der Experimente 1 und 2.....	48
6. Zusammenfassung.....	51
7. Summary.....	53
8. Literaturverzeichnis .....	55
9. Kooperationen und Interessenskonflikte.....	63
10. Danksagung .....	64
11. Selbstständigkeitserklärung.....	66

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.</b>	Schematische Darstellung des Ovsynchprotokolls. ....	3
<b>Abbildung 2.</b>	Schematische Darstellung der Protokolle zur Vorsynchronisation. ....	6
<b>Abbildung 3.</b>	Schematische Darstellung der in den Experimenten 1 und 2 genutzten Behandlungsprotokolle .....	22
<b>Abbildung 4.</b>	Einfluss des Behandlungsprotokolls <sup>1</sup> auf die Konzentrationen von Progesteron <sup>2</sup> zur zweiten GnRH-Gabe (linke Graphik) sowie auf den Anteil an Kühen mit Konzentrationen von Progesteron < 0,6 ng / ml zur zweiten GnRH-Gabe (rechte Graphik). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts da. ....	36
<b>Abbildung 5.</b>	Einfluss des Behandlungsprotokolls <sup>1</sup> auf die prozentuale Verteilung von Kühen innerhalb der Progesteron-Kategorien <sup>2</sup> (Experiment 2). ....	37
<b>Abbildung 6.</b>	Einfluss der Konzentration von Progesteron <sup>1</sup> zur zweiten GnRH-Gabe auf den Besamungserfolg 38 Tage nach der künstlichen Besamung für Kühe aus allen drei Behandlungsprotokollen (Experiment 2). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts da. ....	38
<b>Abbildung 7.</b>	Einfluss des Behandlungsprotokolls <sup>1</sup> auf den Besamungserfolg für die kombinierten Ergebnisse aus Experiment 1 und 2 <sup>2</sup> . Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts da. ....	40

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.</b>	Relevante Informationen zu den sechs Betrieben aus Experiment 1 .....	15
<b>Tabelle 2.</b>	Futtrationen in kg Frischmasse pro Tier und Tag in den einzelnen Betrieben aus Experiment 1 .....	16
<b>Tabelle 3.</b>	Durchschnittliche Fruchtbarkeitsleistung in den sechs Betrieben aus Experiment 1 während des Versuchszeitraums.....	18
<b>Tabelle 4.</b>	Fruchtbarkeitsmanagement Experiment 1 .....	20
<b>Tabelle 5.</b>	Milchleistungsdaten der sechs Versuchsbetriebe aus Experiment 1 im Februar 2018 .....	21
<b>Tabelle 6.</b>	Futtrationen in kg Frischmasse pro Tier und Tag in den einzelnen Betrieben aus Experiment 2 .....	25
<b>Tabelle 7.</b>	Durchschnittliche Fruchtbarkeitsleistung in den zwei Betrieben während des Versuchszeitraums.....	26
<b>Tabelle 8.</b>	Milchleistungsdaten der zwei Versuchsbetriebe im August 2018.....	27
<b>Tabelle 9.</b>	Einfluss des Vorhandenseins eines Gelbkörpers zur ersten GnRH-Gabe während eines Ovsynchprotokolls auf den Besamungserfolg [Besamungserfolg, % (n / n)] 38 Tage nach der künstlichen Besamung bei laktierenden Holstein Friesian Kühen (Experiment 1).....	32
<b>Tabelle 10.</b>	Einfluss des Behandlungsprotokolls auf den Besamungserfolg [Besamungserfolg, % (Anzahl Kühe)] 38 Tage nach der künstlichen Besamung für die Experimente 1 und 2 sowie für die Kombinierten Ergebnisse aus Experiment 1 und 2.....	35

## Abkürzungsverzeichnis

AI	artificial insemination
CL	corpus luteum
cm	Zentimeter
d	Tag
et al.	et alii
g	relative Zentrifugalbeschleunigung (RZB) [ $m / s^2$ ]
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
G1	erste GnRH-Gabe
G2	zweite GnRH-Gabe
h	Stunde
KB	künstliche Besamung
kg	Kilogramm
LH	luteinisierendes Hormon
$\mu$ g	Mikrogramm
ml	Milliliter
ng	Nanogramm
P/AI	pregnancy per artificial insemination
P4	progesterone
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	Prostaglandin F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
PGFM	13, 14-dihydro-15-keto-PGF
p.i.	post inseminationem
p.p.	post partum
TAI	timed artificial insemination
z.T.	zum Teil

## Definitionen

Besamungserfolg	Anteil tragender Kühe aus den auswertbaren Besamungen.
21 d Trächtigkeitsrate	Anteil der in einem Zeitraum von 21 Tagen tragend gewordenen Kühe bezogen auf die im gleichen Zeitraum zur Besamung anstehenden Kühe.
Brunstnutzungsrate	Anteil der in einem Zeitraum von 21 Tagen besamten Kühe bezogen auf die zur Besamung anstehenden Kühe.
Luteolyse	Auflösung des Gelbkörpers.
Luteolyserate	Anteil an Kühen, deren Gelbkörper sich vollständig aufgelöst hat, bezogen auf die Kühe, die im Beobachtungszeitraum einen Gelbkörper hatten.



# 1. Einleitung

Protokolle zur Ovulationssynchronisation sind auf intensiv geführten Milchviehbetrieben weit verbreitet (Caraviello et al., 2006). Diese Protokolle dienen dazu, Mängel in der visuellen Brunstbeobachtung zu überwinden und eine terminorientierte künstliche Besamung (KB) zu ermöglichen (Caraviello et al. 2006; Wiltbank und Pursley, 2014).

Mithilfe von Protokollen zur Vorsynchronisation auf Basis von Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) oder einer Kombination aus Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) und PGF<sub>2α</sub> kann der Besamungserfolg aus Ovsynchprotokollen gesteigert werden (Moreira et al., 2001; Bello et al., 2006 Souza et al., 2008). Grund dafür ist, dass durch Vorsynchronisationen der Anteil an Kühen erhöht wird, die sich zu Beginn des Ovsynchprotokolls im Diöstrus (zwischen dem 5. und 9. Zyklustag) befinden.

Dadurch wird die Ovulationsrate in Antwort auf die erste GnRH-Gabe erhöht (Vasconcelos et al., 1999) und der neu gebildete Gelbkörper sorgt für eine höhere Konzentration von Progesteron während der Follikelreifungsphase (Pursley und Martins, 2011; Stevenson, 2016a).

Dieser neue Gelbkörper ist teilweise refraktär gegenüber einer einmaligen PGF<sub>2α</sub>-Gabe an Tag 7 des Ovsynchprotokolls und führt somit nicht bei allen Kühen zu einer vollständigen Luteolyse. Die vollständige Luteolyse am Ende des Protokolls wird definiert durch eine Konzentration von Progesteron von  $\leq 0,4$  ng/ml (Carvalho et al., 2018). Erhöhte Konzentrationen von Progesteron zum Zeitpunkt der Besamung führen zu deutlich schlechteren Besamungserfolgen (Santos et al., 2010; Giordano et al., 2012a; Carvalho et al., 2018). Im Ovsynchprotokoll zeigen 13 - 21 % der Kühe eine unvollständige Luteolyse bzw. Konzentrationen von Progesteron  $> 0,4$  ng/ml zur zweiten GnRH Gabe nach einmaliger PGF<sub>2α</sub>-Gabe an Tag 7 (Brusveen et al., 2009; Martins et al., 2011a; Giordano et al., 2012a; Carvalho et al., 2018). Eine besondere Risikogruppe für eine hohe Konzentration von Progesteron zum Zeitpunkt der zweiten GnRH-Gabe nach einmaliger PGF<sub>2α</sub>-Gabe stellen Tiere dar, die das Ovsynchprotokoll ohne Gelbkörper, d.h. mit niedrigen Konzentrationen von Progesteron beginnen (Bisinotto et al., 2010; Giordano et al., 2012a; Carvalho et al., 2018).

Die Beobachtung der unvollständigen Luteolyse und der damit verbundenen erhöhten Konzentration von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe führte in den letzten Jahren zur Entwicklung von zwei Behandlungsprotokollen mit dem Ziel die Luteolyserate im Ovsynchprotokoll zu erhöhen und damit den Besamungserfolg zu steigern. Entweder wurden die Tiere mit einer höheren Dosis PGF<sub>2α</sub> an Tag 7 behandelt (Ribeiro et al., 2012b; Giordano et al., 2013) oder es wurde eine zweite Dosis PGF<sub>2α</sub> 24 Stunden nach der ersten verabreicht (Brusveen et al., 2009; Carvalho et al., 2015a; Wiltbank et al., 2015; Santos et al., 2016). Durch

eine Dosiserhöhung von 500 µg PGF<sub>2α</sub> auf 750 µg PGF<sub>2α</sub> in einem 7 d-Ovsynchprotokoll konnten bei Mehrkalbskühen höhere Luteolyseraten (+ 8,5 %,  $P = 0,03$ ) und geringfügig höhere Besamungserfolge erzielt werden (+ 4,5 %,  $P = 0,05$ ; Giordano et al., 2013). In einer Metaanalyse wurde der Einfluss einer zusätzlichen PGF<sub>2α</sub>-Gabe an Tag 8 des 7 d-Ovsynchprotokolls auf die Luteolyserate und den Besamungserfolg ermittelt. Die zusätzliche PGF<sub>2α</sub>-Gabe erhöhte die Luteolyserate um 11,6 % und den Besamungserfolg um 4,6 % (Borchardt et al., 2018). Bis jetzt gibt es keine kontrollierte, randomisierte Studie, die beide Verfahren (doppelte Dosis an Tag 7 vs. doppelte Gabe an Tag 7 und Tag 8) unter Verwendung des Wirkstoffs Cloprostenol verglichen hat.

Deshalb war es das Ziel der vorliegenden Studie, den Einfluss einer doppelten PGF<sub>2α</sub>-Dosis (1000 µg Cloprostenol) oder einer zweimaligen PGF<sub>2α</sub>-Gabe (500 µg Cloprostenol an Tag 7 und Tag 8) während eines 7 d-Ovsynchprotokolls auf die Konzentration von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe und den Besamungserfolg zu untersuchen.

Die Hypothesen dieser Arbeit waren, erstens, dass durch beide Modifikationen niedrigere Konzentrationen von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe und höhere Besamungserfolge erreicht werden als durch ein herkömmliches Ovsynchprotokoll mit einer einmaligen PGF<sub>2α</sub>-Gabe und zweitens, dass Tiere, die das Ovsynchprotokoll ohne Gelbkörper beginnen, besonders von der zweimaligen PGF<sub>2α</sub>-Gabe profitieren.

## 2. Literatur

### 2.1 Ovsynchprotokoll: Grundsätzlicher Ablauf



**Abbildung 1.** Schematische Darstellung des Ovsynchprotokolls.

Das von Pursley und Wiltbank (1995) entwickelte Protokoll zur Ovulationssynchronisation (Ovsynch) bildete die Grundlage für die heute am weitesten verbreiteten Protokolle zur terminorientierten Besamung bei Milchkühen (Stevenson, 2016b). In der ursprünglichen Version des Ovsynchprotokolls wurde GnRH an einem beliebigen bzw. unbekanntem Zyklustag verabreicht. Sieben Tage später erfolgte eine  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe, worauf sich 48 Stunden (h) später eine erneute GnRH-Applikation anschloss. In einem Zeitintervall von 16 bis 20 h nach der zweiten GnRH-Injektion erfolgte die terminorientierte künstliche Besamung (Pursley et al., 1995).

Obwohl durch das Ovsynchprotokoll allein noch keine bestmögliche Synchronisation erreicht wurde (Wiltbank und Pursley, 2014), wurden mithilfe dieses Synchronisationsverfahrens vergleichbare Besamungserfolge erzielt wie bei Tieren, die nach spontan aufgetretener Brunst besamt wurden (Rabiee et al., 2005).

Durch ein besseres Verständnis der physiologischen Grundlagen bei der Follikelentwicklung und unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse wurden in den folgenden Jahren zahlreiche Modifikationen des „Ovsynch“ untersucht, um den Besamungserfolg nach terminorientierter Besamung zu verbessern (Wiltbank und Pursley, 2014).

Hierbei wurde der Zeitpunkt der künstlichen Besamung relativ zur zweiten GnRH-Gabe auf 12 - 16 h angepasst (Wiltbank und Pursley, 2014). Kurze Zeitabstände (0 bzw. 6 h) zwischen der zweiten GnRH-Gabe und der künstlichen Besamung wurden mit reduzierten Besamungserfolgen in Zusammenhang gebracht. Wohingegen besonders lange Zeitabstände (> 16 h) mit einer reduzierten Embryonenqualität einhergingen (Dalton et al., 2001). Die Embryonenqualität wurde nach der Gewinnung von Embryonen mikroskopisch beurteilt, indem die Kompaktheit und Homogenität der Zellmasse bewertet wurde. Als degeneriert wurden Embryonen mit Blastomeren bezeichnet, die zwar Kerne enthielten, aber zu unterentwickelt waren um als lebensfähig angesehen zu werden (Lindner und Wright, 1983). Ein Zeitintervall von 12 – 16 h brachte damit den höchsten Besamungserfolg als Kompromiss

zwischen einer akzeptablen Fertilisationsrate und einer guten Embryoqualität (Pursley et al., 1998; Dalton et al., 2001).

Daraus ergibt sich das Protokoll, welches in dieser Arbeit als herkömmliches Ovsynch bezeichnet wird (Abbildung 1).

## 2.2 Grenzen für das Ovsynchprotokoll

### 2.2.1 Zyklussynchronisation

Der Besamungserfolg nach Ovulationssynchronisation hängt maßgeblich von dem Synchronisationserfolg ab (Carvalho et al., 2018). Dabei kann der Synchronisationserfolg einer Beobachtungsgruppe anhand von drei Kriterien gemessen werden: Anteil an Kühen mit

- 1) hohen Serumkonzentrationen von Progesteron ( $> 1,0$  ng / ml) zur PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Gabe,
- 2) niedrigen Serumkonzentrationen von Progesteron ( $< 0,4$  ng / ml) zur zweiten GnRH-Gabe und
- 3) einer zeitgerechten Ovulation nach der zweiten GnRH Gabe.

Tiere, die basierend auf einem der drei Kriterien keine Synchronisation zeigen, haben einen deutlich schlechteren Besamungserfolg (Carvalho et al., 2018).

### 2.2.2 Zyklusstand

Die Synchronisationsrate nach der zweiten GnRH-Gabe im Ovsynchprotokoll hängt davon ab, wie viele Tiere nach der ersten GnRH-Gabe ovuliert haben (Bello et al., 2006; Chebel et al., 2006; Bisinotto et al., 2010; Keskin et al., 2010; Giordano et al., 2012b). Der Zyklusstand zu Beginn des Ovsynchprotokolls bedingt sowohl die Ovulationsrate zur ersten GnRH-Gabe (Vasconcelos et al., 1999; Moreira et al., 2000) als auch die Konzentration von Progesteron während der Follikelreifung und zum Zeitpunkt der PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Gabe. Erfolgt die GnRH-Applikation zwischen dem 1. und 4. Zyklustag und bevor der dominante Follikel der ersten Follikelwelle ovulatorische Kapazität erlangt hat, spricht der Follikel nicht auf die GnRH-Gabe an und unterliegt zum Zeitpunkt der zweiten GnRH-Gabe bereits der Atresie (Vasconcelos et al., 1999; Moreira et al., 2000). Wird GnRH in Anwesenheit eines dominanten Follikels gegeben, ist die Wahrscheinlichkeit einer Ovulation sehr groß. Dies ist bei Zyklen mit zwei Follikelwellen in der Regel zwischen dem 5. und 9. sowie zwischen dem 17. und 21. Zyklustag der Fall (Vasconcelos et al., 1999; Cerri et al., 2009). Es kommt gehäuft schon vor der PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Gabe zu einer Luteolyse (Konzentration vom Progesteron  $< 1$  ng / ml zur PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Gabe) sowie zu einer spontanen Ovulation vor der zweiten GnRH-Gabe, wenn das Ovsynchprotokoll in der zweiten Zyklushälfte begonnen wird (Vasconcelos et al., 1999). Durch die GnRH-Injektion zwischen

dem 5. und 9. Zyklustag wird der dominante Follikel der ersten Follikelwelle zur Ovulation gebracht. Dadurch wird die Rekrutierung der zweiten Follikelwelle synchronisiert und der dominante Follikel dieser Welle erlangt zur zweiten GnRH-Gabe ovulatorische Kapazität. Die höhere Wahrscheinlichkeit für einen guten Synchronisationserfolg bei Tieren, die das Ovsynchprotokoll zwischen dem 5. und 9. Zyklustag beginnen, wird auch durch den in diesem Zyklusstadium vorhandenen Gelbkörper verursacht. Er sollte seine Funktionalität bis zur PGF<sub>2α</sub>-Gabe behalten und gut auf diese ansprechbar sein (Schmidt et al., 2013). Außerdem sorgt er in Kombination mit dem auf die erste GnRH-Gabe gebildeten Gelbkörper für eine optimale Konzentration von Progesteron während der Follikelreifungsphase (Stevenson et al., 2018).

### 2.2.3 Progesteron während der Follikelentwicklung

Das Heranreifen der präovulatorischen Follikelwelle bei geringen Konzentrationen von Progesteron geht mit einer reduzierten Fertilität einher (Pursley und Martins, 2011; Wiltbank et al., 2012).

Progesteron hemmt über einen negativen Feedbackmechanismus die GnRH-Freisetzung und bewirkt dadurch eine reduzierte Ausschüttung des luteinisierenden Hormons (LH) aus dem Hypophysenvorderlappen (Kinder et al., 1996). Bei geringer Konzentration von Progesteron während der Follikelreifungsphase kommt es sowohl zu einer erhöhten Frequenz als auch zu einer höheren Amplitude der LH-Ausschüttung (Roche und Ireland, 1981; Kinder et al., 1996). Die dadurch verursachten höheren Konzentrationen des LH bewirken ein verlängertes Follikelwachstum (Cerri et al., 2011).

Follikel, die bei niedrigen Konzentrationen von Progesteron heranreifen, sind zur Ovulation größer als solche, die bei hoher Konzentration von Progesteron heranreifen (Carvalho et al., 2019). Bei verlängerter Follikeldominanz unter zu niedriger Konzentration von Progesteron setzt die Eizelle die Meiose fort und es kommt zur ersten Reifeteilung noch vor dem LH-Peak (Revah und Butler, 1996). Ähnlich wie persistierende Follikel werden solche durch LH überstimulierte Follikel seltener befruchtet und es entwickelt sich kein gesunder Embryo aus ihnen (Sartori et al., 2002b).

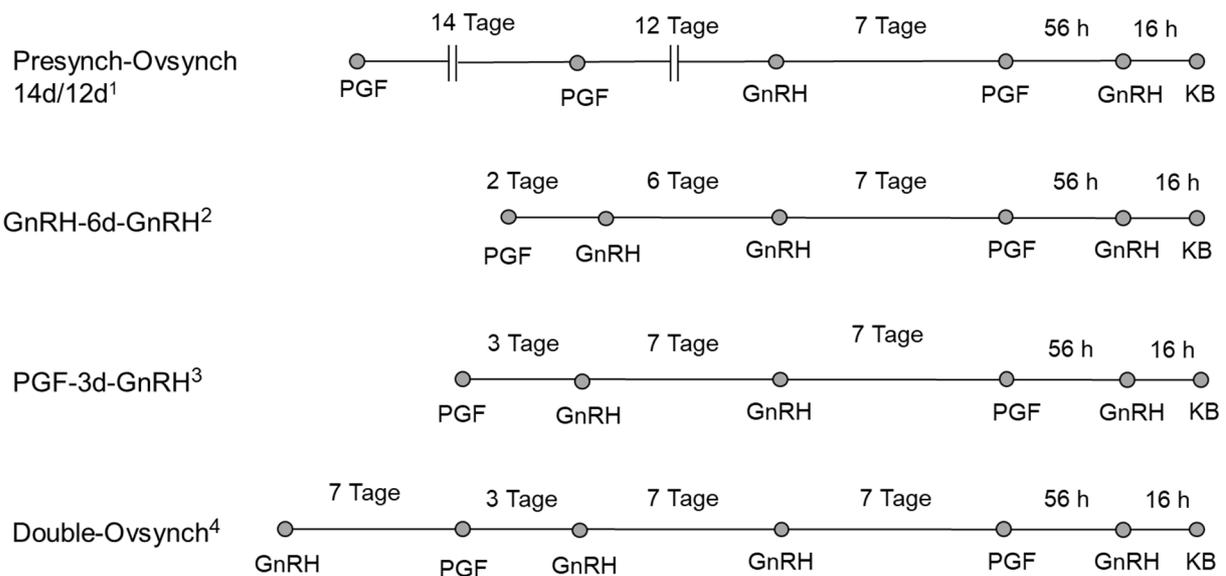
Das Heranreifen des ovulatorischen Follikels bei niedrigerer Konzentration von Progesteron wird außerdem mit einer erhöhten Inzidenz von Doppelovulationen assoziiert (Wiltbank et al., 2000; Carvalho et al., 2019). Kühen mit niedriger Konzentration von Progesteron zur ersten GnRH-Gabe hatten in einem Ovsynchprotokoll mit zweimaliger PGF<sub>2α</sub>-Gabe (die zweite Gabe 24 h nach der ersten) eine 49 % ige Wahrscheinlichkeit für Doppelovulationen (Martins et al.,

2018). Der Besamungserfolg lag hier bei 66,4 %. Dieser wurde schon am Tag 23. nach der Besamung ermittelt. Im Verlauf der Trächtigkeit wurde bei 33 % der am Tag 23 nach der Besamung als tragend diagnostizierten Kühe eine Resorption der Frucht oder einen Fruchtverlust diagnostiziert. Von den besamten Kühen kalbten 43,2 %.

Eine niedrigere Konzentration von Progesteron bedingt weiterhin eine beschleunigte Ausbildung von Östrogenrezeptor  $\alpha$  im Endometrium, wodurch eine verstärkte  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese und dadurch das Auftreten von kürzeren Lutealphasen im folgenden Zyklus begünstigt wird (Cerri et al., 2011).

### 2.2.3.1 Vorsynchronisation

Eine optimale Konzentration von Progesteron während der Follikelreifungsphase kann durch Protokolle zur Vorsynchronisation erreicht werden. Diese erhöhen den Anteil an Kühen, die sich zum Beginn des Ovsynchprotokolls zwischen dem 5. und 9. Zyklustag befinden und zur ersten GnRH-Gabe ovulieren.



