



Einfluss des Uterusmikrobioms auf in vivo gewonnene Rinderembryonen

Alexandra Krebbers

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet abrufbar über
<http://dnb.ddb.de>

ISBN 978-3-86345-806-5

1. Auflage 2026

© 2026 by Verlag:

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen

Printed in Germany

Verlag

DVG Service GmbH

An der Alten Post 2

35390 Gießen

Tel.: 0641 984446-0

info@dvb.de

www.dvb.de

Aus dem Fachbereich Veterinärmedizin
Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde
Professur für Molekulare Reproduktionsmedizin

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. med. vet. Christine Wrenzycki

Einfluss des Uterusmikrobioms auf in vivo gewonnene Rinderembryonen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Alexandra Krebbers
Tierärztin aus Hannover

Gießen 2026

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Stefan Arnhold

1. Gutachterin: Prof. Dr. Christine Wrenzycki

2. Gutachter: Prof. Dr. Tobias Eisenberg

Tag der Disputation: 07.07.2026

In Kooperation mit der
Besamungs- und ET-Station Georgsheil
des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter (VOST)
Südbrookmerland

Leave this world a little better than you found it.
- Robert Baden Powell -

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Entwicklung der Follikel und Eizellen im Ovar	3
2.1.1	Aufbau eines Follikels	3
2.1.2	Follikulo- und Oogenese	4
2.2	Ovulation	8
2.3	Fertilisation	10
2.4	Phasen der frühen Embryogenese bis zum Blastozystenstadium	12
2.4.1	Entwicklung im Ovidukt	12
2.4.2	Entwicklung im Uterus	13
2.5	Follikulo-, Oogenese, Fertilisation und frühe Embryogenese nach einer Superovulation	15
2.5.1	Follikulo- und Oogenese	15
2.5.2	Ovulationen	18
2.5.3	Fertilisation	20
2.5.4	Transport der Eizellen und der Embryonen	23
2.5.5	Frühe Embryogenese im Ovidukt und im Uterus	24
2.6	Einflussfaktoren auf die Anzahl und Qualität von Embryonen nach einer Superovulation	28
2.6.1	Einflussfaktoren zum Zeitpunkt der Follikelentwicklung und der Ovulation	28
2.6.1.1	Zyklusstadium	28
2.6.1.2	Superovulationsprogramme (SOP)	31
2.6.1.2.1	Equines Choriongonadotropin (eCG) und kombinierte Anwendungen	31
2.6.1.2.2	Protokolle auf Basis von Follikelstimulierendem Hormon (FSH) und Luteinisierendem Hormon (LH)	34
2.6.1.3	Einflüsse des Spendertiers	40
2.6.1.3.1	Rasse	40
2.6.1.3.2	Alter	41
2.6.1.3.3	Parität	43
2.6.1.3.4	Laktationsstadium und Milchleistung	44
2.6.1.3.5	Körperkondition	46
2.6.1.4	Hitzestress	48
2.6.2	Einflussfaktoren im Ovidukt	53
2.6.2.1	Sperma	53
2.6.2.1.1	Zeitpunkt der Besamung	53
2.6.2.1.2	Ort der Samenablage	55
2.6.2.1.3	Spermaqualität	57
2.6.2.1.4	Sortiertes oder konventionelles Sperma	58
2.6.2.2	Hitzestress	62

2.6.3	Einflussfaktoren im Uterus	66
2.6.3.1	Endometritis	66
2.7	Einfluss des Uterusmikrobioms.....	72
2.8	Hintergrund und Erwartungen der vorliegenden Untersuchungen	84
3	Material und Methoden	85
3.1	Studie 1 – Potenzieller Einfluss von Laktobazillen auf in vivo gewonnene Rinderembryonen	85
3.1.1	Spendertierauswahl	85
3.1.2	Voruntersuchung der Spendertiere.....	85
3.1.3	Superovulation und instrumentelle Besamung	87
3.1.4	Embryonengewinnung und Probenentnahme.....	88
3.1.5	Handhabung von Embryonen und Proben.....	91
3.1.6	Embryonenbeurteilung	92
3.1.7	Weitere Behandlung von Embryonen	93
3.1.8	Kultivierung, Isolierung und Charakterisierung von Bakterien.....	93
3.1.9	Kategorisierung der nachgewiesenen Bakterien und des kultivierbaren uterinen Mikrobioms.....	95
3.1.10	Kategorisierung weiterer erhobener Parameter	98
3.1.11	Statistische Analyse	99
3.2	Studie 2 – Vergleichende Betrachtung des Uterusmikrobioms in den Hornspitzen und im Corpus uteri an neun Schlachtkühen	101
3.2.1	Daten der Schlachtkühe	101
3.2.2	Probenentnahme am Schlachthof	101
3.2.3	Handhabung von Organen und Proben.....	101
3.2.4	Kultivierung, Isolierung und Charakterisierung von Bakterien.....	103
3.2.5	Statistische Analyse	104
4	Ergebnisse	105
4.1	Studie 1 – Potenzieller Einfluss von Laktobazillen auf in vivo gewonnene Rinderembryonen	105
4.1.1	Mikrobiologische Nachweise	105
4.1.2	Ergebnisse der Embryonengewinnungen	112
4.1.3	Mikrobiologischer Einfluss auf die Embryonenqualität	114
4.1.4	Weitere Einflüsse auf die Embryonenqualität	118
4.1.4.1	Laktationsstadium, Parität und Milchleistung.....	118
4.1.4.2	Stoffwechsellage	121
4.1.4.3	Körperkondition	122
4.1.4.4	Eutergesundheit.....	122
4.1.4.5	Verwendete Spermaportionen.....	124
4.1.4.6	Rückgewinnung, Trübung und Blutbeimengung der Spülflüssigkeit.....	125
4.1.4.7	Betriebseinfluss.....	131

4.2	Studie 2 – Vergleichende Betrachtung des Uterusmikrobioms in den Hornspitzen und im Corpus uteri an neun Schlachtkühen	132
5	Diskussion.....	135
5.1	Studie 1 – Potenzieller Einfluss von Laktobazillen auf in vivo gewonnene Rinderembryonen	135
5.1.1	Mikrobiologische Nachweise	135
5.1.2	Ergebnisse der Embryonengewinnung	138
5.1.3	Mikrobiologischer Einfluss auf die Embryonenqualität	140
5.1.4	Weitere Einflüsse auf die Embryonenqualität	149
5.1.4.1	Laktationsstadium, Parität und Milchleistung.....	149
5.1.4.2	Körperkondition	152
5.1.4.3	Eutergesundheit.....	153
5.1.4.4	Verwendete Spermaportionen.....	154
5.1.4.5	Rückgewinnung, Trübung und Blutbeimengung der Spülflüssigkeit.....	155
5.2	Studie 2 – Vergleichende Betrachtung des Uterusmikrobioms in den Hornspitzen und im Corpus uteri an neun Schlachtkühen	158
6	Zusammenfassung	162
7	Summary	166
8	Abkürzungsverzeichnis	170
9	Abbildungsverzeichnis	173
10	Tabellenverzeichnis	174
11	Literaturverzeichnis	176
12	Anhang	213
12.1	Muster Superovulationsplan	213
12.2	Einzeltierprotokolle.....	214
12.2.1	Protokoll zur Voruntersuchung	214
12.2.2	Protokoll zur Besamung	216
12.2.3	Protokoll zum Tag der Embryonengewinnung	217
13	Selbstständigkeitserklärung	219
14	Danksagung	220

1 Einleitung

Mit dem Ziel, den Antibiotikaeinsatz im Allgemeinen und in der Tierhaltung im Besonderen zu reduzieren, rücken Probiotika zunehmend in den Fokus der veterinärmedizinischen Forschung. Die FAO und WHO definieren Probiotika als lebende Mikroorganismen, die, wenn sie in ausreichender Menge verabreicht werden, dem Wirt einen gesundheitlichen Nutzen bringen (Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization, 2006). Am bekanntesten ist die probiotische Bakterienordnung *Lactobacillales*, deren Vertreter das Wachstum anderer Bakterien inhibieren können (Bertuccini et al., 2017). Zu dieser Bakterienordnung zählen unter anderem die Familien *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae*, und *Leuconostocaceae* (Ludwig et al., 2015). Diese Bakterien werden auch als Milchsäurebakterien (laktatbildende Bakterien, LAB) bezeichnet, da sie Laktat als Hauptendprodukt des Kohlenhydratmetabolismus produzieren und somit den pH-Wert ihrer Umgebung senken (Batt, 2014). Dies führt zu einem für die meisten pathogenen Bakterien ungünstigen Umgebungsmilieu. Es konnte ebenfalls festgestellt werden, dass einige Arten der Milchsäurebakterien auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) produzieren. H_2O_2 kann für solche Bakterien toxisch sein, welche selbst keine oder nur wenige H_2O_2 -abfangende Enzyme (z. B. Katalase) produzieren und deren Wachstum dadurch gehemmt wird (Dahiya & Speck, 1968; Eschenbach et al., 1989; Wheeler et al., 1952). Darüber hinaus produzieren einige LAB antimikrobielle Peptide und Proteine, sogenannte Bakteriozine. Sie hemmen das Wachstum anderer Bakterien, insbesondere grampositiver Bakterien, indem sie eine Destabilisierung und Permeabilisierung empfindlicher Zellmembranen bewirken (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Bhunia et al., 1991; Jack et al., 1995).

Milchsäurebakterien kommen als physiologische Kommensalen im Genitaltrakt verschiedener Säugetiere vor. Sie dominieren das vaginale Mikrobiom gesunder Frauen (Mårdh, 1991; Moreno et al., 2016), konnten jedoch auch aus dem Uterus von Frauen und Rindern isoliert werden (Gärtner et al., 2015; Medina-Bastidas et al., 2022). Studien in der humanen Reproduktionsmedizin haben ergeben, dass die Einnistungsrate der Embryonen, die Schwangerschaftsrate sowie die Zahl an Lebendgeburten bei Patientinnen, die sich einer assistierten Reproduktionsbehandlung unterziehen, höher waren, wenn zum Zeitpunkt des Embryotransfers Laktobazillen im Uterus dominierten (Kyono et al., 2019; Moreno et al., 2016, 2022). Untersuchungen des uterinen Mikrobioms von Rindern ergaben, dass der Anteil an Laktobazillen-positiven Kühen bei tragenden Tieren signifikant höher war als bei solchen, die an Tag 200 in der Laktation noch nicht tragend waren (Machado et al., 2012).

Wie sich in verschiedenen veterinärmedizinischen Studien zeigte, hat die Verabreichung von Milchsäurebakterien positive Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit von Rindern. Intravaginale

Infusionen mit LAB resultierten in einer beschleunigten Uterusinvolution (Deng et al., 2015a) und In-vitro-Studien zeigten eine geringere Besiedlung von Endometriumszellen mit *Escherichia coli* bei einer Ko-Kultivierung mit LAB (Genís et al., 2016). Laktobazillen, insbesondere *Lactobacillus buchneri*, wiesen keine negativen lokalen Auswirkungen auf die Gebärmutter auf. Ein mit *L. buchneri* infiltrierter Uterus zeigte weder eine proinflammatorische Reaktion noch einen Untergang endometrialer Epithelzellen (Gärtner et al., 2015). Daher wurde *L. buchneri* in einer Folgestudie als probiotischer Stamm zur Modulation der Immunantwort im Uterus von frisch abgekalbten Kühen eingesetzt, um seinen Einfluss auf die Reproduktionsleistung von Milchkühen zu untersuchen. Es konnte eine Verbesserung der gynäkologischen Gesundheit post partum beobachtet werden, was sich in einem verbesserten Erstbesamungserfolg und einer verkürzten Günstzeit darstellte (Peter et al., 2018).

Die potenziell positiven Auswirkungen von LAB sind vor dem Hintergrund des Einflusses des Uterusmikrobioms und einer optimalen Uterusgesundheit auf die erfolgreiche Reproduktion in der Milchviehhaltung von besonderem Interesse. In der Rinderzucht gewinnen Embryotransferprogramme weiter an Bedeutung. Im Jahr 2024 wurden weltweit 296.520 transfertaugliche In-vivo- und 2.029.007 In-vitro-Rinderembryonen gewonnen bzw. produziert. Dies belief sich in Europa auf 113.136 in vivo und 58.404 in vitro gewonnene transfertaugliche Embryonen. Daran ist zu erkennen, dass in Europa, im Gegensatz zu den anderen vor allem amerikanischen Kontinenten, bislang die In-vivo-Embryonenproduktion noch die In-vitro-Produktion übertrifft. Dabei wurden 87,7 % der Embryonengewinnung in Europa an Milchkühen und -rindern und 12,3 % bei Tieren von Fleischrassen durchgeführt (IETS, 2025). Der Embryotransfer bietet eine gezielte und effektive Möglichkeit, die Gesundheit, Langlebigkeit und Milchproduktion zukünftiger Milchkühe durch gezielte Anpaarungen zu fördern. Insbesondere im Hinblick auf die Emission klimaschädlicher Gase, wie etwa Methan, ist dies von besonderem Interesse für die Milchindustrie (Baruselli et al., 2023).

Ziel dieser Studie war es, zu ermitteln, ob Milchsäurebakterien, insbesondere *L. buchneri*, und ein grundsätzlich probiotisches Mikrobiom im Uterus einen positiven Einfluss auf die Qualität der Embryonen bei der In-vivo-Embryonengewinnung bei Milchkühen nehmen. Zudem wurde untersucht, ob sich die vorherrschende Annahme bestätigen lässt, dass pathogene Keime im Uterus einen negativen Einfluss auf Rinderembryonen ausüben. Zu diesem Zweck wurde in einer Feldstudie das Mikrobiom am Tag der Embryonengewinnung untersucht und die Qualität der Embryonen bestimmt.

2 Schrifttum

2.1 Entwicklung der Follikel und Eizellen im Ovar

2.1.1 Aufbau eines Follikels

Follikel werden nach gängiger Einteilung in Primordial-, Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel unterteilt (siehe Abbildung (Abb.) 1). In den Primordialfollikeln wird die Eizelle von einer einfachen Schicht flacher (Prä-) Granulosazellen umgeben. Die Oberfläche der Granulosazellen umgibt die Basalmembran, welche den Primordialfollikel vom umgebenden Stroma abgrenzt (Aerts & Bols, 2010a). Primärfollikel sind von einer 1 bis 1,5-fachen Schicht kuboider Granulosazellen umgeben (Braw-Tal & Yossefi, 1997). Mit der Bildung mehrschichtiger Granulosazellen werden die Follikel als Sekundärfollikel klassifiziert (Aerts & Bols, 2010a), welche von Braw-Tal und Yossefi (1997) in kleine präantrale und große präantrale Follikel unterteilt wurden. Kleine präantrale Follikel sind von zwei bis drei Schichten Granulosazellen umgeben und große präantrale Follikel weisen in vier bis sechs Schichten 101 bis 250 Granulosazellen auf. Erste Anzeichen der Bildung der Zona pellucida sind in kleinen präantralen Follikeln auszumachen. Ab dem Stadium der großen präantralen Follikel kann sie als vollständiger Ring um die Oozyte beobachtet werden (Braw-Tal & Yossefi, 1997). Die Antrumbildung beginnt ab 250 Granulosazellen. Tertiärfollikel werden in kleine antrale, große antrale und reife antrale Follikel (Graaf'sche Follikel) unterteilt (Aerts & Bols, 2010a; Braw-Tal & Yossefi, 1997). Zu Beginn entstehen innerhalb der Granulosazellschicht flüssigkeitsgefüllte Räume. Von einem Antrum wird gesprochen, wenn die flüssigkeitsgefüllten Zwischenräume zu einem großen, sichelförmigen Hohlraum konfluiert sind (Smitz & Cortvrindt, 2002). Mit Bildung des Antrums teilen sich die Granulosazellen in zwei anatomische Subtypen auf. Die Kumulus-Granulosazellen umgeben die Eizelle und stehen im engen Stoffwechselkontakt mit ihr. Eizelle und Kumulus bilden durch den engen Kontakt gemeinschaftlich den Kumulus-Oozyten-Komplex (KOK). Die innerste an der Zona pellucida anliegende Zellschicht wird Corona radiata genannt. Die Follikelwand wird von den muralen Granulosazellen ausgekleidet (Gilchrist et al., 2004). Der Follikel wächst von einem Durchmesser von $< 40 \mu\text{m}$ als Primordialfollikel zu einem Durchmesser von bis zu $500 \mu\text{m}$ als kleiner antraler Follikel. Ebenfalls die Eizelle wächst. Weist sie zunächst einen Durchmesser von knapp $30 \mu\text{m}$ im Primordialfollikel auf, ist dieser mehr als verdreifacht im antralen Follikel bei $90\text{--}130 \mu\text{m}$ (Adams & Singh, 2021; Braw-Tal & Yossefi, 1997).

wobei alle 20 bis 22 Tage eine neue Brunst auftritt (Ginther et al., 1989). Der Zyklus des Rindes lässt sich in die längere Luteal- und die kürzere Follikelphase unterteilen.

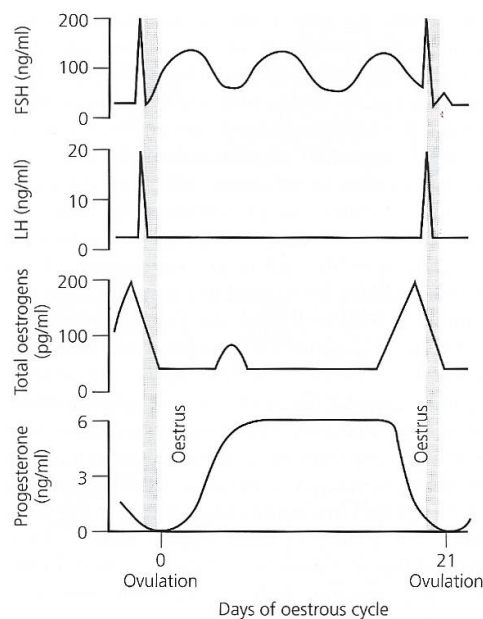


Abb. 2 Entwicklung der Hormonkonzentrationen im Blut während des Zyklus mit beispielhaft drei Follikelwellen (Noakes, 2001)

Nach der Ovulation beginnt die frühe Lutealphase, in der vom neu gebildeten Gelbkörper Progesteron produziert wird (siehe Abb. 2). Es schließt sich die mittlere Lutealphase mit einem konstant hohen Progesterongehalt und die späte Lutealphase, die durch die Regression des Corpus luteum und einer Abnahme der Progesteronkonzentration gekennzeichnet ist, an (Karg et al., 1969; Roche, 1996; Roche et al., 1998). Es folgt die Follikelphase, in der ein dominanter Follikel heranreift und ovuliert. Der Brunstzyklus bei Rindern besteht aus zwei oder drei Follikelwellen. Jede Follikelwelle kann in eine Rekrutierungs-, Selektions- und Dominanzphase eingeteilt werden. Während der Rekrutierung beginnt eine Kohorte aus 8 bis 41 Follikeln zu wachsen. Die rekrutierten Follikel durchlaufen einen Selektionsprozess, wobei bei monoovulären Arten wie dem Rind normalerweise ein einziger Follikel eine Dominanz entwickelt, während sich die übrigen Follikel zurückbilden (Aerts & Bols, 2010b; Ginther et al., 1996, 2000; Savio et al., 1988). Bei einem Großteil der Tiere treten zwei Wellen auf, während weniger häufig auch drei Wellen auftreten können (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2000; Jaiswal et al., 2009). Sehr selten zeigen Tiere nur eine Follikelwelle (Savio et al., 1988). Einer Follikelwelle geht immer ein Anstieg an Follikelstimulierenden Hormon (FSH) zwei bis vier Tage vor ultrasonografischer Sichtbarkeit der Welle voraus (Adams et al., 1992). Follikel sind bei einer transrektalen Ultraschalluntersuchung mit einem anechogenen Hohlraum ab einem Durchmesser von 2 mm zu diagnostizieren (Bollwein, 2022). Die erste Follikelwelle entsteht

direkt im Anschluss an die Ovulation. In Zyklen mit zwei Follikelwellen beginnt die zweite Welle ab Tag 10 und in Zyklen mit drei Follikelwellen beginnen die zweite und dritte Welle um Tag 9 und 16 des Zyklus (Adams et al., 1992). Der ovulatorische Follikel erreicht seine maximale Größe um Tag 21 des Zyklus (Savio et al., 1988). Bei Zyklen mit zwei Follikelwellen ist die erste Follikelwelle insgesamt und die Dauer der Dominanz des dominanten Follikels der ersten Welle signifikant länger als bei Zyklen mit drei Wellen. Zyklen mit zwei Follikelwellen neigen dazu kürzer als 21 Tage zu sein, was an einem früheren Beginn der Regression des Corpus luteums liegt (Ginther et al., 1989; Jaiswal et al., 2009). Während in den älteren Studien von Savio et al. (1988) der dominante Follikel der letzten Follikelwelle signifikant größer war im Vergleich zu den dominanten Follikeln in den frühen Follikelwellen, konnte dies in der jüngeren Studie von Jaiswal et al. (2009) nicht bestätigt werden. Der dominante Follikel erreicht beim Rind eine Endgröße von in etwa 15 mm (Jaiswal et al., 2009). Für eine schematische Darstellung der Abläufe der Follikelwellen bei einem Brunstzyklus mit beispielhaft drei Follikelwellen, siehe Abb. 3.

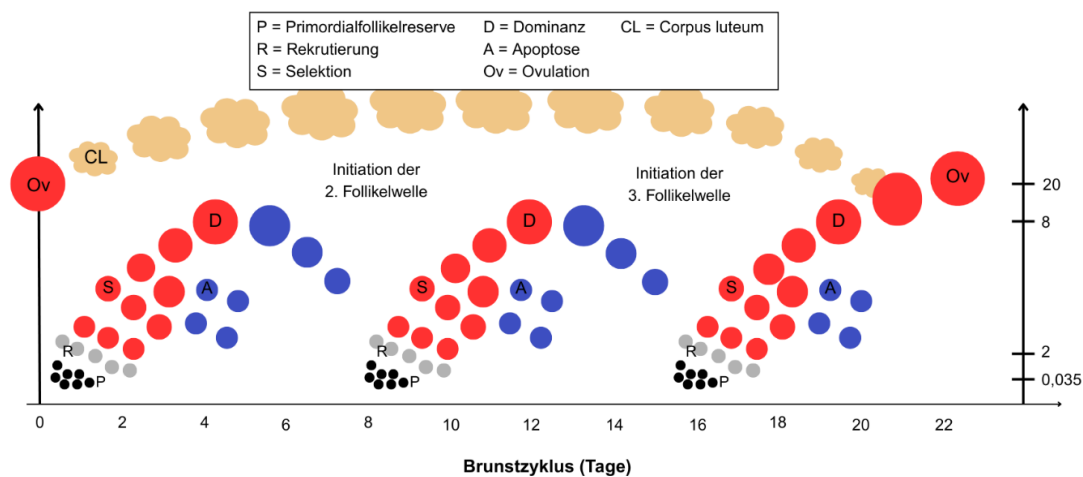


Abb. 3 Schematische Darstellung eines Brunstzyklus mit drei Follikelwellen, modifiziert nach Aerts und Bols (2010b)

Die Follikulogenese basiert auf einem präzise abgestimmten Zusammenspiel aus endokrinen, parakrinen und autokrinen Signalen (Driancourt, 1991). Das Follikelwachstum wird zunächst ohne das Einwirken von Gonadotropinen initiiert, weshalb diese Phase als das Gonadotropin-unabhängige Stadium bezeichnet wird (Braw-Tal & Yossefi, 1997). Die genauen Umstände, welche die Aktivierung der Primordialfollikel aus der Reserve in die Wachstumsphase bedingen, sind bislang noch nicht abschließend erforscht. Eine Vielzahl lokaler Faktoren der Oozyten, Granulosa- und Thekazellen wirkt auf die Initialisierung dieser Prozesse ein (Aerts & Bols, 2010a; Rodrigues et al., 2008). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei einer

Übermacht aktivierender Signale das Wachstum der Primordialfollikel eingeleitet wird. Die anschließende primäre Entwicklung der Follikel erfolgt ebenfalls durch ein komplexes Zusammenspiel parakriner und autokriner Faktoren. Es ist mittlerweile bekannt, dass auch insbesondere die Oozyte selbst durch wasserlösliche, parakrine Wachstumsfaktoren Einfluss auf die Follikelentwicklung nimmt (Braw-Tal, 2002; Eppig, 2001; Gilchrist et al., 2001). Die beteiligten Wachstumsfaktoren sind noch nicht abschließend untersucht. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass unter anderem Faktoren der Transforming Growth Factor β – Superfamilie beteiligt sind. Insbesondere die Faktoren GDF-9, GDF-9B und BMP-6 werden diskutiert (Gilchrist et al., 2003, 2004; Lanuza et al., 1998).

Nach Initiierung des Wachstums treten die Follikel in das Gonadotropin-abhängige Stadium ein. Die für die Follikulogenese relevanten Gonadotropine sind das FSH und das Luteinisierende Hormon (LH). Die Expression von FSH-Rezeptoren erfolgt ab dem Primärfollikel auf den Granulosazellen (Oktay et al., 1997). Allerdings ist ein Wachstum bis zum präantralen Follikel noch ohne FSH-Einwirkung möglich (Abel et al., 2000). Erst die Antralfollikel reagieren deutlich auf die FSH-Stimulation, sodass deren Wachstum von dieser abhängig wird (Roche, 1996). FSH stimuliert über membranständige Rezeptoren die Granulosazellen zur mitotischen Teilung und Bildung der Follikelflüssigkeit. Mit dem Wachstum der Follikel produzieren sie Östradiol und Inhibin. Dies führt wiederum bei Follikeln ab einem Durchmesser von 5 mm zu einem negativen Feedback auf die FSH-Freisetzung der Hypophyse, obwohl das weitere Wachstum der Follikel auf FSH angewiesen ist (Bodensteiner et al., 1996; Gibbons et al., 1999). Der größte Follikel sezerniert vermehrt Östradiol ins Blut, was zu einer anhaltenden Absenkung der FSH-Konzentration unter den Bedarf kleinerer antraler Follikel führt und somit eine Atresie provoziert (Ginther et al., 2000). Der sich entwickelnde dominante Follikel ist durch eine optimale Nutzung von FSH und FSH-abhängigen Wachstumsfaktoren besser an das endokrine Umfeld angepasst und hat somit einen Wachstumsvorteil gegenüber den untergeordneten Follikeln (Ginther et al., 2000, 2001; Mihm & Austin, 2002). LH spielt eine Schlüsselrolle in der Dominanzphase des Follikels (Crowe et al., 2001). Rinderfollikel exprimieren LH-Rezeptoren ab einem Follikeldurchmesser von 8 mm (Beg et al., 2001). Der dominante Follikel durchläuft einen Übergang in der Gonadotropin-Abhängigkeit von FSH zu LH, weshalb es ihm möglich ist, trotz niedriger zirkulierender FSH-Spiegel final zu wachsen und zu reifen (Driancourt, 1991; Mihm et al., 2006).

Ziel der Oogenese ist die Erlangung einer vollständigen Befruchtungskompetenz der Eizelle. Dies bedingt zum einen die Kernreifung und zum anderen die zytoplasmatische Reifung. Während der längsten Zeit der Follikulogenese verbleibt die Oozyte in ihrer pränatal arretierten Prophase der ersten meiotischen Teilung (Eppig, 1991). In diesem Zustand ist die Oozyte nicht

inaktiv, sondern beeinflusst über parakrine Wachstumsfaktoren das Wachstum des Follikels, die Steroid- und Inhibinsynthese sowie die Expression von Hormonrezeptoren (Eppig et al., 1997; Lanuza et al., 1998; Li et al., 2000; Vanderhyden & Tonary, 1995). Die Oozyte fährt mit der meiotischen Teilung kurz vor oder zeitgleich zum Einsetzen der Antrumbildung im Follikel fort (Sorensen & Wassarman, 1976). Das Gonadotropin LH spielt dabei eine entscheidende Rolle. Die Arretierung der Meiose wird maßgeblich durch die Second Messenger zyklisches GMP (cGMP) und AMP (cAMP) bedingt (Törnell et al., 1990). Granulosazellen produzieren cGMP als inhibitorisches Signal, welches über Gap Junctions in die Oozyte gelangt. Dort inhibiert cGMP die Phosphodiesterase 3A (PDE3A), wodurch eine hohe Konzentration an cAMP intrazellulär vorliegt, was maßgeblich die Meiose inhibiert. Der Anstieg von LH revidiert diesen Effekt. Zum einen verringert sich das cGMP-Level in den Granulosazellen drastisch. Zum anderen kommt es über noch nicht abschließend bekannte Wege zu einer Entkopplung bzw. Auflösung der Gap Junctions. Die Reduktion des cGMP in den Eizellen führt zu einer fünffach gesteigerten Aktivität der PDE3A, was wiederum ein Absenken der cAMP bedingt (Hyttel et al., 1986a; Norris et al., 2008, 2009). Mit Reduktion der Konzentration von cAMP wird die erste meiotische Teilung fortgesetzt. Die zweite meiotische Teilung zur reifen Eizelle erfolgt unmittelbar im Anschluss, arretiert jedoch erneut in der Metaphase der zweiten meiotischen Teilung (MII) bis zum Eindringen des Spermiums bei der Befruchtung (Hyttel et al., 1997; Kruij et al., 1983).

2.2 Ovulation

Die Dauer des Östrus bei Milchkühen wurde in verschiedenen Studien untersucht und liegt je nach Studie im Durchschnitt zwischen 9,4 und 17,8 Stunden. Umwelt- und Herdenfaktoren beeinflussen diese Spanne erheblich, wobei Beobachtungen aus neuerer Zeit eher einen Trend zu einer kürzeren Brunstdauer erkennen lassen (Britt et al., 1986; Kerbrat & Disenhaus, 2004; Roelofs et al., 2004; Sveberg et al., 2015; Van Vliet & Van Eerdenburg, 1996). Das Intervall zwischen Östrusbeginn und Ovulation wurde über mehrere Jahre hinweg erforscht und variiert je nach Studie zwischen 25 und 32 Stunden (Bloch et al., 2006; Larsson, 1988; Roelofs et al., 2004, 2005; Walker et al., 1996). Die Ovulation selbst wird durch einen Anstieg von LH ausgelöst. Während des sogenannten LH-Peaks wird eine bis zu 11-fache Steigerung des Basiswertes von LH für ca. neun bis zehn Stunden beobachtet (Larsson, 1988; Roelofs et al., 2004). Der LH-Peak setzt zwischen 3,5 und 7,5 Stunden nach Beginn des Östrus ein. Auch das Intervall zwischen LH-Peak und Ovulation wurde in zahlreichen Studien untersucht und liegt zwischen 20 und 30 Stunden (Bloch et al., 2006; Larsson, 1988; Renegar et al., 1978; Roelofs et al., 2004).

Für eine erfolgreiche Ovulation müssen mehrere Prozesse genau aufeinander abgestimmt sein. Die Luteolyse, also der Abbau des Gelbkörpers, leitet diese Prozesse ein. Dabei sinkt die Progesteronkonzentration, wodurch das negative Feedback auf den Hypothalamus abnimmt. Dies führt zu einer gesteigerten Frequenz an Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) des Hypothalamus und folglich einer gesteigerten LH-Sekretion mit erhöhter Pulsfrequenz und -amplitude. Dies fördert die finale Reifung des Follikels und die Produktion an Östradiol (Aerts & Bols, 2010b; Ginther et al., 1998; Wildt et al., 1981). Die kontinuierlich zunehmende Östradiolproduktion löst schließlich den LH-Peak aus, der die Ovulation einleitet (Karsch, 1987).

LH-Rezeptoren sind sowohl auf Granulosa- als auch auf Thekazellen vorhanden (Xu et al., 1995). Innerhalb der Granulosazellen konzentrieren sie sich insbesondere auf die muralen Granulosazellen, wobei sie dort insbesondere in den Schichten nahe der Basalmembran stärker ausgeprägt sind als in den Bereichen nahe des Antrums (Peng et al., 1991). Die Kommunikation innerhalb des Follikels erfolgt über Second Messenger, insbesondere cAMP und intrazelluläres Kalzium via Gap Junctions (Cooke, 1999; Gilula et al., 1978; Kosugi et al., 1995; Marsh, 1970).

Ein entscheidender Schritt in der Vorbereitung auf die Ovulation ist die Kumulusexpansion. Dabei bildet sich eine Hyaluronsäure-haltige Matrix zwischen den Kumuluszellen, wodurch der Kumulus expandiert. Während der Ovulation bleibt die Eizelle in diesem expandierten, mukösen Kumulus eingebettet und wird gemeinsam als KOK in den Eileiter aufgenommen (Eppig, 1980, 2001). Die Expansion des Kumulus wird sowohl durch parakrine Wachstumsfaktoren wie GDF-9, BMP-15 und FGF-8 der sich entwickelnden Oozyte (Elvin et al., 1999; Yoshino et al., 2006), als auch durch die durch den LH-Peak gesteigerte Prostaglandinsekretion und epidermale Wachstumsfaktoren der muralen Granulosazellen reguliert (Eppig, 1981; Fillion et al., 2001; Hizaki et al., 1999; Park et al., 2004).

Auch das Ovar muss sich auf die Ovulation vorbereiten. Die Bindegewebsmatrix sowie die Oberfläche des Follikels werden gezielt umgebaut, um die Ruptur des Follikels zu ermöglichen. Verschiedene Enzyme, darunter Metalloproteasen, Plasminogenaktivatoren, Kallikrein und Heparanasen spielen dabei eine zentrale Rolle (Canipari et al., 1995; Klipper et al., 2009; Murdoch & Gottsch, 2003; Richards et al., 1998). Ebenfalls Prostaglandin E₂ (PGE₂) nimmt eine wichtige Rolle während der Ovulation ein, da in Versuchen an Mäusen mit defekten PGE₂ Rezeptoren keine oder weniger Ovulationen beobachtet werden konnten (Lim et al., 1997).

Das Infundibulum des Eileiters legt sich auf die Oberfläche des Ovars. Dort werden die Follikelflüssigkeit und die Oozyte durch einen von Kinozilien erzeugten Flüssigkeitszug in den

Eileiter aufgenommen (Coy et al., 2012). Die Kumuluszellen und die Hyaluronsäure-haltige Matrix des expandierten KOK spielen eine essentielle Rolle bei der Aufnahme und initialen Adhäsion im Infundibulum (Kölle et al., 2009; Lam et al., 2000; Talbot et al., 1999).

2.3 Fertilisation

Die vom Infundibulum aufgenommene Eizelle wird in die Ampulle des Ovidukts weitergeleitet, wo die Befruchtung stattfindet (Abb. 4; Besenfelder et al., 2020). Bei der Befruchtung vereinigen sich zwei Gameten zu einer Zygote. Die Fertilisation lässt sich in zwei Teilschritte gliedern: Erstens die Imprägnation, bei der das Spermium die Eizelle penetriert sowie aktiviert und zweitens die Vorkernverschmelzung, auch Syngamie genannt, bei der sich durch Verschmelzung der Vorkerne das maternale und paternale Genom vereinen (Austin, 1959).

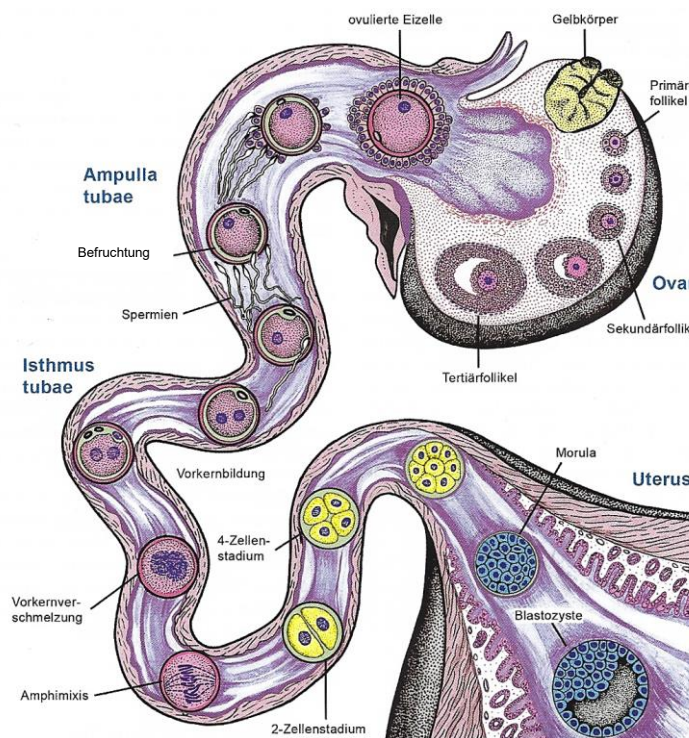


Abb. 4 Schematische Darstellung der Ovulation, Befruchtung und Furchung beim Säugetier modifiziert nach Schnorr & Kressin (2011)

Die Spermien durchqueren nach dem Deckakt oder der instrumentellen Besamung zunächst die Gebärmutter und dringen anschließend in die Eileiter ein. In beiden Eileitern, sowohl dem zur Ovulation ipsilateralen als auch dem kontralateralen Ovidukt, bildet sich innerhalb von weniger als fünf Stunden nach der Besamung ein funktionelles Spermienreservoir. Dieses befindet sich im Bereich der uterotubalen Verbindung sowie im Anfangsbereich des Isthmus im distalen Teil des Eileiters. Dort interagieren die Spermien mit dem Oviduktepithel, wodurch

die Spermien vorübergehend zurückgehalten werden (Hunter et al., 1991; Kölle et al., 2009; Lefebvre et al., 1997). Nach der Ovulation kommt es zur Hyperaktivierung und Kapazitation der Spermien und sie werden aus dem Reservoir freigesetzt, um zur Eizelle vorzudringen (Hunter et al., 1991; Hunter & Wilmut, 1984; Kölle et al., 2009). Thermo- und Chemotaxis spielen eine entscheidende Rolle für die zielgerichtete Bewegung der Spermien zur Eizelle (Chang & Suarez, 2010; Eisenbach & Giojalas, 2006).

Am Ort der Fertilisation müssen die Spermien zunächst die Kumuluszellen durchdringen. Das Eindringen der Spermien in die Kumulusmatrix wird durch eine membrangebundene Hyaluronidase der Spermien erleichtert (Lin et al., 1994). Ebenfalls Bestandteile der oviduktalen Flüssigkeit helfen, den KOK aufzulösen (Acuña et al., 2014; Griffiths et al., 2008). Im Vergleich zu anderen Spezies löst sich der Kumulus beim Rind verhältnismäßig schnell nach der Ovulation auf (Hamilton & Laing, 1946). Sobald das erste Spermium die Zona pellucida erreicht und erfolgreich die Akrosomenreaktion durchlaufen hat, kann es diese penetrieren. Daraufhin folgt unmittelbar die kalziumvermittelte Kortikalreaktion, wobei kortikale Granula der Eizelle ihren Inhalt in den perivitellinen Raum zwischen Oolemm und Zona pellucida abgeben. Diese Exsudate, unter anderem Proteasen und Peroxidasen, bewirken eine biochemische und strukturelle Veränderung der Zona pellucida, insbesondere ihrer Glykoproteine. Diese sogenannte Zonareaktion führt zum Zonablock, wobei die Zona ihre Fähigkeit verliert, Spermien zu binden und von ihnen durchdrungen zu werden. Dies stellt bei Rindern die wichtigste Barriere gegen eine Polyspermie dar (Sun, 2003). In Versuchen an Mäusen wurde unter anderem die Metalloprotease Ovastacin aus den kortikalen Granula analysiert. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass Ovastacin das Zona pellucida-Glykoprotein ZP2 veränderte, was im Anschluss eine Polyspermie verhinderte (Burkart et al., 2012). Es ist häufig unter dem Mikroskop zu beobachten, dass Eizellen bzw. Embryonen von vielen Spermien umgeben werden, die an der Außenseite der Zona pellucida andocken oder in ihr gefangen sind. Es wird davon ausgegangen, dass die akzessorischen Spermien die Anzahl an Spermien darstellen, die in der Zeit, in der die Eizelle empfänglich war, um die Befruchtung konkurrierten. Die Anzahl der akzessorischen Spermien korreliert positiv mit der Befruchtungsrate und der Embryonalqualität (Saacke et al., 2000). In der Studie von DeJarnette et al. (1992) konnte festgestellt werden, dass unbefruchtete Eizellen signifikant weniger akzessorische Spermien aufwiesen als befruchtete. Von diesen wiesen degenerierte Embryonen die geringste Anzahl akzessorischer Spermien auf. Im Median wurden Embryonen mit guter Qualität tendenziell von mehr akzessorischen Spermien umgeben als Embryonen mit schlechter Qualität (DeJarnette et al., 1992).

Nach der Fusion des Spermiums mit der Eizelle wird kalziumvermittelt die zweite meiotische Teilung der Eizelle reaktiviert (Fissore et al., 1992; Miyazaki et al., 1986). Es folgen zahlreiche

nukleäre und zytoplasmatische Veränderungen in der Eizelle. Die Pronuklei der zwei Gameten bilden sich, durchlaufen eine Schwellung und verschmelzen letztendlich miteinander, was in der Bildung der Zygote resultiert (Crozet, 1984; Hyttel et al., 1988).

2.4 Phasen der frühen Embryogenese bis zum Blastozystenstadium

2.4.1 Entwicklung im Ovidukt

Die folgende Entwicklungsphase wird Furchung genannt, wobei durch mitotische Teilung die Blastomere entstehen. Unmittelbar im Anschluss zur Befruchtung beginnt die erste mitotische Teilung der Zygote, die nach 23 bis 31 Stunden nach der Ovulation abgeschlossen ist (Hamilton & Laing, 1946; Hyttel et al., 1988). Die weiteren Furchungen zum 4- bzw. 8-Zeller schließen sich im Durchschnitt nach je 10–15 Stunden an (Eyestone & First, 1988; Hamilton & Laing, 1946; Sirard & Lambert, 1985). Bei jeder Zellteilung entstehen beim Rind nahezu gleich große Blastomere. Der Embryo durchläuft eine Entwicklung von einem 2-Zellstadium über das 4-Zell-, 8-Zell-, 16-Zellstadium usw. bis hin zu einer kompakten Morula mit multiplen Blastomeren (Hamilton & Laing, 1946). Während dieser gesamten Entwicklung entspricht die Gesamtgröße des Embryos der Gesamtgröße der Zygote von ca. 160–180 µm inkl. einer Zonadicke von 10 bis 15 µm (Hamilton & Laing, 1946; Linares & King, 1980).

Der Metabolismus des sich entwickelnden Embryos wird durch die biochemische Zusammensetzung und das Volumen des Oviduktsekrets sowie durch endokrine Faktoren beeinflusst. In einer In-vitro-Studie wurde festgestellt, dass die Embryonen, die mit Eileitergewebe im Vergleich zu denen in einer Kultivierung ohne dieses Gewebe kultiviert wurden, signifikant bessere Teilungs- und Entwicklungsraten aufwiesen (Eyestone & First, 1988). Es wird davon ausgegangen, dass Bestandteile der Eileiterflüssigkeit wie Ionen, Immunglobuline, Glukose und Pyruvat aktiv per Transsudation oder passiv durch Diffusion aus dem Blut in den Eileiter übertreten. Zudem werden eine Reihe spezifischer Eileiterproteine unter anderem das Ovidukt-spezifische Glykoprotein bekannt als OVGP1 von den Epithelzellen produziert und in das Lumen des Oviduktes sezerniert (Boice et al., 1990; Brunton & Brinster, 1971; Gandolfi et al., 1993; Leese & Gray, 1985; Malayer et al., 1988; Parr & Parr, 1986). Im Vergleich wurde eine konstant höhere Kaliumkonzentration in der Oviduktflüssigkeit ($4,46 \pm 0,13$ mM) als im Serum festgestellt, während die Magnesiumkonzentration im Zyklus starken Schwankungen unterlag und immer geringer als im Serum war. Kalzium erreichte seine maximale Konzentration ($2,57 \pm 0,22$ mM und $2,05 \pm 0,29$ mM) um den Östrus und die Ovulation (Grippe et al., 1992).

Die Eileiterpassage der Gameten und der Zygote basiert auf einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Aspekte und wird im Wesentlichen sowohl durch die Steroidhormone als auch durch lokal produzierte Prostaglandine und adrenerge Innervation gesteuert (Polidoro et al., 1973; Spilman & Harper, 1975). Diese nehmen Einfluss auf die Zilienaktivität, das Mukosaödem und die Strömungsgeschwindigkeit und -richtung der Eileiterflüssigkeit. Das präovulatorisch produzierte Östradiol bedingt eine vermehrte Kontraktion der glatten Muskelzellen, es kommt zu einem ausgeprägten Mukosaödem des Oviduktepithels, einer vermehrten Sekretion ins Lumen, einem verstärkten Flüssigkeitsstrom und einer erhöhten Schlagfrequenz der auf dem Epithel sitzenden Kinozilien (Bishop, 1956; Gonella-Diaza et al., 2017; Lindblom et al., 1980; Orihuela et al., 2003, 2006). Postovulatorisch steigt die Progesteron- und sinkt die Östradiolproduktion. Progesteron bedingt eine zum Östradiol gegenteilige Entwicklung im Ovidukt, in dem es die Kinozilienaktivität und die Muskelkontraktion reduziert (Bylander et al., 2010, 2013; Conneely et al., 2003; Lindblom et al., 1980; Mahmood et al., 1998). Kölle et al. (2009) konnten in ihren Untersuchungen mittels Videomikroskopie feststellen, dass nach der Fertilisation die Fließgeschwindigkeit im zur Ovulation ipsilateralen Ovidukt abnahm und nach Übertritt in den Uterus wieder zunahm. Insbesondere in der Lokalität, in der sich der Embryo befand, war die Fließgeschwindigkeit langsamer, und es konnte eine Zunahme an sekretorischen Zellen sowie eine verstärkte Angiogenese beobachtet werden. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass auch der Embryo selbst lokalen Einfluss auf das Ovidukt ausübt (Kölle et al., 2009).

2.4.2 Entwicklung im Uterus

Die Wanderung der Oozyte und der frühen Embryonalstadien durch den Eileiter bis ins Uterushorn dauert beim Rind etwa drei bis vier Tage (Hamilton & Laing, 1946; Kölle et al., 2009). In der Regel tritt der Embryo im 8- bis 16-Zellstadium aus dem Ovidukt in den Uterus ein. Dort entwickelt er sich zu einer Morula an Tag 5/6 und zu einer Blastozyste an Tag 7/8 weiter (Hamilton & Laing, 1946).

Gemäß älteren Annahmen bewahren die Blastomere nach den ersten Teilungsschritten das totipotente Entwicklungspotenzial der Zygote. So gelang es Johnson et al. (1995), aus Blastomeren eines 4-Zell Embryos vier identische Kälber zu generieren. Boiani et al. (2019) stellen in ihrer Übersichtsarbeit jedoch diese lang angenommene Weitergabe der Totipotenz in Frage. Aufgrund der Auswertung diverser Studien kommen die Autoren zu der Hypothese, die Zygote als eine Art Mosaik anzusehen, was zu einer teilweise bereits frühen unterschiedlichen Vererbung auf die Schwesterblastomere führt (Boiani et al., 2019). Sicher ist, dass sich die Totipotenz im Verlauf der Furchung ab dem 16-Zellstadium verändert. Die

Anordnung der Blastomeren ist dabei von entscheidender Bedeutung für die spätere Entwicklung. Außen sammeln sich einschichtig große und abgeflachte Blastomeren, die das multipotente Trophektoderm bilden. Aus diesen entwickeln sich später die fetalen Anteile der Plazenta und Anteile des Chorions. Die innen liegenden, kleineren Blastomeren bilden die pluripotente innere Zellmasse (ICM). Diese kann in der weiteren Entwicklung in den Hypoblasten und Epiblasten differenziert werden. Ausschließlich aus der ICM entwickelt sich der Fetus weiter sowie der Dottersack und weitere Anteile des Chorions (Adjaye et al., 2005; Kuijk et al., 2012; Ozawa et al., 2012; Ralston & Rossant, 2005; Van Soom et al., 1997).

Die frühe Embryonalentwicklung wird zu Beginn durch maternale mRNA und Proteine gesteuert. Jedoch wird diese Steuerung ab dem 8-Zellstadium in bovinen Embryonen durch die Aktivierung des embryonalen Genoms ersetzt. Dieser Prozess wird als maternal-to-embryonic transition bezeichnet. Die RNA-Synthese des embryonalen Genoms wird ab dem 8-Zellstadium initiiert, was zu einer wesentlichen Veränderung im qualitativen und quantitativen Muster der Proteinsynthese ab dem 8- bis 16-Zeller führt (Frei et al., 1989; King et al., 1988; Kopečný et al., 1989).

Bovine Embryonen kompaktieren ab dem 32-Zellstadium, das zwischen 126 und 138 Stunden nach der Befruchtung eintritt (Van Soom et al., 1992, 1997). Im Zuge der Kompaktierung kommt es zu einem erhöhten Kontakt zwischen den Blastomeren durch Tight und Gap Junctions, bis die Blastomeren nicht mehr als einzelne Zellen, sondern als einheitliche zelluläre Masse auszumachen sind (Ducibella & Anderson, 1975). Die Blastozystenformation beginnt ab 64 bis 128 Blastomeren bzw. zwischen Tag 6 und 8 nach der Ovulation (Van Soom et al., 1997). Dabei entsteht allmählich ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum, der als Blastocoel bezeichnet wird. Das Trophektoderm, eine polarisierte einlagige Zellschicht, kleidet die Wand der sich bildenden Blastozyste aus und ist für den Transport u. a. von Ionen, Zuckern, Nukleosiden in und aus dem Embryo zuständig (Wiley, 1988). Das Blastocoel entsteht durch eine aktive Aufnahme von u. a. Ionen über transzelluläre Transportwege und den daraus resultierenden osmotischen Druck, welcher einen passiven Wassereinstrom in den Embryo bedingt (Biggers et al., 1988; Borland & Tasca, 1974; Cross, 1973; Hobbs & Kaye, 1986). Die Blastozyste entwickelt sich innerhalb der Zona pellucida von einer frühen Blastozyste bis hin zur expandierten Blastozyste, wobei der Embryo einem flüssigkeitsgefüllten Hohlkörper gleicht. Die expandierte Blastozyste weist einen Durchmesser von 200 µm auf und umfasst ca. 160 Zellen (Morris et al., 2001). Um den neunten Tag der Entwicklung kommt es zum Schlupf der Blastozyste aus der Zona pellucida (Robertson & Nelson, 2009; Van Soom et al., 1997).

2.5 Follikulo-, Oogenese, Fertilisation und frühe Embryogenese nach einer Superovulation

2.5.1 Follikulo- und Oogenese

Im Gegensatz zur einfachen bzw. in selteneren Fällen multiplen Ovulation in etwa 11,4 bis 22,4 % der Fälle (Colazo & Ambrose, 2014; Lopez et al., 2005; López-Gatius et al., 2005) in nicht stimulierten Tieren zielt ein Superovulationsprogramm (SOP) darauf ab, gleichzeitig multiple Follikel und darin enthaltene Oozyten heranreifen und ovulieren zu lassen. Dies erfordert die Verabreichung eines Gonadotropinpräparats, welches die Effekte des FSH und LH simuliert. Das SOP ermöglicht es, den vom Körper der Kuh strikten Selektionsprozess auf ein bzw. maximal zwei dominante Follikel zu umgehen (Boland et al., 1991). Die extern zugeführten Gonadotropine greifen erheblich in die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse ein und beeinflussen die Follikelentwicklung. Sie steigern die Ovulationsrate durch Aktivierung reaktionsfähiger Follikel, indem die mitotische Aktivität präantraler und kleiner Antralfollikel der Follikelwelle gesteigert wird. Zusätzlich kommt es zu einer Reduktion der Atresie antraler Follikel (Monniaux et al., 1983; Moor et al., 1984).

Die Superovulationsbehandlung wird meist in der Mitte der Lutealphase, d. h. etwa um den zehnten Tag des Zyklus, initiiert, wobei ein Blütegelbkörper vorliegt (Boland et al., 1991). Ein intakter Gelbkörper und dessen Progesteronproduktion sind von entscheidender Bedeutung für die Oozytenqualität während der Superstimulation. So zeigte eine Studie von Rivera et al. (2011), dass ein SOP in der ersten Follikelwelle nach dem Östrus, also ohne vorhandenen Blütegelbkörper, signifikant schlechtere Embryonen hervorbrachte, als ein SOP in der ersten Follikelwelle mit Applikation eines exogenen Progesterons oder ein SOP in der zweiten Follikelwelle mit intaktem Corpus luteum. Ein hoher Progesterongehalt während des Wachstums der ovulatorischen Follikel korreliert mit einer verbesserten Oozytenqualität (Lonergan & Sánchez, 2020). Ein Inhibieren der Progesteronsynthese der Kumuluszellen mittels Substitution von Trilostane (Inhibitor der 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase) während der In-vitro-Maturation (IVM) resultierte in schlechterer embryonaler Entwicklung. Dies deutet darauf hin, dass Progesteron essenziell für die Entwicklungskompetenz der Eizelle und folglich des Embryos ist (Aparicio et al., 2011). Ein Start des SOP um den zehnten Tag des Zyklus kann mit der Initiation der zweiten Follikelwelle oder noch der Follikeldominanz aus der ersten Welle zusammenfallen (Ginther et al., 1989; Savio et al., 1988). Auf den potenziellen Einfluss eines dominanten Follikels zu Beginn der Superovulationsbehandlung wird in Kapitel 2.6.1.1 eingegangen.

In der Literatur wird das equine Choriongonadotropin (eCG), welches in früherer Literatur auch als Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) bezeichnet wurde, als mögliches

Gonadotropin zur Superovulation diskutiert. Es zeichnet sich durch eine lange Halbwertszeit von bis zu 120 h aus, sodass eine einmalige Gabe ausreichend ist. In der Folge wird Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) intramuskulär 48 Stunden nach eCG-Gabe injiziert, um die Luteolyse des bestehenden Corpus luteum einzuleiten (Bever & Dieleman, 1987; Dieleman et al., 1993; Jahnke & Youngs, 2021; Schams et al., 1978). Alternativ können FSH-/LH-Präparate aus der Schweine- und Schafhypophyse verwendet werden, deren Halbwertszeit in etwa 5 Stunden (Laster, 1972) beträgt. Daher ist eine zweimal tägliche Gabe über mehrere Tage erforderlich. Zumeist erfolgt die Superovulationsbehandlung über 4 Tage in absteigender Dosierung (Chupin & Procureur, 1983). Am dritten oder vierten Tag der FSH-Behandlung wird ein $PGF_{2\alpha}$ -Präparat zur Einleitung der Luteolyse injiziert (Mapletoft & Bó, 2012; Monniaux et al., 1983). Eine Übersicht ist in Abb. 5 dargestellt. In den Anfängen des Embryotransfers stellte die Verwendung von humanem Menopausengonadotropin (hMG) eine weitere Möglichkeit zur Superovulation dar. Da diese Methode jedoch keine nennenswerten Vorteile bei der Kuh bietet und keine Präparate für Rinder zugelassen sind, findet sie keinerlei kommerzielle Anwendung (Jahnke & Youngs, 2021).

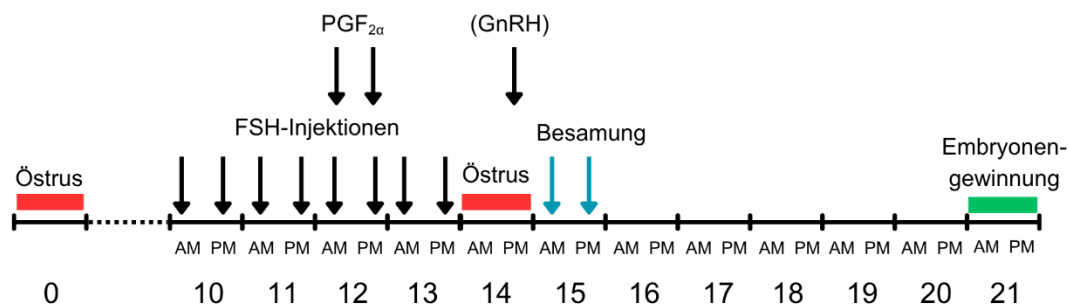


Abb. 5 Schematischer Ablauf eines Superovulationsprogramms (SOP) mit einem FSH-Präparat modifiziert nach Mikkola et al. (2020); FSH = Follikelstimulierendes Hormon; AM = vormittags; PM = nachmittags

Die Superovulation nimmt Einfluss auf die Follikelentwicklung, die in drei Phasen unterteilt werden kann. In der ersten Phase kommt es zur primären Stimulation und Rekrutierung von Follikeln durch die Gonadotropine. Die Phase startet mit Beginn der Gonadotropinbehandlung und dauert ca. drei Tage bis zur Gabe des $PGF_{2\alpha}$ -Medikamentes. Die zweite Phase schließt sich direkt an und endet mit dem LH-Peak. In dieser Phase kommt es zum weiteren Wachstum der Follikel. Diese Phase ist mit ca. 41 Stunden deutlich kürzer als bei nicht-superovulierten Tieren mit ca. 61 Stunden. Sie ist dadurch gekennzeichnet, dass sich die endogene Basalsekretion, Pulsfrequenz und Pulsamplitude von FSH und Pulsfrequenz von LH deutlich verringert (Dieleman & Bevers, 1993). Dies ist vermutlich auf das stärkere negative Feedback

der erhöhten Östradiolkonzentration und des Inhibins der wachsenden Follikel zurückzuführen (Driancourt, 1991). Der LH-Peak initiiert die abschließende Maturation der Follikel und Oozyten in der dritten Phase, welche mit multiplen Ovulationen endet. In diesen drei Phasen sind die Gonadotropine maßgeblich für Phase 1 und 2 von entscheidender Bedeutung (Dieleman & Bevers, 1993).

Frühere Studien von Hyttel et al. (1986a) an superstimulierten Kühen zeigten, dass null bis zwei Stunden nach dem LH-Peak der perivitelline Spalt in der Oozyte entstand. Neun bis zwölf Stunden nach dem LH-Peak kam es zu einer Auftrennung der Tight Junctions zwischen Kumuluszellen und dem Oolemm und 19 Stunden nach dem LH-Peak wurde der erste Polkörper ausgeschleust. Im Verlauf dieser Entwicklung sank die follikuläre Östradiol- und stieg die follikuläre Progesteronkonzentration (Callesen et al., 1986; Hyttel et al., 1986a). Allerdings verläuft eine Superovulation beim stimulierten Tier nicht immer identisch, da es durch den Eingriff in die fein abgestimmte Hormonachse auch zu Abweichungen kommen kann. Diese Abweichungen gehen wiederum mit intra- und interfollikulärer Asynchronität einher (Dieleman & Bevers, 1993). In physiologisch regulär verlaufenden Entwicklungen erfolgt die Oozytenmaturation synchron zur intrafollikulären Hormonverschiebung. Folglich lassen sich weniger weit entwickelte Oozyten in Östradiol-dominierten Follikeln (Progesteron-Östradiol-Ratio: $< 0,8$) beobachten. Ab dem LH-Peak erfolgt eine Verschiebung der intrafollikulären Situation vom Östradiol zum Progesteron hin, sodass ab 12 – 17 Stunden nach LH-Peak eine Ratio von eins vorliegt. Ab 21 – 23 Stunden post LH-Peak, wenn die Oozyten weiter entwickelt sind, zeigt sich eine Progesteron-Dominanz mit einer Progesteron-Östradiol-Ratio von $> 1,2$ (Callesen et al., 1986). Der Wechsel von der Östradiol- zu der Progesteron-Dominanz manifestiert sich beim superovulierten Tier geringgradig schneller als bei nicht-superovulierten Tieren, wobei der Wechsel ab 20 Stunden nach dem LH-Peak auftritt (Dieleman et al., 1983a). Dieser Wechsel der hormonellen Konzentrationen ist darauf zurückzuführen, dass mit dem LH-Peak die Androgenproduktion in den Granulosazellen arretiert. Dies führt folglich zu einer Senkung der Östradiolkonzentration. Parallel markiert der LH-Peak den Beginn der Luteinisierung (Dieleman & Bevers, 1993; Lucy, 2007). In einigen Fällen können sich bei superovulierten Kühen jedoch zum Zeitpunkt des LH-Peaks bereits Oozyten im MII-Stadium befinden, obwohl der Follikel noch Östradiol produziert. Diese veränderte hormonelle Follikelsituation kann möglicherweise schädlich für die Entwicklung der Oozyte und anschließend des Embryos sein (Dieleman & Bevers, 1993). Diese Hypothese wurde durch die In-vitro-Studie von Beker et al. (2002) bestätigt, in der bei der Maturation von Oozyten mit erhöhten 17β -Östradiol-Spiegeln im Kultivierungsmedium vermehrt nukleare Malformationen in Form von abnormaler chromosomaler Organisation beobachtet wurden. Auch in vivo wurde dies bereits von Callesen et al. (1986) bei

superovulierten Tieren bestätigt. Insbesondere Kühe, die ein abweichendes Hormonprofil aufwiesen, wiesen ebenfalls eine vermehrte asynchrone nukleare Oozytenmaturation auf, was zu Oozyten und später Embryonen minderer Qualität führte. In einer Studie von Hyttel et al. (1991) konnte festgestellt werden, dass etwa die Hälfte der untersuchten superovulierten Tiere regulär gereifte Oozyten aufwies. Ein Viertel der Tiere wies ausschließlich Oozyten mit abweichender Maturation auf, während das verbleibende Viertel sowohl Oozyten mit regulärer und abweichender Maturation aufwies. Oozyten aus superovulierten Kühen wiesen eine vorzeitige Bildung des perivitellinen Raums, fehlende Vakuolisierung des Zellkerns, reduzierte Menge an Lipidtröpfchen und fehlende Lipid-Mitochondrien-Assoziation, ein vergrößertes Kompartiment des rauen endoplasmatischen Retikulums sowie verstärkte Chromatinkondensation auf (Assey et al., 1994).

Die absolute Menge und Sekretion von ovariellen Hormonen in superovulierten Tieren unterscheidet sich von nicht-superovulierten Tieren aufgrund des Wachstums und der Entwicklung multipler Follikel und späterer Corpora lutea (Saumande, 1980). Saumande (1980) konnte bereits zeigen, dass 24 Stunden nach einmaliger Gabe von eCG die Blutkonzentration des 17β -Östradiols exorbitant anstieg. Die Tiere mit den höchsten Östradiolwerten zeigten im späteren Verlauf auch die meisten Ovulationen. Allerdings ist diese Schlussfolgerung mit Vorsicht zu betrachten, da aus der Östradiolkonzentration nicht sicher auf den Ovulationserfolg geschlossen werden kann. Es ist nämlich nicht gewährleistet, dass alle Östradiol-produzierenden Follikel sicher ovulieren. Des Weiteren wurde ein quantitativer Zusammenhang zwischen der Anzahl an Corpora lutea und der Höhe der Blutprogesteronwerte post ovulationem festgestellt. Zudem konnte eine zeitliche Korrelation beobachtet werden, wobei die Progesteronwerte bei den Tieren schneller anstiegen, bei denen sich die Corpora lutea schneller und früher bildeten (Saumande, 1980).

2.5.2 Ovulationen

Bei Untersuchungen von Yadav et al. (1986) wurden Fleischrinder mit porzinem FSH (pFSH) zweimal täglich über vier Tage hinweg in absteigender Konzentration beginnend an Tag (D) 8-10 des Zyklus superstimuliert. Daraufhin folgte eine $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe 60–72 Stunden nach der ersten pFSH-Injektion zur Auslösung der Luteolyse und folglich der Ovulationen. Die erhobenen Daten ergaben, dass der Östrus ca. $41,3 \pm 1,25$ h nach der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe einsetzte. Bereits zwei Stunden später wurde der LH-Peak gemessen, gefolgt von multiplen Ovulationen ab 21 Stunden nach LH-Peak. In der Studie von Kanitz et al. (2002) wurde der LH-Peak bei mit pFSH stimulierten Färsen und Kühen $46,5 \pm 4,4$ Stunden nach der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe festgestellt.

Die Ovulationen setzten 62–68 Stunden nach Beginn der Luteolyse bzw. 24–30 Stunden nach dem LH-Peak ein. In einer früheren Studie aus dem Jahr 1978 (Maxwell et al., 1978) konnte ein vergleichbares Ergebnis bei einer Stimulierung mit eCG bei Anguskühen festgestellt werden. Zwischen 18 und 24 Stunden nach Östrusbeginn setzten die Ovulationen ein. Dies bedeutet, dass die Ovulationen bei superovulierten Tieren früher einsetzen als bei nicht-superovulierten. Bei nicht-superovulierten Tieren tritt der LH-Peak erst 5–8 h nach dem Östrusbeginn auf und die Ovulation erfolgt ca. 25 h nach dem LH-Peak (Bloch et al., 2006; Larsson, 1988; Roelofs et al., 2004). Lediglich in der Studie von Bloch et al. (2006) liegt das Intervall zwischen Östrusbeginn und LH-Peak mit $3,5 \pm 0,5$ h bei nicht stimulierten Tieren zeitlich enger an den zwei Stunden von superovulierten Tieren. Die Verkürzung der Intervalle ist bei superovulierten Tieren auf das exogen zugeführte Gonadotropin zurückzuführen, welches zu einem stärkeren und früheren Anstieg des von den multiplen Follikeln produzierten Östradiols führt. Diese These wird von Purwantara et al. (1994b) und Bó et al. (2006) bestätigt. Tiere mit einer geringeren Anzahl an großen Follikeln und damit einhergehend einer geringeren Anzahl an Ovulationen weisen einen späteren Beginn der Ovulationen auf. Somit wird der Effekt des erhöhten Östradiols auf die verkürzten Intervalle sogar zwischen superovulierten Tieren deutlich.

In verschiedenen Studien wurde eine unterschiedlich lange Ovulationsperiode festgestellt (siehe Tabelle (Tab.) 1). Es zeigen sich keinerlei Unterschiede in Beginn, Dauer und Anzahl an Ovulationen zwischen Milchkühen und -rindern und zwischen dem linken und rechten Ovar (Purwantara et al., 1994b).

Tab. 1 Ergebnisse verschiedener Studien über die Ovulationsperiode nach einer Superovulation

Veröffentlichung	Donoren	Beginn SOP	Gonadotropin	Ovulationsperiode
Maxwell et al. (1978)	Anguskühe N = 15	D 10–11	eCG	91 % der Ovulationen innerhalb von 20 h
Yadav et al. (1986)	Fleischrinder N = 32	D 8–10	pFSH	80 % der Ovulationen innerhalb von 12 h 88 % der großen (> 10 mm Ø) Follikel ovulieren innerhalb von 22 h
Purwantara et al. (1994b)	Milchkühe & -rinder N = 20	D 9–12	pFSH	$8,3 \pm 0,54$ h Hauptanteil der Ovulationen in den ersten 4 h

Das Wachstum der Follikel ist mit Beginn der Ovulationsperiode noch nicht abgeschlossen. Insbesondere mittelgroße (6–10 mm Ø) und kleine (< 5 mm Ø) Follikel können nach Ovulation der ersten größeren (> 10 mm Ø) Follikel noch weiterwachsen. Dies zeigte sich in den

Untersuchungen von Yadav et al. (1986) in einem Anstieg der Anzahl kleiner Follikel, wenn die Anzahl großer Follikel sank. Es wurde beobachtet, dass selbst mittelgroße Follikel zu einem späteren Zeitpunkt noch ovulieren. Mit den Ovulationen der ersten Follikel steht den kleineren Follikeln nun mehr FSH zur Verfügung, was ihnen zuvor durch die Follikelhierarchie, bei der große Follikel das Wachstum der kleineren inhibieren, verwehrt blieb (Yadav et al., 1986).

2.5.3 Fertilisation

In einer Vielzahl älterer Studien wurde festgestellt, dass die Befruchtungsrate bei superovulierten Tieren deutlich unter der nicht-superovulierter Tiere lag. So wurde von Elsden et al. (1976) bei nicht superovulierten Tieren eine Befruchtungsrate von 89 % beobachtet, während superovulierte Tiere trotz dreimaliger Besamung mit tiefgefrorenem Sperma bzw. zweimaliger Besamung mit frischem Sperma lediglich eine Befruchtungsrate von 70 % erreichten. Ebenfalls in den Untersuchungen von Hasler et al. (1983) wurde eine Befruchtungsrate nach einer Superovulation von ca. 70 % erreicht, während Hasler (1992) eine Rate von 64 % erreichte. Auch Saacke et al. (1998) erzielten eine um 19,3 %-Punkte geringere Befruchtungsrate bei superovulierten Kühen. Demgegenüber belegen die Studien von Dalton et al. (2000) und Sartori et al. (2002), dass bei der Verwendung hochqualitativer Spermaportionen und beim richtigen Besamungszeitpunkt Befruchtungsraten von über 80 % erreicht werden können.

Kafi und McGowan (1997) vermuteten, dass die geringere Befruchtungsrate bei superovulierten Rindern und Kühen auf eine Störung im Spermientransport und/oder des Transportes der Eizellen sowie auf eine suboptimale Eizellqualität zurückzuführen sei. Wie die Übersichtsarbeit von Mirihagalle et al. (2022) ausführlich darlegt, spielt das Steroidhormon Progesteron eine entscheidende Rolle bei der Freisetzung der Spermien aus dem Spermienreservoir im Ovidukt nicht stimulierter Tiere. Bei Schweinen führte sowohl eine Progesteroninjektion unter die Serosa der Eileiter im Bereich des Spermienreservoirs als auch eine Progesteronsubstitution bei Oviduktzell-Spermien-Aggregaten, zu einer vermehrten Freisetzung von Spermien (Hunter, 1972; Machado et al., 2019). Darüber hinaus beeinflusst Progesteron, wie in der Übersichtsarbeit von Tamburrino et al. (2020) dargelegt, auch manche Spermienfunktionen post ejaculationem, wie die Kapazitation, die Akrosomenreaktion sowie die hyperaktive Motilität und Chemotaxis. Ob dieser Einfluss jedoch beim superovulierten Tier zum Tragen kommt, ist fraglich. Es ist bekannt, dass der Progesterongehalt post ovulationem nach einer Superovulation höher ist als bei nicht-superovulierten Tieren. Dieser Unterschied

manifestiert sich jedoch erst ab Tag zwei bis vier nach den Ovulationen bzw. der Ovulation (Forde et al., 2012; O'Hara et al., 2012).

Das Steroidhormon Östradiol, welches bei einer Superstimulation erhöht ist (Fontes et al., 2019; Saumande, 1980), kann Einfluss auf die Befruchtungsfähigkeit der Spermien nehmen. Östradiol beeinflusst das Östrus-assoziierte Glykoprotein, welches vom Oviduktepithel in das Lumen sezerniert wird (Gerena & Killian, 1990). Eine vierstündige Inkubation von Spermien mit diesem Glykoprotein resultierte in einer signifikanten Steigerung der Kapazitationsrate der Spermien (King et al., 1994). Im Vergleich zu nicht stimulierten Tieren zeigten Kühe, die mit pFSH oder eCG stimuliert wurden, eine erhöhte Östradiolkonzentration im Oviduktgewebe und einen Anstieg der mRNA, die für das Östrus-assoziierte Ovidukt-spezifische Glykoprotein 1 (OVGP1), auch Oviductin genannt, kodiert (Fontes et al., 2019; Zhao et al., 2022).