**Abbildung 2.** Schematische Darstellung der Protokolle zur Vorsynchronisation.

<sup>1</sup>Moreira et al., 2001

<sup>2</sup>Bello et al., 2006

<sup>3</sup>Peters und Pursley, 2002

<sup>4</sup>Ayres et al., 2013

Protokolle zur Vorsynchronisation (Abbildung 2) bestehen in der Regel aus der Anwendung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  oder einer Kombination aus GnRH und  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Die zweimalige  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe im

Abstand von 14 Tagen gefolgt von einem 12 Tage später beginnenden Ovsynchprotokoll wird als Presynch-Ovsynch 14 d / 12 d bezeichnet (Moreira et al., 2001). Diese Vorsynchronisation steigert den Besamungserfolg (diagnostiziert am 32. Tag nach der Besamung) aus dem Ovsynchprotokoll bei zyklischen Tieren um bis zu 11 Prozentpunkte. Azyklische Kühe, bei denen zur zweiten PGF<sub>2α</sub>-Gabe kein Gelbkörper vorliegt, können von dieser Strategie nicht profitieren (El-Zarkouny et al., 2004; Chebel et al., 2006). Um die Synchronisationsrate auch bei azyklischen Tieren zu erhöhen, wurden Protokolle entwickelt, die die Anwendung von GnRH integrieren. Mithilfe von GnRH basierten Behandlungsprotokollen (GnRH - 6 d - GnRH (Bello et al., 2006), PGF<sub>2α</sub> - 3 d - GnRH oder Double-Ovsynch (Souza et al., 2008)), lässt sich der Anteil an Kühen, die sich zur ersten GnRH-Gabe im optimalen Zyklusstand (5. bis 9. Zyklustag) befinden und in Antwort auf die erste GnRH-Gabe ovulieren, deutlich erhöhen (Stevenson, 2016b). Das Vorschalten eines Ovsynchprotokolls 7 Tage vor dem zur künstlichen Besamung genutzten Ovsynchprotokoll (Double-Ovsynch) erhöht den Anteil an Kühen, die das Ovsynchprotokoll mit einem funktionalen Gelbkörper beginnen (88,0 % vs. 76,3 %) und somit den Prozentsatz an Tieren, die zur ersten GnRH-Gabe moderate Konzentrationen von Progesteron ( $0,50 < \text{Progesteron} < 3,0 \text{ ng / ml}$ ) haben (80,0 % vs. 57,0 %) im Gegensatz zu nicht vorsynchronisierten Tieren (Ayres et al., 2013).

#### 2.2.3.2 Steigerung der Ovulationsrate zur ersten GnRH-Gabe

Die reduzierte Ovulationsrate nach der ersten GnRH-Gabe bei Tieren, die sich nicht zwischen dem 5. und 9. Zyklustag befinden, kann entweder auf das Fehlen eines dominanten Follikels oder die mangelnde LH-Freisetzung in Folge der GnRH-Gabe zurückzuführen sein (Carvalho et al., 2018). Eine hohe Konzentration von Progesteron hemmt die GnRH-induzierte LH-Freisetzung aus dem Hypophysenvorderlappen (Giordano et al., 2013). Giordano et al. (2013) untersuchten eine Dosiserhöhung von GnRH, um diese Hemmung zu überwinden. Sie wiesen bei Tieren mit einer hohen Konzentration von Progesteron zur ersten GnRH-Gabe eine gesteigerte Ovulationsrate durch eine Verdopplung der GnRH Dosis nach. Ein weiterer Ansatz kann die vorübergehende Senkung der Konzentration von Progesteron durch die Injektion einer geringen Dosis von PGF<sub>2α</sub> sein, um so ein besseres Ansprechen der Hypophyse auf GnRH zu ermöglichen. Grundlage hierfür ist, dass ein junger Gelbkörper durch eine PGF<sub>2α</sub>-Gabe nicht zur vollständigen Luteolyse gebracht wird. Es wird aber eine deutliche, zeitlich beschränkte Absenkung der Konzentration von Progesteron verursacht (Nascimento et al., 2014). Eine Applikation von 12,5 mg PGF<sub>2α</sub> zwei Tage vor der ersten GnRH-Gabe senkt die Konzentration von Progesteron und erhöht die Ovulationsrate (Carvalho et al., 2015a).

## 2.3 Luteolyse

Der nach der ersten GnRH-Gabe gebildete Gelbkörper verhält sich teilweise refraktär gegenüber einer einmaligen PGF<sub>2α</sub>-Gabe an Tag 7 des Ovsynchprotokolls wodurch die PGF<sub>2α</sub>-Gabe nicht bei allen Kühen zu einer vollständigen Luteolyse führt (Carvalho et al., 2018).

Progesteron wird beim nichttragenden Rind überwiegend durch den Gelbkörper produziert. Die Auflösung des Gelbkörpers (Luteolyse) lässt sich deshalb durch die Messung der Konzentration von Progesteron im Blut nachweisen (Wiltbank und Pursley, 2014).

Der Grenzwert zur Definition einer vollständigen Luteolyse wird in der aktuellen Literatur zwischen 0,3 und 0,5 ng / ml angegeben (Giordano et al., 2013; Brusveen et al., 2009; Wiltbank et al., 2015). Er wird in der Regel, wie bei Carvalho et al. (2018) beschrieben, retrospektiv ermittelt, indem die Konzentration zur zweiten GnRH-Gabe mit dem Besamungserfolg in Beziehung gesetzt wird. Die Messung der Konzentration von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe stellt allerdings eine Momentaufnahme dar. Eine niedrige Konzentration von Progesteron kann zum einen bedeuten, dass tatsächlich eine durch das Behandlungsprotokoll verursachte Luteolyse stattgefunden hat. Möglich ist aber auch, dass es zu einer spontanen Luteolyse schon vor der PGF<sub>2α</sub>-Gabe und unabhängig vom Behandlungsprotokoll kam oder gar kein Gelbkörper vorhanden war. Einige Autoren führten deshalb eine zweimalige Messung von Progesteron durch. Eine vollständige Luteolyse wurde angenommen, wenn zur ersten oder einzigen PGF<sub>2α</sub>-Gabe hohe Konzentrationen von Progesteron ( $\geq 1$  ng / ml) und zur zweiten GnRH-Gabe niedrigere Konzentrationen von Progesteron ( $< 1$  ng / ml (Ribeiro et al., 2012a),  $< 0,5$  ng / ml (Martins et al., 2011a), oder  $< 0,3$  ng / ml, (Giordano et al., 2013)) gemessen wurden.

### 2.3.1 Progesteron zur Besamung

Erhöhte Konzentrationen von Progesteron zum Zeitpunkt der künstlichen Besamung führen zu schlechteren Besamungserfolgen (Santos et al., 2010; Giordano et al., 2012a; Carvalho et al., 2018). Die physiologischen Grundlagen, die diesem Phänomen zu Grunde liegen, sind noch nicht vollständig geklärt (Carvalho et al., 2018).

Bei in vitro Fertilisationsversuchen verringerte die Zugabe von Progesteron zum Reifungsmedium sowohl die Zahl der Eizellen insgesamt als auch den Anteil an Eizellen, aus denen sich Blastozysten entwickelten (Silva und Knight, 2000).

Eine weitere Ursache für den reduzierten Besamungserfolg bei Tieren mit unvollständiger Luteolyse kann der Einfluss von Progesteron auf die Schichtdicke des Endometriums sein.

Souza et al. (2011) beschrieb eine lineare Beziehung zwischen der Schichtdicke des Endometriums und dem Besamungserfolg (< 20 % bei Schichtdicken von 6 mm und 40 % bei Schichtdicken von 10 mm). Eine vollständige Luteolyse (Progesteron < 0,5 ng / ml) korrelierte in dieser Studie mit einer größeren Schichtdicke des Endometriums (10 mm bei vollständiger vs. 8,5 mm bei unvollständiger Luteolyse; Souza et al., 2011).

### 2.3.2 Inzidenz der unvollständigen Luteolyse nach einmaliger PGF<sub>2α</sub>-Gabe.

Im Ovsynchprotokoll zeigten 13 bis 21 % der Kühe eine unvollständige Luteolyse bzw. erhöhte Konzentrationen von Progesteron nach einmaliger PGF<sub>2α</sub>-Gabe an Tag 7 (Brusveen et al., 2009; Martins et al., 2011a; Giordano et al., 2012a; Carvalho et al., 2018).

### 2.3.3 Einfluss auf die Luteolyse

#### 2.3.3.1 Ansprechbarkeit des Gelbkörpers

Die luteolytische Wirkung von PGF<sub>2α</sub> ist abhängig vom Entwicklungsstadium des vorhandenen Gelbkörpers (Nascimento et al., 2014). Obwohl bereits an Tag 2 nach der Ovulation PGF<sub>2α</sub>-Rezeptoren mit hoher Affinität in der Plasmamembran vom Gelbkörper nachweisbar sind (Wiltbank et al., 1995), wird der Gelbkörper erst sechs bis sieben Tage nach der Ovulation sensibel für die Wirkung von PGF<sub>2α</sub> (Tsai und Wiltbank, 1998). Selbst eine Dosisverdopplung von PGF<sub>2α</sub> von 25 mg auf 50 mg oder eine zweimalige Gabe von je 25 mg im Abstand von 8 h kann bei einem 5 Tage alten Gelbkörper keine vollständige Luteolyse verursachen (Nascimento et al., 2014). Die unvollständige Auflösung des Gelbkörpers ist vor allem ein Problem bei jungen Gelbkörpern in verkürzten Synchronisationsprogrammen (z.B. 5 d-Cosynch). Wird in einem 5 d-Protokoll nur einmalig eine PGF<sub>2α</sub>-Gabe verabreicht, zeigen nur etwa 50 % der Tiere eine vollständige Luteolyse (Santos et al., 2010). Eine wiederholte PGF<sub>2α</sub>-Gabe 24 h nach der ersten ist in einem 5 d-Protokoll zwingend notwendig (Ribeiro et al., 2012b; Nascimento et al., 2014).

Tiere, die einen jungen und einen alten Gelbkörper aufweisen, sind seltener von einer unvollständigen Luteolyse betroffen (7,2 %; Stevenson et al., 2018 bzw. 8,2 %; Giordano et al., 2012b). Im Gegensatz dazu zeigen Tiere, die zum Zeitpunkt der PGF<sub>2α</sub>-Gabe ausschließlich einen jungen, in Antwort auf die erste GnRH-Gabe gebildeten Gelbkörper haben, deutlich häufiger eine unvollständige Luteolyse (16,7 %; Stevenson et al., 2018 bzw. 35,6 %; Giordano et al., 2012b). Ein älterer, ausgereifterer Gelbkörper zeigt eine deutlich bessere Ansprechbarkeit auf PGF<sub>2α</sub> und bewirkt durch seine Regression auch die Regression eines jüngeren Gelbkörpers (Stevenson, 2016a).

Die Ausschüttung von endogenem PGF<sub>2α</sub> aus dem Uterus erfolgt pulsatil (Ginther et al. 2010; Baird et al., 1976). Es wird angenommen, dass weniger die Höhe eines einzelnen PGF<sub>2α</sub> Impulses als die Frequenz der Impulse über eine entsprechende Zeit entscheidend für eine vollständige Luteolyse ist (McCracken et al., 1984; Wade und Lewis, 1996). Über ein Utero-Ovarielles Kreislaufsystem wird das endogene PGF<sub>2α</sub> unter Umgehung der Lunge direkt zum Gelbkörper geleitet (McCracken et al., 1984). Die PGF<sub>2α</sub>-Impulse stimulieren dort die Ausschüttung von Oxytocin aus dem Gelbkörper, welches wiederum eine uterine PGF<sub>2α</sub>-Ausschüttung fördert.

Möglicherweise bewirkt der ältere, ausgereifere Gelbkörper über PGF<sub>2α</sub>-Rezeptoren eine gesteigerte Freisetzung von lutealem Oxytocin, welches wiederum die uterine PGF<sub>2α</sub>-Sekretion erhöht (McCracken et al., 1999).

### 2.3.3.2 Progesteron zur PGF<sub>2α</sub>-Gabe

Hohe Konzentrationen von Progesteron zur PGF<sub>2α</sub>-Gabe werden mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zur Luteolyse in Folge der PGF<sub>2α</sub>-Gabe (Martins et al., 2011a) und einer höheren Konzeptionswahrscheinlichkeit assoziiert (Bello et al., 2006). Die höchsten Konzentrationen von Progesteron zur PGF<sub>2α</sub>-Gabe ( $5,77 \pm 0,21$  ng / ml) werden bei Kühen gemessen, die sowohl einen jungen, nach der ersten GnRH-Gabe gebildeten, als auch einen bei der ersten GnRH-Gabe bereits vorhandenen Gelbkörper tragen. Deutlich niedrigere Konzentrationen von Progesteron zeigen dagegen Tiere, die nur einen alten ( $5,05 \pm 0,27$  ng / ml) oder nur einen jungen Gelbkörper ( $3,22 \pm 0,68$  ng / ml) haben (Stevenson et al., 2018).

### 2.3.3.3 Unterschiedliche PGF<sub>2α</sub>-Analoge

Um bei laktierenden Milchkühen eine Luteolyse zu verursachen, werden vorwiegend die beiden synthetischen PGF<sub>2α</sub>-Analoge Dinoprost und Cloprostenol eingesetzt (Martins et al., 2011b). Cloprostenol hat aufgrund seines Chlorbenzolrings eine längere Halbwertszeit von etwa 3 h (EMEA, 1997; Reeves, 1978) und verbleibt dadurch länger im Kreislauf. Durch seine längere Halbwertszeit verursacht Cloprostenol eventuell einen beschleunigten Abfall von Progesteron und dadurch einen beschleunigten Anstieg von Estradiol (Martins et al., 2011b).

In Studien, die die Wirkung von Cloprostenol und Dinoprost bei Milchkühen vergleichen, konnte kein Unterschied auf die Luteolyserate oder die Zeit bis zur vollständigen Luteolyse festgestellt werden (Martins et al., 2011a; Martins et al., 2011b).

Lediglich in einer Studie konnte bei Tieren, die nach visueller Brunstbeobachtung besamt worden waren, ein höherer Besamungserfolg durch die Verwendung von Cloprostenol im Vergleich zu Dinoprost nachgewiesen werden (Pursley et al., 2012). Dieser Effekt war bei erstlaktierenden Kühen besonders deutlich und korrelierte mit einer besseren Brunsterkennungsrate. Die Autoren vermuten, dass Cloprostenol durch seine längere Halbwertszeit einen beschleunigten Abfall von Progesteron und dadurch eine beschleunigte Produktion von Estradiol durch den dominanten Follikel verursacht (Pursley et al., 2012).

## 2.4 Methoden um die Luteolyserate zu erhöhen

Der negative Effekt einer unvollständigen Luteolyse auf den Besamungserfolg führte zur Entwicklung von zwei Behandlungsprotokollen mit dem Ziel die Luteolyserate im Ovsynchprotokoll zu erhöhen und damit den Besamungserfolg zu steigern. Entweder wurden die Tiere mit einer erhöhten Dosis  $\text{PGF}_{2\alpha}$  an Tag 7 behandelt (Giordano et al., 2013) oder es wurde eine zweite Dosis  $\text{PGF}_{2\alpha}$  24 Stunden nach der ersten verabreicht (Brusveen et al., 2009; Carvalho et al., 2015a; Wiltbank et al., 2015; Santos et al., 2016).

Um eine hohe Fruchtbarkeit zu erreichen, ist bei der Durchführung von verkürzten Ovsynchprotokollen (z.B. 5 d-Cosynch) die wiederholte Gabe von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  anerkannt (Ribeiro et al., 2012a; Nascimento et al., 2014). In den letzten Jahren untersuchten verschiedene Studien den Einfluss einer zweimaligen  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe in einem 7 d-Ovsynchprotokoll auf die Luteolyserate und den Besamungserfolg (Brusveen et al., 2009; Carvalho et al., 2015a; Wiltbank et al., 2015; Santos et al., 2016; Heidari et al., 2017; Barletta et al., 2018). Die Luteolyserate war nach zweimaliger  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe in den angegebenen Studien signifikant höher und unterschied sich gegenüber der einmaligen  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe um 6 – 14 Prozentpunkte. Ein Einfluss auf den Besamungserfolg konnte aufgrund der oft zu kleinen Tierzahlen in den einzelnen Studien meist nicht ermittelt werden. In einer Metaanalyse wurde deutlich, dass die zusätzliche  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe die Luteolyserate um 11,6 % und den Besamungserfolg um 4,6 % im Vergleich zu einer einzelnen  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe erhöhte (Borchardt et al., 2018). Die wiederholte  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Applikation ist allerdings mit einem erhöhten Arbeitsaufwand und vermehrtem Stress für die Tiere verbunden.

Eine alternative Strategie, um die Luteolyserate und daraus folgend den Besamungserfolg ohne eine zusätzliche Injektion zu erhöhen, könnte die Verabreichung einer höheren Dosis an Tag 7 in einem Ovsynchprotokoll sein (Ribeiro et al., 2012b; Giordano et al., 2013). In einem 5 d-Cosynchprotokoll zeigten nach der Anwendung der doppelten  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Dosis (1000  $\mu\text{g}$  Cloprostenol) im Vergleich zur zweimaligen  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe (an Tag 5 und 6 je 500  $\mu\text{g}$  Cloprostenol) weniger Kühe eine vollständige Luteolyse (72,1 % vs. 95,9 %;  $P = 0,01$ ; Ribeiro

et al., 2012). Auch der Besamungserfolg der Tiere, die mit der doppelten Dosis behandelt wurden, lag deutlich unter dem der zweimalig behandelten Tiere (29,4 % vs. 39,9 %). Dagegen konnte in einer anderen Studie durch die Erhöhung der PGF<sub>2α</sub>-Dosis von 500 auf 750 µg Cloprostenol in einem 7 d-Ovsynchprotokoll die Luteolyserate bei Mehrkalbskühen gesteigert werden (+ 8.5 %;  $P = 0,03$ ; Giordano et al., 2013). Der Besamungserfolg war tendenziell höher (+ 4.5 %;  $P = 0,05$ ).

### 2.4.1 Vergleichende Studien

Im direkten Vergleich der beiden Behandlungsprotokolle (doppelte Dosis vs. zweimalige Gabe) in einem 7 d-Ovsynchprotokoll unter der Verwendung von Dinoprost wurden hinsichtlich Luteolyserate und Besamungserfolg bisher keine übereinstimmenden Ergebnisse ermittelt (Barletta et al., 2018; Stevenson et al., 2018). Stevenson et al. (2018) demonstrierte, dass sowohl die doppelte Dosis als auch die zweimalige Gabe hohe Luteolyseraten induzierten (96 % vs. 100 %). Tendenzuell ergaben sich durch die Behandlung mit der doppelten Dosis im Gegensatz zur Behandlung mit einer zweimaligen Gabe höhere Besamungserfolge (46,1 % vs. 36,7 %;  $P = 0,07$ ; Stevenson et al., 2018). Im Gegensatz dazu stellten Barletta et al. (2018) höhere Luteolyseraten nach der zweimaligen PGF<sub>2α</sub>-Gabe gegenüber der doppelten Dosis fest (94 % vs. 88 %;  $P = 0,03$ ). In Bezug auf den Besamungserfolg unterschieden sich die beiden Behandlungsprotokolle in dieser Studie jedoch nicht signifikant (35,4 % zweimalige Gabe vs. 32,4 % doppelte Dosis;  $P = 0,3$ ; Barletta et al., 2018).

Eine Subgruppe (345 / 1100) von Kühen wurde in der Studie von Barletta et al. (2018) zur ersten GnRH-Gabe ultrasonographisch auf das Vorhandensein eines Gelbkörpers untersucht. Bei dem Vergleich des Behandlungseffekts bei Kühen ohne Gelbkörper zur ersten GnRH-Gabe war der Besamungserfolg zugunsten der zweimaligen PGF<sub>2α</sub>-Gabe zwar numerisch höher, unterschied sich aber nicht signifikant (44 % vs. 25 %  $P = 0,09$ ).

Bisher gibt es keine Studien, die eine doppelte Cloprostenol Dosis direkt mit einer zweimaligen Gabe von Cloprostenol vergleichen.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Versuchsziel

Das Ziel dieser Studie war es, drei unterschiedliche Ovsynchprotokolle zu vergleichen:

- 1) Tag 0 GnRH – Tag 7 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH – Tag 10 KB (Kontrolle)
- 2) Tag 0 GnRH – Tag 7 1.000 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH – Tag 10 KB (GDPG)
- 3) Tag 0 GnRH – Tag 7 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 8 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH – Tag 10 KB (GPPG)

Dazu wurden zwei kontrollierte, randomisierte Experimente mit einem vergleichbaren Studiendesign auf insgesamt acht Milchviehbetrieben in Brandenburg durchgeführt. Die Zuordnung der Milchkühe in die drei Gruppen erfolgte im wöchentlichen Wechsel. Dazu bekamen die Herdenmanager farblich markierte Protokollbögen, auf denen die gruppenspezifischen Maßnahmen vorgegeben waren. Untersucht werden sollte, ob die Gabe einer doppelten Dosis PGF<sub>2α</sub> (Tag 7 1.000 µg PGF<sub>2α</sub>) oder einer zweimaligen Gabe der einfachen Dosis (Tag 7 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 8 500 µg PGF<sub>2α</sub>) dem herkömmlichen Ovsynchprotokoll im Hinblick auf den Besamungserfolg überlegen ist. Die beiden Experimente unterschieden sich lediglich in der Überwachung der Konzentration von Progesteron. In Experiment 1 wurde bei jedem Tier an Tag 0 eine transrektale sonographische Untersuchung durchgeführt. Sofern ein Gelbkörper vorhanden war, wurde die Größe mithilfe eines über das Ultraschallbild gelegten Gitternetzes abgeschätzt. Im zweiten Experiment wurden Blutproben von einer Subgruppe von Kühen zum Zeitpunkt der zweiten GnRH-Gabe entnommen, welche auf die Konzentration von Progesteron untersucht wurden.