Über die Hypothese, dass die geringeren Befruchtungsraten bei superovulierten Tieren auf einen fehlerhaften Spermientransport zurückzuführen ist, herrscht Uneinigkeit. Hyttel et al. (1991) stellten in ihren Untersuchungen eine fehlerhafte Bildung des Spermienreservoirs bei superovulierten Tieren fest. Der Spermientransport in den Eileitern wurde mittels Rasterelektronenmikroskop bei nicht stimulierten und superstimulierten Tieren untersucht. Bei den nicht stimulierten Tieren bildete sich innerhalb eines Zeitraums von weniger als fünf Stunden ein Spermienreservoir in der Nähe der uterotubalen Mündung im Anfangsbereich des Isthmus der beiden Eileiter. Weder die Akkumulation von Spermien im Reservoir noch die anschließende Umverteilung der Spermien aus dem Reservoir wurden durch unilaterale Steroidsignale der Eierstöcke reguliert. Bei drei von vier superovulierten Färsen wurde hingegen kein oder nur ein einseitiges Spermienreservoir beobachtet, was auf eine Störung des Spermientransports hindeutet. Hawk et al. (1987) stellten bei dem Vergleich von superovulierten und nicht-superovulierten Schafen nach einem Natursprung eine reduzierte Anzahl an Spermien in der Zervix, der Gebärmutter und den Eileitern fest. Drei Stunden nach dem Natursprung war dies insbesondere in der Zervix und 23 Stunden nach dem Natursprung vor allem in den Eileitern auffällig. Zudem wurde eine reduzierte Befruchtungsrate bei den superovulierten Schafen festgestellt, was die Autoren zu der Schlussfolgerung veranlasste, dass die Superovulation den Spermientransport beeinflusst. Die Ergebnisse von Wiley et al. (1982), die bei Untersuchungen an Kühen erzielt wurden, stehen jedoch in Widerspruch zu dieser Aussage. In den Versuchen erfolgte die Besamung von acht superovulierten und fünf nicht-superovulierten Tieren mit je 13 Millionen motilen Spermien. Dreißig Stunden nach Östrusbeginn wurden bei den superovulierten Tieren ein und bei den nicht-superovulierten Tieren beide Eileiter chirurgisch entfernt. Die verschiedenen Segmente des Ovidukts wurden getrennt durchgespült und die Anzahl der Spermien quantifiziert. Weder im Isthmus noch in der Ampulle des Oviduktes unterschieden sich die

Spermienkonzentrationen zwischen den superovulierten und nicht-superovulierten Kühen. Zudem konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Spermienkonzentration im Eileiter und der Befruchtungsrate im verbliebenen Eileiter bei den superovulierten Kühen festgestellt werden (Wiley et al., 1982).

Das Vorhandensein akzessorischer Spermien, die sich an der Zona pellucida einer befruchteten Eizelle anheften, unterscheidet sich deutlich zwischen superovulierten und nicht-superovulierten Tieren. Bei Tieren mit einer einfachen Ovulation wiesen die meisten Embryonen und 80 % der unbefruchteten Eizellen akzessorische Spermien auf. Die durchschnittliche Anzahl akzessorischer Spermien lag zwischen 18 und 42 Spermien pro Embryo bzw. 18 Spermien pro unbefruchteter Eizelle (Sartori et al., 2002). Ähnliche Ergebnisse erlangten Hawk und Tanabe (1986), die nahezu bei allen Embryonen aus nicht stimulierten Kühen akzessorische Spermien nachwiesen. Im Durchschnitt (arithmetisches Mittel) fanden sich 40 Spermien und im Median 20 Spermien pro Embryo von Erstbesamungskühen. DeJarnette et al. (1992) stellten die Hypothese auf, dass die Anzahl akzessorischer Spermien in/an der Zona pellucida der Embryonen bei nicht-superovulierten Tieren positiv mit der Befruchtung und der Embryonenqualität korreliert. Es konnte festgestellt werden, dass unbefruchtete Eizellen die wenigsten akzessorischen Spermien trugen. Der Median an akzessorischen Spermien nahm von Embryonen mit sehr guter Qualität zu Embryonen mit schlechter Qualität ab. Degenerierte Embryonen wiesen mehr akzessorische Spermien auf als unbefruchtete Eizellen, aber weniger als taugliche Embryonen (DeJarnette et al., 1992). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Forschungsergebnissen von Nadir et al. (1993). Die Hypothese kann bei superovulierten Tieren nicht sicher bestätigt werden, da häufig eine nicht ausreichende Menge an akzessorischen Spermien bei den Embryonen festgestellt wird. Embryonen aus superovulierten Tieren weisen signifikant geringere Mengen an akzessorischen Spermien auf als Embryonen aus nicht-superovulierten Tieren. Allerdings weisen zahlreiche Embryonen aus superovulierten Tieren Spuren an der Zona pellucida auf, die auf ein Ansetzen, jedoch dann auf ein vorzeitiges Lösen der akzessorischen Spermien hindeuten (Saacke et al., 1998). Hawk und Tanabe (1986) stellten bei 17 % der Embryonen und Saacke et al. (1998) lediglich bei 10 % der Embryonen und unbefruchteten Eizellen von Kühen nach einer Superovulation akzessorische Spermien fest. Dalton et al. (2000) untersuchten die Anzahl akzessorischer Spermien und deren Spuren an der Zona pellucida in Abhängigkeit zum Besamungszeitpunkt nach einer Superovulation. Die Kühe wurden einmalig mit einer Gesamtspermiedosis von 50 Millionen Spermien entweder 0, 12 oder 24 Stunden nach dem Beginn des Östrus künstlich besamt. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass die Anzahl der akzessorischen Spermien mit zunehmendem Abstand der Besamung zum Östrusbeginn anstiegen. Nach einer Besamung 24 Stunden nach

Östrusbeginn trugen signifikant die meisten Embryonen (41 %) durchschnittlich $2,9 \pm 8,3$ akzessorische Spermien, während an 52 % der Embryonen Spuren akzessorischer Spermien festgestellt wurden. Demgegenüber wurden bei einer Besamung 0 Stunden nach Östrusbeginn lediglich bei 5 % der Embryonen akzessorische Spermien ($\bar{0},07 \pm 0,31$) beobachtet und bei 21 % der Embryonen wurden Spuren davon festgestellt. Bei der Besamung 12 Stunden nach Östrusbeginn trugen 8 % der Embryonen durchschnittlich $0,24 \pm 1,3$ akzessorische Spermien und 31 % der Embryonen Spuren davon.

Die Anzahl der akzessorischen Spermien kann die Anzahl der Spermien widerspiegeln, die um die Befruchtung konkurriert haben. Dies wurde von Nadir et al. (1993) an nicht-superovulierten Tieren dargelegt. Eine Steigerung der Spermindosis von 20 Millionen auf 100 Millionen Gesamtspermien pro Besamung führte sowohl zu einem Anstieg der Anzahl an akzessorischen Spermien im Median (3,0 zu 27,5 pro Embryo/unbefruchteter Eizelle) als auch zu einer Steigerung des Anteils der Embryonen, die akzessorische Spermien tragen (79 % zu 92 %). Hawk et al. (1988) konnten diesen Effekt ebenfalls bei superovulierten Tieren nachweisen. Bei 12 % der befruchteten Embryonen nach einer Superovulation und Besamung mit durchschnittlich 70 Millionen Gesamtspermien wurden akzessorische Spermien beobachtet. Demgegenüber führte eine Besamung mit einer 100-fach höheren Gesamtspermienzahl von im Durchschnitt 4,4 Milliarden Spermien zu 32 % befruchteten Embryonen, die akzessorische Spermien trugen.

2.5.4 Transport der Eizellen und der Embryonen

Der Uteruseintritt der Embryonen erfolgt bei nicht-superovulierten Kühen in der Regel um den dritten oder tendenziell sogar eher den vierten Tag nach der Ovulation (Hamilton & Laing, 1946). In verschiedenen Studien wurde die Verteilung der Embryonen im Ovidukt und im Uterus an verschiedenen Tagen nach der Ovulation an geschlachteten Tieren untersucht. In der Untersuchung von Hafez et al. (1963) an nicht-superovulierten Kühen wurden zwei Tage nach der ersten Ovulation noch alle Embryonen im Ovidukt nachgewiesen. In den nachfolgenden Tagen konnte jedoch eine Zunahme der im Uterus befindlichen Embryonen beobachtet werden. Dabei waren die meisten Embryonen am dritten oder früh am vierten Tag in den Uterus übergetreten. In einer Studie von El-Banna und Hafez (1970) einige Jahre später wurde der Uteruseintritt zwischen superovulierten und nicht-superovulierten Kühen direkt miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die Embryonen oder Eizellen bei superovulierten Kühen innerhalb der ersten 72 h nach der Ovulation weiter kaudal im Ovidukt in Richtung Uterus lagen als bei nicht-superovulierten Tieren. Nach den 72 Stunden wurden in drei untersuchten superovulierten Kühen alle Embryonen im Uterus gefunden. Bei drei nicht-

superovulierten Tieren befanden sich hingegen alle Embryonen noch im Ovidukt. Es sei jedoch angemerkt, dass es sich um einen Versuch mit geringer Stückzahl handelt. In einer späteren Studie von Moore (1975) konnten bei superovulierten Kühen bereits nach 48 Stunden Embryonen oder Oozyten in einem geringen Prozentsatz (15 %) im Uterus nachgewiesen werden. Der Großteil an Embryonen (65 %) trat in dieser Studie zwischen 48 und 72 h in die Uterushornspitze über. Die Ergebnisse dieser Studien deuten darauf hin, dass der Uteruseintritt bei superovulierten im Vergleich zu nicht-superovulierten Tieren beschleunigt erfolgt.

Während der Großteil der Embryonen früher in den Uterus eintritt, kann ein geringer Anteil von ca. 6 % der Embryonen auch nach 10–16 Tagen noch im Ovidukt aufzufinden sein, wodurch eine Ausspülung mittels nicht-chirurgischer Verfahren erschwert wird (Betteridge et al., 1980). Der Einsatz uterusmotilitätsfördernder $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Medikamente 12–16 Stunden vor der Embryonengewinnung fördert die Ausspülrate (Wolgast, 2009).

2.5.5 Frühe Embryogenese im Ovidukt und im Uterus

Ein vorzeitiger Eintritt von Embryonen in den Uterus kann mit potenziellen Schäden für diese einhergehen. Infolge des hohen präovulatorischen Östrogenspiegels kommt es zu einer Asynchronität zwischen Uterus und Embryo, welche eine Anpassung aneinander erschwert. Diese These wurde in Versuchen von Newcomb et al. (1976) experimentell belegt. Am Tag drei nach Östrusbeginn wurden bei 14 superovulierten Kühen unilateral Embryonen aus dem Ovidukt mit einem kleinen Volumen an Kochsalz oder Spülmedium in den Uterus gespült. Anschließend wurden beide Eileiter ligiert. Im Rahmen einer zweiten Spülung wenige Tage später zeigte sich bei den Embryonen aus dem Uterus ein Anteil degenerierter Embryonen von 69,4 %. Demgegenüber belief sich der Anteil degenerierter Embryonen aus dem kontralateralen Ovidukt lediglich auf 18,5 % (Newcomb et al., 1976). Dieses Ergebnis stützt die These, dass ein verfrühter Eintritt von weniger als 72 h alten Embryonen eine schädigende Wirkung auf diese haben kann.

Dies lässt sich durch die unterschiedlichen Bedingungen für den Embryo im Ovidukt und im Uterus erklären. Das Oviduktsekret zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Substraten und Ko-Faktoren aus, zu denen Pyruvat, Hydrogencarbonat, freie Aminosäuren und weitere Stoffe gehören. Diese werden von der oviduktalen Mukosa produziert und ins Lumen abgegeben. Das Oviduktepithel zeigt eine besondere Aktivität in Bereichen, in denen sich ein Embryo befindet (Kölle et al., 2009). Die hormonelle Superstimulation mit multiplen Ovulationen geht mit multiplen Corpora lutea einher. Von Tag vier bis sieben nach den Ovulationen ist bei

superovulierten Kühen im Vergleich zu nicht stimulierten Tieren ein signifikant höherer Progesterongehalt im Blut nachzuweisen (Forde et al., 2012). Eine erhöhte unphysiologische Progesteronkonzentration nimmt grundsätzlich keinen Einfluss auf die Sekretionsrate im Ovidukt, jedoch aber auf die Zusammensetzung des Sekretes. Hugentobler et al. (2010) berichteten bei einem erhöhten zirkulierenden Progesterongehalt im Blut im Vergleich zu physiologischen Werten von gestiegenem Sulfat, aber auch Natrium sowie neun von zwanzig Aminosäuren im Oviduktsekret. Insbesondere die Aminosäure Glycin war in doppelt so hoher Konzentration nachzuweisen (Hugentobler et al., 2010). Die biochemische Zusammensetzung der Oviduktflüssigkeit unterscheidet sich erheblich von der des Uterus. Dies lässt den Schluss zu, dass die Substratzusammensetzung im Ovidukt für die Embryonen in frühen Furchungsstadien von entscheidender Bedeutung ist. Ein frühzeitiger Eintritt der Embryonen in den Uterus, wobei junge Embryonalstadien einem veränderten Milieu ausgesetzt werden, könnte einer der Gründe für die erhöhten Degenerationsraten der Embryonen in der Studie von Newcomb et al. (1976) sein.

In einer Studie aus Kanada 2014 wurde die biochemische Zusammensetzung der Flüssigkeit im Uterus und des Serums von superovulierten Kühen und nicht-superovulierten Tieren an Tag 7 des Zyklus und am Tag der Embryonengewinnung untersucht. Dabei zeigte sich am Tag der Embryonengewinnung bei den Tieren der Superovulationsgruppe im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe ein erhöhter Gehalt an $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Metaboliten sowie ein erniedrigter Glukosegehalt in der uterinen Flüssigkeit. Im Serum waren die Harnstoffgehalte, die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Metaboliten und das Progesteron erhöht (Rasolomboahanginjatovo et al., 2014). Auch in anderen Studien wiesen superovulierte Kühe gegenüber nicht-superovulierten Kühen einen erhöhten Gehalt an $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Metaboliten auf (Dos Santos et al., 2009). Für den erhöhten Gehalt an $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Metaboliten sind verschiedene Gründe zu nennen. Der wahrscheinlichste liegt im erhöhten Progesteronspiegel, der auf die größere Anzahl an Corpora lutea zurückzuführen ist. Ein erhöhter Progesterongehalt hat ein negatives Feedback auf die eigenen Rezeptoren. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Bildung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ aus dem Endometrium (Dos Santos et al., 2009). Erhöhte Werte an $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Metaboliten sind negativ mit der Anzahl transfertauglicher Embryonen korreliert, indem sie einen negativen Effekt auf Entwicklung, Schlupf und Überlebensrate der Embryonen ausüben (Scenna et al., 2004; Schrick et al., 1993). So zeigte sich in der Studie von Scenna et al. (2004) bei der Kultivierung von In-vitro-Embryonen im 16- bis 32-Zellstadium unter erhöhten $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentrationen über einen Zeitraum von vier Tagen eine verringerte Blastozystenrate. In einem weiteren Experiment wurde festgestellt, dass auch In-vivo-Morulae, die nach dem Auftauen für 24 Stunden in Kultivierungsmedien mit erhöhten $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentrationen gegeben wurden, zwar keine

reduzierte Blastozystenrate, jedoch eine reduzierte Schlupfrate aufwiesen (Scenna et al., 2004).

Die erhöhten Werte an Harnstoff im Serum im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe können sich ebenfalls schlecht auf die Embryonen auswirken (Rasolomboahanginjatovo et al., 2014). In Studien, in denen durch die Fütterung ein hoher Harnstoffgehalt im Serum induziert wurde, konnte zunächst kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl, Qualität und Entwicklungsstadien der Embryonen zwischen den Tieren mit hohem Harnstoffgehalt und denen der Kontrollgruppe festgestellt werden. Langfristig zeigte sich jedoch eine verminderte Lebensfähigkeit, da die Embryonen aus den Donoren mit hohem Harnstoffgehalt schlechtere Anwachsrate bei den Rezipienten aufwiesen (Rhoads et al., 2006). In der kanadischen Studie lagen die erhöhten Harnstoffwerte allerdings noch in einem moderaten Bereich, sodass kein Einfluss auf die Anzahl transfertauglicher Embryonen wahrgenommen wurde (Rasolomboahanginjatovo et al., 2014).

Im Rahmen der kanadischen Versuche konnte eine erniedrigte uterine Glukosekonzentration am Tag der Embryonengewinnung bei den Tieren der Superovulations-Gruppe im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese Beobachtung lässt sich vermutlich auf einen erhöhten Glukosestoffwechsel der multiplen Embryonen zurückführen (Rasolomboahanginjatovo et al., 2014). Über eine zu geringe Glukosekonzentration wird in der Literatur nur wenig gesprochen. Insbesondere im Energiestoffwechsel der späten Morulae und Blastozysten spielt Glukose eine wesentliche Rolle. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Glukosemetabolismus signifikant zwischen dem 8- und 16-Zellstadium ansteigt (Rieger et al., 1992). Eine zu hohe Glukosekonzentration kann jedoch auch einen schädigenden Einfluss auf den Embryo ausüben. Dies konnte in In-vitro-Versuchen mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen im Kultivierungsmedium belegt werden, wobei dieser Effekt in den frühen Entwicklungsstadien (Tag 0–3) bereits ab 3 mmol/l Glukose ausgeprägt war, was zu reduzierten Blastozystenraten führte. Bei den älteren Embryonen (Tag 4–8) waren lediglich ab einer Konzentration von 5 mmol/l Glukose schädigende Auswirkungen auf die weitere Entwicklung auszumachen (Matsuyama et al., 1993).

Der bei superovulierten Tieren erhöhte Progesterongehalt nimmt weiterhin Einfluss auf das Transkriptom des Endometriums und dessen Histiotrophe. Eine detaillierte Analyse ergab, dass sich das endometriale Transkriptom superstimulierter Kühe mit supraphysiologischem Progesterongehalt erheblich von dem nicht stimulierter Tiere unterscheidet. Es zeigte sich, dass bei superstimulierten Tieren 795 Gene im Endometrium hoch- und 440 runterreguliert sind. Im Vergleich zu Tieren, die einen erhöhten Progesterongehalt im physiologischen Rahmen nach Behandlung mit intravaginalen Progesteronspiralen aufwiesen, sind dies

zehnmal mehr veränderte Gene (Forde et al., 2012). Ein unphysiologisch erhöhter Progesterongehalt nahm ebenfalls Einfluss auf die Sekretion des Uterusepithels. Die Sekretionsrate war erniedrigt und der Gehalt der Aminosäure Valin war signifikant erhöht (Hugentobler et al., 2010).

Ob ein erhöhter Progesterongehalt einen direkten Einfluss auf frühe Embryonen hat, ist noch nicht eindeutig bestätigt (Lonergan & Sánchez, 2020). Während Larson et al. (2011) in ihren In-vitro-Versuchen keinen Unterschied in der Teilungs- und Blastozystenrate bei Progesteronsupplementation verzeichnen konnten, nahmen Gad et al. (2011) ein signifikant verändertes Transkriptom in Blastozysten aus superstimulierten Tieren wahr. In dieser Studie wurde das Transkriptom zwischen Blastozysten aus superstimulierten Fleckviehkühen, die sich unter supraphysiologischen Progesteronkonzentrationen in den Donoren entwickelten und Blastozysten aus superstimulierten Kühen, die sich ab Tag 2 bei einer physiologischen Progesteronkonzentration in Rezipienten entwickelten, verglichen. Es besteht jedoch Unklarheit darüber, ob es sich um funktionelle oder rein plastische Veränderungen des Transkriptoms handelt. Allerdings ist festzuhalten, dass der Anteil der Embryonen, die sich zu einer Blastozyste weiterentwickelten, bei den superstimulierten Donoren geringer war als bei den nicht stimulierten Rezipienten (Gad et al., 2011).

Eine Studie an Wagyükühen bestätigt, dass Embryonen nach einer Superovulation selbst einen Einfluss auf die Zusammensetzung der uterinen Flüssigkeit ausüben. Alle 21 Wagyükühe der Studie wurden superstimuliert, aber nur 15 Tiere wurden instrumentell besamt. Die Anwesenheit multipler Embryonen führte zu einer signifikanten Veränderung der Proteinzusammensetzung und des Gehalts an exosomaler micro-RNA in der Uterusflüssigkeit an Tag sieben nach der Besamung, welche Einfluss auf die immunologische Interaktion zwischen Embryonen und Uterus nehmen kann (Kusama et al., 2021).

2.6 Einflussfaktoren auf die Anzahl und Qualität von Embryonen nach einer Superovulation

Die Auswirkung von Ernährungsfaktoren wie Futteraufnahme, Energiezufuhr, Eiweißquellen und -gehalt sowie der Zusatz von Fettsäuren, Vitaminen und Mineralien auf die Fertilität ist Bestandteil vieler Untersuchungen. Eine Vielzahl von Übersichtsarbeiten umfassen dieses weite Spektrum und dessen Einfluss auf die Oozyten- und Embryonenqualität (Diskin et al., 2003; D'Occhio et al., 2019; Laven et al., 2007; Leroy et al., 2008; Mikkola et al., 2020; Sartori et al., 2017). Die multifaktoriellen Wechselwirkungen zwischen dem physiologischen und metabolischen Status der Spenderkühe, den Nahrungsbestandteilen der verschiedenen Versuchsdiäten und die unterschiedlichen Studiendesigns machen den Vergleich vieler Studien äußerst komplex. Dadurch besteht häufig Uneinigkeit über den Einfluss der untersuchten Parameter. Im Schrifttum der vorliegenden Arbeit wird daher der Fokus auf nicht-fütterungsrelevante Einflussfaktoren in Bezug auf die verschiedenen Phasen der Oozytenreifung und Embryonalentwicklung gelegt.

2.6.1 Einflussfaktoren zum Zeitpunkt der Follikelentwicklung und der Ovulation

2.6.1.1 Zyklusstadium

Aufgrund empirischer Daten und Praxiserfahrung hat sich in den frühen Zeiten des Embryotransfers der Beginn des Superovulation-Verfahrens in der Mitte des Zyklus an Tag 8 bis 12 während der Lutealphase etabliert (Mikkola et al., 2020). Dies wurde bereits früh durch die Ergebnisse praktischer Studien bestätigt. Dabei zeigte sich, dass ein früherer Beginn der Superovulation vor Tag 8 bei Holsteinfärsen mit einer geringeren Anzahl an Gelbkörpern und befruchteter Embryonen einhergeht (Lindsell et al., 1986). Im Rahmen wissenschaftlicher Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ca. 10 Tage nach der Ovulation mit dem Beginn der zweiten Follikelwelle und somit einem Aufkommen rekrutierbarer Follikel zu rechnen ist (Ginther et al., 1989). Es konnte nachgewiesen werden, dass der Follikelstatus im Ovar einen relevanten Einfluss auf den Erfolg der Superovulation nimmt. Die Ansprechbarkeit des Ovars auf FSH und LH variiert in Abhängigkeit von dem Stand der Follikelwelle. FSH unterliegt einem negativen Feedback von Östradiol und Inhibin. Ein erhöhter FSH-Spiegel initiiert und fördert das Wachstum der Follikel, welche daraufhin beginnen, Östradiol zu produzieren. In der Konsequenz wird der zirkulierende FSH-Spiegel wieder gesenkt, was eine weitere Rekrutierung von Follikeln verhindert (Adams, 1994, 1999; Mapletoft et al., 2002). Folglich wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Beginn des SOP bestenfalls vor der Selektion eines dominanten Follikels erfolgen sollte. Liegt bereits ein dominanter Follikel vor, ist die Rekrutierung bereits abgeschlossen und der dominante Follikel weist eine LH-Präferenz auf

(Mapletoft et al., 2002). Diese These konnte im Jahr 1993 in zwei verschiedenen Studien belegt werden. In der Studie von Adams et al. (1993) wurden nullipare Holsteinfärsen in zwei Gruppen aufgeteilt und mit rekombinantem bovinem FSH über einen Zeitraum von vier Tagen stimuliert. Die Stimulation erfolgte in der ersten Follikelwelle nach der Ovulation, sodass bei Tieren der Gruppe 1 einen Tag nach der Ovulation, also vor einer Selektion eines dominanten Follikels, die Hormonbehandlung initiiert wurde. Bei Färsen der Gruppe 2 wurde hingegen ab Tag fünf post ovulationem das Superovulationsprogramm initiiert, folglich nach der Selektion des dominanten Follikels der ersten Follikelwelle. Die Ergebnisse zeigen, dass die Tiere der Gruppe 1 signifikant mehr Ovulationen aufwiesen als die der Gruppe 2 (Adams et al., 1993). Nasser et al. (1993) wählten in ihrer Studie noch engere Zeitabstände und untersuchten eine höhere Anzahl an Tieren pro Gruppe. Nullipare Mastfärsen sind mit Folltropin® (Vetoquinol, pFSH) über 5 Tage hinweg superstimuliert worden. Die Tiere wurden in 4 Gruppen eingeteilt und an den Tagen -1, 0, +1, und +2, wobei die Ovulation an Tag 0 stattfand, gestartet. Aus Gründen der Einfachheit erfolgte in diesem Studiendesign die Superovulation mit der ersten Follikelwelle. Die Hypothese, dass eine exogene FSH-Behandlung parallel zum natürlichen FSH-Anstieg einen Tag vor der beginnenden Follikelwelle einen positiven Effekt auf das Superovulationsergebnis hat, konnte bestätigt werden. Die Färsen der Gruppe 0 wiesen signifikant mehr Gelbkörper ($18,4 \pm 3,4$) auf als die der Gruppen -1 ($9,5 \pm 2,3$), +1 ($6,7 \pm 2,2$) und +2 ($6,5 \pm 2,3$). Dabei zeigte sich, dass bei den Tieren der Gruppe -1 immer noch tendenziell mehr Gelbkörper beobachtet werden konnten als bei Kühen der beiden späteren Gruppen. Auch am letzten Tag der Stimulation wiesen die Färsen der Gruppen -1 und 0 signifikant mehr Follikel ≥ 7 mm auf als die der Gruppen +1 und +2 (Nasser et al., 1993).

Mit diesem Wissen sind lediglich 20 % des Zyklus, also ca. 4–5 Tage, optimal, um ein SOP zu starten, die restlichen 80 % des Zyklus sind als unvorteilhaft hinsichtlich des Spülerfolges zu sehen (Mapletoft et al., 2002). Aufgrund dessen haben sich Vorsynchronisationsprogramme jeglicher Art mit verschiedenen Kombinationen an Behandlungen mit Östradiol, intravaginalen oder lokalen Progesteronimplantaten, systemischen Progesterongaben, GnRH- und LH-Präparaten etabliert (Mapletoft & Bó, 2013). Die Ergebnisse der Studien schwanken zwischen keinem Unterschied und einem positiven Einfluss einer Vorsynchronisation. Es ist zu beachten, dass nicht für alle Protokolle Präparate in der EU zugelassen und verfügbar sind.

Die wohl praktikabelste Variante ohne zusätzliche Hormonverabreichung der Vorsynchronisation stellt die Ablation des dominanten Follikels dar, weshalb in dieser Ausarbeitung nur auf diese Variante näher eingegangen wird. Die Ergebnisse diverser Studien, in denen FSH- oder eCG-Präparate zur Stimulation von Milchkühen eingesetzt wurden, legen nahe, dass die Anzahl der Corpora lutea und die Anzahl transfertauglicher

Embryonen bei Vorhandensein eines dominanten Follikels zum Zeitpunkt des Beginns der Superstimulation signifikant geringer ist (Bungartz & Niemann, 1994; Guilbault et al., 1991; Huhtinen et al., 1992). Dies spricht für die Indikation zur Entfernung des dominanten Follikels. Für die Ablation wird transvaginal der dominante Follikel punktiert oder kauterisiert. In der Folge kommt es zu einem Anstieg der FSH-Konzentration nach einem Tag, sodass ein bis zwei Tage nach der Behandlung eine neue Follikelwelle initiiert wird (Adams et al., 1992; Bergfelt et al., 1994). Der Erfolg einer Ablation wird kontrovers diskutiert (siehe Tab. 2).

Tab. 2 Ergebnisse verschiedener Studien über den Erfolg einer Ablation eines dominanten Follikels jeweils 2 Tage vor dem Superovulationsprogramm mit FSH-Präparaten;
FSH = Follikelstimulierendes Hormon

Veröffentlichung	Donoren	Ergebnisse nach Ablation des dominanten Follikels im Vergleich zu keiner Ablation
Bungartz und Niemann (1994)	Milchkühe N = 38	↑ Anzahl Corpora lutea ↑ Anzahl gesamt gewonnener Embryonen + Oozyten ↑ Anzahl transfertauglicher Embryonen Ergebnisse vergleichbar zu denen nach einer Superovulationen ohne dominanten Follikel
Shaw und Good (2000)	Kühe (Milch- und Fleischrasse) N = 1385	↓ Anzahl gesamt gewonnener Embryonen + Oozyten <i>Kein</i> Unterschied in der Anzahl transfertauglicher Embryonen
Kim et al. (2001)	Milchkühe N = 26	↑ Anzahl Corpora lutea ↑ Progesteronkonzentration ↑ Anzahl gesamt gewonnener Embryonen + Oozyten ↑ Anzahl transfertauglicher Embryonen
Diaz et al. (2001)	Milchkühe N = 11	<i>Kein</i> Unterschied in: Anzahl Corpora lutea, Anzahl und Rate gesamt gewonnener Embryonen + Oozyten, transfertauglicher Embryonen

In dem Datenpool von Shaw und Good (2000) wurden 87 Tiere mit vier oder mehr Superovulationen, davon je mindestens zwei mit und ohne Ablation des dominanten Follikels, beobachtet. Auch auf Kuh-individueller Ebene konnte keine signifikante Verbesserung der Anzahl transfertauglicher Embryonen zwischen den beiden Behandlungen festgestellt werden.

Schlussendlich lässt sich festhalten, dass, auch wenn einige Studien höhere Ovulationsraten und/oder höhere Anzahlen an transfertauglichen Embryonen nachgewiesen haben, wenn der SOP-Beginn exakt auf eine beginnende Follikelwelle terminiert wird, sich in der Praxis keine Unterschiede in den verschiedenen Protokollen insbesondere hinsichtlich der hormonellen Vorsynchronisationsprogramme zeigen. Tiere, die in der Praxis zwischen Tag 8 und 12 des Zyklus gestartet werden, zeigen vergleichbare Ergebnisse wie Tiere mit Vorsynchronisation der Follikelwelle (Mikkola et al., 2020). Es lässt sich lediglich sicher feststellen, dass der Vorteil

eines vorangehenden Synchronisationsprogramms darin liegt, dass zu jedem Zeitpunkt im Zyklus das SOP begonnen werden kann (Mapletoft et al., 2002).

Es können keine Unterschiede im Erfolg der Superovulation in Abhängigkeit, ob die erste oder die zweite Follikelwelle genutzt wird, festgestellt werden. In einer 1994 durchgeführten Studie wurden die Superovulation bei Mastfärsen entweder zu Beginn der ersten Follikelwelle (ca. Tag 0, Tag der Ovulation) oder zu Beginn der zweiten Follikelwelle (ca. Tag 9 post ovulationem) mittels Folltropin® initiiert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl an Ovulationen ($6,6 \pm 1,0$ vs. $8,2 \pm 1,7$), der gesamt gewonnenen Eizellen und Embryonen ($5,2 \pm 0,7$ vs. $5,1 \pm 0,8$) sowie der Anzahl an befruchteten Embryonen ($2,8 \pm 0,6$ vs. $3,0 \pm 0,6$; Adams et al., 1994).

2.6.1.2 Superovulationsprogramme (SOP)

2.6.1.2.1 Equines Choriongonadotropin (eCG) und kombinierte Anwendungen

In der Frühphase des Embryotransfers erfolgte die Superstimulation hauptsächlich unter Verwendung von eCG bzw. PMSG. Bei eCG handelt es sich um ein Glykoprotein, welches während der Trächtigkeit von Stuten in den Endometrial Cups der Plazenta produziert wird. In etwa ab dem 35. Trächtigkeitstag ist eCG im Serum der Stuten nachweisbar, seine höchste Konzentration erreicht es um den 60. Trächtigkeitstag und ab Tag 130 liegt die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze. Aufgrund der FSH- und LH-Wirkung führt es physiologisch bei der Stute zur Luteinisierung von Follikeln während der Trächtigkeit, wodurch akzessorische Gelbkörper entstehen, die zusätzliches Progesteron produzieren (Allen, 1969; Murphy & Martinuk, 1991). Als extrahypophysäres Gonadotropin wird es zur Superstimulation bei Kühen genutzt. Die empfohlene Dosis für die Superovulationsbehandlung variiert zwischen 1500 IE und 3000 IE, wobei in der Regel 2500 IE intramuskulär verabreicht werden, kombiniert mit der Gabe eines Prostaglandins 48 Stunden später (Jahnke & Youngs, 2021). Mit höheren Dosen bis zu 5000 IE werden zwar noch mehr Follikel stimuliert, jedoch ist bei diesen hohen Dosen eine vermehrte Bildung von hämorrhagischen und luteinisierten Follikeln zu beobachten. Bereits ein bis zwei Tage nach der Injektion von eCG lässt sich bei rektaler Kontrolle ein Follikelwachstum feststellen (Hafez et al., 1963). ECG zeichnet sich durch eine lange Halbwertszeit von bis zu 120 h aus, wodurch es auch nach 10 Tagen noch im Blut der behandelten Kühe messbar ist (Schams et al., 1978). Aufgrund der langen Halbwertszeit wird der Einsatz von eCG kontrovers diskutiert. Die lange Halbwertszeit führt in einigen Fällen zu einer Verlängerung der ovariellen Stimulation über die Ovulationen hinaus. In der Konsequenz kommt es zu einer Zunahme nicht ovulierter Follikel und zu einer zweiten Follikelwelle nach den Ovulationen, die mit einem hohen Östrogenspiegel einhergeht (Bevers & Dieleman, 1987;

Boland et al., 1991). Ein erhöhter Östrogenspiegel kann, wie in Kapitel 2.5.1. beschrieben, nachteilige Auswirkungen auf die Oozytenmaturation und folglich die Embryonalentwicklung haben.

Um der verlängerten Wirkung von eCG entgegenzuwirken, etablierte sich die Anwendung von Anti-eCG in wissenschaftlichen Studien. Bei Anti-eCG handelt es sich um monoklonale Antikörper, die innerhalb weniger Stunden nach Behandlung zu einer Senkung der eCG-Konzentration führen (Dieleman & Bevers, 1987). Die Anwendung von Anti-eCG wird ebenso kontrovers diskutiert. In der Studie von Dieleman und Bevers (1987) wurden Färsen einer Milchrasse mit 2500 IE eCG in Kombination mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ 48 Stunden später zur Superstimulation behandelt. Anschließend erfolgte eine intravenöse Verabreichung von Anti-eCG vier bis acht Stunden nach dem maximalen LH-Peak. Bereits zwei Stunden nach der Anti-eCG-Gabe war kein eCG mehr im Blut messbar, wodurch die eCG-Wirkung während der finalen Oozytenmaturation beendet wurde. Dies führte zu einer synchronen Maturation der Eizellen, einer kürzeren Ovulationsspanne und signifikant mehr Ovulationen. Auch in einer Studie an einer belgischen Zweinutzungsrinderrasse von Bouters et al. (1983) konnte durch die kombinierte Behandlung mit einem eCG-Schaf-Antiserum zwölf Stunden nach Brunstbeginn, also sechzig Stunden nach der Behandlung mit $\text{PGF}_{2\alpha}$, eine Verbesserung der Ergebnisse beobachtet werden. Ein rascher Abfall der Östrogenwerte wurde beobachtet, was sich positiv auf den Gametentransport, die Befruchtungsrate und die Anzahl gewonnener Embryonen auswirkte. Des Weiteren konnte eine signifikante Verkürzung der Brunstdauer beobachtet werden. Das Verhältnis von ovulierten zu nicht ovulierten Follikeln stieg von 1:1 bei den Tieren der Kontrollgruppe, die nur mit eCG behandelt wurden, auf 6:1 bei den Tieren der Anti-eCG-Gruppe. Bouters et al. (1983) identifizierten einen optimalen Zeitpunkt der Antiserumgabe bei 24 Stunden nach dem ersten Östrogenanstieg, was 12 Stunden nach dem Brunstbeginn oder 60 Stunden nach der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe entsprach. Eine frühere Gabe des Antiserums führte zu einer signifikanten Verschlechterung der Ovulationsrate.

Dies demonstriert die Relevanz einer präzisen zeitlichen Abstimmung der Anti-eCG-Gabe. Eine zu frühe Injektion, eventuell sogar vor dem LH-Peak, kann zum Ausbleiben der Ovulationen führen. Dieleman et al. (1993) wiesen deutlich darauf hin, dass eine Behandlung mit Anti-eCG ausschließlich in einem festen zeitlichen Abstand zur Prostaglandinbehandlung zu schwankenden Ergebnissen führt. Dies ist auf eine zeitliche Variation des LH-Anstieges zwischen Kühen und Färsen sowie auf eine tierindividuelle Schwankungsbreite zurückzuführen. Auch eine Behandlung unter Berücksichtigung des Brunstbeginns kann eine hohe Variabilität aufweisen, da sowohl die Häufigkeit der Brunstbeobachtung als auch die Definition des Brunstbeginns durch den Beobachter einen erheblichen Einfluss nehmen. So zeigte sich in einer Studie von Goulding et al. (1996), die mehrere Versuche an Kühen der

Fleischrassen Charolais und Simmental umfasste, keine verbesserte Embryonengewinnung und -qualität durch eine Anti-eCG Behandlung. Die Tiere wurden dabei in drei Versuchsgruppen (pFSH vs. eCG vs. eCG + Anti-eCG) aufgeteilt. Zeitgleich zu der ersten Besamung, welche acht bis zwölf Stunden nach detektiertem Brunstbeginn erfolgte, wurde den Kühen der Versuchsgruppe 3 das Anti-eCG verabreicht. Die Kernaussage dieser Studie ist, dass im ersten Versuch der Studie die Tiere der eCG-Gruppe signifikant mehr große Follikel (≥ 10 mm), mehr Gelbkörper und somit Ovulationen aufwiesen als die der beiden anderen Versuchsgruppen. Bei den Kühen der eCG-Gruppe konnte ebenfalls eine größere Anzahl insgesamt gewonnener Embryonen beobachtet werden. Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen der Anzahl gewonnener Embryonen und deren Qualität festgestellt werden. Hinsichtlich tiefgefriertauglicher Embryonen der Qualität 1 und 2 unterschieden sich die Tiere der drei Versuchsgruppen nicht. Die Kühe der eCG-Gruppe wiesen tendenziell mehr degenerierte Embryonen und signifikant mehr unbefruchtete Eizellen auf. In einem zweiten Versuch mit gleichem Versuchsaufbau konnten die besseren Ergebnisse der Tiere der eCG-Gruppe jedoch nicht reproduziert werden. Somit lässt sich festhalten, dass in keinem der beiden Versuche ein Vorteil einer Anti-eCG-Behandlung belegt werden konnte (Goulding et al., 1996), was vermutlich auf eine zu frühe Behandlung mit dem Anti-eCG zurückzuführen war. Dieleman et al. (1993) sprechen daher eindeutig davon, dass lediglich eine Anti-eCG-Gabe in zeitlicher Abstimmung mit dem LH-Peak erhebliche Erfolge aufweise. In Studien an Milchkühen, in denen das Anti-eCG acht Stunden nach dem LH-Peak intravenös appliziert wurde, wiesen die Tiere mit Anti-eCG-Behandlung signifikant mehr transfertaugliche Embryonen (9,1) auf als Kühe mit reiner eCG- (5,3) oder pFSH-Behandlung (4,6). Des Weiteren wurde eine geringere Anzahl an Follikelzysten bei den Tieren der Anti-eCG- und pFSH-Gruppe beobachtet (Dieleman et al., 1989).

Schlussendlich kann festgehalten werden, dass zwei Faktoren die Wirkung von Anti-eCG maßgeblich beeinflussen. Diesbezüglich sind zunächst das exakte Timing hinsichtlich des LH-Peaks sowie die ursprüngliche Reaktion des Tieres auf die eCG-Stimulation von entscheidender Bedeutung. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass die praktische Anwendung einer LH-Wert-Messung in kurzen Abständen nicht möglich ist. Folglich müsste eine Anti-eCG-Behandlung mit intravaginalen Progesteronimplantaten und einer GnRH induzierten Ovulation zeitlich abgestimmt werden (Dieleman et al., 1993).

In diesem Kontext sei darauf hingewiesen, dass die Produktion von eCG derzeit ein kontrovers diskutiertes Thema ist. Tierschutzorganisationen weisen in diesem Zusammenhang auf die teilweise mangelhaften Zustände und Behandlungen der tragenden Stuten in einigen Ländern hin. ECG wird u. a. in den Ländern Uruguay, Argentinien und Island gewonnen. Es bestehen Bedenken bezüglich des Tierwohls (engl. *animal welfare*), die insbesondere im

Zusammenhang mit zu häufigen oder zu großvolumigen Blutentnahmen bestehen. Zudem wird kritisiert, dass die Tiere nicht artgerecht gehalten und Aborte für eine erneute Nutzung eingeleitet werden (Manteca Vilanova et al., 2019). Zum aktuellen Zeitpunkt (Stand: April 2026) sind zwei Präparate für Rinder mit eCG als Wirkstoff in Deutschland zugelassen: Intergonan® (240 IE/ml; Intervet Deutschland GmbH / MSD Tiergesundheit) und Pregmagon® (200 IE/ml; CEVA Tiergesundheit GmbH). Derzeit ist jedoch nur Pregmagon® verfügbar.

2.6.1.2.2 Protokolle auf Basis von Follikelstimulierendem Hormon (FSH) und Luteinisierendem Hormon (LH)

In der modernen Reproduktionsmedizin finden derzeit vornehmlich Superovulationsprotokolle Anwendung, bei denen FSH zur Stimulation zum Einsatz kommt. Dieses wird aus der Hypophyse von Schweinen oder Schafen gewonnen. Mit der Entwicklung von FSH-Produkten in den 1970er Jahren etablierte sich diese Behandlung und verdrängte die eCG-Anwendungen (Bó & Mapletoft, 2014; Mikkola & Taponen, 2017a). In verschiedenen Studien zeigte sich, dass FSH-Protokolle gleiche oder sogar bessere Ergebnisse hinsichtlich der ovariellen Reaktion als eCG-Protokolle erzielten (Boland et al., 1991; Callesen et al., 1987; Monniaux et al., 1983). In anderen Untersuchungen zeigte sich ebenfalls eine bessere Ovulationsrate, welche sich durch eine höhere Anzahl an Gelbkörpern, mehr gesamt gewonnene Embryonen und Eizellen, mehr tiefgefriertaugliche Embryonen (Qualität 1 & 2) und teilweise auch mehr Trächtigkeiten nach Transfer darstellte (Elsden et al., 1978; Goulding et al., 1996; Monniaux et al., 1983). Die lange Halbwertszeit (HWZ) und die hohe LH-Aktivität von eCG resultieren in einer prolongierten Stimulation der Ovarien, abweichenden endokrinen Profilen, nicht ovulierten Follikeln sowie einer Beeinträchtigung der Embryonenqualität (Dieleman et al., 1993; Jensen et al., 1982; Moor et al., 1984). Diese Nachteile führten zur Verwendung von FSH als Standardmethode für die Superovulation bei Rindern (Mikkola & Taponen, 2017a). Die HWZ von FSH beträgt lediglich fünf Stunden oder weniger (Laster, 1972). Aufgrund dessen hat sich standardmäßig eine zweimal tägliche Behandlung über vier bis fünf Tage in absteigender Dosis etabliert (Chupin & Procureur, 1983; Looney et al., 1981). Diese wird von einer PGF_{2α}-Injektion 48–72 Stunden nach dem Beginn des SOP zur Auslösung der Luteolyse mit anschließendem Östrus 36–48 Stunden später begleitet (Jahnke & Youngs, 2021).

2.6.1.2.2.1 Behandlungsschemata

Die zweimal tägliche Injektion bedingt eine häufige Betreuung durch das Betriebspersonal und erhöht die Wahrscheinlichkeit von Compliance-Fehlern. Des Weiteren könnten zweimal

tägliche Behandlungen bei den Donoren unangemessenen Stress verursachen, was zu einer verringerten superovulatorischen Reaktion und/oder einem veränderten präovulatorischen LH-Anstieg führt (Mapletoft & Bó, 2013; Stoebel & Moberg, 1982). Es ist zu erwarten, dass vereinfachte Protokolle die Handhabung der Spenderinnen reduzieren und die Reaktion verbessern, insbesondere bei weniger kooperativen Tieren. In diesem Zusammenhang wurden diverse Studien zu alternativen Anwendungen von FSH-Produkten vornehmlich an Kühen aus Fleischrassen mit unterschiedlichen Ergebnissen durchgeführt. Chupin und Procureur (1983) zeigten in ihren frühen Versuchen, dass eine einmal tägliche Behandlung oder eine Behandlung alle 48 Stunden intramuskulär signifikant schlechtere Ergebnisse hinsichtlich der Anzahl an Ovulationen und Embryonen bedingt als die Standardbehandlung. Hingegen führte eine drei Mal tägliche Behandlung zu keiner weiteren Verbesserung der Ergebnisse. Ähnliche Ergebnisse erlangten Kelly et al. (1997) in ihren Studien an Rindern von Fleischrassen, wobei eine einmalige subkutane Gabe von Folltropin® oder Pluset® (Calier, 500 IE/500 IE, pFSH/pLH) mit zweimal täglichen Injektionen intramuskulär über vier bis fünf Tage mit Folltropin® oder Pluset® verglichen wurden. Eine einmalige Gabe zeigte hierbei einen superovulatorischen Erfolg, jedoch führten die Behandlungsschemata mit multiplen Injektionen bei beiden Präparaten zu signifikant mehr tauglichen Embryonen und einer besseren Rückgewinnungsrate der Embryonen. Hingegen zeigten sich in einigen anderen Studien andere Ergebnisse. In der Studie von Purwantara et al. (1994a) wurden zyklische Färsen aus gemischten Rassen entweder drei Tage einmal täglich oder vier Tage zweimal täglich intramuskulär mit pFSH superovuliert. Dabei wurde insgesamt die gleiche Menge von 35 mg pFSH verwendet. Hinsichtlich der Anzahl der Corpora lutea, der gesamt gewonnenen Embryonen und Eizellen sowie der transfertauglichen Embryonen konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Die Versuche von Kanitz et al. (2002) an Simmentalkühen unterstützen diese Ergebnisse. Auch Versuche, welche eine einmalige subkutane Behandlung mit multiplen intramuskulären Injektionen mit pFSH bei Fleckviehkühen (Schallenberger et al., 1994) oder Kühen aus Fleischrassen mit einem Body Condition Score (BCS) > 3 (Bó et al., 1994) verglichen, wiesen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der ovariellen Reaktion und der gewonnenen Embryonen auf. Allerdings konnten vergleichbare Ergebnisse bei Milchkühen bisher nicht nachgewiesen werden, da das subkutane Fettgewebe, welches als Speicher für das FSH dient, bei diesen Tieren weniger ausgeprägt ist.

Um den Einfluss des tierindividuellen Fettgewebes zu umgehen, wurde in den 2010er Jahren die Anwendung von pFSH in einer Lösung auf Hyaluronsäurebasis als Slow-Release-Treatment erforscht. Im Gegensatz zu den Tieren der Kontrollgruppe, bei denen das FSH-Präparat in 0,9 %iger Kochsalzlösung (NaCl-Lsg.) gelöst wird, erfolgt die Lösung in diesem Fall in einer hyaluronsäurehaltigen Flüssigkeit (siehe Tab. 3).

Tab. 3 Ergebnisse verschiedener Studien zum Einsatz von pFSH-Präparaten aufgelöst in einer Hyaluronsäurelösung; pFSH = porcines follikelstimulierendes Hormon; *i. m. (intramuskulär); **s. c. (subkutan)

Veröffent-lichung	Donoren	Gonado-tropin	Versuchsaufbau	Ergebnisse der Embryonengewinnung
Tribulo et al. (2011)	Fleischras-sekühe N = 12	Folltropin®	Kontrolle: 2x tgl. pFSH gelöst in NaCl-Lsg. A) & B) gelöst in Hyaluronsäurelsg. (20 mg/ml) A) 1x i. m.* B) 1x s. c.**	A) intermediäre (nicht signifikante) Ergebnisse zwischen Kontr. und B B) ↓↓ Anzahl der gesamt gewonnenen Embryonen + Oozyten ↓↓ Anzahl der befruchteten und transfertauglichen Embryonen
	Anguskühe N = 40	Folltropin®	1x i. m.* pFSH gelöst in Hyaluronsäurelsg. A) 20 mg /ml B) 10 mg/ml	B) zu A) ↓ Anzahl der gesamt gewonnenen Embryonen + Oozyten ↓ Anzahl der befruchteten und transfertauglichen Embryonen 40 % der Kühe produzierten keine transfertauglichen Embryonen
	Anguskühe N = 58	Folltropin®	Kontrolle: 2x tgl. pFSH gelöst in NaCl-Lsg. A) 1x i. m.* gelöst in Hyaluronsäurelsg. (20 mg/ml)	Keine Unterschiede hinsichtlich: Anzahl der Gelbkörper Anzahl der gesamt gewonnenen Embryonen + Oozyten Anzahl der befruchteten und transfertauglichen Embryonen
Tribulo et al. (2012)	Fleischras-sekühe N = 26	Folltropin®	Kontrolle: 2x tgl. pFSH gelöst in NaCl-Lsg. A) 2x i. m.* Abstand 48 h gelöst in Hyaluronsäurelsg. (10 mg/ml)	Keine Unterschiede hinsichtlich: Anzahl der Gelbkörper Anzahl der gesamt gewonnenen Embryonen + Oozyten Anzahl der befruchteten und transfertauglichen Embryonen
	Fleischras-sekühe N = 29	Folltropin®	Kontrolle: 2x tgl. pFSH gelöst in NaCl-Lsg. A) & B) gelöst in Hyaluronsäurelsg. A) 10 mg/ml B) 5 mg/ml 2x i. m.* Abstand 48 h	A) & B) ↑ Anzahl der Gelbkörper ↑ Anzahl der gesamt gewonnenen Embryonen + Oozyten Keine Unterschiede hinsichtlich: Anzahl der befruchteten und transfertauglichen Embryonen
Biancucci et al. (2016)	Fleischras-serinder N = 32	Pluset®	Kontrolle: 2x tgl. pFSH gelöst in NaCl-Lsg. A) 2x i. m.* Abstand 48 h gelöst in Hyaluronsäurelsg. (5 mg/ml)	A) ↑ Anzahl der Gelbkörper ↑ Anzahl der gesamt gewonnenen Embryonen + Oozyten ↑ Anzahl der transfer- und tiefgefrier-tauglichen Embryonen

In der Studie von Biancucci et al. (2016) wurde ebenfalls der Kortisolwert als Marker für die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, welche u. a. die Stressreaktion beeinflusst, im Haar gemessen. Hierbei konnten bei den Tieren der Kontrollgruppe mit zweimal täglicher Behandlung signifikant höhere Werte festgestellt werden. Dies bestätigt, dass ein Superovulationsprogramm mit weniger Behandlungen aufgrund eines Slow-Release-Treatments mittels Lösungen auf Hyaluronsäurebasis gleiche oder sogar bessere Ergebnisse bei Tieren von Fleischerassen hervorbringt und zusätzlich durch das reduzierte Handling das Stresslevel der Donoren gesenkt wird. Ein ähnlicher Versuchsaufbau ist bei Milchkühen bisher nicht bekannt. Es wäre von Interesse, zu untersuchen, ob Milchkühe, die durch das zweimal tägliche Melken an Behandlungen gewöhnt sind, ebenfalls erhöhte Kortisolwerte bei den Injektionen während der Superovulation aufweisen. Eine Studie von Koenneker et al. (2023) untersuchte die Entwicklung der Kortisolkonzentration im Blut bei unterschiedlichen Stimuli bei Milchkühen. Eine instrumentelle Besamung, eine tierärztliche Untersuchung sowie ein transrektaler Ultraschall führten zu keinen signifikant erhöhten Kortisolwerten im Blut. Hingegen führten ein Embryotransfer, das morgendliche und abendliche Melken sowie eine Klauenbehandlung und ein Natursprung zu signifikant erhöhten Kortisolwerten. Nach dem Embryotransfer und den Melkungen kam es jedoch auch zu einem signifikanten und rapiden Abfall der Konzentration in den ersten 20 Minuten. Die höchste Kortisolproduktion wurde durch eine Klauenkorrektur und den Natursprung verursacht und sank auch innerhalb von 40 Minuten nicht signifikant ab.

Demgegenüber stehen Studien, die eine längere Behandlung mit FSH-Präparaten in Betracht ziehen, um kleineren Follikeln ausreichend Zeit zum Wachsen zu geben, um eine größere Follikelkohorte zu rekrutieren (Mapletoft et al., 2002). Im Rahmen einer Studie wurde die Hypothese, dass eine verlängerte Exposition wachsender Follikel gegenüber FSH zu einer verbesserten superstimulatorischen Reaktion führt, an Kühen aus Fleischerassen überprüft, die entweder vier oder sieben Tage zweimal täglich mit insgesamt 400 mg pFSH Folltropin® superovuliert wurden. Die Tiere wurden nach Ablation des dominanten Follikels während der Superovulation mit einer intravaginalen Progesteronspange (PRID® delta, 1,55 g) behandelt. Zusätzlich erhielten sie 25 mg pLH 24 Stunden nach der Entfernung der PRID®. Die ovarielle Reaktion unterschied sich zwischen den Tieren der beiden Gruppen nicht. Sowohl die Tiere der Gruppe mit kurzer als auch die der Gruppe mit langer Stimulation wiesen zum Zeitpunkt der ersten Besamung eine gleich hohe Anzahl an Follikeln mittlerer Größe (6–8 mm) sowie an großen Follikeln (> 9 mm) auf. Jedoch konnte bei den Tieren mit längerer Stimulation eine höhere Anzahl an Ovulationen innerhalb von 12–32 Stunden nach pLH-Gabe sowie insgesamt eine höhere Anzahl an Gelbkörpern beobachtet werden. Dies lässt auf eine höhere Synchronität im Timing der Ovulationen schließen. In Bezug auf die Embryonen konnten keine

signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Bei einer Betrachtung der Daten ohne Berücksichtigung von zwei Kühen der 7-Tage-Gruppe, welche als einzige keine Embryonen hervorbrachten, zeigte sich, dass die Tiere der Gruppe mit längerer Stimulation signifikant mehr befruchtete Eizellen und zumindest tendenziell mehr transfer- und tiefgefriertaugliche Embryonen aufwiesen. In der Rate an transfer- und tiefgefriertauglichen Embryonen der insgesamt gewonnenen Embryonen zeigten sich zwischen den Kühen der beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Dies wurde von den Autoren als Beweis dafür angeführt, dass befürchtete adverse Effekte auf die Oozytenqualität durch eine längere Stimulation nicht begründet seien (García Guerra et al., 2012). Diese Aussage wurde durch ähnliche Ergebnisse bei einer sechstägigen Stimulation bei Kühen aus Fleischrassen von Bó et al. (2008) unterstützt.

2.6.1.2.2.2 Präparate

Das Angebot und die Verfügbarkeit von hypophysären FSH-Produkten ist begrenzt und variiert. Häufig sind in den meisten europäischen Ländern nur einzelne Produkte zugelassen. Auf dem europäischen Markt wurden in den vergangenen Jahren vornehmlich zwei kommerzielle Präparate genutzt, die beide aus der Schweinehypophyse gewonnen werden. Hierbei handelt es sich um das Folltropin® und das Pluset®. Allerdings ist aktuell (Stand April 2026) lediglich das Pluset® sowohl zugelassen (dezentrale EU-Zulassung) als auch käuflich in Deutschland zu erwerben. Folltropin® ist in der EU zwar dezentral zugelassen, ist jedoch nicht verfügbar. Die beiden Präparate unterscheiden sich in ihrer FSH-LH-Ratio. Eine Packung Folltropin® enthält 700 IE pFSH bei einer Ratio von 1:0,12, wobei Pluset® mit 500 Internationale Einheiten (IE) pFSH und 500 IE pLH eine Ratio von 1:1 aufweist. In diesem Zusammenhang ist daher von großem Interesse, ob die beiden Produkte sich in ihrer Wirkung sowie der Ausbeute an Embryonen unterscheiden. Im Rahmen einer groß angelegten retrospektiven Studie von Mikkola und Taponen (2017a) wurden die Daten von insgesamt 3990 Milchkühen und -färsen der Rassen Holstein und Ayrshire über einen Zeitraum von 16 Jahren diesbezüglich ausgewertet. Alle Tiere wurden insgesamt achtmal über einen Zeitraum von vier Tagen mit einem der beiden Präparate Folltropin® oder Pluset® behandelt, wobei die Behandlung jeweils alle zwölf Stunden, beginnend zwischen dem achten und zwölften Tag des Zyklus, erfolgte. Kühe erhielten dabei in absteigender Dosis insgesamt 630 IE pFSH (Folltropin®) bzw. 850 IE pFSH (Pluset®), während Färsen insgesamt 420-490 IE pFSH (Folltropin®) bzw. 500-600 IE pFSH (Pluset®) zur Superovulation erhielten. Die Tiere der Plusetgruppe wiesen signifikant 1,1 mehr insgesamt gewonnene Embryonen und Eizellen pro Spülung auf als die der Folltropingruppe (Plusetgruppe: 11,9 und Folltropingruppe: 10,8).

Allerdings belief sich dies lediglich auf signifikant mehr unbefruchtete Eizellen. Die mittlere Anzahl an transfertauglichen Embryonen pro Spülung (Plusetgruppe: 7,1 und Follitropingruppe: 7,0), der Entwicklungsstatus und die Aufteilung der Embryonen in Qualitäten 1–3 wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Ebenso zeigten sich hinsichtlich der Anzahl der Donoren, die lediglich eine geringe Reaktion auf die Stimulation aufwiesen, keine relevanten Differenzen zwischen den beiden Gruppen (Mikkola & Taponen, 2017a). Die Resultate dieser Studie bestätigen die 20 Jahre zuvor gewonnenen Erkenntnisse von Kelly et al. (1997) bezüglich der Vergleichbarkeit der Präparate. Auch zu diesem Zeitpunkt wurde ersichtlich, dass eine Stimulation mit Pluset® zwar eine Zunahme an Ovulationen sowie eine Steigerung der insgesamt gewonnenen Strukturen zur Folge hatte, jedoch mit einer erhöhten Anzahl an unbefruchteten Eizellen und degenerierten Embryonen einherging. Die Anzahl transfertauglicher Embryonen wies keine Unterschiede auf. Lediglich die tiefgefriertauglichen Embryonen waren bei den Tieren der Follitropingruppe in einer höheren Anzahl nachzuweisen (Kelly et al., 1997). Abschließend lässt sich festhalten, dass beide Präparate mit vergleichbaren Erfolgsaussichten zu verwenden sind.

Aufgrund der gegenwärtigen Engpässe in der Versorgung mit hypophysärem FSH richtet sich das Forschungsinteresse auf die Untersuchung der Anwendung rekombinanter FSH-Alternativen. Eine Herstellung von Präparaten auf Grundlage gentechnologischer Verfahren könnte dazu beitragen, die Abhängigkeit von Schlachtprodukten zu reduzieren. Bereits in den 1990er Jahren konnte von Wilson et al. (1993) nachgewiesen werden, dass eine Superstimulation von Milchkühen mit rekombinatem, Desoxyribonukleinsäure (DNA)-basiertem bovinem FSH möglich ist. Die besten Resultate konnten bei einer zweimal täglichen Gabe von insgesamt 24 mg erzielt werden, welche mit denen von hypophysären Produkten vergleichbar waren. In jüngeren Studien werden insbesondere langwirksame rekombinante FSH-Präparate untersucht, welche lediglich eine einmal tägliche Behandlung erfordern. In den Untersuchungen von Gutiérrez-Reinoso et al. (2022) an primiparen Anguskühen konnte gezeigt werden, dass die einmal tägliche Behandlung mit bovinem rekombinatem extra-long-acting FSH über einen Zeitraum von vier Tagen zu einer signifikant höheren Anzahl von Corpora lutea sowie der insgesamt gewonnenen Embryonen und Eizellen ($10,32 \pm 0,81$) im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe, die mit konventionellen Präparaten behandelt wurden ($8,00 \pm 0,6$), führte. Insbesondere wiesen die Kühe der mit rekombinatem FSH behandelten Gruppe eine höhere Anzahl lebensfähiger Embryonen auf als die der konventionell behandelten Gruppe, in der eine höhere Anzahl degenerierter Embryonen beobachtet wurde. In der Anzahl unbefruchteter Eizellen ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Im Rahmen dieser Studie konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Embryonen der Tiere der rekombinanten Gruppe eine Überexpression von

Interferon-tau aufwiesen. Inwieweit sich dies auf die weitere Embryonalentwicklung auswirkt, muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden (Gutiérrez-Reinoso et al., 2022). Ebenfalls in Versuchen mit ovinem rekombinanten long-acting FSH an Kühen aus Fleisch- und Milchrassen konnten vergleichbar gute Ergebnisse beobachtet werden. Dabei wies das verwendete Produkt eine vergleichbare Effektivität wie konventionelle hypophysäre Produkte auf. Auch eine wiederholte Anwendung führte zu keinen nennenswerten Unterschieden in den Ergebnissen (Sanderson & Martinez, 2020).

2.6.1.3 Einflüsse des Spendertiers

2.6.1.3.1 Rasse

Die Ausbeute an transfertauglichen Embryonen wird ebenfalls durch die Rasse des Spendertieres beeinflusst. Gemäß der Jahresstatistik 2025 des Bundesverbandes Rind und Schwein (BRS) aus dem Jahr 2024 ergaben Spülungen der in Deutschland genutzten Zweinutzungsrasen Fleckvieh mit durchschnittlich 7,9 ($n = 1231$) und Gelbvieh als fleischbetonte Zweinutzungsrasse mit 10,0 ($n = 7$) transfertauglichen Embryonen pro Spülung hohe Werte. Spülungen der milchbetonten Zweinutzungsrasse Brown Swiss ($n = 216$) und der milchbetonten und gefährdeten Rasse Rotvieh ($n = 8$) ergaben durchschnittlich etwas über fünf transfertaugliche Embryonen. Den größten Anteil an Spülungen mit 1887 Spülungen, jedoch den schlechtesten Ergebnissen, mit nur durchschnittlich 4,7 transfertauglichen Embryonen, erzielten die schwarzbunten Deutsch Holstein. Die rotbunten Deutsch Holstein wiesen bei 328 Spülungen mit durchschnittlich 5,9 transfertauglichen Embryonen etwas bessere Ergebnisse auf (siehe Abb. 6).

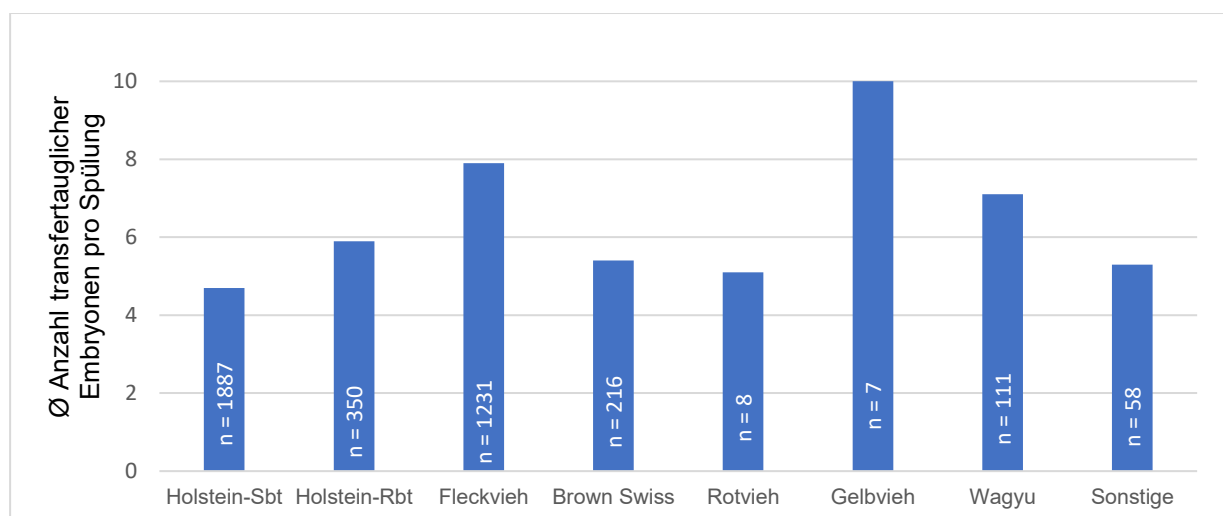


Abb. 6 Anzahl transfertauglicher Embryonen in Abhängigkeit der Rasse; aus der Jahresstatistik 2024 Bund Rind und Schwein

Auch die Wagyu-Rinder, die nach wie vor als exotische Rasse gelten, wiesen im Durchschnitt eine hohe Anzahl transfertauglicher Embryonen auf (6,7). Eine retrospektive Studie aus Texas, welche Daten über einen Zeitraum von sieben Jahren auswertete, konnte nachweisen, dass ein SOP mit Folltropin® bei Wagyu ebenso effektiv war wie bei anderen Fleischrassen. Die Ergebnisse zeigten, dass mit $16,6 \pm 1,1$ gesamt gewonnenen Strukturen und davon $9,1 \pm 0,7$ lebenden Embryonen vergleichbare und teilweise sogar bessere Resultate erzielt wurden als bei anderen Fleischrassen (Steinhauser et al., 2018).

In einer älteren Studie aus dem Jahre 1984 konnten insbesondere die Fleischrassen, die aus einer Kreuzung mit der *Bos indicus*-Rasse Brahman und verschiedenen *Bos taurus*-Rassen hervorgehen, Brangus (16,2 und 6,6), Simbrah (15,8 und 6,1) und Beefmaster (13,0 und 6,1) hinsichtlich der gewonnenen Embryonen sowie der transfertauglichen Embryonen die besten Ergebnisse verzeichnen. Auch Fleckviehkühe als Zweinutzungsrasse wiesen mit durchschnittlich 6,6 tauglichen Embryonen pro Spülung sehr gute Ergebnisse auf. Der höchste Anteil an transfertauglichen Embryonen wurde mit 68 % bei Anguskühen gewonnen (Donaldson, 1984). Es lässt sich feststellen, dass Fleisch- und Zweinutzungsrasse eine höhere Eignung für die In-vivo-Produktion aufweisen als milchbetonte Rassen. Letztere resultieren in einer durchschnittlichen Anzahl von 2,5 bis 3 geborenen Kälbern pro Spülung, während Spülungen von fleischbetonten Rassen im Mittel ein bis zwei Kälber mehr ergeben (Niemann, 1986). Diese Beobachtung lässt sich auf genetische Veranlagungen zurückführen. Dabei zeigt sich, dass fruchtbarere Rindergenotypen empfindlicher auf die stimulierende Wirkung von eCG- und FSH-Präparaten reagieren. Dieser Zusammenhang lässt sich auch bei der Gegenüberstellung fruchtbarer und weniger fruchtbarer Schafrassen bestätigen (Bindon et al., 1986).

2.6.1.3.2 Alter

Das Alter der Donoren wirkt sich auf zwei verschiedene Arten auf das Ergebnis bei der In-vivo-Embryonenproduktion aus. Zum einen nimmt das Alter Einfluss auf die generelle Follikulo- und Oogenese des Tieres. Zum anderen beeinflusst es die Reaktion der Ovarien auf die Superstimulation mit Gonadotropinen.

Während der Follikulogenese ist auffällig, dass ältere Kühe zum Zeitpunkt des erwarteten Beginns der Follikelwelle eine geringere Anzahl an Follikeln mit einer Größe von 2–5 mm rekrutieren als jüngere Kühe (Malhi et al., 2006, 2008). In einer Studie von Lerner et al. (1986) an Holsteinkühen zwischen 1,8–17,8 Jahren wurde der Superovulationserfolg hinsichtlich des Alters der Tiere untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Anzahl an gesamt gewonnenen

Embryonen, die Befruchtungsrate, die Qualität der Embryonen und die Anzahl transfertauglicher Embryonen signifikant mit dem Alter abnahm. In Untersuchungen, in denen Holstein Kühe im Alter von 13–16 Jahren mit ihren eigenen Töchtern im Alter von 1–6 Jahren verglichen wurden, die mit pFSH superstimuliert wurden, konnte eine reduzierte ovarielle Reaktion älterer Tiere auf eine Gonadotropinbehandlung beobachtet werden. Die älteren Tiere wiesen signifikant weniger Follikel mit einer Größe von > 6 mm auf. Des Weiteren wurden tendenziell weniger Follikel mit einer Größe von > 9 mm zwölf Stunden nach der letzten pFSH-Gabe sowie tendenziell weniger Ovulationen bei den älteren Kühen beobachtet (Malhi et al., 2006, 2008). In einer weiteren Studie mit gleichem experimentellem Design konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl an Ovulationen oder der Anzahl der Gelbkörper festgestellt werden. Allerdings wurde eine geringere Anzahl an Embryonen von den älteren Kühen gewonnen. Während aus den Kühen der Tochtergeneration (3–6 Jahre) $\varnothing 12 \pm 2$ Embryonen gewonnen wurden, waren es lediglich $\varnothing 6 \pm 2$ aus denen der Muttergeneration (13–16 Jahre). Dabei zeigten die Tiere der Muttergeneration einen signifikant höheren Anteil an unbefruchteten Eizellen und ungeteilten Zygoten von 71 %, im Gegensatz zu 38 % bei den jüngeren Kühen (Malhi et al., 2007). Diese Befunde stützen die Hypothese, dass eine Alterung der Donoren mit einer verminderten Entwicklungskompetenz der Oozyten einhergeht. Die Kernreifung und die Aktivierung des Maturation-Promoting-Factors schreiten in Oozyten älterer Kühe signifikant schneller voran als in Oozyten der jüngeren Tiere. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich die Gap Junctions zwischen den Kumuluszellen und der älteren Oozyte schneller auflösen und somit die Meiose früher fortgesetzt wird (Yamamoto et al., 2010). Eine Untersuchung der Genexpression in Granulosazellen zum Zeitpunkt der Selektion des dominanten Follikels ergab signifikante Unterschiede in der Anzahl an exprimierten Genen zwischen denen alter ($15 \pm 1,5$ Jahre) und junger ($6 \pm 1,1$ Jahre) Kühe. In den Granulosazellen alter Tiere waren Gene hoch- oder herunterreguliert, die zu einer verminderten Steuerung der Gonadotropinsekretion (u. a. Follistatin (FST) $\downarrow$; Inhibin beta A (INHBA) $\downarrow$) und zu einer verminderten Reaktionsfähigkeit auf Gonadotropin-induzierte Veränderungen im Zytoskelett und der extrazellulären Matrix (u. a. Tropomyosin 2 (TPM2) $\uparrow$, Tumornekrosefaktor alpha induziertes Protein 6 (TNFAIP6) $\downarrow$) führen. Zusätzlich waren Gene des Lipidmetabolismus, der Steroidsynthese sowie Gene, die eine verminderte Proliferation und eine schlechte interzelluläre Kommunikation (u. a. Gap Junction Protein alpha 1 (GJA1) $\downarrow$) bedingen, herunterreguliert. Hingegen waren Gene der oxidativen Stressantwort (u. a. Glutathionperoxidase 3 (GPX3) $\uparrow$) hochreguliert (Khan et al., 2013). Diese Befunde legen nahe, dass die Granulosazellen des wachsenden dominanten Follikels zum Zeitpunkt der Selektion altersbedingte Veränderungen im Transkriptom aufweisen. Dies könnte eine Erklärung für den follikelbedingten Verlust der Oozytenkompetenz bei älteren Kühen sein (Khan et al., 2013).

2.6.1.3.3 Parität

Heutzutage werden in der In-vivo-Embryonenproduktion zum Großteil nullipare Rinder als Donoren verwendet. Mit der Einführung der genomischen Zuchtwertschätzung im Jahr 2010 hat sich die Verwendung überwiegend junger Tiere als Donoren durchgesetzt. Dies dient dem Ziel, das Generationsintervall zu verkürzen und somit den genetischen Fortschritt in der Herde zu beschleunigen.

Ein Vergleich der Embryongewinnung bei laktierenden Kühen und nulliparen Tieren zeigt, dass aus Milchkühen signifikant weniger gesamt gewonnene und befruchtete Embryonen sowie tendenziell weniger lebensfähige Embryonen gewonnen wurden als aus Rindern (Chagas e Silva et al., 2002). Des Weiteren wiesen Rinder signifikant höhere Progesteronlevel während der Gonadotropininjektionen an Tag 5 und an Tag 7 nach dem stimulierten Östrus auf. Ein höherer Progesteronwert korrelierte mit einer gesteigerten Embryonenausbeute sowie verbesserten Embryoqualitäten. Die höhere Progesteronkonzentration spiegelte die höhere Anzahl der Gelbkörper wider (Chagas e Silva et al., 2002). In einer anderen Studie, die Kühe mit nulliparen Rindern verglich, konnten keine Unterschiede in der Anzahl gesamt gewonnener Embryonen und Eizellen sowie der Rate an befruchteten und transfertauglichen Embryonen verzeichnet werden. Jedoch wurde festgestellt, dass Kühe signifikant weniger Embryonen mit exzellenter Qualität produzieren als die Nulliparen. Die Embryonenentwicklung schien bei den Kühen etwas verlangsamt, da signifikant mehr frühe Morulae und weniger Blastozysten zu finden waren. Zusätzlich waren die Embryonen der Kühe signifikant dunkler im Zytoplasma (Leroy et al., 2005b). Es besteht eine Korrelation zwischen einer dunkleren Embryonenfarbe und dem Lipidgehalt (Leroy et al., 2005a) sowie einer beeinträchtigten Embryonenqualität (Leroy et al., 2005b). Ein erhöhter Gehalt an intrazellulären Lipiden kann die Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress steigern und ist mit einer reduzierten Kryotoleranz assoziiert (Nagashima et al., 1995; Nonogaki et al., 1994; Reis et al., 2003; Seidel, 2006).

Das Alter der Donoren kann und sollte jedoch nicht beliebig weit gesenkt werden. Die anatomischen Verhältnisse müssen die Arbeit des Tierarztes¹ ohne Verletzungen des Tieres gewährleisten. In einer Studie wurden Holsteinrinder im Alter von 5 bis 18 Monaten mit pFSH superstimuliert und zum Ovum-Pick-Up (OPU) vorgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass bei jungen Tieren im Alter von 5–8 Monaten signifikant mehr Follikel punktiert wurden, jedoch Tiere im Alter von 5–10 Monaten weniger Embryonen in der folgenden In-vitro-Produktion (IVP) hervorbrachten, die das Morula- oder Blastozystenstadium erreichten, als ältere Rinder. Obgleich eine höhere Anzahl an Oozyten von jungen Rindern gewonnen werden konnte, wird

¹ In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum bei Personenbezeichnungen verwendet.

dieser Vorteil durch die suboptimale Entwicklungskompetenz kompensiert (Landry et al., 2016). Die vorliegende Beobachtung lässt sich durch die Annahme erklären, dass Oozyten von sehr jungen, insbesondere präpubertären Rindern nicht auf Faktoren aus der Follikelflüssigkeit reagieren, welche die Oozytenmaturation und Entwicklungskompetenz positiv beeinflussen (Khatir et al., 1997). Die Autoren vermuten, dass sich bestimmte Rezeptoren erst während oder nach der Pubertät entwickeln (Khatir et al., 1997). Eine Studie, in der Oozyten und Follikelflüssigkeit aus Schlachtoorganen laktierender Kühe und 3–4 Monate alter präpuberaler Kälber untersucht wurden, ergab, dass sich das konstitutive (kontinuierlich produzierte Proteine) und neosynthetisierte (dynamisch, auf Reize hin produzierte Proteine) Proteinprofil der Oozyten in den beiden Altersklassen bis auf geringfügige Abweichungen gleich. Die konstitutiven Proteine in der Follikelflüssigkeit wiesen jedoch erhebliche quantitative Unterschiede auf. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die unterschiedliche Entwicklungskompetenz von Kuh- und Kälbereizellen weniger auf das Proteinprofil der Eizelle an sich zurückzuführen ist, sondern vielmehr durch das Mikroklima, in dem sich die Eizelle entwickelt, beeinflusst wird (Khatir et al., 1996).

Um die anatomischen Gegebenheiten bei jungen Kälbern zu umgehen und das Generationsintervall noch weiter zu verkürzen, kann ein laparoskopischer OPU in Betracht gezogen werden. Dadurch ist es möglich, bereits zwei Monate alte Kälber als Eizellspender zu nutzen. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die Blastozystenrate und die Embryonenqualität bei so jungen Tieren signifikant geringer sind (Baldassarre et al., 2018; Currin et al., 2021). Ob ein Eingriff unter Allgemeinanästhesie mit minimalinvasiven Verfahren mittels Laparoskopie bei so jungen Tieren ethisch zu vertreten ist, bleibt zur Diskussion offen.

2.6.1.3.4 Laktationsstadium und Milchleistung

Die Laktation wirkt sich auf vielfältige Weise und durch zahlreiche Faktoren, die mit einer hohen oder niedrigen Milchleistung verbunden sind, sowohl förderlich als auch schädlich auf die Qualität der Follikel, Oozyten und folglich auch der Embryonen aus. Zum einen ist die Milchleistung eng verknüpft mit der adäquaten Fütterung der Tiere. In der Übersichtsarbeit von Leroy et al. (2008) wird der Einfluss einer milchleistungsfördernden, meist sehr energie- und proteinreichen Fütterung auf die Fruchtbarkeit und insbesondere die Oozytenqualität von Milchkühen ausführlich behandelt. Es ist allgemein bekannt, dass die Kuh nach der Geburt zunächst eine negative Energiebilanz aufweist, die sich im Laufe der Laktation ausgleicht und positiv wird. In der Phase der negativen Energiebilanz wirken sich die erhöhten Konzentrationen an nicht veresterten freien Fettsäuren (NEFA) und die niedrige Glukosekonzentration direkt negativ auf die Qualität der Oozyten und Granulosazellen aus

(Leroy et al., 2006, 2005c; Vanholder et al., 2005). Tiere, die zur Embryonengewinnung vorgestellt werden, sollten aus diesen Gründen keine negative Energiebilanz mehr aufweisen und werden daher in der Regel erst später in der Laktation ausgewählt. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die aus den Follikeln freigesetzten Oozyten zuvor dieser negativen Energiebilanz ausgesetzt waren. Wenn eine positive Energiebilanz im Laufe der Laktation erreicht wird, ist eine energiereiche Fütterung grundsätzlich förderlich für die Follikeldynamik und die Konzentration von Steroiden und Wachstumsfaktoren (Leroy et al., 2008). Eine energiereiche Fütterung führt durch eine erhöhte Produktion zu erhöhten Plasmaprogesteronspiegeln und steigert die Aktivität des Enzyms Cytochrom P 19A1 (CYP19A1, ehemals Aromatase) und somit die Östrogenproduktion der Granulosazellen (Armstrong et al., 2001, 2002). Eine zu hohe Energiezufuhr, insbesondere im späteren Verlauf der Laktation, wenn der Energieverbrauch sinkt, kann jedoch auch zu einer Überstimulation der Ovarien führen und sich schädigend auf die Oozyten auswirken (Armstrong et al., 2001). Eine hohe Milchleistung ist mit einer entsprechend hohen Futteraufnahme verbunden. Dies bedingt einen vermehrten Blutfluss zur Leber, welcher wiederum den dortigen Steroidkatabolismus steigert, was in einer reduzierten Progesteronkonzentration mündet (Vasconcelos et al., 2003). Aufgrund der Vielzahl an beeinflussenden Faktoren besteht in der Literatur keine Einigkeit darüber, wie schwer jeder Faktor wiegt und tatsächlich Einfluss auf die Oozytenqualität nimmt.

Um den Einfluss der Milchleistung auf die Fertilität in Hinblick auf den Erfolg einer Superovulation zu untersuchen, verglichen einige Studien die Ergebnisse laktierender und trockenstehender Kühe. Sartori et al. (2002) zeigten auf, dass sich die Anzahl gesamt gewonnener Strukturen und die Fertilitätsrate zwischen den laktierenden und den trockenstehenden Kühe nicht unterschieden. Allerdings wiesen die Embryonen der laktierenden Kühe eine geringere Qualität auf. Lediglich 52,8 % der untersuchten Embryonen waren bei den laktierenden Kühen transfertauglich. Bei den Trockenstehenden waren es hingegen 82,3 %. Auch hinsichtlich der Spülungen, bei denen keinerlei lebensfähige Embryonen gewonnen wurden, wiesen die laktierenden Tiere deutlich schlechtere Werte auf. Während bei den trockenstehenden Kühen nur 28 % der Spülungen erfolglos waren, waren es bei den laktierenden Kühen 53 %. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Studie von Chebel et al. (2008), wobei im Gegensatz zu Sartori et al. (2002) auch bessere Ergebnisse der gesamt gewonnenen Strukturen bei den trockenstehenden Kühen verzeichnet wurden.

2.6.1.3.5 Körperkondition

Die Körperkondition von Kühen wird zumeist durch den Body Condition Score (BCS) in einer Skala von 1 (stark unterkonditioniert) bis 5 (stark überkonditioniert) nach Edmonson et al. (1989) angegeben. Aufgrund der intensiven Milchproduktion und des damit verbundenen Energiebedarfs unterliegen Milchkühe Schwankungen im BCS. Der hohe Energiebedarf post partum wird durch Einschmelzen des Körperfettanteils zu kompensieren versucht, um eine adäquate Energieversorgung sicherzustellen. In der Früh-laktation kommt es bei den Tieren zu einer Reduktion des Körperfettanteils, der um den 60. Tag der Laktation sein minimales Niveau erreicht (Bastin et al., 2010). Es konnte weiterhin belegt werden, dass ein Verlust von über 0,5 BCS-Punkten nach der Kalbung zu schlechteren Trächtigkeitsergebnissen führte (Buckley et al., 2003). In der allgemeinen Tendenz zeigt sich eine negative Korrelation zwischen einem geringen BCS und der Rastzeit (Zeitspanne zwischen Abkalbung und erster Besamung), der Verzögerungszeit (Zeitspanne zwischen erster Besamung bis zur erfolgreichen Besamung) sowie der Güstzeit (Zeitspanne zwischen Abkalbung bis zur erfolgreichen Besamung). Des Weiteren lässt sich eine positive Korrelation zwischen dem BCS und der Non-Return-Rate an Tag 56 feststellen. Somit wird deutlich, dass ein geringer BCS nach der Abkalbung zur Verzögerung im Reproduktionsstatus führt (Bastin et al., 2010). Diese These wurde durch die Untersuchungen von Carvalho et al. (2014) bestätigt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Kühe, die nach der Abkalbung einen niedrigeren BCS-Score aufwiesen, eine geringere Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Trächtigkeit aufwiesen. Demgegenüber zeigten Kühe, deren BCS-Score sich nach der Abkalbung nicht veränderte, sowie Kühe, die einen höheren BCS-Score aufwiesen, eine intermediäre bzw. bessere Trächtigkeitsrate.

Eine Reduktion der Energieaufnahme aufgrund reduzierter Fütterung oder Energiedichte, welche in einem niedrigeren Body Condition Score resultiert, hat insbesondere einen negativen Einfluss auf den Durchmesser und die Dauer der Dominanz des dominanten Follikels. Es besteht sogar die Möglichkeit des vermehrten Ausbleibens der Ovulation, was zu Atresien antraler Follikel, vermehrten Follikelzysten und einer ernährungsbedingten Anöstrie führt (Diskin et al., 2003; Mackey et al., 1999; Makarevich et al., 2011; Murphy et al., 1991). Demgegenüber steht eine hohe energetische Versorgung, die zu einer Zunahme des Durchmessers und der Wachstumsrate des dominanten Follikels führt (Armstrong et al., 2001). Eine verminderte Energieversorgung wirkt sich nicht nur auf das Follikelwachstum, sondern auch auf die Oozyten aus, was bei unterkonditionierten Kühen zu einer signifikant schlechteren Qualität der Oozyten führt (Chrenek et al., 2015; Domínguez, 1995; Nowak et al., 2011).

In der Literatur findet sich eine uneinheitliche Evidenz hinsichtlich des Einflusses des BCS auf die In-vivo-Embryonengewinnung. Die Ergebnisse der verschiedenen Studien werden in Tab. 4 zusammengefasst.

Tab. 4 Ergebnisse verschiedener Studien über den Einfluss des Body-Condition-Scores (BCS) im Zeitraum der Superovulation auf die Ergebnisse der Embryonengewinnung

Veröffentlichung	Versuchsaufbau	BCS	Ergebnisse der Embryonengewinnung
Kadokawa et al. (2008)	Holstein Rinder n = 88 Antrin-R 4 Tage, 2x tgl.	≤ 2,5 3,0 3,5	↑ Anzahl unbefruchteter Eizellen Optimal ↓ Anzahl Embryonen 1. Qualität,
Kubovičová et al. (2013)	Holstein Kühe n = 56 Pluset® 3 Tage, 2x tgl.	2,0–2,25 2,5–2,75 3,0–3,25 3,5–4,0 4,5–5,0	↓ Embryonengewinnungsrate ↑ Embryonengewinnungsrate ↓ Rate transfertauglicher Embryonen ↑ Embryonengewinnungsrate ↑ Rate transfertauglicher Embryonen ↓↓ Embryonengewinnungsrate
Bezdíček et al. (2015)	Holstein Kühe n = 110 Pluset® 5 Tage, 2x tgl.	2,0–5,0	Keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtzahl sowie der Anzahl transfertauglicher und degenerierter Embryonen
Makarevich et al. (2016)	Holstein Kühe n = 59 Pluset® 5 Tage, 2x tgl.	2 3 4	↑ Rate degenerierte Embryonen ↑ Gesamtzellzahl in Embryonen ↓ Index toter Zellen in Embryonen ↑ Embryonengewinnungsrate ↑ Gesamtzellzahl in Embryonen ↑ Rate transfertauglicher Embryonen ↑ Rate degenerierter Embryonen ↓ Gesamtzellzahl in Embryonen ↑ TUNEL Index (Indikator für schlechte Embryonenqualität) ↑ Index toter Zellen in Embryonen

Carvalho et al. (2014) fokussierten sich nicht auf den BCS der Tiere selbst, sondern auf die Schwankungsbreite desselben. Im Rahmen der Studie wurden laktierende Milchkühe wöchentlich in den ersten Wochen post partum gewogen und, basierend auf ihren Körpergewichtsschwankungen in den ersten drei Wochen, in Gruppen eingeteilt. Die Tiere wurden mit Folltropin® superstimuliert. Die Ergebnisse ergaben keinen Einfluss der BCS-Schwankung auf die Anzahl der Ovulationen sowie der insgesamt gewonnenen und befruchteten Embryonen. Jedoch wiesen die Tiere mit geringen Körpergewichtsschwankungen prozentual mehr transfertaugliche Embryonen (83,8 %) und weniger degenerierte Embryonen (9,6 %) auf als Tiere mit hohen Schwankungen in ihrem Körpergewicht (53,2 % transfertaugliche und 35,2 % degenerierte Embryonen). Somit konnte nachgewiesen werden, dass eine starke Abnahme des Körpergewichtes nach der Kalbung einen negativen Einfluss auf die Qualität der Embryonen ausübt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl über- als auch unterkonditionierte Tiere eine verminderte Anzahl und Qualität von In-vivo-Embryonen aufweisen. Dies hat in der Praxis dazu geführt, dass insbesondere Tiere mit einer optimalen Körperkondition (BCS = 3) als Spendertiere ausgewählt werden. Diese Empfehlung wird von Boland et al. (2001) bestätigt.

2.6.1.4 Hitzestress

In den Sommermonaten kommt es in Deutschland und Europa teilweise zu hohen Außentemperaturen, was bei den hier lebenden Rindern zu Hitzestress führt. Dieser bedingt über multikausale Faktoren in diversen Geweben eine Reduktion der Fruchtbarkeit. Hitzestress wird ab einer Temperatur von $\geq 29,0$ °C definiert (Chebel et al., 2004), wobei nicht nur allein die Umgebungstemperatur, sondern auch die Luftfeuchtigkeit eine Relevanz aufweist. Daher wird der „Temperature-Humidity-Index“ (THI) als Indikator für Hitzestress bei Rindern und Milchkühen herangezogen. Dieser Index ergibt sich aus der Temperatur und dem Wasserdampfgehalt der Luft. Bei Werten über 67 beginnt milder Hitzestress für die Tiere (DLG, 2021). Hitzestress kann sowohl chronisch über mehrere Tage als auch akut auftreten. Eine Erhöhung der Rektaltemperatur und der Atemfrequenz der Tiere ist als Folge von Hitzestress zu beobachten (Ferreira et al., 2011). Im Jahr 2023, welches das wärmste Jahr seit Beginn der deutschen Wetteraufzeichnung darstellt, wurden im Sommer 56 Tage mit einer Tagesmaximumtemperatur von ≥ 25 °C und an 20 Tagen sogar ≥ 30 °C verzeichnet (Deutscher Wetterdienst, 2024). Eine Zucht auf höhere Milchleistung geht mit einer höheren Sensitivität für Hitzestress einher (Leroy et al., 2008; Wolfenson & Roth, 2019). Während der Milchproduktion kommt es zu einer metabolischen Wärmeproduktion. Eine Kuh, die 30 kg Milch pro Tag produziert, weist eine doppelt so hohe Wärmeproduktion auf wie eine nicht laktierende Kuh. Bei einer täglichen Milchproduktion von 55 kg ist dies bereits dreifach so hoch (Wolfenson & Roth, 2019). Diese Körperwärme kann bei hohen Außentemperaturen nicht ausreichend an die Umgebung abgeführt werden. Es zeigte sich, dass Hitzestress in einem Zeitraum von 50 bis 20 Tagen vor der Besamung zu einer verminderten Konzeptionsrate bei hochleistenden Holsteinkühen führte (Chebel et al., 2004). Bereits ein Temperaturanstieg von 0,5 °C in der Gebärmutter führt zu reduzierten Konzeptionsraten (Gwazdauskas et al., 1973). Hingegen scheinen Rinder weniger unter dem Hitzestress zu leiden. Im Vergleich zu den laktierenden Kühen zeigten sie eine deutlich bessere Konzeptionsrate (50 % Rinder vs. 34 % Kühe) sowie einen geringeren Besamungsindex (1,5 Rinder vs. 2,3 Kühe; Badinga et al., 1985).

Die Abb. 7 stellt eine Übersicht ausgewählter Auswirkungen von Hitzestress auf die Reproduktion dar. Der Hitzestress greift u. a. negativ in die fein abgestimmte Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse ein. In der Literatur wird der Einfluss von Hitzestress auf die LH-Sekretion kontrovers diskutiert.

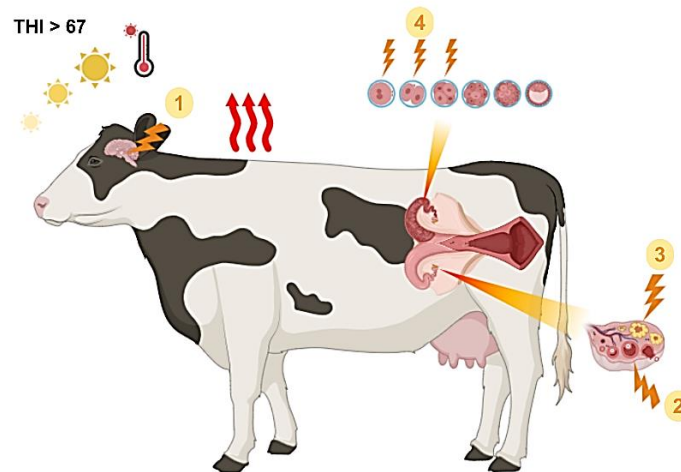


Abb. 7 Grafische Darstellung der in dieser Arbeit beschriebenen Auswirkungen von Hitzestress: 1) Produktion der Gonadotropine Follikelstimulierendes (FSH) & Luteinisierendes Hormon (LH) in der Hypophyse; 2) Östradiolproduktion der Follikel, Dominanz des Follikels, Oozytenkompetenz; 3) Progesteronproduktion der Luteinzellen; 4) Entwicklung früher Embryonalstadien

Gwazdauskas et al. (1981) kamen zu dem Schluss, dass Hitzestress keinen Einfluss auf den LH-Peak nimmt. Demnach weisen gestresste und nicht gestresste Tiere die gleiche LH-Konzentration auf. Auch die basalen LH-Werte unterschieden sich nicht. Alle Tiere der Studie wiesen einen präovulatorischen LH-Peak auf. Gilad et al. (1993) hingegen beschrieben, dass chronischer Hitzestress zwar keinen Einfluss auf die basale LH-Sekretion aufwies, jedoch eine Reduktion der LH-Amplitude zu beobachten war. Dies konnte insbesondere bei Kühen mit niedrigen Östradiolwerten nachgewiesen werden. Die FSH-Sekretion scheint hingegen unter Hitzestress vermehrt zu sein, da ein vermehrtes Wachstum von Follikeln in den Ovarien beobachtet wurde (Roth et al., 2000; Wolfenson et al., 1995). Unter Hitzestress ist eine Reduktion der Inhibin-Konzentrationen im Plasma zu verzeichnen, was zu einem Anstieg der FSH-Konzentrationen führte. Dies führte zu einer Beschleunigung der Bildung des dominanten Follikels und demzufolge zu einer längeren Dauer der Dominanz. Eine prolongierte Dominanz geht jedoch mit einer verminderten Fertilität einher (Roth et al., 2000; Wolfenson et al., 1995). Die vermehrte Entwicklung von Follikeln in den Ovarien könnte die Ursache für die Beobachtung von Doppelovulationen im Sommer und die vermehrten Geburten von Zwillingen nach Sommerbesamungen sein (Wolfenson & Roth, 2019).

Auch die Produktion der Sexualhormone ist von den Auswirkungen des Hitzestresses betroffen. Bei Tieren, die im Sommer unter Hitzestress litten, konnten signifikant geringere Östradiolwerte im Blut und in der Follikelflüssigkeit nachgewiesen werden (Gwazdauskas et al., 1981; Wolfenson et al., 1997). Dies erklärt eine verkürzte Brunstdauer von 21 auf 16 Stunden (Gwazdauskas et al., 1981). Auch ein im Winter künstlich induzierter Hitzestress führte zu gleichen Veränderungen der Hormonkonzentration im Blut (Wolfenson et al., 1997). Dieser Einfluss konnte zudem *in vitro* bestätigt werden, wobei eine signifikant geringere Östradiolproduktion aus der Follikelwand des dominanten Follikels bei einer Temperatur von 41 °C im Vergleich zu 37 °C oder 39 °C festgestellt wurde (Bridges et al., 2005). Wolfenson et al. (1997) vermuteten eine geringere Aktivität des Enzyms CYP19A1 in den Granulosazellen bei Hitzestress, was zu einer reduzierten Östradiolsekretion des dominanten Follikels führen kann. Ein niedriger Östradiolspiegel kann den LH-Peak beeinflussen, was wiederum wesentliche Auswirkungen auf die Ovulation, die anschließende Gelbkörperbildung und Progesteronproduktion nimmt (Gilad et al., 1993; Wolfenson & Roth, 2019). Diese negativen Effekte können jedoch durch die Anwendung von Hormonprogrammen und die Durchführung zeitlich festgelegter Besamungen kompensiert werden (Friedman et al., 2011). Allerdings besteht in diesem Bereich weiterhin Uneinigkeit in der Literatur, da die Reaktion auf extern zugeführte Gonadotropine unter Hitzestress als gleich (Bridges et al., 2005) oder vermindert (Gilad et al., 1993) im Vergleich zu nicht gestressten Tieren beschrieben wurde.

In der *In-vitro*-Studie von Bridges et al. (2005) konnte eine vermehrte Produktion von Progesteron aus isolierten Follikelzellen bei höheren Temperaturen nachgewiesen werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Granulosa- und Thekazellen unter Hitzestress früher luteinisieren. Eine prämatüre Luteinisierung geht jedoch mit persistierenden Follikeln einher. Hingegen zeigte die *In-vitro*-Studie von Wolfenson et al. (2002) eine verminderte Progesteronproduktion von luteinisierten Granulosa- und Thekazellen von Follikeln, welche im Sommer gewonnen wurden. Es zeigte sich zusätzlich, dass Thekazellen sensibler auf den Hitzestress reagieren als Granulosazellen. Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass ein durch Hitzestress geschädigter Follikel einen ebenfalls geschädigten Gelbkörper zur Folge hat.

Wie in Kapitel 2.1.2 dargelegt, entwickelt die Oozyte parallel zur Follikelentwicklung ihre Entwicklungskompetenz. Folglich führt eine durch Hitzestress bedingte Störung der Follikulogenese ebenfalls zu einer verminderten Kompetenz der Eizelle. Oozyten, die im Sommer heranreifen, erreichten signifikant langsamer das Zwei- bis Vierzellstadium nach Fertilisation als Oozyten aus dem Winter. Zudem war das Gen POU5F1 in Oozyten aus den Sommermonaten signifikant niedriger exprimiert (Gendelman et al., 2010). POU5F1 ist ein Transkriptionsfaktor für eine Vielzahl weiterer Gene, die eine entscheidende Rolle bei der

frühembryonalen Entwicklung spielen und eine große Bedeutung für die pluripotente Entwicklung und Differenzierung der Blastomeren haben (Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000). Im Rahmen der In-vitro-Maturation konnte die Nachstellung von Hitzestress dazu führen, dass weniger Oozyten das MII-Stadium erreichten. Dies ist auf eine Funktionsstörung des Spindelapparates zurückzuführen (Payton et al., 2004; Roth & Hansen, 2005). Außerdem wurde festgestellt, dass KOKs, die während der In-vitro-Maturation unter Hitzeschock (41 °C) litten, übermäßig viele reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) bildeten, die die Eizellfunktion beeinträchtigten (Cavallari de Castro et al., 2019). Roth et al. (2001) zeigten auf, dass zwei bis drei weitere Zyklen erforderlich waren, um den durch Hitzestress verursachten Schaden auszugleichen. Neben dem akuten Schaden kam es somit zu einem verzögerten Effekt auf die Oozyten und somit der Embryonalentwicklung.

In einer Studie an Kühen verschiedener Rassen von Rocha et al. (1998) konnte nachgewiesen werden, dass aus Tieren ohne vorangegangene Superstimulation beim OPU im Sommer und im Winter eine vergleichbare Anzahl an Oozyten gewonnen werden konnten. Jedoch waren es insgesamt signifikant weniger Oozyten mit guter Qualität im Sommer als im Winter ($41,0 \pm 9,5$ % im Sommer vs. $75,9 \pm 8,0$ % im Winter). Hingegen konnten in der Studie von Chrenek et al. (2015) im Sommer im Vergleich zu den Frühlings- und Herbstmonaten die meisten guten Oozyten aus Schlachthofovarien aspiriert werden. In der IVP zeigen sich tendenziell (Rocha et al., 1998) bzw. signifikant (Chrenek et al., 2015) schlechtere Teilungsraten nach Fertilisation aus Sommeroozyten. Diese Ergebnisse konnten jedoch in zwei weiteren Studien, in denen Eizellen aus Schlachtorganen untersucht wurden, nicht bestätigt werden. Hierbei konnten ähnliche Teilungsraten zwischen Oozyten aus Sommer- und Wintermonaten beobachtet werden (Al-Katanani et al., 2002b; Ferreira et al., 2011). Allerdings wurden im Sommer geringere Blastozystenraten festgestellt (Al-Katanani et al., 2002b; Chrenek et al., 2015; Ferreira et al., 2011). Insbesondere die Oozyten von Kühen, die bereits mindestens zwei Mal nicht erfolgreich besamt wurden (Repeated Breeder), waren besonders anfällig für Hitzestress. Im Sommer war eine Verminderung der Blastozystenrate um 14 % zu verzeichnen, während bei gesunden, hochleistenden Kühen und Rindern lediglich ein Verlust von 7 % zu beobachten war. Darüber hinaus wiesen die Blastozysten der Repeated Breeder-Kühe eine höhere Anzahl an Schädigungen auf (Ferreira et al., 2011).

Einige Studien untersuchten den Einfluss von Hitzestress während der In-vivo-Embryonengewinnung. Jedoch wurde in diesen Studien der Gesamteinfluss von Hitzestress auf die Ovarien sowie die Entwicklung der Embryonen im Ovidukt und Uterus untersucht, da nicht genau unterschieden wird, an welchen Tagen der Entwicklung die Tiere unter Hitzestress litten. So wurden in den Sommermonaten niedrigere Fertilisationsraten sowie geringere Raten an transfer- und tiefgefriertauglichen Embryonen beobachtet (Gordon et al.,

1987; Kubovičová et al., 2013; Sartori et al., 2002). Es ist jedoch schwierig, den alleinigen Einfluss auf die Follikulo- und Oogenese zu beleuchten. Dies kann durch Studien untersucht werden, in denen superstimulierte Tiere beim OPU genutzt werden, die während der Stimulation unter Hitzestress leiden, die folgende IVP jedoch unter optimalen Bedingungen abläuft. Unter diesen Bedingungen konnten nach OPU prozentual weniger Oozyten mit guter Qualität von hitzestressierten Tieren gewonnen werden als aus Tieren, die nicht unter Hitzestress litten. Die Oozyten aus gestressten Kühen wiesen in der folgenden IVP signifikant schlechtere Teilungs- und Blastozystenraten auf (Rocha et al., 1998). In In-vivo-Versuchen zeigten Tiere, die im Sommer superstimuliert wurden, signifikant weniger Ovulationen und schlechtere Ausspülraten (Gordon et al., 1987; Kubovičová et al., 2013). In einer In-vivo-Studie von Putney et al. (1989b) wurde der Einfluss von Hitzestress auf die finale Phase der Oozytenreifung während einer Superstimulation untersucht. Dazu wurden Holsteinfärsen während der pFSH-Gaben und nach der ersten instrumentellen Besamung thermoneutral in Klimakammern gehalten. Nur zwischen dem Östrusbeginn und den Ovulationen wurden die Tiere für ca. 10 Stunden akutem Hitzestress bei 42 °C ausgesetzt. Lediglich 12 % der in der Hitzestressgruppe gewonnenen Embryonen waren von guter Qualität. Hingegen waren es 68 % in der Kontrollgruppe. Unter Hitzestress waren signifikant mehr Embryonen retardiert oder degeneriert. Diese Daten deuten darauf hin, dass Hitzestress während der periovulatorischen Phase das Auftreten von verzögerten und/oder abnormalen Embryonen bei superovulierten Tieren erhöht.

Insgesamt ist festzuhalten, dass Hitzestress während der Superovulation zu einem Rückgang qualitativ hochwertiger Oozyten und deren Entwicklungskompetenz führt. In einer neueren Studie wurde untersucht, ob eine Melatoninbehandlung eben diese negativen Effekte des Hitzestresses aufheben kann (Ratchamak et al., 2022). Melatonin ist ein Neurohormon, welches direkte antioxidative Effekte gegen ROS aufweist, was zu besseren Ergebnissen in In-vitro-Experimenten bei Zugabe ins Kultivierungsmedium geführt hat (Cavalcante et al., 2019; Manjunatha et al., 2009; Zang et al., 1998). Auch in der In-vivo-Studie von Ratchamak et al. (2022) an Holstein-Kreuzungstieren waren die Anzahl großer Follikel (≥ 10 mm) und Corpora lutea sowie die Anzahl der gesamt gewonnenen Embryonen und Eizellen, die Fertilisationsrate und die Anzahl transfertauglicher Embryonen in der mit Melatonin behandelten Gruppe (18 mg/50 kg, intramuskulär) signifikant höher. Bei Tieren der Kontrollgruppe ohne Melatoninbehandlung, aber unter Hitzestress, waren hingegen mehr Embryonen degeneriert. Die Embryonen der Tiere der Melatonin-Gruppe wiesen eine höhere Aktivität des antioxidativen Enzyms Superoxiddismutase auf und eine signifikant geringere Lipidperoxidation (Ratchamak et al., 2022).

2.6.2 Einflussfaktoren im Ovidukt

2.6.2.1 Sperma

2.6.2.1.1 Zeitpunkt der Besamung

Bei nicht-superovulierten Tieren etablierte sich über die Jahre die „Morgens-Abends-Regel“ für die künstliche (instrumentelle) Besamung (KB). Demnach soll eine Besamung zwölf Stunden nach Beginn der Hauptbrunst erfolgen. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von Saacke et al. (2000) und Dalton et al. (2001) gestützt. Die Experimente ergaben, dass eine Besamung zwölf Stunden nach Beginn des Östrus einen Kompromiss zwischen potenziellen Befruchtungsversagen bei früherer und schlechterer embryonaler Qualität bei späterer Besamung darstellt. Es konnte mit steigendem Abstand der KB zum Beginn des Östrus eine Steigerung der Fertilitätsrate und eine Verschlechterung der Embryonenqualität festgestellt werden.

Wie in Kapitel 2.5.2 dargelegt, setzen bei superovulierten Tieren der LH-Peak früher nach Beginn des Östrus und die Ovulationen früher nach dem LH-Peak ein. Zudem erstrecken sich die Ovulationen über einen längeren Zeitraum. Aufgrund der Variabilität der superovulatorischen Reaktion ist die Erkennung des Östrusbeginns von entscheidender Bedeutung, um die künstliche Besamung zum bestmöglichen Zeitpunkt durchzuführen und so die Befruchtungsrate sowie die Qualität der Embryonen zu maximieren. In vielen älteren Studien war die Fertilitätsrate bei superovulierten Tieren schlechter als bei nicht-superovulierten (Elsden et al., 1978; Hasler et al., 1983; Saacke et al., 1998). Wenn jedoch der richtige Zeitpunkt und qualitativ hochwertige Spermaportionen gewählt werden, können Befruchtungsraten von über 80 % erreicht werden (Dalton et al., 2000; Sartori et al., 2002).

Ein Abstand von 12 oder 24 Stunden nach Beginn des Östrus hat sich in der Literatur als optimaler Besamungszeitpunkt bei superovulierten Kühen und Rindern erwiesen (Dalton et al., 2000; Sales & Souza, 2005; Schiewe et al., 1987). Während Dalton et al. (2000) bei Holstein-Milchkühen, die mit pFSH superovuliert wurden, die höchsten Fertilitätsraten von 81 % bei einer einmaligen Besamung mit 50 Millionen Gesamtspermien 24 Stunden nach Beginn des Östrus beobachtete, stellten Schiewe et al. (1987) gleich gute Fertilitätsraten bei einer einmaligen KB 12 oder 24 Stunden nach Beginn des Östrus bei Tieren von Fleischrassen fest. Sie konnten weiterhin feststellen, dass eine Mehrfachbesamung bei diesen KB-Zeitpunkten nicht zwingend erforderlich war, um gleichbleibende Ergebnisse hinsichtlich der Befruchtungsrate und der Embryonenqualität zu erlangen. Spätere Besamungen mit einem Abstand von 36 oder 48 Stunden zum superovulierten Östrusbeginn gingen hingegen mit schlechteren Fertilitätsraten einher (Schiewe et al., 1987). Untersuchungen von Sales und Souza (2005) an mit pFSH stimulierten Milchkühen und -rindern zeigten, dass die erste

Besamung der Kühe sogar direkt zu Beginn der Brunst erfolgen kann. Ein Besamungsregime mit der ersten Besamung zu Beginn der Brunst und 12 Stunden später wirkte sich, im Vergleich zu Besamungen 12 und 24 Stunden nach Brunstbeginn, nicht nachteilig auf die Fertilitätsrate und die Embryonenqualität aus. Bei Färsen wurde hingegen bei der ersten Besamung zu Beginn des Östrus eine Reduktion der Anzahl lebensfähiger Embryonen beobachtet. Daher sollte von einer Besamung zu diesem Zeitpunkt abgesehen werden.

Die Östruserkennung stellt jedoch in jedem Besamungs- und ET-Programm eine der herausforderndsten Aufgaben dar. In diesem Zusammenhang werden in verschiedenen Studien die Machbarkeit von Programmen untersucht, bei denen eine Besamung ohne vorausgehende Brunstbeobachtung zu einem definierten Zeitpunkt durchgeführt wird. Kanitz et al. (2002) entwickelten anhand diverser erhobener Daten bezüglich der zeitlichen Abstände zwischen der Luteolyse, dem LH-Peak und dem Einsetzen der Ovulationen, wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben, ein Schema für eine terminorientierte Besamung. Die Luteolyse wird 48 Stunden nach Beginn der pFSH-Stimulation mit einer PGF_{2α}-Gabe eingeleitet, woraufhin der LH-Peak in etwa 40 bis 50 Stunden später einsetzt. Gemäß Kanitz et al. (2002) soll die erste Besamung 55 bis 57 Stunden und die zweite Besamung 71 bis 73 Stunden nach der PGF_{2α}-Injektion durchgeführt. Hierbei wurde die benötigte Zeit für die Kapazitation der Spermien (ca. 6 Stunden) mit einbezogen, womit sich die Fertilisationsperiode der Spermien über den gesamten Zeitraum der Ovulationen erstreckt. In den Untersuchungen wurden 325 Embryonengewinnungen nach diesem Schema durchgeführt. Für beide Besamungen wurde je eine Paillette mit 20 Millionen Spermien verwendet, wobei Befruchtungsraten von über 85 % beobachtet wurden (Kanitz et al., 2002). Eine Vielzahl anderer Protokolle für die terminorientierte Besamung verwendeten während der Superstimulation ein lokales Progesteronpräparat, wie beispielsweise eine intravaginale Progesteronspange, und zur gezielten Auslösung der Ovulationen wird ein GnRH- oder LH-Präparat appliziert (Bó et al., 2006). Eine Reihe von Experimenten an Fleischrassetieren untersuchten den optimalen Zeitpunkt für die Entfernung der Progesteronspange in Kombination mit der Gabe der ovulationsauslösenden GnRH- oder pLH-Injektion und der nachfolgenden terminorientierten Besamung (Bó et al., 2006; Chesta et al., 2006; Larkin et al., 2005). Im Rahmen dieser Studien wurden den Tieren an Tag 0 eine intravaginale Progesteronspange eingesetzt, begleitet von einer einmaligen systemischen Gabe von Östradiol und Progesteron. Es sei darauf hingewiesen, dass diese Versuche in Südamerika durchgeführt wurden und kein Östradiol-Präparat in der EU zugelassen/verfügbar ist. Vier Tage später wurde mit der Superstimulation mit pFSH über 3,5 oder 4 Tage begonnen. An Tag 6 wurden die Tiere morgens und abends mit PGF_{2α} behandelt. Die Versuche ergaben, dass die Entfernung der Progesteronspange 12 Stunden nach der zweiten PGF_{2α}-Behandlung in Kombination mit einer

GnRH-Gabe 24 Stunden später zu einer verbesserten Synchronität der multiplen Ovulationen führte und die Ovulationen insgesamt später einsetzten. Insgesamt war festzuhalten, dass sämtliche Kombinationen der Behandlungen mit Entfernung der Progesteronspergule 12 oder 24 Stunden nach der zweiten PGF_{2α}-Behandlung, eine GnRH- oder pLH-Gabe 12 oder 24 Stunden danach, gekoppelt mit terminorientierten Besamungen weitere 12 und 24 Stunden später, zu vergleichbaren superovulatorischen Reaktionen und einer vergleichbaren Embryonenqualität bei Tieren von Fleischrassen führten. In der Konsequenz können alle diese Behandlungen in einem Superstimulationsschema bei Rindern mit terminorientierter KB eingesetzt werden (Bó et al., 2006; Chesta et al., 2006; Larkin et al., 2005). Ein ähnliches Studiendesign von Martins et al. (2012), welches an mit pFSH superstimulierten, laktierenden Holsteinkühen durchgeführt wurde, ergab, dass bei Milchkühen der optimale Zeitpunkt für die Entfernung des intravaginalen Progesteronpräparates bei 24 Stunden nach der zweiten PGF_{2α}-Behandlung liegt. In Kombination mit der Ovulationsinduktion mittels GnRH oder pLH 24 Stunden danach und terminorientierten Besamungen 12 und 24 Stunden später, konnten die meisten transfertauglichen Embryonen gewonnen werden. Darüber hinaus wurde in einem zweiten Experiment festgestellt, dass die gleichzeitige Anwendung von zwei Progesteron-Ohrimplantaten (keine EU-Zulassung) die Embryonenqualität förderte, was sich in einer erhöhten Anzahl an tiefgefriertauglichen Embryonen darstellte (Martins et al., 2012).

Gemäß der International Embryo Technology Society (IETS) sollte bei der KB eine angemessene Menge an hochwertigem Sperma verwendet werden. Zudem sollten die Besamungszeitpunkte und die Häufigkeit der Besamungen in den schriftlichen Anweisungen des Superovulationsprogramms angegeben werden (Mapletoft & Bó, 2020). In der Praxis hat sich eine zweifache Besamung im Abstand von 12 und 24 Stunden nach Beginn der Brunst bei Milchkühen durchgesetzt.

2.6.2.1.2 Ort der Samenablage

Die Ergebnisse mehrerer Studien zur KB haben gezeigt, dass es kaum Unterschiede in der Fruchtbarkeit gibt, wenn der Samen in den Gebärmutterhörnern, im -körper oder in der Mitte der Zervix deponiert wurde (Andersson et al., 2004; Graves et al., 1991; Knight et al., 1951; Olds et al., 1953; Salisbury & Vandemark, 1951; Williams et al., 1988). Lediglich in wenigen Studien führte eine intrakornuale Besamung im Vergleich zu einer Besamung in den Uteruskörper bei nicht-superovulierten Kühen zu signifikant besseren Trächtigkeitsraten (López-Gatius & Camón-Urgel, 1988; Meirelles et al., 2012). Bei Rindern etablierte sich daher eine Samenablage in den Uteruskörper (Diskin, 2018).

Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in den meisten Studien an superovulierten Tieren wider. Ein erstes kleineres Experiment von Carvalho et al. (2013) an 17 nulliparen Holsteinfärsen, die mit pFSH superstimuliert wurden, ließ die Verfasser zunächst die Hypothese aufstellen, dass eine Hornbesamung auf Höhe der großen Krümmung mit je einer halben Samenportion (1x 20 Millionen Gesamtspermien pro Paillette 18 Stunden nach GnRH-Injektion) die Anzahl fertiler Strukturen und die Befruchtungsrate signifikant steigert. In zwei weiteren Experimenten, die mittels eines Cross-Over-Designs bzw. einer höheren Tieranzahl eine höhere statistische Aussagekraft hatten, konnte dies jedoch nicht reproduziert werden. Weder in der Befruchtungsrate noch in anderen Parametern der Embryonenqualität wurden bei einer intrakornualen oder tief intrakornualen Besamung Unterschiede zu einer Besamung in den Uteruskörper festgestellt. Auch Hawk et al. (1988) konnten bei einer tief intrakornualen Besamung mittels flexiblem Katheter im Bereich der uterotubalen Mündung keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Befruchtungsrate (59 % tief intrakornuale KB vs. 64 % Uteruskörper-KB) feststellen. Demgegenüber führte eine laparoskopische Besamung direkt in das Infundibulum der Eileiter einige Stunden vor den Ovulationen zu einer signifikanten Reduktion der Befruchtungsrate auf 9 %. Im Gegensatz dazu lag die Befruchtungsrate bei der Besamung in den Uteruskörper bei 62 %. Zudem sank die Ausspülrate an Embryonen und Eizellen von 80 % auf 43 % ab. Die niedrige Befruchtungsrate bei Kühen, die laparoskopisch in das Infundibulum besamt wurden, deutet darauf hin, dass entweder nur eine minimale Anzahl von Spermien vom Infundibulum weiter in die Eileiter gelangte, die Spermien nicht im Eileiter verblieben oder die Spermien in den Eileitern nicht in der Lage waren, Eizellen zu befruchten (Hawk et al., 1988).

Hawk und Tanabe (1986) führten eine Untersuchung zur einseitigen tiefen Hornbesamung durch und stellten fest, dass in der Mehrzahl der untersuchten Tiere eine vergleichbare Befruchtungsrate im ipsilateralen und kontralateralen Horn vorlag. Lediglich in Einzelfällen war dies nicht der Fall. López-Gatius und Camón-Urgel (1990), die ebenfalls eine unilaterale Hornbesamung untersuchten, stellten fest, dass vergleichbare Befruchtungsraten im ipsi- sowie kontralateralen Horn vorlagen, wenn die Besamung in das rechte Uterushorn erfolgte. Demgegenüber ergab sich bei einer Besamung in das linke Uterushorn eine deutliche Diskrepanz in der Befruchtungsrate zwischen dem ipsi- und kontralateralen Horn. Die Befruchtungsrate in den kontralateralen Hörnern war signifikant geringer bei Besamungen in das linke Uterushorn (15,6 %) als für Besamungen in das rechte Uterushorn (50 %).

2.6.2.1.3 Spermaqualität

Der Bulle und die Spermaqualität sind wichtige Einflussfaktoren auf die Befruchtungsraten und die Embryonenqualität. Hasler (1992) beschrieb die Ergebnisse von 712 Embryonengewinnungen, wobei das Sperma von neun verschiedenen Holsteinbulln verwendet wurde. Die Befruchtungsraten lagen zwischen 20 % und 55 % und die durchschnittliche Anzahl tiefgefriertauglicher Embryonen zwischen 2,2 und 4,9 für einzelne Bullen. Stroud und Hasler (2006) untersuchten die Ergebnisse von 742 Embryospülungen, bei denen Spermaportionen von schlechter bis sehr guter Qualität von 227 Fleischrassbullen für die Besamung verwendet wurden. Die Spermaqualität wurde anhand folgender Kriterien beurteilt: Konzentration, Anteil motiler Spermien, Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien, Morphologie und Anteil von morphologisch abweichenden Spermien. Sowohl der Anteil der befruchteten Embryonen als auch der Anteil der Embryonen mit exzellenter Qualität nahm mit jeder Qualitätsstufe des Spermas signifikant ab. Der Anteil befruchteter Embryonen sank von 82,1 % bei sehr guter Qualität des verwendeten Spermas, auf 67,6 % bei guter Qualität, auf 58,3 % bei mittlerer Qualität und auf 51,8 % bei schlechter Qualität. Der Anteil der Embryonen mit sehr guter Qualität sank von 61,2 % über 55,7 % und 53,9 % auf 33,7 % bei der Verwendung von Sperma mit sehr guter Qualität bis hin zu Sperma mit schlechter Qualität. Ein anderer Bewertungsansatz wurde von Callaghan und King (1980) verwendet. Sie verglichen die Ausbeute an befruchteten Embryonen mit der Non-Return-Rate (NRR) der verwendeten Bullen. Eine Befruchtungsraten von 89 % bei Bullen mit hoher NRR und eine von 70 % bei Bullen mit hoher NRR lassen auf eine Korrelation dieser Parameter schließen. Im Gegensatz dazu konnte Hupka (2000) in ihrer Dissertation keine Korrelation zwischen der NRR 56 sowie der NRR 90 der einzelnen Bullen und der Anzahl sowie dem Prozentsatz tauglicher Embryonen feststellen. Allerdings ergab die Auswertung von 1294 Spülungen eine signifikante Abhängigkeit hinsichtlich der Rate tauglicher sowie degenerierter Embryonen und unbefruchteter Oozyten von dem eingesetzten Bullen. Die Anzahl und der Anteil tauglicher Embryonen unterschieden sich zum Teil erheblich in Abhängigkeit des eingesetzten Bullen. Die Auswertung ergab, dass 14 Bullen einen Prozentsatz von über 60 % tauglicher Embryonen erzielten, während neun Bullen einen Prozentsatz von weniger als 50 % erreichten. Der höchste Prozentsatz tauglicher Embryonen lag bei 72,1 %, während der niedrigste bei 39,7 % lag (Hupka, 2000). Insgesamt scheint die Qualität des verwendeten Spermas nicht nur den Prozentsatz der befruchteten Eizellen, sondern auch die Qualität der Embryonen zu beeinflussen. Daher sollte bei superovulierten Tieren immer versucht werden, qualitativ hochwertiges Sperma zu verwenden, auch wenn dies in der Praxis aufgrund der Wünsche der Landwirte nicht immer möglich ist (Mikkola et al., 2020).

In der KB von Rindern hat sich der Einsatz von Tiefgefriersperma aus Gründen der Praktikabilität durchgesetzt. Bei korrektem Auftauverfahren und richtiger Handhabung des Spermas gibt es keine Einschränkungen hinsichtlich Befruchtung und Embryoqualität (Nadir et al., 1993). Eine unsachgemäße Handhabung des Spermas während des Auftauens kann jedoch zu einer erheblichen Schädigung des Spermas führen (Stroud, 2006). Auch bei superovulierten Tieren hat sich der Einsatz von Tiefgefriersperma etabliert. Sowohl Hawk et al. (1988) als auch Goulding et al. (1994) beobachteten keine abweichenden Befruchtungsraten bei Verwendung von Tiefgefriersperma im Vergleich zu frischem Sperma nach der Besamung superovulierter Kühe. Lediglich in der mit einer intravaginalen Progesteronsponge behandelten Gruppe wurden weniger Embryonen mit Qualitäten 1 und 2 nach Verwendung von Tiefgefriersperma Sperma im Vergleich zu den Versuchsgruppen PRID® und Frischsperma, PGF_{2α} und Tiefgefriersperma sowie PGF_{2α} und Frischsperma festgestellt (Goulding et al., 1994).

2.6.2.1.4 Sortiertes oder konventionelles Sperma

Der Einsatz von X- oder Y-chromosomal sortiertem Sperma hat vor einigen Jahren Einzug in die Besamungsprogramme gefunden. In Milchkuhherden wird dabei meist X-sortiertes Sperma zur gezielten Nachzucht weiblicher Tiere bei Besamungen von Rindern oder Kühen mit genetischem und/oder züchterischem Interesse verwendet. Für die Sortierung der Spermien wird die Durchflusszytometrie zur Trennung von X- und Y- Chromosom-tragenden Spermien auf der Grundlage des DNA-Gehaltes der einzelnen Spermien eingesetzt (Johnson, 2000). Diese Technik hat sich als sehr genau erwiesen und führt mit bis zu über 90 %-iger Sicherheit zu sortierten Populationen lebensfähiger geschlechtsspezifischer Spermien. Allerdings gehen mit der Aussetzung der Spermien gegenüber diversen biochemischen Veränderungen, einem DNA-Farbstoff, mechanischem Druck, Bestrahlung mittels Laser und einem elektrischen Feld während des Prozesses Schäden einher (Garner, 2006; Seidel & Garner, 2002). So zeigen Spermien nach dem Sexing-Prozess eine kompromittierte Fähigkeit am Oviduktepithel anzuhaften und signifikant schlechtere Ergebnisse hinsichtlich Motilität, mitochondrialem Membranpotential und Plasmamembranstabilität sowie weniger lebende Spermien mit intaktem Akrosom (Carvalho et al., 2018). Dies erklärt die meist schlechteren Befruchtungs- und Trächtigkeitsraten nach Besamungen mit sortiertem Sperma. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass bei der Besamung mit sortiertem Sperma aufgrund der hohen Kosten in der Regel geringere Spermienkonzentrationen verwendet werden. Ein exzellentes Reproduktionsmanagement ist jedoch der Schlüssel zum Erreichen besserer Trächtigkeitsraten (Schenk et al., 2006; Seidel et al., 1999). So konnten bis zu 90 % der

Fertilitätsraten mit konventionellem Sperma auch mit Samenportionen mit einer geringen Konzentration von sortierten Samenzellen erreicht werden (Schenk et al., 2005; Seidel et al., 1999). Zudem zeigten sich kaum Unterschiede hinsichtlich der Trächtigkeitsraten zwischen frischem und tiefgefrorenem X-sortiertem Sperma, ebenso wenig zwischen bilateralen Besamungen in die Uterushörner oder den Uteruskörper (Seidel et al., 1999). Ein neueres Durchflusszytometrieverfahren namens Sexcel® (ABS, Wisconsin, USA), das laut Herstellerangaben eine schonendere Behandlung der Spermien verspricht, ist seit einigen Jahren auf dem Markt verfügbar. Beim Sexcel®-Verfahren werden die Spermien, die das ungewollte Chromosom tragen, durch einen Laser zerstört. Die detaillierte Vorgehensweise wird vom Hersteller nicht explizit dargelegt, jedoch konnten in einer ersten Studie bei Besamungen nach Östrusdetektion keine signifikanten Unterschiede in der Konzeptionsrate nach Besamungen mit konventionellen oder Sexcel®-Sperma festgestellt werden (Perry et al., 2020).

Die Verwendung von sortiertem Sperma in Verbindung mit der Superovulation ist kommerziell sehr attraktiv. Jedoch ist zu beachten, dass der Sortierprozess mit zusätzlichen Kosten verbunden ist, was zu einer Steigerung der Kosten pro Spermaportion führt. Infolgedessen ist die Anzahl der Spermien pro Besamungsdosis begrenzt. Dies hat zur Folge, dass die meisten Studien an superovulierten Kühen mit einer geringeren Dosis an sortierten Spermien im Vergleich zum konventionellen Sperma durchgeführt werden. In der Studie von Schenk et al. (2006) wurde die Ausbeute und Qualität an Embryonen nach zweimaliger Besamung mit verschiedenen Dosen an X- und Y-sortiertem Sperma (2 Millionen vs. 10 Millionen vs. 20 Millionen Gesamtspermienzahl) sowie konventionellem Sperma (40 Millionen Gesamtspermienzahl) verglichen. Es zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich des Anteils transfertauglicher sowie degenerierter Embryonen und des Anteils unbefruchteter Eizellen zwischen X- und Y-sortiertem Sperma. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Befruchtungsrate bei der Verwendung jeglicher sortierter Spermadosen signifikant geringer war als bei den Besamungen mit 40 Millionen nicht sortierten Spermien. Bei Besamungen mit 2 und 10 Millionen sortierten Spermien war die Anzahl transfertauglicher Embryonen ebenfalls signifikant geringer. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Besamungen mit 2 Millionen sortierten Spermien die höchste Anzahl an unbefruchteten Eizellen hervorbrachten. Die Autoren dieser Studie kommen zu dem Schluss, dass wiederholte Besamungen superovulierter Tiere mit einer hohen Dosis (min. 20 Millionen Spermien) an sortierten Spermien dazu beitragen könnten, retrograde Spermienverluste auszugleichen. Dies führt zu einer erhöhten Anzahl an Spermien am Ort der Befruchtung und zu vergleichbaren Befruchtungsraten und transfertauglichen Embryonen im Vergleich zu nicht sortierten Kontrollbesamungen (Schenk et al., 2006). Sartori et al. (2004) stellten fest, dass

eine zweimalige Besamung mit 10 Millionen X-sortierten Spermien pro Paillette 12 und 24 Stunden nach Brunstbeginn eine gleiche Rate an befruchteten und lebensfähigen Embryonen hervorbringt wie eine einmalige Besamung mit 20 Millionen X-sortierten Spermien 12 Stunden nach Brunstbeginn (61,9 % vs. 63,5 %). Demgegenüber führte eine zweimalige Besamung mit 10 Millionen nicht sortierten Spermien pro Paillette 12 und 24 Stunden nach Brunstbeginn zu einer Rate von 90,9 % befruchteten und lebensfähigen Embryonen. Die Verwendung von X-sortierten Sperma erhöht neben der Anzahl an nicht befruchteten Oozyten auch den Anteil der Spülungen in denen keinerlei transfertauglichen Embryonen gewonnen werden konnten (Mikkola & Taponen, 2017b).

Während Schenk et al. (2006) und Peippo et al. (2009) keine qualitativen Unterschiede bei den Embryonen nach Besamung mit sortiertem und nicht sortiertem Sperma feststellten, nahmen Sartori et al. (2004) sowie Mikkola und Taponen (2017b) eine vermehrte Anzahl degenerierter Embryonen wahr. Des Weiteren wurde eine Abnahme von Embryonen mit 1. Qualität festgestellt (Hayakawa et al., 2009; Mikkola & Taponen, 2017b). Ein weiteres Kriterium, um die Qualität der transfertauglichen Embryonen zu beurteilen, ist die Trächtigkeitsrate nach dem Transfer auf Rezipienten. Schenk et al. (2006) nahmen auch in dieser Hinsicht keine Unterschiede zwischen Embryonen nach KB mit sortiertem und nicht sortiertem Sperma in ihrer Studie wahr. Mikkola et al. (2015) hingegen berichteten in einer groß angelegten Feldstudie in Finnland mit 12.438 Transfers (davon 1741 Embryonen aus Besamungen mit X-sortiertem Sperma) von einer signifikanten Reduktion der Trächtigkeitsraten nach dem Transfer von Embryonen, die aus Besamungen mit X-sortiertem Sperma entstanden sind. Die Trächtigkeitsraten beliefen sich auf 49,6 % mit Embryonen aus konventionellem Sperma und 38,8 % mit Embryonen aus X-sortiertem Sperma. Die Mortalität der geborenen weiblichen Kälber unterschied sich zwischen den Gruppen nicht. Hingegen war die Mortalität der männlich geborenen Kälber signifikant höher, wenn der Embryo aus einer Besamung mit X-sortiertem Sperma entstand.

Der Einsatz von X-sortiertem Sperma resultiert in einer nahezu zweifachen Steigerung des Anteils an weiblichen, transfertauglichen Embryonen (Hayakawa et al., 2009; Peippo et al., 2009; Schenk et al., 2006). Daher ist der Einsatz von sortiertem Sperma von großem Interesse. Er ermöglicht es, den Transfer männlicher Embryonen, die nicht für die Zucht benötigt werden, und die damit verbundenen Kosten zu vermeiden. Zudem kann auf den Nachweis des embryonalen Geschlechts mittels Biopsien verzichtet werden, wodurch potenzielle Folgeschäden, und verringerte Anwachsrate vermieden werden (Hasler et al., 2002). Es sei jedoch angemerkt, dass selbst bei einer 90 %-igen Reinheit des X-sortierten Spermas die Wahrscheinlichkeit einer Geburt eines Bullenkalbes bei einer von zehn Geburten besteht.

In der Studie von Peippo et al. (2009) wurde der Einsatz von X-sortiertem Sperma an Kühen und Färsen vergleichend untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Kühe deutlich schlechtere Befruchtungsraten nach Besamungen mit X-sortiertem Sperma (48,4 %) aufwiesen, im Vergleich zu Besamungen mit konventionellem Sperma bei Kühen (100 %) oder X-sortiertem Sperma bei Färsen (70,3 %). Auch ihre retrospektive Auswertung von Ergebnissen aus einem kommerziellen Embryotransferprogramm bestätigten dies. Die Rate unbefruchteter Eizellen war bei Kühen nach Besamung mit X-sortiertem Sperma mit 56,0 % im Vergleich zu Besamungen mit konventionellem Sperma (14,4 %) sowie zu Besamungen bei Färsen (X-sortiert: 21,1 %, XY: 10,6 %) am höchsten. Die Rate transfertauglicher Embryonen war nach Besamungen mit X-sortiertem Sperma bei Kühen am geringsten (Kühe: X-sortiert 21,1 %, XY 64,5 %; Färsen: X-sortiert 53,9 %, XY 65,5 %). Die Studie von Hayakawa et al. (2009), in welcher ebenfalls weniger transfertaugliche Embryonen aus Kühen nach Besamung mit X-sortiertem Sperma als aus Färsen gewonnen wurden, stützt die Ergebnisse von Peippo et al. (2009). In der retrospektiven Studie von Mikkola und Taponen (2017b) wurden 1971 Spülungen (davon 443 mit X-sortiertem Sperma) ausgewertet. Es konnte festgestellt werden, dass der Anteil an Spülungen, die keinerlei transfertaugliche Embryonen hervorbringen, bei Färsen um 4 %-Punkte und bei Kühen hingegen um 11,7 %-Punkte nach Verwendung von X-sortiertem Sperma anstieg. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Kühe nach einer Besamung mit sortiertem Sperma ein höheres Risiko für schlechte Ergebnisse in der Embryonenproduktion aufweisen als Färsen. Daher kann beim Einsatz von sortiertem Sperma bei Kühen eine erhöhte Besamungsdosis sowie eine häufigere Besamung erforderlich sein als bei Färsen (Peippo et al., 2009).

Die von Soares et al. (2011) durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass Besamungen mit 4,2 Millionen X-sortierten Spermien 18 und 30 Stunden nach einer ovulationsauslösenden pLH-Injektion mit einer signifikant höheren Rate an transfertauglichen Embryonen ($54,2 \pm 23,2$) einhergingen als Besamungen 12 und 24 Stunden nach der pLH-Gabe ($40,7 \pm 21,3$). Eine mögliche Erklärung für die besseren Ergebnisse bei späteren Besamungen könnte in den durch die Spermasortierung verursachten Schäden an den Spermien liegen, die möglicherweise zu einer kürzeren Lebensdauer als bei nicht sortierten Spermien geführt haben. Zusätzlich durchlaufen die Spermien eine Art „Vorkapazitation“ während des Sortierprozesses bei den Durchflusszytometrie-Verfahren (Lu & Seidel, 2004; Maxwell et al., 2004). Daraus leitet sich die Empfehlung einer geringgradig späteren Insemination mit sortiertem Sperma im Vergleich zu konventionellem Sperma ab, um die Fertilisationsperiode der sortierten Spermien passend zum Einsetzen der multiplen Ovulationen zu timen.

Durch die Verwendung von frischem X-sortiertem Sperma ergeben sich bei Milchkühen keine Vorteile gegenüber der Verwendung von tiefgefrorenem. Die Raten an transfertauglichen

(frisch: $59,5 \pm 9,3$; gefroren: $69,0 \pm 8,9$ %) und degenerierten Embryonen (frisch: $31,8 \pm 8,3$ %; gefroren: $27,3 \pm 7,8$ %) sowie an unbefruchteten Eizellen (frisch: $8,7 \pm 4,5$ %; gefroren: $3,7 \pm 2,5$ %) unterschieden sich nicht. Da frisches X-sortiertes Spermia keine Vorteile mit sich bringt, jedoch der Einsatz mit einem höheren logistischen Aufwand verbunden ist, ist der Einsatz von tiefgefrorenem X-sortiertem Spermia praktikabler (Hayakawa et al., 2009).

2.6.2.2 Hitzestress

Wie in Kapitel 2.6.1.4 beschrieben, nimmt Hitzestress ebenfalls Einfluss auf die sich entwickelnden Embryonen während ihrer Passage im Ovidukt. Eine Übersicht ist in Abb. 7, S. 49 dargestellt. Hitzestress kann sich negativ auf die Entwicklung des Embryos auswirken. Unter anderem wurde bei hitzestressierten Embryonen ein reduziertes Membranpotential der Mitochondrienmembranen beobachtet, wobei ein hohes Membranpotential ein Marker für eine gute Entwicklungskompetenz ist (Acton et al., 2004; Jones et al., 2004; Kuroki et al., 2013). Darüber hinaus resultiert ein Hitzestress in einer reduzierten Kalziumkonzentration im Zytoplasma, was die Zellfunktionen beeinträchtigt (Kamano et al., 2014). Ebenfalls kann eine Mitochondrienschwellung, eine Reorganisation im Zytoskelett, eine Migration der Zellorganellen ins Zentrum der Blastomeren (Rivera et al., 2003, 2004) und ein Anstieg von ROS in den Blastomeren (Sakatani et al., 2004) beobachtet werden. Diverse Studien belegen, dass insbesondere die frühen Stadien Zygote und 2- bis 8-Zeller eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Hitzestress aufweisen. Mit fortschreitender Entwicklung weisen Morulae und Blastozysten eine erhöhte Hitzetoleranz auf (Ealy et al., 1995; Edwards & Hansen, 1997; Sakatani et al., 2012). Erste In-vitro-Versuche verdeutlichten, dass die Entwicklungskompetenz von 2-Zellern, die einem Hitzeschock von mindestens 41°C über drei Stunden ausgesetzt sind, hin zum 4- und > 16 -Zeller reduziert war. Hingegen war die Entwicklung zu einer Blastozyste bei einer hitzestressierten Morula unter identischen Bedingungen nicht beeinträchtigt (Ealy et al., 1995). Edwards und Hansen (1997) beobachteten bei der Inkubation unter Hitzeschock eine Reduktion der Entwicklungskompetenz von 2- sowie 4- bis 8-Zellern, wobei die 2-Zeller die stärkste Reduktion aufwiesen. Ähnliches berichteten Sakatani et al. (2012). Bei einem Hitzeschock an Tag 0 und 2 in der IVP wurde eine signifikante Reduktion der Entwicklungsraten und ein erhöhter intrazellulärer oxidativer Stress beobachtet. Hingegen nahm ein Hitzeschock an Tag 4 und 6 keinen Einfluss mehr.

Die Mechanismen, die für den Erwerb der Thermotoleranz verantwortlich sind, sind bis dato noch nicht vollständig bekannt. Es handelt sich um ein komplexes Zusammenspiel vieler Faktoren. Unter anderem ist davon auszugehen, dass die Aktivierung des embryonalen

Genoms ab dem 8-Zellstadium (Graf et al., 2014; King et al., 1988) eine entscheidende Rolle spielt, womit der Embryo das gesamte Spektrum der zellulären Anpassung nutzen kann (Hansen, 2019). Ein vielfach untersuchter Aspekt ist die Fähigkeit zur Transkription des Hitzeschockproteins HSP70. In der Vergangenheit wurde die fehlende Thermotoleranz früher Embryonalstadien mit der Unfähigkeit zur Bildung dieses HSP70 assoziiert. Edwards et al. (1997) konnten jedoch nachweisen, dass eine erhöhte Synthese von HSP70 (68-kDa-Form) in 2-Zellern, jedoch nicht mehr in 4-Zellern, nach einer thermischen Belastung zu verzeichnen war. Des Weiteren konnten sie konstitutiv (konstant) produzierte HSP70-Moleküle (HSC 70 und 71) beim 2-Zeller bis zur Blastozyste nachweisen. Eine hitzeinduzierte Produktion von HSC 70 & 71 wurde jedoch nur in Blastozysten beobachtet. Wrenzycki et al. (1998) konnten in In-vitro-Embryonen ohne Hitzestress eine Expression des HSP70-Gens vom 2-Zeller bis zur Blastozyste nachweisen. Dabei wird davon ausgegangen, dass die beobachtete Expression bis zum 4-Zeller-Stadium auf ein maternales und ab dem 8-Zeller wahrscheinlich auf ein embryonales Transkript zurückzuführen ist. Chandolia et al. (1999) wiesen in einer weiteren Studie auch in hitzestressierten 2- und 4-Zellern eine erhöhte induzierte Genexpression von HSP70 auf. Die erhöhte Wärmeempfindlichkeit der frühen Embryonalstadien ist demnach nicht auf die Unfähigkeit der Synthese von HSP70 zurückzuführen (Edwards et al., 1997).

Bei In-vitro-Versuchen konnte unter Verwendung von Insulin-like Growth Factor (IGF-1), das dafür bekannt ist, diverse Zellen vor Stressoren zu schützen, im Kultivierungsmedium eine verbesserte Thermotoleranz von Embryonen beobachtet werden. Nach Kultivierung in IGF-1 angereicherten Medien und zusätzlicher Inkubation unter Hitzeschock wurde eine bessere Blastozystenrate von Embryonen dokumentiert, als bei rein hitzestressierten Embryonen (Jousan & Hansen, 2007). In vivo konnte diese Wirkung jedoch nicht bestätigt werden. Eine Behandlung von laktierenden Kühen mit bovinem Somatotropin, welches einen nachweisbaren Anstieg von IGF-1 mit sich führte, hatte keine positiven Auswirkungen auf die Trächtigkeitsraten im Sommer (Jousan et al., 2007).

Die Schädigung der Entwicklungskompetenz früher Embryonalstadien konnte ebenfalls in vivo bestätigt werden. Dunlap und Vincent (1971) setzten Färsen von Fleischrassen in Klimakammern für 72 Stunden nach der Besamung Hitzestress (32,2 °C und 65 % Luftfeuchtigkeit) aus. Die Tiere zeigten signifikant schlechtere Trächtigkeitsraten als die Kontrolltiere, die bei 21,1 °C gehalten wurden. Von den 23 hitzestressierten Färsen wurde keine tragend, während die Kontrolltiere eine Trächtigkeitsrate von 48 % aufwiesen. Zudem wurde ein signifikanter Anstieg der Rektaltemperatur der hitzestressierten Tiere auf 40,0 °C beobachtet.

In vergleichenden Versuchen wurde festgestellt, dass Embryonen der hitzetoleranteren Rasse Brahman (*Bos indicus*) und der weniger hitzetoleranten Rassen Holstein und Angus (*Bos taurus*) unterschiedlich hitzeresistent sind. Der Einfluss von Hitzestress auf die Entwicklungsrate zum Blastozystenstadium und die Zellanzahl pro Embryo in der IVP war bei Brahman-Embryonen geringer ausgeprägt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die bessere Thermotoleranz der *Bos indicus*-Rasse nicht nur auf einer besseren körperlichen Anpassung beruht, sondern auch auf zellulärer Ebene wirksam ist (Paula-Lopes et al., 2003).