### 3.2 Fallzahlplanung

Für die Fallzahlplanung wurde angenommen, dass sich der Besamungserfolg zwischen den Behandlungsprotokollen um 5 Prozentpunkte unterscheiden würde. Diese Annahme basiert auf einer aktuellen Metaanalyse, die den Einfluss der zusätzlichen PGF<sub>2α</sub>-Gabe an Tag 8 in einem 7 d-Ovsynchprotokoll untersuchte (Borchardt et al., 2018). Hier war der Besamungserfolg bei zweimalig mit PGF<sub>2α</sub> behandelten Tieren um 4,5 Prozentpunkte höher als bei Tieren, die mit der einfachen Dosis behandelt wurden. Um bei einem Signifikanzniveau von 5 % und einer statistischen Power von 80 % einen Unterschied von 5 Prozentpunkten nachweisen zu können, ist die Aufnahme von 1.100 Kühen pro Behandlungsgruppe notwendig. Die Berechnung erfolgte mit MedCalc (Version 15.6.1, MedCalc Software,

Ostende, Belgien). Aufgrund von entsprechenden Feldversuchen wurde eine Ausfallquote von 5% berücksichtigt.

### 3.3 Experiment 1

#### 3.3.1 Tiere

Insgesamt wurden von Februar 2018 bis Juni 2019 1.979 Milchkühe der Rasse Holstein – Friesian (553 Jungkühe und 1.426 Mehrkalbskühe) aus sechs kommerziellen Milchviehbetrieben aufgenommen. In dem Experiment wurden alle Tiere berücksichtigt, die bis zu einem betriebsindividuell festgelegten Zeitpunkt (60 – 120 d) post partum (p.p.) noch nicht besamt waren oder die bei der Trächtigkeitsuntersuchung als nicht tragend diagnostiziert wurden. Nicht aufgenommen wurden als zuchtuntauglich erklärte Tiere und solche, die in der tierärztlichen Untersuchung als klinisch erkrankt diagnostiziert wurden. Von den aufgenommenen Kühen wurden 317 Tiere (16,0 %) ausgeschlossen, weil sie in den 10 Tagen des Ovsynchprotokolls erkrankten ( $n = 55$ ), gemerzt wurden ( $n = 41$ ), oder nicht termingerecht besamt wurden ( $n = 221$ ). Der allgemeine Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich in allen Betrieben durch die Herdenmanager überwacht. Alle Behandlungen erfolgten nach tierärztlichen Vorgaben und unter Nutzung von vorab festgelegten Behandlungsprotokollen.

#### 3.3.2 Betriebsinformationen

##### 3.3.2.1 Haltung und Fütterung

Die sechs an der Studie teilnehmenden Betriebe lagen in den Landkreisen Teltow-Fläming und Dahme-Spreewald in Brandenburg. In der Tabelle 1 sind die durchschnittliche Anzahl der Kühe in Laktation sowie die Haltungsbedingungen der Tiere während der Versuchsperiode dargestellt.

Alle Betriebe fütterten eine totale Mischration auf Grundlage von Mais- und Anwelksilagen. Die Rationen der zur Besamung anstehenden Tiere sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 1.** Relevante Informationen zu den sechs Betrieben aus Experiment 1

Parameter	Betrieb 1	Betrieb 2	Betrieb 3	Betrieb 4	Betrieb 5	Betrieb 6
Kühe in Laktation	860	750	325	350	480	350
Haltungssystem	Laufstall	Laufstall	Laufstall	Laufstall	Laufstall	Laufstall
Bodenbelag	Beton	Spaltenboden	Stroh	Spaltenboden	Beton	Beton
Liegeflächen	Tiefstreu	Gummimatten	Gummimatten / Stroh	Gummimatten	Gummimatten	Tiefstreu
Entmistung	Faltschieber	Spaltenboden	Radlader	Spaltenboden	Faltschieber	Faltschieber
Lüftungssystem	Offenstall	Trauf-First	Trauf-First	Trauf-First	Trauf-First / Offenstall	Trauf-First

**Tabelle 2.** Futterrationen in kg Frischmasse pro Tier und Tag in den einzelnen Betrieben aus Experiment 1

Betrieb 1	Betrieb 2	Betrieb 3	Betrieb 4	Betrieb 5	Betrieb 6
Maissilage 21,0	Maissilage 28,0	Maissilage 25,0	Maissilage 23,0	Maissilage 22,0	Maissilage 24,0
Grassilage 10,0	Grassilage 10,0	Kartoffel-pulpe 9,0	Hofmix 10,0	Grassilage 11,5	Luzerne 15,0
Rapsextrak- tionsschrot 4,2	Erbsenpülpe 10,0	Grassilage 8,0	Grassilage 8,0	Luzerne 7,0	Winter-Gerste, Körner 4,2
Erbsenpülpe 4,0	Raps 2,4	Rapsschrot 4,0	Ganzpflanzensilage- Roggen 4,0	Rapsschrot 2,5	Rapsextrak- tionsschrot 4,2
Luzerne-silage 3,0	Potent 2,4	Helvecia Vega-Pro 2,0	Gerstenstroh 0,5	Schrot 2,5	Maisschrot, Körner 2,2
Triticale 2,0	Maisschrot 2,4	Helvecia Energy 2,0	Roggenstroh, 0,5	Corn-Cob-Mix 1,3	BASU Laktation 0,12
Körnermais 2,0	Getreide 1,6	Winterroggen 1,5		Raps 1,3	Viehsalz 0,06
Gerstenfuttermehl 2,0	Erbse 1,0	Roggen 1,5		Kekse 1,0	Futterkalk 0,02
Gerstenstroh 1,0	Melasse 0,6	Futterkalk 0,4		Sojaschrot 1,0	
Rübenmelasse 1,0	Stroh 0,6	Mineral 0,3		Mineral 0,85	

Betrieb 1	Betrieb 2	Betrieb 3	Betrieb 4	Betrieb 5	Betrieb 6
Schaumann Energy 0,4	Harnstoff 0,2	Viehsalz 0,05		Melasse 0,7	
Mineral 0,35	Fett 0,3			Heu 0,6	
Heu 0,2					
Calciumcarbonat 0,1					
Harnstoff 0,03					

### 3.3.2.2 Fruchtbarkeitskennzahlen

Die Tabelle 3 zeigt die durchschnittlichen Fruchtbarkeitsleistungen der Betriebe für den Betrachtungszeitraum zwischen April 2018 und September 2018.

**Tabelle 3.** Durchschnittliche Fruchtbarkeitsleistung in den sechs Betrieben aus Experiment 1 während des Versuchszeitraums

Fruchtbarkeitsparameter	Betrieb 1	Betrieb 2	Betrieb 3	Betrieb 4	Betrieb 5	Betrieb 6
Rastzeit, Tage	76	69	92	98	79	75
Güstzeit, Tage	128	136	148	145	134	128
Erstbesamungserfolg, %	41	21	36	38	28	28
Besamungserfolg, %	39	35	31	39	27	29
Zwischenkalbezeit, Tage	392	405	421	439	393	403
21 d Trächtigkeitsrate, %	18	15	15	15	16	15
Remontierungsrate, %	28,9	35,1	23,8	41,9	30,5	40,1

### 3.3.2.3 Fruchtbarkeitsmanagement

Das Fruchtbarkeitsmanagement der sechs Betriebe war in etwa vergleichbar, unterschied sich jedoch in einigen Details (Tabelle 4). Die Betriebe 1 und 4 führten zwischen dem 30. und 42. Tag post partum eine sonographische Puerperalkontrolle durch. Die freiwillige Wartezeit wurde betriebsindividuell auf 50 bis 100 Tage festgelegt. Alle Betriebe führten eine visuelle Brunstbeobachtung durch. Bei einigen wurde diese durch Hilfsmittel wie Pedometer oder Schwanzmalfarbe unterstützt. Auch der Zeitpunkt, ab welchem Tiere, die sich nach der Kalbung nicht in Brunst gezeigt hatten, einer tierärztlichen Untersuchung (Sterilitätsuntersuchung) unterzogen wurden, unterschied sich. Auf drei Betrieben wurden die künstlichen Besamungen von bestandseigenen Besamungstechnikern vorgenommen. Die anderen Betriebe beauftragten hierfür externe Besamungstechniker von Rinderzuchtverbänden. Der jeweils früheste Zeitpunkt für die Trächtigkeitsuntersuchungen (TU) lag zwischen dem 35. und 40. Tag post inseminationem (p.i.). Zur Auswertung der Herdendaten nutzten die Betriebe entweder das Programm „Herde“ (Firma dsp-Agrosoft

GmbH, 14669 Ketzin, Deutschland, Version 5.11) oder „Dairy Plan C21“ (Firma GEA Group Aktiengesellschaft, 40468 Düsseldorf, Deutschland) in unterschiedlichen Versionen.

**Tabelle 4.** Fruchtbarkeitsmanagement Experiment 1

Parameter	Betrieb 1	Betrieb 2	Betrieb 3	Betrieb 4	Betrieb 5	Betrieb 6
Puerperalkontrolle	30 – 37 Tage post partum	--	--	34 – 42 Tage post partum	--	--
freiwillige Wartezeit, Tage	45	42	60	50	50	42
Brunstbeobachtung	Visuell, Pedometer <sup>1</sup>	Visuell,Halsband- sensor <sup>2</sup>	Visuell	Visuell	Visuell, Pedometer <sup>1</sup>	Visuell, Schwanzmalfarbe
Laktationstag zur ersten termin- orientierten künstlichen Besamung	90	90	120	130	100	95
Besamungstechniker	Bestandseigen	Bestandseigen	RBB <sup>3</sup>	RBB <sup>3</sup>	Bestandseigen	Alta <sup>4</sup>
Zeitpunkt Trächtigkeitsuntersuchung, Tage post inseminationem	35	35	35	35	35	40
Herdenverwaltungsprogramm	Dairy Plan C21 <sup>5</sup>	Herde <sup>6</sup>	Dairy Plan C21 <sup>5</sup>	Herde <sup>6</sup>	Dairy Plan C21 <sup>5</sup>	Herde <sup>6</sup>

<sup>1</sup> Pedometer: (CowScout, Firma GEA Group Aktiengesellschaft, 40468 Düsseldorf, Deutschland)

<sup>2</sup> Halsbandsensor: (Smart Dairy, Firma BouMatic, 87437, Kempten, Deutschland)

<sup>3</sup> RBB: Rinderproduktion Berlin-Brandenburg GmbH, 14550, Groß Kreutz, Deutschland

<sup>4</sup> Alta: Alta Deutschland GmbH, 29525, Uelzen, Deutschland

<sup>5</sup> Dairy Plan C21: Firma GEA Group Aktiengesellschaft, 40468 Düsseldorf, Deutschland

<sup>6</sup> „Herde“, Version 5.11.: für Windows, Firma dsp-Agrosoft GmbH, 14669 Ketzin

### 3.3.2.4 Milchleistung und -inhaltsstoffe

Die Kühe wurden auf allen sechs Betrieben zweimal täglich gemolken. In der Tabelle 5 sind die Milchleistungsdaten mit Stand Februar 2018 dargestellt.

**Tabelle 5.** Milchleistungsdaten der sechs Versuchsbetriebe aus Experiment 1 im Februar 2018

Parameter	Betrieb 1	Betrieb 2	Betrieb 3	Betrieb 4	Betrieb 5	Betrieb 6
305–d Milchleistung, kg	9.873	10.837	10.787	8.350	10.640	9.450
Milcheiweiß, %	3,44	3,43	3,27	3,53	3,37	3,58
Milchfett, %	3,92	3,82	3,34	3,95	3,84	3,96
Zellzahl x 10 <sup>3</sup> / ml	202	291	366	276	244	263

### 3.3.3 Datenerfassung

Mit Hilfe der Herdenverwaltungsprogramme wurden von jedem Tier die Stammdaten dokumentiert (Ohrmarkennummer, Laktationsnummer, Datum der letzten Kalbung, Anzahl der vorausgegangenen Besamungen in dieser Laktation, Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung, Datum der Trächtigkeitsuntersuchung). Dem Besamungsdatum wurde die jeweilige Meteorologische Jahreszeit zugeordnet (Frühling: 01. März bis zum 31. Mai; Sommer: 01. Juni bis zum 31. August; Herbst: 01. September bis zum 30. November; Winter: 01. Dezember bis zum 28. Februar). Im wöchentlichen Wechsel wurden die Tiere in ein Ovsynchprotokoll aufgenommen und einer der drei Versuchsgruppen zugeordnet. Dazu erhielten die Herdenmanager farblich unterschiedlich markierte Listen, auf denen die Ohrmarken- und Stallnummern der Kühe sowie die Vermessungsdaten der Gelbkörper notiert wurden.

### 3.3.4 Versuchsablauf

#### 3.3.4.1 Durchführung

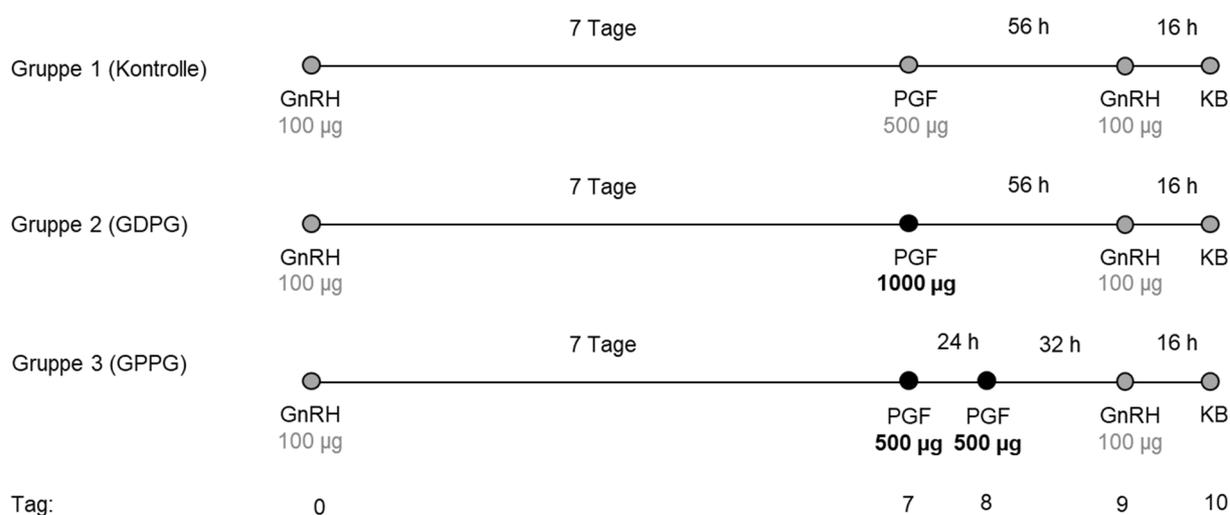
Die Tiere in der Gruppe 1 (Kontrollgruppe) erhielten an Tag 0 100 µg GnRH (Gonavet Veyx, Veyx Pharma GmbH, Deutschland). Sieben Tage später wurde 500 µg Cloprostenol (PGF Veyx forte, Veyx Pharma GmbH, Deutschland) verabreicht. Achtundvierzig Stunden später

erhielten die Kühe eine zweite Applikation von 100 µg GnRH. Weitere 16 h später wurden die Tiere, unabhängig von Brunstanzeichen, künstlich besamt (Abbildung 3).

Die Behandlung in Gruppe 2 (GDPG) unterschied sich von der Kontrollgruppe durch die Gabe einer doppelten Dosis Cloprostenol (1000 µg PGF<sub>2α</sub> (PGF Veyx forte, Veyx Pharma GmbH, Deutschland) an Tag 7 anstatt der 500 µg Cloprostenol.

In der Gruppe 3 (GPPG) erfolgte an Tag 8 abweichend zur durchgeführten Behandlung bei der Kontrollgruppe eine zusätzliche Injektion mit 500 µg Cloprostenol (PGF Veyx forte, Veyx Pharma GmbH, Deutschland).

Die Applikation der jeweiligen Medikamente erfolgte in allen drei Versuchsgruppen in die lange Sitzbeinmuskulatur der Versuchstiere unter der Verwendung von 2,5 cm langen, 20 Gauge starken Kanülen. Alle Injektionen wurden mithilfe von auf 2 ml einstellbaren Dosierspritzen vorgenommen (HSW ROUX-REVOLVER Henke-Sass, Wolf GmbH, 78532 Tuttlingen, Deutschland).



**Abbildung 3.** Schematische Darstellung der in den Experimenten 1 und 2 genutzten Behandlungsprotokolle

### 3.3.4.2 Zuordnung zu den Gruppen

Die Zuordnung von Kühen zu den Versuchsgruppen (Kontrolle, GDPG, GPPG) erfolgte im wöchentlichen Wechsel. In der ersten Versuchswoche wurden Kühe, welche die Aufnahmekriterien erfüllten (siehe 3.3.1), ausschließlich in Gruppe 1 (Kontrolle) aufgenommen. In der zweiten Woche wurden zur Verfügung stehende Kühe dagegen ausschließlich der Gruppe 2 (GDPG) zugeordnet. In der dritten Woche erfolgte dann die Aufnahme von Kühen nur in Gruppe 3 (GPPG). Nach einer Woche, in der Kühe der Gruppe 3 (GPPG) zugeordnet wurden, folgte dementsprechend wieder eine Woche, in der Tiere nur in

die Kontrollgruppe aufgenommen wurden. Nur in dem Betrieb 3, in welchem die Trächtigkeits- und Sterilitätsuntersuchungen alle zwei Wochen erfolgten, wurden Kühe in einer Woche zufällig in eine der drei Gruppen aufgeteilt. Über alle Betriebe einheitlich verblieb jede Kuh in der Gruppe, der sie zugeordnet wurde, bis sie entweder abkalbte oder bei einer Trächtigkeitsuntersuchung keine Trächtigkeit festgestellt wurde bzw. sich die Kuh wieder in Brunst zeigte. Einer der drei Versuchsgruppen zugeordnete Tiere, bei denen es aus der Behandlung jedoch nicht zu einer Trächtigkeit gekommen war oder die sich wieder in Brunst zeigten, wurden ein weiteres Mal nach dem beschriebenen Vorgehen einer der Gruppen zugeordnet. Auf den Betrieben 3 bis 6 wurde der Wechsel der Behandlungsprotokolle solange wiederholt, bis jedes Protokoll zehnmal durchgeführt worden war. Die Betriebe 1 und 2 führten den Wechsel solange fort, bis jedes Protokoll 23-mal durchgeführt wurde.

#### 3.3.4.3 Tierärztliche Untersuchung an Tag 0

Alle Tiere wurden an Tag 0 mit einem Ultraschallgerät (Draminski iscan mit einem 7,5 MHz Linearschallkopf, Draminski S.A., 10-860, Olsztyn, Polen) untersucht. Die Größe von lutealem Gewebe wurde abgeschätzt (Höhe und Breite). Dazu wurde ein Gitternetz mit einer Höhe und Breite von je 10 mm über das Untersuchungsbild des Ultraschallgerätes gelegt. Bei Anwesenheit eines Hohlraumes im Gelbkörper wurde dieser ebenfalls geschätzt (Höhe und Breite) und von der Größe des Gelbkörpers abgezogen. Ein aktiver Gelbkörper wurde ab einer Größe von 15 mm im maximalen Durchmesser berücksichtigt (Giordano et al., 2016).

#### 3.3.4.4 Trächtigkeitsuntersuchung

Die Trächtigkeitsuntersuchung erfolgte betriebsspezifisch zwischen dem 35. und 47. Tag nach der Besamung. Als tragend wurden alle Kühe diagnostiziert, bei denen in einer Trächtigkeitsuntersuchung mittels Ultraschall ein physiologisch entwickelter Embryo mit Herzschlag zu sehen war. Im Folgenden wird einheitlich von einer Trächtigkeitsuntersuchung am 38. Tage p.i. gesprochen. Als nichttragend galten Tiere, bei denen keine Trächtigkeit diagnostiziert werden konnte oder die sich bereits vor der geplanten Trächtigkeitsuntersuchung in Brunst zeigten (Wiltbank et al., 2015).

### 3.4 Experiment 2

#### 3.4.1 Tiere

Die 1.581 an der Studie teilnehmenden Kühe (492 Jungkühe, und 1.089 Mehrkalbskühe) wurden in zwei kommerziellen Milchviehbetrieben in Brandenburg gehalten. Die Versuchsdurchführung erfolgte im Zeitraum von August 2018 bis März 2019. Voraussetzung für die Aufnahme in das Experiment war, dass die freiwillige Wartezeit der Kühe abgelaufen war, dass sie laut Definition der Herdenmanager zuchttauglich waren und bei einer tierärztlichen Untersuchung klinisch gesund erschienen. Die Zuordnung zu den Gruppen erfolgte entweder in Folge eines Presynch (PGF<sub>2α</sub>, 14 Tage später PGF<sub>2α</sub>, 12 Tage später Aufnahme in ein Ovsynchprotokoll) oder nach negativer Trächtigkeitsuntersuchung. Von den aufgenommenen Tieren wurden 98 Kühe (6,2 %) aufgrund von Fehlern in der Protokolldurchführung (n = 37) oder weil sie vor der Trächtigkeitsuntersuchung gemerzt wurden (n = 61) ausgeschlossen. Der allgemeine Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich in beiden Betrieben durch die Herdenmanager überwacht. Alle Behandlungen erfolgten nach tierärztlichen Vorgaben und unter Nutzung von vorab festgelegten Behandlungsprotokollen.

#### 3.4.2 Betriebsinformationen

##### 3.4.2.1 Haltung und Fütterung

In den beiden Betrieben, die 1.380 (Betrieb A) bzw. 900 (Betrieb B) melkende Tiere versorgten, waren die Tiere über den gesamten Versuchszeitraum in Laufstallhaltungen mit Querlüftung untergebracht. Die Laufflächen bestanden aus Beton wobei die Entmistung auf Betrieb A durch Spaltenböden und auf Betrieb B durch Faltschieber realisiert wurde. Als Liegeflächen dienten Gummimatten (Betrieb B) bzw. Strohkalbmatratzen (Betrieb A).

Beide Betriebe fütterten eine totale Mischration auf Grundlage von Mais- und Anwelksilagen. Die Futtermengen der zur Besamung anstehenden Tiere sind Tabelle 6 zu entnehmen.