Auch bei superovulierten Tieren zeigt sich der negative Einfluss von Hitzestress während der frühen Entwicklungsphase. Putney et al. (1988b) superovulierten Holsteinfärsen mit pFSH unter thermoneutralen Bedingungen in Wärmekammern. Nach der Besamung wurde ein Teil der Färsen hyperthermischen Konditionen ausgesetzt. Für einen Zeitraum von sieben Tagen wurden die Färsen täglich entweder bei einer Temperatur von 30 °C für 16 Stunden oder einer Temperatur von 42 °C für 8 Stunden gehalten. Die Ergebnisse zeigten, dass beide hitzestressierten Gruppen einen erhöhten Anteil an abnormalen Embryonen mit extrudierten und/oder degenerierten Blastomeren (26,83 %) und retardierten Embryonen (34,15 %), im Vergleich zur Kontrollgruppe (abnormal: 13,24 %; retardiert: 16,18%) aufwiesen. Der Anteil an unbefruchteten Eizellen unterschied sich hingegen nicht zwischen den Gruppen (Hitzestress: 18,29 %; Kontrolle: 19,12 %). Putney et al. (1988a) erzielten in einer weiteren Studie, die unter natürlichen Bedingungen im Sommer in Florida durchgeführt wurde, ebenfalls ähnliche Ergebnisse hinsichtlich des erhöhten Vorkommens retardierter Embryonen. Ealy et al. (1993) spezifizieren den Zeitraum des negativen Einflusses auf die Embryonen von superstimulierten Holsteinkühen. Die Donoren waren an Tag 1, 3, 5 oder 7 nach der Besamung Hitzestress ausgesetzt. Dazu werteten die Autoren die Wetterdaten der jeweiligen Tage aus. Die Ergebnisse zeigten, dass Embryonen aus Kühen, die an Tag 1 Hitzestress ausgesetzt waren, im Vergleich zu den Embryonen der Kontrollkühe (kein Hitzestress) eine reduzierte Lebensfähigkeit und ein geringeres Entwicklungsstadium aufwiesen. Hitzestress der Donoren an den drei anderen Tagen hatten keine nachteiligen Auswirkungen auf die Entwicklung und Qualität der Embryonen.

Der Transfer von Embryonen bietet eine gute Möglichkeit, die negativen Auswirkungen von Hitzestress in der frühen Embryonalentwicklung zu umgehen und somit die Fruchtbarkeit im Sommer zu verbessern. Im Sommer waren die Trächtigkeitsraten nach dem Transfer von tiefgefrorenen in vivo gewonnenen Embryonen exzellenter Qualität besser als nach instrumenteller Besamung (Drost et al., 1999; Putney et al., 1989a). Der Transfer von frischen IVP-Embryonen führte im Sommer ebenfalls zu besseren Trächtigkeitsraten (Al-Katanani et al., 2002a). Dies zeigt, dass der Transfer von Embryonen die Konzeptionsrate bei

hitzegepressten Milchkühen erhöhen kann, indem die kritische Phase der Empfindlichkeit gegenüber Hitzestress der frühen Embryonalstadien umgangen wird.

2.6.3 Einflussfaktoren im Uterus

2.6.3.1 Endometritis

Der Metritis-Komplex besteht aus den drei Erkrankungen: Metritis, Endometritis und Pyometra (Sandals et al., 1979). Die Erkrankungen werden wie folgt definiert (siehe Tab. 5):

Tab. 5 Definitionen der Erkrankungen des Metritis-Komplex; *post partum (p. p.),
** polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)

Erkrankung	Definition	Veröffentlichung
Metritis	Bis 21 Tage p. p.* Unphysiologisch vergrößerter Uterus Übelriechender, rot-bräunlicher uteriner Ausfluss Kombination mit Fieber & systemischen Symptomen	Sheldon et al. (2006)
Endometritis	Entzündung der oberflächlichen Schichten des Endometriums (nicht tiefer als Stratum spongiosum)	Bondurant (1999) LeBlanc et al. (2002) Kasimanickam et al. (2004) Sheldon et al. (2006)
	<table><tr><td><i>Klinische Endometritis (CE):</i> > 20 bzw. 21 Tage p. p. Purulenter Ausfluss Vergrößerter Zervixdurchmesser (> 7,5 cm)</td><td><i>Subklinische Endometritis (SE):</i> > 20 bzw. 21 Tage p. p. Vorhandensein von PMN** im Endometriumsabstrich Kein Genitalkatharr Klinisch gesunde Kühe</td></tr></table>	
<i>Klinische Endometritis (CE):</i> > 20 bzw. 21 Tage p. p. Purulenter Ausfluss Vergrößerter Zervixdurchmesser (> 7,5 cm)	<i>Subklinische Endometritis (SE):</i> > 20 bzw. 21 Tage p. p. Vorhandensein von PMN** im Endometriumsabstrich Kein Genitalkatharr Klinisch gesunde Kühe	
Pyometra	Persistierender Gelbkörper Ansammlung von eitrigem Material im Uteruslumen Meist geschlossene Zervix	Sheldon et al. (2006)

Die gebräuchlichste Technik zur Diagnose einer Subklinischen Endometritis (SE) ist die sogenannte Cytobrush-Methode, die von Kasimanickam et al. (2004) entwickelt wurde und in der Folge in zahlreichen Untersuchungen Anwendung fand (Carvalho et al., 2013; Kaufmann et al., 2009; Madoz et al., 2013; Plöntzke et al., 2010). Dabei wird die Cytobrush unter rektaler Kontrolle und geschützt transzervikal in den Uterus eingeführt und durch drehende Bewegung wird ein zytologischer Abstrich gewonnen (Kasimanickam et al., 2004). Eine weitere gängige Möglichkeit stellt die niedrigvolumige Uterusspülung mit geringen Mengen an Kochsalzlösung dar (Cheong et al., 2011; Galvão et al., 2009; Gilbert et al., 2005). Die Proben werden auf einem Objektträger ausgestrichen (bei der Lavage-Methode nach vorheriger Zentrifugation), gefärbt und mikroskopisch auf die Quantität der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) untersucht. Eine neuere alternative Diagnostik wurde von Pascottini et al. (2015) entwickelt, wobei statt einer Cytobrush ein Klebetape genutzt wird. Mit dem Cytotape gewonnene zytologische Abstriche erzielten gleich gute Ergebnisse hinsichtlich der Auswertung an PMN und der Gesamtzellzahl. Dabei wurden sogar weniger Blutkontaminationen beobachtet.

In den meisten Studien wurde zur Untersuchung auf PMN und zur Diagnose einer SE der Uteruskörper mittels Cytobrush beprobt (Carvalho et al., 2013; Kaufmann et al., 2009; Madoz et al., 2013; Plöntzke et al., 2010). Ebenfalls die niedrigvolumige Uteruslavage wird im Uteruskörper durchgeführt. Der Uterus wird zehn Sekunden lang transrektal massiert, um eine Verteilung der 20 ml Kochsalzlösung zu gewährleisten. Es ist jedoch zu bemerken, dass die Sicherheit der Verteilung in die Uterushörner nicht sicher gewährleistet wird, weshalb anzunehmen ist, dass der kaudale Anteil des Uterus beprobt wird (Gilbert et al., 2005). Es existieren nur wenige Studien, die das Endometrium an verschiedenen Lokalisationen auf das Vorhandensein von PMN untersuchen. Pascottini et al. (2016) untersuchten den Uterus von 32 Kühen nach der Schlachtung. Sie entnahmen Uterusbiopsien und zytologische Proben an acht verschiedenen Lokalisationen: Basis, Mitte und Spitze von je dem linken und rechten Uterushorn sowie links und rechts aus dem Uteruskörper. Sie stellten eine ungleichmäßige Verteilung von PMN zwischen den Lokalisationen fest, wobei signifikant die meisten PMN in den Proben aus dem Uteruskörper und der rechten Hornbasis (nahe der Bifurkation) beobachtet wurden. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass es sinnvoll ist, Proben zur Diagnose von PMN aus dem Uteruskörper zu entnehmen. Pothmann et al. (2019) empfehlen hingegen eine Probenentnahme aus der Basis des rechten Uterushorns, da diese die größte Übereinstimmung der PMN-Zahlen mit den anderen Endometriumslokalisationen aufwies. Zudem wurde festgestellt, dass die Wahrscheinlichkeit, mit nur einer Cytobrush-Probe eine SE (Grenzwert dieser Studie: > 5 % PMN) zu diagnostizieren, bei lediglich 51 % lag. Aus diesem Grund empfehlen die Autoren die Durchführung einer zweiten Cytobrush-Probe an einer zweiten Lokalisation, um die Genauigkeit der Diagnose einer subklinischen Endometritis zu erhöhen. Egberts et al. (2016b) vertreten eine ähnliche Auffassung. Die Untersuchung von drei verschiedenen Lokalisationen (Uteruskörper, linkes und rechtes Uterushorn, jeweils 1,5 cm kranial der Uterusbifurkation) ergab zwar keine signifikanten Unterschiede im Anteil an PMN, jedoch empfehlen die Autoren aufgrund festgestellter tierindividueller Unterschiede in den drei Lokalisationen die Entnahme mehrerer Proben zur Diagnose einer SE.

Obwohl die Infiltration von PMN als diagnostischer Marker für die SE allgemein anerkannt ist, besteht noch Uneinigkeit bezüglich eines Schwellenwerts für den Anteil an PMN in 100 gezählten Zellen des zytologischen Ausstrichs, der eine SE klassifiziert. Dies ist insbesondere darauf zurückzuführen, dass ein gewisser Anteil an PMN im Uterus nach der Geburt physiologisch ist und im Verlauf des Puerperiums und danach abnimmt. Folgende Grenzwerte wurden in verschiedenen Studien definiert (Tab. 6):

Tab. 6 Grenzwerte zur Diagnose einer subklinischen Endometritis (SE) in Abhängigkeit von den Tagen post partum (Übersicht ausgewählter Studien)

Veröffentlichung	Tage post partum	Grenzwert für eine SE [PMN]
<i>Kasimanickam et al. (2005)</i>	20–33	18,0 %
	34–47	10,0 %
<i>Cheong et al. (2011)</i>	40–60	10,0 %
<i>Galvão et al. (2019)</i>	≤ 21	8,5 %
	22–35	6,5 %
	≥ 49	4,0 %
<i>Madoz et al. (2013)</i>	21–33	8,0 %
	34–47	6,0 %
	48–62	4,0 %
	21–62	5,0 %
<i>Plöntzke et al. (2010)</i>	18–38	5,0 %
<i>Gilbert et al. (2005)</i>	40–60	5,0 %
<i>Salasel et al. (2010)</i>	190 ± 40	3,0 %

Eine Reihe von Faktoren wurde als Risikofaktoren für eine SE identifiziert, darunter Geburtsstörungen, Nachgeburtsverhaltung, akute Metritis, die Stallhaltung von Frühlaktierenden in Einstreuställen sowie eine hohe Milchleistung bei Primiparen (Cheong et al., 2011; Salasel et al., 2010). Die Parität wurde hingegen nicht als Einflussfaktor für das Vorkommen einer SE ausgemacht (Gilbert et al., 2005). In der Literatur besteht Konsens darüber, dass eine SE einen negativen Einfluss auf die Fertilität bei Milchkühen ausübt. Diverse Studien belegten eine reduzierte Trächtigkeitsrate, verlängerte Günstzeiten und/oder einen geringeren Erstbesamungserfolg bei an subklinischer Endometritis erkrankten, insbesondere älteren Kühen (Cheong et al., 2011; Gilbert et al., 2005; Madoz et al., 2013; Ricci et al., 2015). Lediglich einige wenige Autoren wie Santos et al. (2009), die den Einfluss einer SE bei Kühen von Fleischrassen untersuchten sowie Plöntzke et al. (2010), die extensiv gehaltene Milchkühe untersuchten, stellten keinen Einfluss einer SE auf die Fertilität fest. Die Mehrheit der Studien untersuchte den endometrialen PMN-Anteil am Ende der postpartalen Phase bis 60 Tage post partum. Nur wenige Studien untersuchten den PMN-Anteil im Uterus zu einem späteren Zeitpunkt (Kaufmann et al., 2009; Salasel et al., 2010). Kaufmann et al. (2009) untersuchten das Endometrium des Uteruskörpers mittels Cytobrush vier Stunden nach der ersten KB. Die Kühe wurden anhand des PMN-Gehaltes in drei Gruppen eingeteilt: 0 %, > 0–15 % und > 15 % PMN. Der Erstbesamungserfolg war signifikant höher in der Gruppe mit > 0–15 % PMN als in den beiden anderen Gruppen, wobei dieser Effekt bei Primiparen am ausgeprägtesten war. Im Vergleich mit Kontrolltieren, die nicht mit einer Cytobrush beprobt wurden, ergab sich kein Einfluss der Probenentnahme auf die Konzeptionsrate. Die Autoren dieser Studie stellten die Hypothese auf, dass ein gewisser

PMN-Einstrom in das Endometrium physiologisch ist und sich als vorteilhaft für die Trächtigkeitswahrscheinlichkeit darstellt (Kaufmann et al., 2009).

Im Zuge einer subklinischen Endometritis wird eine erhöhte endometriale mRNA (messenger ribonucleic acid)-Expression verschiedener proinflammatorischer Mediatoren, wie Zytokine, antimikrobielle Peptide und Akute Phase Proteine, beobachtet. Dabei werden unter anderem die Zytokine CXCL5, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 sowie TNF α bei einem entzündeten Endometrium hochreguliert (Fischer et al., 2010; Gabler et al., 2009, 2010). Ein entzündetes Endometrium kann sich negativ auf die Embryonenqualität auswirken. So untersuchten Hill und Gilbert (2008) den Einfluss eines aseptisch entzündeten Uterusmilieus auf IVP-Embryonen. Zu diesem Zweck kultivierten sie fünf Tage alte Embryonen für zwei Tage in verschiedenen Medien. Eine Gruppe Embryonen wurde in einem Medium kultiviert, welches aus dem Uterus gesunder Holsteinkühe gewonnen wurde. Im Anschluss an die erste Entnahme des Mediums erfolgte eine Infusion des Uterus mit Glykogen, um eine aseptische endometriale Entzündung auszulösen. Sechs Stunden später wurde erneut Medium aus den nun entzündeten Uteri gewonnen. In diesem Medium wurde eine weitere Gruppe Embryonen kultiviert. Zusätzlich gab es zwei Kontrollgruppen (Kultivierungsmedium, Kultivierungsmedium mit Serum). Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Blastozystenrate zwischen dem Uterusmedium gesunder Kühe (49,3 %), dem entzündeten Uterusmedium (42,2 %) und dem Kultivierungsmedium mit Serum (50,9 %). Einzig in der Kontrolle mit reinem Kultivierungsmedium war die Blastozystenrate signifikant geringer (16,9 %). Bei weiteren Untersuchungen der Blastozysten wurde jedoch festgestellt, dass die Blastozysten aus dem entzündeten Uterusmedium eine signifikant geringere Anzahl an Trophektodermzellen aufwiesen, wobei die innere Zellmasse unverändert blieb. In der Folge kam es zu einem signifikanten Anstieg der inneren Zellmasse-Trophektoderm-Ratio. Dies hatte vermutlich einen negativen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Embryonen. Eine veränderte Embryonenqualität kann ein Grund für frühe embryonale Mortalität bei Kühen mit subklinischer Endometritis sein (Hill & Gilbert, 2008).

Der Einfluss einer subklinischen Endometritis während und nach einer Superovulation ist bislang nur Gegenstand weniger Studien. Hoelker et al. (2012) analysierten den Einfluss einer SE auf die endometriale und embryonale Genexpression. Zu diesem Zweck wurden superovulierte Holsteinkühe zwei Stunden vor der ersten Besamung (Tag 0) und direkt nach der Embryonengewinnung (Tag 7) mittels Cytobrush im Uteruskörper beprobt. Tiere mit 0 % PMN wurden als gesund und Tiere mit > 0 % wurden mit subklinischer Endometritis diagnostiziert. Sowohl eine SE an Tag 0 als auch an Tag 7 führten zu einer veränderten endometrialen Expression von Genen der Zelladhäsion und der Immunmodulation. Eine SE an Tag 7 beeinflusste ebenfalls die embryonale Expression von Genen, die mit der

Membranstabilität, dem Zellzyklus und der Apoptose zusammenhängen. Spülungen von Kühen, bei denen an Tag 0 keine PMN diagnostiziert wurden, jedoch an Tag 7 eine SE aufwiesen, erzielten signifikant die meisten gesamt gewonnenen und transfertauglichen Embryonen. Kühe, die an beiden Tagen gesund diagnostiziert wurden, wiesen die höchste Anzahl an Embryonen im Blastozystenstadium auf. Die Charakteristika der Blastozystenqualität, wie die innere Zellmasse, unterschieden sich nicht. Ähnliche Ergebnisse erzielten Drillich et al. (2012), die Kühe anhand des PMN-Anteils im Endometrium zum Zeitpunkt der KB (Tag 0) und zum Zeitpunkt der Embryongewinnung (Tag 7) klassifizierten. Tiere wurden negativ bei einem PMN-Anteil von 0 % und positiv bei einem PMN-Anteil von > 0 % klassifiziert. Es konnte festgestellt werden, dass Kühe, die an Tag 0 negativ getestet wurden, tendenziell mehr gesamt gewonnene Embryonen (10,3) sowie transfertaugliche Embryonen (6,8) aufwiesen als Kühe, die an Tag 0 SE positiv diagnostiziert wurden (6,9 gesamt gewonnene und 3,7 transfertaugliche Embryonen). Die größte Anzahl transfertauglicher Embryonen ($8,8 \pm 6,8$) wurde von Kühen gewonnen, deren PMN-Anteil von 0 % an Tag 0 auf einen positiven PMN-Anteil bei der Spülung anstieg, im Vergleich mit allen anderen Kombinationen des PMN-Anteils an Tag 0 und 7. Die Tiere der Gruppe, die an Tag 0 hohe positive PMN-Anteile aufwies, die zu Tag 7 auf weniger stark positive Werte sank, erzielten signifikant die schlechtesten Ergebnisse hinsichtlich der Anzahl an Corpora lutea ($7,2 \pm 4,7$) und der transfertauglichen Embryonen ($1,9 \pm 3,9$) im Vergleich zur Gruppe mit den besten Ergebnissen. Dies spiegelt sich jedoch in den prozentualen Anteilen transfertauglicher Embryonen nur numerisch wider.

Studien ohne dynamische Untersuchung des PMN-Anteils über zwei Zeitpunkte stellten einen negativen Einfluss einer subklinischen Endometritis am Tag der Follikelablation vor dem Start der Superstimulation (Carvalho et al., 2013) bzw. am Tag 6–13 des Zyklus (Egberts et al., 2016a) auf die Embryonenqualität fest. Carvalho et al. (2013) definierten eine SE ab einem PMN-Anteil von > 5 %, wobei bei SE-positiven Tieren ein tendenzieller Rückgang der Ausspülrate und der Befruchtungsrate zu beobachten war. Die Befruchtungsrate von Kühen mit 0 % PMN lag bei 80 % und sank kontinuierlich auf weniger als 50 %, bei Kühen mit einem PMN-Anteil von > 50 %. Bei der Einteilung in drei Gruppen (< 1 %, 1–5 %, > 5 % PMN) stellten Carvalho et al. (2013) keine Unterschiede in der Anzahl der Gelbkörper, jedoch in der Ausspülrate mit steigendem PMN-Anteil bei den Kühen fest. Die Anzahl der befruchteten ($2,3 \pm 0,7$), transfertauglichen ($1,8 \pm 0,6$) und tiefgefriertauglichen ($1,8 \pm 0,6$) Embryonen war in der Gruppe mit > 5 % PMN signifikant geringer als in den beiden anderen Gruppen (< 1 % PMN: befruchtet $5,9 \pm 7,7$, transfertauglich $4,6 \pm 0,7$, tiefgefriertauglich $4,4 \pm 0,7$; 1–5 % PMN: befruchtet $7,4 \pm 1,9$, transfertauglich $5,9 \pm 1,7$, tiefgefriertauglich $5,3 \pm 1,6$). Da jedoch auch die Anzahl der gesamt gewonnenen Embryonen und Oozyten vermutlich aufgrund der

signifikant geringeren Ausspülrate bei Kühen mit PMN > 5 % tendenziell geringer ($p = 0,01$) war, spiegeln sich die schlechteren Erfolgsparameter der Embryonengewinnung im Anteil der transfertauglichen sowie tiefgefriertauglichen nicht signifikant und im Anteil befruchteter Embryonen nur tendenziell ($p = 0,14$) wider. Die ersten Ergebnisse von Egberts et al. (2016a) ergaben ebenfalls einen negativen Einfluss einer SE zum Zeitpunkt der Voruntersuchung auf die Embryonenqualität. In dieser Studie wurde sowohl der Uteruskörper als auch beide Uterushörner beprobt. Fünfzig Prozent der 62 untersuchten Tiere wurden als risikobehaftet eingestuft, da mindestens eine der drei Lokalisationen einen PMN-Anteil von > 3 % aufwies. In dieser Auswertung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der risikobehafteten und nicht-risikobehafteten Gruppe hinsichtlich der Anzahl gesamt gewonnener und transfertauglicher Embryonen festgestellt werden. Beim Vergleich der Hornspülungen eines Tieres wurde jedoch ein signifikant geringerer Anteil transfertauglicher Embryonen (53,9 % vs. 80,0 %) im betroffenen Horn im Vergleich zum nicht betroffenen Horn festgestellt. Der Anteil degenerierter Embryonen und auch der Anteil unbefruchteter Oozyten war im betroffenen Horn signifikant höher. Die beiden Studien (Carvalho et al., 2013; Egberts et al., 2016a) stützen die These, dass ein zunehmender Anteil an PMN im Uterus einen negativen Einfluss auf die Befruchtung haben kann. Dies könnte darin begründet sein, dass PMN zu einer Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) führen (Aloé et al., 2012), die für Spermien schädlich sein können. Dies wurde in vitro bestätigt, da die Exposition von Spermien gegenüber Verbindungen die ROS erhöhen (Menadion und *tert*-Butylhydroperoxid), die Befruchtungs- und Blastozystenrate in der IVP verringerten (Hendricks & Hansen, 2010).

2.7 Einfluss des Uterusmikrobioms

Das Uterusmikrobiom stellt einen weiteren Einflussfaktor auf die Anzahl und Qualität von Embryonen nach einer Superovulation dar und bildet den Schwerpunkt dieser Arbeit. Daher wird diesem Faktor ein eigenes Kapitel gewidmet.

Die Erforschung verschiedener Mikrobiome hat sich in den letzten Jahrzehnten rasant weiterentwickelt und ist zu einem Thema von großem wissenschaftlichem und öffentlichem Interesse geworden. Der Begriff „Mikrobiota“ setzt sich aus dem altgriechischen Wort „Mikro“ (*μικρός*, klein) und dem Begriff „Biota“ (*βίота*) zusammen, was so viel bedeutet wie „die Lebewesen eines Ökosystems oder eines bestimmten Gebiets“. Der Begriff „Mikrobiom“ setzt sich aus den altgriechischen Begriffen „Mikro“ und „Bios“ (*βίος*, Leben) zusammen (Berg et al., 2020). Eine klare und allgemein anerkannte Definition des Begriffs „Mikrobiom“ fehlt jedoch. Laut Berg et al. (2020) stellt die Mikrobiota die Gesamtheit der Mikroorganismen (Bakterien, Archaeen, Protozoen, Pilze und Algen) dar. Das Mikrobiom ist ein dynamisches und interaktives System aus der Mikrobiota und ihrem Lebensraum. Neben den beteiligten Mikroorganismen umfasst es auch ihre Interaktion miteinander und mit der Umgebung in einem „Aktionsraum“, der unter anderem durch mikrobielle Strukturen, Stoffwechselprodukte sowie Relikt-DNA (DNA von abgestorbenen Mikroorganismen) definiert ist (siehe Abb.8).

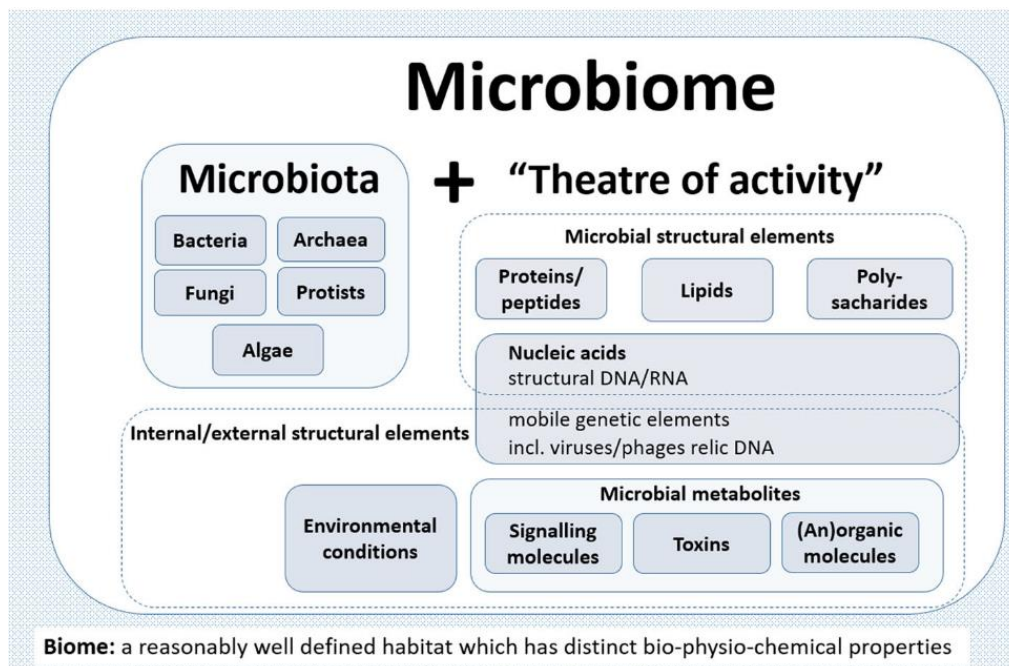


Abb. 8 Schematische Darstellung der Zusammensetzung des Mikrobioms aus Mikrobiota und dem Aktionsraum (Berg et al., 2020)

Die Gebärmutter galt traditionell als steril, da davon ausgegangen wurde, dass die Zervix eine Barriere darstellt, die das Aufsteigen von Bakterien aus dem unteren Genitaltrakt in die Gebärmutter verhindert. Ein Eintrag von Bakterien während der Geburt ist bekannt, da zu diesem Zeitpunkt die physischen Barrieren der Vulva, Vagina und Zervix geschwächt sind, sodass Bakterien aus der Umgebung sowie von der Haut und aus dem Kot in den Genitaltrakt eindringen können (Bromfield et al., 2015). Die Gebärmutter nahezu jeder Kuh ist nach der Geburt mit einem breiten Spektrum an Bakterienarten besiedelt. Der Prozentsatz der nachweisbaren Bakterien im Uterus nimmt mit fortschreitender Zeit nach der Geburt jedoch rasch ab (Elliott et al., 1968; Griffin et al., 1974; Sheldon et al., 2002a, 2002b). In der Regel werden bakterielle Infektionen drei bis fünf Wochen post partum eliminiert (Bromfield et al., 2015). Durch die Anwendung der Hochdurchsatz-Sequenzierung wurde jedoch nun bestätigt, dass der Uterus im Anschluss keinesfalls frei von Bakterien ist. Moore et al. (2017) und Karstrup et al. (2017) bewiesen erstmals, dass der Uterus beim Rind auch während einer intakten Trächtigkeit bakteriell besiedelt ist. Proben von Plazentomen, von Plazenta aus dem Bereich zwischen den Kotyledonen sowie von Amnionflüssigkeit von tragenden Schlachtkühen im letzten Trächtigkeitsdrittel, wurden mittels 16S ribosomaler RNA-Genanalyse untersucht. Die drei am häufigsten vorkommenden Bakterienstämme in diesen Proben waren die Phyla *Bacillota* (ehemals *Firmicutes*), *Bacteroidota* (ehemals *Bacteroidetes*) und *Proteobacteria* (Moore et al., 2017). Darüber hinaus konnten Bakterien nachgewiesen werden, die in der postpartalen Phase als pathogen oder potenziell pathogen erachtet werden, darunter *Fusobacterium necrophorum*, *Trueperella pyogenes* und *Acinetobacter* spp. (species plurales, Karstrup et al., 2017; Moore et al., 2017). Auch die Untersuchungen von Moraes et al. (2024) bestätigten die Existenz eines Mikrobioms mit geringer Biomasse im tragenden, gesunden Uterus. Ebenfalls im Uterus von Kühen in der mittleren Laktationsphase konnte ein Mikrobiom mit geringer Biomasse festgestellt werden (Lietaer et al., 2021). Der Uterus von fünf Kühen wurde direkt nach dem Schlachtprozess je an der Spitze und der Basis beider Uterushörner beprobt. Die Auswertung der Ergebnisse ergab keine Unterschiede in der Zusammensetzung des Mikrobioms und der DNA-Quantität zwischen den verschiedenen Lokalisationen. Eine Kontrollprobe der Vagina ergab, dass sich die Zusammensetzung des Mikrobioms des Uterus und der Vagina unterschied. Dies deutet darauf hin, dass die Zervix eine funktionelle Kompartimentierung zwischen Uterus und Vagina ermöglicht (Lietaer et al., 2021).

Die am häufigsten aus einem erkrankten Uterus isolierten Bakterienarten sind *Trueperella* (*T.*) *pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum*, *Escherichia* (*E.*) *coli* und *Prevotella* spp. (Sheldon et al., 2006). Wang et al. (2018a) analysierten mittels 16S ribosomaler RNA (rRNA)-Genanalyse Uterusspülproben von Kühen mit klinischer Endometritis (CE), subklinischer Endometritis (SE)

oder mit einem gesunden Uterus 30 Tage nach der Geburt. Die vergleichende Betrachtung ergab, dass das Mikrobiom bei einem gesunden Uterus, bei einer SE sowie CE eine ähnliche komplexe mikrobielle Vielfalt sowie ähnliche Bakterienarten aufwies. Es konnten jedoch signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft zwischen gesunden und CE-Kühen festgestellt werden. Die Zusammensetzung eines an subklinischer Endometritis erkrankten Uterus unterschied sich hingegen nicht von einem gesunden Uterus. In gesunden sowie SE-Uteri waren die fünf am häufigsten nachgewiesenen Bakteriengattungen *Lactococcus*, *Bacillus*, *Solibacillus*, *Pseudomonas* und *Arthrobacter*. In CE-Kühen waren die vier am häufigsten nachgewiesenen Gattungen *Lactococcus*, *Bacillus*, *Fusobacterium* und *Solibacillus*. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass sich die Gattungen in ihrer relativen Häufigkeit unterschieden. Bei CE-Kühen wurde ein erhöhtes Auftreten von *Fusobacterium* sowie die einzigartige Präsenz von *Trueperella* und *Peptoniphilus* im Mikrobiom des Uterus festgestellt. Bei SE-Kühen waren bekannte intrauterine Krankheitserreger kaum vorhanden und das uterine Mikrobiom war durch eine Anreicherung von *Lactobacillus* und *Acinetobacter* gekennzeichnet (Wang et al., 2018a). Pascottini et al. (2020) untersuchten das uterine Mikrobiom mittels der Cytobrush-Methode an den Tagen 10, 21 und 31 post partum. Auch in dieser Studie konnten keine signifikanten Unterschiede im Mikrobiom von SE-Kühen und gesunden Kühen festgestellt werden, jedoch wurden signifikante Unterschiede zum Mikrobiom von CE-Kühen beobachtet. Das Mikrobiom von CE-Kühen zeichnete sich durch eine höhere relative Häufigkeit der Phyla *Bacteroidota* und *Fusobacteria* sowie der Gattung *Trueperella* im Vergleich zu gesunden und SE-Tieren aus. *T. pyogenes* war die vorherrschende Bakterienart, die bei Kühen mit CE kultiviert wurde. Zudem wies das uterine Mikrobiom von Kühen mit CE einen Verlust an bakterieller Vielfalt auf. In gesunden Kühen und Kühen mit SE wurde hingegen ein breiteres Spektrum an Bakterienarten nachgewiesen (Pascottini et al., 2020). Der Verlust der Bakteriendiversität im Mikrobiom von Tieren mit einem gestörten Puerperium (Nachgeburtsverhaltung, Metritis) wurde ebenfalls von Kronfeld et al. (2022) in Kühen 14 Tage p.p. festgestellt. In diesen Untersuchungen dominierten *Fusobacterium* spp., *Bacteroides* spp. und *Helcococcus* spp. das Mikrobiom der kranken Tiere. Es konnten keine Unterschiede in der Häufigkeit von *T. pyogenes* und *E. coli* zwischen gesunden und erkrankten Tieren festgestellt werden. Obwohl in zahlreichen Studien ein verändertes Mikrobiom von CE-Kühen im Vergleich zu SE- und gesunden Kühen festgestellt wurde, besteht keine gesicherte Korrelation zwischen dem Nachweis spezifischer Bakterien, der Wachstumsrate von Bakterien auf dem Nährboden und dem Anteil an PMN im Endometrium, bzw. dem Schweregrad der Endometritis (Prunner et al., 2014; Ricci et al., 2015). So wurde sowohl bei *E. coli*, als auch bei α -hämolisierenden Streptokokken und Koagulase-negativen Streptokokken (KNS) kein signifikanter Zusammenhang mit dem Anteil an PMN im Endometrium festgestellt. Lediglich das

Vorkommen von *T. pyogenes* schien deutlich mit einem erhöhten Anteil von PMN im Endometrium zu korrelieren (Madoz et al., 2014; Westermann et al., 2010).

Das angeborene Immunsystem der Gebärmutter ist für die Erkennung pathogener Keime verantwortlich. Bakterien, die in die Gebärmutter eindringen, werden über Toll-like Rezeptoren (TLR) erkannt. Diese TLRs sind in der Lage, pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) wie das Lipopolysaccharid (LPS) von gramnegativen Bakterien, also auch bakterielle Lipopeptide und Nukleotide zu binden (Beutler, 2009). In Abb. 9 sind PAMPs und die jeweils zugehörigen TLR beispielhaft dargestellt.

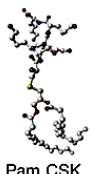
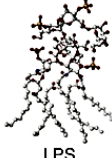
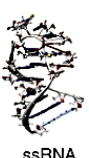
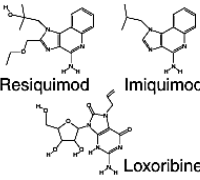
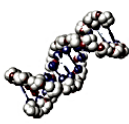
Receptor	TLR2/1 or 2/6	TLR3	TLR4	TLR5	TLR7	TLR9
Ligands	Lipopeptides	Poly I:C, dsRNA	LPS	Flagellin	ssRNA, resiquimod, imiquimod, loxoribine	Unmethylated DNA, CpG-DNA
Source	Gram-positive bacteria, fungi	Viruses	Gram-negative bacteria	Bacterial flagellum	Viruses	Bacteria
Examples	 Pam ₂ CSK ₄	 dsRNA	 LPS	 Flagellin	 ssRNA  Resiquimod Imiquimod Loxoribine	 CpG-DNA

Abb. 9 Verschiedene Toll-like Rezeptoren (TLR) und ihre Liganden (Moresco et al., 2011)

Es konnte in der Forschung festgestellt werden, dass endometriale Zellen unter anderem den TLR 4-CD14 Rezeptor-Komplex exprimieren, welcher für die Erkennung von LPS notwendig ist (Herath et al., 2006). Die Bindung zwischen TLR und PAMP löst eine Signalkaskade aus, welche eine Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen bewirkt, die phagozytische Zellen in das Endometrium rekrutieren (Ghasemi et al., 2012; Zerbe et al., 2003). Eine bakterielle Infektion bedingt demnach eine Entzündung des uterinen Epithels und des Stratum compactum, welches zu einer Subfertilität der infizierten Kühe führt (Bonnett et al., 1991, 1993). Die mit einer Gebärmutterinfektion einhergehende Subfertilität wird sowohl durch eine Störung der Ovarfunktion als auch durch lokale Schädigungen des Uterus bedingt. Die Subfertilität scheint auch nach dem klinischen Abklingen der Krankheit weiter zu bestehen (Sheldon & Dobson, 2004). Williams et al. (2007a) und Sheldon et al. (2002b) beobachteten bei Untersuchungen an postpartalen Holsteinkühen, dass eine stärkere bakterielle Kontamination des Uteruslumens sieben Tage p.p. die Follikulogenese der Eierstöcke störte. Im Vergleich zu postpartalen Kühen mit einer moderaten uterinen Keimbesiedlung, zeigten die Tiere mit einer hohen Keimbesiedlung dominante Follikel mit kleineren Durchmessern und geringerer Wachstumsrate sowie geringere Plasma-Östradiolwerte. In beiden Untersuchungen konnte jedoch kein Einfluss der uterinen Bakterienlast auf die FSH-Ausschüttung festgestellt werden. Ebenfalls wurden keine Unterschiede in der

Rekrutierung der ersten Follikel, dem Intervall zwischen der Geburt und der Follikeldominanz, sowie dem Ausgang des ersten dominanten Follikels p.p., in Abhängigkeit einer starken oder schwachen uterinen Besiedlung nach der Geburt, beobachtet (Sheldon et al., 2002b; Williams et al., 2007a).

Die Untersuchung der Auswirkungen einer Gebärmutterinfektion auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse konzentriert sich primär auf die Rolle des Endotoxins LPS, welches ein Bestandteil der Zellwände gramnegativer Bakterien ist. Tatsächlich kann LPS aus dem postpartalen Uteruslumen in den peripheren Kreislauf aufgenommen werden (Herath et al., 2009; Mateus et al., 2003; Peter et al., 1990). Die uterine Endotoxinlast steigt mit dem Grad der Endometritis und insbesondere bei schweren Fällen sind die Plasma-LPS-Konzentrationen erhöht (Mateus et al., 2003). Williams et al. (2007a) konnten eine Konzentration von 0,05–0,99 ng/ml LPS im Plasma von Kühen nachweisen. Dabei wurde jedoch kein Unterschied zwischen Kühen mit einer starken oder schwachen bakteriellen Besiedlung an Tag 7 p. p. festgestellt.

Der Einfluss einer intrauterinen oder systemischen LPS-Challenge auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse sowie die Ovulation wurde in verschiedenen Studien untersucht (siehe Tab. 7)

Tab. 7 Ergebnisse verschiedener Studien über den Einfluss einer intrauterinen oder systemischen Lipopolysaccharid (LPS)-Challenge auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse sowie die Ovulation

Veröffentlichung	Versuchsaufbau	LPS-Challenge	Ergebnisse
<i>Peter et al.</i> (1989)	Holsteinfärsen N = 8 Synchronisierung des Zyklus mit 2x PGF _{2α}	Uterusinfusionen 10x alle 6 h mit: A) pyrogenfreiem Wasser (Kontrolle) B) LPS 5 µg/kg Körpergewicht	A) Bei allen Tiere Ovulation innerhalb von 72–96 h Keine abweichenden Plasma- Kortisolwerte B) Kein Tier mit Ovulation Bildung von Follikelzysten <i>Kein</i> Anstieg der LH- Konzentration ↑ Plasma-Kortisolwerte nach jeder Infusion
<i>Williams et al.</i> (2008b)	Postpubertäre Holsteinrinder N = 8 Synchronisierung des Zyklus mit 2x PGF _{2α}	Uterusinfusion alle 6 h für 9 Tage A) sterile PBS- Lsg. (Kontrolle) B) LPS 3 µg/kg Körpergewicht	B) zu A) ↑ Ausbleiben der Ovulation <i>Kein</i> Unterschied hinsichtlich: LH-Konzentration, LH-Peak, Östradiolkonzentration, Durchmesser des dominanten Follikels

Tab. 7 Ergebnisse verschiedener Studien über den Einfluss einer intrauterinen oder systemischen LPS-Challenge auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse sowie die Ovulation (1. Fortsetzung)

Veröffentlichung	Versuchsaufbau	LPS-Challenge	Ergebnisse
<i>Suzuki et al.</i> (2001)	Holsteinrinder N = 12 Synchronisierung des Zyklus mit 1x PGF _{2α}	Injektion i. v. 42 h nach PGF _{2α} - Injektion A) sterile NaCl-Lsg. B) LPS 5 µg/kg Körpergewicht	B) zu A) ↑ längere Zeit von PGF _{2α} - Injektion bis zur Ovulation ↓ LH-Pulsfrequenz <i>Kein</i> Unterschied hinsichtlich: Durchschnittskonzentration und Amplitude von LH ↑ Plasmaprogesteron- konzentration ↑ Plasmakortisolkonzentration ↓ Östradiolkonzentration
<i>Battaglia et al.</i> (1997)	Suffolk Schafe nach Ovarektomie N = 12	Injektion i. v. LPS 400 ng/kg Körpergewicht	↓ mittlere GnRH- Konzentration ↓ GnRH-Pulsamplitude <i>Kein</i> Einfluss auf GnRH- Pulsfrequenz ↓ LH-Pulsfrequenz ↑ Plasmaprogesteron- konzentration ↑ Plasmakortisolkonzentration

Diese Ergebnisse führten Peter et al. (1989) und Suzuki et al. (2001) zu der Schlussfolgerung, dass eine endotoxinbedingte Erhöhung der Kortisolkonzentration und Verringerung der präovulatorischen Östradiolkonzentration die Ovulation verhindert, indem der präovulatorische LH-Anstieg ausbleibt. Battaglia et al. (1997) stellten die Hypothese auf, dass LPS die reproduktive neuroendokrine Achse bereits auf Ebene der des Hypothalamus hemmt, was zu einer unterdrückten pulsatilen GnRH- und folglich gehemmten LH-Sekretion führt.

Das bakterielle Endotoxin LPS nimmt auch direkt im Ovar Einfluss. In den Granulosazellen führt LPS zu einer lokalen Suppression der Östradiolkonzentration, die durch eine Downregulation des Transkriptoms des CYP19A1-Enzyms bedingt ist (Herath et al., 2007; Williams et al., 2008b). LPS reichert sich in der Follikelflüssigkeit der dominanten Follikel von Kühen mit Uterusinfektionen an. Dort nimmt es direkten Einfluss auf die sich im Follikel entwickelnden Oozyten. In der IVP kann der Einfluss verschiedener LPS-Konzentrationen präzise untersucht werden (siehe Tab. 8).

Tab. 8 Ergebnisse verschiedener Studien über den Einfluss unterschiedlicher Lipopolysaccharid (LPS)-Konzentrationen in der In-vitro-Produktion (IVP)

Veröffentlichung	Tierart	Schritt der IVP	LPS-Konzentration	Ergebnisse
<i>Soto et al. (2003)</i>	Rind	IVM	0,01 ng/ml bis 1 µg/ml	Kein Einfluss auf Teilungsrate ↓ Blastozystenrate bei 0,1 & 1 µg/ml
		IVC		↓ Teilungsrate bei 0,1 & 1 µg/ml Kein Einfluss auf Blastozystenrate
<i>Bromfield und Sheldon (2011)</i>	Rind	IVM	1 µg/ml 10 µg/ml	↑ meiotischer Arrest bei 10 µg/ml ↓ Germinal-Vesicle-Breakdown (GVBD) bei 10 µg/ml
<i>Zhao et al. (2017)</i>	Rind	IVM	1 µg/ml 10 µg/ml	↓ Rate der Polkörperextrusion bei 10 µg/ml
<i>Rincón et al. (2019)</i>	Rind	IVM	0,1 µg/ml 1 µg/ml 5 µg/ml	↓ Maturationsrate bei 1 & 5 µg/ml Kein Einfluss auf Teilungs- & Blastozystenrate
		IVC		Kein Einfluss auf Teilungs- & Blastozystenrate
<i>Heydari et al. (2020)</i>	Schaf	IVM	0,01 µg/ml 0,1 µg/ml 1 µg/ml 10 µg/ml	↓ Maturationsrate bei 10 µg/ml Kein Einfluss auf Teilungsrate ↓ Blastozystenrate ab 1 µg/ml
<i>Granacher et al. (2023)</i>	Rind	IVM	10 µg/ml	↓ Maturationsrate bei 10 µg/ml Kein Einfluss auf Teilungs- & Blastozystenrate
<i>Castro et al. (2024)</i>	Rind	IVM	0,01 µg/ml 0,1 µg/ml 1 µg/ml	Kein Einfluss auf Maturationsrate ↓ (tendenziell) Teilungsrate bis Morulastadium bei 1 µg/ml ↓ Blastozystenrate bei 0,1 & 1 µg/ml
<i>Tariq et al. (2025)</i>	Rind	IVM	1 µg/ml	↓ Blastozystenrate bei 1 µg/ml
<i>Granacher et al. (2026)</i>	Rind	IVM	10 µg/ml	Kein Einfluss auf Teilungs- & Blastozystenrate Keine veränderten Gen-Transkripte (u. a. <i>BAX</i> , <i>BCL2L1</i> , <i>HSPA1A</i>)

Rincón et al. (2019) konnten jedoch eine reduzierte Teilungsrate beobachten, wenn Kühe drei Tage vor dem OPU mit 0,5 µg/kg LPS intravenös behandelt und die gewonnenen Eizellen für eine IVP ohne weitere LPS-Last verwendet wurden. Sowohl in ihrem reinen In-vitro- als auch im OPU-Versuch konnten Rincón et al. (2019) keine Veränderung der Zellzahl pro Embryo und übereinstimmend mit Granacher et al. (2026) keine veränderte Genexpression im Embryo feststellen. Piersanti et al. (2019) stellten bei Oozyten nach IVM mit LPS eine deutliche Auswirkung auf die Expression von verschiedenen Transkripten in den Eizellen fest. In den Oozyten wurden 31 veränderte Transkripte (darunter *ACVR1V*, *BMP15*, *DNMT3A*) und in den KOK 12 veränderte Transkripte (darunter *AREG*, *FGF4*, *PIK3IP1*) beobachtet. Die Autoren dieser Studie vermuten, dass die veränderte Transkriptmenge in den Eizellen mit der reduzierten meiotischen Reifung und Embryonalentwicklung zusammenhängt.

Nicht nur die Follikulo- und Oogenese wird durch LPS beeinflusst, auch die Gelbkörperbildung wird gestört. Die Auswirkungen einer Gebärmutterinfektion auf den Gelbkörper sind jedoch noch unklar. Tatsächlich werden Infektionen sowohl mit einer vorzeitigen Rückbildung des Corpus luteum als auch mit einem Versagen der Luteolyse und einer daraus resultierenden verlängerten Lutealphase in Verbindung gebracht. In der Studie von Mateus et al. (2003) wurden 14 Milchkühe mit puerperaler Metritis untersucht. Die Kühe mit starker Endometritis wiesen signifikant höhere Konzentrationen von dem Plasmametaboliten des uterin sezernierten $\text{PGF}_{2\alpha}$ (PGFM) auf als Kühe mit milder Endometritis. Auch Nakao et al. (1997) stellten bei Tieren mit Dystokie oder gestörtem Puerperium signifikant höhere PGFM-Konzentrationen fest, jedoch über einen kürzeren Zeitraum, als bei Kühen mit ungestörtem Puerperium. $\text{PGF}_{2\alpha}$ wirkt luteolytisch und könnte somit eine Erklärung für eine vorzeitige Rückbildung des Gelbkörpers liefern (McCracken et al., 1972). In den Untersuchungen von Williams et al. (2007a) wurden bei Kühen mit starker bakterieller Kontamination im Uterus im Anschluss an die Ovulationen von kleineren dominanten Follikeln auch kleinere Gelbkörper beobachtet. Die Plasmaprogesteronkonzentration war jedoch nur tendenziell geringer bei den Tieren mit starker Uteruskontamination. Die PGFM-Konzentrationen unterschieden sich zwischen Tieren mit starker oder milder bakterieller Kontamination in dieser Untersuchung nicht. Ähnliches beobachteten Herath et al. (2009) in ihren In-vivo-Untersuchungen von postpartalen Kühen. Kühe, die eine Uterusinfektion mit *E. coli* aufwiesen, wiesen höhere Plasmakonzentrationen an LPS und dem luteotropen Prostaglandin E_2 (PGE_2) auf im Vergleich zu Kühen mit ungestörtem Puerperium. Die Konzentration an PGFM blieb unverändert. Dies bestätigte sich auch in ihren In-vitro-Versuchen (Herath et al., 2009). Uterusgewebe von gesunden Schlachtfärsen produzierte nach Inkubation mit LPS signifikant mehr PGE_2 als PGFM (Ratio: 2,75:1). Auch bei einer LPS-Inkubation von uterinen Stroma- und Epithelzellen kam es zu einem stärkeren Anstieg der PGE_2 -Sekretion im Vergleich zur $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Sekretion. Die Autoren folgern aus diesen Ergebnissen, dass eine LPS-Detektion der Endometriumszellen eine Akkumulation von luteotropen PGE_2 anstelle von $\text{PGF}_{2\alpha}$ stimuliert, welches einen Mechanismus zur Erklärung einer prolongierten Lutealphase bei Tieren mit Gebärmuttererkrankungen darstellt. Bereits Herath et al. (2006) konnten in In-vitro-Versuchen nach LPS-Inkubation von Endometriumszellen eine vermehrte PGE_2 -Sekretion im Vergleich zur $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Sekretion feststellen. Eine Vorinkubation der Stroma- und Epithelzellen mit Östradiol oder Progesteron für 48 Stunden resultierte in einer signifikanten Reduktion der Prostaglandinproduktion während der LPS-Inkubation, wobei dieser Effekt bei einer Progesteroninkubation am stärksten ausfiel. Dies legt nahe, dass die Steroidhormone eine Rolle in der uterinen Antwort auf bakterielle Infektionen einnehmen können. Die Downregulierung des uterinen Immunsystems durch Progesteron, unter anderem bedingt durch eine Runterregulierung der

Prostaglandinproduktion, wird auch in der Übersichtsarbeit von Lewis (2003) beschrieben. Auch eine intravenöse Verabreichung von 0,5 µg/kg LPS 10 Tage nach der Ovulation, führte bei zyklischen Holsteinrindern innerhalb von 24 Stunden zu einer signifikanten Reduktion des Gelbkörperdurchmessers. Ebenso der luteale Blutfluss war ab 3 Stunden nach der LPS-Injektion für 72 Stunden signifikant reduziert. Die Plasmaprogesteron-, PGFM- und PGE₂-Konzentrationen stiegen innerhalb von Minuten bis Stunden signifikant an (Herzog et al., 2012).

Die erhöhten LPS-Konzentrationen im Uterus (Mateus et al., 2003; Williams et al., 2007a) haben auch einen direkten lokalen Einfluss. Guo et al. (2019) setzten in ihren In-vitro-Versuchen Endometriumszellen einer LPS-Konzentration von 2 µg/ml aus. Die Genanalyse zeigte, dass 2035 Gene nach LPS-Inkubation anders exprimiert werden als in der Kontrollgruppe. Gene der Immunantwort, der Reaktion auf Stress und auf externe Stimuli, der katalytischen Aktivität und des Zellzyklus waren überexprimiert. Dagegen waren Gene für Zellmembranbestandteile und Zelladhäsionswege unterexprimiert.

Viele Studien konzentrieren sich auf den Nachweis pathogener Keime. Bakterien, die in die Gebärmutter von Rindern eindringen, lassen sich nach ihrer Pathogenität in drei Gruppen einteilen (Sheldon et al., 2002b):

- 1) Anerkannte uterine Pathogene, die mit Endometriumsläsionen in Verbindung gebracht werden (u. a. *T. pyogenes*, *E. coli*, *Prevotella* spp.)
- 2) Potenziell pathogene Bakterien, im Allgemeinen nicht mit Endometriumsläsionen verbunden, die aber häufig aus dem Uteruslumen von Rindern mit Endometritis isoliert werden (u. a. *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*)
- 3) Opportunistische Kontaminanten, die vorübergehend aus dem Uteruslumen isoliert werden und nicht mit einer Endometritis in Verbindung gebracht werden (u. a. *Clostridium perfringens*, *Micrococcus* spp., *Streptococcus acidominimus*).

Bislang wurde der dritten Gruppe nur eine marginale Aufmerksamkeit zuteil. Zum Beispiel Laktobazillen, die aus dem Rinderuterus isoliert wurden, nehmen laut den Untersuchungen von Gärtner et al. (2015) keinen negativen Einfluss auf kokultivierte Endometriumszellen und können somit der dritten Gruppe zugeordnet werden. Laktobazillen zählen zu den Milchsäurebakterien (LAB), da sie Laktat als Hauptendprodukt des Kohlenhydratmetabolismus produzieren und somit den pH-Wert ihrer Umgebung senken (Batt, 2014). Dies kann für andere Bakterien zu einem ungünstigen Umgebungsmilieu führen. Einige Arten der Milchsäurebakterien produzieren ebenfalls Wasserstoffperoxid (H₂O₂). H₂O₂ kann das Wachstum anderer Bakterien hemmen, die selbst keine oder nur geringfügig H₂O₂-abfangende

Enzyme (z. B. Katalase) bilden (Dahiya & Speck, 1968; Eschenbach et al., 1989; Wheeler et al., 1952). Einige Vertreter der LAB bilden Bakteriozine, wobei es sich um antimikrobiell wirksame Peptide und Proteine handelt. Diese Bakteriozine destabilisieren und permeabilisieren die Zellmembranen, insbesondere grampositiver Bakterien, und hemmen so deren Wachstum (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Bhunia et al., 1991; Jack et al., 1995).

Machado et al. (2012) konnten die Gattung *Lactobacillus* in 41 % der Nachweise im Uterus von gesunden Kühen, in 50 % der Nachweise im Uterus von Kühen mit milder SE und in 20 % der Nachweise im Uterus von Kühen mit starker SE feststellen. Bei Kühen ohne Metritis wurden in 40 % der Fälle und bei Kühen mit Metritis in 39 % der Fälle Laktobazillen nachgewiesen. Eine subklinische oder klinische Endometritis hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Vorhandensein der Laktobazillen. Bei der Untersuchung von tragenden oder nicht tragenden Tieren, waren signifikant häufiger Laktobazillen in tragenden (49 %) als in nicht tragenden (18 %) Tieren nachweisbar. Gärtner et al. (2015) führten erstmalig eine umfassende Untersuchung der Isolate und molekularen Charakterisierungen von kommensalen Laktobazillenspezies aus der Rindergebärmutter durch. Zu diesem Zweck wurden bakteriologische Cytobrush-Proben aus dem Corpus uteri von 11 gesunden laktierenden Milchkühen gewonnen. Es konnten neun verschiedene Isolate der Laktobazillen-Gruppe isoliert werden, die zu den Arten *Lactobacillus (L.) buchneri*, *L. ruminis*, *L. amylovorus*, *L. plantarum* und *L. similis* zugehörig sind. Der Einfluss einer Kultivierung von endometrialen Epithelzellen mit *L. buchneri*, *L. ruminis* und *L. amylovorus* auf die Genexpression von Zytokinen und die Prostaglandinproduktion wurde weitergehend in vitro untersucht. *L. ruminis* und *L. amylovorus* induzierten eine signifikante Erhöhung der mRNA-Spiegel der proinflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-6, IL-8, sowie eine Freisetzung von IL-8 und PGF_{2 α} aus den Endometriumzellen im Vergleich zur Kontrolle. *L. buchneri* nahm auf keine dieser Faktoren signifikanten Einfluss. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Anwesenheit von Laktobazillen die Immunantwort stimulieren kann, ohne zytotoxische Wirkungen auf das Endometrium zu zeigen (Gärtner et al., 2015).

In verschiedenen Studien wurde der Einfluss einer Anwendung von Milchsäurebakterien auf die Fertilität von Rindern untersucht. Deng et al. (2015a, 2015b) untersuchten den Einfluss einer zwei- oder dreimaligen vaginalen Administration im wöchentlichen Abstand von LAB um den Zeitraum der Geburt. Dabei verwendeten sie 100 Millionen bis 1 Milliarde Koloniebildende Einheiten (KbE) der Bakterien *L. sakei* und *Pediococcus acidilactici* pro Behandlung. Die mit LAB behandelten Holsteinkühe wiesen eine schnellere Uterusinvolution, eine geringere Inzidenz für Gebärmutterinfektionen, eine geringere Plasma-PGFM-Konzentration und tendenziell eine geringere Konzentration von dem Akute Phase Protein SAA im Serum auf als Kühe der Kontrollgruppe. Zudem wurde beobachtet, dass Kühe nach dreimaliger

LAB-Behandlung schneller nach der Geburt wieder in den Zyklus kamen. Bei Kühen mit zweimaliger LAB-Behandlung wurde eine kürzere Güstzeit beobachtet als bei den Kontrolltieren. Auch Ametaj et al. (2014) beobachteten nach sechsmaliger vaginaler Behandlung mit LAB um den Geburtszeitpunkt ein reduziertes Auftreten von vaginalen Ausflüssen und eine reduzierte Plasmakonzentration von Haptoglobin, welches ein häufig nachgewiesenes Akute Phase Protein bei uterinen Infektionen ist. Eine einmalige intrauterine Behandlung mit 15 bis 20 Milliarden KbE des *L. buchneri* 24 bis 30 Tage p. p. wurde von Peter et al. (2018) untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sowohl gesunde Tiere als auch Tiere mit SE, die jeweils mit LAB behandelt wurden, einen besseren Erstbesamungserfolg und eine kürzere Güstzeit zeigten. Die Behandlung mit *L. buchneri* hatte keinen Einfluss auf den Gehalt an PMN im Endometrium von SE-Tieren innerhalb von drei Wochen nach der Behandlung im Vergleich zu Tieren mit Placebo-Behandlung. Zwei Wochen nach der LAB-Behandlung wurde sogar ein tendenziell höherer PMN-Gehalt beobachtet als bei den Kontrolltieren. Jedoch zeigte sich in der Auswertung von proinflammatorischen Zytokinen eine Reduktion in der endometrialen mRNA-Expression der Zytokine CXCL1, 2 und 3, CXCR-2, IL-1 β , IL-8 und PTPRC. Die Autoren vermuten, dass eine durch die Applikation von Laktobazillen bedingte zeitlich verzögerte Downregulation des uterinen Immunsystems um den Besamungszeitpunkt für das Überleben und die spätere Implantation des Embryos vorteilhaft war (Peter et al., 2018). In einer In-vitro-Untersuchung von Genís et al. (2016) wurden Endometriumzellen von Kühen mit *E. coli* und verschiedenen LAB (*L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. sakei*, *P. acidilactici*) kokultiviert. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass *L. sakei*, *L. reuteri* und *P. acidilactici* in der Lage waren, eine *E. coli*-Infektion signifikant zu verringern. Bei *L. rhamnosus* wurde diese Wirkung lediglich bei der höchsten Dosierung beobachtet. *L. sakei* und *L. reuteri* hatten dosisabhängig eine eigene proinflammatorische Wirkung auf das Endometrium. Eine mögliche Erklärung für die Reduktion der *E. coli*-Infektionen könnte auf die wachstumshemmende Wirkung von durch Laktobazillen gebildetem Laktat sowie weiteren organische Säuren, H₂O₂ und Bakteriozinen zurückzuführen sein (Cantoni et al., 1989; Dahiya & Speck, 1968; Wheeler et al., 1952).

Es liegen bislang nur wenige Studien vor, die den Einfluss von sowohl pathogenen Keimen als auch von Kommensalen, wie den LAB, im Bereich des Embryotransfers untersuchen. Studien von Moreno et al. (2016, 2022) in der Humanmedizin analysieren den Einfluss des uterinen Mikrobioms auf den Ausgang von assistierten Reproduktionsbehandlungen. Frauen, die ein Laktobazillen dominiertes Mikrobiom (> 90 % *Lactobacillus* spp.) aufwiesen, zeigten signifikant bessere Einnistungsraten (60,7 % vs. 23,1 %), Schwangerschaftsraten (70,6 % vs. 23,1 %) sowie eine bessere Rate an anhaltenden Schwangerschaften (58,8 % vs. 13,3 %) und Lebendgeburten (58,8 % vs. 6,7 %) als Frauen mit einem nicht Laktobazillen dominierten

Mikrobiom (< 90 % *Lactobacillus* spp., Moreno et al., 2016). Ein dysbiotisches Uterusmikrobiom bestehend aus den Genera *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Chryseobacterium*, *Gardnerella*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Neisseria*, *Staphylococcus* und *Streptococcus* ist mit erfolglosen Behandlungsergebnissen assoziiert. Demgegenüber konnten Bakterien des Genus *Lactobacillus* bei Patientinnen mit Lebendgeburten durchgehend nachgewiesen werden (Moreno et al., 2022). Ähnliches wiesen Moore et al. (2000) nach, die eine signifikant erhöhte Lebendgeburtenrate bei dem Nachweis von *Lactobacillus* an der Transferkatheterspitze beobachteten.

Zu der Untersuchung des Uterusmikrobioms bei superovulierten Kühen liegen bislang nur zwei Studien vor. In einer kanadischen Studie wurde die Spülflüssigkeit aus dem Uterus am Tag der Embryonengewinnung bei Tieren mit und ohne Superovulation verglichen. In der Kontrollgruppe (ohne SOP) von 7 Tieren wies ein Tier (14,2 %) einen positiven bakteriellen Nachweis (*Enterococcus* sp.) auf, in der Superovulationsgruppe waren es 3 von 28 Kühen (10,7 %; *Trueperella* spp., *Pseudomonas* spp., *Corynebacterium* spp.). Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der bakteriellen Besiedlung und der Anzahl transfertauglicher Embryonen beobachtet werden (Rasolomboahanginjatovo et al., 2014). Lyu et al. (2020) untersuchten 10 Kühe einer chinesischen, fleischbetonten Hybridrasse (Charolais (*Bos taurus*) x Nanyang-Rind (Hybrid aus *Bos taurus* und *indicus*)), die mit einem CIDR-Progesteron-Spangen- und FSH-Protokoll stimuliert wurden. Bei der Embryonengewinnung wurde jedes Uterushorn mit 250 ml Spülflüssigkeit gespült und die ersten 10 ml beider Hörner wurden gemeinsam bakteriologisch mittels 16S rRNA-Genanalyse untersucht. Zusätzlich erfolgte eine bakteriologische Untersuchung des Zervixschleims. Die Embryonenspülungen wurden in drei verschiedene Klassen eingeteilt: A) > 80 % der Embryonen mit sehr guter Qualität; B) 40–80 % der Embryonen mit sehr guter Qualität; C) < 40 % der Embryonen mit sehr guter Qualität. Die Bakterien wurden auf Stamm-Ebene untersucht. Das am häufigsten nachgewiesene Phylum waren die *Proteobacteria*, welche in allen drei Klassen > 78 % der Nachweise ausmachten. Es wurde jedoch eine Abnahme des Anteils der *Proteobacteria*-Bakterien bei abnehmender Embryonenqualität beobachtet (A: 95,6 % ± 0,9 %; B: 91,3 % ± 2,5 %, C: 78,85 % ± 2,45 %). Der Anteil der Nachweise der Phyla *Bacillota*; A: 2,35 % ± 0,15 %; B: 4,0 % ± 0,1 %, C: 10,95 % ± 1,55 %) und *Bacteroidota* (A: 0,6 % ± 0,2 %; B: 1,25 % ± 0,05 %, C: 7,4 % ± 0,7 %) stieg hingegen signifikant mit Abnahme der Embryonenqualität. Die Autoren dieser Studie vermuten, dass die Bakterienstämme *Bacillota* und *Bacteroidota* einen Einfluss auf die frühe Embryonalentwicklung nehmen. Einen Zusammenhang der reichlich nachgewiesenen Mikroorganismen im Zervixschleim und den Ergebnissen der Embryonengewinnung konnte nicht festgestellt werden (Lyu et al., 2020).

2.8 Hintergrund und Erwartungen der vorliegenden Untersuchungen

Wie das Schrifttum dieser Arbeit verdeutlicht, wurden über viele Jahre intensiv die Einflüsse auf den Superovulationserfolg und die Embryonenqualität auf Ebene des Ovars und des Ovidukts erforscht. Es besteht jedoch Forschungsbedarf hinsichtlich der Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Embryonenqualität und den Superovulationserfolg im Bereich des Uterus. Insbesondere der Einfluss probiotischer Kommensalen ist bisher nur unzureichend erforscht.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, ein umfassenderes Verständnis des Mikrobioms der Rindergebärmutter mit Fokus auf probiotische Keime insbesondere *Lactobacillus buchneri* und dessen Einfluss auf in vivo gewonnene Rinderembryonen bis Tag 7 zu erlangen.

Das Ziel der **ersten** Studie bestand darin in einer Feldstudie im Rahmen eines kommerziellen Embryotransferprogrammes, *L. buchneri* und weitere vorherrschende Bakterien aus dem Spülmedium der Uterushornspitzen bei der Embryonengewinnung zu isolieren und deren potenziellen Einfluss auf den Superovulationserfolg und die Embryonenqualität zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Holsteinkühe superovuliert und das Spülmedium bei der Embryonengewinnung an Tag 7 nach der Besamung bakteriell untersucht sowie die Embryonen nach IETS-Standard klassifiziert.

Die **zweite** Studie wurde durchgeführt, da in einer Vielzahl von Studien das Mikrobiom im Rinderuterus mittels einer Cytobrush-Probe aus dem Corpus uteri analysiert wurde, während eine Analyse auf Basis von Spülproben des Corpus uteri bislang nur in wenigen Studien erfolgte. Eine vergleichende Untersuchung des Mikrobioms innerhalb eines Tieres zwischen den Uterushörnern und dem Uteruskörper ist bislang nicht beschrieben. Lietaer et al. (2021) untersuchten vergleichend das Mikrobiom beider Uterushörner an jeweils zwei Lokalisationen (Basis und Spitze). Insbesondere in Hinblick auf die in der ersten Studie gewonnenen Spülproben aus den Hornspitzen ist dies von Interesse, da weniger häufig Bakterien der Ordnung *Lactobacillales* insbesondere der Gattung *Lactobacillus* nachgewiesen wurden als in anderen Studien im Uteruskörper (Gärtner et al., 2015; Machado et al., 2012). Das Ziel der zweiten Studie war daher eine vergleichende Untersuchung des Keimmilieus der Uterushörner und des Uteruskörpers. Zu diesem Zweck wurde der Uterus von neun Schlachtkühen an je drei Lokalisationen post mortem untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Studie 1 – Potenzieller Einfluss von Laktobazillen auf in vivo gewonnene Rinderembryonen

3.1.1 Spendertierauswahl

In der Studie wurden im Untersuchungszeitraum von Mai 2021 bis Juli 2022 30 Kühe der Rasse Deutsche Holstein von 20 verschiedenen Betrieben untersucht. Die Kühe waren Spendertiere im kommerziellen Embryotransferprogramm des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter (VOST) in Ostfriesland (Niedersachsen, Deutschland) und wurden von den Züchtern aufgrund ihrer Genetik oder ihrer Leistung vorselektiert. Es wurden Kühe zwischen der 1. bis 10. Laktation ($3,9 \pm 2,6$) untersucht, die zwischen 2,5 bis 14 Jahren ($6,0 \pm 3,4$) alt waren. Zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung hatten die Spendertiere vor 51 bis 634 Tagen gekalbt ($198,5 \pm 151,2$).

3.1.2 Voruntersuchung der Spendertiere

Die erste Untersuchung der Spenderkühe fand an Tag (D) 7 bis 14 im Brunstzyklus durch drei verschiedene Tierärzte und/oder einen Fachagrarwirt statt und umfasste eine allgemeine und gynäkologische Untersuchung. Im Vorbericht wurden der letzte Kalbeverlauf, die vorangegangene Brunst und die vorherige Nutzung als Spendertier dokumentiert. Milchleistung, Zellzahlen, Harnstoff-, Eiweiß- und Fettgehalt der letzten beiden Milchleistungsprüfungen (MLP) vor der Erstvorstellung wurden ermittelt. Die Daten stammten aus dem SERVIT-System des Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung e.V. (VIT) Verden. Zusätzlich wurden im Nachhinein die Daten der ersten MLP nach der Spülung herangezogen, um die weitere Leistungsentwicklung des Tieres zu verfolgen. Die Allgemeinuntersuchung umfasste die Aufnahme der Vitalparameter wie Körpertemperatur, Herzfrequenz und Atemfrequenz, sowie eine Einschätzung des Verhaltens, der Haltung, der Kotkonsistenz und des Pflegezustandes des Tieres. Mittels des BCS wurde die Körperkondition bewertet. Der BCS nach Edmonson et al. (1989) bewegt sich auf einer Skala von 1 bis 5, wobei 1 für stark unterkonditionierte Tiere und 5 für stark überkonditionierte Tiere steht. Die Tiere wurden in 0,5 BCS-Abstufungen klassifiziert. Die Beurteilung des Pflegezustandes erfolgte anhand der Hygiene Scoring Card von Cook & Reinemann (2007), wobei die Verschmutzung an Euter, Unterschenkel und Oberschenkel in 4 Stufen eingeteilt wurde. Stufe 1 ist ein Tier mit keiner bis geringer Verschmutzung in allen 3 Bereichen. Die Bewertung ist aufsteigend bis 4, wobei das Tier eine hochgradige Verschmutzung am Euter und im gesamten Beinbereich aufweist.

Im Anschluss erfolgte eine Untersuchung des äußeren Genitals gemäß Rosenberger (1977). Die adspektorische Untersuchung der Vulva umfasste eine Beurteilung eines potenziellen Ödems, mangelnden Schlusses, Verletzungen und Ausfluss. Die Portio vaginalis wurde hinsichtlich Form, Öffnungsgrad, Farbe und Feuchtigkeitsgrad mit einem Einmalspekulum (Minitube™, Länge 43 cm, Innendurchmesser 3 cm, sterilisiert) untersucht. Eine transrektale Palpation und Ultraschalluntersuchung (Easy-Scan®, BCF™ Technology, breitband-linear Rektalsonde, 7,5 MHz, Modus: Ovary/Early pregnancy) des Reproduktionstraktes folgte. Die Beurteilung des Uterus erfolgte anhand von Größe, Symmetrie und Tonus. Die Ovarien wurden einschließlich ihrer Funktionskörper vermessen und vorhandene Funktionskörper bestimmt. Gelbkörper (Corpus luteum, CL) definierten sich als rundliche bis ovale Funktionsgebilde mit einer homogenen grauen Körnung. Funktionsgebilde mit homogener schwarzer (hypoechogener) Struktur wurden als Follikel eingestuft. Bilder der Ovarien wurden aus Dokumentationszwecken auf dem internen Speicher des Ultraschallgerätes gespeichert und später auf den Computerserver übertragen (Abb. 10).

Nur allgemein und gynäkologisch gesunde Kühe mit einem CL von mindestens 2 cm Durchmesser wurden für die Superovulation ausgewählt. Zwölf Kühe wiesen zusätzlich zum CL einen Follikel auf einem der beiden Ovarien auf. Eine Punktion des dominanten Follikels mit einem Mindestdurchmesser von 1 cm erfolgte in zwei der Fälle. Zur Durchführung der Punktion wurde eine Punktionskanüle nach Nohner (RMP Medizinische Produkte) mit einer Einmalkanüle (WDT, Easy-Lance Einmalkanüle, 18 G x 1 1/2") verwendet. Für eine rektale Entspannung während des Eingriffs erfolgte eine kleine sakrale Epiduralanästhesie mit 3 ml Procainhydrochlorid (Procamidol®; WDT, 20 mg/ml) zwischen Os sacrum und Vertebra coccygialis (Co) 1 oder zwischen Co 1 und Co 2. Anschließend folgte eine Reinigung des äußeren Genitals mit Papiertüchern sowie eine Desinfektion mit Desderman® (Schuelke, Händedesinfektion). Ein Sanitary sheath (A.I./E.T. Sanitary sheaths, L = 533 mm/ 21", inv technologies) schützte die Punktionskanüle, die unter Rektalkontrolle in die Vagina eingeführt wurde. Durch rektale Manipulation ließ sich das Ovar mit dem dominanten Follikel dorsal des Scheidendaches positionieren und anschließend durch das Scheidendach hindurch punktieren.