**Tabelle 6.** Futterrationen in kg Frischmasse pro Tier und Tag in den einzelnen Betrieben aus Experiment 2

Betrieb A	Betrieb B
Maissilage 31,2	Maissilage 22,91
Rapsextraktionsschrot 4,9	Luzernesilage 8,39
Luzernesilage 3,98	Wasser 7,0
Weizengrieskleie 3,8	Rapsextraktionsschrot 3,0
Gerste 2,4	Rapsschrot 2,8
Rübenmelasseschnitzel 2,4	Gerste 2,6
Corn-Cob-Mix Silage 1,9	Rübenmelasseschnitzel 2,3
Gerstenstroh 0,9	Weizengrieskleie 2,0
Fett calciumseife 0,4	Corn-Cob-Mix Silage 1,4
Mineral 0,31	Gerstenstroh 1,2
Natriumbicarbonat 0,22	Fett 0,4
Harnstoff 0,07	Mineral 0,4
	Natriumbicarbonat 0,2
	Harnstoff 0,04

### 3.4.2.2 Fruchtbarkeitskennzahlen

Die Tabelle 7 zeigt die durchschnittlichen Fruchtbarkeitsleistungen der Betriebe für den Betrachtungszeitraum zwischen August 2017 und August 2018.

**Tabelle 7.** Durchschnittliche Fruchtbarkeitsleistung in den zwei Betrieben während des Versuchszeitraums

Fruchtbarkeitsparameter	Betrieb A	Betrieb B
Rastzeit, Tage	73	99
Güstzeit, Tage	130	151
Erstbesamungserfolg, %	33	38
Besamungserfolg, %	34	32
Zwischenkalbezeit, Tage	392	418
21 d Trächtigkeitsrate, %	19	14
Remontierungsrate, %	38,8	30,0

### 3.4.2.3 Fruchtbarkeitsmanagement

Die visuelle Brunstbeobachtung und die Besamung wurde auf Betrieb A von einem Besamungstechniker der Firma Alta (Alta Deutschland GmbH, 29525, Uelzen, Deutschland) durchgeführt. Auf Betrieb B führte ein bestandseigener Besamungstechniker die beschriebenen Aufgaben aus. Beide Betriebe unterstützten die visuelle Brunstbeobachtung mithilfe von Schwanzmalfarbe. Die freiwillige Wartezeit betrug 80 (Betrieb A) bzw. 50 Tage (Betrieb B). Zur ersten künstlichen Besamung nach Ablauf der freiwilligen Wartezeit nutzten beide Betriebe ein Presynch-Ovsynchprotokoll (PGF<sub>2α</sub>, 14 Tage später PGF<sub>2α</sub>, 12 Tage später erste GnRH-Gabe des Ovsynchprotokolls). Tiere, die sich nach der ersten (Betrieb A: 80 ± 3 Tage p.p., bzw. Betrieb B: 50 ± 3 Tage p.p.) oder zweiten PGF<sub>2α</sub>-Gabe (Betrieb A 94 ± 3 Tage p.p. bzw. Betrieb B: 64 ± 3 Tage p.p.) in Brunst zeigten, wurden besamt. Tiere, die nach keiner PGF<sub>2α</sub>-Gabe in Brunst gesehen wurden, erhielten eine terminorientierte künstliche Besamung (Betrieb A: 116 ± 3 Tage p.p. und Betrieb B: 86 ± 3 Tage p.p.). Nichttragende Tiere erhielten

zur Folgebesamung ein Ovsynchprotokoll, beginnend an dem Tag der negativen Trächtigkeitsuntersuchung. Der zuständige Besamungstechniker führte die Trächtigkeitsuntersuchung zwischen dem 38 und 45 Tag nach der künstlichen Besamung mittels manueller transrektaler Palpation durch. Zur Auswertung der Herdendaten nutzten die Betriebe das Programm „Herde“ (Firma dsp-Agrosoft GmbH, 14669 Ketzin, Deutschland, Version 5.11).

#### 3.4.2.4 Milchleistung und -inhaltsstoffe

Auf beiden Betrieben wurden die Kühe zweimal täglich gemolken. In der Tabelle 8 sind die Milchleistungsdaten mit Stand August 2018 dargestellt.

**Tabelle 8.** Milchleistungsdaten der zwei Versuchsbetriebe im August 2018.

Parameter	Betrieb A	Betrieb B
305 - d Milchleistung, kg	9.798	11.409
Milcheiweiß in %	3,17	3,16
Milchfett in %	3,85	3,49
Zellzahl x 10 <sup>3</sup> / ml	223	252

#### 3.4.3 Datenerfassung

In den Herdenverwaltungsprogrammen wurden von jedem Tier die Stammdaten dokumentiert (Ohrmarkennummer, Laktationsnummer, Datum der letzten Kalbung, Anzahl der vorausgegangenen Besamungen in dieser Laktation, Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung, Datum der Trächtigkeitsuntersuchung). Dem Besamungsdatum wurde die jeweilige meteorologische Jahreszeit zugeordnet (siehe 3.3.3). Im wöchentlichen Wechsel wurden die Tiere in ein Ovsynchprotokoll aufgenommen und einer der drei Versuchsgruppen zugeordnet.

### 3.4.4 Versuchsablauf

#### 3.4.4.1 Durchführung sowie Zuordnung zu den Gruppen

Die Durchführung der Behandlungsprotokolle sowie die Zuordnung zu den drei Gruppen erfolgte wie in Experiment 1 im wöchentlichen Wechsel. Nach einer Woche, in der das Protokoll der Gruppe 3 durchgeführt wurde, folgte dementsprechend wieder eine Woche mit Gruppe 1 (siehe 3.3.4.1 und 3.3.4.2). Der Wechsel wurde solange wiederholt, bis jedes Protokoll zehnmal durchgeführt worden war.

#### 3.4.4.2 Blutprobenentnahme zur Bestimmung der Konzentration von Progesteron

Von den Kühen, die zwischen dem 21.08.2018 und dem 16.10.2018 in das Experiment aufgenommen wurden ( $n = 491$ ), wurde zum Zeitpunkt der zweiten GnRH-Gabe (16 h vor der künstlichen Besamung) Blutproben entnommen, um diese auf die Konzentration von Progesteron zu untersuchen. Zur Blutgewinnung wurde die Vena bzw. Arteria coccygea media mittels 3,81 cm langen, 18 Gauge Kanüle (Vacurette, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) punktiert und das Blut in sterilen Serum-Vakuumröhrchen (8 ml, Vacurette, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) gesammelt. Unverzüglich gekühlt wurden die Proben zum Labor an der Freien Universität Berlin gebracht, wo sie nach einer 4- bis 6 - stündigen Koagulationszeit bei etwa 20°C und 4500 g für fünf Minuten zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde in Polypropylen-Probenröhrchen (2 ml, Cryovial, Simport, Bernard-Pilon, Kanada) überführt und anschließend bis zur Bestimmung der Konzentration von Progesteron bei - 18°C gelagert. Die Bestimmung der Konzentration von Progesteron im Serum wurde mittels Festphasen Radioimmunoassay ohne Extraktion durchgeführt (MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA). Die Bestimmungsgrenze dieser Methode lag bei 0,05 ng / ml Progesteron. Der Intraassay-Variationskoeffizient, wurde basierend auf einer Qualitätskontrollprobe mit 2,50 ng / ml Progesteron, auf 12,2 % bestimmt. Ein Interassay-Variationskoeffizient ist nicht anzugeben, da alle Proben in einem einzigen Testdurchlauf untersucht wurden. Anhand der Konzentration von Progesteron wurden die Kühe in sieben Kategorien eingeteilt. (von 0,00 bis  $\geq 0,6$  ng / ml in 0,1 ng / ml Schritten). Für die Kühe in jeder Progesteron-Kategorie wurde der Besamungserfolg bestimmt, um daraus retrospektiv den Grenzwert zu ermitteln, bei welchem der größte Abfall des Besamungserfolges zu verzeichnen war (Abbildung 4). Basierend auf einem 47 % geringeren Besamungserfolg bei Kühen mit einer Konzentration von Progesteron  $\geq 0,6$  ng / ml im Vergleich zu Kühen mit niedrigeren Konzentrationen wurde diese Konzentration von Progesteron als Grenzwert für niedrige Konzentrationen von Progesteron (Progesteron  $< 0,6$ ) bzw. hohe Konzentrationen von Progesteron (Progesteron  $\geq 0,6$ ) definiert.

#### 3.4.4.3 Trächtigkeitsuntersuchung

Die Trächtigkeitsuntersuchung erfolgte zwischen dem 38. und 45. Tag nach der Besamung. Im Folgenden wird einheitlich von einer Trächtigkeitsuntersuchung am 38. Tag p.i. gesprochen. Als tragend wurden alle Kühe diagnostiziert, bei denen durch manuelle transrektale Palpation eine Doppelwandigkeit des Uterus festgestellt werden konnte (positiver Eihautgriff). Nichttragend waren Tiere, bei denen keine Trächtigkeit diagnostiziert werden konnte oder die sich bereits vor der geplanten Trächtigkeitsuntersuchung in Brunst zeigten (Wiltbank et al., 2015).

### 3.5 Statistische Analysen

Die erhobenen Zuchtdateien (d.h. Identifikation der Kuh, Besamungsdatum, Anzahl vorausgegangener Besamungen in der Laktation, Kalbedatum, Laktationsnummer) und die Ergebnisse der Trächtigkeitsuntersuchung wurden aus den Herdenverwaltungsprogrammen exportiert und für die Auswertung in eine Excel-Tabelle (Excel 2016, Version 1901, Microsoft Corporation, WA, USA) übertragen. Im Anschluss erfolgte die Analyse, wobei das Programm „SPSS“ (Version 27.0, SPSS inc., IBM, Ehningen, Deutschland) zum Einsatz kam. Um den Einfluss der drei Protokolle auf den Besamungserfolg zu untersuchen, wurden unter der Verwendung der SPSS-Prozedur GENLINMIXED verschiedene logistische Regressionsmodelle ausgewertet. Die einzelne Kuh wurde als experimentelle Einheit betrachtet. Der Betrieb wurde als zufälliger Effekt berücksichtigt. Für die Erstellung der statistischen Modelle wurde wie von Dohoo et al (2009) beschrieben, zunächst jeder Parameter univariat in einem Modell getestet. Im Modell verblieben nach einer sequentiellen Rückwärtsselektion die Variablen, welche einen erklärenden Einfluss ( $P > 0.1$ ) auf den Besamungserfolg aufwiesen. Zusätzlich wurden alle biologisch sinnvollen Interaktionen getestet. Signifikanz wurde für eine beeinflussende Variable ab  $P < 0,05$  definiert. Von einer Tendenz wird bei  $P \geq 0,05$  und  $P < 0,10$  gesprochen.

#### 3.5.1 Statistische Analysen Experiment 1

Die Tiere in Experiment 1 ( $n = 1.979$ ) wurden zur ersten GnRH-Gabe ultrasonographisch auf das Vorhandensein eines Gelbkörpers untersucht. Die Erstellung des statistischen Modells erfolgte wie oben beschrieben. Aufgrund des besonderen Interesses für die Beantwortung der Fragestellung wurde die Anwesenheit eines Gelbkörpers zur ersten GnRH-Gabe sowie die Interaktion zwischen dem Behandlungsprotokoll und der Anwesenheit eines Gelbkörpers zur ersten GnRH-Gabe in das statistische Modell mit aufgenommen, obwohl sich aus der vorigen Analyse mit einer Variablen kein signifikanter Einfluss ableiten lies (Anwesenheit eines Gelbkörpers zur ersten GnRH-Gabe:  $P = 0,80$ , Interaktion zwischen Anwesenheit eines

Gelbkörpers und Behandlungsprotokoll:  $P = 0,51$ ). Um den Einfluss des Behandlungsprotokolls auf den Besamungserfolg zu testen, wurde ein Modell verwendet, welches folgende feste Effekte berücksichtigt: Behandlungsprotokoll (Kontrolle vs. GDPG vs. GPPG), Jahreszeit zur künstlichen Besamung (Frühling: 01. März bis zum 31. Mai; Sommer: 01. Juni bis zum 31. August; Herbst: 01. September bis zum 30. November; Winter: 01. Dezember bis zum 28. Februar), Laktationsnummer (Jungkühe vs. Altkühe), Anwesenheit eines Gelbkörpers zur ersten GnRH-Gabe (ja vs. nein) sowie die Interaktion zwischen Behandlungsprotokoll und Anwesenheit eines Gelbkörpers zur ersten GnRH-Gabe.

### 3.5.2 Statistische Analysen Experiment 2

Zur Bestimmung des Besamungserfolgs wurde in Experiment 2 ein ähnliches statistisches Modell genutzt. Folgende erklärenden Variablen wurden als feste Effekte in das Modell integriert: Behandlungsprotokoll, Jahreszeit zur künstlichen Besamung, Laktationsnummer sowie Anzahl der künstlichen Besamungen (Erst- vs. Folgebesamungen).

Von den Kühen, die zwischen dem 21.08.2018 und dem 16.10.2018 in das Experiment aufgenommen wurden ( $n = 491$ ), wurde zum Zeitpunkt der zweiten GnRH-Gabe (16 h vor der künstlichen Besamung) Blutproben entnommen, um diese auf die Konzentration von Progesteron zu untersuchen. Anhand der Konzentration von Progesteron wurden die Kühe in sieben Kategorien eingeteilt. (von 0,00 bis  $\geq 0,6$  ng / ml in 0,1 ng / ml Schritten). Für die Kühe in jeder Progesteron-Kategorie wurde der Besamungserfolg bestimmt, um daraus retrospektiv den Grenzwert zu ermitteln, bei welchem der größte Abfall des Besamungserfolgs zu verzeichnen ist (Abbildung 3). Basierend auf einem 47 % geringeren Besamungserfolg bei Kühen mit einer Konzentration von Progesteron  $\geq 0,6$  ng / ml im Vergleich zu Kühen mit niedrigeren Konzentrationen wurde diese Konzentration von Progesteron als Grenzwert für niedrige Konzentrationen von Progesteron (Progesteron  $< 0,6$ ) bzw. hohe Konzentrationen von Progesteron (Progesteron  $\geq 0,6$ ) definiert.

### 3.5.3 Statistische Analysen Experiment 1 und 2 kombiniert

Das finale Modell enthielt folgende Variablen als feste Effekte: Behandlungsprotokoll, Jahreszeit zur künstlichen Besamung und Laktationsnummer. Es gab keine Interaktionen zwischen Behandlungsprotokoll und Jahreszeit ( $P = 0,64$ ), Behandlungsprotokoll und Laktationsnummer ( $P = 0,80$ ) oder Behandlungsprotokoll und Besamungsanzahl ( $P = 0,46$ ). In das endgültige statistische Modell wurden diese Interaktionen deshalb nicht aufgenommen.

## 4. Ergebnisse

Insgesamt wurden 3.560 Kühe in die Studie aufgenommen. Von diesen Tieren wurden 416 (11,7 %) ausgeschlossen, weil sie den Betrieb vor der Trächtigkeitsuntersuchung verließen ( $n = 104$ ) oder bei ihrer Behandlung Fehler in der Protokolldurchführung gemacht wurden ( $n = 312$ ). In die statistische Analyse gingen die Daten von 3.144 Kühe ein.

### 4.1 Experiment 1

Von den 1.979 aufgenommenen Kühen wurden 318 Tiere (16,1 %) ausgeschlossen, weil sie in den 10 Tagen des Ovsynchprotokolls erkrankten ( $n = 54$ ), remontiert wurden ( $n = 42$ ), oder nicht termingerecht besamt wurden ( $n = 222$ ). Für die statistische Analyse standen somit die Daten von 1.661 Kühen zur Verfügung. Der Besamungserfolg 38 Tage nach der künstlichen Besamung lag im Durchschnitt bei 33,7 %. Zwischen den drei Behandlungsprotokollen zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Besamungserfolg ( $P = 0,03$ ). Der Anteil tragender Tiere war bei den zweimalig mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  behandelten Tieren (38,0 %) größer als bei den mit der doppelten Dosis behandelten Tieren (31,9 %;  $P = 0,04$ ) oder den Tieren der Kontrollgruppe (31,2 %  $P = 0,02$ ). Der Besamungserfolg von Tieren der Kontrollgruppe und von Tieren der GDPG Gruppe unterschied sich nicht signifikant ( $P = 0,80$ ; Tabelle 10). Jungkühe hatten einen unwesentlich höheren Besamungserfolg als Altkühe (35,8 % vs. 31,5 %;  $P = 0,09$ ). Einen starken Einfluss auf den Besamungserfolg hatte die Jahreszeit ( $P < 0,01$ ). So lag der Besamungserfolg im Frühling bei 36,8 %, im Sommer bei 26,3 %, im Herbst bei 38,0 % und im Winter bei 34,2 %. Die Besamungsanzahl hatte dagegen keinen Einfluss auf den Besamungserfolg ( $P = 0,75$ ). Insgesamt hatten 59,5 % der Kühe zur ersten GnRH-Gabe einen funktionellen Gelbkörper (Gelbkörpergewebe  $\geq 15$  mm). Der Besamungserfolg wurde von der Anwesenheit eines Gelbkörpers nicht beeinflusst ( $P = 0,55$ ). Er betrug bei Tieren mit Gelbkörper 34,4 % und bei Tieren ohne Gelbkörper 33,0 %. Auch war keine Interaktion zwischen dem Effekt der Behandlung und der Anwesenheit eines Gelbkörpers zur ersten GnRH-Gabe feststellbar. Bei der einzelnen Betrachtung von Kühen, die bei der ersten GnRH-Gabe einen funktionellen Gelbkörper hatten, unterschied sich der Besamungserfolg nicht zwischen den Behandlungsprotokollen (30,9 % Kontrolle vs. 34,6 % GDPG vs. 37,8 % GPPG;  $P = 0,16$ ). GPPG Kühe hatten jedoch einen tendenziell höheren Besamungserfolg als Kühe der Kontrollgruppe ( $P = 0,06$ ; Tabelle 9). Bei Kühen, die das Protokoll ohne Gelbkörper begannen, hatte das Behandlungsprotokoll ebenfalls keinen Einfluss auf den Besamungserfolg (31,5 % Kontrolle vs. 29,4 % GDPG vs. 38,3 % GPPG;  $P = 0,11$ ). Im direkten Vergleich war die zweimalige Gabe der doppelten Dosis in Bezug auf den Besamungserfolg überlegen ( $P = 0,04$ ).

**Tabelle 9.** Einfluss des Vorhandenseins eines Gelbkörpers zur ersten GnRH-Gabe während eines Ovsynchprotokolls auf den Besamungserfolg [Besamungserfolg, % (n / n)] 38 Tage nach der künstlichen Besamung bei laktierenden Holstein Friesian Kühen (Experiment 1)

Gelbkörper <sup>2</sup>	Behandlungsprotokoll <sup>1</sup>				P-Wert		
	Kontrolle	GDPG	GPPG	Behandlung	C <sub>1</sub> <sup>4</sup>	C <sub>2</sub> <sup>5</sup>	C <sub>3</sub> <sup>6</sup>
Anwesend, % (n / n) <sup>3</sup>	30,9 (123 / 359)	34,6 (115 / 299)	37,8 (137 / 330)	0,16	0,31	0,06	0,4
Abwesend, % (n / n) <sup>3</sup>	31,5 (74 / 213)	29,4 (74 / 228)	38,3 (95 / 232)	0,11	0,63	0,13	0,04

<sup>1</sup>Im wöchentlich rotierenden Rhythmus wurden laktierende Holstein Friesian Kühe in eines der drei Behandlungsprotokolle aufgenommen.

1) Ovsynch (Kontrolle: Tag 0 GnRH – Tag 7 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH). 2) Ovynch mit einer doppelten Dosis PGF<sub>2α</sub> (GDPG: Tag 0 GnRH – Tag 7 1000 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH). 3) Ovsynch mit einer zweimaligen PGF<sub>2α</sub> Gabe (GPPG: Tag 0 GnRH – Tag 7 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 8 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH). Alle Kühe wurden 16 h nach der zweiten GnRH-Gabe künstlich besamt.

<sup>2</sup>Das Vorhandensein eines Gelbkörpers wurde an Tag 0 durch eine rektale Ultraschalluntersuchung geprüft.

<sup>3</sup>Die Prozentangaben, welche den Besamungserfolg angeben, sind aus dem GENLINMIXED Model abgeleitete Werte, die die Behandlungsgruppe, die Laktationsnummer, die Jahreszeit, die An- oder Abwesenheit eines Gelbkörpers sowie die Interaktion zwischen der Behandlung und der Anwesenheit eines Gelbkörpers miteinschließt. Bei den in Klammern angegebenen Tierzahlen handelt es sich um Rohdaten.

<sup>4</sup>C<sub>1</sub> = vergleichende Betrachtung zwischen Kontrollgruppe und GDPG.

<sup>5</sup>C<sub>2</sub> = vergleichende Betrachtung zwischen Kontrollgruppe und GPPG.

<sup>6</sup>C<sub>3</sub> = vergleichende Betrachtung zwischen GDPG und GPPG.

## 4.2 Experiment 2

Von den 1.581 aufgenommenen Tieren wurden 98 Kühe (6,2 %) aufgrund von Abweichungen in der Protokolldurchführung ( $n = 37$ ) oder wegen Remontierung vor der Trächtigkeitsuntersuchung ( $n = 61$ ) ausgeschlossen. Die Daten von 1.483 Kühen flossen in die statistische Analyse ein.

Der Besamungserfolg lag 38 Tage nach der künstlichen Besamung im Durchschnitt bei 36,5 %. Zwischen den drei Behandlungsprotokollen unterschied sich der Besamungserfolg signifikant ( $P < 0,01$ ). Der Anteil tragender Tiere war bei GPPG Tieren (40,6 %;  $P < 0,01$ ) und bei GDPG Tieren (38,1 %;  $P = 0,02$ ) größer als bei Tieren der Kontrollgruppe (31,0 %). Zwischen GDPG und GPPG Kühen unterschied sich der Besamungserfolg nicht ( $P = 0,45$ ; Tabelle 10). Jungkühe hatten einen unwesentlich höheren Besamungserfolg als Altkühe (38,8 vs. 34,1 %;  $P = 0,09$ ). Die Besamungsanzahl hatte keinen Einfluss auf den Besamungserfolg ( $P = 0,17$ ) und betrug 38,3 % für die Erst- und 34,6 % für die Folgebesamungen. Beeinflusst wurde der Besamungserfolg von der Jahreszeit ( $P < 0,01$ ). Er betrug im Frühling 47,4 %, im Sommer 16,6 %, im Herbst 43,3 % und im Winter 44,1 %.

Das Behandlungsprotokoll hatte Einfluss auf die zur zweiten GnRH-Gabe gemessene Konzentration von Progesteron im Blut ( $P < 0,01$ ). Sowohl GPPG ( $0,49 \pm 0,15$  ng / ml;  $n = 153$ ) als auch GDPG ( $0,73 \pm 0,15$  ng / ml;  $n = 180$ ) Kühe hatten im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe ( $1,22 \pm 0,16$  ng / ml;  $n = 158$ ) niedrigere Konzentrationen von Progesteron ( $P < 0,01$ ). GPPG und GDPG Kühe unterschieden sich nur unwesentlich ( $P = 0,08$ ; Abbildung 4, linke Grafik). Um den Effekt der drei Behandlungsprotokolle auf die Konzentration von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe genauer darzustellen, wurden die Kühe basierend auf den Konzentrationen von Progesteron in sieben Kategorien unterteilt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte sowohl die zweimalige Gabe, als auch die doppelte Dosis den Anteil an Kühen mit Konzentrationen von Progesteron  $\leq 0,09$  ng / ml. Die GPPG Behandlung reduzierte zudem den Anteil an Kühen mit Konzentrationen von Progesteron  $\geq 0,6$  ng / ml im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zwischen der Kontrollgruppe und der GDPG Gruppe unterschied sich der Anteil an Kühen mit Konzentrationen von Progesteron  $\geq 0,6$  ng / ml nicht (Abbildung 5).

Um den Grenzwert von Progesteron, ab welchem dieser einen negativen Einfluss auf den Besamungserfolg hat, zu ermitteln, wurde in diesem Experiment die Konzentration von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe mit dem Besamungserfolg in Beziehung gesetzt (Abbildung 6). Die Überschreitung von 0,6 ng / ml hatte im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen von Progesteron einen um 47 % niedrigeren Besamungserfolg zur Folge.

## Ergebnisse

---

Insgesamt zeigten 64,4 % der Tiere zur zweiten GnRH-Gabe Konzentrationen von Progesteron  $< 0,6$  ng / ml. Kühe mit Konzentrationen von Progesteron  $< 0,6$  ng / ml hatten einen höheren Besamungserfolg (36,9 %) als Tiere mit höheren Konzentrationen von Progesteron (17,4 %). Die Inzidenz für Konzentrationen von Progesteron  $< 0,6$  ng / ml war abhängig vom Behandlungsprotokoll ( $P = 0,01$ ). Gegenüber der Kontrollgruppe hatten mehr GPPG Kühe Konzentrationen von Progesteron  $< 0,6$  ng / ml zur zweiten GnRH-Gabe (55,7 % vs. 73,1 %;  $P < 0,01$ ). GPPG Kühe erreichten unwesentlich häufiger Konzentrationen von Progesteron  $< 0,6$  ng / ml als GDPG Kühe (73,1 % vs. 63,3 %;  $P = 0,05$ ). GDPG Kühe und Kühe der Kontrollgruppe unterschieden sich nicht hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit zur zweiten GnRH- Gabe Konzentrationen von Progesteron  $< 0,6$  ng / ml zu erreichen ( $P = 0,15$ ; Abbildung 4).

Die Laktationsnummer steht in keiner Beziehung mit der durchschnittlichen Konzentration von Progesteron ( $0,77 \pm 0,13$  ng / ml vs.  $0,79 \pm 0,6$  ng / ml für Jung- bzw. Altkühe;  $P = 0,89$ ). Auch der Anteil an Kühen mit Konzentrationen von Progesteron  $< 0,6$  ng / ml wurde von der Laktationsnummer nicht beeinflusst (Jungkühe 58,8% vs. Altkühe 65,9%;  $P = 0,15$ ).

Eine Korrelation zwischen dem Behandlungseffekt und der Laktationsnummer bestand nicht ( $P = 0,995$ ).

**Tabelle 10.** Einfluss des Behandlungsprotokolls auf den Besamungserfolg [Besamungserfolg, % (Anzahl Kühe)] 38 Tage nach der künstlichen Besamung für die Experimente 1 und 2 sowie für die Kombinierten Ergebnisse aus Experiment 1 und 2.

Experiment	Behandlungsprotokoll <sup>1</sup>				P-Wert		
	Kontrolle	GDPG	GPPG	Behandlung	C <sub>1</sub> <sup>5</sup>	C <sub>2</sub> <sup>6</sup>	C <sub>3</sub> <sup>7</sup>
Experiment 1 <sup>2</sup>	31,2 (572)	31,9 (527)	38,0 (562)	0,03	0,8	0,02	0,04
Experiment 2 <sup>3</sup>	31,0 (493)	38,1 (475)	40,65 (515)	0,05	0,02	0,01	0,45
kombinierte Ergebnisse aus Experiment 1 und 2 <sup>4</sup>	32,4 (1065)	36,3 (1002)	40,5 (1077)	0,01	0,06	0,01	0,05

<sup>1</sup>Im wöchentlich rotierenden Rhythmus wurden laktierende Holstein Friesian Kühe in eines der drei Behandlungsprotokolle aufgenommen. 1) Ovsynch (Kontrolle: Tag 0 GnRH – Tag 7 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH). 2) Ovsynch mit einer doppelten Dosis PGF<sub>2α</sub> (GDPG: Tag 0 GnRH – Tag 7 1000 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH). 3) Ovsynch mit einer zweimaligen PGF<sub>2α</sub> Gabe (GPPG: Tag 0 GnRH – Tag 7 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 8 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH). Alle Kühe wurden 16 h nach der zweiten GnRH-Gabe künstlich besamt.

<sup>2</sup>Die Prozentangaben, welche den Besamungserfolg angeben, sind aus dem GENLINMIXED Model abgeleitete Werte, die die Behandlungsgruppe, die Laktationsnummer, die Jahreszeit, die An- oder Abwesenheit eines Gelbkörpers sowie die Interaktion zwischen der Behandlung und der Anwesenheit eines Gelbkörpers mit einschließt.

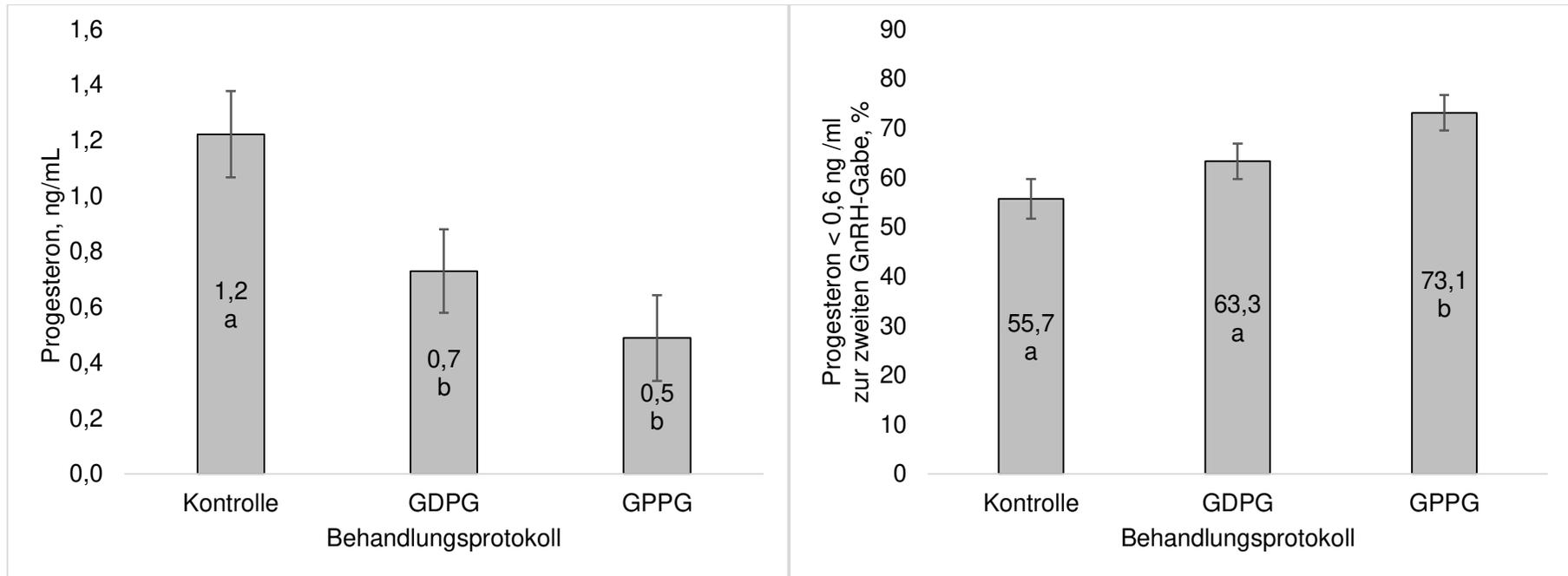
<sup>3</sup>Die Prozentangaben, welche den Besamungserfolg angeben, sind aus dem GENLINMIXED Model abgeleitete Werte, die die Behandlungsgruppe die Laktationsnummer, die Jahreszeit sowie die Anzahl der künstlichen Besamungen mit einschließt.

<sup>4</sup>Die Prozentangaben, welche den Besamungserfolg angeben, sind aus dem GENLINMIXED Model abgeleitete Werte, die die Behandlungsgruppe die Laktationsnummer sowie die Jahreszeit mit einschließt.

<sup>5</sup>C<sub>1</sub> = vergleichende Betrachtung zwischen Kontrollgruppe und GDPG.

<sup>6</sup>C<sub>2</sub> = vergleichende Betrachtung zwischen Kontrollgruppe und GPPG.

<sup>7</sup>C<sub>3</sub> = vergleichende Betrachtung zwischen GDPG und GPPG.

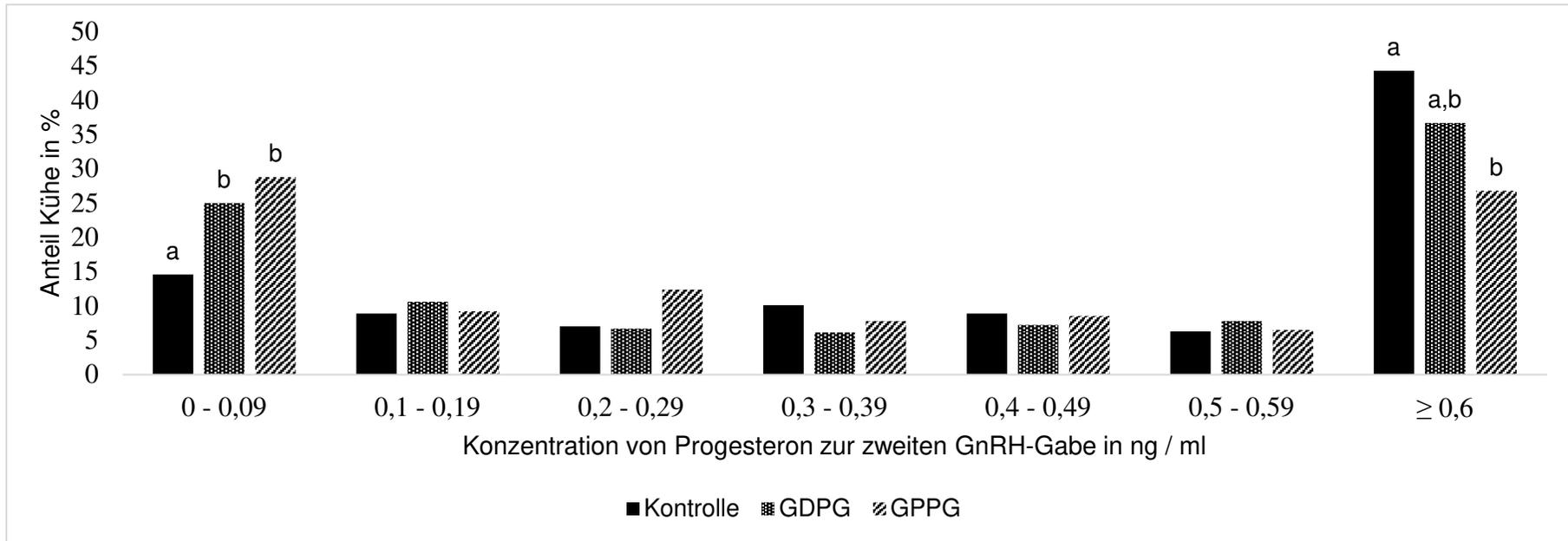


**Abbildung 4.** Einfluss des Behandlungsprotokolls<sup>1</sup> auf die Konzentrationen von Progesteron<sup>2</sup> zur zweiten GnRH-Gabe (linke Graphik) sowie auf den Anteil an Kühen mit Konzentrationen von Progesteron < 0,6 ng / ml zur zweiten GnRH-Gabe (rechte Graphik). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts da.

<sup>1</sup>Im wöchentlich rotierenden Rhythmus wurden laktierende Holstein Friesian Kühe in eines der drei Behandlungsprotokolle aufgenommen.

1) Ovsynch (Kontrolle: Tag 0 GnRH – Tag 7 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH). 2) Ovsynch mit einer doppelten Dosis PGF<sub>2α</sub> (GDPG: Tag 0 GnRH – Tag 7 1000 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH). 3) Ovsynch mit einer zweimaligen PGF<sub>2α</sub> Gabe (GPPG: Tag 0 GnRH – Tag 7 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 8 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH). Alle Kühe wurden 16 h nach der zweiten GnRH-Gabe künstlich besamt.

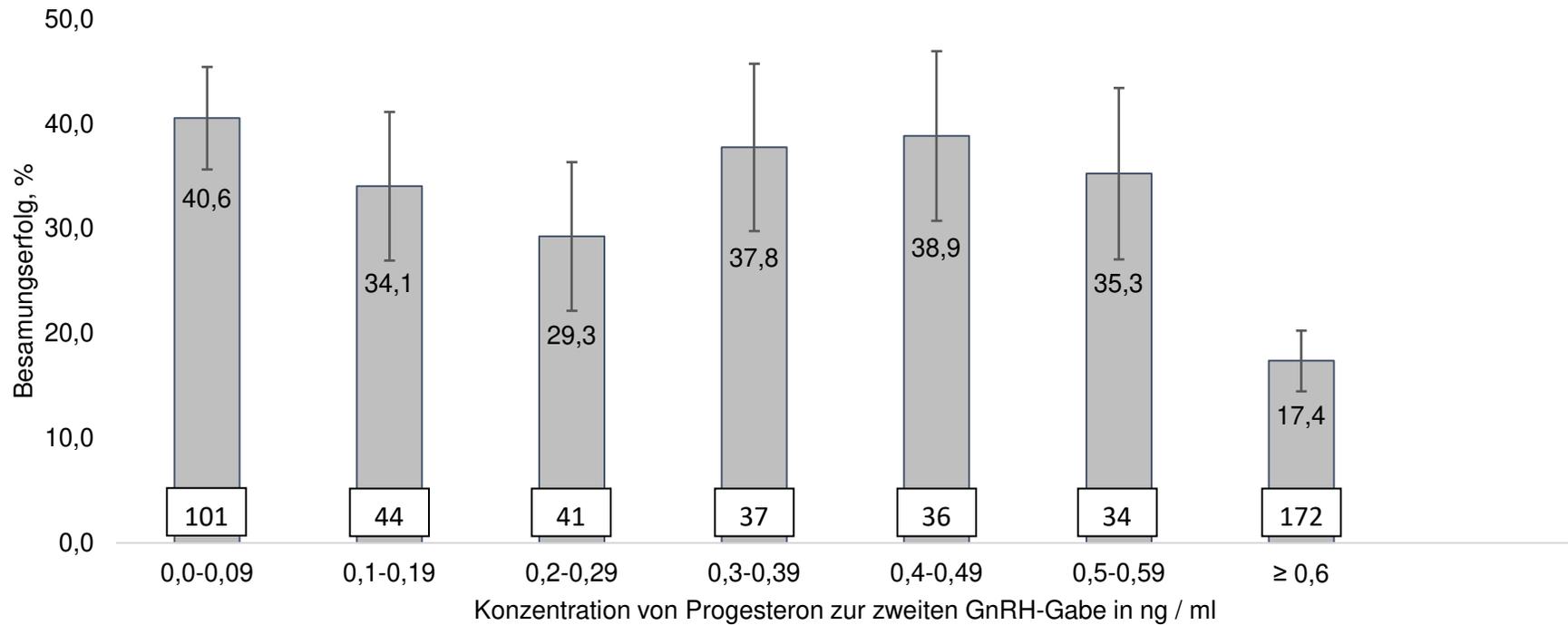
<sup>2</sup>Zum Zeitpunkt der zweiten GnRH-Gabe wurden Blutproben (n=491) entnommen und die Konzentration von Progesteron bestimmt. Innerhalb einer Grafik weisen verschiedene Buchstaben auf signifikante Unterschiede zwischen den Werten hin (P < 0,05)



**Abbildung 5.** Einfluss des Behandlungsprotokolls<sup>1</sup> auf die prozentuale Verteilung von Kühen innerhalb der Progesteron-Kategorien<sup>2</sup> (Experiment 2).

<sup>1</sup>Im wöchentlich rotierenden Rhythmus wurden laktierende Holstein Friesian Kühe in eines der drei Behandlungsprotokolle aufgenommen. 1) Ovsynch (Kontrolle: Tag 0 GnRH – Tag 7 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH). 2) Ovsynch mit einer doppelten Dosis PGF<sub>2α</sub> (GDPG: Tag 0 GnRH – Tag 7 1000 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH). 3) Ovsynch mit einer zweimaligen PGF<sub>2α</sub> Gabe (GPPG: Tag 0 GnRH – Tag 7 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 8 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH). Alle Kühe wurden 16 h nach der zweiten GnRH-Gabe künstlich besamt.

<sup>2</sup>Zum Zeitpunkt der zweiten GnRH-Gabe wurden Blutproben (n=491) entnommen und die Konzentration von Progesteron bestimmt. Basierend auf der Konzentration von Progesteron wurden die Kühe in sieben Kategorien eingeteilt. Innerhalb einer Progesteron-Kategorie weisen unterschiedliche Buchstaben auf signifikante Unterschiede zwischen den Werten hin (P < 0,05).



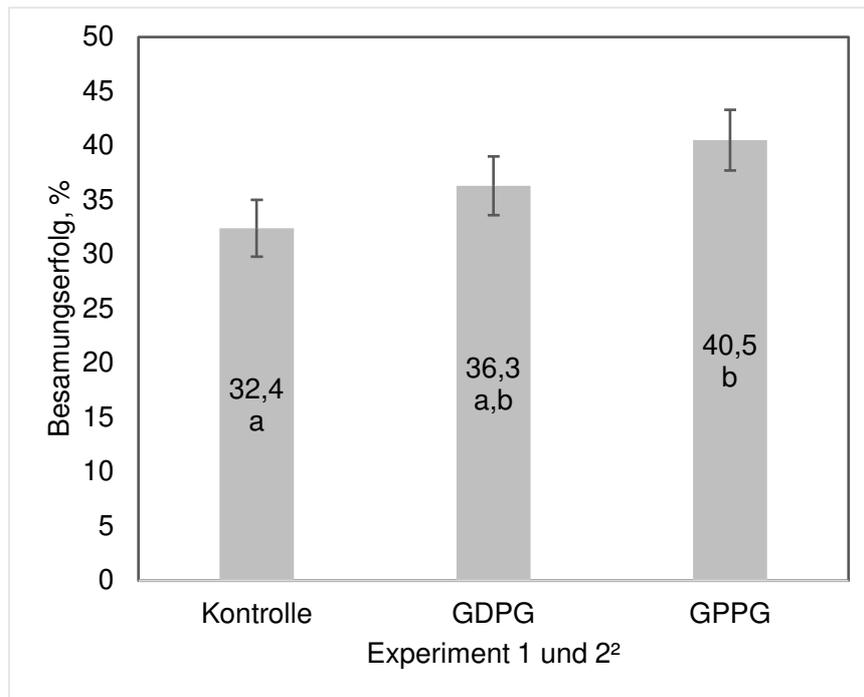
**Abbildung 6.** Einfluss der Konzentration von Progesteron<sup>1</sup> zur zweiten GnRH-Gabe auf den Besamungserfolg 38 Tage nach der künstlichen Besamung für Kühe aus allen drei Behandlungsprotokollen (Experiment 2). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts da.

<sup>1</sup>Zum Zeitpunkt der zweiten GnRH-Gabe wurden Blutproben (n=491) entnommen und die Konzentration von Progesteron bestimmt. Basierend auf der Konzentration von Progesteron wurden die Kühe in sieben Kategorien eingeteilt. Die obere in den Balken stehenden Zahlen geben den Besamungserfolg in % an. Die untere Zahl beziehen sich auf die Anzahl der Kühe je Progesteron-Kategorie.

### 4.3 Gemeinsame Auswertung der Experimente 1 und 2

Die Experimente 1 und 2 wurden nach einem vergleichbaren Studiendesign durchgeführt. Um eine größere statistische Aussagekraft bezüglich des Besamungserfolgs zu erreichen, wurden die Ergebnisse beider Experimente kombiniert. Der Besamungserfolg betrug im Durchschnitt 36,3 %. Unter Berücksichtigung aller Behandlungsprotokolle hatten Jungkühe einen höheren Besamungserfolg (39,0 %) als Altkühe (33,7%;  $P = 0,01$ ). Die Besamungsanzahl hatte keinen Einfluss auf den Besamungserfolg, welcher bei Erstbesamungen 36,1 % und bei Folgebesamungen 33,5 % ( $P = 0,16$ ) betrug. Der Besamungserfolg im Frühling (39,9 %), Herbst (41,4 %) und Winter (41,6 %) war größer als im Sommer (24,0 %;  $P < 0,01$ ). Kühe, die wiederholt mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  behandelt wurden, hatten einen höheren Besamungserfolg (40,5 %;  $P < 0,01$ ) als Kühe, die nur eine einfache Dosis  $\text{PGF}_{2\alpha}$  an Tag 7 erhielten (32,4 %) und tendierten zu einem höheren Besamungserfolg als Tiere, die eine doppelte Dosis an Tag 7 erhielten (36,3 %;  $P = 0,05$ ). Tendenziell war der Besamungserfolg von GDPG Kühen größer als bei Kühen der Kontrollgruppe ( $P = 0,06$ ; Tabelle 10; Abbildung 7).

Der Einfluss des Behandlungsprotokolls auf den Besamungserfolg wurde weder von der Jahreszeit ( $P = 0,64$ ) noch von der Laktations- ( $P = 0,79$ ) oder der Besamungsnummer ( $P = 0,46$ ) beeinflusst.



**Abbildung 7.** Einfluss des Behandlungsprotokolls<sup>1</sup> auf den Besamungserfolg für die kombinierten Ergebnisse aus Experiment 1 und 2<sup>2</sup>. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts da.