Von 30 vorgestellten Kühen erfüllten 24 die Parameter zur Einleitung einer Superovulation und zeigten keine Anzeichen einer klinischen oder gynäkologischen Erkrankung. Die Gründe für den Ausschluss aus der Studie waren Eierstockzysten (1x Follikel-Theka-Zyste, 1x Follikel-Lutein-Zyste), klinische Endometritiden (2x), Brunsterscheinungen (2x) und fehlendes CL (1x). Eine Kuh wurde nach der Behandlung der Zyste 1,5 Monate später erneut vorgestellt und für tauglich für die Superovulation befunden und in die Studie aufgenommen. Im Nachhinein mussten zwei Kühe aus der Studie ausgeschlossen werden. Eine der beiden

Kühe zeigte im Anschluss an die Superovulationsbehandlung keine Brunst und wurde daher nicht besamt und gespült. Bei der zweiten Kuh entschied der Landwirt, aus persönlichen Gründen die Kuh aus dem Programm zurückzuziehen und nicht weiter zu behandeln.

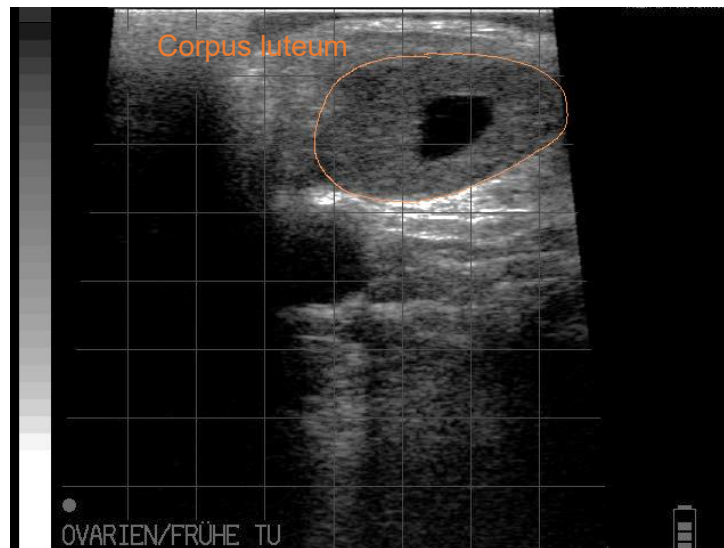


Abb. 10 Rechtes Ovar einer Kuh an Tag 11 mit einem Corpus luteum (mit kleiner Kavität), Gesamtdurchmesser 3 cm

3.1.3 Superovulation und instrumentelle Besamung

Die Superovulation wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt (beispielhaft an Tag 11 des Zyklus begonnen):

Tag	0			Brunst	
Tag	11	morgens	100 IE / 100IE	pFSH / pLH	
		abends	100 IE / 100IE	pFSH / pLH	
Tag	12	morgens	60 IE / 60IE	pFSH / pLH	
		abends	60 IE / 60IE	pFSH / pLH	
Tag	13	morgens	50 IE / 50IE	pFSH / pLH	
		abends	50 IE / 50IE	pFSH / pLH	
Tag	14	morgens	40 IE / 40IE	pFSH / pLH	& 500 µg PGF _{2α} (Cloprostenol)
		abends	40 IE / 40IE	pFSH / pLH	& 25 mg PGF _{2α} (Dinoprost)
Tag	15	morgens		-	
		abends		Brunstbeobachtung	
Tag	16	morgens		Brunstbeobachtung	
		abends		1. Besamung	
Tag	17	morgens		2. Besamung	& 20 µg GnRH (Buserelin)
Tag	22	abends	25 mg	PGF _{2α} (Dinoprost)	
Tag	23			Embryonengewinnung	

Das Superovulationsprogramm wurde zwischen Tag 9 und 14 nach vorangegangener Brunst begonnen. Die Superovulation erfolgte mit dem Präparat Pluset® (Calier, 500 IE/500 IE pFSH/pLH). Nach Gabe des PGF_{2α}-Analogon Cloprostenol (2 ml, Estrumate®; MSD, 250 µg/ml) und PGF_{2α} Dinoprost (5 ml, Dinolytic®; Zoetis, 5 mg/ml) kommt es innerhalb von 48 Stunden zur Luteolyse und folglich zu einer neuen Brunst. Die Brunstbeobachtung erfolgte entweder durch Brunstüberwachungssysteme oder durch Sichtkontrolle des Besitzers. Es wurden sowohl 11 Kühe mit konventionellem Sperma und 11 Kühe mit X-sortiertem Sperma besamt. Zwölf Stunden nach Einsetzen der Brunst erfolgte die erste Besamung mit hochwertigem konventionellen Tiefgefriersperma (je 20 Millionen Spermien) und nach weiteren 12 Stunden ein zweites Mal. Die Spermaportion wurde dabei im Corpus uteri platziert. Die erste Besamung mit X-sortiertem Sperma erfolgte 16 bis 20 Stunden nach Brunstbeginn, gefolgt von der zweiten Besamung 6 bis 8 Stunden später. Für die beiden Besamungen mit X-sortiertem Sperma wurde eine Spermadosis mit je acht Millionen Spermien verwendet. Diese Acht-Millionen-Spermien-Portionen wurden von Sexing Technologies (ST Germany GmbH, Cloppenburg, Germany) für bestimmte Bullen hergestellt. Wenn diese nicht verfügbar waren, erfolgte eine Besamung mit je drei Pailletten mit 2,1 Millionen Spermien. Jeweils die zweite Besamung wurde von einer Injektion mit Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Analogon Buserelin (Receptal®; MSD, 5 ml, 0,004 mg/ml) zur Ovulationsinduktion begleitet. Aufgrund einer längeren Brunstdauer wurden drei Kühe ein drittes Mal besamt.

Es erfolgte eine erneute Injektion von Dinoprost 12 bis 16 Stunden vor der Embryonengewinnung, da das Medikament Dinolytic® eine motilitätssteigernde Wirkung auf den Uterus zeigt. Alle Behandlungen wurden von den Tierbesitzern durchgeführt. Die Besamung erfolgte entweder durch einen geschulten Besamungstechniker vom VOST oder durch den Besitzer als Eigenbestandsbesamer selbst.

3.1.4 Embryonengewinnung und Probenentnahme

Sechseinhalb bis sieben Tage nach der ersten KB erfolgte bei 22 Versuchskühen die Gewinnung der Embryonen mit der nicht-chirurgischen, transzervikalen Spülmethode (Hahn, 1978). Die Tiere wurden im Fressgitter oder in der Liegebox fixiert und es folgte eine kurze klinische Untersuchung. Eine transrektale Ultraschalluntersuchung diente der Zählung der Corpora lutea und Follikel sowie dem Vermessen der Ovarien. Bilder der Ovarien wurden im Ultraschallgerät und später auf dem Computer für Dokumentationszwecke gespeichert (siehe Abb. 11).

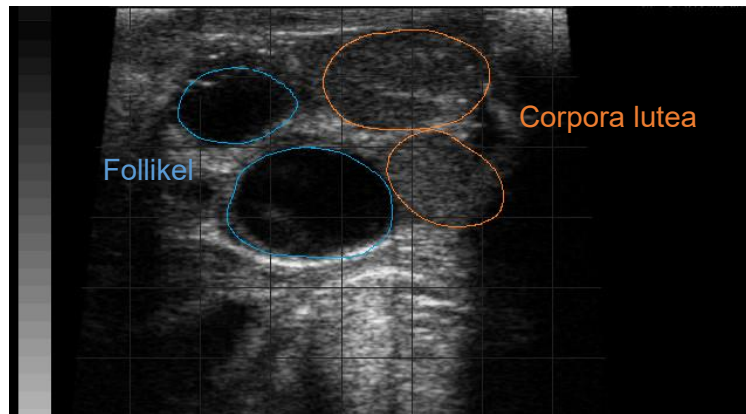


Abb. 11 Linkes Ovar einer Kuh am Tag der Embryonengewinnung, zu sehen: 2 Corpora lutea und 2 Follikel, Ovargesamtdurchmesser: 6 cm (Corpora lutea insgesamt: 4, Follikel: 3; nicht alle im Anschnitt zu sehen)

Eine Epiduralanästhesie sowie Reinigung und Desinfektion des äußeren Genitals erfolgte entsprechend der Beschreibung in Kapitel 3.1.2. Ein flexibler Zweiwegeballonkatheter (Minitube™, Silikon-ET-Katheter CH 20, Luer-Lock, 2-Wege, Ballon 5–30 ml) wurde innen und außen mit antibiotikafreiem Spülmedium (EmXcell embryo flushing medium®, imv technologies™) vorgespült und die Dichtheit des Ballons überprüft. Unter rektaler Führung ließ sich der Katheter mithilfe eines Stilets aus rostfreiem Stahl in das rechte Gebärmutterhorn einführen. Nach Erreichen der großen Kurvatur wurde der Mandrin gelöst und ca. 10 cm zurückgezogen. Der nun im vorderen Bereich flexible Katheter ließ sich anschließend weiter bis in die Hornspitze vorschieben. Im Anschluss wurde der Ballon mit ca. 20 ml Luft aufgeblasen, bis die Hornspitze nach kaudal abgedichtet war. Eine schematische Darstellung eines transzervikal positionierten Ballonkatheters ist in Abb. 12 dargestellt. Danach wurde die Hornspitze mit insgesamt 600 ml warmen Spülmedium fraktioniert gespült. Die ersten beiden Spülvorgänge erfolgten mit jeweils 35 ml Spülmedium mit Einwegspritzen (BD-Plastipak™, Luer-Lok, 60 ml). Im Anschluss wurde in 40 ml-Schritten, und wenn die Rückgewinnung nahezu vollständig und das Horn vorgedehnt war, in 50 ml-Schritten weitergespült. Anschließend erfolgt eine Überführung der fraktioniert zurückgewonnenen Spülflüssigkeit in einen embryodichten Mikromembranfilter (MiniFlush®, minitube™, Porengröße 60 µm). Die ersten filtrierte 50–60 ml Spülflüssigkeit wurden in einem sterilen Glasgefäß (Duran®, 100 ml, mit Schraubverschluss und Ausgießring, PP, blau) aufgefangen, um sie später bakteriologisch untersuchen zu können. Der Rest wurde in einer leeren durchsichtigen Mediumflasche aufgefangen. Das gleiche Verfahren erfolgte am linken Uterushorn mit einem neuen Katheter, Spülfilter und einer neuen Auffangflasche.

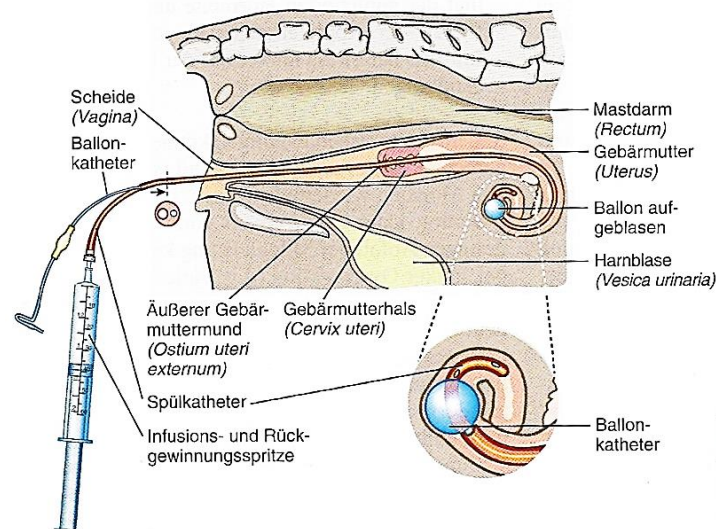


Abb. 12 Schematische Darstellung der Embryonengewinnung mit Hilfe eines transzervikal positioniertem Ballonkatheter (Schellander, 2005)

Die Menge der wiedergewonnenen und gefilterten Flüssigkeit wurde gemessen und vor einem weißen Hintergrund bei eingeschaltetem Deckenlicht im mobilen Embryotransfer (ET)-Labor nach einem modifizierten Bewertungsschema von Wolgast (2009) visuell hinsichtlich Trübung und Blutbeimengung klassifiziert (siehe Tab. 9 und Abb. 13). Aufgrund zu starker Blutbeimengung oder zu schlechter Rückgewinnung ($\leq 50\%$) der Spülflüssigkeit mussten die Spülungen von insgesamt drei Gebärmutterhörnern bei zwei Spendertieren abgebrochen werden, um die Gesundheit der Donoren nicht zu gefährden.

Tab. 9: Bewertungsschema für die Trübung und die Blutbeimengung der Spülflüssigkeit; modifiziert nach Wolgast (2009)

Grad	Trübung	Blutbeimengung
0	Keine Trübung, wasserklar	Originalfarbe des EmXcell® Medium (leicht rosa)
1	Geringgradige (ggr.) Trübung, Flüssigkeit noch durchsichtig	Geringgradige Blutbeimengung (intensiveres Rosa)
2	Leichte Trübung, Flüssigkeit kaum noch durchsichtig	Leichte Blutbeimengung (leichte Rotfärbung)
3	Mittelgradige (mgr.) Trübung, Flüssigkeit zunehmend undurchsichtig	Mittelgradige Blutbeimengung
4	Starke Trübung, Flüssigkeit undurchsichtig	Starke Blutbeimengung
5	Hochgradige (hgr.) Trübung	Hochgradige Blutbeimengung (tiefrot)



Abb. 13 Beispielbild der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit: Links Trübung 3, Blutbeimengung 1; Rechts Trübung 1, Blutbeimengung 0

3.1.5 Handhabung von Embryonen und Proben

Im mobilen Embryotransferlabor wurde die Spülflüssigkeit im Duran-Glasgefäß durch leichtes Schwenken resuspendiert. Anschließend erfolgte die Entnahme einer 10 ml-Probe mit einer Spritze (Henke Sass Wolf-Henke-Ject®, 10 ml (12 ml), Luer) in ein Falcon™-Röhrchen (konisches Zentrifugenröhrchen, 15 ml, Fisher scientific GmbH). Das Röhrchen wurde verschlossen und mit einem Stück Parafilm (Parafilm®, 10 cm x 15 cm) um den Deckel versiegelt. Die Lagerung der Proben erfolgte während der Analyse der Embryonen bei einer Temperatur von ca. 9 °C im Kühlschrank des Labors.

Die Embryonensuche erfolgte horngetrennt. Beide Mikromembranfilter wurden vorsichtig geöffnet und die Membranen jeweils mit 60 ml Spülmedium abgespült. Das Medium wurde in einer großen Gewebekulturschale (Sarstedt®, 35 x 10 mm, mit Entlüftungsnocken) aufgefangen. Nach mindestens fünfminütiger Sedimentationszeit erfolgte eine meanderförmige Suche der Spülflüssigkeit nach Embryonen. Zu diesem Zweck wurde ein Stereomikroskop (Olympus® SZ61) mit einer 10- bis 15-fachen Vergrößerung verwendet. Die Überführung der gefundenen Embryonen und unbefruchteten Eizellen erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle mit einer 1 ml-Spritze mit Pipettenspitze (Henke Sass Wolf - Henke Ject®, 1 ml, Luer & Sarstedt® Pipette tip, 200 µl) in eine kleine Gewebekulturschale (Sarstedt®, 92 x 16 mm, ohne Entlüftungsnocken) mit Haltemedium (ICP_{bio}-EMCARE™ Embryo Holding Solution, ECHM-500 oder ECHM-100). Durch mehrmaliges Wiederholen des Suchvorgangs

wurde sichergestellt, dass sich keine Embryonen mehr im Filterspülmedium befanden. Anschließend erfolgte die Entnahme von 10 ml des linken und des rechten Filtermediums (Filterproben) mit einer sterilen Spritze (Henke Sass Wolf-Henke-Ject® 10(12) ml). Die Filterproben wurde wie die Spülproben behandelt.

3.1.6 Embryonenbeurteilung

Die Embryonen wurden gemäß den Standards der International Embryo Technology Society (IETS) mit einem Stereomikroskop (Olympus® SZ61) mit einer 67,5-fachen Vergrößerung beurteilt. Die Klassifizierung erfolgte nach Entwicklungsstadium und Qualität am Gewinnungstag. Die Beurteilung erfolgte jedes Mal durch denselben Fachtierarzt. Das Entwicklungsstadium konnte in unbefruchtete Eizelle (1), 2–16-Zeller (2), frühe Morula (3), kompakte Morula (4), frühe Blastozyste (5), Blastozyste (6), expandierte Blastozyste (7), geschlüpfte (8) und expandiert geschlüpfte Blastozyste (9) eingestuft werden. Die Qualität wurde in vier Kategorien eingeteilt (Robertson & Nelson, 2009):

(1) Sehr gute bis gute Qualität

- a. Der Embryo entspricht dem erwarteten Entwicklungsstadium, weist eine intakte und glatte Zona pellucida auf und weniger als 15 % der Gesamtzellmasse sind extrudiert.
- b. Der Embryo ist sowohl lebensfähig als auch tiefgefriertauglich.

(2) Mittelmäßige Qualität

- a. Der Embryo weist moderate Unregelmäßigkeiten in Größe, Form, Farbe und Dichte und eine intakte Zona pellucida auf. Es sind mehr als 15 %, aber weniger als 50 % der Gesamtzellmasse extrudiert.
- b. Der Embryo ist lebensfähig und bedingt tiefgefriertauglich.

(3) Schlechte Qualität

- a. Der Embryo weist größere Unregelmäßigkeiten und eine intakte Zona pellucida auf. Es sind mehr als 50 %, aber weniger als 75 % der Gesamtzellmasse extrudiert.
- b. Der Embryo ist lebensfähig, aber nicht tiefgefriertauglich.

(4) Tot oder degeneriert

- a. Der Embryo weist einen zu lockeren Zellverband auf. Häufig sind die Embryonen dunkler oder haben eine beschädigte Zona pellucida.
- b. Der Embryo ist nicht lebensfähig und kommt daher nicht für den Transfer in Frage.

Embryonen erster und zweiter Qualität wurden als tiefgefriertauglich klassifiziert. Zu Dokumentationszwecken wurden Bilder der entnommenen Embryonen/Eizellen mit der Bildanalysesoftware OLYMPUS Stream (Softwareversion 1-9,1) aufgenommen und gespeichert (Bsp. siehe Abb. 14).

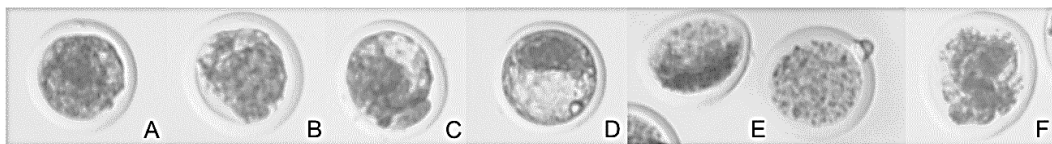


Abb. 14 Embryonen verschiedener Kühe der Studie (Stadium-Qualität): A: 4-1; B: 4-2; C: 5-1
D: 6-1; E: zwei unbefruchtete Eizelle; F: Degeneriert

3.1.7 Weitere Behandlung von Embryonen

Die weitere Behandlung der Embryonen war von der Entscheidung abhängig, ob eine direkte, frische Übertragung auf ein Trägartier erfolgte oder ob eine Kryokonservierung vorgenommen wurde. Eine Erläuterung der weiteren Behandlungsschritte ist nicht Gegenstand dieser Arbeit.

3.1.8 Kultivierung, Isolierung und Charakterisierung von Bakterien

Die Proben wurden über Nacht bei 6–8 °C im Kühlschrank der Besamungs- und ET-Station in Georgsheil des VOST (Am Bahndamm 4, 26624 Südbrookmerland) gelagert und innerhalb der nächsten 36 Stunden gekühlt per Kurier an das Labor der FU Berlin (Institut für Veterinärbiochemie, Freie Universität Berlin, Oertzenweg 19b, 14163, Berlin, Deutschland) geschickt.

Die Bearbeitung der Proben erfolgte durch Herrn Dr. Gabler der FU Berlin modifiziert nach der Methode von Gärtner et al. (2015). Jede Probe wurde achtmal kultiviert, viermal aerob und viermal mikroaerophil ($< 10\% \text{ O}_2$), wie in Abb. 15 dargestellt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C über einen Zeitraum von bis zu 72 Stunden. Dabei wurden die Probe sowohl direkt auf

Rogosa-SL-Agar (SL: Selektives Medium für die Kultivierung von Laktobazillen) und MRS-Agar (Man-Rogosa-Sharpe) ausgestrichen, als auch in Rogosa-SL- und MRS-Bouillon vorkultiviert. Die Bakterien einzelner Kolonien wurden entnommen und in dem entsprechenden Flüssigmedium weiter kultiviert und dann erneut auf dem Nährboden ausgestrichen. Der Ausstrich vorkultivierter Proben erfolgte im Anschluss direkt auf den passenden Agarplatten. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, um eine Reinheit des Bakterienstamms zu erreichen. Anschließend wurden die Bakterien auf einem Blutagar (Merck, Darmstadt) ausgestrichen. Die Lagerung aller Isolate erfolgte bei -80 °C in 15 % Glycerin.



Abb. 15 Laboruntersuchungsvorgang für die Proben jeder Kuh an der FU Berlin – Institut für Veterinärbiochemie

Die Bakterien wurden auf Größe, Form, Konsistenz und Farbe der Kolonien sowie auf die Katalase-Reaktion untersucht. Anschließend erfolgte die Extraktion der DNA aus den isolierten Kolonien und deren Nutzung zur weiteren Klassifizierung durch Sequenzierung. Zur Bestimmung des Bakterienstamms kamen phylogenetische 16S rRNA-Primer von Eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland) zum Einsatz, wie in Gärtner et al. (2015) beschrieben. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler. Die Forward- und im Falle von *Lactobacillus buchneri* ebenfalls Reverse-Sequenzen der PCR-Produkte wurden anschließend bestimmt (GATC Biotech, Konstanz, Deutschland) und die resultierenden Sequenzen mit der NCBI (National Center for Biotechnology Information)-Datenbank verglichen, um die spezifischen Sequenzinformationen des Bakterienstamms zu erhalten.

Das Institut für Lebensmittelqualität der LUFA Nord-West (Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt Nord-West, Ammerländer Heerstraße 115, 26129 Oldenburg, Deutschland) erhielt zusätzlich eine 10 ml-Spülprobe jedes Horns der letzten neun

Versuchskühe zur Untersuchung des allgemeinen Keimgehalts, einschließlich *Trueperella pyogenes*, coliformer Bakterien, Hefen, Schimmelpilze, unspezifischer Bakterien und Chlamydien. Jede Probe wurde auf fünf verschiedenen Agars ausplattiert: Columbia-Agar (37 °C, 24 h) und Columbia-Agar (7,5 % CO₂-begast, 37 °C, 24 h) zum Nachweis von mikroaerophilen Bakterien; Gassner-Agar (37 °C, 24 h) zum Nachweis von gramnegativen Bakterien; Sabouraud-Agar (28 °C, 5 Tage) und YGC-Agar (28 °C, 5 Tage) zum Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen. Der Bakteriengehalt wurde semiquantitativ in den Kategorien „nicht nachgewiesen“ (-) bis hochgradig (+++) vom Labor angegeben. Zur weiteren bakteriellen Differenzierung wurden Kolonien anhand ihrer Morphologie von den Agarplatten abgenommen und subkultiviert. Eine genaue Klassifizierung erfolgte anschließend mittels Bruker MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalyse). Die Chlamydien-PCR wurde direkt aus den Spülproben durchgeführt.

3.1.9 Kategorisierung der nachgewiesenen Bakterien und des kultivierbaren uterinen Mikrobioms

Die mittels PCR oder MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmte Bakteriengattung und/oder -art wurde anhand einer Literaturrecherche als „potenziell probiotisch“, „potenziell pathogen“ oder als Kommensale eingestuft. Dabei erfolgte für jede Bakteriengattung und -art eine individuelle Recherche, wobei verschiedene wissenschaftliche Studien und mikrobiologische Grundlagen einbezogen wurden. Als „potenziell probiotisch“ wurden jene Bakterien klassifiziert, für die in der Literatur Hinweise auf gesundheitsfördernde Effekte beschrieben waren. Hierzu zählten insbesondere Vertreter der Milchsäurebakterien, d. h. der Bakterienordnung *Lactobacillales*. Als „potenziell pathogen“ wurden Bakterien eingeordnet, für die in wissenschaftlichen Arbeiten Hinweise auf krankheitsverursachende Eigenschaften festgestellt wurden, insbesondere Schädigungen von Geweben der Reproduktionsorgane. Als Kommensale wurden jene Bakterien klassifiziert, für die in der ausgewerteten Literatur weder Hinweise auf gesundheitsfördernde noch auf pathogene Effekte beschrieben waren. Aufgrund der heterogenen Datenlage erfolgte die Klassifikation bewusst als „potenziell“, um zu verdeutlichen, dass die zugrunde liegende Evidenz kontextabhängig und nicht eindeutig war. Die Auflistung von über 80 Literaturstellen zur Klassifizierung der nachgewiesenen Bakterienarten findet sich Tab. 10.

Tab. 10 Bakterienarten alphabetisch sortiert in 3 Kategorien: „potenziell pathogen“, „potenziell probiotisch“, reine Kommensalen

„Potenziell pathogen“		Kommensalen			
		„Potenziell probiotisch“		Reine Kommensalen	
Bakterienart	Literaturnachweis	Bakterienart	Literaturnachweis	Bakterienart	Literaturnachweis
<i>Bacillus cereus</i>	(Drobniewski, 1993; Sun et al., 2011)	<i>Bacillus licheniformis</i>	(Agerholm et al., 1995; Alexopoulos et al., 2004; Shobharani et al., 2015; Wieler et al., 2015)	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	(Savini et al., 2009; Srinivasan et al., 2022a, 2022b)
<i>Chlamydia</i> spp.	(Land & Evers, 2002; Rowland et al., 1985)	<i>Enterococcus hirae</i>	(Espeche et al., 2012; Maldonado et al., 2018; Zhang et al., 2022)	<i>Streptococcus mitis</i>	(Mitchell, 2011; Wyder et al., 2011)
<i>Corynebacterium</i> spp.	(Ballas et al., 2020; Hartigan et al., 1974)	<i>Heyndrickxia coagulans</i>	(Liang et al., 2024)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(Wang et al., 2018a)
<i>Escherichia coli</i>	(Williams et al., 2008b, 2008a)	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	(Batt, 2014)	<i>Staphylococcus simulans</i>	(Sayari et al., 2001; Shields et al., 2016)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	(Adekunle et al., 2024; Marchiani et al., 2021; Mekibib et al., 2024)	<i>Lactobacillus brevis</i>	(Batt, 2014; Rönkä et al., 2003; Teixeira, 2014)		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Arulmozhil et al., 2014; Mekibib et al., 2024; Sheikh et al., 2005)	<i>Lactobacillus buchneri</i>	(Gärtner et al., 2015; Peter et al., 2018)		
<i>Pseudomonas</i> sp.	(Azawi, 2008; Ferris et al., 2017; Gani et al., 2008)	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	(Batt, 2014; Coton et al., 2008; Fang et al., 2023)		
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	(Al-Kraety et al., 2022; Hajjar et al., 2020; Pi et al., 2020)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(Bhandari et al., 2016; Ramos et al., 2013)		
<i>Staphylococcus capitis</i>	(Rebordão et al., 2014)	<i>Lactobacillus sakei</i>	(Genís et al., 2016; Li et al., 2022)		
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	(Zhao et al., 2014)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	(Daba et al., 1991; De Paula et al., 2015; Khudaier, 2011; Lonvaud-Funel, 2014)		

Tab. 10 Bakterienarten alphabetisch sortiert in 3 Kategorien: „potenziell pathogen“, „potenziell probiotisch“, reine Kommensalen (1. Fortsetzung)

„Potenziell pathogen“		Kommensalen			
		„Potenziell probiotisch“		Reine Kommensalen	
Bakterienart	Literaturnachweis	Bakterienart	Literaturnachweis	Bakterienart	Literaturnachweis
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	(AL-Ghizzawi & Jomaa, 2018; Fredheim et al., 2009; Zhao et al., 2014)	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	(Iarovoi et al., 2023; Lonvaud-Funel, 2014; Sawa et al., 2010; Wang et al., 2018b)		
<i>Staphylococcus sciuri</i>	(Nemeghaire et al., 2014)	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	(Borges et al., 2013; Raccach, 2014)		
<i>Streptococcus anginosus</i>	(Gobbetti & Calasso, 2014; Ruoff, 1988; Tao et al., 2019)	<i>Weissella jogaejeotgali</i>	(Ahmed et al., 2022; Lonvaud-Funel, 2014)		
<i>Streptococcus equinus</i>	(Gobbetti & Calasso, 2014; Jans et al., 2015)	<i>Weissella paramesenteroides</i>	(Ahmed et al., 2022; Lonvaud-Funel, 2014; Yadav et al., 2022)		
<i>Streptococcus salivarius</i>	(Bednarska-Czerwińska et al., 2022; Ruoff et al., 1989)	<i>Weizmannia coagulans</i>	(Cao et al., 2020; Fijan et al., 2023; Ito et al., 2022; Jurenka, 2012; Ostad et al., 2024; Wang et al., 2022; Zhang et al., 2024)		

Wurde bei einem Uterushorn eine Besiedlung mit potenziell pathogenen Keimen und eventuell Kommensalen festgestellt, erfolgte die Einstufung des Uterushorns als „potenziell pathogen“ (PATH). War hingegen eine reine Besiedlung mit potenziell probiotischen Keimen und eventuell Kommensalen nachweisbar, so wurde das Horn als „potenziell probiotisch“ (PROB) eingestuft. Lag eine Besiedlung mit sowohl potenziell pathogenen und probiotischen Keimen sowie eventuell Kommensalen in einem Horn vor, erfolgte die Einstufung als „gemischt besiedelt“ (MIX). War ein Uterushorn lediglich mit als Kommensalen klassifizierten Bakterien besiedelt, wurde es als Kommensalen-Horn (KOM) eingestuft:

PATH	Potenziell pathogene Bakterien (+ evtl. Kommensalen)
PROB	Potenziell probiotische Bakterien (+ evtl. Kommensalen)
MIX	Potenziell pathogene und probiotische Bakterien (+ evtl. Kommensalen)
KOM	Rein Kommensalen

Eine ähnliche Einteilung erfolgte für den gesamten Uterus. Wies der Uterus der Tiere im linken und im rechten Uterushorn eine reine Besiedlung mit potenziell pathogenen Keimen und eventuell Kommensalen auf, wurde der Uterus als potenziell pathogen (PATH) eingestuft. War der Uterus der Tiere im linken und im rechten Uterushorn mit potenziell probiotischen Keimen und eventuell Kommensalen besiedelt, wurde der Uterus als potenziell probiotisch (PROB) eingestuft. Wies der Uterus der Tiere im linken und rechten Horn eine unterschiedliche Besiedlung (PATH und PROB) oder in mindestens einem Horn eine gemischte Besiedlung auf, wurde der Uterus als gemischt (MIX) eingestuft:

PATH	a) Beide Uterushörner PATH b) Ein Uterushorn PATH und das andere KOM
PROB	a) Beide Uterushörner PROB b) Ein Uterushorn PROB und das andere KOM
MIX	a) Linkes und rechtes Uterushorn unterschiedlich (PROB und PATH) b) Ein oder beide Uterushörner MIX

3.1.10 Kategorisierung weiterer erhobener Parameter

Zusätzlich wurden die über die Befundbögen erhobenen und aus dem VIT Verden stammenden Daten der Versuchstiere analysiert. Es erfolgte eine Kategorisierung der Parameter Laktationsstadium, Parität, Eutergesundheit sowie Rückgewinnung, Trübung und

Blutbeimengung der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit während der Embryonengewinnung wie in Tab. 11 ersichtlich.

Tab. 11 Einteilung untersuchter Parameter in Kategorien mit Definitionskriterien

Parameter	Kategorie	Definition
Laktationsstadium	1	≤ 90 DIM *
	2	91 – 180 DIM
	3	181 – 365 DIM
	4	> 365 DIM & Trockenstehphase (Martin et al., 2014)
Parität (Laktationsgruppe)	1	Primipara
	2	Multipara: 2. und 3. Laktation
	3	Multipara: ≥ 4. Laktation
Eutergesundheit	1	Eutergesund (≤ 100.000 Zellen/ml)
	2	Subklinische (> 100.000–200.000 Zellen/ml) oder chronischen Mastitis (2-mal > 200.000 Zellen/ml) (Hoedemaker et al., 2014)
Rückgewinnung der Spülflüssigkeit	1	Vollständig
	2	Reduziert **
Trübung der Spülflüssigkeit	1	Grad 1 (ggr.)
	2	Grad 2 (leicht) und 3 (hgr.)
Blutbeimengung der Spülflüssigkeit	1	Grad 0 (keine) und 1 (ggr.)
	2	Grad 2 (leichte) bis 4 (schwer)

* DIM = Days in milk (Tage in Laktation)

** Die Uterushornspülungen wurden jeweils mit einem Volumen von 600 ml Spülmedium durchgeführt. Bei drei Uterushörnern musste die Spülung mit einer reduzierten Menge von 180 bis 270 ml durchgeführt werden. Aufgrund einer starken Blutbeimengung oder einer unzureichenden Rückgewinnung der eingebrachten Spülflüssigkeit (< 50 %) wurden die Spülungen abgebrochen, um die Gesundheit der Spender zu gewährleisten. Diese Spülungen wurden ebenfalls der Kategorie 2 zugeordnet.

3.1.11 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte durch Herrn Schaubmar und PD Dr. Büttner der AG Biomathematik und Datenverarbeitung der Justus-Liebig-Universität Gießen (Frankfurter Str. 95, 35392 Gießen) mit dem Statistikprogramm SAS®, Statistical Analysis System, Version 9.4.2., USA 2013. Für die Datenbeschreibung und Datenprüfung wurden

arithmetische Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (engl. Standard Deviation, SD) sowohl von den Anzahlen als auch von den Prozentsätzen ermittelt. Die Prüfung der Daten auf Normalverteilung erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Test, Kolmogorov-Smirnov-Test sowie Cramér-von-Mises-Test. Die Signifikanz der festen Effekte (bis zu vier festen Effekten) wurden in einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mittels Typ III F-Tests innerhalb einer ANOVA getestet. Als statistisch signifikant galten Unterschiede von $p < 0,05$ (*) und Unterschiede von bis zu $p < 0,1$ als Tendenz. Bei der statistischen Überprüfung sowohl der Einflüsse der verwendeten Spermaportionen als auch der Rückgewinnung, der Trübung sowie der Blutbeimengung der Spülflüssigkeit auf die Erfolgsparameter der Embryonengewinnung lag keine Normalverteilung der Werte vor. Nicht normalverteilte Daten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test als nicht parametrischer Test überprüft. Bei der Auswertung von zwei kategorialen Daten wie im Falle der statistischen Auswertung der mikrobiellen Besiedlung und dessen Einfluss auf die Rückgewinnung, die Trübung und die Blutbeimengung der Spülflüssigkeit fand der Pearson Chi-Quadrat-Test Anwendung.

Die Werte dieser Arbeit werden auf eine Nachkommastelle gemäß dem üblichen Regeln gerundet. Dadurch kann es in Einzelfällen zu geringfügigen Abweichungen bei der Summenbildung kommen, sodass z. B. addierte Prozentsätze nicht exakt 100,0 % ergeben. Beispielsweise summieren sich bei der Auswertung der Embryonenergebnisse beim Laktationsstadium 4 die Raten 46,1 % taugliche Embryonen, 16,4 % degenerierte Embryonen und 37,6 % unbefruchtete Oozyten zu 100,1 %. Die Ursprungswerte der Prozentsätze lauteten: 46,067 %, 16,367 % und 37,567 %.

Es waren lediglich zwei Uterushörner rein mit Kommensalen besiedelt. Daher wurden diese Uterushörner sowie die kontralateralen Hörner aus statistischen Gründen von der Auswertung des mikrobiologischen Einflusses auf die Embryonenqualität ausgeschlossen. Lediglich ein Embryo innerhalb der gesamten Untersuchung war nicht tiefgefriertauglich. Daher wird dieser Erfolgsparameter bei der Auswertung der Einflussfaktoren nicht weiter betrachtet. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs und der zu gleichen Ausprägung des Parameters „Stoffwechsellaage“, der heterogenen Ausprägung des Parameters „Betriebseinfluss“ und der Vielzahl der eingesetzten Bullen bei den Besamungen konnten diese Variablen nicht statistisch ausgewertet werden.

3.2 Studie 2 – Vergleichende Betrachtung des Uterusmikrobioms in den Hornspitzen und im Corpus uteri an neun Schlachtkühen

3.2.1 Daten der Schlachtkühe

Bei den neun beprobten Kühen handelte es sich um Milchkühe der Rasse Deutsche Holstein (oder Kreuzungen) von sieben verschiedenen Betrieben aus dem VOST-Gebiet. Die Kühe wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Die Gründe für die Schlachtung der Einzeltiere sowie eine Anwendung von Medikamenten bei den Tieren vor der Schlachtung waren nicht bekannt. Da die Tiere dem Schlachtprozess zugeführt wurden, ist jedoch davon auszugehen, dass eine eventuelle Wartezeit von Medikamenten eingehalten wurde. Die neun Kühe befanden sich zwischen der 1. und 9. Laktation und waren zwischen 22 bis 275 Tagen post partum. Die Daten wurden online aus dem SERVIT-System der VIT erhoben.

3.2.2 Probenentnahme am Schlachthof

An drei verschiedenen Tagen zwischen November 2022 und April 2023 wurden in einem Schlachthof in der Nähe von Leer (Ostfriesland, Niedersachsen, Deutschland) während der regulären Schlachtroutine die Uteri von je drei Schlachtkühen entnommen. Der amtliche Tierarzt des Schlachthofes schnitt die Uteri aus dem Darmbündel zwischen Portio vaginalis und Vulva heraus, um Kontaminationen der Gebärmütter durch Kontakt mit der äußeren Haut zu vermeiden. Alle neun Kühe waren schlachttauglich, und das Fleisch sowie alle anderen verwendeten Organe wurden als für die Lebensmittelproduktion geeignet eingestuft. Die Kühe waren nicht tragend und wiesen äußerlich keine sichtbaren pathologischen Veränderungen der Ovarien und des Uterus auf.

3.2.3 Handhabung von Organen und Proben

Die Entnahme der Uteri erfolgte maximal 30 Minuten nach der Tötung. Innerhalb von zwei Stunden wurden alle Uteri am Schlachthof entnommen und innerhalb von 45 Minuten bei Raumtemperatur in das Labor transportiert. Der Transport der Organe erfolgte separat unter Verwendung von Plastikboxen, um eine gegenseitige Kontamination zu verhindern. Die Symmetrie (symmetrisch = S, asymmetrisch = AS) und Größe der Uteri ließ sich modifiziert nach dem Untersuchungsschlüssel nach Rosenberger (1977) bestimmen. Die Größeneinstufung reicht von G I, wobei die Uterushörner etwa fingerstark sind, bis G V, wobei der Uterus die Größe eines Brotlaibs überschreitet. Waren die Uterushörner asymmetrisch,

wurde das größere Uterushorn für die Bestimmung der Größe beurteilt. Die Größe der Ovarien wurde mit einem Lineal vermessen und die vorhandenen Funktionsgebilde dokumentiert.

Im Labor erfolgte die Vorbereitung der Uteri zur Gewährleistung einer sauberen und einfachen mikrobiologischen Probenentnahme. Dazu wurde die Gebärmutteroberfläche gründlich mit Jodseife (Jodosept PVP®, Vetoquinol) gereinigt. Das Ligamentum latum uteri wurde beidseitig entlang des Gebärmutterhalses und des Corpus uteri und die Ligamenta intercornualia zwischen den beiden Hörnern in der Mitte zur Bifurkation hin mit einem Skalpell (O.R. Skalpell-Klinge steril, Figur 2) abpräpariert.

Um eine Probe aus der Uterushornspitze zu gewinnen, wurde eine Metallarterienklemme (Arterienklemme ohne Zähne, gerade, 21 cm, WDT) auf den Eileiter gesetzt, um den Verlust von Flüssigkeiten über diesen zu vermeiden. Mit einem sterilen Skalpell erfolgte die Durchtrennung der Uterushörner am höchsten Punkt der großen Kurvatur. Das Spülmedium (EmXcell embryo flushing medium®, imv technologies) wurde mit einer Spritze (Henke Sass Wolf - Henke-Ject® 10(12) ml) und einer Kanüle (WDT, Easy-Lance Einmalkanüle, 18 G x 1 1/2") schrittweise bis zu 30 ml in die Hornspitze gespült und anschließend wieder aspiriert. Die ersten 10 ml der zurückgewonnenen Flüssigkeit wurden in einem Falcon™-Röhrchen (konisches Zentrifugenröhrchen, 15 ml, Fisher scientific GmbH) zur Analyse im Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde Gießen (Justus-Liebig-Universität Gießen, Frankfurter Straße 92, 35392 Gießen) überführt. Die nächsten 10 ml der Spülflüssigkeit wurden zur Untersuchung im Institut für Lebensmittelqualität der LUFA Nord-West entnommen. Diese Prozedur erfolgte sowohl am linken als auch am rechten Horn mit jeweils neuen Spritzen, Kanülen und Röhrchen.

Für die Korpus-Proben wurde das linke Horn jedes Organs mit Nahtmaterial (Catgut Chrome, EP3, LuxSutures) knapp oberhalb der Bifurkation abgebunden. Zudem wurden zwei Metallarterienklemmen auf oder direkt kranial des Gebärmutterhalses platziert, um einen Verlust und eine Kontamination der Spülflüssigkeit durch die Zervix zu verhindern. Das rechte Horn wurde knapp oberhalb der Bifurkation mit einem Skalpell durchtrennt. Die Spülung des Corpus uteri erfolgte in gleicher Weise wie an den Hornspitzen. Die Abb. 16 stellt das angewandte Vorgehen der Probenentnahme dar.

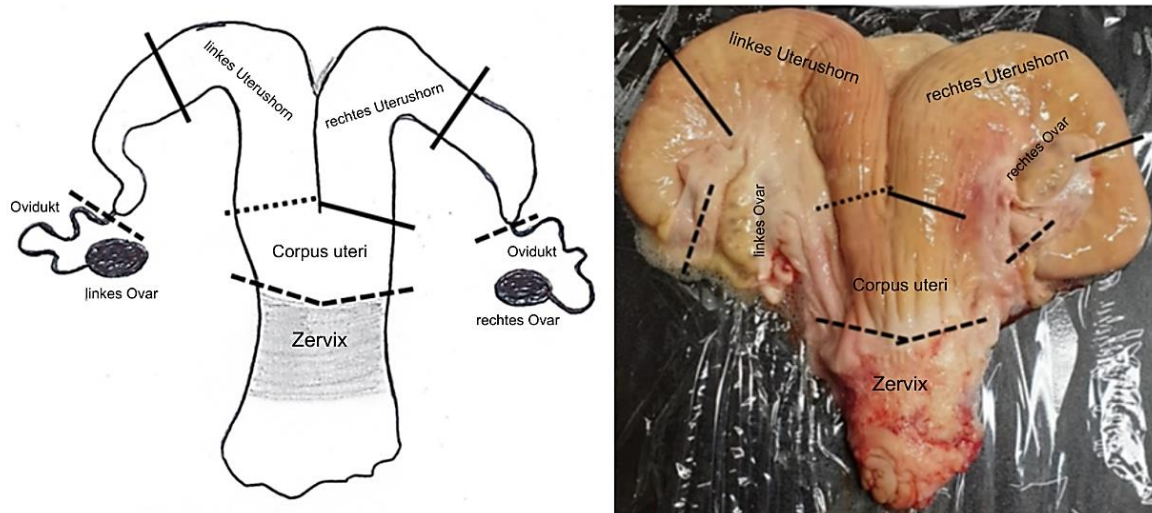


Abb. 16 Schematische Darstellung der Vorgehensweise am Uterus anhand einer Zeichnung bzw. eines Bildes; durchgehende Linie = Schnitt, gestrichelte Linie = Klemme, gepunktete Linie = Naht

3.2.4 Kultivierung, Isolierung und Charakterisierung von Bakterien

Die Lagerung der Proben erfolgte über Nacht im Kühlschrank der Besamungs- und ET-Station in Georgsheil des VOST bei einer Temperatur von 6 bis 8 °C. Per Kurier wurden sie innerhalb der nächsten 36 Stunden gekühlt an die Labore verschickt.

Es folgte eine Untersuchung der Proben aus allen drei Lokalisationen (rechte Hornspitze, linke Hornspitze, Corpus uteri) im Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde Gießen auf das Vorhandensein von Laktobazillen. Zur Bestimmung von aerob wachsenden, Laktat bildenden Bakterien (LAB) wurden die Proben mittels Spatelmethode nach Referenzmethode ASU L 06.00-35 1992-12, wie sie für Fleisch und Fleischprodukte üblich ist, untersucht. Bei dieser Methode wurde ein MRS-Agar mit 0,1 ml der unverdünnten homogenisierten Probe oder der Erstverdünnung und der weiteren Verdünnungen (jeweils im Doppelansatz) beimpft und anschließend mit einem Spatel in kreisenden Bewegungen gleichmäßig verteilt. Die Bebrütung der Agarplatten erfolgte für einen Zeitraum von drei Tagen bei 25 °C im Brutschrank. In dieser Studie wurden weiße oder graue, flache oder erhabene, glatte oder raue Kolonien als LAB klassifiziert und gezählt. Anhand der Koloniezahlen der verschiedenen Verdünnungsstufen wurde die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (KbE) pro Milliliter berechnet. Anschließend erfolgte zur Identifizierung von Laktobazillen auf Genus-Ebene eine konventionelle PCR unter Verwendung des Primer-Paars R16-1 fw (5'-CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA-3') und LbLMA1 rv (5'-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3') für das 16S rRNA Zielgen, welche Fragmente variabler Größe von etwa 250 bp amplifizieren. Die PCR wurde in einem

Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Das Thermocycler-Programm umfasste folgende Schritte: initiale Denaturierung (95 °C, 5 min); 35 Zyklen aus Denaturierung (95 °C, 15 Sek.), Annealing (55 °C, 15 Sek.), Elongation (72 °C, 15 Sek.); finale Elongation (72 °C, 5 min). Die Amplifikationsprodukte wurden anschließend mittels 1,5 %iger Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

Das Institut für Lebensmittelqualität der LUFA Nord-West untersuchte die Proben wie in Kapitel 3.1.8. beschrieben auf den allgemeinen Bakteriengehalt (*Trueperella pyogenes*, coliforme Bakterien, unspezifische Bakterien, Hefen und Schimmelpilze). In dieser Studie fand keine Untersuchung hinsichtlich Chlamydien statt. Der Bakteriengehalt wurde semiquantitativ in den Kategorien „nicht nachgewiesen“ (-) bis hochgradig (+++) vom Labor angegeben.

3.2.5 Statistische Analyse

Alle Ergebnisse wurden mit arithmetischem Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (SD) der Grundgesamtheit angegeben. Diese wurden mittels Microsoft Excel (Microsoft 365) ermittelt. Die qualitative und semiquantitative mikrobiologische Besiedlung wurde rein deskriptiv analysiert und beschrieben.

Die Einteilung der Kühe in die verschiedenen Laktationsstadien erfolgte wie in Kapitel 3.1.10 beschrieben. In der weitergehenden Analyse wurden die Nachweise von coliformen Keimen und *Proteus* spp. als potenziell pathogener Keimgehalt zusammengefasst (Arulmozhil et al., 2014; Mekibib et al., 2024; Williams et al., 2008a).

4 Ergebnisse

4.1 Studie 1 – Potenzieller Einfluss von Laktobazillen auf in vivo gewonnene Rinderembryonen

Bei insgesamt 22 superovulierten Kühen wurden im Rahmen der Embryonengewinnung mikrobiologische Proben gewonnen. Die Ergebnisse von drei Kühen mussten aus der Analyse aufgrund labortechnischer Gründe (Schimmelpilzüberwucherung der Nährböden) ausgeschlossen werden. In der finalen Auswertung wurden 19 Tiere berücksichtigt, wobei insgesamt 38 Uterushörner für die Embryonengewinnung gespült wurden.

4.1.1 Mikrobiologische Nachweise

Im Rahmen dieser Studie wurden jeweils zweimal 10 ml der ersten 50 bis 60 ml Spülflüssigkeit von insgesamt 38 Uterushörnern aus 19 Tieren mikrobiologisch untersucht. Die Auswertung ergab insgesamt 66 mikrobiologische Nachweise (siehe Tab. 12).

Tab. 12 Mikrobiologische Nachweise aus 38 Uterushörnern (19 Tiere) und deren Einschätzung
in: ¹ potenziell probiotisch, ² potenziell pathogen, ³ Kommensale

Tier-Nr.	Uterus-horn	Identifizierte Bakterienart	Isolat	% Identität	Einschätzung
2	rechts	<i>Weizmannia coagulans</i>	EB 74	98	¹
	links	<i>Streptococcus equinus</i>	CNU 77-49	100	²
		<i>Staphylococcus sciuri</i>	MP3	100	²
		<i>Weizmannia coagulans</i>	27	98	¹
		<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	VB19458	72	²
		<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1401	98	²
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IAUK 8737		²
4	rechts	<i>Escherichia coli</i>	EGI30	83	²
	links	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Hakim 1980	100	²
		<i>Bacillus cereus</i>	SPA 1.1	100	²
5	rechts	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	R2A-YJ10_15-48	96	³
	links	<i>Weizmannia coagulans</i>	CACC 834	100	¹
6	rechts	<i>Weissella paramesenteroides</i>	PF58Q	100	¹
		<i>Corynebacterium spp.</i>	GXLA20200911-3	100	²
	links	<i>Weissella paramesenteroides</i>	RKG	100	¹
		<i>Weizmannia coagulans</i>	EB 74	100	¹
7	rechts	<i>Bacillus licheniformis</i>	ka18-2	100	¹
		<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	af-B11	100	²
		<i>Escherichia coli</i>	N18ECO432	100	²
	links	<i>Weissella paramesenteroides</i>	CE.3.1	100	¹

Tab. 12 Mikrobiologische Funde aus 38 Uterushörnern (19 Tiere) und deren Einschätzung in:
¹ potenziell probiotisch, ² potenziell pathogen, ³ Kommensale (1. Fortsetzung)

Tier-Nr.	Uterus horn	Identifizierte Bakterienart	Stamm	% Iden- tität	Einschät- zung
8	rechts	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SMB13		¹
	links	<i>Corynebacterium</i> sp.	GXLA20200911-3	90	²
		<i>Enterococcus hirae</i>	708	100	¹
9	rechts	<i>Corynebacterium</i> sp.	73QC2CO	100	²
	links	<i>Corynebacterium</i> sp.	73QC2CO	100	²
		<i>Staphylococcus pasteurii</i>	RPS6	100	³
11	rechts	<i>Staphylococcus simulans</i>	PCM 2106	100	³
		<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	af-B11	100	²
	links	<i>Escherichia coli</i>	HCD15-2	100	²
12	rechts	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	7036	100	¹
		<i>Weissella jogaejeotgali</i>	L28	100	¹
	links	<i>Lactobacillus brevis</i>	2096	100	¹
13	rechts	<i>Escherichia coli</i>	SSGNw2	80	²
	links	<i>Escherichia coli</i>	MS14386	100	²
16	rechts	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3361	100	¹
	links	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	MLG1-24	100	¹
19	rechts	<i>Lactobacillus sakei</i>	DJ1	100	¹
		<i>Streptococcus salivarius</i>	1638	100	²
	links	<i>Lactobacillus sakei</i>	6668	99	¹
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BDS 302	100	¹
23	rechts	<i>Streptococcus salivarius</i>	2789		²
		<i>Escherichia coli</i>	B1S11	100	²
	links	<i>Klebsiella aerogenes</i>	PM-005	63	²
		<i>Raoultella ornithinolytica</i>	RT1902		²
24	rechts	<i>Bacillus licheniformis</i>	NNTSB1	100	¹
	links	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	RT1902	99	²
		<i>Chlamydia</i> sp.			²
26	rechts	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	RT1902		²
		<i>Bacillus licheniformis</i>	B12	89	¹
	links	<i>Streptococcus anginosus</i>	NCTC11064		²
27	rechts	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	HBUAS56106	100	¹
		<i>Lactobacillus buchneri</i>	CD034	100	¹
		<i>Escherichia coli</i>	KR001_HIC_0034		²
	links	<i>Lactobacillus buchneri</i>	CD034	100	¹
		<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Ro24724	100	²
28	rechts	<i>Lactobacillus buchneri</i>	CD034	99	¹
		<i>Escherichia coli</i>	HH45	98	²
	links	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	EGI317	93	²
30	rechts	<i>Pseudomonas</i> sp.			²
		<i>Staphylococcus capitis</i>	AYP1020	99	²
	links	<i>Pseudomonas</i> sp.			²
		<i>Escherichia coli</i>	2018-10-2CC	99	²

Tab. 12 Mikrobiologische Funde aus 38 Uterushörnern (19 Tiere) und deren Einschätzung in:
¹ potenziell probiotisch, ² potenziell pathogen, ³ Kommensale (2. Fortsetzung)

Tier-Nr.	Uterus horn	Identifizierte Bakterienart	Stamm	% Identität	Einschätzung
31	rechts	<i>Escherichia coli</i>	05P2R3D1E2	97	²
		<i>Heyndrickxia coagulans</i>	LG3	99	¹
	links	<i>Streptococcus mitis</i>	3ET5	80	³
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ADB_BD125	91	³

Die nachgewiesenen Bakterien gehörten zu 65,2 % dem Phylum *Bacillota* und zu 27,3 % dem Phylum *Proteobacteria* an. Vertreter der Phyla *Actinomycetota* (ehemals *Actinobacteria*) und *Chlamydiae* konnten 4- bzw. 1-mal nachgewiesen werden. Insgesamt erfolgte eine Identifikation von 17 verschiedenen Bakteriengattungen, wobei das Genus *Staphylococcus* mit 12 Nachweisen am häufigsten vertreten war. Als zweithäufigstes wurde das Genus *Escherichia* (n = 10) und am dritthäufigsten das Genus *Lactobacillus* (n = 9) isoliert (siehe Abb. 17). Vier Gattungen (*Chlamydia*, *Enterococcus*, *Heyndrickxia*, *Pediococcus*) wurden jeweils nur ein einziges Mal nachgewiesen und wurden daher in Abb. 17 als „Sonstige“ zusammengefasst.

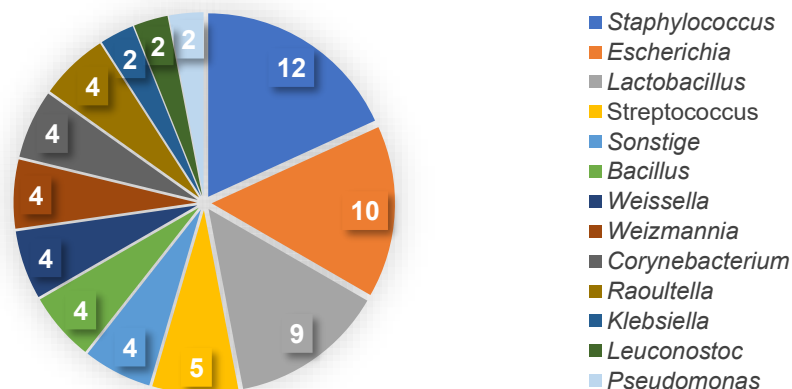


Abb. 17 Einteilung der mikrobiologischen Nachweise (n = 66) anhand der Bakteriengattung (n = 17) und des absoluten Vorkommens

Bakterien der Gattungen *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus* und *Enterococcus*, die zu den Milchsäurebakterien bzw. der Ordnung *Lactobacillales* zählen, wurden insgesamt 17-mal bei 8 von 19 Tieren (42,1 %) nachgewiesen.

Es wurden 34 verschiedene Bakterienarten isoliert. Die am häufigsten nachgewiesene Bakterienart war *Escherichia coli* (n = 10), gefolgt von *Staphylococcus haemolyticus* (n = 5) sowie *Corynebacterium* sp. (species), *Raoultella ornithinolytica* und *Weizmannia (W.) coagulans* (ehemals *Bacillus coagulans*) mit je vier Nachweisen. Das Genus *Lactobacillus*

mit sechs verschiedenen Isolaten (*L. acidipiscis*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. parabuchneri*, *L. plantarum*, *L. sakei*) sowie das Genus *Staphylococcus* (S.) mit ebenfalls sechs verschiedenen Isolaten (*S. sciuri*, *S. capitis*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. pasteurii*, *S. simulans*) waren am diversesten vertreten. 22 Bakterienarten wurden jeweils nur einmal isoliert.

Es folgt die Auswertung der bakteriellen Nachweise der Uterushörner. Aus den Spülproben der linken Uterushörner wurden insgesamt 34 mikrobiologische Nachweise erbracht. Die Bakterien gehörten zu 14 verschiedenen Bakteriengenera und 24 verschiedenen Bakterienarten. Das Genus *Staphylococcus* wurde mit sieben Nachweisen von fünf verschiedenen Bakterienarten am häufigsten nachgewiesen. Die Bakterienarten *E. coli*, *Raoultella ornithinolytica*, *S. haemolyticus* und *W. coagulans* wurden mit je drei Nachweisen am häufigsten isoliert (siehe Abb. 18). Aus den Spülproben der rechten Uterushörner wurden 32 mikrobiologische Nachweise erbracht, die 12 verschiedenen Bakteriengenera und 20 verschiedenen Bakterienarten zugeordnet werden konnten. Die am häufigsten isolierte Gattung war *Escherichia*, welche mit sieben Nachweisen von *E. coli* am stärksten vertreten war. Die am zweithäufigsten nachgewiesene Gattung war *Lactobacillus*, welche sechs Nachweise von fünf verschiedenen *Lactobacillus*-Arten aufwies (siehe Abb. 18).

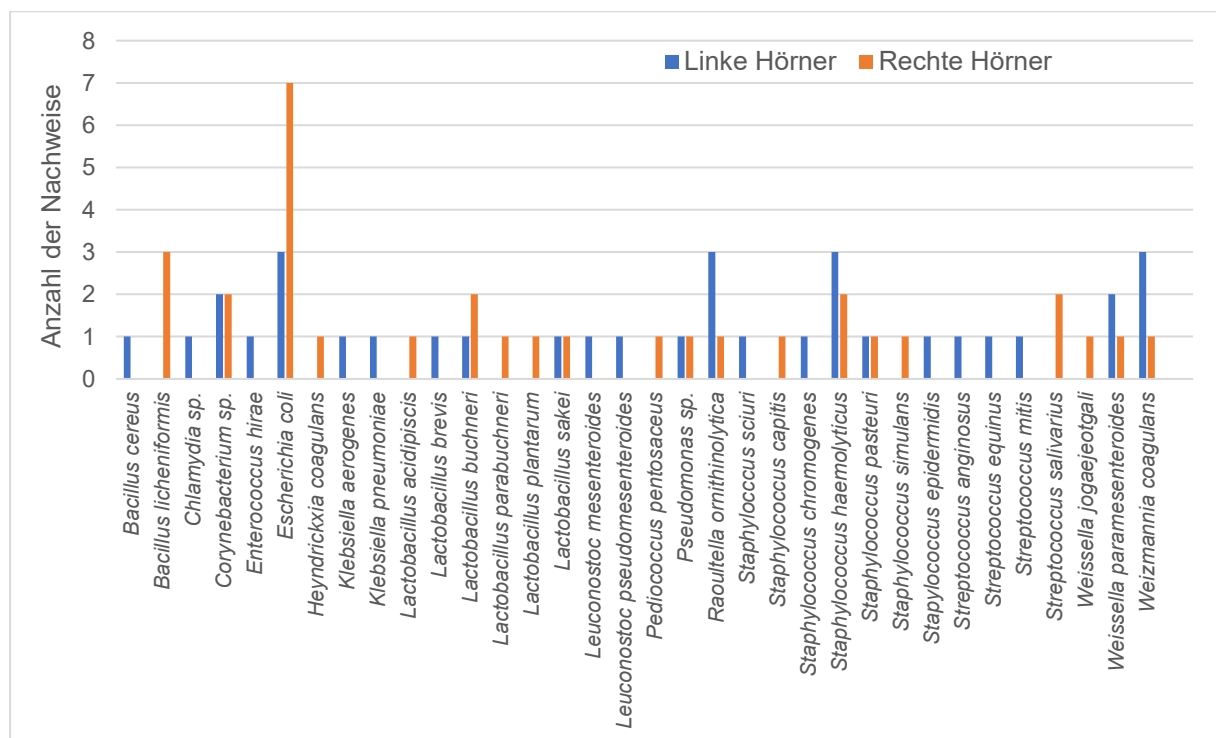


Abb. 18 Absolutes Vorkommen der nachgewiesenen Bakterienarten in den linken (n = 19) und rechten (n = 19) Uterushörnern

L. buchneri wurde in insgesamt drei Uterushörnern von zwei Tieren nachgewiesen. Bei einem Tier konnte *L. buchneri* sowohl im linken als auch im rechten Uterushorn nachgewiesen

werden. Aus dem rechten Uterushorn desselben Tieres wurde ebenfalls *Lactobacillus parabuchneri* isoliert (siehe Tab. 12).

In lediglich einem Tier (Tier 13) wurde eine identische Keimbesiedlung im linken und rechten Uterushorn festgestellt, wobei aus beiden Uterushörnern *E. coli* isoliert wurde. Sechs weitere Tiere wiesen eine Übereinstimmung in einer Bakterienart im linken und rechten Uterushorn auf. Dabei handelte es sich in den Einzelfällen um *W. coagulans* (Tier 2), *Weissella paramesenteroides* (Tier 6), *Corynebacterium* sp. (Tier 9), *L. sakei* (Tier 19), *L. buchneri* (Tier 27) und *Pseudomonas* sp. (Tier 30). Insgesamt konnten bei acht von 19 Tieren Bakterien des gleichen Genus im linken und rechten Uterushorn nachgewiesen werden (siehe Tab. 12).

Die nachgewiesenen Bakterien wurden, wie in Kapitel 3.1.9 beschrieben, anhand einer Literaturrecherche in drei Kategorien klassifiziert: „potenziell pathogen“, „potenziell probiotisch“, Kommensale. Insgesamt konnten 15 Bakterienarten der Kategorie „potenziell pathogen“, 16 Bakterienarten der Kategorie „potenziell probiotisch“ und 4 Bakterienarten der Kategorie Kommensalen zugeordnet werden (siehe Tab. 10, S. 96 f.).

Insgesamt wurden 36 potenziell pathogene Keime (54,5 %), 25 potenziell probiotische Keime (37,9 %) und 5 Kommensalen (7,6 %) nachgewiesen (siehe Abb. 19). Die 34 bakteriologischen Nachweise aus den linken Uterushörnern wurden 20-mal der Kategorie „potenziell pathogen“, 11-mal der Kategorie „potenziell probiotisch“ und 3-mal der Kategorie Kommensalen zugeordnet. Somit waren 58,8 % der bakteriologischen Nachweise potenziell pathogener und 34,4 % potenziell probiotischer Ausprägung (siehe Abb. 20). Die 32 bakteriellen Nachweise aus den rechten Uterushörnern wurden 16-mal der Kategorie „potenziell pathogen“, 14-mal der Kategorie „potenziell probiotisch“ und 2-mal der Kategorie Kommensalen zugeordnet. In den rechten Uterushörnern waren somit 50 % der Nachweise potenziell pathogen und 43,8 % der Nachweise potenziell probiotisch (siehe Abb. 20).

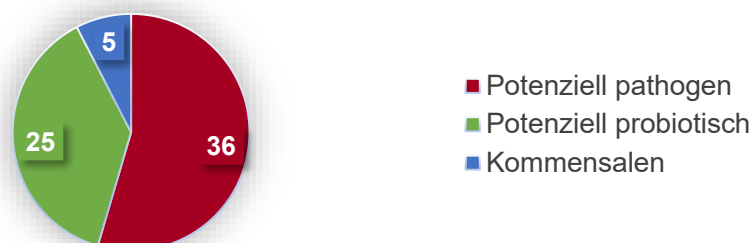


Abb. 19 Einteilung aller mikrobiologischen Nachweise (n = 66) sowohl der linken und rechten Uterushörner anhand der Kategorien: potenziell pathogen, potenziell probiotisch, Kommensalen in absoluten Zahlen

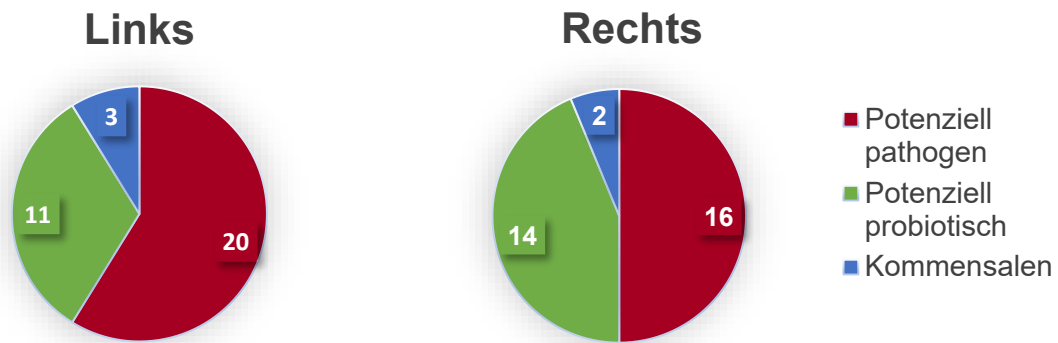


Abb. 20 Einteilung der mikrobiologischen Nachweise links (n = 34) und rechts (n = 32) anhand der Kategorien: potenziell pathogen, potenziell probiotisch, Kommensalen in absoluten Zahlen

Die Einstufung der Uterushörner als „potenziell pathogen“ (PATH), „potenziell probiotisch“ (PROB), „gemischt besiedelt“ (MIX) oder Kommensalen-Horn (KOM) erfolgte anhand der bakteriologischen Besiedlung der Uterushornspitze, wie in Kapitel 3.1.9 näher erläutert. Die Auswertung ergab folgende Einstufung der 38 gespülten Uterushörnern: 15 Hörner in der Kategorie PATH (39,5 %), 11 Hörner in der Kategorie PROB (28,9 %), 10 Hörner in der Kategorie MIX (26,3 %) und zwei Hörner in der Kategorie KOM (5,3 %, siehe Abb. 21). Von den 19 linken Uterushörnern wurden 9 Hörner der Kategorie PATH (47,4 %), 6 Hörner der Kategorie PROB (31,6 %), 3 Hörner der Kategorie MIX (15,8 %) und ein Horn der Kategorie KOM (5,3 %) zugeordnet. Die Einteilung der 19 rechten Uterushörner ergab 6-mal die Kategorie PATH (31,6 %), 5-mal die Kategorie PROB (26,3 %), 7-mal die Kategorie MIX (36,8 %) und 1-mal die Kategorie KOM (5,3 %; siehe Abb. 22).

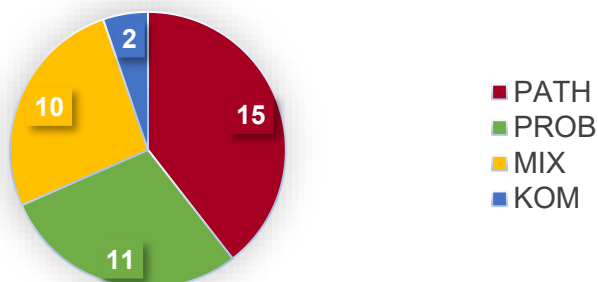


Abb. 21 Zuordnung der untersuchten Uterushörner (n = 38) in die bakteriellen Kategorien PATH, PROB, MIX, KOM in absoluten Zahlen

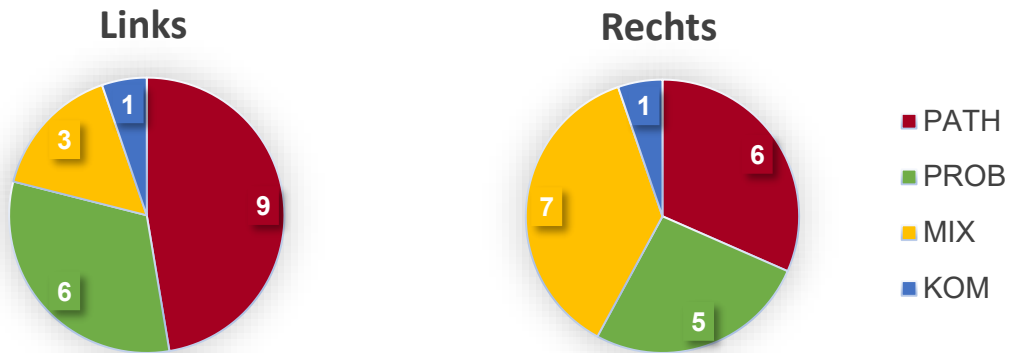


Abb. 22 Zuordnung der untersuchten linken (n = 19) und rechten (n = 19) Uterushörner in die bakteriellen Kategorien PATH, PROB, MIX, KOM in absoluten Zahlen

Die Einstufung des gesamten Uterus erfolgte anhand der Einstufung der linken und rechten Uterushörner, wie in Kapitel 3.1.9 näher beschrieben. Die Auswertung der 19 Uteri ergab: 6-mal Kategorie PATH (31,6 %), 3-mal Kategorie PROB (15,8 %) und 10-mal Kategorie MIX (52,6 %, siehe Abb.23). Dies bedeutet, dass in 13 von 19 Uteri (68,4 %) potenziell probiotische Keime identifiziert werden konnten.

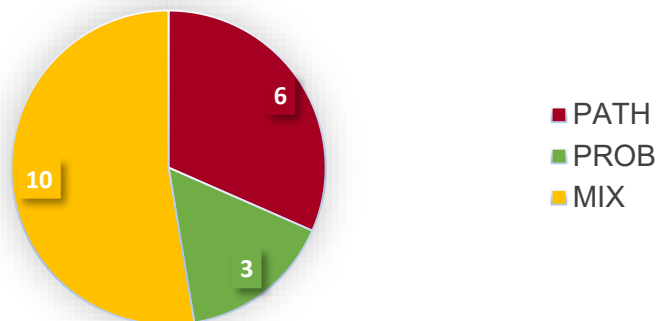


Abb. 23 Zuordnung der Uteri (n = 19) in die bakteriellen Kategorien PATH, PROB, MIX

Es wurden keine Hefen oder Schimmelpilze in den daraufhin untersuchten Proben nachgewiesen.