<sup>1</sup>Im wöchentlich rotierenden Rhythmus wurden laktierende Holstein Friesian Kühe in eines der drei Behandlungsprotokolle aufgenommen. 1) Ovsynch (Kontrolle: Tag 0 GnRH – Tag 7 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH). 2) Ovsynch mit einer doppelten Dosis PGF<sub>2α</sub> (GDPG: Tag 0 GnRH – Tag 7 1000 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH). 3) Ovsynch mit einer zweimaligen PGF<sub>2α</sub> Gabe (GPPG: Tag 0 GnRH – Tag 7 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 8 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH). Alle Kühe wurden 16 h nach der zweiten GnRH-Gabe künstlich besamt. An Tag 38 nach der Besamung erfolgte eine Trächtigkeitsdiagnostik.

<sup>2</sup>Die Prozentangaben, welche den Besamungserfolg angeben, sind aus dem GENLINMIXED Model abgeleitete Werte, die die Behandlungsgruppe, die Laktationsnummer sowie die Jahreszeit miteinschließt. Verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Werten an (P < 0,05).

## 5. Diskussion

Das Ziel der Studie war es, den Einfluss einer doppelten PGF<sub>2α</sub>-Dosis (1000 µg Cloprostenol) oder einer zweimaligen PGF<sub>2α</sub>-Gabe (500 µg Cloprostenol an Tag 7 und Tag 8) mit einer einmaligen PGF<sub>2α</sub>-Gabe (500 µg Cloprostenol an Tag 7) während eines 7 d-Ovsynchprotokolls auf die Konzentration von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe und auf den Besamungserfolg zu untersuchen.

Die Hypothese lautete, dass durch beide Modifikationen niedrigere Konzentrationen von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe und höhere Besamungserfolge erreicht werden als durch ein herkömmliches Ovsynchprotokoll.

### 5.1 Experiment 1

In Experiment 1 sollte weiterhin untersucht werden, ob der Einfluss der Behandlungsprotokolle von der Anwesenheit eines Gelbkörpers zur ersten GnRH-Gabe abhängig ist, wie es in anderen Studien unter der Verwendung von Dinoprost bereits beschrieben wurde (Santos et al., 2016; Stevenson, 2016a; Barletta et al., 2018).

Zwischen den drei Behandlungsprotokollen zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Besamungserfolg ( $P = 0,03$ ). Der Anteil tragender Tiere war bei den zweimalig mit PGF<sub>2α</sub> behandelten Tieren (38,0 %) größer als bei den mit der doppelten Dosis behandelten Tieren (31,9 %;  $P = 0,04$ ) oder den Tieren der Kontrollgruppe (31,2 %  $P = 0,02$ ). Der Besamungserfolg von Tieren der Kontrollgruppe und von Tieren der GDPG Gruppe unterschied sich nicht signifikant ( $P = 0,8$ ).

Insgesamt hatten nur 59,5 % der Kühe zur ersten GnRH-Gabe einen funktionellen Gelbkörper (Gelbkörpergewebe  $\geq 15$  mm). Dies erscheint auch bei nicht vorsynchronisierten Tieren gering. In anderen Studien war zu Beginn eines Resynchprotokolls der Anteil der Kühe, die zur ersten GnRH-Gabe einen anhand einer Ultraschalluntersuchung nachgewiesenen Gelbkörper trugen, mit 72 bzw. 80,9 % deutlich höher (Santos et al., 2016; Barletta et al., 2018). Da die Anwesenheit eines Gelbkörpers vom Zyklusstand abhängig ist, wird sie durch die Zeitspanne zwischen der letzten künstlichen Besamung und dem Beginn des Resynchprotokolls beeinflusst. Die unterschiedlichen Zeitspannen von  $33 \pm 3$  Tage (Santos et al., 2016) über 35 Tage in der vorliegenden Studie bis 39 Tage (Barletta et al., 2018) können hier möglicherweise einen Unterschied bedingen. Zur ersten künstlichen Besamung liegt der Anteil azyklischer Tiere zwischen 20 und 30 % (Moreira et al., 2001; Chebel et al., 2006). Während in vergleichbaren Studien ausschließlich Tiere zu Folgebearbeitungen aufgenommen

wurden, flossen in die vorliegende Auswertung die Daten von 434 Erstbesamungen mit ein. Der Anteil azyklischer Tiere, die zur ersten GnRH-Gabe keinen Gelbkörper trugen, war dadurch möglicherweise erhöht.

Der Besamungserfolg bei Kühen mit Gelbkörper (34,4 %) und Kühen ohne Gelbkörper (33,0 %) zur ersten GnRH-Gabe unterschied sich in der vorliegenden Studie nicht. Ähnliches zeigte Carvalho et al. (2015) in einer Studie mit 897 Kühen. Auch hier hatte die Konzentration von Progesteron zur ersten GnRH-Gabe keinen Einfluss auf den Besamungserfolg (Carvalho et al., 2015a). In der aktuellen Literatur wird dagegen mehrheitlich festgestellt, dass sich die Anwesenheit eines Gelbkörpers zur ersten GnRH-Gabe positiv auf den Besamungserfolg auswirkt (Denicol et al., 2012; Bisinotto et al., 2015; Stevenson, 2016a; Carvalho et al., 2018; Stevenson et al., 2018). Hohe Konzentrationen von Progesteron reduzieren jedoch auch die Ovulationshäufigkeit nach der ersten GnRH-Gabe, indem sie hemmend auf die GnRH-induzierte LH-Freisetzung aus dem Hypophysenvorderlappen wirken (Giordano et al., 2013). Kühe, die nach der ersten GnRH-Gabe ovulieren, zeigen auch ein erhöhtes Ansprechen auf die folgenden Hormongaben während des Ovsynchprotokolls, woraus sich eine höhere Synchronisationsrate ableitet (Vasconcelos et al., 1999; Bello et al., 2006). Außerdem wird eine höhere Ovulationsrate mit einem höheren Besamungserfolg in Beziehung gebracht (Chebel et al., 2006; Galvao et al., 2007; Giordano et al., 2013). Die beste Voraussetzung für einen hohen Besamungserfolg haben Kühe mit moderaten Konzentrationen von Progesteron (zwischen 0,5 und 6 ng / ml) zur ersten GnRH-Gabe (Carvalho et al., 2018). Eine niedrige Konzentration von Progesteron während des Heranreifens der präovulatorischen Follikelwelle wird mit einer reduzierten Fertilität in Verbindung gebracht (Pursley und Martins, 2011; Wiltbank et al., 2012). Progesteron wirkt über einen negativen Feedbackmechanismus hemmend auf die GnRH-Freisetzung und bewirkt dadurch eine reduzierte Ausschüttung des LH aus dem Hypophysenvorderlappen (Kinder et al., 1996). Bei niedriger Konzentration von Progesteron während der Follikelreifungsphase kommt es sowohl zu einer erhöhten Frequenz als auch zu einer höheren Amplitude der LH-Ausschüttung (Roche und Ireland, 1981; Kinder et al., 1996). Dies führt zu einem beschleunigten Follikelwachstum (Cerri et al., 2011).

Follikel, die unter niedriger Konzentration von Progesteron heranreifen, sind zur Ovulation größer als solche, die unter hoher Konzentration von Progesteron heranreifen (Carvalho et al., 2019). Bei verlängerter Follikeldominanz unter suboptimalen Konzentrationen von Progesteron setzt die Eizelle die Meiose fort und es kommt zur ersten Reifeteilung noch vor dem LH-Peak (Revah und Butler, 1996). Ähnlich wie persistierende Follikel werden solche durch LH überstimulierte Follikel seltener befruchtet und es entwickelt sich kein gesunder Embryo aus ihnen (Sartori et al., 2002b).

Bei Tieren, die zur ersten GnRH-Gabe keinen Gelbkörper tragen, ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie zur PGF<sub>2α</sub> -Gabe einen einzelnen jungen Gelbkörper haben, besonders hoch (Stevenson et al., 2018). Der nach der ersten GnRH-Gabe gebildete Gelbkörper verhält sich teilweise refraktär gegenüber einer einmaligen PGF<sub>2α</sub> -Gabe an Tag 7 des Ovsynchprotokolls (Giordano et al., 2012b; Stevenson, 2016a).

Tiere, die ausschließlich einen jungen, in Antwort auf die erste GnRH-Gabe gebildeten Gelbkörper haben, haben häufiger eine unvollständige Luteolyse (16,7 %; Stevenson et al., 2018 bzw. 35,6 %; Giordano et al., 2012b) als solche Tiere, die zum Zeitpunkt der PGF<sub>2α</sub> -Gabe einen jungen und einen alten Gelbkörper aufweisen (7,2 %; Stevenson et al., 2018 bzw. 8,2 %; Giordano et al., 2012b). Die physiologischen Grundlagen, warum ein einzelner junger Gelbkörper unzureichend auf eine einfache Behandlung mit exogenem PGF<sub>2α</sub> anspricht, wurden vielfach diskutiert und sind noch nicht vollständig geklärt (Howard und Britt, 1990; Wade und Lewis, 1996; McCracken et al., 1999).

Die Ausschüttung von endogenem PGF<sub>2α</sub> aus dem Uterus erfolgt pulsatil (Baird et al., 1976). Es wird angenommen, dass weniger die Höhe eines einzelnen PGF<sub>2α</sub> Impulses als die Frequenz der Impulse über eine entsprechende Zeit entscheidend für eine vollständige Luteolyse ist (Peterson et al., 1975; Ginther et al., 2010; Greco et al., 2018). Kleinere PGF<sub>2α</sub> Impulse verursachen jedoch zunächst reversible Abfälle der Konzentration von Progesteron (Ginther et al., 2010). Dem deutlichen und letztendlich irreversiblen Abfall von Progesteron geht ein besonders hoher Peak des im Blut zirkulierenden PGF<sub>2α</sub> Metaboliten 13, 14-dihydro-15-keto-PGF (PGFM) voraus (Ginther et al., 2010; Pinaffi et al., 2018; Mezera et al., 2019). Die Angaben zur Höhe dieses PGF<sub>2α</sub> Peaks, welcher die Luteolyse auslöst, schwanken erheblich und werden zwischen  $92,8 \pm 10,7$  und  $532,4 \pm 84,8$  pg / ml angegeben (Ginther et al., 2010; Pinaffi et al., 2018).

Die PGF<sub>2α</sub> -Impulse des Endometriums stimulieren die Ausschüttung von Oxytocin aus dem Gelbkörper, welches wiederum eine uterine PGF<sub>2α</sub> -Ausschüttung fördert (McCracken et al., 1984).

Möglicherweise bewirkt der ältere, ausgereifere Gelbkörper über PGF<sub>2α</sub> -Rezeptoren eine gesteigerte Freisetzung von lutealem Oxytocin, welches wiederum die uterine PGF<sub>2α</sub> -Sekretion erhöht (McCracken et al., 1999) und somit auch die Regression eines jüngeren Gelbkörpers fördert (Stevenson, 2016a, b).

Deshalb war eine Grundannahme dieser Arbeit, dass besonders solche Tiere von der zweimaligen PGF<sub>2α</sub> -Gabe profitieren, die zur ersten GnRH-Gabe keinen Gelbkörper tragen.

Anders als in aktuellen Studien beschrieben (Santos et al., 2016; Stevenson, 2016a; Barletta et al., 2018), konnte dies nicht bestätigt werden. Der Behandlungseffekt war unabhängig von der Anwesenheit eines Gelbkörpers zur ersten GnRH-Gabe.

Möglicherweise war die Methode, die Größe des Gelbkörpers mittels eines 10 mm groben, über das Ultraschallbild gelegten Gitternetzes abzuschätzen, nicht genau genug, um einen funktionellen Gelbkörper mit ausreichender Sicherheit zu erkennen. Bei dem Nachweis eines funktionellen Gelbkörpers zu einem unbekanntem Zyklusstand mittels transrektaler Ultraschalluntersuchung liegt die Sensitivität bei 89,4 bzw. 91,2 % und die Spezifität bei 39,8 bzw. 45,7 % (Bicalho et al., 2008; Sauls-Hiesterman et al., 2020). Um die Spezifität der Methodik zu erhöhen, eignet sich die Definition eines bestimmten Durchmessers, ab welchem ein Gelbkörper als funktionell anzusprechen ist. Die Sensitivität nimmt dabei nur moderat ab (Bicalho et al., 2008). Die höchste Übereinstimmung zwischen Ultraschalldiagnostik und der Konzentration von Progesteron im Blut wurde bei einem Durchmesser von 22 - 23 mm erreicht (Bicalho et al., 2008). In der Literatur werden jedoch Durchmesser mit einer Spannweite zwischen 10 und 23 mm definiert (Bisinotto et al., 2015; Giordano et al., 2016; Santos et al., 2016), was einen Vergleich der Ergebnisse erschwert. Das Nachweisen eines funktionellen Gelbkörpers mithilfe einer Ultraschalluntersuchung ist auch von den Fähigkeiten und Erfahrungen des untersuchenden Tierarztes bzw. Besamungstechnikers abhängig. Sensitivität und Spezifität schwanken zum Teil erheblich zwischen verschiedenen Technikern (Sensitivität 88,1 – 95,8 % / Spezifität 20,5 - 70,2 %; Sauls-Hiesterman et al., 2020). Das Abschätzen der Größe eines vorhandenen Gelbkörpers mittels Ultraschalldiagnostik stellt eine einfache und kostengünstige Methode dar, die sich leicht in den Arbeitsablauf im Stall integrieren lässt. Anders als eine Blutuntersuchung bietet sich mit ihr die Möglichkeit einer Entscheidungshilfe direkt im Stall. Die Konzentration von Progesteron im Blut wird zum einen durch die Produktion durch den Gelbkörper und zum anderen durch den Metabolismus von Progesteron durch die Leber bedingt (Sartori et al., 2002a). Die Größe des Gelbkörpers korreliert daher nicht zwingend mit der im Blut gemessenen Konzentration von Progesteron. Als Goldstandard für die Diagnostik eines funktionellen Gelbkörpers gilt daher die Messung der Konzentration von Progesteron im Blut (Silva et al., 2007; Stevenson et al., 2008). Für weiterführende Studien sollte neben einer ultrasonographischen Vermessung der Gelbkörper eine Messung der Konzentration von Progesteron im Blut zur ersten GnRH-Gabe vorgenommen werden. Nur so lässt sich die Funktion des Gelbkörpers sicher nachweisen und prüfen, ob der Einfluss einer modifizierten PGF<sub>2α</sub>-Gabe auf den Besamungserfolg von der Anwesenheit eines Gelbkörpers zur ersten GnRH-Gabe abhängig ist.

## 5.2 Experiment 2

Das zweite Experiment diente dazu, den Einfluss der modifizierten Ovsynchprotokolle auf den Besamungserfolg und die Konzentration von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe zu evaluieren. Das Erreichen niedriger Konzentrationen von Progesteron zum Zeitpunkt der künstlichen Besamung ist eine Voraussetzung für eine hohe Fertilität (Santos et al., 2010; Giordano et al., 2012a; Carvalho et al., 2018). Für den negativen Einfluss von erhöhtem Progesteron zur Besamung können verschiedene Ursachen verantwortlich sein. Bei in vitro Fertilisationsversuchen, verringerte die Zugabe von Progesteron zum Reifungsmedium sowohl die Zahl der befruchteten Eizellen als auch den Anteil an Eizellen, aus denen sich Blastozysten entwickelten (Silva und Knight, 2000). Progesteron könnte damit negativ auf die Embryonalentwicklung und folglich auf die Fruchtbarkeit wirken. Eine weitere Ursache für den reduzierten Besamungserfolg bei Tieren mit unvollständiger Luteolyse kann der reduzierende Einfluss von Progesteron auf die Schichtdicke des Endometriums sein (Souza et al., 2011). Um den Anteil an Kühen mit besonders niedrigen Konzentrationen von Progesteron in dem vorliegenden Experiment zu ermitteln, wurde von einer Subpopulation von Kühen aus Experiment 2 die Konzentration von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe im Blut gemessen. Ergebnisse zur Konzentration von Progesteron beziehen sich auf die Daten dieser 491 Kühe.

In der vorliegenden Studie hatten sowohl GPPG als auch GDPG Kühe im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe niedrigere Konzentrationen von Progesteron ( $P < 0,01$ ) zur zweiten GnRH-Gabe. GPPG Tiere zeigten nur unwesentlich niedrigere Konzentrationen von Progesteron als GDPG Kühe ( $P = 0,08$ ). Der positive Effekt der doppelten  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe auf das Erreichen niedriger Konzentrationen von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe konnte in anderen Studien ebenfalls gezeigt werden (Carvalho et al., 2015b; Wiltbank et al., 2015). Es gibt allerdings nur wenige Studien, die eine zweimalige  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe mit der Verabreichung einer doppelten  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Dosis direkt verglichen haben. Barletta et al. (2018) konnte bei dem Vergleich der drei Behandlungsoptionen (Kontrolle, GPPG, GDPG) unter Verwendung von Dinoprost keinen Effekt auf die Konzentration von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe feststellen.

Der Grenzwert zur Definition einer vollständigen Luteolyse wird in der aktuellen Literatur zwischen 0,3 und 0,5 ng / ml angegeben (Brusveen et al., 2009; Giordano et al., 2013; Wiltbank et al., 2015). Dieser wird in der Regel, wie bei Carvalho et al. (2018) beschrieben, retrospektiv ermittelt, indem die Konzentration von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe mit dem Besamungserfolg in Beziehung gesetzt wird.

In der vorliegenden Studie ergab sich mithilfe dieser Methode eine maximale Konzentration von 0,6 ng / ml Progesteron für eine vollständige Luteolyse. Basierend auf dieser Grenze zeigten insgesamt 63,0 % der Tiere eine vollständige Luteolyse.

Im 7 d-Ovsynchprotokoll mit einer einzigen PGF<sub>2α</sub>-Gabe wird in der Literatur eine Luteolyserate von 79 – 88 % beschrieben (Brusveen et al., 2009; Martins et al., 2011a; Giordano et al., 2013; Barletta et al., 2018). Dagegen erscheint das hier gefundene Ergebnis niedrig. Unterschiedliche Methoden der Analyse von Progesteron, die Definition der Luteolyse sowie der Aufbau des Studiendesigns mit oder ohne Vorsynchronisation erschweren den direkten Vergleich.

Um den Grenzwert von Progesteron zur Definition einer vollständigen Luteolyse zu ermitteln, wurde in der vorliegenden Arbeit die Konzentration von Progesteron zum Zeitpunkt der zweiten GnRH-Gabe genutzt. Diese Methode wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Brusveen et al., 2009; Santos et al., 2016; Barletta et al., 2018). Die Messung der Konzentration von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe stellt allerdings eine Momentaufnahme dar. Eine niedrige Konzentration von Progesteron kann zum einen bedeuten, dass tatsächlich eine durch das Behandlungsprotokoll verursachte Luteolyse stattgefunden hat. Möglich ist aber auch, dass es zu einer spontanen Luteolyse schon vor der PGF<sub>2α</sub>-Gabe und unabhängig vom Behandlungsprotokoll kam oder gar kein Gelbkörper vorhanden war. Andere Autoren nutzten deshalb eine präzisere Definition, die auf der zweimaligen Messung von Progesteron basiert. Eine vollständige Luteolyse definiert sich hier durch hohe Konzentrationen von Progesteron ( $\geq 1$  ng / ml) zur ersten oder einzigen PGF<sub>2α</sub>-Gabe und niedrigere Konzentrationen von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe ( $< 1$  ng / ml; (Ribeiro et al., 2012a),  $< 0,5$  ng / ml (Martins et al., 2011a) oder  $< 0,3$  ng / ml, (Giordano et al., 2013)). Eine zweimalige Messung von Progesteron war in der aktuellen Studie in den Arbeitsablauf auf den Milchviehbetrieben nicht integrierbar.

Das Behandlungsprotokoll hatte im durchgeführten Experiment einen signifikanten Einfluss auf das Erreichen von Konzentrationen von Progesteron  $\leq 0,6$  ng / ml ( $P = 0,01$ ).

Gegenüber der Kontrollgruppe konnte nur durch die GPPG-Behandlung bei mehr Kühen eine Konzentration von Progesteron  $\leq 0,6$  ng / ml erreicht werden (55,7 % vs. 73,2 %;  $P < 0,01$ ). Auch der Besamungserfolg von zweimal mit PGF<sub>2α</sub> behandelten Tieren war signifikant höher als der von Kontrolltieren (40,6 % vs. 31,0 %;  $P > 0,01$ ). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen zahlreicher Studien aus den letzten Jahren. Die Luteolyserate war nach zweimaliger PGF<sub>2α</sub>-Gabe in den meisten Studien signifikant höher und unterschied sich gegenüber der einmaligen PGF<sub>2α</sub>-Gabe um 6 - 14 Prozentpunkte (Brusveen et al., 2009; Carvalho et al., 2015b; Wiltbank et al., 2015; Santos et al., 2016; Heidari et al., 2017; Barletta

et al., 2018). Anders als in der vorliegenden Studie konnte ein Einfluss auf den Besamungserfolg aufgrund der oft zu kleinen Tierzahlen in den einzelnen Studien meist nicht ermittelt werden. Vergleichbare Ergebnisse zur vorliegenden Studie liefert eine Metaanalyse, die deutlich macht, dass die zusätzliche  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe die Luteolyserate um 11,6 % und den Besamungserfolg um 4,6 % im Vergleich zu einer einzelnen  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe erhöht (Borchardt et al., 2018).

GDPG Kühe und Kühe der Kontrollgruppe erreichten in gleicher Weise Konzentrationen von Progesteron  $\leq 0,6$  ng / ml ( $P = 0,14$ ). Dies deckt sich mit den Erkenntnissen von Barletta et al. (2018). Auch hier konnte die Luteolyserate in einem 7 d-Ovsynchprotokoll durch die Verwendung der doppelten Dosis im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nicht gesteigert werden. Eine andere Studie zeigte dagegen bei Mehrkalbskühen durch die Erhöhung der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Dosis von 500 auf 750  $\mu\text{g}$  Cloprostenol in einem 7 d-Ovsynchprotokoll sowohl eine erhöhte Luteolyserate als auch einen tendenziell höheren Besamungserfolg (+ 8.5 %;  $P = 0,03$  bzw. + 4.5 %;  $P = 0,05$ ; Giordano et al., 2013).

Bei GPPG Kühen wurden bei der hier vorgelegten Studie unwesentlich häufiger Konzentrationen von Progesteron  $\leq 0,6$  ng / ml erreicht als bei GDPG Kühen (73,2 vs. 63,3 %;  $P = 0,06$ ). Bisher wurden wenig Studien durchgeführt, die die zweimalige  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe direkt mit der doppelten Dosis verglichen haben.

In einem 5 d-Cosynchprotokoll zeigten nach zweimaliger  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe (an Tag 5 und 6 je 500  $\mu\text{g}$  Cloprostenol) im Vergleich zur Anwendung der doppelten  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Dosis (1000  $\mu\text{g}$  Cloprostenol) mehr Kühe eine vollständige Luteolyse (95,9 % vs. 72,1 %;  $P = 0,01$ ; Ribeiro et al., 2012a). Auch der Besamungserfolg der Tiere, die zweimalig mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  behandelt wurden, lag deutlich über dem der Tiere, die eine doppelte Dosis erhielten (39,9 % vs. 29,4 %). Bei vorsynchronisierten Tieren zeigte sich dieser Effekt besonders deutlich (Ribeiro et al., 2012a). Die Autoren vermuten, dass es durch die Vorsynchronisation (GnRH-6d-GnRH) vermehrt zu Ovulationen in Antwort auf die erste GnRH-Gabe kommt. Der sich daraus bildende Gelbkörper verhält sich wie oben bereits beschrieben z.T. refraktär gegenüber einer einmaligen  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe.

Stevenson et al. (2014) konnten zeigen, dass sich die Luteolyserate in einem 5 d-Protokoll zwischen der doppelten Dosis (50 mg Dinoprost an Tag 6) und der zweimaligen Gabe (25 mg Dinoprost an Tag 5 und 6) unter Annahme eines Grenzwerts von 1 ng / ml Progesteron an Tag 8 nicht unterscheidet. Wird dagegen ein strengerer Grenzwert von  $< 0,5$  ng / ml angenommen, zeigten zweimalig behandelte Kühe sowohl höhere Luteolyseraten als auch einen höheren Besamungserfolg im Vergleich zu Kühen, die die doppelte Dosis  $\text{PGF}_{2\alpha}$  erhielten. Das Ergebnis dieser Studie legt nahe, dass die Verabreichung der doppelten Dosis

die Konzentration von Progesteron zwar reduziert, aber möglicherweise nicht in ausreichendem Maße, um die Fruchtbarkeit zu verbessern.

Auch in 7 d-Ovsynchprotokollen unter der Verwendung von Dinoprost wurde die zweimalige PGF<sub>2α</sub>-Gabe gegenüber der doppelten Dosis bereits mit höheren Luteolyseraten assoziiert (94 % vs. 88 %;  $P = 0,03$ ; Barletta et al., 2018). Stevenson et al. (2018) beschreiben stattdessen, dass sowohl die doppelte Dosis als auch die zweimalige Gabe in einem 7 d-Ovsynchprotokoll mit Vorsynchronisierung hohe Luteolyseraten induzierte (96 % vs. 100 %). Das Design dieser Studie umfasste jedoch eine verhältnismäßig kleine Anzahl an Kühen (GPPG: 100 Kühe vs. GDPG: 99 Kühe) und das Ergebnis der Studie wurde von vielen Interaktionen beeinflusst.

Die Anzahl der Laktationen korreliert in unserem Experiment nicht mit der durchschnittlichen Konzentration von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe oder dem Anteil an Kühen mit besonders niedrigen Konzentrationen von Progesteron. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Erkenntnissen anderer Autoren (Wiltbank et al., 2015; Barletta et al., 2018). Im Gegensatz dazu wird in einigen Studien jedoch beschrieben, dass die Luteolyserate bei Jungkühen höher war als bei Altkühen (Martins et al., 2011a; Giordano et al., 2013).

### 5.3 Gemeinsame Auswertung der Experimente 1 und 2

Da die Experimente 1 und 2 einem ähnlichen Studiendesign folgten, wurden ihre Ergebnisse kombiniert, um im Hinblick auf den Besamungserfolg eine höhere statistische Aussagekraft zu erzeugen.

Das Behandlungsprotokoll hatte einen signifikanten Einfluss auf den Besamungserfolg ( $P < 0,01$ ). Kühe, die wiederholt mit PGF<sub>2α</sub> behandelt wurden, hatten einen um 8,1 Prozentpunkte höheren Besamungserfolg als Kühe, die nur eine einfache Dosis PGF<sub>2α</sub> an Tag 7 erhielten und hatten tendenziell auch einen höheren Besamungserfolg als Tiere, die eine doppelte Dosis an Tag 7 erhielten (+ 4,2 %). Tendenzuell war der Besamungserfolg von GDPG Kühen größer als bei Kühen der Kontrollgruppe (+ 3,9 %).

Vergleichend zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, konnte ein geringfügig höherer Besamungserfolg nach Erhöhung der PGF<sub>2α</sub>-Dosis von 500 auf 750 µg Cloprostenol in einem 7 d-Ovsynchprotokoll mit Vorsynchronisation auch in einer anderen Studie festgestellt werden (+ 4.5 %;  $P = 0,05$ ; Giordano et al., 2013).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Erkenntnisse einer kürzlich von Barletta et al. (2018) durchgeführten Studie, welche ein ähnliches Versuchsprotokoll beschrieben. In einem 7 d-Resynchprotokoll wurde unter der Verwendung von Dinoprost der Einfluss der zweimaligen PGF<sub>2α</sub>-Gabe oder der doppelten PGF<sub>2α</sub>-Dosis gegenüber einer Kontrollgruppe

untersucht. GPPG Kühe zeigten 39 Tage p.i. tendenziell einen höheren Besamungserfolg als Tiere der Kontrollgruppe (35,4% vs. 30,7 %;  $P = 0,08$ ). Der Besamungserfolg von GDPG Tieren und solchen der Kontrollgruppe unterschied sich in dieser Studie nicht ( $P = 0,3$ ). Ein direkter Vergleich des Besamungserfolgs von GPPG gegen GDPG Kühen wurde jedoch nicht angestellt.

Eine aktuelle Studie testete neben den beiden Ovsynchprotokollen GPPG und GDPG gleichzeitig auch unterschiedliche Protokolllängen (5 Tage bzw. 7 Tage). Ziel war es, den Einfluss von Ovsynchprotokoll und Protokolllänge auf die Luteolyserate und den Besamungserfolg zu testen (Stevenson et al., 2018).

Wie bei Ribeiro et al. (2012) wurden hohe Luteolyseraten und Besamungserfolge in einem 5 d-Protokoll nur durch GPPG nicht jedoch durch GDPG erzielt (95,9 % vs. 72,2 % bzw. 44,5 % vs. 36,4 %). Im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung ergaben sich dagegen in einem 7 d-Ovsynchprotokoll sowohl durch GPPG als auch durch GDPG hohe Luteolyseraten (100 % vs. 96 %). GDPG Kühe tendierten im 7 d-Protokoll sogar zu höheren Besamungserfolgen als GPPG Kühe (46,1 % vs. 36,7 %;  $P = 0,07$ ). Der Vergleich zu einer Kontrollgruppe wurde nicht geführt.

Die unterschiedlichen Ergebnisse von Barletta et al. (2018) und Stevenson et al. (2018) zu denen der vorliegenden Studie sind möglicherweise mit den geringeren Fallzahlen ( $n = 1100$  bzw.  $n = 199$ ), mit der Integration einer Vorsynchronisation oder mit der Verwendung von Dinoprost statt Cloprostenol als  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analogon zu erklären.

Letztere Annahme erscheint nach aktuellem Erkenntnistand jedoch unwahrscheinlich. In Studien, die die Wirkung von Cloprostenol und Dinoprost bei Milchkühen verglichen, konnte kein Unterschied auf die Luteolyserate oder die Zeit bis zur Erreichung einer vollständigen Luteolyse festgestellt werden (Martins et al., 2011a, b).

Lediglich in einer Studie konnte bei Tieren, die nach visueller Brunstbeobachtung besamt worden waren, ein höherer Besamungserfolg durch die Verwendung von Cloprostenol im Vergleich zu Dinoprost nachgewiesen werden (Pursley et al., 2012). Dieser Effekt war bei erstlaktierenden Kühen besonders deutlich und korrelierte mit einer besseren Brunsterkennungsrate. Die Autoren vermuten, dass Cloprostenol durch seine längere Halbwertszeit einen beschleunigten Abfall von Progesteron und dadurch eine beschleunigte Produktion von Estradiol durch den dominanten Follikel verursacht (Pursley et al., 2012).

In unsere Auswertung flossen die Daten von 572 vorsynchronisierten Tieren ein. Anders als in anderen Studien oder in Experiment 1 erfolgten die Erstbesamungen im Experiment 2 im Anschluss an ein Presynchprotokoll ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ , 14 Tage später  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , 12 Tage später die erste

GnRH-Gabe des Ovsynchprotokolls). Vorsynchronisierte Tiere, die Brunstverhalten zeigten, wurden besamt, ehe sie in eines der drei Versuchsprotokolle aufgenommen wurden. Bei den verbliebenen, in das Experiment aufgenommen Kühen, handelt es sich somit möglicherweise um eine vorselektierte Subpopulation mit einem erhöhten Anteil azyklischer Tiere.

Andererseits können Vorsynchronisationen maßgeblich zur Steigerung der Synchronisationsrate beitragen und somit den Besamungserfolg erhöhen (Carvalho et al., 2019). Ein Beginn zwischen dem 5. und 9. Zyklustag optimiert die Ovulationsrate nach der ersten GnRH-Gabe (Vasconcelos et al., 1999; Moreira et al., 2000), die Konzentration von Progesteron während der Follikelreifung und zum Zeitpunkt der PGF<sub>2α</sub>-Gabe (Stevenson et al., 2018) sowie die Follikelgröße zur zweiten GnRH-Gabe. Möglicherweise hat die Vorsynchronisation Einfluss auf den Effekt der unterschiedlichen Behandlungsprotokolle. Um diese Frage zu beantworten, reicht die Anzahl der vorsynchronisierten Kühe pro Behandlungsprotokoll in der vorliegenden Studie jedoch nicht aus. In weiterführenden Untersuchungen sollte geklärt werden, inwieweit der Erfolg unterschiedlicher Ovsynchprotokolle von einer Vorsynchronisation beeinflusst wird.

Der Effekt des Behandlungsprotokolls zeigte sich nicht von der Besamungsnummer abhängig ( $P = 0,46$ ). Wie bei Barletta et al. (2018) konnte auch keine Abhängigkeit zwischen der Laktationsnummer und dem Behandlungsprotokoll festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu beschrieben Wiltbank et al. (2015) in ihrer Studie, dass Altkühe von der zweimaligen PGF<sub>2α</sub>-Behandlung besonders profitierten. Der Besamungserfolg von Altkühen war nach einer wiederholten P PGF<sub>2α</sub>-Gabe an Tag 8 um 3,4 Prozentpunkte höher als bei Altkühen der Kontrollgruppe ( $P = 0,07$ ). Obwohl sich Jung- und Altkühe in der Inzidenz einer unvollständigen Luteolyse in dieser Studie nicht unterschieden, profitierten Jungkühe nicht von der zweimaligen PGF<sub>2α</sub>-Gabe. Einen Widerspruch sehen die Autoren auch darin, dass durch die zweite PGF<sub>2α</sub>-Gabe der Besamungserfolg besonders bei Tieren gesteigert wird, die zur ersten PGF<sub>2α</sub>-Gabe hohe Konzentrationen von Progesteron haben. Der größte Anstieg der Luteolyserate durch die zweimalige PGF<sub>2α</sub>-Gabe ist dagegen bei Tieren mit niedrigen Konzentrationen von Progesteron zur ersten PGF<sub>2α</sub>-Gabe zu verzeichnen. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Steigerung des Besamungserfolges durch die zweite PGF<sub>2α</sub>-Gabe nicht allein mit einer erhöhten Luteolyserate zu erklären ist (Stevenson et al., 2018). Neben der luteolytischen Wirkung von PGF<sub>2α</sub> ist es möglicherweise entscheidend, wie schnell niedrige Konzentrationen von Progesteron und gesteigerte Estradiol-Werte während des Ovsynchprotokolls erreicht werden (Brusveen et al., 2009; Martins et al., 2011a).

## 6. Zusammenfassung

Protokolle zur Ovulationssynchronisation dienen dazu, Mängel in der visuellen Brunstbeobachtung zu kompensieren und eine terminorientierte künstliche Besamung zu ermöglichen. Im Ovsynchprotokoll mit einmaliger PGF<sub>2α</sub>-Gabe an Tag 7 zeigen 13 – 21 % der Kühe eine unvollständige Luteolyse. Eine unvollständige Luteolyse bzw. Konzentrationen von Progesteron > 0,4 ng / ml zum Zeitpunkt der zweiten GnRH-Gabe führen zu schlechteren Besamungserfolgen. Eine besondere Risikogruppe für hohe Konzentrationen zur zweiten GnRH-Gabe stellen Kühe dar, die das Ovsynchprotokoll ohne Gelbkörper bzw. mit niedrigen Konzentrationen von Progesteron beginnen. Um den Anteil an Kühen mit einer vollständigen Luteolyse und dadurch den Besamungserfolg zu erhöhen, wurden modifizierte Ovsynchprotokolle beschrieben, die entweder die PGF<sub>2α</sub>-Dosis erhöhten, oder eine zusätzliche PGF<sub>2α</sub>-Gabe integrierten. Das Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss einer doppelten PGF<sub>2α</sub>-Dosis (1.000 µg Cloprostenol) direkt mit dem Einfluss einer zweimaligen PGF<sub>2α</sub>-Gabe (500 µg Cloprostenol an Tag 7 und Tag 8) während eines 7 d-Ovsynchprotokolls auf die Konzentration von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe und den Besamungserfolg zu untersuchen.

Die Hypothesen lauteten, erstens, dass durch beide Modifikationen niedrigere Konzentrationen von Progesteron zur zweiten GnRH-Gabe und höhere Besamungserfolge erreicht werden als durch ein herkömmliches Ovsynchprotokoll und zweitens, dass Tiere, die das Ovsynchprotokoll ohne Gelbkörper beginnen, besonders von der zweimaligen PGF<sub>2α</sub>-Gabe profitieren.

Dazu wurden zwei kontrollierte, randomisierte Feldversuche mit einem vergleichbaren Studiendesign auf insgesamt acht Milchviehbetrieben in Brandenburg durchgeführt. Im wöchentlich rotierenden Rhythmus wurden laktierende Milchkühe in eines von drei Behandlungsprotokollen aufgenommen.

- 1) Ovsynch (Kontrolle: Tag 0 GnRH – Tag 7 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH).
- 2) Ovsynch mit einer doppelten Dosis PGF<sub>2α</sub> (GDPG: Tag 0 GnRH – Tag 7 1.000 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH).
- 3) Ovsynch mit einer zweimaligen PGF<sub>2α</sub> Gabe (GPPG: Tag 0 GnRH – Tag 7 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 8 500 µg PGF<sub>2α</sub> – Tag 9 GnRH).

Alle Kühe wurden 16 h nach der zweiten GnRH-Gabe künstlich besamt. In Experiment 1 wurden 1.979 Kühe von sechs Milchviehbetrieben aufgenommen. Bei jedem Tier wurde an

Tag 0 eine transrektale sonographische Untersuchung durchgeführt und die An- oder Abwesenheit eines Gelbkörpers dokumentiert. In Experiment 2 wurden 1.581 Kühe von zwei Milchviehbetrieben aufgenommen. Von einer Subpopulation von Kühen aus Experiment 2 ( $n = 491$ ) wurden Blutproben zum Zeitpunkt der zweiten GnRH-Gabe entnommen, um die Konzentration von Progesteron zu bestimmen.

In Experiment 1 hatte das Behandlungsprotokoll einen signifikanten Einfluss auf den Besamungserfolg ( $P = 0,03$ ). Der Anteil tragender Tiere war bei den zweimalig mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  behandelten Tieren (38,0 %) größer als bei den mit der doppelten Dosis behandelten Tieren (31,9 %;  $P = 0,04$ ) oder den Tieren der Kontrollgruppe (31,2 %;  $P = 0,02$ ). Der Besamungserfolg bei Tieren der Kontrollgruppe und bei Tieren der GDPG Gruppe unterschied sich nicht signifikant ( $P = 0,80$ ). Der Besamungserfolg wurde von der Anwesenheit eines Gelbkörpers ( $P = 0,55$ ) nicht beeinflusst. Auch war keine Interaktion zwischen dem Effekt der Behandlung und der Anwesenheit eines Gelbkörpers zur ersten GnRH-Gabe feststellbar. In Experiment 2 war der Anteil tragender Tiere bei GPPG Tieren (40,6 %;  $P < 0,01$ ) und bei GDPG Tieren (38,1 %;  $P = 0,02$ ) größer als bei Tieren der Kontrollgruppe (31,0 %). Zwischen GDPG und GPPG Kühen unterschied sich der Besamungserfolg nicht ( $P = 0,45$ ). Im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte sowohl die zweimalige Gabe als auch die doppelte Dosis den Anteil an Kühen mit besonders niedrigen Konzentrationen von Progesteron (0,00 – 0,09 ng / ml) zur zweiten GnRH-Gabe. Die GPPG Behandlung reduzierte zudem den Anteil an Kühen mit besonders hohen Konzentrationen von Progesteron ( $\geq 0,6$  ng / ml) zur zweiten GnRH-Gabe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Da die beiden Experimente ein ähnliches Versuchsdesign hatten, wurden die Ergebnisse im Hinblick auf den Besamungserfolg kombiniert. Kühe, die wiederholt mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  behandelt wurden, hatten einen höheren Besamungserfolg (40,5 %;  $P < 0,01$ ) als Kühe, die nur eine einfache Dosis  $\text{PGF}_{2\alpha}$  an Tag 7 erhielten (32,4 %) und hatten tendenziell auch einen höheren Besamungserfolg als Tiere, die eine doppelte Dosis an Tag 7 erhielten (36,3 %;  $P = 0,05$ ). Tendenzuell war der Besamungserfolg bei GDPG Kühen größer als bei Kühen der Kontrollgruppe ( $P = 0,06$ ).

Die Ergebnisse der beiden Experimente zeigten, dass bei einer zweiten  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe an Tag 8 in einem 7 d-Ovsynchprotokoll der Besamungserfolg im Vergleich zu einem herkömmlichen 7 d-Ovsynchprotokoll gesteigert werden konnte. Die Verwendung der doppelten  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Dosis an Tag 7 erwies sich als weniger effektiv. Die Anwesenheit eines Gelbkörpers zur ersten GnRH-Gabe hatte keinen Einfluss auf den Behandlungseffekt. Eine Ultraschalluntersuchung an Tag 0 bietet damit keine Entscheidungshilfe im Stall hinsichtlich der Wahl eines der drei Behandlungsprotokolle.

## 7. Summary

Effect of different treatments with prostaglandin F<sub>2α</sub> treatments during a 7-d Ovsynch protocol on selected parameters of fertility.

Synchronization protocols are used to overcome deficiencies in visual estrus detection and to allow timed artificial insemination (TAI). At the end of such a protocol, cows with increased progesterone (P<sub>4</sub>) concentrations had decreased pregnancy per artificial insemination (P/AI) as a result of incomplete luteal regression. Lack of complete regression of the corpus luteum (CL) in response to a single prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) treatment has been observed in 13 to 21 % of cows treated with Ovsynch. Cows starting the Ovsynch protocol without a CL or with low P<sub>4</sub> concentrations have a greater risk for high P<sub>4</sub> concentrations at the second GnRH treatment (G2).

Modified Ovsynch protocols were described that either increased the PGF<sub>2α</sub> dose or integrated an additional PGF<sub>2α</sub> treatment, to increase the proportion of cows with complete luteal regression at the end of the protocol and subsequently P/AI. The objective of this study was to evaluate the effect of a double PGF<sub>2α</sub> dose (1000 µg cloprostenol) or a second PGF<sub>2α</sub> treatment (500 µg cloprostenol on day 7 and day 8) during a 7-d Ovsynch protocol on the P<sub>4</sub> concentration at G2 and P/AI. The hypothesis was that both treatments would lead to decreased P<sub>4</sub> concentrations at G2 and an increase in P/AI compared to the traditional 7-d Ovsynch protocol. Additionally, it was hypothesized that cows starting the Ovsynch protocol without CL will particularly benefit from the second PGF<sub>2α</sub> treatment.

Two experiments with a comparable study design were conducted on a total of eight commercial dairy farms in Germany.

Once a week, cows from both experiments were assigned to one of three protocols:

- 1) Ovsynch (control: day 0 GnRH – day 7 500 µg PGF<sub>2α</sub> – day 9 GnRH),
- 2) Ovsynch with a double PGF<sub>2α</sub> dose (GDPG: day 0 GnRH – day 7 1000 µg PGF<sub>2α</sub> – day 9 GnRH), or
- 3) Ovsynch with a second PGF<sub>2α</sub> treatment (GPPG: day 0 GnRH – day 7 500 µg PGF<sub>2α</sub> – day 8 500 µg PGF<sub>2α</sub> – day 9 GnRH).

All cows received TAI approximately 16 h after G2. Pregnancy diagnosis was performed by transrectal ultrasonography (35 ± 7 d after TAI, experiment 1) or by transrectal palpation

## Summary

---

( $38 \pm 3$  d after TAI, experiment 2). In experiment 1, 1,979 cows from six dairy farms were enrolled. Transrectal ultrasonography was performed at the first GnRH treatment (G1) to determine the presence or absence of a CL. In experiment 2, 1,581 cows from 2 dairy farms were enrolled. Blood samples were collected from a subsample of cows from experiment 2 ( $n = 491$ ) at G2 to determine P4 concentration.

In experiment 1, treatment affected P/AI ( $P = 0.03$ ). P/AI was greater for cows given a second PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  treatment on day 8 (38.0%) than for cows treated with a double dose (31.9%;  $P = 0.04$ ) or cows in the control group (31.2%;  $P = 0.02$ ). Cows from the control group had similar P/AI compared to GDPG cows ( $P = 0.80$ ). P/AI was not affected by the presence of a CL at G1 ( $P = 0.55$ ), and there was no interaction between treatment and the presence of a CL at G1.

In experiment 2, P/AI was greater for GPPG cows (40.6%;  $P < 0.01$ ) and GDPG cows (38.1%;  $P = 0.02$ ) than for control cows (31.0%). Between GDPG and GPPG cows, P/AI did not differ ( $P = 0.45$ ). The percentage of cows with especially low P4 concentrations (0.00-0.09 ng/mL) at G2 increased in both GPPG and GDPG compared with the control cows. GPPG treatment also reduced the percentage of cows with particularly high P4 concentrations ( $\geq 0.6$  ng/ml) at G2 compared to the control group.