4.1.2 Ergebnisse der Embryonengewinnungen

In den 19 Embryonengewinnungen wurden insgesamt 226 Embryonen bzw. Oozyten gewonnen. Dies ergab $11,9 \pm 9,9$ Embryonen bzw. Oozyten pro Gewinnung. Im Durchschnitt waren davon $7,3 \pm 7,0$ transfertauglich, was einem Anteil von $65,4 \pm 31,5$ % entsprach. Die nicht transfertauglichen Embryonen beliefen sich auf $1,6 \pm 2,3$ ($11,2 \pm 16,8$ %) degenerierte Embryonen und $3,1 \pm 4,5$ ($23,5 \pm 31,7$ %) unbefruchtete Eizellen. Durchschnittlich $80,4 \pm 32,3$ % der transfertauglichen Embryonen waren erster Qualität und $99,6 \pm 1,8$ % der transfertauglichen Embryonen waren tiefgefriertauglich (Qualität 1 und 2). Lediglich ein Embryo war von dritter Qualität und somit nicht tiefgefriertauglich (siehe Tab. 13).

Tab. 13 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen der Uteri (n = 19)

Erfolgsparameter	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$
Corpora lutea	228	$12,0 \pm 4,7$
Embryonengewinnungsrate	–	$72,4 \pm 28,1$ %
Gewonnene Embryonen + Oozyten	226	$11,9 \pm 9,9$
Taugliche Embryonen (% von Gesamt)	138	$7,3 \pm 7,0$ ($65,4 \pm 31,5$ %)
Tiefgefriertaugliche Embryonen (% von Tauglich)	137	$7,2 \pm 7,0$ ($99,6 \pm 1,8$ %)
Embryonen 1. Qualität (% von Tauglich)	116	$6,1 \pm 6,2$ ($80,4 \pm 32,3$ %)
Degenerierte Embryonen (% von Gesamt)	30	$1,6 \pm 2,3$ ($11,2 \pm 16,8$ %)
Unbefruchtete Oozyten (% von Gesamt)	58	$3,1 \pm 4,5$ ($23,5 \pm 31,7$ %)

Von den 19 Tieren dieser Studie wurden alle Uterushörner gespült und ausgewertet. Die Embryonengewinnung von insgesamt drei Gebärmutterhörnern bei zwei Spendertieren wurde frühzeitig abgebrochen. Da aus diesen Spülungen jedoch mikrobiologische Proben sowie Embryonen gewonnen wurden, fließen sämtliche Daten dieser Spülungen in die Auswertung mit ein. Somit wurden insgesamt 38 Uterushörner, 19 linke und 19 rechte Hörner analysiert.

Mittels transrektalen Ultraschalls konnten sowohl auf den linken als auch auf den rechten Ovarien insgesamt jeweils 114 Corpora lutea dargestellt werden. Im Durchschnitt wurden $5,9 \pm 5,3$ Embryonen und Eizellen pro Uterushorn gewonnen (siehe Tab. 14). Dies belief sich bei Spülungen aus dem linken Horn auf insgesamt 107 und durchschnittlich $5,6 \pm 4,5$ gewonnene Embryonen und Eizellen. Bei den Spülungen der rechten Uterushörner wurden insgesamt 119 und durchschnittlich $6,3 \pm 6,1$ Embryonen und Eizellen gewonnen. Die durchschnittliche Embryonengewinnungsrate unterschied sich bei Embryonengewinnungen der linken und rechten Uterushörner nur um 1,2 %-Punkte (siehe Tab. 15). Aus einem linken

und aus zwei rechten Hörnern konnten trotz nachweisbarer Corpora lutea auf dem ipsilateralen Ovar keine Embryonen und Eizellen gewonnen werden. Durchschnittlich konnten $3,6 \pm 3,8$ transfertaugliche Embryonen aus den Uterushörnern gewonnen werden, die zu $78,7 \pm 34,9$ % Embryonen 1. Qualität waren. Pro Horn wurden im Durchschnitt $0,8 \pm 1,4$ degenerierte Embryonen sowie $1,5 \pm 2,6$ unbefruchtete Eizellen gewonnen (siehe Tab. 14). Es konnten keine Unterschiede hinsichtlich der ausgewerteten Erfolgsparameter zwischen dem linken und rechten Uterushorn beobachtet werden (siehe Tab. 15).

Tab. 14 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryongewinnungen pro Uterushorn (linkes und rechtes Uterushorn zusammen, n = 38)

Erfolgsparameter	$\bar{x} \pm SD$
Corpora lutea	$6,0 \pm 2,5$
Embryongewinnungsrate	$70,1 \pm 35,7$ %
Gewonnene Embryonen + Oozyten	$5,9 \pm 5,3$
Taugliche Embryonen (% von Gesamt)	$3,6 \pm 3,8$ ($63,0 \pm 34,6$ %)
Tiefgefriertaugliche Embryonen (% von Tauglich)	$3,6 \pm 3,8$ ($99,4 \pm 3,0$ %)
Embryonen 1. Qualität (% von Tauglich)	$3,1 \pm 3,4$ ($78,7 \pm 34,9$ %)
Degenerierte Embryonen (% von Gesamt)	$0,8 \pm 1,4$ ($12,3 \pm 19,1$ %)
Unbefruchtete Oozyten (% von Gesamt)	$1,5 \pm 2,6$ ($24,3 \pm 35,8$ %)

Tab. 15 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryongewinnungen der linken und rechten Uterushörner (getrennte Auswertung)

Erfolgsparameter	Links (n = 19)		Rechts (n = 19)	
	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$
Corpora lutea	114	$6,0 \pm 2,3$	114	$6,0 \pm 2,7$
Embryongewinnungsrate		$69,5 \pm 35,9$		$70,7 \pm 36,4$
Gewonnene Embryonen + Oozyten	107	$5,6 \pm 4,5$	119	$6,3 \pm 6,1$
Taugliche Embryonen (% von Gesamt)	69	$3,6 \pm 3,9$ ($61,7 \pm 39,5$ %)	69	$3,6 \pm 3,8$ ($64,4 \pm 29,6$ %)
Tiefgefriertaugliche Embryonen (% von Tauglich)	68	$3,6 \pm 3,9$ ($98,8 \pm 4,5$ %)	69	$3,6 \pm 3,8$ ($100,0 \pm 0,0$ %)
Embryonen 1. Qualität (% von Tauglich)	60	$3,2 \pm 3,6$ ($79,7 \pm 37,4$ %)	56	$2,9 \pm 3,2$ ($77,8 \pm 33,7$ %)
Degenerierte Embryonen (% von Gesamt)	14	$0,7 \pm 1,1$ ($12,4 \pm 20,5$ %)	16	$0,8 \pm 1,6$ ($12,3 \pm 18,1$ %)
Unbefruchtete Oozyten (% von Gesamt)	24	$1,3 \pm 2,4$ ($25,9 \pm 41,4$ %)	34	$1,8 \pm 2,8$ ($22,4 \pm 29,5$ %)

4.1.3 Mikrobiologischer Einfluss auf die Embryonenqualität

Der Einfluss der mikrobiologischen Besiedlung der Uterushornspitze auf die Embryonenqualität wurde in 34 Uterushörnern ermittelt. In der vorliegenden Untersuchung wurden insgesamt 10 Uterushörner der Kategorie PROB, 15 Uterushörner der Kategorie PATH und 9 Uterushörner der Kategorie MIX ausgewertet. Die 17 linken Uterushörner wurden wie folgt kategorisiert: 5x PROB, 9x PATH, 3x MIX. Die 17 rechten Uterushörner waren 5x PROB, 6x PATH und 6x MIX.

In der gesamten Auswertung, bei der linke und rechte Uterushörner gemeinsam analysiert wurden, konnten keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) der Erfolgsparameter der Embryonengewinnung zwischen den mikrobiologischen Kategorien festgestellt werden (siehe Tab. 16).

Tab. 16 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen pro Uterushorn (linkes und rechtes Uterushorn zusammen) anhand der mikrobiologischen Kategorien: potenziell probiotisch (PROB), potenziell pathogen (PATH), gemischt besiedelt (MIX)

	PROB n = 10		PATH n = 15		MIX n = 9	
Erfolgsparameter	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$
Gewonnene Embryonen + Oozyten	60	$6,0 \pm 6,2$	115	$7,7 \pm 5,4$	47	$5,2 \pm 3,7$
Taugliche Embryonen (% von Gesamt)	37	$3,7 \pm 4,7$ ($62,3 \pm 41,6$ %)	71	$4,7 \pm 3,8$ ($56,7 \pm 26,1$ %)	26	$2,9 \pm 3,0$ ($66,7 \pm 41,5$ %)
Embryonen 1. Qualität (% von Tauglich)	32	$3,2 \pm 4,4$ ($72,9 \pm 45,1$ %)	60	$4,0 \pm 3,2$ ($89,1 \pm 19,9$ %)	20	$2,2 \pm 2,8$ ($59,9 \pm 43,1$ %)
Degenerierte Embryonen (% von Gesamt)	8	$0,8 \pm 1,1$ ($16,0 \pm 26,5$ %)	20	$1,3 \pm 1,9$ ($16,4 \pm 18,0$ %)	2	$0,2 \pm 0,4$ ($3,4 \pm 6,2$ %)
Unbefruchtete Oozyten (% von Gesamt)	15	$1,5 \pm 2,5$ ($21,8 \pm 36,4$ %)	24	$1,6 \pm 2,0$ ($27,0 \pm 33,3$ %)	19	$2,1 \pm 3,9$ ($30,0 \pm 43,8$ %)

Bei Spülungen von potenziell probiotisch besiedelten Uterushörnern konnten im Durchschnitt $6,0 \pm 6,2$ Embryonen bzw. Oozyten gewonnen werden, wovon $3,7 \pm 4,7$ transfertaugliche Embryonen waren. Die Rate transfertauglicher Embryonen belief sich dabei auf $62,3 \pm 41,6$ %. Es konnten ähnliche Ergebnisse bei Spülungen von potenziell pathogen und gemischt besiedelten Uterushörnern erzielt werden. Spülungen von Uterushörnern der Kategorie PATH erreichten mit einer durchschnittlichen Anzahl von $4,0 \pm 3,2$ sowie prozentual $89,1 \pm 19,9$ % die meisten Embryonen erster Qualität ($p > 0,05$). Bei Uterushörnern, die potenziell probiotisch besiedelt waren, wurden durchschnittlich $72,9 \pm 45,1$ % Embryonen erster Qualität gewonnen, während bei gemischt besiedelten Uterushörnern lediglich $59,9 \pm 43,1$ % Embryonen erster

Qualität erzielt wurden. Demgegenüber wurde bei gemischt besiedelten Uterushörnern der geringste Anteil ($p > 0,05$) mit $3,4 \pm 6,2$ % an degenerierten Embryonen, jedoch der höchste Anteil an unbefruchteten Eizellen von $30,0 \pm 43,8$ % beobachtet. Bei Spülungen von Uterushörnern der Kategorie PROB wurde die geringste Anzahl ($1,5 \pm 2,5$, $p > 0,05$) sowie der geringste prozentuale Anteil ($21,8 \pm 36,4$ %, $p > 0,05$) an unbefruchteten Eizellen gewonnen (siehe Tab. 16).

Ebenfalls in der getrennten Auswertung der Erfolgsparameter der Embryongewinnungen der linken und rechten Uterushörner in Abhängigkeit der mikrobiologischen Kategorien konnten sowohl im Seitenvergleich als auch zwischen den mikrobiologischen Kategorien keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) bei allen Parametern festgestellt werden (siehe Tab. 17). Aus rechten Hörnern der Kategorie PATH konnte mit $\bar{O}$ 8,0 Embryonen/Eizellen die größte Anzahl gewonnen werden. Dieser Wert unterschied sich jedoch nicht signifikant von den anderen Kategorien ($p > 0,05$). Im Durchschnitt waren davon $4,5 \pm 3,6$ Embryonen transfertauglich ($58,3 \pm 7,0$ %). Demgegenüber wurden aus rechten Uterushörnern der Kategorie PROB $6,8 \pm 8,4$ Embryonen und Eizellen gewonnen, von denen $62,4 \pm 41,5$ % transfertaugliche Embryonen waren. Die höchste Rate transfertauglicher Embryonen mit $\bar{O}$ $72,2 \pm 35,6$ % konnte bei Spülungen rechter MIX-Hörner beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse erzielten die Spülungen der linken Uterushörner. Aus linken PATH-Hörnern wurden durchschnittlich $7,4 \pm 4,7$ Embryonen und Eizellen gewonnen. Bei den linken PROB-Hörnern belief sich dieser Wert auf lediglich $5,2 \pm 3,8$, während er bei den drei linken MIX-Hörnern sogar nur $3,3 \pm 4,9$ gesamt gewonnene Embryonen und Eizellen betrug. Die linken MIX-Hörner wiesen die niedrigste Rate transfertauglicher Embryonen von lediglich $50,0 \pm 70,7$ % auf. Dahingegen konnte bei den linken PROB-Hörnern durchschnittlich $62,1 \pm 46,5$ % und bei den linken PATH-Hörnern durchschnittlich $55,6 \pm 34,1$ % transfertaugliche Embryonen beobachtet werden. Dies entsprach den Raten der rechten PROB- und PATH-Hörner. Sowohl linke als auch rechte Uterushörner der Kategorie PATH erreichten die höchsten ($p > 0,05$) prozentualen Anteile Embryonen erster Qualität von gewonnenen tauglichen Embryonen von jeweils über 88 %. Die linken und rechten PROB-Hörner wiesen $\bar{O}$ 72,7 % bzw. 73,1 % Embryonen erster Qualität auf.

Während aus den drei linken, gemischt besiedelten Hörnern kein Embryo erster Qualität gewonnen werden konnte, wurden aus den rechten, gemischt besiedelten Hörnern im Durchschnitt $3,3 \pm 2,8$ Embryonen erster Qualität gewonnen, was einem prozentualen Anteil von $69,9 \pm 37,3$ % der tauglichen Embryonen entspricht. Der Anteil degenerierter Embryonen belief sich auf 15,0–16,9 % bei den potenziell probiotisch besiedelten linken und rechten sowie den potenziell pathogen besiedelten linken und rechten Uterushörnern.

Tab. 17 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen der linken und rechten Uterushörner (getrennte Auswertung) anhand der mikrobiologischen Kategorien: potenziell probiotisch (PROB), potenziell pathogen (PATH), gemischt besiedelt (MIX)

Erfolgsparameter	Links (n = 17)						Rechts (n = 17)					
	PROB (n = 5)		PATH (n = 9)		MIX (n = 3)		PROB (n = 5)		PATH (n = 6)		MIX (n = 6)	
	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$
Gewonnene Embryonen + Oozyten	26	5,2 ± 3,8	67	7,4 ± 4,7	10	3,3 ± 4,9	34	6,8 ± 8,4	48	8,0 ± 6,8	37	6,2 ± 3,1
Taugliche Embryonen (% von Gesamt)	20	4,0 ± 4,5 (62,1 ± 46,5 %)	44	4,9 ± 4,2 (55,6 ± 34,1 %)	1	0,3 ± 0,6 (50,0 ± 70,7 %)	17	3,4 ± 5,4 (62,4 ± 41,5 %)	27	4,5 ± 3,6 (58,3 ± 7,0 %)	25	4,2 ± 2,9 (72,2 ± 35,6 %)
Embryonen 1. Qualität (% von Tauglich)	17	3,4 ± 4,2 (72,7 ± 48,7 %)	39	4,3 ± 3,8 (89,2 ± 22,5 %)	0	0,0 (0,0 %)	15	3,0 ± 5,1 (73,1 ± 48,9 %)	21	3,5 ± 2,3 (88,9 ± 18,6 %)	20	3,3 ± 2,8 (69,9 ± 37,3 %)
Degenerierte Embryonen (% von Gesamt)	3	0,6 ± 1,3 (15,0 ± 33,5 %)	11	1,2 ± 1,2 (16,4 ± 15,2 %)	0	0,0 (0,0 %)	5	1,0 ± 1,0 (16,9 ± 21,1 %)	9	1,5 ± 2,7 (16,3 ± 23,0 %)	2	0,3 ± 0,5 (4,5 ± 6,9 %)
Unbefruchtete Oozyten (% von Gesamt)	3	0,6 ± 0,9 (22,9 ± 43,6 %)	12	1,3 ± 1,9 (28,0 ± 41,7 %)	9	3,0 ± 5,2 (50,0 ± 70,7 %)	12	2,4 ± 3,3 (20,7 ± 32,8 %)	12	2,0 ± 2,2 (25,5 ± 17,9 %)	10	1,7 ± 3,6 (23,3 ± 38,3 %)

Aus den drei linken, gemischt besiedelten Hörnern konnten wiederum kein degenerierter Embryo und aus den rechten, gemischt besiedelten Hörnern im Durchschnitt $4,5 \pm 6,9$ % degenerierte Embryonen gewonnen werden. Der Anteil an unbefruchteten Eizellen war sowohl in den linken probiotischen Uterushörnern mit $22,9 \pm 43,6$ % als auch in den rechten probiotischen Uterushörnern mit $20,7 \pm 32,8$ % am geringsten ($p > 0,05$). Bei den linken gemischt besiedelten Uterushörnern konnten mit $3,0 \pm 5,2$ bzw. $50,0 \pm 70,7$ % die meisten unbefruchteten Eizellen beobachtet werden. Diese Beobachtung ist auf eine einzelne Spülung zurückzuführen, wobei von neun gewonnenen Embryonen und Oozyten alle neun unbefruchtete Eizellen waren. Mit durchschnittlich 20,7 % bis 25,5 % unbefruchteten Eizellen waren die Ergebnisse der rechten Uterushörner der drei mikrobiellen Kategorien vergleichbar (siehe Tab. 17).

Auffallend war, dass sich die Erfolgsparameter der linken und rechten Hörner in den Kategorien PROB und PATH glichen. Hingegen gab es deutliche, jedoch nicht signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen den linken und rechten gemischt besiedelten Uterushörnern.

4.1.4 Weitere Einflüsse auf die Embryonenqualität

4.1.4.1 Laktationsstadium, Parität und Milchleistung

Die 19 Kühe dieser Auswertung hatten 83 bis 634 Tage ($211,9 \pm 171,1$) vor der Erstuntersuchung vor dem Start der Superstimulation gekalbt. Drei Kühe befanden sich im Laktationsstadium 1 (< 90 DIM), 10 Kühe im Laktationsstadium 2 (91–180 DIM), 3 Kühe im Laktationsstadium 3 (181–365 DIM) und 3 Kühe im Laktationsstadium 4 (> 365 DIM und TS).

In keinem der evaluierten Erfolgsparameter konnten signifikante Unterschiede zwischen den vier Laktationsstadien festgestellt werden. Die Auswertung ergab, dass bei Tieren des Laktationsstadiums 4 im Mittel die meisten ($23,0 \pm 13,1$) gesamt gewonnene Embryonen und Eizellen dokumentiert werden konnten ($p > 0,05$). Bei Embryonengewinnungen von Tieren des Laktationsstadiums 2 und 3 wurden $\bar{O}$ 10,9 bzw. 9,7 Embryonen/Oozyten gewonnen. Im Rahmen der Spülungen von Tieren im frühesten Laktationsstadium ließen sich im Durchschnitt die geringste Anzahl von $6,3 \pm 4,7$ Embryonen und Oozyten gewinnen. Jedoch erreichten Kühe aus dem Laktationsstadium 1 den größten Anteil ($p > 0,05$) an tauglichen Embryonen mit $85,0 \pm 13,2$ %, von denen $95,8 \pm 7,2$ % Embryonen erster Qualität waren. In der späten Phase der Laktation (Laktationsstadium 3 und 4) wurden weniger als 50 % der gewonnenen Embryonen und Oozyten als transfertauglich klassifiziert, wobei im Laktationsstadium 3 lediglich eine Rate transfertauglicher Embryonen von $37,2 \pm 25,6$ % erreicht wurde. Dieser Sachverhalt manifestiert sich in den beiden Laktationsstadien in einem hohen Anteil unbefruchteter Eizellen (3: $53,9 \pm 24,7$ %; 4: $37,6 \pm 35,3$ %). Der Anteil unbefruchteter Eizellen war mit lediglich $17,1 \pm 31,6$ % bzw. 0,0 % der Tiere aus den Laktationsstadien 1 und 2 deutlich, jedoch nicht signifikant besser. Die durchschnittliche Anzahl degenerierter Embryonen variiert zwischen $0,9 \pm 1,4$ in der Laktationsgruppe 2 und $4,7 \pm 4,2$ in der Laktationsgruppe 4. Der prozentuale Anteil der degenerierten Embryonen liegt zwischen $8,9 \pm 10,2$ % im Laktationsstadium 3 und $16,4 \pm 16,0$ % im Laktationsstadium 4 (siehe Tab. 18)

Tab. 18 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen anhand der Laktationsstadien (Stadium: 1 = 0–90; 2 = 91–180; 3 = 181–365; 4 = > 365 Laktationstage & Trockenstehende)

Stadium	Kühe	Gewonnene Embryonen + Oozyten		Taugliche Embryonen (% von Gesamt)		Embryonen 1. Qualität (% von Tauglich)		Degenerierte Embryonen (% von Gesamt)		Unbefruchtete Oozyten (% von Gesamt)	
		Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$
1	3	19	6,3 ± 4,7	15	5,0 ± 3,6 (85,0 ± 13,2 %)	14	4,7 ± 3,2 (95,8 ± 7,2 %)	4	1,3 ± 1,2 (15,0 ± 13,2 %)	0	0,0 ± 0,0 (0,0 ± 0,0 %)
2	10	109	10,9 ± 9,6	73	7,3 ± 7,6 (73,7 ± 33,4 %)	60	6,0 ± 6,5 (69,5 ± 39,5 %)	9	0,9 ± 1,4 (9,2 ± 20,6 %)	27	2,7 ± 5,7 (17,1 ± 31,6 %)
3	3	29	9,7 ± 5,5	13	4,3 ± 4,9 (37,2 ± 25,6 %)	13	4,3 ± 4,9 (100,0 ± 0,0 %)	3	1,0 ± 1,0 (8,9 ± 10,2 %)	13	4,3 ± 1,5 (53,9 ± 24,7 %)
4	3	69	23,0 ± 13,1	37	12,3 ± 9,6 (46,1 ± 20,8 %)	29	9,7 ± 9,3 (81,7 ± 27,6 %)	14	4,7 ± 4,2 (16,4 ± 16,0 %)	18	6,0 ± 2,6 (37,6 ± 35,3 %)

Tab. 19 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen anhand der Laktationsgruppen (Gruppe: 1 = 1. Laktation; 2 = 2. und 3. Laktation; 3 = ≥ 4. Laktation)

Gruppe	Kühe	Gewonnene Embryonen + Oozyten		Taugliche Embryonen (% von Gesamt)		Embryonen 1. Qualität (% von Tauglich)		Degenerierte Embryonen (% von Gesamt)		Unbefruchtete Oozyten (% von Gesamt)	
		Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$
1	6	38	6,3 ± 5,2	34	5,7 ± 4,6 (93,0 ± 9,8 %)	30	5,0 ± 4,6 (80,2 ± 39,6 %)	3	0,5 ± 0,8 (5,8 ± 10,2 %)	1	0,2 ± 0,4 (1,2 ± 2,9 %)
2	3	52	17,3 ± 2,1	28	9,3 ± 8,0 (55,5 ± 45,6 %)	24	8,0 ± 7,2 (60,8 ± 53,4 %)	2	0,7 ± 0,6 (4,1 ± 3,6 %)	22	7,3 ± 9,5 (40,5 ± 48,8 %)
3	10	136	13,6 ± 12,1	76	7,6 ± 8,4 (51,8 ± 26,9 %)	62	6,2 ± 7,1 (86,5 ± 20,2 %)	25	2,5 ± 2,8 (16,6 ± 20,9 %)	35	3,5 ± 3,1 (31,7 ± 31,2 %)

Die 19 Kühe dieser Auswertung befanden sich in der 1. bis 10. Laktation ($3,9 \pm 2,9$). Die Kühe wurden anhand ihrer Parität in Laktationsgruppen eingeteilt. Primipara wurden der Laktationsgruppe 1 ($n = 6$) zugeordnet. Multipara wurden weiter unterteilt. Kühe in ihrer 2. und 3. Laktation wurden in die Laktationsgruppe 2 ($n = 3$) sowie Kühe ab der 4. Laktation in die Laktationsgruppe 3 ($n = 10$) zusammengefasst.

In keinem der evaluierten Erfolgsparameter konnten signifikante Unterschiede zwischen den drei Laktationsgruppen festgestellt werden. Bei den Embryonengewinnungen der Primipara wurde die niedrigste ($p > 0,05$) durchschnittliche Anzahl an Embryonen und Oozyten ($6,3 \pm 5,2$) beobachtet. Embryonengewinnungen bei Multipara ergaben durchschnittlich $17,3 \pm 2,1$ gewonnene Embryonen und Oozyten in der Laktationsgruppe 2 bzw. $13,6 \pm 12,1$ in der Laktationsgruppe 3. Auch die durchschnittliche Anzahl der gewonnenen tauglichen Embryonen ($5,7 \pm 4,6$) und Embryonen erster Qualität ($5,0 \pm 4,6$) war bei Tieren der Laktationsgruppe 1 am geringsten. Bei Betrachtung der relativen Werte zeigten sich bei Embryonengewinnungen in der Laktationsgruppe 1 eine tendenziell ($p = 0,07$) höhere Rate transfertauglicher Embryonen ($93,0 \pm 9,8 \%$) um durchschnittlich mindestens 37,5 %-Punkte im Vergleich zu den Laktationsgruppen 2 ($55,5 \pm 45,6 \%$) und 3 ($51,8 \pm 26,9 \%$). Embryonengewinnungen der Laktationsgruppe 3 zeichneten sich durch die höchste Rate an degenerierten Embryonen mit $16,6 \pm 20,9 \%$ aus ($p > 0,05$). Hingegen lag die Rate degenerierter Embryonen bei Tieren der Laktationsgruppe 1 und 2 bei durchschnittlich unter 6 %. Bei Embryonengewinnungen von Kühen der Laktationsgruppe 1 wurden durchschnittlich die wenigsten unbefruchteten Eizellen ($0,2 \pm 0,4$ bzw. $1,2 \pm 2,9 \%$) gewonnen im Vergleich zu Tieren der Laktationsgruppe 2 mit $7,3 \pm 9,5$ bzw. $40,5 \pm 48,8 \%$ und zu denen der Laktationsgruppe 3 mit $3,5 \pm 3,1$ bzw. $31,7 \pm 31,2 \%$ unbefruchteten Eizellen (siehe Tab. 19). Es ist festzuhalten, dass mit steigendem Alter der Anteil und die Anzahl degenerierter Embryonen sowie unbefruchteter Eizellen zu Ungunsten des Anteils transfertauglicher Embryonen stieg.

Die durchschnittliche Milchleistung in der letzten MLP vor der Embryonengewinnung lag bei den 19 untersuchten Tieren bei $35,7 \pm 13,9$ kg Milch. Ein Tier befand sich zum Zeitpunkt der Embryonengewinnung in der Trockenstehphase. Neun Kühe wiesen in der letzten MLP vor der Embryonengewinnung eine Milchleistung von $< 40,0$ kg auf ($n = 9$). Zehn Kühe wiesen eine hohe Milchleistung von $\geq 40,0$ kg Milch auf ($n = 10$).

Es konnte kein signifikanter Einfluss der Milchleistung der letzten MLP vor der Embryonengewinnung auf die evaluierten Erfolgsparameter beobachtet werden ($p > 0,05$). Eine hohe Milchleistung nahm keinen negativen Einfluss auf die Anzahl gewonnener Embryonen und Oozyten, die Anzahl und Rate tauglicher Embryonen sowie Embryonen erster

Qualität. Die Anzahl und Rate unbefruchteter Eizellen und degenerierter Eizellen unterschied sich ebenfalls nicht zwischen den beiden Kategorien (siehe Tab. 20).

Tab. 20 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen anhand der Milchleistung (< 40,0 kg bzw. ≥ 40,0 kg)

Erfolgsparameter	Milchleistung < 40,0 kg n = 9		Milchleistung ≥ 40,0 kg n = 10	
	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$
Gewonnene Embryonen + Oozyten	108	12,0 ± 11,3	118	11,8 ± 9,1
Taugliche Embryonen (% von Gesamt)	69	7,7 ± 7,1 (69,0 ± 30,3 %)	69	6,9 ± 7,4 (62,1 ± 33,8 %)
Embryonen 1. Qualität (% von Tauglich)	57	6,3 ± 6,5 (80,7 ± 34,2 %)	59	5,9 ± 6,2 (80,2 ± 32,3 %)
Degenerierte Embryonen (% von Gesamt)	17	1,9 ± 3,0 (9,3 ± 12,5 %)	13	1,3 ± 1,4 (12,9 ± 20,4 %)
Unbefruchtete Oozyten (% von Gesamt)	22	2,4 ± 3,1 (21,6 ± 32,0 %)	36	3,6 ± 5,6 (25,1 ± 33,1)

4.1.4.2 Stoffwechsellaage

Der Fett-Eiweiß-Quotient (FEQ) ist ein Indikator für die Energieversorgung der Tiere und sollte zwischen 1 und 1,5 liegen (Martin et al., 2014). In der vorliegenden Studie wurde lediglich bei einer Kuh in zwei aufeinanderfolgenden MLP ein FEQ < 1,0 beobachtet, während bei zwei anderen Kühen ein FEQ von 1,5 festgestellt wurde. Demzufolge war von keiner relevanten Störung des Stoffwechsels bei den Versuchskühen auszugehen. Der Milchharnstoffgehalt, welcher als Indikator für die Proteinversorgung der Kühe gilt, sollte idealerweise zwischen 150 und 300 mg/l liegen (Martin et al., 2014). Bei lediglich einem Versuchstier wurde in zwei aufeinander folgenden MLP ein reduzierter Milchharnstoffgehalt zwischen 140 und 150 mg/l beobachtet. Es ist daher davon auszugehen, dass die Versuchskühe optimal mit Protein versorgt waren. Wie bereits in Kapitel 3.1.11 dargelegt, wurde aufgrund der zu geringen Anzahl an Tieren mit abweichenden Befunden auf eine entsprechende Analyse der Stoffwechselparameter verzichtet.

4.1.4.3 Körperkondition

Alle 19 Kühe dieser Studie wiesen einen physiologischen Body-Condition-Score zwischen 2,5 und 4 auf. Am Tag der ersten Untersuchung wiesen 5 Kühe einen BCS von 2,5, 13 Kühe einen BCS von 3 und lediglich eine ggr. überkonditionierte Kuh einen BCS von 4 auf. Unabhängig vom jeweiligen BCS-Score wiesen die Kühe hinsichtlich der Raten der gesamt gewonnenen Embryonen und Oozyten, der tauglichen Embryonen, der degenerierten Embryonen und der unbefruchteten Oozyten ähnliche Ergebnisse auf. Lediglich die Rate der Embryonen erster Qualität war mit $75,2 \pm 36,0 \%$ bei Kühen mit einem BCS von 3 etwas geringer als bei den fünf Kühen mit einem BCS von 2,5, die eine Rate der Embryonen erster Qualität von $90,0 \pm 22,4 \%$ aufwiesen (siehe Tab. 21).

4.1.4.4 Eutergesundheit

Im Rahmen der Beurteilung der Eutergesundheit wurden die somatischen Zellgehalte der Milch der letzten zwei MLP vor der Embryonengewinnung analysiert. Tiere, deren Milch einen somatischen Zellgehalt von ≤ 100.000 Zellen/ml aufwies, wurden als eutergesund und somit in die Eutergesundheitskategorie 1 eingestuft. Kühe mit einer subklinischen Mastitis ($> 100.000 - 200.000$ Zellen/ml) oder einer chronischen Mastitis (2-mal > 200.000 Zellen/ml) wiesen eine gestörte Eutergesundheit auf (Hoedemaker et al., 2014) und wurden in die Eutergesundheitskategorie 2 eingestuft. In dieser Studie wurden 13 Kühe als eutergesund klassifiziert, während 6 Tiere eine gestörte Eutergesundheit aufwiesen: 2x subklinische Mastitis, 4x chronische Mastitis.

Bei Embryonengewinnungen von eutergesunden und -kranken Tieren konnten durchschnittlich ähnliche Anzahlen an Embryonen und Eizellen gewonnen werden. Jedoch wurden bei Embryonengewinnungen von Kühen mit gestörter Eutergesundheit weniger taugliche Embryonen gewonnen, was sich auch in einer nicht signifikant schlechteren Rate an tauglichen Embryonen darstellt (1: $71,6 \pm 31,8 \%$, 2: $51,8 \pm 28,8 \%$, $p > 0,05$). Dies ist auf einen, um über 19 Prozentpunkte gestiegenen Anteil an unbefruchteten Eizellen in der Gruppe mit erkranktem Euter zurückzuführen (siehe Tab. 22).

Tab. 21 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen anhand des Body-Condition-Scores (BCS)

BCS	Kühe	Gewonnene Embryonen + Oozyten		Taugliche Embryonen (% von Gesamt)		Embryonen 1. Qualität (% von Tauglich)		Degenerierte Embryonen (% von Gesamt)		Unbefruchtete Oozyten (% von Gesamt)	
	n	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$
2,5	5	24	4,8 $\pm$ 2,8	11	2,2 $\pm$ 0,4 (61,1 $\pm$ 36,9 %)	10	2,0 $\pm$ 0,7 (90,0 $\pm$ 22,4 %)	4	0,8 $\pm$ 1,8 (13,3 $\pm$ 29,8 %)	9	1,8 $\pm$ 3,0 (25,6 $\pm$ 36,4 %)
3	13	187	14,4 $\pm$ 10,8	117	9,0 $\pm$ 7,7 (66,9 $\pm$ 32,1 %)	96	7,4 $\pm$ 6,8 (75,2 $\pm$ 36,0 %)	25	1,9 $\pm$ 2,5 (10,7 $\pm$ 11,1 %)	45	3,5 $\pm$ 5,2 (22,4 $\pm$ 32,6 %)
4	1	15	15	10	10 (66,7 %)	10	10 (100,0 %)	1	1 (6,7 %)	4	4 (26,7 %)

Tab. 22 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen anhand der Eutergesundheit (Kategorie: 1 = eutergesund, 2 = euterkrank)

KAT	Kühe	Gewonnene Embryonen + Oozyten		Taugliche Embryonen (% von Gesamt)		Embryonen 1. Qualität (% von Tauglich)		Degenerierte Embryonen (% von Gesamt)		Unbefruchtete Oozyten (% von Gesamt)	
	n	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$
1	13	146	11,2 $\pm$ 8,3	96	7,4 $\pm$ 6,7 (71,6 $\pm$ 31,8 %)	82	6,3 $\pm$ 5,9 (75,6 $\pm$ 36,2 %)	14	1,1 $\pm$ 1,3 (11,1 $\pm$ 18,6 %)	36	2,8 $\pm$ 5,2 (17,4 $\pm$ 31,9 %)
2	6	80	13,3 $\pm$ 13,6	42	7,0 $\pm$ 8,4 (51,8 $\pm$ 28,8 %)	34	5,7 $\pm$ 7,3 (90,9 $\pm$ 20,1 %)	16	2,7 $\pm$ 3,5 (11,5 $\pm$ 13,6 %)	22	3,7 $\pm$ 2,9 (36,7 $\pm$ 29,4 %)

4.1.4.5 Verwendete Spermaportionen

In der Studie wurden Samenportionen von 20 verschiedenen Besamungsbullen eingesetzt. Bei 15 Kühen kam dabei derselbe Bulle zum Einsatz und bei 4 Tieren wurden Samenportionen von je zwei verschiedenen Bullen verwendet. Als Einflussparameter auf die Ergebnisse der Embryonengewinnung wurde der Einsatz von nicht sortiertem (X/Y-Sperma, n = 9) und X-sortiertem Sperma (n = 10) untersucht.

Tab. 23 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen mit nicht sortiertem Sperma (X/Y-Sperma) oder X-sortiertem Sperma (X-Sperma)

Erfolgsparameter	Embryonengewinnungen mit			
	X/Y-Sperma n = 9		X-Sperma n = 10	
	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$	Anzahl	$\bar{x} \pm SD$
Gewonnene Embryonen + Oozyten	127	14,1 $\pm$ 10,2	99	9,9 $\pm$ 9,7
Taugliche Embryonen (% von Gesamt)	84	9,3 $\pm$ 6,2 (71,4 $\pm$ 23,8 %)	54	5,4 $\pm$ 7,5 (59,9 $\pm$ 37,6 %)
Embryonen 1. Qualität (% von Tauglich)	73	8,1 $\pm$ 5,6 (90,4 $\pm$ 16,0 %)	43	4,3 $\pm$ 6,3 (71,4 $\pm$ 40,8 %)
Degenerierte Embryonen (% von Gesamt)	20	2,2 $\pm$ 2,9 (12,3 $\pm$ 11,8 %)	10	1,0 $\pm$ 1,5 (10,2 $\pm$ 20,9 %)
Unbefruchtete Oozyten (% von Gesamt)	23	2,6 $\pm$ 3,2 (16,3 $\pm$ 25,2 %)	35	3,5 $\pm$ 5,6 (29,9 $\pm$ 36,7)

Bei den 9 Embryonengewinnungen mit nicht sortiertem Sperma wurden insgesamt und im Durchschnitt mehr Embryonen und Oozyten gewonnen (127, 14,1 $\pm$ 10,2) als bei den 10 Embryonengewinnungen mit X-sortiertem Sperma (99; 9,9 $\pm$ 9,7). Ebenfalls konnten eine größere durchschnittliche Anzahl und ein größerer Anteil an tauglichen Embryonen (9,3 $\pm$ 6,2; 71,4 $\pm$ 23,8 %; $p > 0,05$) beobachtet werden. Bei Embryonengewinnungen, bei denen konventionelles Sperma eingesetzt wurde, konnten im Mittel tendenziell mehr Embryonen erster Qualität (8,1 $\pm$ 5,6) als bei Embryonengewinnungen, bei denen X-sortiertes Sperma eingesetzt wurde (4,3 $\pm$ 6,3, $p < 0,08$), gewonnen werden. Der Anteil von Embryonen erster Qualität unterschied sich jedoch nicht signifikant zwischen den verwendeten Spermaportionen (XY: 90,4 $\pm$ 16,0 %, X: 71,4 $\pm$ 40,8 %, $p > 0,05$). Es liegt keine große Varianz im Anteil degenerierter Embryonen bei den verschiedenen Spermaportionen vor. Die Anzahl und der Anteil unbefruchteter Eizellen waren hingegen nach Besamungen mit X-sortiertem Sperma größer (3,5 $\pm$ 5,6; 29,9 $\pm$ 36,7, $p > 0,05$) im Vergleich zu Embryonengewinnungen mit nicht-sortiertem Sperma (siehe Tab. 23).

4.1.4.6 Rückgewinnung, Trübung und Blutbeimengung der Spülflüssigkeit

Die Rückgewinnung, Trübung und Blutbeimengung der Spülflüssigkeit wurden auf Basis der einzelnen Uterushörner analysiert.

Im Rahmen der Analyse wurden 34 Uterushörner wie in Kapitel 4.1.3 einer horngetrenten statistischen Analyse unterzogen. Bei 29 dieser Uterushörner (15 linke und 14 rechte Uterushörner) wurde die Spülflüssigkeit vollständig zurückgewonnen (Kategorie 1). Während des Spülvorgangs von 5 Uterushörnern ($n = 2$ linke, 3 rechte) konnte nicht die gesamte Spülflüssigkeit zurückgewonnen werden (Kategorie 2). Dies wurde bei einem Tier sowohl beim rechten als auch beim linken Uterushorn beobachtet.

In keinem der evaluierten Erfolgsparameter der Embryonenqualität konnten signifikante Unterschiede zwischen einer vollständigen oder verminderten Rückgewinnung festgestellt werden ($p > 0,05$). Am wenigsten Embryonen und Eizellen ($4,0 \pm 4,2$, $p > 0,05$) wurden aus den linken Uterushörnern der Kategorie 2 gewonnen, wobei lediglich zwei Embryonengewinnungen in diese Kategorie einfließen. In beiden Kategorien war sowohl links als auch rechts eine gleichmäßige durchschnittliche Anzahl an transfertauglichen Embryonen von 3,5 bis 4,1 zu beobachten. Die Rate der Embryonen erster Qualität war sowohl bei den Embryonengewinnungen der rechten und linken Uterushörner der Kategorie 1 bei durchschnittlich über 80 % und in Kategorie 2 bei durchschnittlich 50 bis 52 %. Dieser Unterschied war jedoch weder links noch rechts signifikant ($p > 0,05$). Die Auswertung der Anzahl und Anteile an degenerierten Embryonen zeigte ein relativ gleichmäßiges Bild bei den linken und rechten Uterushornspülungen mit vollständiger Rückgewinnung und den zwei linken Uterushornspülungen mit verminderter Rückgewinnung. Im Durchschnitt wurden 0,5–0,9 bzw. 7,2–14,9 % degenerierte Embryonen gewonnen. Demgegenüber wiesen die drei rechten Uterushörner der Kategorie 2 eine durchschnittliche Anzahl von $2,7 \pm 3,8$ bzw. $30,4 \pm 26,7$ % degenerierter Embryonen auf ($p > 0,05$). Unbefruchtete Eizellen wurden sowohl links als auch rechts vermehrt ($p > 0,05$) in den Uterushörnern mit vollständiger Rückgewinnung im Gegensatz zu den Spülungen mit verminderter Rückgewinnung beobachtet (siehe Tab. 24). Es konnten keine negativen Auswirkungen einer reduzierten Rückgewinnung auf die Qualität der Embryonen festgestellt werden. Lediglich ein numerischer Effekt ist in der Rate von Embryonen erster Qualität zu beobachten.

Tab. 24 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen der linken und rechten Uterushörner (getrennte Auswertung) anhand der Rückgewinnung der Spülflüssigkeit (1 = vollständige Rückgewinnung, 2 = unvollständige Rückgewinnung)

Erfolgsparameter	Rückgewinnung Links (n = 17)				Rückgewinnung Rechts (n = 17)			
	1 (n = 15)		2 (n = 2)		1 (n = 14)		2 (n = 3)	
	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$
Gewonnene Embryonen + Oozyten	95	6,3 $\pm$ 4,6	8	4,0 $\pm$ 4,2	99	7,1 $\pm$ 5,6	20	6,7 $\pm$ 9,0
Taugliche Embryonen (% von Gesamt)	58	3,9 $\pm$ 4,3 (51,8 $\pm$ 39,4 %)	7	3,5 $\pm$ 3,5 (92,9 $\pm$ 10,1 %)	58	4,1 $\pm$ 3,8 (63,7 $\pm$ 30,9 %)	11	3,7 $\pm$ 4,6 (67,6 $\pm$ 28,1 %)
Embryonen 1. Qualität (% von Tauglich)	50	3,3 $\pm$ 3,9 (81,6 $\pm$ 34,2 %)	6	3,0 $\pm$ 4,2 (50,0 $\pm$ 70,7 %)	50	3,6 $\pm$ 3,4 (83,8 $\pm$ 28,2 %)	6	2,0 $\pm$ 2,6 (51,9 $\pm$ 50,1 %)
Degenerierte Embryonen (% von Gesamt)	13	0,9 $\pm$ 1,2 (14,9 $\pm$ 22,5 %)	1	0,5 $\pm$ 0,7 (7,2 $\pm$ 10,1 %)	8	0,6 $\pm$ 0,8 (8,4 $\pm$ 14,2 %)	8	2,7 $\pm$ 3,8 (30,4 $\pm$ 26,7 %)
Unbefruchtete Oozyten (% von Gesamt)	24	1,6 $\pm$ 2,6 (33,3 $\pm$ 44,4 %)	0	0,0 $\pm$ 0,0 (0,0 $\pm$ 0,0 %)	33	2,4 $\pm$ 3,1 (27,9 $\pm$ 29,9 %)	1	0,3 $\pm$ 0,6 (2,0 $\pm$ 3,4 %)

Die zurückgewonnene und gefilterte Spülflüssigkeit wurde visuell hinsichtlich ihrer Trübung von 0 keine Trübung bis 5 hochgradige Trübung klassifiziert. Die Auswertung ergab, dass von 34 analysierten Uterushörnern 20-mal ($n = 8$ linke, 12 rechte) nur eine ggr. (Grad 1), 9-mal ($n = 6$ linke, 3 rechte) eine leichte (Grad 2) und bei 5-mal ($n = 3$ linke, 2 rechte) eine mgr. (Grad 3) Trübung der Spülflüssigkeit beobachtet wurde. Bei 12 der 17 in die Analyse einbezogenen Kühe wiesen die Spülflüssigkeiten der linken und rechten Uterushörner den gleichen Trübungsgrad auf. Für die statistische Auswertung wurden die Uterushörner mit einer leichten und mgr. Trübung der Spülflüssigkeit in eine Kategorie 2 zusammengefasst.

In den rechten und linken Uterushörnern wurden bei Spülungen in beiden Kategorien durchschnittlich zwischen 5,0 und 7,4 Embryonen und Eizellen gewonnen. Aus den linken Uterushörnern der Kategorie 1 konnten numerisch die wenigsten transfertauglichen Embryonen in Anzahl ($2,6 \pm 3,2$) und Rate ($43,6 \pm 43,2 \%$) gewonnen werden, wobei weder links noch rechts signifikante Unterschiede zwischen den Graden der Trübung vorlagen ($p > 0,05$). Die Auswertung der rechten Uterushörner ergab eine tendenziell negative Korrelation zwischen einem höheren Grad der Trübung und dem prozentualen Anteil an Embryonen erster Qualität ($p = 0,05$). Dieser Einfluss konnte jedoch in der Auswertung der linken Uterushörner mit einer größeren Anzahl an Spülungen mit Trübungsgrad 2 nicht beobachtet werden. Bei der Auswertung der degenerierten Embryonen konnte in den rechten Uterushörnern ein tendenziell geringerer Anteil beobachtet werden ($p < 0,1$). Diese Korrelation wurde jedoch in der Auswertung der Embryonengewinnungen der linken Uterushörner nicht bestätigt. In linken Uterushörnern konnten vermehrt ($p > 0,05$) degenerierte Embryonen bei stärkerer Trübung der Spülflüssigkeit beobachtet werden. Des Weiteren wurde ein Unterschied in der Auswertung der unbefruchteten Eizellen zwischen den linken und rechten Uterushörnern festgestellt. Bei den Embryonengewinnungen der linken Uterushörner wurde eine tendenziell höhere Anzahl ($p < 0,07$) und eine signifikant höhere Rate von $50,5 \pm 46,9 \%$ an unbefruchteten Eizellen ($p < 0,02$) bei Trübungsgrad 1 gewonnen. Demgegenüber zeigte die Auswertung der rechten Uterushörner eine numerische, aber nicht signifikant höhere Anzahl und Rate an unbefruchteten Eizellen bei einem höheren Trübungsgrad (siehe Tab. 25).

Tab. 25 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen der linken und rechten Uterushörner (getrennte Auswertung) anhand der Trübung der Spülflüssigkeit (1 = ggr. Trübung, 2 = leichte bis mgr. Trübung), * $p < 0,05$

Erfolgsparameter	Trübung Links (n = 17)				Trübung Rechts (n = 17)			
	1 (n = 8)		2 (n = 9)		1 (n = 12)		2 (n = 5)	
	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$
Gewonnene Embryonen + Oozyten	40	5,0 $\pm$ 4,7	63	7,0 $\pm$ 4,4	82	6,8 $\pm$ 6,3	37	7,4 $\pm$ 5,9
Taugliche Embryonen (% von Gesamt)	21	2,6 $\pm$ 3,2 (43,6 $\pm$ 43,2 %)	44	4,9 $\pm$ 4,7 (67,3 $\pm$ 35,0 %)	51	4,3 $\pm$ 4,1 (64,3 $\pm$ 27,7 %)	18	3,6 $\pm$ 3,3 (64,7 $\pm$ 37,5 %)
Embryonen 1. Qualität (% von Tauglich)	17	2,1 $\pm$ 2,9 (85,0 $\pm$ 30,0 %)	39	4,3 $\pm$ 4,3 (71,9 $\pm$ 44,8 %)	43	3,6 $\pm$ 3,5 (90,9 $\pm$ 15,6 %)	13	2,6 $\pm$ 3,0 (48,9 $\pm$ 46,2 %)
Degenerierte Embryonen (% von Gesamt)	5	0,6 $\pm$ 1,4 (5,9 $\pm$ 11,1 %)	9	1,0 $\pm$ 1,0 (20,2 $\pm$ 25,7 %)	15	1,3 $\pm$ 2,0 (16,9 $\pm$ 19,9 %)	1	0,2 $\pm$ 0,4 (1,3 $\pm$ 2,8 %)
Unbefruchtete Oozyten (% von Gesamt)	14	1,8 $\pm$ 1,9 (50,5 $\pm$ 46,9 %)*	10	1,1 $\pm$ 3,0 (12,5 $\pm$ 33,1 %)	16	1,3 $\pm$ 2,2 (18,8 $\pm$ 25,1 %)	18	3,6 $\pm$ 3,9 (34,1 $\pm$ 37,2 %)

Eine eventuelle Blutbeimengung der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit wurde visuell klassifiziert, wobei die Skala von 0 (keine Blutbeimengung) bis 5 (hgr. Blutbeimengung) reichte. In der vorliegenden Untersuchung wurden 34 Uterushörner analysiert. Die Spülflüssigkeit wies 9-mal keine (0; n = 4 linke, 5 rechte), 14-mal eine ggr. (1, n = 7 linke, 7 rechte) 7-mal eine leichte (2, n = 4 linke, 3 rechte) 3-mal eine mgr. (3, n = 2 linke, 1 rechte) und einmal eine starke Blutbeimengung (4, 1 rechts) auf. Bei 12 der 17 untersuchten Kühe wies die Spülflüssigkeit aus dem linken und rechten Uterushorn die gleiche Blutbeimengung auf. Für die Auswertung wurden die Uterushörner mit keiner und nur ggr. Blutbeimengung als Kategorie 1 und leichter bis starker Blutbeimengung als Kategorie 2 zusammengefasst.

Bei Embryonengewinnungen der rechten und linken Uterushörner konnten bei einer Blutbeimengung Kategorie 1 durchschnittlich unter 7 und bei Kategorie 2 durchschnittlich über 7 Embryonen und Eizellen gewonnen werden. Es wurden die wenigsten gesamt gewonnenen Embryonen und Eizellen sowie die geringste Anzahl an transfertauglichen Embryonen bei der Embryonengewinnung von linken Uterushörnern mit einem Blutbeimengungsgrad 1 gewonnen ($p > 0,05$). Ebenfalls lag bei Spülungen linker Uterushörner der Kategorie 1 die durchschnittliche Rate transfertauglicher Embryonen bei unter 50 %, wobei diese bei linken Uterushörnern der Kategorie 2 und rechten Uterushörnern beider Kategorien über 64 % lag. Die Analyse der rechten Uterushörner ergab eine tendenziell negative Korrelation zwischen einer höheren Blutbeimengung und dem prozentualen Anteil von Embryonen erster Qualität ($p = 0,05$). Dieser Einfluss konnte jedoch in der Auswertung der linken Uterushörner mit einer zwischen den Graden der Blutbeimengung ausgeglicheneren Verteilung nicht festgestellt werden. Zudem konnte ein tendenziell höherer Anteil degenerierter Embryonen in Spülungen der rechten Uterushörner und ein numerisch höherer Anteil in den Spülungen der linken Uterushörner mit geringer Blutbeimengung beobachtet werden ($p < 0,1$). Der Einfluss auf die Rate unbefruchteter Eizellen stellt sich uneinheitlich dar. Während linke Uterushörner mit geringer Blutbeimengung eine nicht signifikant höhere Rate unbefruchteter Eizellen von durchschnittlich über 16 Prozentpunkten mehr aufwiesen, war dies bei rechten Uterushörnern mit über 15 Prozentpunkten bei Hornspülungen mit höherer Blutbeimengung der Fall (siehe Tab. 26).

Die mikrobiologische Besiedlung der Uterushörner hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Rückgewinnung, Trübung und Blutbeimengung der Spülflüssigkeit ($p > 0,05$), sowohl bei der Auswertung der linken als auch der rechten Uterushörner. Bei linken sowie rechten probiotisch besiedelten Uterushörnern konnte jedoch numerisch häufiger eine vollständige Rückgewinnung, ggr. Trübung und keine bis ggr. Blutbeimengung der Spülflüssigkeit festgestellt werden (siehe Tab. 27 und 28).

Tab. 26 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryongewinnungen der linken und rechten Uterushörner (getrennte Auswertung) anhand der Blutbeimengung der Spülflüssigkeit (1 = keine – ggr. Blutbeimengung, 2 = leichte – starke Blutbeimengung)

Erfolgsparameter	Blutbeimengung Links (n = 17)				Blutbeimengung Rechts (n = 17)			
	1 (n = 11)		2 (n = 6)		1 (n = 12)		2 (n = 5)	
	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$	An- zahl	$\bar{x} \pm SD$
Gewonnene Embryonen + Oozyten	52	4,7 ± 4,1	51	8,5 ± 4,6	82	6,8 ± 6,3	37	7,4 ± 5,9
Taugliche Embryonen (% von Gesamt)	28	2,5 ± 2,9 (46,4 ± 38,1 %)	37	6,2 ± 5,2 (74,6 ± 37,8 %)	51	4,3 ± 4,1 (64,3 ± 27,7 %)	18	3,6 ± 3,3 (64,7 ± 37,5 %)
Embryonen 1. Qualität (% von Tauglich)	23	2,1 ± 2,7 (77,1 ± 40,7 %)	33	5,5 ± 4,7 (75,1 ± 42,5 %)	43	3,6 ± 3,5 (90,9 ± 15,6 %)	13	2,6 ± 3,0 (48,9 ± 46,2 %)
Degenerierte Embryonen (% von Gesamt)	10	0,9 ± 1,4 (18,3 ± 25,9 %)	4	0,7 ± 0,8 (6,7 ± 7,3 %)	15	1,3 ± 2,0 (16,9 ± 19,9 %)	1	0,2 ± 0,4 (1,3 ± 2,8 %)
Unbefruchtete Oozyten (% von Gesamt)	14	1,3 ± 1,8 (35,4 ± 45,4 %)	10	1,7 ± 3,6 (18,8 ± 40,1 %)	16	1,3 ± 2,2 (18,8 ± 25,1 %)	18	3,6 ± 3,9 (34,1 ± 37,2 %)

Bei linken potenziell pathogen und gemischt besiedelten Uterushörnern wurde häufiger eine stärker getrübbte Spülflüssigkeit und bei gemischt besiedelten Hörnern ebenfalls eine stärkere Blutbeimengung beobachtet. Diese Beobachtung konnte jedoch bei den rechten Uterushörnern nicht festgestellt werden. In diesen Fällen wiesen sowohl potenziell pathogen als auch gemischt besiedelte Hörner häufiger eine ggr. Trübung und keine bis ggr. Blutbeimengung auf (siehe Tab. 27 und 28).

In 31 von 34 Fällen konnte eine Übereinstimmung zwischen den Kategorien der Trübung und der Blutbeimengung festgestellt werden.

Tab. 27 Häufigkeiten der Ausprägungen der Rückgewinnung, Trübung und Blutbeimengungen der Spülflüssigkeit der linken Uterushörner (n = 17) anhand der mikrobiellen Besiedlung

		Linke Uterushörner					
		Rückgewinnung		Trübung		Blutbeimengung	
	n	Vollständig (1)	Vermindert (2)	Ggr. (1)	Leicht – mgr. (2)	Keine – ggr. (1)	Leicht – Stark (2)
PROB	5	5	0	3	2	4	1
PATH	9	8	1	4	5	6	3
MIX	3	2	1	1	2	1	2

Tab. 28 Häufigkeiten der Ausprägungen der Rückgewinnung, Trübung und Blutbeimengungen der Spülflüssigkeit der rechten Uterushörner (n = 17) anhand der mikrobiellen Besiedlung

		Rechte Uterushörner					
		Rückgewinnung		Trübung		Blutbeimengung	
	n	Vollständig (1)	Vermindert (2)	Ggr. (1)	Leicht – mgr. (2)	Keine – ggr. (1)	Leicht – Stark (2)
PROB	5	3	2	4	1	4	1
PATH	6	5	1	4	2	4	2
MIX	6	6	0	4	2	4	2

4.1.4.7 Betriebseinfluss

Die 19 untersuchten und zur Embryonengewinnung gespülten Kühe dieser Studie stammen von 15 verschiedenen landwirtschaftlichen Betrieben aus dem Zuchtgebiet des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter. Wie bereits in Kapitel 3.1.11 dargelegt, war aufgrund der Vielzahl der vertretenen Betriebe eine Analyse des Betriebseinflusses nicht möglich.

4.2 Studie 2 – Vergleichende Betrachtung des Uterusmikrobioms in den Hornspitzen und im Corpus uteri an neun Schlachtkühen

Die neun Schlachtkühe dieser Studie befanden sich in der 1. bis 9. Laktation ($4,8 \pm 2,1$) und waren zwischen 22 und 275 ($111,2 \pm 90,7$) DIM. Sechs Kühe befanden sich in der Früh-laktation (< 90 DIM) und drei Kühe in der Spät-laktation (> 180 DIM).

Drei der neun Uteri wiesen symmetrische, gleich große Uterushörner auf (S). Sechs Uteri wiesen asymmetrisch große Uterushörner auf (AS), wobei in fünf Fällen das linke und in einem Fall das rechte Uterushorn vergrößert war. Sechs Uteri wiesen drei- bis vierfingerstarke Uterushörner (GIII) auf, während drei Uteri etwas kleiner waren und in etwa zweifingerstarke Uterushörner (GII) aufwiesen. Die Ovarien der Schlachtorgane wurden vermessen. Das kleinste Ovar war 2 cm x 1 cm x 0,5 cm (1 cm^3) und das größte Ovar 4 cm x 4 cm x 2 cm (32 cm^3) groß. Im Schnitt wiesen die untersuchten Ovarien ein Volumen von $9,7 \pm 9,2 \text{ cm}^3$ auf. Auf 11 von 18 Ovarien konnten äußerlich sichtbare Funktionsgebilde festgestellt werden. Dabei konnte für zwei Ovarien ein Blütegelbkörper, für ein Ovar ein Gelbkörper in An- oder Rückbildung und für drei Ovarien ein Corpus albicans dokumentiert werden. Drei Ovarien trugen einen solitären größeren Follikel von 0,5 bis 0,8 cm Durchmesser, zwei Ovarien wiesen multiple kleine Follikel auf und ein Ovar wies multiple kleine Follikel und einen größeren Follikel von 1 cm Durchmesser auf. Ein Ovar trug einen Corpus albicans sowie einen solitären Follikel parallel. Sieben von neun Kühen wiesen auf mindestens einem der beiden Ovarien ein aktives Funktionsgebilde auf. Dabei wiesen alle drei Kühe in der Spät-laktation und 4 der 6 Kühe in der Früh-laktation Funktionsgebilde auf. An den Schlachtorganen einer Kuh (29 DIM) konnte auf keinem der beiden Ovarien ein äußerlich sichtbares Funktionsgebilde festgestellt werden. Eine Kuh (38 DIM) wies lediglich ein Corpus albicans auf einem der beiden Ovarien auf.

Die Spülflüssigkeit der Lavage von jeder der drei untersuchten Uteruslokalisationen (linkes Uterushorn, rechtes Uterushorn, Uteruskörper) von jeder der neun Schlachtkühe wurde mikrobiologisch untersucht. Sieben der 27 untersuchten Proben waren in den mikrobiologischen Untersuchungen keimfrei/steril. Dabei handelte es sich um Proben von 3 linken Uterushörnern, 2 rechten Uterushörnern und 2 Uteruskörpern von insgesamt 4 Tieren. Drei dieser vier Tiere wiesen an mehr als einer Stelle einen keimfreien Befund auf. Weitere 8 Proben wiesen lediglich einen ggr. unspezifischen (unsp.) Keimgehalt auf. Die Befunde keimfrei/steril und ggr. unspezifischer Keimgehalt werden im Folgenden gemeinsam betrachtet, da der unspezifische Keimnachweis keine weiterführende mikrobiologische Differenzierung und damit keine funktionelle Einordnung der Keime erlaubt. In 6 Proben konnten ggr. coliforme Keime isoliert werden. Diese 6 Proben stammten aus 2 Kühen aus allen 3 Lokalisationen. Drei dieser Proben eines Tieres wiesen ebenfalls eine hgr. Besiedlung von

Proteus spp. auf. *Trueperella pyogenes* wurden in keiner der 27 Spülproben nachgewiesen. Milchsäurebakterien (LAB) wurden in insgesamt neun Spülproben nachgewiesen. Die Uteri von 3 Tieren waren in jeweils allen 3 Lokalisationen mit LAB besiedelt (siehe Tab. 29). Zwei der drei Tiere waren in allen 3 Lokalisationen nur geringgradig besiedelt, was sich in der Kultur in 1 bis 17 KbE/ml darstellte. In einem Uterus konnte eine höhere Anzahl an koloniebildenden Einheiten nachgewiesen werden. Im Korpus belief sich dies auf 900 KbE/ml, im rechten Uterushorn auf 120 KbE/ml und im linken Uterushorn auf 4100 KbE/ml. Dieser Uterus, war derjenige, der ebenfalls mit coliformen Keimen und *Proteus* spp. besiedelt war. Die Bakteriengattung *Lactobacillus* konnte nicht nachgewiesen werden.

Tab. 29 Anzahl bakterieller Nachweise in den Lokalisationen (Corpus uteri, linkes Horn, rechtes Horn) in 9 Uteri

Lokalisation	Steril/ggr Keimgehalt	Coliforme Keime	<i>Proteus</i> spp.	<i>Trueperella pyogenes</i>	LAB
Corpus uteri	5	2	1	0	3
Linkes Uterushorn	5	2	1	0	3
Rechtes Uterushorn	5	2	1	0	3
Gesamt	15	6	3	0	9

Die Gesamtbetrachtung der bakteriellen Mikrobiota der drei Lokalisationen ergab, dass insgesamt 15-mal ein keimfreies bzw. nur ggr. unspezifisch besiedeltes Uterusmikrobiom diagnostiziert wurde. Insgesamt waren 6-mal nur LAB und 3-mal nur potenziell pathogene Keime nachweisbar. Die Proben von 3 Nachweisen ergaben eine Besiedlung mit sowohl potenziell pathogenen Keimen als auch LAB und wurden daher als gemischte Mikrobiota klassifiziert (siehe Abb. 24).

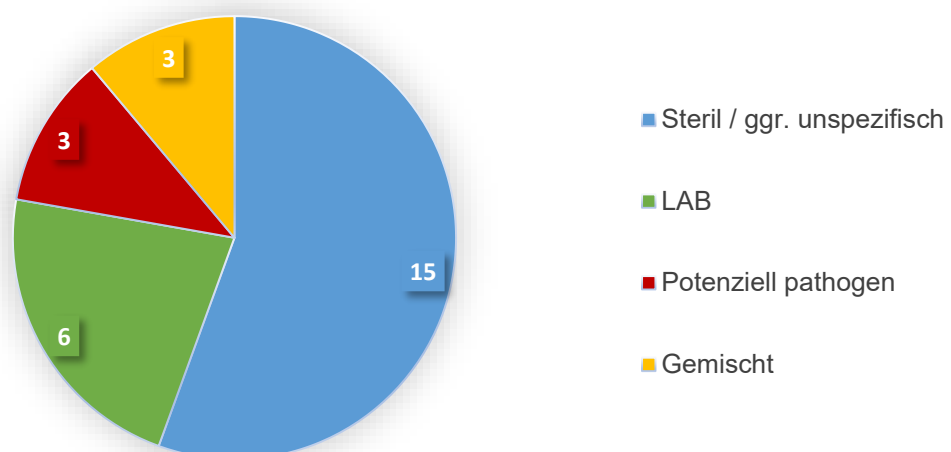


Abb. 24 Bakterielle Keimbesiedlung von 27 Spülproben

Bei allen neun Schlachtkühen wiesen die drei untersuchten Lokalisationen der jeweiligen Gebärmutter eine identische qualitative Einschätzung der bakteriellen Mikrobiota auf. Fünf Tiere wiesen in allen drei Lokalisationen eine sterile bzw. unspezifische Besiedlung auf. Bei zwei Tieren wurde in allen drei Uteruslokalisationen eine reine Besiedlung mit LAB festgestellt. Der Uterus einer Kuh wies an allen drei Lokalisationen eine potenziell pathogene Mikrobiota auf und war mit coliformen Keimen besiedelt. Eine weitere Kuh wies in allen drei Uteruslokalisationen ein gemischtes Keimmilieu aus coliformen Keimen, *Proteus* spp. und Milchsäurebakterien auf (siehe Tab. 30).

Tab. 30 Bakterielle Besiedlung der drei Lokalisationen (linkes Horn, Corpus uteri, rechtes Horn) der Uteri (n = 9)

Kuh	Linkes Horn	Corpus uteri	Rechtes Horn
1	Gemischt	Gemischt	Gemischt
2	LAB	LAB	LAB
3	LAB	LAB	LAB
4	Ggr. unsp. Keimgehalt	Ggr. unsp. Keimgehalt	Ggr. unsp. Keimgehalt
5	Steril	Steril	Ggr. unsp. Keimgehalt
6	Potenziell pathogen	Potenziell pathogen	Potenziell pathogen
7	Steril	Ggr. unsp. Keimgehalt	Steril
8	Ggr. unsp. Keimgehalt	Ggr. unsp. Keimgehalt	Steril
9	Steril	Steril	Ggr. unsp. Keimgehalt

In keiner der 27 untersuchten Spülproben konnte ein Nachweis für Schimmelpilze erbracht werden. Hefen wurden hingegen in zwei Uterushörnern und einem Uteruskörper aus zwei Tieren nachgewiesen. Ein Tier wies einen positiven Hefenachweis im rechten Uterushorn und Uteruskörper auf. Weitergehend wurde in den drei Lokalisationen dieses Tieres lediglich ein ggr. unspezifischer Keimgehalt festgestellt. Der Uterus dieses Tieres war symmetrisch und wies ein Corpus luteum auf dem kontra- sowie einen solitären Follikel auf dem ipsilateralen Ovar zum positiven Horn auf. Bei dem anderen positiv getesteten Tier wurden die Hefen lediglich im linken Uterushorn nachgewiesen. Des Weiteren wies der Uterus an allen drei Lokalisationen einen unspezifischen Keimgehalt sowie positive Nachweise für coliforme Keime auf. Das auf Hefen positiv getestete Uterushorn war kleiner als das kontralaterale Horn. Auf den Ovarien dieser Kuh konnten keine Funktionsgebilde festgestellt werden.

5 Diskussion

5.1 Studie 1 – Potenzieller Einfluss von Laktobazillen auf in vivo gewonnene Rinderembryonen

5.1.1 Mikrobiologische Nachweise

Während nach der Geburt ein breites Spektrum an Bakterienarten im Uterus nachweisbar ist, nimmt der Prozentsatz kultivierbarer Bakterien im Verlauf der Laktation rasch ab (Elliott et al., 1968; Griffin et al., 1974; Sheldon et al., 2002a, 2002b). Kühe, die sich in der mittleren Laktationsphase befanden, wiesen nach Lietaer et al. (2021) nur noch ein Mikrobiom mit geringer Biomasse auf. Die sehr geringen Anzahlen an Bakterien machen den bakteriellen Nachweis schwierig. Dies stellte sich auch in der vorliegenden Untersuchung dar. Die Proben der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit wurden auf Spezialagar (MRS und Rogosa-SL) ausgestrichen, sowohl direkt als auch nach vorheriger Kultivierung in MRS- und Rogosa-SL-Medium. Es folgte eine Entnahme der Bakterien aus den anwachsenden Kolonien und der Vorgang wurde weitere drei Mal wiederholt, um eine Reinheit des Bakterienstammes zu gewährleisten. Im Durchschnitt konnten je Uterushorn nur 1,7 bakteriologische Nachweise erbracht werden. Bei zu erwartender geringerer bakteriologischer Biomasse im Uterus von Rindern hat sich daher die 16S rRNA-Analyse in vielen Studien etabliert (Karstrup et al., 2017; Lietaer et al., 2021; Moore et al., 2017). Vorteile dieser 16S rRNA-Untersuchungsmethode stellen die quantitative Analyse von taxonomischen Einheiten dar und der Nachweis von Bakterien, die schwer im Anzuchtverfahren anwachsen und somit nachzuweisen sind. Nachteile dieser 16S rRNA-Untersuchungsmethode stellen der Nachweis eventuell bereits abgestorbener Bakterien dar. Die in dieser Studie durchgeführte Methode der Anzucht der Bakterien ermöglichte eine Analyse der lebenden Bakterienarten, wobei das Ziel verfolgt wurde, insbesondere verschiedene Laktobazillenarten zu identifizieren. Lyu et al. (2020) untersuchten ebenfalls wie in der vorliegenden Studie das uterine Mikrobiom in den Uterushörnern anhand der rückgewonnenen Spülflüssigkeit zum Zeitpunkt der Embryonengewinnung. Mittels 16S rRNA-Genanalyse wurden die Bakterienphyla analysiert. Eine weitergehende Untersuchung des uterinen Mikrobioms der Uterushörner zum Zeitpunkt der Embryonengewinnung, die eine Zwischenlösung zwischen den quantitativen Ergebnissen auf Phylum-Ebene von Lyu et al. (2020) und den qualitativen Ergebnissen auf Bakterienart-Ebene der vorliegenden Studie bietet, wäre von großem Interesse.

Auf Phylum-Ebene wurden in der vorliegenden Studie *Bacillota* mit 65,2 % der Nachweise am häufigsten gefolgt von *Proteobacteria* mit 27,3 % der Nachweise isoliert. Die Phyla *Actinomycetota* (ehemals *Actinobacteria*) und *Chlamydiae* konnten 4- bzw. 1-mal nachgewiesen werden. Dies widerspricht den Untersuchungen von Lyu et al. (2020) an

superovulierten Kühen und Lietaer et al. (2021) an Kühen in der Mitte der Laktation, die jeweils den größten Anteil bei dem Phylum *Proteobacteria* gefolgt von dem Phylum *Bacillota* ausmachten. Der geringste Anteil konnte in beiden Studien bei dem Phylum *Bacteroidota* beobachtet werden. Dieses Phylum wurde in der eigenen Arbeit aus keiner Probe isoliert. Im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung wurde in beiden Studien das Mikrobiom per 16 S rRNA-Genanalyse evaluiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie entsprechen eher den Nachweisen des uterinen Mikrobioms bei der Frau (Baker et al., 2018). In der Übersichtsarbeit von Baker et al. (2018) zeigte sich, dass in den meisten jedoch nicht allen Studien in der Humanmedizin das Phylum *Bacillota* am häufigsten nachgewiesen wurde. *Lactobacillus* stellte das am häufigsten nachgewiesene Genus dar (Kyono et al., 2019; Mitchell et al., 2015; Verstraelen et al., 2022). Es ist jedoch anzumerken, dass viele Studien in der humanen Reproduktionsmedizin an Frauen durchgeführt werden, die eine nicht das Mikrobiom betreffende Einschränkung der Fruchtbarkeit (vorangegangene diverse Operationen, uterine Polypen, verschiedene Zysten, notwendige IVP) aufweisen.

Gärtner et al. (2015) untersuchten Cytobrush-Proben aus dem Uteruskörper von Milchkühen 40–90 DIM mittels Reinzucht-Verfahren, wie in der vorliegenden Studie und wiesen in 6 von 11 Tieren (54,5 %) Bakterien der Familie *Lactobacillaceae* als potentiell probiotische Keime nach. Dabei identifizierten sie 9 verschiedene *Lactobacillus*-Isolate der fünf Laktobazillenarten *L. buchneri*, *L. ruminis*, *L. amylovorus*, *L. plantarum* und *L. similis*. Zusätzlich wurde dreimal *Weissella paramesenteroides* und einmal *Pediococcus pentosaceus* isoliert. In der eigenen Untersuchung konnten in 68,4 % der Kühe (13 von 19) potenziell probiotische Keime im Uterus nachgewiesen werden. In dieser Einteilung wurden zu den potenziell probiotischen Keimen neben Vertretern der Ordnung *Lactobacillales* (LAB) auch Bakterien der Ordnung *Bacillales*, speziell der Familien *Bacillaceae* und *Heyndrickxiaceae* gewertet. Diese identifizierten bzw. untersuchten Gärtner et al. (2015) nicht. In der vorliegenden Untersuchung wurden in 8 von 19 (42,1 %) Uteri LAB mit Vertretern der Familien *Lactobacillaceae* und *Enterococcaceae* nachgewiesen. Auch bei ausschließlicher Betrachtung der von Gärtner et al. (2015) isolierten Gattungen *Lactobacillus*, *Weissella* und *Pediococcus* konnten diese in der vorliegenden Untersuchung insgesamt 14-mal sowie in 8 von 19 Uteri (42,1 %) diagnostiziert werden. Somit traten in der eigenen Untersuchung diese Bakteriengattungen zu über 10 %-Punkten seltener auf. Jedoch ist anzumerken, dass sowohl die eigene Studie als auch die von Gärtner et al. (2015) relativ wenige (19 bzw. 11) Tiere untersucht haben und somit die Ergebnisse von Einzeltieren einen großen Einfluss auf den Anteil nahmen. Die Häufigkeit der Nachweise der drei untersuchten Gattungen der Milchsäurebakterien differieren in den beiden Studien um ca. 12 %-Punkte. Die Gattung *Lactobacillus* wurde in der Studie von Gärtner et al. (2015) in 5 von 11 Uteri (45,5 %) und in der eigenen Studie hingegen deutlich seltener in 5 von 19 Uteri

(26,3 %) beobachtet. *L. buchneri* konnte bei Gärtner et al. (2015) lediglich bei einem Tier aus dem Uterus isoliert werden. In der eigenen Studie belief sich dies auf drei Nachweise von *L. buchneri* aus dem Uterus von zwei verschiedenen Tieren. Die Bakterienisolate *Weissella paramesenteroides* und *Pediococcus pentosaceus* wurden in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls drei- bzw. einmal nachgewiesen. Machado et al. (2012) konnten mittels 16 S rRNA Genanalyse, die im eigenen Versuch am häufigsten vorliegenden Bakteriengattungen *Staphylococcus*, *Escherichia* und *Lactobacillus* in 65 %, 46 % und 41 % der Uteri gesunder Kühe nachweisen. Dies belief sich in der vorliegenden Studie auf 47,4 %, 47,4 % und 30,0 %. Somit konnten die Gattungen *Staphylococcus* und *Lactobacillus* um über 10 %-Punkte seltener und das Genus *Escherichia* gleich häufig nachgewiesen werden.

In die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich Tiere mit aufgenommen, die bereits mindestens einmal gekalbt hatten. Ein bakterieller Eintrag in den Uterus während der Geburt ist unvermeidlich, weshalb ein diverseres Mikrobiom bei Kühen zu erwarten ist. Zum Zeitpunkt der Geburt sind die physischen Barrieren der Vulva, Vagina und Zervix geschwächt und es kommt zum Eintrag von Bakterien aus der Umgebung, der menschlichen Haut und dem Kot in den Genitaltrakt (Bromfield et al., 2015). Dies stellt nach Baker et al. (2018) und Altmäe (2018) einen der Eintrittswegen von Bakterien in den weiblichen oberen Genitaltrakt dar. Das uterine Mikrobiom kann jedoch auch durch die Einführung vaginaler Bakterien durch Verfahren der assistierten Reproduktionsmedizin wie u. a. die instrumentelle Besamung und durch Bestandteile des seminalen Mikrobioms beeinflusst werden (Adnane & Chapwanya, 2022; Altmäe, 2018; Baker et al., 2018; Givens, 2018). Eine hämatogene Ausbreitung von Bakterien aus dem Darm mit anschließender Besiedlung des Uterus stellt ebenfalls einen weiteren Eintragsweg dar. Dieser Eintragsweg hat zum Konzept der „Hypothese des endogenen Weges“ geführt, was neben der Etablierung von Endometritiden auch hinsichtlich der uterinen Besiedlung mit potenziell probiotischen Keimen nicht außer Acht gelassen werden darf (Appiah et al., 2020). Einige landwirtschaftliche Betriebe verwenden Siliermittel auf Basis homo- und heterofermentativer Milchsäurebakterien, die unter anderem *L. buchneri* und weitere Laktobazillen enthalten. Silierzusatzstoffe sind in der Europäischen Union durch die EG-Verordnung 1831/2003 reguliert. Sie werden als Futterzusatzstoffe klassifiziert und unterliegen einer amtlichen Zulassung, bei der die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit aller Wirkstoffe geprüft wird. Ziel des Einsatzes von Silierzusatzstoffen ist eine Verbesserung des Gärverlaufes, der aeroben Stabilität, der Verdaulichkeit der Silage sowie eine Reduktion des Gärstoffes und eine Verhinderung der Vermehrung von Clostridien (DLG-Qualitätssiegel). Der Einsatz homofermentativer LAB führt durch eine vermehrte Bildung von Laktat zu einem reduzierten pH-Wert und auch zu niedrigeren Werten von Essigsäure und Ethanol in der Silage. Der Einsatz von heterofermentativen LAB verbessert insbesondere die aerobe

Stabilität der Silage (Nussbaum, 2012). Es ist zu vermuten, dass in Betrieben, die Siliermittel mit LAB verwenden, eine durch den hämatogenen und vaginalen Eintragsweg bedingte Anreicherung von LAB im Uterus von Milchkühen möglich ist (Fardini et al., 2010; Han et al., 2004; Jeon et al., 2017). Der Einsatz von Silierzusatzstoffen wurde in der vorliegenden Studie nicht dokumentiert. Daher konnte dieser Einflussfaktor auf das uterine Mikrobiom nicht untersucht werden. Dies wäre von Interesse in einer weiteren Studie.

5.1.2 Ergebnisse der Embryonengewinnung

Die Erfolgsparameter der Embryonengewinnung dieser Studie entsprechen den deutschland- sowie europa- und weltweiten Vergleichswerten des Referenzjahres 2022 (IETS, 2023). Im Jahr 2022 wurden bei weltweit 34.453 In-vivo-Embryonengewinnungen bei Tieren von Milchrassen im Durchschnitt 8,3 Embryonen und Eizellen gewonnen. Von diesen waren 68,9 % transfertauglich, was einer durchschnittlichen Anzahl von 5,7 tauglichen Embryonen pro Embryonenspülung entspricht. In Europa konnten ähnliche Zahlen dokumentiert werden. Bei 18.746 durchgeführten In-vivo-Embryonengewinnungen konnten durchschnittlich 8,7 Embryonen/Oozyten gewonnen werden, wovon 6,0 Embryonen transfertauglich waren. Dies entsprach einer Rate transfertauglicher Embryonen von 69,1 % (IETS, 2023). Der Bundesverband Rind und Schwein e. V. (BRS) verzeichnete bei den Embryonengewinnungen bei schwarzbunten Deutsch Holstein Rindern und Kühen bei 2.238 Spülungen im Jahr 2022 15.808 gesamt gewonnene Embryonen und Eizellen und 11.231 transfertaugliche Embryonen. Dies belief sich auf durchschnittlich 5,0 bzw. 71,0 % transfertaugliche Embryonen pro Spülung. Die IETS und der BRS differenzierten in ihren Daten nicht, ob Rinder (Nullipara) oder Kühe (Uni- oder Multipara) als Donoren für die Embryonengewinnung genutzt wurden. In der vorliegenden Studie wurde eine durchschnittliche Anzahl von $11,9 \pm 9,6$ Embryonen und Eizellen pro Spülung bei Kühen ermittelt. Davon waren im Durchschnitt $7,3 \pm 6,9$ Embryonen transfertauglich, was einer Rate von $65,4 \pm 30,7$ % entspricht. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit geringgradig schlechtere Ergebnisse in der Rate transfertauglicher Embryonen jedoch durchschnittlich bessere Ergebnisse in der Anzahl gesamt gewonnener Embryonen und Oozyten sowie transfertauglichen Embryonen im deutschlandweiten, europäischen und weltweiten Vergleich erzielt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Studie ließen sich ebenfalls im Vergleich mit anderen wissenschaftlichen Studien sehr gute Ergebnisse beobachten. Die Kühe wiesen im Durchschnitt $12,0 \pm 4,5$ Gelbkörper auf den Ovarien auf. Im Vergleich zu den Studien von Bezdíček et al. (2015) und Makarevich et al. (2016), die ebenfalls eine Superovulation mit Pluset® durchführten, jedoch nur eine Ovarreaktion von durchschnittlich $8,1 \pm 4,6$ bzw.

7,2 ± 0,6 Gelbkörpern pro Tier dokumentierten, reagierten die Kühe der eigenen Untersuchung stärker auf die Superovulation. Carvalho et al. (2013) beobachteten hingegen nach der Verwendung von Folltropin® eine bessere Ovarreaktion, mit 17,7 ± 3,4 und 19,1 ± 3,7 Gelbkörpern pro Kuh in zwei Versuchsgruppen. Mit einer Embryonengewinnungsrate von 72,4 ± 28,1 % wurden in der vorliegenden Studie die höchste Ausspülrate (Embryonen und Eizellen prozentual zu der Anzahl der Gelbkörper) im Vergleich zu anderen Studien gewonnen (Bezdiček et al., 2015; Carvalho et al., 2013; Chebel et al., 2008; Makarevich et al., 2016; Sartori et al., 2002). Die Ergebnisse der eigenen Studie mit 11,9 ± 9,6 gesamt gewonnenen Embryonen und Eizellen und 7,3 ± 6,9 transfertauglichen Embryonen sind vergleichbar mit denen aus der Studie von Mikkola & Taponen (2017a), die Donoren entweder mit Pluset® oder Folltropin® superovulierten. Darüber hinaus konnten sogar bessere Ergebnisse als in den Studien von Carvalho et al. (2013), Chebel et al. (2008), Bezdiček et al. (2015) sowie Makarevich et al. (2016) beobachtet werden. Die Rate transfertauglicher Embryonen von 65,4 ± 30,7 % ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Mikkola & Taponen (2017a) mit 61,9 % (Pluset®) und 65,1 % (Folltropin®) sowie Makarevich et al. (2016) mit 66,5 % und besser als in den Studien von Carvalho et al. (2013) und Sartori et al. (2002), wobei Raten zwischen 40,6 % und 52,8 % erreicht wurden. Ebenfalls die durchschnittlichen Anzahlen der degenerierten Embryonen (1,6 ± 2,2) und der unbefruchteten Eizellen (3,1 ± 4,4) sind in der vorliegenden Studie mit den Ergebnissen der Embryonengewinnungen von finnischen Milchkühen mit Pluset® von Mikkola & Taponen (2017a) vergleichbar (degenerierte Embryonen: 1,7; unbefruchtete Eizellen: 3,1). Die Tiere der Folltropingruppe wiesen ggr. weniger unbefruchtete Eizellen (2,2) auf (Mikkola & Taponen, 2017a). Dies spiegelt sich auch in vergleichbaren Raten von degenerierten Embryonen und unbefruchteten Eizellen wider. Der Anteil degenerierter Embryonen war in den Untersuchungen von Bezdiček et al. (2015) mit 21,87 ± 28,3 % deutlich höher als in der eigenen Studie (11,2 ± 16,3 %).

Nur in wenigen Studien wurden die Ergebnisse der Embryonengewinnung horngetrennt ermittelt. Sartori et al. (2003a) untersuchten bei Rindern den Unterschied zwischen Hornspülungen, bei denen der Katheter tief im Uterushorn platziert wird (Ballon ca. 7 cm kaudal der Hornspitze) und Hornspülungen, bei denen der Ballon des Katheters ca. 5 cm kranial der Bifurkation platziert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde der Ballon des Spülkatheters auf Höhe der großen Kurvatur platziert. Dies entspricht einer mittleren Höhe im Vergleich zu den beiden Techniken von Sartori et al. (2003a). Sartori et al. (2003a) beobachteten hochsignifikant schlechtere Ergebnisse in der Embryonengewinnungsrate (37,4 ± 6,5 % vs. 63,9 ± 8,6 %) sowie signifikant schlechtere Ergebnisse in der Anzahl gesamt gewonnener Embryonen und Eizellen (3,9 ± 0,8 vs. 5,4 ± 1,1) bei tiefen Hornspülungen. Die Anzahl transfertauglicher Embryonen war nur tendenziell geringer bei tiefen Hornspülungen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sind mit einer Embryonengewinnungsrate von $63,0 \pm 34,1 \%$, durchschnittlich $5,9 \pm 5,2$ gesamt gewonnenen Embryonen und Eizellen sowie $3,6 \pm 3,8$ transfertauglichen Embryonen pro Hornspülung mit den besseren Ergebnissen von Sartori et al. (2003a) vergleichbar. Es ist jedoch anzumerken, dass in der Studie von Sartori et al. (2003a) Rinder als Donoren eingesetzt wurden, die im Vergleich zu Kühen einen deutlich kleineren Uterus aufweisen, während die vorliegende Untersuchung ausschließlich Kühe umfasst.

5.1.3 Mikrobiologischer Einfluss auf die Embryonenqualität

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, einen intensiven Einblick in die Mikrobiota und das Mikrobiom der Uterushornspitzen zu erlangen und dessen Einfluss auf die Qualität in vivo gewonnener Rinderembryonen zu beleuchten. Die zugrunde liegende Hypothese war, dass das Vorhandensein potenziell probiotischer Keime in der Uterushornspitze zu einer Verbesserung der Embryonenqualität führt. Dies legt die weitere Hypothese zugrunde, dass das Vorhandensein potenziell pathogener Keime einen negativen Einfluss auf die Qualität der Embryonen ausübt. Insbesondere der Einfluss eines möglicherweise vorhandenen *Lactobacillus buchneri* sollte evaluiert werden.

Bei der vergleichenden Betrachtung der Embryonengewinnungen der Uterushörner konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Anzahl gewonnener Embryonen und Eizellen sowie der Anzahlen und Raten der tauglichen Embryonen, Embryonen 1. Qualität, degenerierten Embryonen und unbefruchteten Eizellen in Abhängigkeit zum ermittelten Uterusmikrobiom festgestellt werden. Weder die potenziell pathogen besiedelten Hörner (PATH) wiesen schlechtere noch die potenziell probiotisch besiedelten Uterushörner (PROB) wiesen bessere Erfolgsparameter der Embryonengewinnung auf. Ebenfalls bei den gemischt besiedelten Hörnern (MIX) konnten keine signifikanten Unterschiede in allen untersuchten Parametern festgestellt werden. Aufgrund der geringen Anzahl an Nachweisen des *Lactobacillus buchneri* in drei Uterushörnern bei zwei Donoren, konnte der Einfluss dieses speziellen Keims statistisch nicht untersucht werden.

Über den direkten Einfluss der bakteriellen Besiedlung im Uterus auf in vivo gewonnene Rinderembryonen liegen derzeit nur zwei Studien vor. Rasolomboahanginjatovo et al. (2014) analysierten vergleichend bei nicht superovulierten und superovulierten Kühen verschiedene Parameter in der Uteruslavage und im Serum. Die Superovulation erfolgte zweimal täglich über vier Tage mit einer abnehmenden Dosierung von pFSH (Folltropin®). Es wurde, im Gegensatz zur eigenen Arbeit, die bakterielle Besiedlung nicht horngetrennt untersucht. In der

Kontrollgruppe lag bei einer von 7 Kühen (14,2 %) ein positiver bakterieller Befund (*Enterococcus* sp.) vor. In der Superovulationsgruppe wurden bei 3 von 28 Kühen (10,7 %) Bakterien in der Spülflüssigkeit nachgewiesen (*Trueperella* spp., *Pseudomonas* spp., *Corynebacterium* spp.). Im Einklang mit den Ergebnissen der eigenen Arbeit, konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der bakteriellen Besiedlung und der Anzahl transfertauglicher Embryonen beobachtet werden.

Lyu et al. (2020) untersuchten die uterine Mikrobiota in den Hornspitzen bei der Embryonengewinnung von 10 chinesischen Kühen einer fleischbetonten Hybridrasse mit *Bos indicus*-Anteil. Im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung wurden die Kühe bei Lyu et al. (2020) unabhängig ihres Zyklusstatus mit einer CIDR-Progesteronspange behandelt. Das Superovulationsprogramm mit einem FSH-Produkt von BIONICHE startete sechs Tage später. Außerdem wurden die Spülungen je Horn mit 250 ml statt 600 ml wie in der eigenen Studie durchgeführt. Lyu et al. (2020) untersuchten im Anschluss die Mikrobiota der Spülflüssigkeit beider Uterushörner zusammen. Die Analyse der uterinen Keimbesiedlung erfolgte ohne vorherige Anzucht auf Nährböden mittels 16S rRNA-Genanalyse und die Bakterien wurden auf Phylum-Ebene bestimmt. Die Uterusproben wurden um Proben des Zervixschleims ergänzt. Eine Einteilung der Embryonengewinnungen erfolgte anhand des Anteils an Embryonen mit sehr guter Qualität in drei Klassen: A umfasste Spülungen mit mehr als 80 % Embryonen sehr guter Qualität, B einen Anteil von 40–80 % und C einen Anteil von weniger als 40 %. Lyu et al. (2020) stellten in allen drei Klassen fest, dass die uterine Mikrobiota zu über 78 % durch das Phylum *Proteobacteria* dominiert wurde. Sie beobachteten, dass mit kontinuierlich abnehmender Embryonenqualität von Spülungen der Klasse A bis C der Anteil des Phylum *Proteobacteria* von 95,6 % über 91,3 % zu 78,9 % abnahm. Der Anteil der Phyla *Bacillota* und *Bacteroidota* stieg demgegenüber signifikant an. Die Spülflüssigkeit der Spülungen der Klasse A wies einen Anteil von 2,4 % *Bacillota* und 0,6 % *Bacteroidota* auf, während es in Spülungen der Klasse B 4,0 % bzw. 1,3 % und der Klasse C 10,95 % bzw. 7,4 % waren. Das Verhältnis von *Bacillota* zu *Bacteroidota* sank mit abnehmender Embryonenqualität. Die Autoren kamen daher zu dem Schluss, dass das Phylum *Proteobacteria* keinen und die Phyla *Bacillota* und *Bacteroidota* einen negativen Einfluss auf die frühe Embryonalentwicklung nehmen. Die Autoren gaben jedoch in den Ergebnissen kein Signifikanz-Level an und ließen auch die Frage unbeantwortet, ob sich die Signifikanz zwischen den Anteilen an *Bacillota* und *Bacteroidota* auf alle drei Klassen der Embryonenqualität bezog oder nur auf den Unterschied zwischen Klasse A und C. Ein Vergleich der eigenen Studie und der von Lyu et al. (2020) ist aufgrund des unterschiedlichen Studiendesigns und der Auswertung nur schwer möglich. Der größte Unterschied in den Studien liegt in der nachgewiesenen Ebene (Phylum bzw. Art) der

Systematik der Bakterien. Lyu et al. (2020) untersuchten mit einer 16S rRNA-Genanalyse die Bakterienphyla. Während diese Untersuchung eine allumfassendere qualitative und quantitative Analyse der Mikrobiota ermöglicht, werden jedoch aktive wie auch inaktive Bakterien nachgewiesen. Mit der Untersuchungsmethode in der vorliegenden Studie mit vorangehender dreimaliger Subkultivierung der Bakterienisolate aus den Spülproben ist eine quantitative Analyse nicht möglich, jedoch wird sichergestellt, dass nur lebende Mikroorganismen nachgewiesen werden. Lyu et al. (2020) wiesen das Phylum *Proteobacteria* nach, welches aus gramnegativen Bakterien besteht. Dieses Phylum gliedert sich in fünf Klassen mit zahlreichen Ordnungen und vereint damit tausende Bakterienarten. Zu den darin vertretenen Gattungen zählen unter anderem *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pasteurella*, *Pseudomonas* und *Coxiella*. Ähnlich verhält es sich bei den Phyla *Bacteroidota*, zu denen die Gattungen *Prevotella* und *Bacteroides* gehören, sowie bei den *Bacillota*, zu denen unter anderem die grampositiven Ordnungen *Lactobacillales*, *Bacillales* und *Clostridiales* zählen (Hashmi et al., 2020; Imhoff, 2005; Johnson et al., 2017; Ludwig et al., 2009). In der vorliegenden Studie erfolgte eine Einteilung der Bakterienarten aufgrund ihres potenziellen pathogenen oder probiotischen Potenzials und anhand dessen wurde der Einfluss auf die Embryonen untersucht. Lyu et al. (2020) hingegen nutzten die phylogenetische Verwandtschaft als Grundlage für die Untersuchung des Einflusses. So konnte Lyu et al. (2020) feststellen, dass mit steigendem Anteil der Phyla *Bacillota* und *Bacteroidota* der Anteil der Spülungen mit einer geringeren Anzahl an Embryonen sehr guter Qualität sinkt. Sie werteten jedoch nicht wie in der vorliegenden Studie den Einfluss auf die klassischen Erfolgsparameter der Anzahl und Anteil gesamt gewonnener, transfertauglicher sowie degenerierter Embryonen und unbefruchteter Eizellen aus. In diesen Parametern konnte in der vorliegenden Studie kein Einfluss der potenziell pathogenen und probiotischen Bakterien beobachtet werden.

Die Hypothese eines positiven Einflusses eines probiotischen Uterusmilieus auf die Embryonenqualität beruft sich auf Studien der bovinen Reproduktionsmedizin. In verschiedenen Untersuchungen konnte ein positiver Einfluss probiotischer Keime insbesondere von Milchsäurebakterien (LAB) auf die Fertilität von Rindern beobachtet werden (Ametaj et al., 2014; Deng et al., 2015a; Genís et al., 2016; Machado et al., 2012; Peter et al., 1989). Machado et al. (2012) konnten zeigen, dass bei tragenden Kühen prozentual mehr Tiere ein Laktobazillen-positives Uterusmikrobiom aufwiesen als bei Kühen, die am 200. Laktationstag noch nicht tragend waren. Laktobazillen produzieren Milchsäure sowie andere organische Säuren, Wasserstoffperoxid und Bakteriozine, die den pH-Wert des Milieus senken und das Wachstum pathogener Keime inhibieren können (Cantoni et al., 1989; Dahiya & Speck, 1968; Wheeler et al., 1952). Dies bestätigten Genís et al. (2016), die in

In-vitro-Versuchen eine *E. coli*-Infektion von Endometriumszellen signifikant durch den Einsatz von *Lactobacillus sakei*, *L. reuteri* und *Pediococcus acidilacti* reduzieren konnten. Eine intravaginale Anwendung von LAB um den Zeitpunkt der Geburt bei Holsteinkühen führte in den Untersuchungen von Deng et al. (2015a, 2015b) und Ametaj et al. (2014) zu einer beschleunigten Uterusinvolution, einer geringeren Inzidenz von Gebärmutterinfektionen und vaginalem Ausfluss sowie einer kürzeren Güstzeit. Peter et al. (2018) konnten ebenfalls nach einer einmaligen intrauterinen Administration von *Lactobacillus buchneri* 30 Tage p.p. bei Holsteinkühen bessere Erstbesamungserfolge und eine kürzere Güstzeit beobachten.

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, weshalb in der vorliegenden Studie keine positiven Effekte eines probiotischen Uterusmilieus auf die Embryonenqualität nachgewiesen werden konnten. Hierfür kommen mehrere mögliche Erklärungsansätze in Betracht. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass die Embryonen diesem Milieu nicht lange genug ausgesetzt waren, um einen nachweisbaren Effekt aufzuzeigen. Bei superovulierten Kühen treten die ersten Embryonen und Eizellen (ca. 15 %) bereits bis 72 Stunden, der Hauptanteil der Embryonen und Eizellen (65 %) dann zwischen 72 und 96 Stunden nach Östrusbeginn vom Ovidukt in die Uterushornspitze ein (El-Banna & Hafez, 1970; Hamilton & Laing, 1946; Moore, 1975). In der vorliegenden Studie wurden die Versuchskühe 12 bis 16 Stunden nach Östrusbeginn erstmals künstlich besamt und sechseinhalb bis sieben Tage später wurden die Embryonen aus dem Uterus gewonnen. Somit ist der Großteil der Embryonen lediglich drei bis vier Tage dem Uterusmilieu ausgesetzt. In der Studie von Peter et al. (2018) konnte nach intrauteriner Administration von *L. buchneri* ein besserer Erstbesamungserfolg und eine kürzere Güstzeit bei behandelten gesunden Tieren und Tieren mit subklinischer Endometritis (SE) beobachtet werden. Die Autoren führen dies aufgrund ihrer Untersuchung von verschiedenen Genexpressionen im Endometrium auf eine Downregulation des uterinen Immunsystems um den Besamungszeitpunkt zurück. Dies wirkte sich daraufhin vorteilhaft auf das Überleben und die Implantation des Embryos aus. Da in der vorliegenden Studie jedoch die Embryonen an Tag 7 nach der Besamung aus dem Uterus herausgespült wurden, kann der von Peter et al. (2018) potenziell positive Einfluss auf das Endometrium zum Zeitpunkt der Implantation (ab D 15; Guillomot et al., 1981) keinen Einfluss auf die Embryonen nehmen. Ähnliche Aspekte müssen bei der Betrachtung der humanen IVP-Studien von Moreno et al. (2016, 2022) an Rezipienten beachtet werden. In der humanen assistierten Reproduktion sind Donoren und Rezipienten zwar in der Regel der gleiche Patient, jedoch findet die embryonale Entwicklung in vitro statt. Zusätzlich ist anzumerken, dass es sich in der Humanmedizin zumeist um Frauen bzw. Paare mit eingeschränkter Fruchtbarkeit handelt, weshalb auf eine IVP zurückgegriffen wird. Es gilt weiterhin zu bedenken, dass die Frauen hormonell stimuliert sind und der Embryo folglich in dieses Milieu übertragen wird. In diesem

Kontext stellt sich die Frage, inwiefern das Uterusmilieu durch hormonelle Beeinflussung verändert wird. Moreno et al. (2016) konnten in ihren Studien nach Embryotransfer in ein *Lactobacillus*-dominiertes Uterusmilieu bessere Einnistungsraten von über 60 % zu 23 % bei einem nicht *Lactobacillus* dominierten Uterusmilieu verzeichnen. Hier ist ebenfalls von Relevanz, dass sich die Embryonen deutlich länger im probiotischen Uterusmilieu der Empfängerin aufhielten. Der Erfolg wurde anhand des Implantationserfolges ausgemacht. Es wurden keinerlei direkte Einflüsse auf die Embryonenqualität untersucht. Daher bedarf es weiterer Studien beim Rind, die den Einfluss des uterinen Mikrobioms auf die Trächtigkeitsraten nach Transfer untersuchen, um zu analysieren, ob ebenfalls beim Embryotransfer bei Rindern bessere Einnistungsraten beobachtet werden können.

Der Aspekt der zu kurzen Expositionsdauer der Embryonen kommt ebenfalls beim fehlenden negativen Einfluss pathogener Keime zum Tragen. Eine bakterielle Infektion bedingt eine Entzündung des Endometriums bis hin zum Stratum compactum, was eine Subfertilität zur Folge haben kann (Bonnett et al., 1991, 1993). Das bakterielle Endotoxin LPS führt zu einer veränderten Genexpression der Endometriumzellen, wobei u. a. Gene der Immunantwort verstärkt und Gene der Zellmembranstabilität weniger exprimiert werden (Guo et al., 2019). Bei einer subklinischen Endometritis, die mit einem Einstrom an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) definiert ist, kommt es ebenfalls zur veränderten endometrialen mRNA-Expression für verschiedene proinflammatorische Mediatoren, wie Zytokine, antimikrobielle Peptide und Akute Phase Proteine (Fischer et al., 2010; Gabler et al., 2009, 2010). In dem In-vitro-Versuch von Hill und Gilbert (2008) konnte jedoch keine signifikante Beeinträchtigung der Blastozystenrate fünf Tage alter Embryonen bei einer zweitägigen Kultivierung in einem aseptisch entzündeten Uterusmilieu festgestellt werden (49,3 % Uterusmedium gesunder Kühe vs. 42,2 % entzündetes Uterusmedium). Es wurde jedoch eine reduzierte innere Zellmasse bei Blastozysten aus dem entzündeten Medium beobachtet. Studien an superovulierten Kühen lassen den Schluss zu, dass insbesondere die Befruchtungsrate durch eine endometriale Entzündung negativ beeinflusst wird (Carvalho et al., 2013; Egberts et al., 2016a). Carvalho et al. (2013) beobachteten eine Abnahme von 80 % Befruchtungsrate bei 0 % PMN im Vergleich zu < 50 % Befruchtungsrate bei > 50 % PMN im Endometrium. In der Studie wurde bei den Tieren der Versuchsgruppe mit > 5 % PMN im Vergleich zu denen der Versuchsgruppen 0 % und 1–5 % PMN im Endometrium keine Veränderung in der Anzahl der Gelbkörper, jedoch eine tendenzielle Reduktion der gesamt gewonnenen Embryonen und Eizellen bei signifikant reduzierter Ausspülrate beobachtet. Ebenfalls konnten bei Tieren der Gruppe > 5 % PMN signifikant weniger befruchtete, transfer- und tiefgefriertaugliche Embryonen gewonnen werden. Aufgrund der reduzierten Anzahl gesamt gewonnener Strukturen konnte im Anteil der transfer- und tiefgefriertauglichen

Embryonen keine und im Anteil der befruchteten Embryonen eine tendenzielle Reduktion beobachtet werden. Dies zeigt, dass ein erhöhter Gehalt an PMN im Endometrium sich hauptsächlich negativ auf die Ausspülrate der Embryonen und auf die Befruchtung auswirkt und weniger auf die embryonale Entwicklung im Uterus und die Embryonenqualität. Die verringerten Befruchtungsraten können auf den negativen Einfluss von PMN auf Spermien zurückzuführen sein. PMN produzieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die schädlich für Spermien sind (Aloé et al., 2012; Hendricks & Hansen, 2010), phagozytieren Spermien und inaktivieren sie durch die Bildung von „neutrophil extracellular traps“, den NETs (Brinkmann et al., 2004; Strzemienski, 1989; Wrenzycki, 2022). Im Hinblick auf den Anteil PMN im Endometrium ist zudem festzuhalten, dass bislang keine gesicherte Korrelation zwischen dem Nachweis spezifischer Bakterien beziehungsweise deren Wachstum auf Kultivierungsmedien und dem PMN-Anteil im endometrialen Gewebe besteht (Prunner et al., 2014; Ricci et al., 2015). So stellten Pascottini et al. (2020) und Wang et al. (2018a) eine ähnliche Mikrobiota bei gesunden Kühen und Kühen mit subklinischer Endometritis fest. In der vorliegenden Arbeit wurde der PMN-Gehalt im Endometrium der Uterushornspitze nicht untersucht, stattdessen wurde ausschließlich die bakterielle Besiedlung analysiert.

Ein weiterer ergänzender Faktor für einen ausbleibenden positiven sowie negativen Einfluss des Uterusmikrobioms auf die Embryonenqualität könnte eine erhöhte Resistenz der Embryonen gegen äußere Einflüsse sein. Ein Blick in die Studien über den Einfluss von Hitzestress zeigt die Entwicklung einer Resistenz der Embryonen gegenüber Hitzestress. Oozyten und frühe embryonale Entwicklungsstadien wie die Zygote und 2- bis 8-Zeller weisen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Hitzestress auf (Cavallari de Castro et al., 2019; Dunlap & Vincent, 1971; Payton et al., 2004; Roth & Hansen, 2005). Weiterentwickelte Embryonen im Morula- und Blastozystenstadium weisen hingegen eine erhöhte Hitzetoleranz auf (Ealy et al., 1995; Edwards & Hansen, 1997; Sakatani et al., 2012). Dies bestätigte sich in Versuchen an superovulierten Rindern. Hitzestress nach der Besamung führte insbesondere am ersten Tag nach der Besamung zu einer geringeren Qualität der Embryonen sowie zu weniger weit entwickelten Embryonen am Tag der Embryonengewinnung (Ealy et al., 1993; Putney et al., 1988b, 1988a). Es ist anzunehmen, dass die Embryonen, die früh in den Uterus eintreten, sich 72 Stunden nach dem Östrusbeginn im 8-Zellstadium befinden. Bei einem späteren Eintritt in die Uterushornspitze ist zu erwarten, dass sich die Embryonen bereits im weiter fortgeschrittenen 16-Zellstadium befinden (Hamilton & Laing, 1946). Daher ist davon auszugehen, dass Embryonen, deren embryonales Genom bereits aktiviert ist, das uterine Milieu erreichen und weniger empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen sind, einschließlich des bakteriellen Mikrobioms (Graf et al., 2014; King et al., 1988).

Bei einer bakteriellen Uterusinfektion mit gramnegativen Bakterien wie z. B. *E. coli*, kann es beim absterben dieser Bakterien zu einer Anreicherung von LPS im Uterus und folglich auch in der Follikelflüssigkeit kommen. Eine LPS-Exposition von Oozyten während der In-vitro-Maturation (IVM), die diese Situation simuliert, führt zu einer signifikanten Reduktion des Anteils der Oozyten, die eine Maturation durchlaufen und das MII-Stadium erreichen (Bromfield & Sheldon, 2011; Granacher et al., 2023; Heydari et al., 2020; Rincón et al., 2019; Zhao et al., 2017). In den Untersuchungen von Castro et al. (2024) konnte bei LPS-Substitution während der IVM, im Gegensatz zu den anderen Studien, zwar kein negativer Effekt auf die Maturation beobachtet werden, jedoch auf die Entwicklungskompetenz der daraus resultierenden Embryonen. Nach einer Maturation in einem mit 1 µg/ml LPS angereichertem Kultivierungsmedium konnten tendenziell schlechtere Teilungsraten bis zum Morulastadium und nach einer Maturation in 0,1 sowie 1 µg/ml LPS eine signifikant geringere Blastozystenrate beobachtet werden. Ähnliches stellten Soto et al. (2003), Tariq et al. (2025) und Heydari et al. (2020) in ihren Untersuchungen fest. Granacher et al. (2026) konnten dies nicht bestätigen. Bei einer Supplementation von 10 µg/ml LPS in der IVM konnten bei anschließender regulärer In-vitro-Fertilisation (IVF) und -Kultivierung (IVC) keine reduzierten Teilungsraten bis Tag 3, Entwicklungsraten bis Tag 7 und 8, sowie keine veränderten Gentranskripte beobachtet werden. Embryonen in der IVC zeigen eine Toleranz gegen LPS. In den Untersuchungen von Rincón et al. (2019) konnte bei einer Substitution von bis zu 5 µg/ml in der IVC kein Einfluss auf die Teilungs- und Blastozystenrate beobachtet werden. Ähnliches beschrieben Soto et al. (2003), die lediglich eine geringgradige Verminderung der Teilungsrate bei 0,1 und 1 µg/ml LPS Zusatz, die sich jedoch nicht signifikant auf die Blastozystenrate auswirkte, beobachten. Diese Beobachtungen stützen die These, dass es zu keiner deutlichen lokalen negativen Beeinflussung der Embryonen durch ein mit LPS angereichertes Uterusmilieu in der In-vivo-Embryonenproduktion kommt. Aufgrund dessen wäre eine Untersuchung des oviduktalen Keimmilieus während der In-vivo-Embryonenproduktion von erheblichem Interesse, da die frühen embryonalen Entwicklungsstadien in diesem anatomischen Raum eventuell noch sensibler auf das Mikrobiom reagieren.

In verschiedenen Studien zeigte sich ein negativer Effekt einer bakteriellen Kontamination des Uteruslumens postpartal auf die Follikulogenese in den Eierstöcken (Sheldon et al., 2002b; Williams et al., 2007b). Verschiedene In-vivo-Versuche stellten nach intrauteriner oder intravenöser LPS-Substitution ein Ausbleiben der Ovulation fest, was auf eine endotoxinbedingte Verringerung der präovulatorischen Östradiolkonzentration und folglich einer veränderten und verringerten LH-Ausschüttung mit teilweise ausbleibendem LH-Peak zurückzuführen ist (Battaglia et al., 1997; Peter et al., 1989; Suzuki et al., 2001; Williams et

al., 2008a). In der vorliegenden Studie konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl gesamt gewonnener Embryonen und Eizellen festgestellt werden. Die PATH-Hörner wiesen mit $7,7 \pm 5,4$ numerisch sogar die größte Anzahl im Vergleich zu $6,0 \pm 6,2$ bei den PROB-Hörnern bzw. $5,2 \pm 3,7$ bei den MIX-Hörnern auf. Diese Anzahl zeigt, dass auch bei Kühen mit pathologisch besiedelten Uterushörnern keine verringerte Anzahl erfolgreicher Ovulationen nachzuweisen ist. Der fehlende negative Einfluss könnte einerseits darauf zurückzuführen sein, dass keine ausreichende LPS-Konzentration in den untersuchten Uteri zustande gekommen ist, um einen negativen Einfluss auf die Ovarien zu nehmen. Im Studiendesign der vorliegenden Untersuchung wurde die zurückgewonnene Spülflüssigkeit lediglich bakteriologisch und nicht auf die LPS-Konzentration hin untersucht. Daher bleibt ungeklärt, ob überhaupt erhöhte LPS-Konzentrationen vorlagen. Andererseits könnte der fehlende negative Einfluss mit der vorangegangenen Stimulation mit Pluset® zu erklären sein. Ziel einer Superovulation ist es mit der Substitution von pFSH und pLH die fein abgestimmte Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse zu übersteuern und multiple Follikel heranreifen und ovulieren zu lassen. Während Battaglia et al. (1997) durch LPS eine unterdrückte pulsatile GnRH- und folglich gehemmte LH-Sekretion detektierten, setzt die Superovulation mit den Hormonen pFSH und pLH eine Stufe in der Achse tiefer, auf Basis der physiologisch von der Hypophyse produzierten Gonadotropine, an. Somit kann davon ausgegangen werden, dass ein potenziell negativer Effekt von LPS einfach übersteuert wird und ausreichend Östradiol von den multiplen Follikeln produziert wird. Diesbezüglich wäre eine Studie an Kühen unter Superovulation und LPS-Substitution von Interesse, um den gegenseitigen Einfluss der externen Gonadotropine und der hemmenden LPS-Wirkung zu analysieren.

Das Uterusmikrobiom beim Rind ist Gegenstand jüngster Forschung. Mit Einführung der 16S rRNA-Genanalyse konnte eine hohe Varianz an Bakterien im Uterus identifiziert werden, was zuvor nicht möglich war. Eine Vielzahl der Studien in diesem Bereich konnte mit dieser neuen Methode den Nachweis von Bakterien erbringen, die bislang noch nicht aus dem Uterus isoliert werden konnten. Demnach gibt es bislang nur wenige Studien, die deren Einfluss im Uterus auf das Endometrium, die Embryogenese und die Fruchtbarkeit untersucht haben. Daher erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Einteilung der Keime in potenziell pathogen, potenziell probiotisch und Kommensale aufgrund der derzeit verfügbaren Literatur, die sich teilweise auf ihre nachteilige oder fördernde Wirkung in anderen Geweben bezieht. Es ist bekannt, dass pathogene Keime nicht zwangsläufig eine Erkrankung verursachen und daher auch in gesunden Geweben nachweisbar sein können. Unter anderem wiesen Moore et al. (2017) und Karstrup et al. (2017) Keime, die postpartal als pathogen gelten, in Uteri von Kühen mit intakter Trächtigkeit nach. Andererseits stellten Gärtner et al. (2015) auch unterschiedliche Reaktionen des Endometriums auf verschiedene *Lactobacillus*-Arten fest. In dieser Studie

konnte eine unterschiedliche Stimulierung des endometrialen Immunsystems ohne zytotoxische Effekte beobachtet werden. Dies bestätigt, dass auch Bakterien derselben Gattung unterschiedliche Wirkungen hervorrufen. Eine Einteilung der Bakterien in der eigenen Untersuchung stellt daher ein vorsichtiges Sortieren der Keime nach Annahme ihres pathogenen oder probiotischen Potenzials dar. Ein tatsächlicher Nachweis einer schädigenden oder gesundheitsfördernden Wirkung wurde im Rahmen dieser Untersuchung nicht erbracht. Ein fehlender nachweisbarer Einfluss des Uterusmikrobioms auf die Erfolgsparameter der Embryonengewinnung könnte also darauf zurückzuführen sein, dass die nachgewiesenen Keime zwar als potenziell pathogen oder probiotisch klassifiziert wurden, diese Einordnung jedoch zumindest für einzelne Spezies nicht zutrifft oder ihr entsprechendes Potenzial unter den vorliegenden Bedingungen nicht zur Geltung kommt.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die bakterielle Besiedlung des Uterushorns einen Einfluss auf die Embryonenqualität nimmt, dieser jedoch in dem Studiendesign nicht zur Geltung kommt. Bei der vorliegenden Untersuchung handelt es sich um eine Feldstudie, wobei die Kühe der untersuchten Gruppen von verschiedenen landwirtschaftlichen Betrieben stammen und somit unterschiedlichen Einflüssen ausgesetzt sind. Die Tiere wiesen unter anderem auch eine große Varianz hinsichtlich des Alters, des Laktationsstadiums und der Eutergesundheit auf. Da bekannt ist, dass diese Aspekte einen Einfluss auf die Embryonengewinnung nehmen können (Chebel et al., 2008; Hockett et al., 2005; Malhi et al., 2007; Sartori et al., 2002; Snijders et al., 2000; Takeo et al., 2013), ist es möglich, dass diese einen potenziellen Einfluss des uterinen Milieus überdecken. Alle Tiere der Studie wurden mit demselben Präparat (Pluset®) superstimuliert und sowohl die Embryonengewinnung als auch die Beurteilung der Embryonen wurde durch denselben Tierarzt durchgeführt. Somit ist ein Einfluss dieser Aspekte auszuschließen. Das Studiendesign bedingt zudem, dass nur ein physiologisch vorhandenes Uterusmikrobiom analysiert wurde. Bei den untersuchten Kühen zeigte sich keine Beeinträchtigung der gynäkologischen Gesundheit, die durch rektale und vaginale Untersuchung festgestellt wurde. Wie Lietaer et al. (2021) in ihren Untersuchungen feststellten, weisen Kühe in ihrer mittleren Laktationsphase lediglich ein uterines Mikrobiom mit geringer Biomasse auf. Die Kühe der vorliegenden Studie waren durchschnittlich $198,5 \pm 151,2$ DIM und somit nicht mehr in der frühen postpartalen Phase, in der zahlreiche Bakterien im Uterus zu erwarten sind (Bromfield et al., 2015). In den Studien, in denen ein positiver Einfluss von LAB auf die Fertilität festgestellt wurde, wurden entweder intravaginal oder intrauterin LAB substituiert. Es ist also nicht auszuschließen, dass eine intrauterine Substitution von LAB oder auch pathogenen Keimen, die zu einer hohen Konzentration der Bakterien vor Ort führt, Einfluss auf die Qualität von Embryonen nimmt. Die Untersuchung des

Einflusses eines mit LAB angereicherten Uterus auf die Embryonenqualität wäre von großem Interesse.

Schlussendlich ist festzuhalten, dass es noch einen erheblichen Forschungsbedarf im Bereich des uterinen Mikrobioms und dessen Einfluss auf Embryonen von nicht-superovulierten und superovulierten Kühen gibt. Von Interesse wäre neben den bereits genannten Vorschlägen weiterhin eine gekoppelte Untersuchung von PMN und dem Mikrobiom in der Uterushornspitze bei der Embryonengewinnung. Ebenfalls wären weitere Untersuchungen der in vivo gewonnenen Embryonen auf zellulärer Ebene, wie es bei Hill und Gilbert (2008) sowie Hoelker et al. (2012) analysiert wurde, um über die Qualitätskategorien der Embryonen hinaus eine Einschätzung zu geben, in Kombination mit der Untersuchung des uterinen Mikrobioms, interessant. Diese Untersuchungen bedürfen aber eines anderen Studiendesigns, da in den vorliegenden Untersuchungen im Rahmen einer Feldstudie im kommerziellen ET-Programm die Umsetzung nicht möglich ist.

5.1.4 Weitere Einflüsse auf die Embryonenqualität

Des Weiteren wurde der Einfluss weiterer Parameter wie das Laktationsstadium, die Parität, die Milchleistung, die Körperkondition und die Eutergesundheit der Donoren auf die Embryonengewinnung und -qualität untersucht. Ebenfalls erfolgte eine Analyse des Einflusses der Verwendung von konventionellem oder X-sortiertem Sperma. Die bei der Embryonengewinnung erhobenen Daten der Rückgewinnung, Trübung und Blutbeimengung der Spülflüssigkeit wurden in Relation zu den Erfolgsparametern der Embryonengewinnungen auf Hornbasis gesetzt.

5.1.4.1 Laktationsstadium, Parität und Milchleistung

Die Donoren sind während der Laktation unterschiedlichen Stoffwechselbelastungen ausgesetzt. Allgemein bekannt ist, dass die Kuh nach dem Einsetzen der Milchleistung post partum eine negative Energiebilanz in den ersten 5 bis 10 Wochen aufweist (De Vries & Veerkamp, 2000; Leroy et al., 2008). Keines der Tiere der vorliegenden Studie wurde in diesem Zeitraum für die Embryonengewinnung genutzt. Ein Vergleich verschiedener Studien wird durch die fehlende Definition der Früh-, Mittel- und Spätlaktation erschwert. In der vorliegenden Studie wurde sich dabei an den Grenzen von Martin et al. (2014) orientiert.

Es konnte kein signifikanter Einfluss des Laktationsstadiums auf die Erfolgsparameter der Embryonengewinnung festgestellt werden. Ebenfalls in den Untersuchungen von

Kweon et al. (1986), Hupka (2000) und Wolgast (2009) korreliert die Anzahl gewonnener, transfertauglicher sowie degenerierter Embryonen als auch die Anzahl unbefruchteter Eizellen nicht oder nur sehr schwach mit dem Laktationsstadium. Numerisch erreichten die Tiere im Laktationsstadium 4 (> 365 DIM und TS) die besten Ergebnisse hinsichtlich der durchschnittlichen Anzahl gesamt gewonnener ($23,0 \pm 10,7$) und transfertauglicher ($12,3 \pm 7,8$) Embryonen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Chebel et al. (2008), die bei der Embryonengewinnung von trockenstehenden Kühen eine höhere Anzahl gesamt gewonnener Embryonen und Eizellen beobachteten. Jedoch wurde sowohl von Chebel et al. (2008) als auch von Sartori et al. (2002) bei trockenstehenden Holstein-Kühen ebenfalls höhere Raten transfertauglicher Embryonen festgestellt. Die Kühe im Laktationsstadium 4 der vorliegenden Studie wiesen jedoch mit $46,1 \pm 17,0$ % eine unterdurchschnittliche Rate transfertauglicher Embryonen auf. Konträre Ergebnisse wiesen die Studien von Darrow et al. (1982) und Bosselmann (2006) auf, bei denen die meisten Embryonen und Eizellen bei Donoren 0 bis 135 bzw. 149 DIM beobachtet wurden. Dies steht insoweit im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen, dass bei Spülungen der Kühe des Laktationsstadiums 2 (91–180 DIM), welches auch die größte Versuchsgruppe darstellte, die zweitbesten Ergebnisse mit $10,9 \pm 9,1$ gesamt gewonnener Embryonen und Eizellen beobachtet wurden. Jedoch widersprüchlich sind die Ergebnisse der Spülungen der Kühe früh in der Laktation (Laktationsstadium 1, ≤ 90 DIM), welche deutlich schlechtere Ergebnisse mit $6,3 \pm 4,7$ gesamt gewonnenen Embryonen und Eizellen aufwiesen. Bezdíček et al. (2015) beobachteten hingegen die größte durchschnittliche Anzahl ($7,6 \pm 1,1$) an Embryonen und Eizellen sowie transfertauglichen ($6,1 \pm 0,8$) Embryonen ab ca. 255 Tage in der Laktation. In der vorliegenden Studie wurde bei den Kühen im Laktationsstadium 3 (181–365 DIM) mit $9,7 \pm 5,5$ gesamt gewonnenen Embryonen das zweitschlechteste und mit $4,3 \pm 4,9$ transfertauglichen Embryonen das schlechteste Ergebnis beobachtet.

Die größte Anzahl und den größten Anteil degenerierter Embryonen und die größte Anzahl unbefruchteter Eizellen wies Bosselmann (2006) bei Spülungen von Kühen im frühen Laktationsstadium (0 bis 149 DIM) nach. Ähnliches beobachteten Hasler et al. (1983), wobei die besten Befruchtungsraten bei Tieren zwischen 151 und 300 DIM vorlagen. Diese Beobachtung konnte in der eigenen Studie nicht bestätigt werden. Die Laktationsstadien 1 und 2 wiesen numerisch den geringsten Anteil an degenerierten Embryonen und unbefruchteten Eizellen auf.

Der Einfluss der Parität bzw. der Anzahl der Laktationen der Donoren wird kontrovers diskutiert. In der vorliegenden Studie konnten die besten Ergebnisse mit durchschnittlich $17,3 \pm 1,7$ gesamt gewonnenen Embryonen und $9,3 \pm 6,5$ transfertauglichen Embryonen bei der Gruppe von Kühen in ihrer zweiten und dritten Laktation beobachtet werden. Diese Ergebnisse

stehen im Einklang mit denen der Dissertationen von Bosselmann (2006) und Wolgast (2009) erhobenen Ergebnissen, wobei die erfolgreichsten Embryonengewinnungen bei Tieren in der dritten Laktation verzeichnet wurden. Hupka (2000) beschrieb in ihrer Dissertation ähnliche Ergebnisse, wobei bei Spülungen von Multipara mehr Embryonen und Eizellen insgesamt und auch mehr taugliche Embryonen gewonnen werden konnten als bei Rindern und Erstlaktierenden. Konträre Ergebnisse beobachteten Bezdíček et al. (2015) sowie Lerner et al. (1986), die bei jungen Kühen die erfolgreichsten Embryonengewinnungen dokumentierten. Mit zunehmendem Alter der Kühe nahm sowohl die Gesamtzahl der gewonnenen als auch die Anzahl der transfertauglichen Embryonen ab.

Ebenfalls übereinstimmend mit den Ergebnissen von Bosselmann (2006) ist die Rate transfertauglicher Embryonen bei primiparen Kühen am größten und nimmt mit den Laktationen ab. Dabei sind die Unterschiede in der vorliegenden Studie mit $93,0 \pm 9,8 \%$ bei Embryonengewinnungen bei Primipara zu unter 56% in den Laktationsgruppen 2 und 3 deutlich jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$). Hupka (2000) hingegen verzeichnete keinen Unterschied in der Rate transfertauglicher Embryonen zwischen Primipara und Multipara ($61,0 \%$ vs. $61,1 \%$).

Lerner et al. (1986) und auch Malhi et al. (2007) stellten eine signifikante Abnahme der Befruchtungsrate bei der Superovulation mit steigendem Alter der Kühe fest. Auch Bosselmann (2006) beschrieb eine kontinuierliche Steigerung der Anzahl unbefruchteter Eizellen mit Zunahme der Laktationen. Diese Kontinuität konnte in der vorliegenden Studie nicht so eindeutig bestätigt werden. Während bei Spülungen bei Primipara mit $0,2 \pm 0,4$ unbefruchteten Eizellen ($1,2 \pm 2,9 \%$) numerisch deutlich bessere Ergebnisse erzielt wurden, setzt sich dies nicht kontinuierlich über die nächsten beiden Laktationsgruppen weiter fort. Embryonengewinnungen der Laktationsgruppe 2 wiesen sowohl in der Anzahl als auch in der Rate die höchsten Werte von $7,3 \pm 9,5$ bzw. über 40% unbefruchtete Eizellen auf. Die Ergebnisse der Laktationsgruppe 3 waren hingegen mit $3,5 \pm 3,1$ und $31,7 \pm 31,2 \%$ unbefruchteten Eizellen wieder besser. Die Vielzahl der Studien bestätigt die Hypothese, dass eine Alterung der Spenderkühe einen negativen Einfluss auf die Oozytenkompetenz und die Befruchtungsrate hat. Lediglich Hupka (2000) stellte keinerlei Unterschiede zwischen Primipara und Multipara fest.

Eine hohe Milchleistung von ≥ 40 kg Milch in der letzten MLP vor der Embryonengewinnung nahm in der vorliegenden Untersuchung keinen signifikanten Einfluss auf die Erfolgsparameter der Embryonengewinnung. Bosselmann (2006) konnte in seinen Untersuchungen ebenfalls keinen signifikanten Einfluss der Milchleistung auf die Anzahl und Rate transfertauglicher Embryonen sowie auf die Anzahl der degenerierten Embryonen nachweisen. Jedoch

beobachtete er, dass die Anzahl der gesamt gewonnenen Embryonen und Eizellen sowie die Anzahl der unbefruchteten Eizellen signifikant und kontinuierlich mit zunehmender Milchleistung abnahm. Die Anzahl transfertauglicher Embryonen sank tendenziell. Hasler et al. (1983) stellten eine Reduktion der Befruchtungsrate mit steigender Tagesmilchleistung fest. In der eigenen Studie konnte keine der Aussagen bestätigt werden, da keine Unterschiede im Anteil unbefruchteter Oozyten bei den Embryonengewinnungen von Kühen mit hoher oder niedriger Milchleistung (< 40 kg Milch: $21,6 \pm 32,0$ % vs. ≥ 40 kg Milch: $25,1 \pm 33,1$ %) beobachtet wurden.

In der vorliegenden Arbeit weicht der fehlende negative Einfluss der Milchleistung auf die Embryonengewinnung von den Erwartungen ab. In Studien an nicht-superovulierten Kühen zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der Produktion und der Reproduktion. So beobachteten Berger et al. (1981) und Faust et al. (1988), dass Tiere mit einer hohen Milchleistung später trächtig werden und mehr Besamungen bis zu einer erfolgreichen Konzeption benötigen. Heutzutage ist jedoch eine bessere leistungsorientierte Fütterung möglich. Die Relevanz einer angemessenen Fütterung für die Reproduktion hochleistender Milchkühe wird in der Übersichtsarbeit von Leroy et al. (2008) beleuchtet.

5.1.4.2 Körperkondition

Die Auswirkungen der Körperkondition (BCS) der Donoren auf die Embryonengewinnung und -qualität sind ein viel diskutiertes Thema. Die Bestimmung des BCS erfolgt häufig visuell, wobei die Ergebnisse aufgrund der unterschiedlichen Einschätzungen der Begutachter variieren können. Insbesondere bei kleineren Abstufungen von 0,25 kann es zu erheblichen Schwankungen zwischen den einzelnen Begutachtern kommen. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die Tiere in 0,5 BCS-Abstufungen klassifiziert. Die überwiegende Anzahl der Tiere wies einen optimalen BCS zwischen 2,5 und 3,0 auf. Ein Tier wies eine geringfügige Überkonditionierung auf und wurde mit einem BCS von 4,0 eingestuft. Dies steht im Gegensatz zu anderen Studien (Kubovičová et al., 2013; Makarevich et al., 2016), die auch deutlich unterkonditionierte Donoren (bis BCS 1,75) sowie deutlich überkonditionierte Tiere (bis BCS 5,0) analysierten. Dies ist auf das Studiendesign der eigenen Untersuchung zurückzuführen. Die Donoren dieser Studie wurden im Rahmen des kommerziellen Embryotransferprogramms des VOST genutzt. Dabei hatten die Landwirte ein wirtschaftliches wie züchterisches Interesse, eine möglichst hohe Anzahl qualitativ hochwertiger Embryonen zu gewinnen. In der Konsequenz werden die Tiere von den Landwirten vorselektiert, die visuell einen optimalen Gesundheitszustand aufweisen. Es konnten in der vorliegenden Untersuchung keine signifikanten Unterschiede in der Embryonengewinnung oder den Raten

an transfertauglichen Embryonen und unbefruchteten Eizellen zwischen den Tieren mit einem BCS von 2,5 und 3,0 festgestellt werden. Bezdíček et al. (2015) beschrieb den optimalen BCS einer Donorenkuh bei 3,0 bis 3,5. Kubovičová et al. (2013) hingegen beobachteten die beste Embryonenausbeute bei Kühen mit einem BCS von 2,5 bis 3,25, während die meisten transfertauglichen Embryonen bei Kühen mit höheren BCS (3,5–4,0) gewonnen wurden. Ähnliche Ergebnisse wurden von Makarevich et al. (2016) berichtet, die eine abnehmende Qualität der Embryonen bei Tieren mit einem BCS von 2,0 oder 4,0 erfassten. Kadokawa et al. (2008) beschrieben eine abnehmende Anzahl Embryonen erster Qualität ab einem BCS von 3,5.

5.1.4.3 Eutergesundheit

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von erhöhten somatischen Zellen (> 100.000 Zellen/ml) in der Milch untersucht, was mit einer eingeschränkten Eutergesundheit assoziiert wird (Hoedemaker et al., 2014). Die Ergebnisse zeigten, dass Donoren mit eingeschränkter Eutergesundheit auf die Superovulation ähnlich gut reagierten (gesamt gewonnene Embryonen und Eizellen $13,3 \pm 13,6$) wie eutergesunde Tiere ($11,2 \pm 8,3$). Allerdings war der Anteil transfertauglicher Embryonen bei Tieren mit subklinischer oder chronischer Mastitis um 20 %-Punkte reduziert, während der Anteil unbefruchteter Eizellen um über 19 %-Punkte erhöht war ($p > 0,05$). Der Anteil degenerierter Embryonen war gleich. Dies deutet auf eine beeinträchtigte Befruchtung bei Tieren mit eingeschränkter Eutergesundheit hin. Vergleichbare Untersuchungen bei superstimulierten Tieren sind nicht bekannt. Es konnte jedoch in zahlreichen Studien an nicht stimulierten Kühen ein negativer Einfluss einer klinischen und subklinischen Mastitis auf die Reproduktionsleistung festgestellt werden. Eine Mastitis um den Zeitpunkt der künstlichen Besamung führt zu einer verlängerten Rastzeit und einem erhöhten Besamungsindex (Barker et al., 1998; Schrick et al., 2001). Darüber hinaus wurde eine schlechtere Konzeptionsrate (Hertl et al., 2010) sowie ein höheres Risiko von embryonaler Mortalität bzw. Aborten in den ersten 45 Tagen (Risco et al., 1999) beobachtet. Barker et al. (1998) stellten fest, dass eine Mastitis nach Feststellung der Trächtigkeit (ca. Tag 50–60) einen geringeren Einfluss auf die Trächtigkeitsrate hatte als eine Mastitis um den Besamungszeitpunkt. Dies lässt den Schluss zu, dass insbesondere die Follikel- und frühe Embryogenese sowie die Befruchtung gegenüber einer Mastitis empfindlich sind. In ihrer Übersichtsarbeit beleuchten Sharma et al. (2017) die physiologischen Grundlagen, wobei sich zusammenfassen lässt, dass ein, durch eine Mastitis bedingter, systemischer Anstieg an Entzündungsmediatoren und Endotoxinen unter anderem die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse stört. So stellten Hockett et al. (2005) fest, dass Tiere mit einer klinischen

Mastitis eine reduzierte LH-Pulsatilität, ein Ausbleiben des LH-Peaks sowie der äußeren Brunst und der Ovulation aufweisen können. In der eigenen Studie wurde keine verminderte Anzahl an Ovulationen der Tiere mit gestörter Eutergesundheit festgestellt. Dies könnte, wie in Kapitel 5.1.3 erläutert, auf eine Übersteuerung der negativen Effekte durch die Superovulation zurückzuführen sein. Die erhöhte Rate unbefruchteter Eizellen weist, auch wenn sie nicht signifikant ist, auf eine schlechtere Konzeptionsrate hin. Untersuchungen beim Transfer von Embryonen ergaben, dass eine Mastitis beim Rezipienten zum Zeitpunkt des Transfers die Trächtigkeitsrate signifikant reduziert (Barbosa et al., 2018).

5.1.4.4 Verwendete Spermaportionen

Die Verwendung von sortiertem Sperma in Verbindung mit der Superovulation ist kommerziell sehr attraktiv, weshalb in der vorliegenden Studie 10 von 19 Tieren auf Wunsch der Besitzer mit X-sortiertem Sperma künstlich besamt wurden. Konventionelles Sperma wurde zweimal in einer Dosis von je 20 Millionen Spermien und X-sortiertes Sperma ebenfalls zweimal in einer Dosis von je 6,3 oder 8 Millionen Gesamtspermien verwendet. Bei Spülungen nach Verwendung mit X-sortiertem Sperma konnten eine nicht signifikant um 11 %-Punkte verminderte Rate transfertaugliche Embryonen und eine um 16,3 %-Punkte erhöhte Rate unbefruchteter Eizellen beobachtet werden. Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Verwendung von X-sortiertem Sperma zu einer Reduktion der Befruchtungsraten führt. Ähnliches beschrieben Sartori et al. (2004) und Schenk et al. (2006), wobei in deren Studien sich die Reduktion der Befruchtungsrate sogar auf mindestens 20 % beläuft. Schenk et al. (2006) erfassten eine Reduktion der Anzahl transfertauglicher Embryonen bei einer Dosis von zweimal 2 oder 10 Millionen sortierten Spermien. Dies wurde auch in der eigenen Studie beobachtet, wobei anzumerken ist, dass die Gesamtzahl der gewonnenen Embryonen und Eizellen in der Gruppe mit X-sortiertem Sperma ebenfalls reduziert war.

Während in den Untersuchungen von Sartori et al. (2004) sowie Mikkola und Taponen (2017b) eine vermehrte Anzahl degenerierter Embryonen dokumentiert wurde, war dies in der eigenen Studie wie auch in den Studien von Schenk et al. (2006) und Peippo et al. (2009) nicht der Fall. Allerdings wurde in der eigenen Studie eine tendenzielle Abnahme ($p < 0,08$) der Anzahl an Embryonen erster Qualität beobachtet. Diese Reduktion stellte sich im prozentualen Anteil an Embryonen erster Qualität mit deutlichen 19 %-Punkten dar, was jedoch nicht signifikant war. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Studien von Mikkola und Taponen (2017b) sowie Hayakawa et al. (2009) überein.

Die geringgradig schlechteren Ergebnisse nach Besamungen mit X-sortiertem Sperma sind vermutlich auf den Sexing-Prozess und den daraus folgenden Schädigungen der Spermien zurückzuführen. Bei sortierten Spermien ist sowohl die Anheftung an das Oviduktepithel beeinträchtigt als auch die funktionelle Qualität vermindert, was sich in einer reduzierten Motilität, einem verringerten mitochondrialen Membranpotential, einer eingeschränkten Plasmamembranstabilität sowie in einem geringeren Anteil vitaler Spermien mit intaktem Akrosom widerspiegelt (Carvalho et al., 2018). Ein zusätzlicher einschränkender Faktor ist, dass aufgrund hoher Kosten für sortiertes Sperma meist eine geringere Konzentration von sortiertem Sperma verwendet wird. Dies war auch in der eigenen Arbeit der Fall, wobei Besamungen mit konventionellem Sperma mit einer 2,5- bis 3,2-fachen Konzentration durchgeführt wurden als Besamungen mit X-sortiertem Sperma. Schenk et al. (2006) vermuteten, dass wiederholte Besamungen mit hohen Spermiodosen von ebenfalls mindestens 20 Millionen sortierten Spermien bei superovulierten Tieren zu vergleichbaren Befruchtungsraten und Raten transfertauglicher Embryonen führen können. Diesbezüglich wäre eine Studie, in der Besamungen mit einer so hohen Dosis an X-sortierten Spermien durchgeführt werden, von Interesse.

5.1.4.5 Rückgewinnung, Trübung und Blutbeimengung der Spülflüssigkeit

Die im Rahmen der Embryonengewinnungen erhobenen Parameter der Rückgewinnung, Trübung und Blutbeimengung der Spülflüssigkeit wurden für jedes gespülte Horn ausgewertet. Dies erfolgte in Anlehnung an Wolgast (2009). Im Unterschied zur vorliegenden Studie wurden dort jedoch lediglich 400 ml anstelle von 600 ml pro Uterushorn verwendet. Wolgast (2009) beschrieb eine nicht signifikante Reduktion von durchschnittlich 2,3 gesamt gewonnenen Embryonen und Eizellen. Dies konnte in der eigenen Arbeit bei der Analyse der linken Uterushörner mit einer nicht signifikanten Reduktion um durchschnittlich 2,3 Embryonen und Eizellen bei reduzierter Rückgewinnung der Spülflüssigkeit ebenfalls beobachtet werden. Dieser Unterschied wird bei den Spülungen der rechten Uterushörner jedoch nicht deutlich. Während Wolgast (2009) annähernd gleiche Raten an tauglichen Embryonen bei vollständiger oder verminderter Rückgewinnung feststellte, belief sich dies in der eigenen Studie bei den linken Uterushörnern sogar auf eine bessere und bei den rechten Uterushörnern ebenfalls auf eine gleichbleibende Rate an tauglichen Embryonen bei verminderter Rückgewinnung. Die Ergebnisse der beiden Studien legen nahe, dass die Rückgewinnung keinen negativen Einfluss auf die Rate tauglicher Embryonen ausübt.

Wolgast (2009) beobachtete ab einer mgr. Trübung und Blutbeimengung (Grad 3) einen Rückgang der durchschnittlichen Anzahl der gesamt gewonnenen Embryonen und Eizellen

sowie transfertauglichen Embryonen. Aufgrund der Anzahl der gespülten Uterushörner wurden in der eigenen Studie die Trübungsgrade 2 und 3 und die Blutbeimengungsgrade 0 und 1 sowie 2 bis 4 gemeinsam ausgewertet. In der eigenen Studie stellten sich die Einflüsse der Trübung und Blutbeimengung uneinheitlich dar. Die beiden Faktoren Trübung und Blutbeimengung schienen miteinander zu korrelieren, da in 31 der 34 untersuchten Uterushörner ein übereinstimmender Befund der beiden Faktoren vorlag. Es wird jedoch kein eindeutiger Einfluss auf die Erfolgsparameter der Embryonengewinnung ersichtlich. Die Gesamtanzahl gewonnener Embryonen und Eizellen unterschied sich weder bei Spülungen der linken oder rechten Uterushörner noch zwischen den Graden der Blutbeimengung sowie Trübung der Spülflüssigkeit.

Sowohl in der Auswertung der Trübung als auch in der Auswertung der Blutbeimengung der rechten Uterushörner stellte sich eine tendenziell negative Korrelation zwischen einem erhöhten Grad und dem prozentualen Anteil Embryonen erster Qualität dar. Jedoch konnte dies bei beiden Einflussfaktoren bei der Auswertung der linken Uterushörner nicht signifikant bestätigt werden.

Der Einfluss der Trübung und Blutbeimengung auf die Anzahl und Rate unbefruchteter Eizellen stellt sich bei den linken und rechten Uterushörnern konträr dar. Entgegen der Erwartung zeigten sich bei Embryonengewinnungen der linken Uterushörner bei einer Trübung der Kategorie 1 eine tendenziell erhöhte Anzahl ($p < 0,07$) und eine signifikant höhere Rate von $50,5 \pm 46,9\%$ zu $12,5 \pm 33,1\%$ (Kategorie 2) an unbefruchteten Oozyten ($p < 0,02$). Ebenfalls bei geringeren Blutbeimengungen wurden 16,6 %-Punkte mehr unbefruchtete Eizellen ($p > 0,05$) gespült. Bei den Spülungen der rechten Uterushörner konnte der umgekehrte Effekt beobachtet werden. Bei der Analyse der Embryonengewinnungen der rechten Uterushörner wurde eine erhöhte Anzahl unbefruchteter Eizellen bei erhöhtem Trübungs- sowie Blutbeimengungsgrad festgestellt.

Die Auswertung der degenerierten Embryonen ergab wiederum andere Ergebnisse. Bei Spülungen der rechten Uterushörner konnten numerisch mehr degenerierte Embryonen und tendenziell höhere Anteile ($p < 0,1$) degenerierter Embryonen bei geringerer Trübung beobachtet werden. Spülungen der linken Uterushörner ergaben hingegen schlechtere Ergebnisse hinsichtlich der Anzahl und Rate degenerierter Embryonen bei stärkerer Trübung der Spülflüssigkeit. Bei einer geringeren Blutbeimengung konnte sowohl bei Spülungen der linken wie auch der rechten Hörner eine erhöhte Anzahl und Rate degenerierter Embryonen verzeichnet werden.

Schlussendlich ist festzuhalten, dass innerhalb der vorliegenden Studie die negativen Einflüsse auf die Erfolgsparameter der Embryonengewinnung bei steigender Trübung und

Blutbeimengungen der Spülflüssigkeit, wie in der Dissertation von Wolgast (2009) beschrieben, nicht bestätigt werden konnten. Dies könnte auf das in der eigenen Arbeit eingesetzte höhere Spülvolumen zurückzuführen sein, das möglicherweise zu einem Verdünnungseffekt geführt hat. Die visuelle Bewertung der Trübung und Blutbeimengung erlaubt daher keinen zuverlässigen Rückschluss auf die Ausbeute sowie die Qualität der gewonnenen Embryonen.

5.2 Studie 2 – Vergleichende Betrachtung des Uterusmikrobioms in den Hornspitzen und im Corpus uteri an neun Schlachtkühen

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, ein eingehenderes Verständnis über das Vorkommen von insbesondere Milchsäurebakterien (LAB) und dem allgemeinen Keimgehalt im Uterus von Rindern zu erlangen. Des Weiteren wurde eine vergleichende Betrachtung des uterinen Mikrobioms im linken und rechten Uterushorn sowie im Uteruskörper durchgeführt. In einer Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten wird die uterine Mikrobiota mittels Cytobrush-Probe (Gärtner et al., 2015; Pascottini et al., 2020; Risvanli et al., 2022) oder durch Spülungen (Machado et al., 2012; Wang et al., 2018a) im Corpus uteri bestimmt. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, ob eine Probe des Gebärmutterkörpers stellvertretend für das gesamte Uterusmikrobiom entnommen werden kann. In Bezug auf die in Studie 1 gewonnenen Spülproben aus den Uterushornspitzen ist dies von besonderem Interesse, da in diesen Untersuchungen weniger Bakterien der Gattung *Lactobacillus*, nachgewiesen werden konnten als in der Studie von Gärtner et al. (2015) mit gleicher Kultivierungsmethode, jedoch bei Beprobung aus dem Uteruskörper.