To generate greater statistical power regarding P/AI, the results from both experiments were combined. Cows with a second PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  treatment had higher P/AI (40.5%;  $P < 0.01$ ) than cows receiving only a single dose of PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  on day 7 (32.4%) and also tended to have higher P/AI than cows treated with double dose on day 7 (36.3%;  $P = 0.05$ ). There was a tendency for GDPG cows to have greater P/AI than control cows ( $P = 0.06$ ).

The results of the two experiments indicate that P/AI can be increased by a second PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  treatment on day 8 during a 7-d Ovsynch protocol compared to the traditional 7-d Ovsynch protocol including a single PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  dose on day 7. The use of the double dose was less effective. The presence of a CL at G1 did not affect the treatment effect. Thus, ultrasonography at d 0 does not provide any decision support regarding the choice of one of the three treatments.

## 8. Literaturverzeichnis

- Ayres, H., R. M. Ferreira, A. P. Cunha, R. R. Araujo, and M. C. Wiltbank. 2013. Double-Ovsynch in high-producing dairy cows: effects on progesterone concentrations and ovulation to GnRH treatments. *Theriogenology* 79(1):159-164.
- Baird, D. T., R. B. Land, R. J. Scaramuzzi, and A. G. Wheeler. 1976. Endocrine changes associated with luteal regression in the ewe; the secretion of ovarian oestradiol, progesterone and androstenedione and uterine prostaglandin F2alpha throughout the oestrous cycle. *J Endocrinol* 69(2):275-286.
- Barletta, R. V., P. D. Carvalho, V. G. Santos, L. F. Melo, C. E. Consentini, A. S. Netto, and P. M. Fricke. 2018. Effect of dose and timing of prostaglandin F2alpha treatments during a Resynch protocol on luteal regression and fertility to timed artificial insemination in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 101(2):1730-1736.
- Bello, N. M., J. P. Steibel, and J. R. Pursley. 2006. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 89(9):3413-3424.
- Bicalho, R. C., K. N. Galvao, C. L. Guard, and J. E. Santos. 2008. Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. *Theriogenology* 70(2):199-207.
- Bisinotto, R. S., L. O. Castro, M. B. Pansani, C. D. Narciso, N. Martinez, L. D. Sinedino, T. L. Pinto, N. S. Van de Burgwal, H. M. Bosman, R. S. Surjus, W. W. Thatcher, and J. E. Santos. 2015. Progesterone supplementation to lactating dairy cows without a corpus luteum at initiation of the Ovsynch protocol. *J Dairy Sci* 98(4):2515-2528.
- Bisinotto, R. S., R. C. Chebel, and J. E. Santos. 2010. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *J Dairy Sci* 93(8):3578-3587.
- Borchardt, S., A. Pohl, P. D. Carvalho, P. M. Fricke, and W. Heuwieser. 2018. Short communication: Effect of adding a second prostaglandin F2alpha injection during the Ovsynch protocol on luteal regression and fertility in lactating dairy cows: A meta-analysis. *J Dairy Sci* 101(9):8566-8571.
- Bourne, G. R., S. R. Moss, P. J. Phillips, and B. Shuker. 1980. The metabolic fate of the synthetic prostaglandin cloprostenol ('Estrumate') in the cow: use of ion cluster techniques to facilitate metabolite identification. *Biomed Mass Spectrom* 7(5):226-230.

- Brusveen, D. J., A. H. Souza, and M. C. Wiltbank. 2009. Effects of additional prostaglandin F2alpha and estradiol-17beta during Ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 92(4):1412-1422.
- Caraviello, D. Z., K. A. Weigel, P. M. Fricke, M. C. Wiltbank, M. J. Florent, N. B. Cook, K. V. Nordlund, N. R. Zwald, and C. L. Rawson. 2006. Survey of management practices on reproductive performance of dairy cattle on large US commercial farms. *J Dairy Sci* 89(12):4723-4735.
- Carvalho, P. D., M. J. Fuenzalida, A. Ricci, A. H. Souza, R. V. Barletta, M. C. Wiltbank, and P. M. Fricke. 2015a. Modifications to Ovsynch improve fertility during resynchronization: Evaluation of presynchronization with gonadotropin-releasing hormone 6 d before initiation of Ovsynch and addition of a second prostaglandin F2alpha treatment. *J Dairy Sci* 98(12):8741-8752.
- Carvalho, P. D., V. G. Santos, H. P. Fricke, L. L. Hernandez, and P. M. Fricke. 2019. Effect of manipulating progesterone before timed artificial insemination on reproductive and endocrine outcomes in high-producing multiparous Holstein cows. *J Dairy Sci* 102(8):7509-7521.
- Carvalho, P. D., V. G. Santos, J. O. Giordano, M. C. Wiltbank, and P. M. Fricke. 2018. Development of fertility programs to achieve high 21-day pregnancy rates in high-producing dairy cows. *Theriogenology* 114:165-172.
- Carvalho, P. D., M. C. Wiltbank, and P. M. Fricke. 2015b. Manipulation of progesterone to increase ovulatory response to the first GnRH treatment of an Ovsynch protocol in lactating dairy cows receiving first timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 98(12):8800-8813.
- Cerri, R. L., R. C. Chebel, F. Rivera, C. D. Narciso, R. A. Oliveira, M. Amstalden, G. M. Baez-Sandoval, L. J. Oliveira, W. W. Thatcher, and J. E. Santos. 2011. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. *J Dairy Sci* 94(7):3352-3365.
- Cerri, R. L., H. M. Rutigliano, R. C. Chebel, and J. E. Santos. 2009. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. *Reproduction* 137(5):813-823.
- Chebel, R. C., J. E. Santos, R. L. Cerri, H. M. Rutigliano, and R. G. Bruno. 2006. Reproduction in dairy cows following progesterone insert presynchronization and resynchronization protocols. *J Dairy Sci* 89(11):4205-4219.
- Dalton, J. C., S. Nadir, J. H. Bame, M. Nofstinger, R. L. Nebel, and R. G. Saacke. 2001. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. *J Dairy Sci* 84(11):2413-2418.

- Denicol, A. C., G. Lopes, Jr., L. G. Mendonca, F. A. Rivera, F. Guagnini, R. V. Perez, J. R. Lima, R. G. Bruno, J. E. Santos, and R. C. Chebel. 2012. Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 95(4):1794-1806.
- Dohoo, P. J., S. W. Martin, and H. Stryhn. 2009. *Veterinary Epidemiologic Research*. 2nd ed. University of Prince Edward Island, Charlottetown, PEI, Canada.
- El-Zarkouny, S. Z., J. A. Cartmill, B. A. Hensley, and J. S. Stevenson. 2004. Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimens with or without presynchronization and progesterone. *J Dairy Sci* 87(4):1024-1037.
- EMA. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Cloprostenol and R-cloprostenol summary report, April 1997.
- Galvao, K. N., M. F. Sa Filho, and J. E. Santos. 2007. Reducing the interval from presynchronization to initiation of timed artificial insemination improves fertility in dairy cows. *J Dairy Sci* 90(9):4212-4218.
- Ginther, O. J., H. K. Shrestha, M. J. Fuenzalida, A. K. Shahiduzzaman, M. A. Hannan, and M. A. Beg. 2010. Intrapulse temporality between pulses of a metabolite of prostaglandin F<sub>2</sub>alpha and circulating concentrations of progesterone before, during, and after spontaneous luteolysis in heifers. *Theriogenology* 74(7):1179-1186.
- Giordano, J. O., P. M. Fricke, J. N. Guenther, G. Lopes, Jr., M. M. Herlihy, A. B. Nascimento, and M. C. Wiltbank. 2012a. Effect of progesterone on magnitude of the luteinizing hormone surge induced by two different doses of gonadotropin-releasing hormone in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 95(7):3781-3793.
- Giordano, J. O., M. J. Thomas, G. Catucuamba, M. D. Curler, M. Masello, M. L. Stangaferro, and R. Wijma. 2016. Reproductive management strategies to improve the fertility of cows with a suboptimal response to resynchronization of ovulation. *J Dairy Sci* 99(4):2967-2978.
- Giordano, J. O., M. C. Wiltbank, P. M. Fricke, S. Bas, R. Pawlisch, J. N. Guenther, and A. B. Nascimento. 2013. Effect of increasing GnRH and PGF<sub>2</sub>alpha dose during Double-Ovsynch on ovulatory response, luteal regression, and fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology* 80(7):773-783.
- Giordano, J. O., M. C. Wiltbank, J. N. Guenther, R. Pawlisch, S. Bas, A. P. Cunha, and P. M. Fricke. 2012b. Increased fertility in lactating dairy cows resynchronized with Double-Ovsynch compared with Ovsynch initiated 32 d after timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 95(2):639-653.

- Graham, J. D. and C. L. Clarke. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18(4):502-519.
- Greco, L. F., J. T. Neves Neto, A. Pedrico, F. S. Lima, R. S. Bisinotto, N. Martinez, E. S. Ribeiro, W. W. Thatcher, C. R. Staples, and J. E. P. Santos. 2018. Effects of altering the ratio of dietary n-6 to n-3 fatty acids on spontaneous luteolysis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 101(11):10536-10556.
- Heidari, F., E. Dirandeh, Z. Ansari Pirsaraei, and M. G. Colazo. 2017. Modifications of the G6G timed-AI protocol improved pregnancy per AI and reduced pregnancy loss in lactating dairy cows. *Animal* 11(11):2002-2009.
- Howard, H. J. and J. H. Britt. 1990. Prostaglandin F-2 alpha causes regression of an hCG-induced corpus luteum before day 5 of its lifespan in cattle. *J Reprod Fertil* 90(1):245-253.
- Hunter, R. H. 2005. The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reprod Nutr Dev* 45(3):281-290.
- Keskin, A., G. Yilmazbas-Mecitoglu, A. Gumen, E. Karakaya, R. Darici, and H. Okut. 2010. Effect of hCG vs. GnRH at the beginning of the Ovsynch on first ovulation and conception rates in cyclic lactating dairy cows. *Theriogenology* 74(4):602-607.
- Kinder, J. E., F. N. Kojima, E. G. Bergfeld, M. E. Wehrman, and K. E. Fike. 1996. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *J Anim Sci* 74(6):1424-1440.
- Lindner, G. M., and R. W. Wright. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20:407-416.
- Martins, J. P., R. K. Policelli, L. M. Neuder, W. Raphael, and J. R. Pursley. 2011a. Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F2alpha of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 94(6):2815-2824.
- Martins, J. P., R. K. Policelli, and J. R. Pursley. 2011b. Luteolytic effects of cloprostenol sodium in lactating dairy cows treated with G6G/Ovsynch. *J Dairy Sci* 94(6):2806-2814.
- McCracken JA, Schramm W, Okulicz WC. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF2alpha from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Anim Reprod Sci* 1984;7:31e55.
- McCracken, J. A., E. E. Custer, and J. C. Lamsa. 1999. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79(2):263-323.
- Mezera, M. A., C. S. Hamm, C. A. Gamarra, R. S. Gennari, A. B. Prata, R. Sartori, and M. C. Wiltbank. 2019. Profiles of prostaglandin F2alpha metabolite in dairy cattle during luteal

- regression and pregnancy: implications for corpus luteum maintenance. *Biol Reprod* 101(1):76-90.
- Moreira, F., R. L. de la Sota, T. Diaz, and W. W. Thatcher. 2000. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *J Anim Sci* 78(6):1568-1576.
- Moreira, F., C. Orlandi, C. A. Risco, R. Mattos, F. Lopes, and W. W. Thatcher. 2001. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 84(7):1646-1659.
- Nascimento, A. B., A. H. Souza, A. Keskin, R. Sartori, and M. C. Wiltbank. 2014. Lack of complete regression of the Day 5 corpus luteum after one or two doses of PGF<sub>2</sub>α in nonlactating Holstein cows. *Theriogenology* 81(3):389-395.
- Peters, M.W., and J.R. Pursley. 2002. Fertility of Lactating Dairy Cows Treated with Ovsynch after Presynchronization Injections of PGF<sub>2</sub>α and GnRH
- Peterson, A. J., R. J. Fairclough, E. Payne, and J. F. Smith. 1975. Hormonal changes around bovine luteolysis. *Prostaglandins* 10(4):675-684.
- Pinaffi, F. L. V., E. R. Araujo, and O. J. Ginther. 2018. Concentrations of a PGF<sub>2</sub>α metabolite during pregnancy on the days that luteolysis occurs in nonbred heifers. *Domest Anim Endocrinol* 62:76-82.
- Pursley, J. R. and J. P. Martins. 2011. Impact of circulating concentrations of progesterone and antral age of the ovulatory follicle on fertility of high-producing lactating dairy cows. *Reprod Fertil Dev* 24(1):267-271.
- Pursley, J. R., J. P. Martins, C. Wright, and N. D. Stewart. 2012. Compared to dinoprost tromethamine, cloprostenol sodium increased rates of estrus detection, conception and pregnancy in lactating dairy cows on a large commercial dairy. *Theriogenology* 78(4):823-829.
- Pursley, J. R., M. O. Mee, and M. C. Wiltbank. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2</sub>α and GnRH. *Theriogenology* 44(7):915-923.
- Pursley, J. R., R. W. Silcox, and M. C. Wiltbank. 1998. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 81(8):2139-2144.
- Rabiee, A. R., I. J. Lean, and M. A. Stevenson. 2005. Efficacy of Ovsynch program on reproductive performance in dairy cattle: a meta-analysis. *J Dairy Sci* 88(8):2754-2770.
- Reeves, P.R. 1978. Distribution, elimination, and residue studies in the cow with the synthetic prostaglandin estrumate. *J Agric Food Chem* 26(1):152-155.

Revah, I. and W. R. Butler. 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 106(1):39-47.

Ribeiro, E. S., R. S. Bisinotto, M. G. Favoreto, L. T. Martins, R. L. Cerri, F. T. Silvestre, L. F. Greco, W. W. Thatcher, and J. E. Santos. 2012a. Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the luteolytic dose of prostaglandin F2alpha as one or two injections in the 5-day timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 78(2):273-284.

Ribeiro, E. S., A. P. Monteiro, F. S. Lima, H. Ayres, R. S. Bisinotto, M. Favoreto, L. F. Greco, R. S. Marsola, W. W. Thatcher, and J. E. Santos. 2012b. Effects of presynchronization and length of proestrus on fertility of grazing dairy cows subjected to a 5-day timed artificial insemination protocol. *J Dairy Sci* 95(5):2513-2522.

Roche, J. F. and J. J. Ireland. 1981. The differential effect of progesterone on concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in heifers. *Endocrinology* 108(2):568-572.

Santos, J. E., C. D. Narciso, F. Rivera, W. W. Thatcher, and R. C. Chebel. 2010. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. *J Dairy Sci* 93(7):2976-2988.

Santos, V. G., P. D. Carvalho, C. Maia, B. Carneiro, A. Valenza, P. M. Crump, and P. M. Fricke. 2016. Adding a second prostaglandin F2alpha treatment to but not reducing the duration of a PRID-Synch protocol increases fertility after resynchronization of ovulation in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 99(5):3869-3879.

Sartori, R., J. M. Haughian, R. D. Shaver, G. J. Rosa, and M. C. Wiltbank. 2004. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci* 87(4):905-920.

Sartori, R., G. J. Rosa, and M. C. Wiltbank. 2002a. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 85(11):2813-2822.

Sartori, R., R. Sartor-Bergfelt, S. A. Mertens, J. N. Guenther, J. J. Parrish, and M. C. Wiltbank. 2002b. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 85(11):2803-2812.

Sauls-Hiesterman, J. A., B. E. Voelz, and J. S. Stevenson. 2020. A shortened resynchronization treatment for dairy cows after a nonpregnancy diagnosis. *Theriogenology* 141:105-112.

- Schmidt, C., Z. Gajewski, und A. Wehrend. 2013. Strategische hormonelle Fruchtbarkeitsprogramme bei Kühen, Teil 2: Präsynchrisation und Resynchrisation. *Tierärztl Prax* 2013; 41 (G): 95-104.
- Silva, C. C. and P. G. Knight. 2000. Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 119(2):261-269.
- Silva, E., R. A. Sterry, and P. M. Fricke. 2007. Assessment of a practical method for identifying anovular dairy cows synchronized for first postpartum timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 90(7):3255-3262.
- Souza, A. H., H. Ayres, R. M. Ferreira, and M. C. Wiltbank. 2008. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology* 70(2):208-215.
- Souza, A. H., E. P. Silva, A. P. Cunha, A. Gumen, H. Ayres, D. J. Brusveen, J. N. Guenther, and M. C. Wiltbank. 2011. Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology* 75(4):722-733.
- Stevenson, J. S. 2016a. Physiological predictors of ovulation and pregnancy risk in a fixed-time artificial insemination program. *J Dairy Sci* 99(12):10077-10092.
- Stevenson, J. S. 2016b. Synchronization and Artificial Insemination Strategies in Dairy Herds. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 32(2):349-364.
- Stevenson, J. S., J. A. Sauls, L. G. D. Mendonca, and B. E. Voelz. 2018. Dose frequency of prostaglandin F2alpha administration to dairy cows exposed to presynchronization and either 5- or 7-day Ovsynch program durations: Ovulatory and luteolytic risks. *J Dairy Sci* 101(10):9575-9590.
- Stevenson, J. S., D. E. Tenhouse, R. L. Krisher, G. C. Lamb, J. E. Larson, C. R. Dahlen, J. R. Pursley, N. M. Bello, P. M. Fricke, M. C. Wiltbank, D. J. Brusveen, M. Burkhart, R. S. Youngquist, and H. A. Garverick. 2008. Detection of anovulation by heatmount detectors and transrectal ultrasonography before treatment with progesterone in a timed insemination protocol. *J Dairy Sci* 91(7):2901-2915.
- Tsai, S. J. and M. C. Wiltbank. 1998. Prostaglandin F2alpha regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biol Reprod* 58(2):346-352.
- Vasconcelos, J. L., R. W. Silcox, G. J. Rosa, J. R. Pursley, and M. C. Wiltbank. 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):1067-1078.

Wade, D. E. and G. S. Lewis. 1996. Exogenous prostaglandin F2 alpha stimulates utero-ovarian release of prostaglandin F2 alpha in sheep: a possible component of the luteolytic mechanism of action of exogenous prostaglandin F2 alpha. *Domest Anim Endocrinol* 13(5):383-398.

Wiltbank, M. C., G. M. Baez, F. Cochrane, R. V. Barletta, C. R. Trayford, and R. T. Joseph. 2015. Effect of a second treatment with prostaglandin F2alpha during the Ovsynch protocol on luteolysis and pregnancy in dairy cows. *J Dairy Sci* 98(12):8644-8654.

Wiltbank, M. C., P. M. Fricke, S. Sangsritavong, R. Sartori, and O. J. Ginther. 2000. Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. *J Dairy Sci* 83(12):2998-3007.

Wiltbank, M. C. and J. R. Pursley. 2014. The cow as an induced ovulator: timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology* 81(1):170-185.

Wiltbank, M. C., T. F. Shiao, D. R. Bergfelt, and O. J. Ginther. 1995. Prostaglandin F2 alpha receptors in the early bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 52(1):74-78.

Wiltbank, M. C., A. H. Souza, J. O. Giordano, A. B. Nascimento, J. M. Vasconcelos, M. H. C. Pereira, P. M. Fricke, R. S. Surjus, F. C. S. Zinsly, P. D. Carvalho, R. W. Bender, and R. Sartori. 2012. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. *Anim Reprod* 9(3):231-241.

## **9. Kooperationen und Interessenskonflikte**

Die für die Durchführung der Experimente benötigten Medikamente wurden von der Firma Veyx Pharma GmbH, Deutschland zur Verfügung gestellt.

Es besteht kein Interessenskonflikt durch die finanzielle Unterstützung bei den Experimenten.

## 10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Heuwieser für die Überlassung dieses interessanten und aus der Praxis heraus sehr gut umsetzbaren Themas bedanken. Insbesondere bedanke ich mich für die stets gewährte zeitnahe Unterstützung bei der Abfassung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stefan Borchardt für die direkte Betreuung und ständige Hilfe bei allen Fragen rund um diese Arbeit. Ganz besonders bedanke ich mich für die liebevoll nachdrückliche Ermunterung bei der Sache zu bleiben und die schnellen Korrekturen und Vorschläge.

Dr. Christie Tippenhauer danke ich für die gründliche und gewissenhafte Unterstützung bei der Versuchsdurchführung und Datenerhebung auf den Betrieben A und B sowie für die geduldige fachlichen Beratung bei der statistischen Datenaufbereitung und bei den vielfältigen Fragen zwischendurch.

Der Firma Veyx Pharma GmbH, Deutschland danke ich für die Bereitstellung der für die Experimente benötigten Medikamente.

Den Geschäftsführern der landwirtschaftlichen Betriebe danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen und dafür diese Studie unter Praxisbedingungen durchführen zu können.

Mein außerordentlicher Dank gilt auch den Herdenmanagern und Mitarbeitern der landwirtschaftlichen Betriebe für die engagierte Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und die endlose Geduld mit meinen bunten Zetteln.

Meiner Chefin Dr. Ina Görner danke ich ganz besonders für Ihr Drängen, eine Doktorarbeit zu schreiben, für die Zeit, die Sie mir dafür immer wieder zur Verfügung gestellt hat und für die ständige tatkräftige sowie mentale Hilfe und Unterstützung. Auch für die lehrreiche Assistenzzeit, die Geduld und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanke ich mich an dieser Stelle ganz herzlich.

Bei meinem Kollegen Kilian Peisker bedanke ich mich, dass er mir so oft den Rücken freigehalten hat, damit ich meine Experimente durchführen konnte sowie für seine Unterstützung und das stets offene Ohr.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die ständige moralische Unterstützung bedanken, besonders bei meinen Eltern, die mich auf meinem Weg immer nach allen Kräften unterstützt und bestärkt haben.

Der größte Dank gilt meinem Partner Alex für die Unterstützung und den festen Glauben an mich und uns in allen Lebenssituationen. Die Doktorarbeit ist lange nicht das einzige Projekt, was ohne Dich nie fertig geworden wäre.

## **11. Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation ist in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder abgelehnt worden.

Berlin, den 06.03.2024

Ilona Steinmetz