In der vorliegenden Studie konnten keine qualitativen Unterschiede in der bakteriellen Mikroflora zwischen den drei untersuchten Lokalisationen festgestellt werden. Die mikrobielle Besiedlung der neun untersuchten Schlachttorgane wies in den Uterushörnern und dem Uteruskörper keine Unterschiede auf. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten von Lietaer et al. (2021). Im Rahmen der von Lietaer et al. (2021) durchgeführten Untersuchungen wurden die Spitze und die Basis der beiden Uterushörner von fünf Milchkühen nach der Schlachtung beprobt. Nach Eröffnung des Uterus mittels eines Skalpellschnitts wurden an den vier Lokalisationen Tupferproben entnommen. Zusätzlich wurde die Vagina beprobt. Im Gegensatz dazu erfolgte die Beprobung in der vorliegenden Arbeit mittels Spülung der Uterushörner bzw. des Uteruskörpers mit anschließender mikrobieller Untersuchung der Spülflüssigkeit. Der bakterielle Keimgehalt wurde bei Lietaer et al. (2021) mittels 16S rRNA-Analyse untersucht. Im Gegensatz zur Anzuchtmethode der eigenen Studie erlaubt die 16S rRNA-Analyse eine bessere quantitative Analyse der Mikroflora wie in Kapitel 5.1.1 dargelegt. Allerdings werden sowohl lebende als auch tote Bakterien nachgewiesen. Lietaer et al. (2021) beobachteten ebenso wie in der vorliegenden Untersuchung keine Unterschiede in der bakteriellen Mikroflora wie auch der bakteriellen DNA-Quantität zwischen den verschiedenen Lokalisationen im Uterus. Jedoch stellten sie eine unterschiedliche bakterielle Komposition zwischen den vaginalen und uterinen Proben fest. Da eine Kontamination der Vagina während der Schlachtroutine und der Probenentnahme in der eigenen Untersuchung nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde auf die Entnahme einer vaginalen Probe verzichtet. Weitere vergleichende Untersuchungen der Mikroflora an

verschiedenen Lokalisationen im Rinderuterus sind bisher nicht bekannt. Die Ergebnisse der eigenen Studie 2 und von Lietaer et al. (2021) stehen im Kontrast zu den in der Studie 1 erhobenen Daten. Dort konnte in lediglich einem Tier eine identische Keimbeseidlung (*E. coli*) in beiden Uterushörnern beobachtet werden. Insgesamt 7 von 19 Tieren wiesen eine Übereinstimmung im Mikrobiom mit wenigstens einer Bakterienart auf und 8 von 19 Tieren eine Übereinstimmung der gleichen Bakteriengattung im linken und rechten Uterushorn. Eine Beprobung des Uteruskörpers wurde nicht durchgeführt. Die hier abweichenden Befunde können auf die in Studie 1 verwendeten Spezialagarn zurückzuführen sein. In der Studie 2 wurde die Untersuchung der Bakterien allgemeiner gehalten, wobei die Labore u. a. coliforme Keime und laktatbildende Bakterien nicht weiter klassifizierten und keine Bestimmung der Bakterienart erfolgte. Die Ergebnisse der Studie 2 sowie die Ergebnisse von Lietaer et al. (2021) erscheinen plausibel, da die Gebärmutter ein Organ ohne weitere Kompartimentierung ist. Infolgedessen ist ein Austausch der Bakterien des linken und rechten Uterushorns über den Uteruskörper ungehindert möglich. Es ist jedoch beim *Uterus bicornis* des Rindes zu beachten, dass Kühe einen verhältnismäßig kurzen Uteruskörper (ca. 3 cm) und lange Uterushörner (ca. 30 cm) aufweisen und somit eine große Distanz zwischen den beiden Uterushornspitzen vorliegt (Nickel et al., 2004). Anhand der vorliegenden eigenen Ergebnisse sowie der Ergebnisse von Lietaer et al. (2021) lässt sich ableiten, dass eine alleinige Beprobung des Uteruskörpers ausreichend ist, um eine stellvertretende Einschätzung des Mikrobioms im gesamten Uterus zu erlangen.

Demgegenüber stellt die Zervix eine funktionelle Kompartimentierung des weiblichen Reproduktionstraktes der Rinder dar. Lietaer et al. (2021) konnten bei fünf untersuchten Schlachtkühen ein abweichendes Mikrobiom in der Vagina und im Uterus feststellen. Ebenfalls konnten Kronfeld et al. (2022) bei Rindern und Moreno et al. (2016) bei Frauen teilweise Unterschiede im vaginalen und uterinen Milieu beobachten. In einigen Fällen korrelierte die vaginale und uterine Mikrobiota jedoch miteinander (Kronfeld et al., 2022; Moreno et al., 2016). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich zum Zeitpunkt der Geburt die Zervix zur Austreibung des Fötus öffnet und ein Eindringen von Keimen aus der Vagina und der Umgebung nicht verhindert werden kann (Bromfield et al., 2015; Sheldon et al., 2002a, 2002b). Ebenso während des Östrus ist das Aufsteigen vaginaler Bakterien in den Uterus über eine geöffnete Zervix denkbar, insbesondere im Zusammenhang mit assistierter Reproduktionsmedizin wie der künstlichen Besamung (Baker et al., 2018).

In der vorliegenden Studie lag bei einem vergleichbaren Anteil an Kühen eine negative Bakterienkultur im Corpus uteri vor wie in anderen Studien (Gärtner et al., 2015; Risvanli et al., 2022). In den Untersuchungen an lebenden Kühen von Gärtner et al. (2015) waren nach Beprobung im Uteruskörper die Bakterienkultur bei 2 von 11 Tieren (18,2 %) negativ. In den

Untersuchungen von Risvanli et al. (2022) an 490 Gebärmuttern von Schlachtkühen waren die Kulturen von 23,9 % der Tiere mit Metritis und 23,2 % der Tiere ohne Metritis negativ. In der eigenen Studie wurden 2 von 9 (22,2 %) untersuchten *Corpora uteri* keimfrei klassifiziert. In der Gesamtbetrachtung in der keimfreie und ggr. unspezifisch bakteriell besiedelte Nachweise zusammengefasst wurden, beläuft sich der Anteil auf 55,6 %. In den Untersuchungen von Risvanli et al. (2022) war bei Tieren ohne Anzeichen von Metritis mit positiven Bakteriennachweis zu 50,0 % nur ein Bakterium, zu 29,3 % zwei, zu 17,0 % drei und zu 3,7 % vier oder mehr Bakterienarten zu isolieren. In der vorliegenden Studie konnten in 4 von 9 Uteri positive Bakterienbefunde nachgewiesen werden. In 75 % davon konnte lediglich ein Nachweis erbracht werden. Aus den Spülproben eines Uterus konnten drei bakterielle Nachweise differenziert werden. Somit wurde in der eigenen Untersuchung eine ähnliche jedoch stärkere Tendenz als bei Risvanli et al. (2022) zu nur mit einer Bakterienart besiedelten Uteri wahrgenommen. Es ist zu vermuten, dass die stärkere Tendenz auf die deutlich geringere Stückzahl im eigenen Versuch zurückzuführen ist. Der Anteil der Kühe mit Nachweisen von Milchsäurebakterien ist in der eigenen Untersuchung geringer als in den Untersuchungen von Gärtner et al. (2015). Während Gärtner et al. (2015) in 6 von 11 (54,5 %) untersuchten Tieren Bakterien der Familie *Lactobacillaceae* nachwiesen, belief sich dies auf 33,3 % Nachweise (3 von 9) der Ordnung *Lactobacillales* (LAB, Milchsäurebakterien) in der vorliegenden Untersuchung (Studie 2). In der Studie 1 dieser Arbeit konnten in 42,1 % der untersuchten Uteri LAB bzw. ebenfalls 42,1 % der Uteri Bakterien der Familie *Lactobacillaceae* nachgewiesen werden. Die prozentualen Ergebnisse der Studie 1, in der im Vergleich der drei Untersuchungen die meisten Tiere untersucht wurden, liegen somit in der Mitte zwischen den Ergebnissen von Gärtner et al. (2015) und der Studie 2. Die Gattung *Lactobacillus* konnte in der Studie von Gärtner et al. (2015) in 45,5 %, in der Studie 1 dieser Arbeit in 26,3 % und in der Studie 2 kein einziges Mal isoliert werden. Machado et al. (2012) stellten mittels 16S rRNA-Analyse eine signifikant geringere Prävalenz des Genus *Lactobacillus* in 20 % bei Tieren mit starker Endometritis zu 50 % bzw. 41 % der Kühe mit milder oder keiner Endometritis dar. Diese verschiedenen Studien legen nahe, dass die Präsenz von Bakterien der Gattung *Lactobacillus* stark variieren kann. Milchsäurebakterien waren über die verschiedenen Untersuchungen hinweg bei gesunden Kühen in 33–55 % der Kühe nachweisbar.

Die Hypothese, dass Kühe, deren letzte Geburt nicht lange zurückliegt und die einen asymmetrischen Uterus aufweisen, ein potenziell durch die Geburt bedingtes ungleiches Mikrobiom in den Uterushörnern aufweisen, konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Untersuchungen von Sheldon et al. (2002a) zeigen, dass das gravide Horn auch 28 Tage post partum noch größer ist als das nicht gravide Horn. Während der Gravidität durchläuft das

Fötus-tragende Horn zunehmend morphologische Veränderungen (Albers et al., 2015; Reynolds et al., 1990; Zheng et al., 1996). Eine Studie an graviden equinen Uteri hat ergeben, dass sich die vorkommenden bakteriellen Phyla im graviden und nicht graviden Uterushorn erheblich überschneiden. Dennoch sind diese nicht identisch, was auf verschiedene Kompartimentierungen des Chorioallantois schließen lässt (Xia et al., 2017). In der vorliegenden Untersuchung konnten jedoch, entgegen den Erwartungen, keine Unterschiede der qualitativen Bakteriennachweise in den Uterushörnern von asymmetrischen Uteri beobachtet werden. Einzig ein Uterus wies im kleineren Uterushorn einen Nachweis von Hefen auf, während dies im größeren Uterushorn nicht der Fall war.

Eine Vielzahl von Studien widmet sich der Erforschung des bakteriellen Mikrobioms im Reproduktionstrakt von Kühen. Die Besiedlung durch Pilze wurde in diesem Zusammenhang bislang jedoch nur unzureichend erforscht. Pilze sind in der Umwelt weit verbreitet, wobei insbesondere pflanzliche Futtermittel natürlicherweise mit Hefen belastet sind. Es wird angenommen, dass die Pilze oder Hefen, die den Uterus besiedeln, in der Regel aus einem Reservoir in der Vagina und den äußeren Genitalien stammen und während der Insemination oder intrauterinen Behandlung iatrogen in den Uterus getragen werden (Dascanio et al., 2001). Pilze, die die Reproduktion stören, werden in der Fachliteratur als opportunistische Pathogene bezeichnet und benötigen prädisponierende Faktoren, um eine Infektion auszulösen (Dascanio et al., 2001; Saini et al., 2019). In verschiedenen Studien an Kühen und Büffeln konnten in 10,4 bis 28,6 % der Fälle mit gestörter Reproduktion wie einer Endometritis, Zervizitis, Vaginitis oder nach einem Abort Pilze im Genitaltrakt festgestellt werden (Garoussi et al., 2007; Saini et al., 2019; Verma et al., 1999). Garoussi et al. (2007) stellten jedoch ein ebenso häufiges Vorkommen von Pilzen in der Cervix und Vagina von tragenden und nicht tragenden, gesunden Milchkühen fest. In 2 von 9 untersuchten Uteri (22,2 %) der vorliegenden Studie 2 konnten Hefen nachgewiesen werden, wobei kein Zusammenhang mit der Uterusgesundheit untersucht wurde. Die Hefen ließen sich im Gegensatz zu besiedelnden Bakterien nicht im gesamten Uterus nachweisen. Schimmelpilze konnten in keinem der neun untersuchten Uteri nachgewiesen werden. Die Präsenz von *Candida kefyr* in der Gebärmutter führt zu einer milden, nicht eitrigen Inflammation des Endometriums (Karstrup et al., 2017). Ebenfalls bei Stuten sind Endometritiden aufgrund einer Candidose beschrieben (Pugh et al., 1986).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass keine Unterschiede in der bakteriellen Besiedlung zwischen den drei untersuchten Lokalisationen im Uterus (Corpus uteri, linkes Uterushorn, rechtes Uterushorn) feststellbar waren. Eine Besiedlung mit LAB lag in 33,3 % der untersuchten Uteri vor, was eine geringere Prävalenz im Vergleich zu anderen Studien aufzeigt.

6 Zusammenfassung

Alexandra Krebbers

Einfluss des Uterusmikrobioms auf in vivo gewonnene Rinderembryonen

Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte das uterine Mikrobiom am Tag der Embryonengewinnung und dessen Einfluss auf die Qualität in vivo gewonnener Rinderembryonen untersucht werden. Es sind zahlreiche Einflussfaktoren auf den Erfolg der In-vivo-Embryonengewinnung bekannt, die sich jedoch zumeist auf die Follikulogenese und die Ovulationen auswirken. Bislang existieren nur wenige Erkenntnisse zu uterinen Einflussfaktoren. Auch das Mikrobiom in der Uterushornspitze und seine mögliche Rolle während der frühen Embryogenese sind bislang kaum erforscht.

Ziel der **ersten Untersuchung** war es, den Einfluss der mikrobiellen Besiedlung der Uterushornspitzen auf die Embryonenqualität in vivo gewonnener Rinderembryonen zu analysieren. Insbesondere der Einfluss des *Lactobacillus buchneri* war von besonderem Interesse. Dafür wurden 19 Embryonengewinnungen untersucht, die im Rahmen eines kommerziellen Embryotransferprogramms im Zuchtgebiet des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter im Zeitraum von Mai 2021 bis Juli 2022 unter Verwendung des Präparats Pluset® stattfanden. Die Spülung jedes Uterushorn erfolgte separat mit neuem Material mit jeweils 600 ml Spülmedium (EmXcell embryo flushing medium®). Für die mikrobiologische Untersuchung wurden 10 ml aus den ersten 60 ml des zurückgewonnenen und gefilterten Spülmediums sowie 10 ml des Filterüberstandes entnommen. Die Klassifizierung der Embryonen erfolgte nach den Kriterien der IETS (International Embryo Technology Society). Die zurückgewonnene Spülflüssigkeit wurde gemessen und ihre Trübung sowie Blutbeimengung beurteilt. Im Labor folgte jeweils eine Kultivierung jeder Probe auf/in vier verschiedenen Medien bei zwei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen. Jede Probe wurde sowohl mikroaerophil als auch aerob direkt auf Rogosa-SL-Agar und MRS-Agar ausgestrichen sowie in Rogosa-SL- und MRS-Bouillon vorkultiviert, wodurch pro Tier 32 Untersuchungsdurchgänge angesetzt wurden. Spülproben der letzten neun Versuchskühe wurden zusätzlich auf einen allgemeinen Keimgehalt hin auf Columbia-, Gassner-, Sabouraud- und YGC-Agar untersucht. Anhand einer Literaturrecherche erfolgte die Klassifizierung der nachgewiesenen Bakterien in drei Kategorien: „potenziell pathogen“, „potenziell probiotisch“, Kommensale. Die Einteilung des Uterusmikrobioms der Uterushörner erfolgte entsprechend dieser Bakterienkategorien in „potenziell pathogen“ (PATH), „potenziell probiotisch“ (PROB) und gemischt (MIX). Die Ergebnisse der Embryonengewinnungen pro Horn wurden in Abhängigkeit zum Uterusmikrobiom analysiert. Weiterhin wurde ausgewertet inwiefern sich

das Laktationsstadium, die Milchleistung, die Parität, die Körperkondition, die Eutergesundheit der Donoren sowie das eingesetzte Sperma auf die Embryonenqualität auswirken.

Des Weiteren erfolgte eine Analyse der Rückgewinnung, Trübung und Blutbeimengung der Spülflüssigkeit der Hornspülungen.

Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

1. Es konnten insgesamt 66 mikrobiologische Nachweise erbracht werden. Die Bakteriengattungen *Staphylococcus* mit 12, *Escherichia* mit 10 und *Lactobacillus* mit 8 Nachweisen waren die am stärksten vertretenen Bakteriengattungen. Die am häufigsten nachgewiesene Bakterienart war *E. coli*.
2. *Lactobacillus buchneri* wurde lediglich aus 3 von 38 untersuchten Uterushörnern in zwei Donoren isoliert. Diese Laktobazillenart ist also nur selten im Uterus von Milchkühen ≥ 83 DIM nachzuweisen. Neben *L. buchneri* konnten die Laktobazillen *L. parabuchneri*, *L. sakei* und *L. plantarum* nachgewiesen werden. Die Ordnung *Lactobacillales* (Milchsäurebakterien, LAB) konnte in 8 von 19 Uteri (42,1 %) isoliert werden.
3. Die mikrobiologischen Nachweise waren zu 54,5 % von potenziell pathogenen und zu 37,9 % von potenziell probiotischen Bakterien. Das Mikrobiom der 38 untersuchten Uterushörner stellte sich wie folgt dar: 39,5 % PATH, 28,9 % PROB, 26,3 % MIX, 5,3 % KOM. Dreizehn von 19 Uteri wiesen eine Besiedlung in mindestens einem Horn mit probiotischen Keimen auf.
4. Im Durchschnitt konnten $11,9 \pm 9,9$ gesamt gewonnene Embryonen und Eizellen pro Uterus und $5,9 \pm 5,3$ pro Uterushorn gewonnen werden. Die durchschnittliche Anzahl und Rate transfertauglicher Embryonen belief sich pro Uterus auf $7,3 \pm 7,0$ bzw. $65,4 \pm 31,5$ % und pro Uterushorn auf $3,6 \pm 3,8$ bzw. $63,0 \pm 34,6$ %. Die Rate unbefruchteter Eizellen lag pro Uterus und Uterushorn bei ca. 24 %.
5. Das Uterusmikrobiom nahm keinen signifikanten Einfluss auf die Qualität in vivo gewonnener Rinderembryonen pro Hornspülung (links oder rechts). Hinsichtlich der Gesamtzahl an Embryonen und Eizellen sowie der Anzahl und Rate der transfertauglichen Embryonen, der Embryonen erster Qualität und der degenerierten Embryonen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den mikrobiellen Kategorien PATH, PROB und MIX. Ebenso bestand in der Anzahl und Rate der unbefruchteten Eizellen als Indikator für die Befruchtungsrate kein signifikanter Unterschied zwischen den mikrobiellen Kategorien.

6. Das Laktationsstadium, die Milchleistung, die Körperkondition und die Eutergesundheit nahmen keinen signifikanten Einfluss auf die Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen. Bei Spülungen von Primipara konnte tendenziell ($p = 0,07$) ein größerer Anteil transfertauglicher Embryonen gewonnen werden. Bei Embryonengewinnungen von Kühen, die mit konventionellem Sperma besamt wurden, konnten tendenziell ($p < 0,08$) mehr Embryonen erster Qualität beobachtet werden.
7. Die Rückgewinnung der Spülflüssigkeit nimmt keinen signifikanten Einfluss auf die untersuchten Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen pro Horn (links oder rechts). Auch zwischen dem Trübungsgrad der Spülflüssigkeit sowie dem Grad der Blutbeimengung zu der Embryonenqualität bestand kein eindeutig signifikanter Zusammenhang, wenngleich seitenabhängige Tendenzen erkennbar waren. Bei Spülungen der rechten Uterushörner zeigte sich eine tendenziell negative Korrelation zwischen einer leichten bis mittelgradigen Trübung (Kategorie 2) sowie einer leicht bis starken Blutbeimengung (Kategorie 2) und dem Anteil an Embryonen erster Qualität (jeweils $p < 0,06$) sowie bei dem Trübungsgrad 1 und der Blutbeimengung Kategorie 1 ein tendenziell höherer Anteil degenerierter Embryonen (jeweils $p < 0,1$). Beide Zusammenhänge konnten bei der Auswertung der Spülungen der linken Uterushörner nicht bestätigt werden. Demgegenüber konnte bei Spülungen der linken Uterushörner bei einer Trübung Kategorie 1 eine tendenziell höhere Anzahl ($p < 0,07$) und eine signifikant höhere Rate ($p < 0,02$) unbefruchteter Eizellen beobachtet werden. Dies konnte wiederum bei der Auswertung der rechten Uterushörner nicht bestätigt werden. Die Faktoren Trübung und Blutbeimengung scheinen miteinander zu korrelieren. In 31 der 34 untersuchten Uterushörner lag ein übereinstimmender Befund der beiden Faktoren vor.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass keine nachteilige oder förderliche Beeinflussung durch ein potenziell probiotisches, potenziell pathogenes oder gemischtes Uterusmikrobiom auf die Qualität in vivo gewonnener Rinderembryonen vorliegt. *Lactobacillus buchneri* konnte zu selten aus dem Uterus von Kühen am Tag der Embryonengewinnung nachgewiesen werden, um einen Effekt dieses Bakterienstamms auf die Embryonenqualität zu ermitteln.

Die Zielsetzung der **zweiten Untersuchung** bestand in einer vergleichenden Analyse des Mikrobioms an drei verschiedenen Lokalisationen im Uterus. Zu diesem Zweck wurden die Uteri von neun Schlachtkühen im Corpus uteri und sowohl im linken und rechten Uterushorn mikrobiologisch untersucht. Dafür wurde das Corpus uteri und die kranialen Anteile (ab dem höchsten Punkt der Kurvatur) der linken und rechten Uterushörner mit einem Skalpellschnitt

eröffnet und mit je bis zu 30 ml Spülflüssigkeit (EmXcell embryo flushing medium®) gespült. Die zurückgewonnene Spülflüssigkeit wurde zum Nachweis Laktat bildender Bakterien (LAB) auf einem MRS-Agar untersucht. Zusätzlich wurde die Spülflüssigkeit auf den allgemeinen Bakteriengehalt auf Columbia-, Gassner-, Sabouraud- und YGC-Agar analysiert.

Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

8. Sieben der 27 untersuchten Proben waren in der mikrobiologischen Untersuchung keimfrei (3x linkes Uterushorn, 2x rechtes Uterushorn, 2x Uteruskörper) von insgesamt 4 Kühen. Weitere acht Proben wiesen lediglich einen ggr. unspezifischen Keimgehalt auf. Aus 15 Proben (55,6 %) konnten demnach keine spezifischen Bakterienarten isoliert werden.
9. Coliforme Keime konnten in zwei Uteri an allen drei Lokalisationen nachgewiesen werden. Bei einem der beiden Tiere wurde parallel in allen drei Lokalisationen eine Besiedlung mit *Proteus* spp. und LAB nachgewiesen. Die Bakterienart *Trueperella pyogenes* sowie Schimmelpilze konnten aus keiner Probe isoliert werden. Hefen wurden in zwei Uterushörnern und einem Uteruskörper in zwei Tieren nachgewiesen.
10. LAB wurde in drei Uteri (33,3 %) an jeweils allen drei Lokalisationen nachgewiesen. Zwei Uteri waren ausschließlich mit LAB besiedelt. Die Gattung *Lactobacillus* konnte in keiner der Proben isoliert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in dieser Untersuchung keine Unterschiede in der bakteriellen Besiedlung zwischen den drei Lokalisationen im Uterus vorlagen. Dies lässt den Schluss zu, dass eine alleinige Beprobung im Corpus uteri ausreichend ist, um eine Einschätzung des Mikrobioms im gesamten Uterus zu erlangen.

7 Summary

Alexandra Krebbers

Influence of the uterine microbiome on in vivo derived bovine embryos

The aim of this study was to investigate the uterine microbiome on the day of embryo collection and its influence on the quality of in vivo derived bovine embryos. Although numerous factors have been identified as affecting the success of in vivo embryo collection, research has predominantly been focused on the effects during folliculogenesis and ovulation. To date, little is known about uterine factors. Likewise, the microbiome of the uterine horn tip and its impact on early embryogenesis remain largely unexplored.

The aim of the **first study** was to investigate the impact of microbial colonization of the uterine horn tips on the quality of in vivo derived bovine embryos. The influence of *Lactobacillus buchneri* was of particular interest. Nineteen embryo collections were examined that were carried out as part of a commercial embryo transfer programme of the Verein Ostfriesischer Stammviehzüchter (association of cattle breeders of East Frisia) between May 2021 and July 2022. Pluset® was used for superovulation in all cows. Each uterine horn was flushed separately with fresh material using 600 ml of flushing medium (EmXcell embryo flushing medium®). For microbiological examination, 10 ml were taken from the first 60 ml of the recovered and filtered flushing medium, in addition to 10 ml from the filter supernatant. The embryos were classified according to IETS (International Embryo Technology Society) criteria. The recovered flushing medium was measured, and its turbidity and blood content were assessed. In the laboratory, each sample was cultured on or in four different media under two different incubation conditions. Specifically, samples were directly plated onto Rogosa-SL agar and MRS agar under both aerobic and anaerobic conditions, and additionally pre-cultured in Rogosa-SL and MRS broth. This process resulted in 32 test runs per animal. Samples of the flushing medium from the last nine cows were additionally tested for general bacterial content on Columbia agar, Gassner agar, Sabouraud agar and YGC agar. The bacteria detected were classified into three categories based on a literature research: potentially pathogenic, potentially probiotic, commensal. The classification of the microbiome of the uterine horn tip was based on the bacterial categories as potentially probiotic (PROB), potentially pathogenic (PATH) and mixed (MIX). The results of the embryo collections of each horn were analysed in relation to the uterine microbiome. Furthermore, the effects of the stage of lactation, milk yield, parity, body condition, udder health of the donors and the semen used on embryo quality were evaluated. In addition, the recovery, turbidity and blood contamination of the flushing medium was analysed.

The following results were obtained:

1. A total of 66 microbiological identifications were obtained. The most prevalent bacterial genera were *Staphylococcus* (12x), *Escherichia* (10x), and *Lactobacillus* (8x). The most prevalent bacterial species identified was *E. coli*.
2. *Lactobacillus buchneri* was isolated from only 3 of 38 uterine horns examined in two donors. Consequently, the prevalence of this *Lactobacillus* is low in the uterus of dairy cows more than 83 DIM. In addition to *L. buchneri*, the lactobacilli *L. parabuchneri*, *L. sakei*, and *L. plantarum* were detected. The bacterial order *Lactobacillales* (lactic acid bacteria, LAB) was isolated in 8 of 19 uteri (42,1%).
3. Of the microbiological detections, 54.5% were potentially pathogenic and 37.9% were potentially probiotic bacteria. The microbiome of the examined 38 uterine horns was determined as follows: 39.5% PATH, 28.9% PROB, 26.3% MIX, and 5.3% KOM. Of the examined 19 uteri, 13 showed colonization with probiotic bacteria in at least one horn.
4. The mean number of total embryos and oocytes recovered per uterus was 11.9 ± 9.9 and per uterine horn 5.9 ± 5.3 . The mean number and percentage of transferable embryos was 7.3 ± 7.0 and $6.5 \pm 31.5\%$ per uterus, and 3.6 ± 3.8 and $63.0 \pm 34.6\%$ per uterine horn, respectively. The rate of unfertilised oocytes per uterus and uterine horn was approximately 24%.
5. The uterine microbiome shows no significant influence on the quality of bovine in vivo derived embryos in the embryo flushings of left or right horns. No significant differences were observed between the microbial categories PATH, PROB, MIX in terms of total number of embryos and oocytes recovered as well as in the number and rate of transferable embryos, embryos of first quality and degenerated embryos. Similarly, there was no significant difference between the microbial categories in the number and rate of unfertilised oocytes as an indicator of the fertilisation rate.
6. The stage of lactation, milk yield, body condition, and udder health showed no significant influence on embryo quality. The embryo recovery of primiparous cows showed a tendency ($p = 0.07$) to recover a larger proportion of transferable embryos. In embryo recoveries from cows inseminated with conventional semen compared to sexed semen, a tendency ($p < 0.08$) to obtain more embryos with excellent quality was observed.

7. The recovery of the flushing medium did not have a significant impact on the investigated quality parameters of embryo recoveries per uterine horn (left or right). Likewise, no clear significant correlation was observed between the turbidity or blood contamination of the flushing medium and embryo quality, although side-dependent tendencies were apparent. For recoveries of the right uterine horns, a tendency towards a negative correlation was observed between turbidity category 2 as well as blood contamination category 2 and the proportion of embryos with excellent quality ($p < 0.06$, respectively). Also, there was a tendency for a higher proportion of degenerated embryos in right uterine horns with a turbidity category 1 and blood contamination category 1 ($p < 0.1$, respectively). Both associations could not be confirmed in the analysis of recoveries from the left uterine horns. Conversely, for flushing of the left uterine horns, turbidity category 1 was associated with a tendency for a higher mean number ($p < 0.07$) and a significantly higher mean rate ($p < 0.02$) of unfertilised oocytes. This finding could also not be confirmed in the analysis of the right uterine horns. The factors turbidity and blood contamination appear to correlate with each other. In 31 of 34 uterine horns examined, there was a consistent finding of both factors.

In summary, there is no adverse or beneficial influence of a potentially probiotic, potentially pathogenic, or mixed uterine microbiome on the quality of in vivo derived bovine embryos. *Lactobacillus buchneri* was detected in low numbers in the uterus of cows on the day of embryo recovery, which precluded the determination of the effect of this bacterial strain on embryo quality.

The aim of the **second study** was to conduct a comparative analysis of the microbiome at three different locations in the uterus. Therefore, the uteri of nine slaughtered cows were examined microbiologically, dissected in the corpus uteri and in the left and the right uterine horn. The corpus uteri and the cranial portion (from the highest point of the greater curvature) of the left and right uterine horn were opened with a scalpel incision and flushed with up to 30 ml flushing medium (EmXcell embryo flushing medium®) each. The recovered flushing medium was examined using MRS agar to detect LAB. Additionally, the medium was analysed for general bacterial content using Columbia, Gassner, Sabouraud and YGC agar.

The following results were obtained:

8. Seven of the 27 samples examined were detected to be germ-free (3x left horn, 2x right horn, 2x uterine body) from a total of 4 cows. Further eight samples showed only a low level of non-specific bacteria. In total, in 15 samples (55.6%), no specific bacterial species could be isolated.

9. Coliform bacteria were detected in two uteri at all three locations. In one of the two cows, the presence of *Proteus* spp. and LAB was also detected in all three locations. The bacterial species *Trueperella pyogenes* and the mould fungi could not be isolated from any of the samples. The presence of yeast was detected in two uterine horns and one uterine body in two animals.
10. LAB were detected in in three uteri (33.3%) in all three locations. Two uteri were determined to be colonised exclusively with LAB. The genus *Lactobacillus* could not be isolated in any of the samples.

In summary, the study did not detect any differences in bacterial colonisation between the three uterine locations. These findings suggest that sampling the corpus uteri alone is sufficient to obtain an assessment of the microbiome in the entire uterus.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BCS	Body Condition Score
BRS	Bundesverband Rind und Schwein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CE	Klinische Endometritis
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CL	Corpus luteum, Gelbkörper
Co1	Vertebra coccygialis 1
CYP19A1	Cytochrom P19 A1 (ehemals Aromatase)
D	Tag
DIM	Tage in der Laktation (engl. days in milk)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
eCG	Equines Choriongonadotropin
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
FEQ	Fett-Eiweiß-Quotient
ET	Embryotransfer
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
ggr.	geringgradig
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hgr.	hochgradig
hMG	Humanes Menopausengonadotropin
HWZ	Halbwertszeit
IE	Internationale Einheiten
IETS	International Embryo Technology Society
IGF-1	Insulin-like Growth Factor
i. m.	intramuskulär
IVC	In-vitro-Kultur
IVF	In-vitro-Fertilisation
IVM	In-vitro-Maturation
IVP	In-vitro-Produktion
KB	Künstliche (instrumentelle) Besamung
KbE	Koloniebildende Einheit
KOK	Kumulus-Oozyten-Komplex
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>

LAB	Laktatbildende Bakterien, Milchsäurebakterien, <i>Lactobacillales</i>
LH	Luteinisierendes Hormon
LPS	Lipopolysaccharid
LUFA	Landwirtschaftliche Untersuchung- und Forschungsanstalt
MII	Metaphase der zweiten meiotischen Teilung
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalyse
mgr.	mittelgradig
MLP	Milchleistungsprüfung
mRNA	messenger RNA
MRS	Man-Rogosa-Shape
NaCl-Lsg.	Kochsalzlösung 0,9 %
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEFA	Nicht veresterte freie Fettsäuren
NRR	Non-Return-Rate
OPU	Ovum-Pick-Up
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDE3A	Phosphodiesterase 3A
pFSH	porzines FSH
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PGFM	Plasmametaboliten des Prostaglandin F _{2α}
pLH	porzines LH
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
p. p.	post partum
PRID®	intravaginale Progesteronsponge
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	ribosomale RNA
S.	<i>Staphylococcus</i>
s. c.	subkutan
SD	Standardabweichung (engl. standard deviation)
SE	Subklinische Endometritis
SOP	Superovulationsprogramm
sp.	species
spp.	species pluralis

<i>T.</i>	<i>Trueperella</i>
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
unsp.	unspezifisch
VIT	Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung e.V.
VOST	Verein Ostfriesischer Stammviehzüchter
<i>W.</i>	<i>Weizmannia</i>
$\bar{x}$	Mittelwert

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung eines Primordial-, Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikels.	4
Abb. 2 Entwicklung der Hormonkonzentrationen im Blut während des Zyklus mit beispielhaft drei Follikelwellen.....	5
Abb. 3 Schematische Darstellung eines Brunstzyklus mit drei Follikelwellen.....	6
Abb. 4 Schematische Darstellung der Ovulation, Befruchtung und Furchung beim Säugetier	10
Abb. 5 Schematischer Ablauf eines Superovulationsprogramms (SOP) mit einem FSH-Präparat.....	16
Abb. 6 Anzahl transfertauglicher Embryonen in Abhängigkeit der Rasse	40
Abb. 7 Grafische Darstellung der in dieser Arbeit beschriebenen Auswirkungen von Hitzestress	49
Abb. 8 Schematische Darstellung der Zusammensetzung des Mikrobioms aus Mikrobiota und dem Aktionsraum	72
Abb. 9 Verschiedene Toll-like Rezeptoren (TLR) und ihre Liganden.....	75
Abb. 10 Rechtes Ovar einer Kuh	87
Abb. 11 Linkes Ovar einer Kuh am Tag der Embryonengewinnung.....	89
Abb. 12 Schematische Darstellung der Embryonengewinnung mit Hilfe eines transzervikal positioniertem Ballonkatheter	90
Abb. 13 Beispielbild der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit.....	91
Abb. 14 Embryonen verschiedener Kühe der Studie	93
Abb. 15 Laboruntersuchungsvorgang für die Proben jeder Kuh an der FU Berlin	94
Abb. 16 Schematische Darstellung der Vorgehensweise am Uterus anhand einer Zeichnung bzw. eines Bildes	103
Abb. 17 Einteilung der mikrobiologischen Nachweise (n = 66) anhand der Bakteriengattung (n = 17) und des absoluten Vorkommens.....	107
Abb. 18 Absolutes Vorkommen der nachgewiesenen Bakterienarten in den linken (n = 19) und rechten (n = 19) Uterushörnern	108
Abb. 19 Einteilung aller mikrobiologischen Nachweise (n = 66) sowohl der linken und rechten Uterushörner	10909
Abb. 20 Einteilung der mikrobiologischen Nachweise links (n = 34) und rechts (n = 32).....	110
Abb. 21 Zuordnung der untersuchten Uterushörner (n = 38) in die bakteriellen Kategorien PATH, PROB, MIX, KOM in absoluten Zahlen	110
Abb. 22 Zuordnung der untersuchten linken (n = 19) und rechten (n = 19) Uterushörner in die bakteriellen Kategorien PATH, PROB, MIX, KOM in absoluten Zahlen	111
Abb. 23 Zuordnung der Uteri (n = 19) in die bakteriellen Kategorien PATH, PROB, MIX....	111
Abb. 24 Bakterielle Keimbesiedlung von 27 Spülproben.....	133

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Ergebnisse verschiedener Studien über die Ovulationsperiode nach einer Superovulation	19
Tab. 2 Ergebnisse verschiedener Studien über den Erfolg einer Ablation eines dominanten Follikels.....	30
Tab. 3 Ergebnisse verschiedener Studien zum Einsatz von pFSH-Präparaten aufgelöst in einer Hyaluronsäurelösung	36
Tab. 4 Ergebnisse verschiedener Studien über den Einfluss des Body-Condition-Scores (BCS) im Zeitraum der Superovulation auf die Ergebnisse der Embryonengewinnung	47
Tab. 5 Definitionen der Erkrankungen des Metritis-Komplex	66
Tab. 6 Grenzwerte zur Diagnose einer subklinischen Endometritis (SE) in Abhängigkeit von den Tagen post partum (Übersicht ausgewählter Studien).....	68
Tab. 7 Ergebnisse verschiedener Studien über den Einfluss einer intrauterinen oder systemischen Lipopolysaccharid (LPS)-Challenge auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse sowie die Ovulation	76
Tab. 8 Ergebnisse verschiedener Studien über den Einfluss unterschiedlicher Lipopolysaccharid (LPS)-Konzentrationen in der In-vitro-Produktion (IVP).....	78
Tab. 9: Bewertungsschema für die Trübung und die Blutbeimengung der Spülflüssigkeit	90
Tab. 10 Bakterienarten alphabetisch sortiert in 3 Kategorien: „potenziell pathogen“, „potenziell probiotisch“, reine Kommensalen.....	96
Tab. 11 Einteilung untersuchter Parameter in Kategorien mit Definitionskriterien	99
Tab. 12 Mikrobiologische Nachweise aus 38 Uterushörnern (19 Tiere) und deren Einschätzung	105
Tab. 13 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen der Uteri (n = 19)	112
Tab. 14 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen pro Uterushorn (linkes und rechtes Uterushorn zusammen, n = 38)	113
Tab. 15 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen der linken und rechten Uterushörner (getrennte Auswertung)	113
Tab. 16 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen pro Uterushorn (linkes und rechtes Uterushorn zusammen) anhand der mikrobiologischen Kategorien: potenziell probiotisch (PROB), potenziell pathogen (PATH), gemischt besiedelt (MIX).....	114
Tab. 17 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen der linken und rechten Uterushörner (getrennte Auswertung) anhand der mikrobiologischen Kategorien: potenziell probiotisch (PROB), potenziell pathogen (PATH), gemischt besiedelt (MIX).....	116
Tab. 18 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen anhand der Laktationsstadien	119
Tab. 19 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen anhand der Laktationsgruppen	119

Tab. 20 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen anhand der Milchleistung	121
Tab. 21 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen anhand des Body-Condition-Scores (BCS).....	123
Tab. 22 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen anhand der Eutergesundheit.....	123
Tab. 23 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen mit nicht sortiertem Sperma (X/Y-Sperma) oder X-sortiertem Sperma (X-Sperma).....	124
Tab. 24 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen der linken und rechten Uterushörner (getrennte Auswertung) anhand der Rückgewinnung der Spülflüssigkeit	126
Tab. 25 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen der linken und rechten Uterushörner (getrennte Auswertung) anhand der Trübung der Spülflüssigkeit	128
Tab. 26 Durchschnittliche Erfolgsparameter der Embryonengewinnungen der linken und rechten Uterushörner (getrennte Auswertung) anhand der Blutbeimengung der Spülflüssigkeit	130
Tab. 27 Häufigkeiten der Ausprägungen der Rückgewinnung, Trübung und Blutbeimengungen der Spülflüssigkeit der linken Uterushörner (n = 17) anhand der mikrobiellen Besiedlung	131
Tab. 28 Häufigkeiten der Ausprägungen der Rückgewinnung, Trübung und Blutbeimengungen der Spülflüssigkeit der rechten Uterushörner (n = 17) anhand der mikrobiellen Besiedlung	131
Tab. 29 Anzahl bakterieller Nachweise in den Lokalisationen (Corpus uteri, linkes Horn, rechtes Horn) in 9 Uteri	133
Tab. 30 Bakterielle Besiedlung der drei Lokalisationen (linkes Horn, Corpus uteri, rechtes Horn) der Uteri (n = 9).....	134

11 Literaturverzeichnis

- Acton, B. M., Jurisicova, A., Jurisica, I. und Casper, R. F. (2004): „Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development“ *Molecular Human Reproduction*. (10) Nr. 1 (2004), 23–32. doi:10.1093/molehr/gah004
- Acuña, O. S., Movilla, M. J., Vilella, I., Jara, L., Canovas, S., Coy, P. et al. (2014): „Detection of SPAM1 in exosomes isolated from the bovine oviductal fluid.“ (Band 49, S. 97–98). Gehalten auf der 12th International Congress of the Spanish Association for Animal Reproduction, Alicante: Reproduction in Domestic Animals.
- Adams, G. P. (1994): „Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: Implications for synchronization & superstimulation“ *Theriogenology*. (41) Nr. 1 (1994), 19–24. doi:10.1016/s0093-691x(05)80044-5
- Adams, G. P. (1999): „Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants“ *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*. (54) (1999), 17–32.
- Adams, G. P., Kot, K., Smith, C. A. und Ginther, O. J. (1993): „Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers“ *Animal Reproduction Science*. (30) Nr. 4 (1993), 259–271. doi:10.1016/0378-4320(93)90076-4
- Adams, G. P., Matteri, R. L., Kastelic, J. P., Ko, J. C. H. und Ginther, O. J. (1992): „Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers“ *Reproduction*. (94) Nr. 1 (1992), 177–188. doi:10.1530/jrf.0.0940177
- Adams, G. P., Nasser, L. F., Bo, G. A., Garcia, A., Del Campo, M. R. und Mapletoft, R. J. (1994): „Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers“ *Theriogenology*. (42) Nr. 7 (1994), 1103–1113. doi:10.1016/0093-691X(94)90858-3
- Adams, G. P. und Singh, J. (2021): Ovarian Follicular and Luteal Dynamics in Cattle. In R.M. Hopper (Hrsg.), *Bovine Reproduction*. (1. Aufl., S. 292–323). Wiley. doi:10.1002/9781119602484.ch25
- Adekunle, O. F., Ajasin, Folasade Olubunmi, Banwo, O. G., Omotosho, O. und Anifowose, O. (2024): „Antimicrobial resistance profile of bacteria isolated from the vagina of nulliparous cattle“ *SVU-International Journal of Veterinary Sciences*. (7) Nr. 3 (2024), 1–11. doi:10.21608/svu.2024.286448.1318
- Adjaye, J., Huntriss, J., Herwig, R., BenKahla, A., Brink, T. C., Wierling, C. et al. (2005): „Primary Differentiation in the Human Blastocyst: Comparative Molecular Portraits of Inner Cell Mass and Trophectoderm Cells“ *Stem Cells*. (23) Nr. 10 (2005), 1514–1525. doi:10.1634/stemcells.2005-0113
- Adnane, M. und Chapwanya, A. (2022): „A Review of the Diversity of the Genital Tract Microbiome and Implications for Fertility of Cattle“ *Animals*. (12) Nr. 4 (2022), 460. doi:10.3390/ani12040460
- Aerts, J. M. J. und Bols, P. E. J. (2010a): „Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development“ *Reproduction in Domestic Animals*. (45) Nr. 1 (2010a), 171–179. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01302.x
- Aerts, J. M. J. und Bols, P. E. J. (2010b): „Ovarian Follicular Dynamics. A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects“ *Reproduction in Domestic Animals*. (45) Nr. 1 (2010b), 180–187. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01298.x
- Agerholm, J. S., Krogh, H. V. und Jensen, H. E. (1995): „A Retrospective Study of Bovine Abortions Associated with *Bacillus licheniformis*“ *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. (42) Nr. 1–10 (1995), 225–234. doi:10.1111/j.1439-0450.1995.tb00706.x
- Ahmed, S., Singh, S., Singh, V., Roberts, K. D., Zaidi, A. und Rodriguez-Palacios, A. (2022): „The *Weissella* Genus: Clinically Treatable Bacteria with Antimicrobial/Probiotic Effects on Inflammation and Cancer“ *Microorganisms*. (10) Nr. 12 (2022), 2427. doi:10.3390/microorganisms10122427
- Albers, R. M., Schnapper, A., Beyerbach, M. und Boos, A. (2015): „Quantitative morphological changes in the interplacentomal wall of the gravid uterine horn of cattle during pregnancy“ *Reproductive Biology and Endocrinology*. (13) Nr. 1 (2015), 32. doi:10.1186/s12958-015-0030-3

- Alexopoulos, C., Georgoulakis, I. E., Tzivara, A., Kritas, S. K., Siochu, A. und Kyriakis, S. C. (2004): „Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters“ *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. (88) Nr. 11–12 (2004), 381–392. doi:10.1111/j.1439-0396.2004.00492.x
- AL-Ghizzawi, G. J. und Jomaa, Z. K. (2018): „The Role Of *Staphylococcus Haemolyticus* In Men Infertility“ *Journal of Physics: Conference Series*. (1003) (2018), 012005. doi:10.1088/1742-6596/1003/1/012005
- Al-Katanani, Y. M., Drost, M., Monson, R. L., Rutledge, J. J., Krininger, C. C., Block, J. et al. (2002a): „Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions“ *Theriogenology*. (58) Nr. 1 (2002a), 171–182. doi:10.1016/S0093-691X(02)00916-0
- Al-Katanani, Y. M., Paula-Lopes, F. F. und Hansen, P. J. (2002b): „Effect of Season and Exposure to Heat Stress on Oocyte Competence in Holstein Cows“ *Journal of Dairy Science*. (85) Nr. 2 (2002b), 390–396. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74086-1
- Al-Kraety, I. A. A., Al-Muhanna, S. G., Banoon, S. R. und Ghasemian, A. (2022): „Bacterial vaginosis pattern and antibiotic susceptibility testing in female patients using high vaginal swabs“ *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. (23) Nr. 6 (2022), 2838–2844. doi:10.13057/biodiv/d230608
- Allen, W. R. (1969): „Factors influencing Pregnant Mare Serum Gonadotrophin Production“ *Nature*. (223)Nr. 5201 (1969), 64–66. doi:10.1038/223064a0
- Aloé, S., Weber, F., Behr, B., Sauter-Louis, C. und Zerbe, H. (2012): „Modulatory Effects of Bovine Seminal Plasma on Uterine Inflammatory Processes“ *Reproduction in Domestic Animals*. (47) Nr. 1 (2012), 12–19. doi:10.1111/j.1439-0531.2011.01792.x
- Altmäe, S. (2018): „Commentary: Uterine Microbiota: Residents, Tourists, or Invaders?“ *Frontiers in Immunology*. (9) (2018), 1874. doi:10.3389/fimmu.2018.01874
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D. und Kuipers, O. P. (2016): „Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family“ *Applied Microbiology and Biotechnology*. (100) Nr. 7 (2016), 2939–2951. doi:10.1007/s00253-016-7343-9
- Ametaj, B. N., Iqbal, S., Selami, F., Odhiambo, J. F., Wang, Y., Gänzle, M. G. et al. (2014): „Intravaginal administration of lactic acid bacteria modulated the incidence of purulent vaginal discharges, plasma haptoglobin concentrations, and milk production in dairy cows“ *Research in Veterinary Science*. (96) Nr. 2 (2014), 365–370. doi:10.1016/j.rvsc.2014.02.007
- Andersson, M., Taponen, J., Koskinen, E. und Dahlbom, M. (2004): „Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows“ *Theriogenology*. (61) Nr. 7–8 (2004), 1583–1588. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.09.006
- Aparicio, I. M., Garcia-Herreros, M., O’Shea, L. C., Hensey, C., Lonergan, P. und Fair, T. (2011): „Expression, Regulation, and Function of Progesterone Receptors in Bovine Cumulus Oocyte Complexes During In Vitro Maturation“ *Biology of Reproduction*. (84) Nr. 5 (2011), 910–921. doi:10.1095/biolreprod.110.087411
- Appiah, M., Wang, J. und Lu, W. (2020): „Microflora in the Reproductive Tract of Cattle: A Review“ *Agriculture*. (10) Nr. 6 (2020), 232. doi:10.3390/agriculture10060232
- Armstrong, D. G., Gong, J. G., Gardner, J. O., Baxter, G., Hogg, C. O. und Webb, R. (2002): „Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake“ *Reproduction*. (123) Nr. 3 (2002), 371–378. doi:10.1530/rep.0.1230371
- Armstrong, D. G., McEvoy, T. G., Baxter, G., Robinson, J. J., Hogg, C. O., Woad, K. J. et al. (2001): „Effect of Dietary Energy and Protein on Bovine Follicular Dynamics and Embryo Production In Vitro: Associations with the Ovarian Insulin-Like Growth Factor System“ *Biology of Reproduction*. (64) Nr. 6 (2001), 1624–1632. doi:10.1095/biolreprod64.6.1624
- Arulmozhi, A., Balasubramaniam, A., Balasubramaniam, G. A., Madheswaran, R. und Mohana, N. (2014): „*Klebsiella pneumoniae* Associated Pyometra and Septicemia in a Female Rabbit“ *The Indian Vet Journal*. (91) Nr. 9 (2014), 98–99.

- Assey, R. J., Hyttel, P., Roche, J. F. und Boland, M. (1994): „Oocyte structure and follicular steroid concentrations in superovulated versus unstimulated heifers“ *Molecular Reproduction and Development*. (39) Nr. 1 (1994), 8–16. doi:10.1002/mrd.1080390103
- Austin, C. R. (1959): „The Role of Fertilization“ *Perspectives in Biology and Medicine*. (3) Nr. 1 (1959), 44–54. doi:10.1353/pbm.1959.0040
- Azawi, O. I. (2008): „Postpartum uterine infection in cattle“ *Animal Reproduction Science*. (105) Nr. 3–4 (2008), 187–208. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.010
- Badinga, L., Collier, R. J., Thatcher, W. W. und Wilcox, C.J. (1985): „Effects of Climatic and Management Factors on Conception Rate of Dairy Cattle in Subtropical Environment“ *Journal of Dairy Science*. (68) Nr. 1 (1985), 78–85. doi:10.3168/jds.S0022-0302(85)80800-6
- Baker, J. M., Chase, D. M. und Herbst-Kralovetz, M. M. (2018): „Uterine Microbiota: Residents, Tourists, or Invaders?“ *Frontiers in Immunology*. (9) (2018), 208. doi:10.3389/fimmu.2018.00208
- Baldassarre, H., Currin, L., Michalovic, L., Bellefleur, A.-M., Gutierrez, K., Mondadori, R. G. et al. (2018): „Interval of gonadotropin administration for in vitro embryo production from oocytes collected from Holstein calves between 2 and 6 months of age by repeated laparoscopy“ *Theriogenology*. (116) (2018), 64–70. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.05.005
- Ballas, P., Rückert, C., Wagener, K., Drillich, Marc, Kämpfer, P., Busse, H.-J. et al. (2020): „*Corynebacterium endometrii* sp. nov., isolated from the uterus of a cow with endometritis“ *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. (70)Nr. 1 (2020), 146–152. doi:10.1099/ijsem.0.003728
- Barbosa, L. F. S. P., Oliveira, W. V. C., Pereira, M.H.C., Moreira, M. B., Vasconcelos, C. G. C., Silper, B. F. et al. (2018): „Somatic cell count and type of intramammary infection impacts fertility from in vitro produced embryo transfer“ *Theriogenology*. (108) (2018), 291–296. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.12.025
- Barker, A.R., Schrick, F. N., Lewis, M. J., Dowlen, H. H. und Oliver, S. P. (1998): „Influence of Clinical Mastitis During Early Lactation on Reproductive Performance of Jersey Cows“ *Journal of Dairy Science*. (81) Nr. 5 (1998), 1285–1290. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75690-5
- Baruselli, P. S., De Abreu, L. A., De Paula, V. R., Carvalho, B., Gricio, E. A., Mori, F. K. et al. (2023): „Applying assisted reproductive technology and reproductive management to reduce CO₂-equivalent emission in dairy and beef cattle: a review“ *Animal Reproduction*. (20) Nr. 2 (2023), e20230060. doi:10.1590/1984-3143-ar2023-0060
- Bastin, C., Loker, S., Gengler, N., Sewalem, A. und Miglior, F. (2010): „Genetic relationships between body condition score and reproduction traits in Canadian Holstein and Ayrshire first-parity cows“ *Journal of Dairy Science*. (93) Nr. 5 (2010), 2215–2228. doi:10.3168/jds.2009-2720
- Batt, C.A. (2014): *Lactobacillus* | Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology*. (2. Aufl., S. 409–411). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00176-2
- Battaglia, D. F., Bowen, J. M., Krasa, H. B., Thrun, L. A., Viguié, C. und Karsch, F. J. (1997): „Endotoxin Inhibits the Reproductive Neuroendocrine Axis While Stimulating Adrenal Steroids: A Simultaneous View from Hypophyseal Portal and Peripheral Blood“ *Endocrinology*. (138) Nr. 10 (1997), 4273–4281. doi:10.1210/endo.138.10.5449
- Bednarska-Czerwińska, A., Czerwiński, M., Morawiec, E., Łach, A., Ziąja, A., Kusaj, A. et al. (2022): „Marking the Profile of the Microflora of the Endometrium and Uterine Cervix in Women as a Potential Factor Determining the Effectiveness of In Vitro Fertilization“ *Journal of Clinical Medicine*. (11) Nr. 12 (2022), 3348. doi:10.3390/jcm11123348
- Beg, M. A., Bergfelt, D. R., Kot, K., Wiltbank, M. C. und Ginther, O. J. (2001): „Follicular-Fluid Factors and Granulosa-Cell Gene Expression Associated with Follicle Deviation in Cattle“ *Biology of Reproduction*. (64) Nr. 2 (2001), 432–441. doi:10.1095/biolreprod64.2.432
- Beker, A. R. C. L., Colenbrander, B. und Bevers, M. M. (2002): „Effect of 17 β -estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes“ *Theriogenology*. (58) Nr. 9 (2002), 1663–1673. doi:10.1016/S0093-691X(02)01082-8
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T. et al. (2020): „Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges“ *Microbiome*. (8) Nr. 1 (2020), 103. doi:10.1186/s40168-020-00875-0

- Berger, P. J., Shanks, R.D., Freeman, A. E. und Laben, R. C. (1981): „Genetic Aspects of Milk Yield and Reproductive Performance“ *Journal of Dairy Science*. (64) Nr. 1 (1981), 114–122. doi:10.3168/jds.S0022-0302(81)82535-0
- Bergfelt, D. R., Lightfoot, K. C. und Adams, G. P. (1994): „Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers“ *Theriogenology*. (42) Nr. 6 (1994), 895–907. doi:10.1016/0093-691X(94)90113-W
- Bertuccini, L., Russo, R., Iosi, F. und Superti, F. (2017): „Effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus* on bacterial vaginal pathogens“ *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. (30) Nr. 2 (2017), 163–167. doi:10.1177/0394632017697987
- Besenfelder, U., Brem, G. und Havlicek, V. (2020): „Review: Environmental impact on early embryonic development in the bovine species“ *Animal*. (14) (2020), s103–s112. doi:10.1017/S175173111900315X
- Betteridge, K. J., Eaglesome, M. D., Randall, G. C. B. und Mitchell, D. (1980): „Collection, description and transfer of embryos from cattle 10-16 days after oestrus“ *Reproduction*. (59) Nr. 1 (1980), 205–216. doi:10.1530/jrf.0.0590205
- Beutler, Bruce A. (2009): „TLRs and innate immunity“ *Blood*. (113)Nr. 7 (2009), 1399–1407. doi:10.1182/blood-2008-07-019307
- Bevers, M. und Dieleman, S. (1987): „Superovulation of cows with PMSG: Variation in plasma concentrations of progesterone, oestradiol, LH, cortisol, prolactin and PMSG and in number of preovulatory follicles“ *Animal Reproduction Science*. (15) (1987), 37–52. doi:10.1016/0378-4320(87)90004-2
- Bevers, M. M. und Dieleman, S. J. (1987): „Superovulation of cows with PMSG: Variation in plasma concentrations of progesterone, oestradiol, LH, cortisol, prolactin and PMSG and in number of preovulatory follicles“ *Animal Reproduction Science*. (15) Nr. 1–2 (1987), 37–52. doi:10.1016/0378-4320(87)90004-2
- Bezdiček, J., Makarevich, A., Stádník, L., Kubovičová, E., Louda, F., Hegedúšová, Z. et al. (2015): „Analyse der Effekte, die die Menge und die Qualität der Embryonen in superovulierten Kühen beeinflussen“ *Züchtungskunde*. (87) Nr. 4 (2015), 249–264.
- Bhandari, P., Rishi, P. und Prabha, V. (2016): „Positive effect of probiotic *Lactobacillus plantarum* in reversing LPS-induced infertility in a mouse model“ *Journal of Medical Microbiology*. (65) Nr. 5 (2016), 345–350. doi:10.1099/jmm.0.000230
- Bhunja, A. K., Johnson, M. C., Ray, B. und Kalchayanand, N. (1991): „Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains“ *Journal of Applied Bacteriology*. (70) Nr. 1 (1991), 25–33. doi:10.1111/j.1365-2672.1991.tb03782.x
- Biancucci, A., Sbaragli, T., Comin, A., Sylla, L., Monaci, M., Peric, T. et al. (2016): „Reducing treatments in cattle superovulation protocols by combining a pituitary extract with a 5% hyaluronan solution: Is it able to diminish activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis compared to the traditional protocol?“ *Theriogenology*. (85) Nr. 5 (2016), 914–921. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.10.041
- Biggers, J. D., Bell, J. E. und Benos, D. J. (1988): „Mammalian blastocyst: transport functions in a developing epithelium“ *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. (255) Nr. 4 (1988), C419–C432. doi:10.1152/ajpcell.1988.255.4.C419
- Bindon, B. M., Piper, L. R., Cahill, L. P., Driancourt, M. A. und O’Shea, T. (1986): „Genetic and hormonal factors affecting superovulation“ *Theriogenology*. (25) Nr. 1 (1986), 53–70. doi:10.1016/0093-691X(86)90183-4
- Bishop, D. W. (1956): „Active Secretion in the Rabbit Oviduct“ *American Journal of Physiology-Legacy Content*. (187) Nr. 2 (1956), 347–352. doi:10.1152/ajplegacy.1956.187.2.347
- Bloch, A., Folman, Y., Kaim, M., Roth, Z., Braw-Tal, R. und Wolfenson, D. (2006): „Endocrine Alterations Associated with Extended Time Interval Between Estrus and Ovulation in High-Yield Dairy Cows“ *Journal of Dairy Science*. (89) Nr. 12 (2006), 4694–4702. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72520-6
- Bó, G. A., Baruselli, P. S., Chesta, P. M. und Martins, C. M. (2006): „The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle“ *Theriogenology*. (65) Nr. 1 (2006), 89–101. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.10.008

- Bó, G. A., Guerrero, D. C. und Adams, G. P. (2008): „Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation“ *Theriogenology*. (69) Nr. 1 (2008), 81–87. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.09.005
- Bó, G. A., Hockley, D. K., Nasser, L. F. und Mapletoft, R. J. (1994): „Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle“ *Theriogenology*. (42) Nr. 6 (1994), 963–975. doi:10.1016/0093-691X(94)90119-4
- Bó, G. A. und Mapletoft, R. J. (2014): „Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle“ *Theriogenology*. (81) Nr. 1 (2014), 38–48. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.020
- Bodensteiner, K. J., Wiltbank, M. C., Bergfelt, D. R. und Ginther, O. J. (1996): „Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles“ *Theriogenology*. (45) Nr. 2 (1996), 499–512. doi:10.1016/0093-691X(95)00386-M
- Boiani, M., Casser, E., Fuellen, Georg und Christians, E. S. (2019): „Totipotency continuity from zygote to early blastomeres: a model under revision“ *Reproduction*. (158) Nr. 2 (2019), R49–R65. doi:10.1530/REP-18-0462
- Boice, M. L., Geisert, R. D., Blair, R. M. und Verhage, H. G. (1990): „Identification and Characterization of Bovine Oviductal Glycoproteins Synthesized at Estrus“ *Biology of Reproduction*. (43) Nr. 3 (1990), 457–465. doi:10.1095/biolreprod43.3.457
- Boland, M. P., Goulding, D. und Roche, J. F. (1991): „Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle“ *Theriogenology*. (35) Nr. 1 (1991), 5–17. doi:10.1016/0093-691x(91)90143-2
- Boland, M. P., Lonergan, P. und O’Callaghan, D. (2001): „Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development“ *Theriogenology*. (55) Nr. 6 (2001), 1323–1340. doi:10.1016/S0093-691X(01)00485-X
- Bollwein, H. (2022): „Einsatz von Ultraschall im Fruchtbarkeitsmanagement beim Rind - ein Update“ *Leipziger Blaue Hefte*. (11. Leipziger Tierärztekongress) Nr. 3 (2022), 128–129.
- Bondurant, R. H. (1999): „Inflammation in the bovine female reproductive tract“ *Journal of Animal Science*. (77) Nr. suppl_2 (1999), 101. doi:10.2527/1999.77suppl_2101x
- Bonnett, B. N., Martin, S. W., Gannon, V. P. J., Miller, R. B. und Etherington, W. G. (1991): „Endometrial Biopsy in Holstein-Friesian Dairy Cows III. Bacteriological Analysis and Correlations with Histological Findings“ *Canadian Journal of Veterinary Research*. (55) Nr. 2 (1991), 168–173.
- Bonnett, B. N., Martin, S. W. und Meek, A. H. (1993): „Associations of clinical findings, bacteriological and histological results of endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy cows“ *Preventive Veterinary Medicine*. (15) Nr. 2–3 (1993), 205–220. doi:10.1016/0167-5877(93)90114-9
- Borges, S., Costa, P., Silva, J. und Teixeira, P. (2013): „Effects of Processing and Storage on *Pediococcus pentosaceus* SB83 in Vaginal Formulations: Lyophilized Powder and Tablets“ *BioMed Research International*. (2013) (2013), 680767. doi:10.1155/2013/680767
- Borland, R. M. und Tasca, R. J. (1974): „Activation of a Na⁺-dependent amino acid transport system in preimplantation mouse embryos“ *Developmental Biology*. (36) Nr. 1 (1974), 169–182. doi:10.1016/0012-1606(74)90199-7
- Bosselmann, Frank (2006): *Genetische und phänotypische Einflussfaktoren auf die Merkmale der in vivo Embryonenproduktion und die Kalbung nach Embryotransfer*. Dissertation. Gießen: Justus Liebig Universität Gießen doi:10.22029/JLUPUB-12151
- Bouters, R., Moyaert, I., Coryn, M. und Vandeplassche, M. (1983): „The use of a PMSG antiserum in superovulated cattle: endocrinological changes and effects on timing of ovulation“ *Reproduction in Domestic Animals*. (18) Nr. 3 (1983), 172–177. doi:10.1111/j.1439-0531.1983.tb01051.x
- Braw-Tal, R. (2002): „The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells?“ *Molecular and Cellular Endocrinology*. (187) Nr. 1–2 (2002), 11–18. doi:10.1016/S0303-7207(01)00699-2
- Braw-Tal, R. und Yossefi, S. (1997): „Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary“ *Reproduction*. (109) Nr. 1 (1997), 165–171. doi:10.1530/jrf.0.1090165
- Bridges, P. J., Brusie, M. A. und Fortune, J. E. (2005): „Elevated temperature (heat stress) in vitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles“ *Domestic Animal Endocrinology*. (29) Nr. 3 (2005), 508–522. doi:10.1016/j.domaniend.2005.02.017

- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S. et al. (2004): „Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria“ *Science*. (303) Nr. 5663 (2004), 1532–1535. doi:10.1126/science.1092385
- Britt, J.H., Scott, R.G., Armstrong, J.D. und Whitacre, M.D. (1986): „Determinants of Estrous Behavior in Lactating Holstein Cows“ *Journal of Dairy Science*. (69) Nr. 8 (1986), 2195–2202. doi:10.3168/jds.S0022-0302(86)80653-1
- Bromfield, J. J., Santos, J. E. P., Block, J., Williams, R. S. und Sheldon, I. M. (2015): „Physiology and endocrinology symposium: Uterine infection: Linking infection and innate immunity with infertility in the high-producing dairy cow“ *Journal of Animal Science*. (93) Nr. 5 (2015), 2021–2033. doi:10.2527/jas.2014-8496
- Bromfield, J. J. und Sheldon, I. M. (2011): „Lipopolysaccharide Initiates Inflammation in Bovine Granulosa Cells via the TLR4 Pathway and Perturbs Oocyte Meiotic Progression in Vitro“ *Endocrinology*. (152) Nr. 12 (2011), 5029–5040. doi:10.1210/en.2011-1124
- Brunton, W. J. und Brinster, R. L. (1971): „Active chloride transport in the isolated rabbit oviduct“ *American Journal of Physiology*. (221) Nr. 2 (1971), 658–661. doi:10.1152/ajplegacy.1971.221.2.658
- Buckley, F., O’Sullivan, K., Mee, J. F., Evans, R. D. und Dillon, P. (2003): „Relationships Among Milk Yield, Body Condition, Cow Weight, and Reproduction in Spring-Calved Holstein-Friesians“ *Journal of Dairy Science*. (86) Nr. 7 (2003), 2308–2319. doi:10.3168/jds.s0022-0302(03)73823-5
- Bungartz, L. und Niemann, H. (1994): „Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination“ *Reproduction*. (101) Nr. 3 (1994), 583–591. doi:10.1530/jrf.0.1010583
- Burkart, A. D., Xiong, B., Baibakov, B., Jiménez-Movilla, M. und Dean, J. (2012): „Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy“ *Journal of Cell Biology*. (197) Nr. 1 (2012), 37–44. doi:10.1083/jcb.201112094
- Burns, D. S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J. L. H., Knight, P. G. und Ireland, J. J. (2005): „Numbers of Antral Follicles During Follicular Waves in Cattle: Evidence for High Variation Among Animals, Very High Repeatability in Individuals, and an Inverse Association with Serum Follicle-Stimulating Hormone Concentrations“ *Biology of Reproduction*. (73) Nr. 1 (2005), 54–62. doi:10.1095/biolreprod.104.036277
- Bylander, A., Lind, K., Goksör, M., Billig, H. und Larsson, D. J. (2013): „The classical progesterone receptor mediates the rapid reduction of fallopian tube ciliary beat frequency by progesterone“ *Reproductive Biology and Endocrinology*. (11) Nr. 1 (2013), 33. doi:10.1186/1477-7827-11-33
- Bylander, A., Nutu, M., Wellander, R., Goksör, M., Billig, H. und Larsson, D. J. (2010): „Rapid effects of progesterone on ciliary beat frequency in the mouse fallopian tube“ *Reproductive Biology and Endocrinology*. (8) Nr. 1 (2010), 48. doi:10.1186/1477-7827-8-48
- Callaghan, B. D. und King, G. J. (1980): „Determination of the fertilization rate of A.I. sires“ *Theriogenology*. (14)Nr. 6 (1980), 403–410. doi:10.1016/0093-691X(80)90051-5
- Callesen, H., Greve, T. und Hyttel, P. (1986): „Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle“ *Theriogenology*. (25) Nr. 1 (1986), 71–86. doi:10.1016/0093-691X(86)90184-6
- Callesen, H., Greve, T. und Hyttel, P. (1987): „Premature ovulations in superovulated cattle“ *Theriogenology*. (28) Nr. 2 (1987), 155–166. doi:10.1016/0093-691X(87)90263-9
- Canipari, R., Epifano, O., Siracusa, G. und Salustri, A. (1995): „Mouse Oocytes Inhibit Plasminogen Activator Production by Ovarian Cumulus and Granulosa Cells“ *Developmental Biology*. (167) Nr. 1 (1995), 371–378. doi:10.1006/dbio.1995.1031
- Cantoni, O., Brandi, G., Schiavano, G. F., Albano, A. und Cattabeni, F. (1989): „Lethality of hydrogen peroxide in wild type and superoxide dismutase mutants of *Escherichia coli*. (A hypothesis on the mechanism of H₂O₂-induced inactivation of *Escherichia coli*)“ *Chemico-Biological Interactions*. (70) Nr. 3–4 (1989), 281–288. doi:10.1016/0009-2797(89)90050-1
- Cao, J., Yu, Z., Liu, W., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q. et al. (2020): „Probiotic characteristics of *Bacillus coagulans* and associated implications for human health and diseases“ *Journal of Functional Foods*. (64) (2020), 103643. doi:10.1016/j.jff.2019.103643

- Carvalho, J. D. O., Sartori, R., Rodello, L., Mourão, G. B., Bicudo, S. D. und Dode, M. A. N. (2018): „Flow cytometry sex sorting affects bull sperm longevity and compromises their capacity to bind to oviductal cells“ *Livestock Science*. (207) (2018), 30–37. doi:10.1016/j.livsci.2017.11.005
- Carvalho, P. D., Souza, A. H., Sartori, R., Hackbart, K. S., Dresch, A. R., Vieira, L. M. et al. (2013): „Effects of deep-horn AI on fertilization and embryo production in superovulated cows and heifers“ *Theriogenology*. (80) Nr. 9 (2013), 1074–1081. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.08.008
- Carvalho, P.D., Souza, A.H., Amundson, M.C., Hackbart, K.S., Fuenzalida, M.J., Herlihy, M.M. et al. (2014): „Relationships between fertility and postpartum changes in body condition and body weight in lactating dairy cows“ *Journal of Dairy Science*. (97) Nr. 6 (2014), 3666–3683. doi:10.3168/jds.2013-7809
- Castro, B., Candelaria, J. I., Austin, M. M., Shuster, C. B., Gifford, C. A., Denicol, A. C. et al. (2024): „Low-dose lipopolysaccharide exposure during oocyte maturation disrupts early bovine embryonic development“ *Theriogenology*. (214) (2024), 57–65. doi:10.1016/j.theriogenology.2023.10.010
- Cavalcante, B. N., Matos-Brito, B. G., Paulino, L. R. F. M., Silva, B. R., Aguiar, A. W. M., De Almeida, E. F. M. et al. (2019): „Effects of melatonin on morphology and development of primordial follicles during in vitro culture of bovine ovarian tissue“ *Reproduction in Domestic Animals*. (54) Nr. 12 (2019), 1567–1573. doi:10.1111/rda.13565
- Cavallari de Castro, F., Leal, C. L. V., Zvi, R. und Hansen, P. J. (2019): „Effects of melatonin on production of reactive oxygen species and developmental competence of bovine oocytes exposed to heat shock and oxidative stress during *in vitro* maturation“ *Zygote*. (27) Nr. 3 (2019), 180–186. doi:10.1017/S0967199419000236
- Chagas e Silva, J., Lopes Da Costa, L. und Robalo Silva, J. (2002): „Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers“ *Animal Reproduction Science*. (69) Nr. 1–2 (2002), 1–8. doi:10.1016/S0378-4320(01)00172-5
- Chandolia, R. K., Peltier, M. R., Tian, W. und Hansen, P. J. (1999): „Transcriptional Control of Development, Protein Synthesis, and Heat-Induced Heat Shock Protein 70 Synthesis in 2-Cell Bovine Embryos“ *Biology of Reproduction*. (61) Nr. 6 (1999), 1644–1648. doi:10.1095/biolreprod61.6.1644
- Chang, H. und Suarez, S. S. (2010): „Rethinking the Relationship Between Hyperactivation and Chemotaxis in Mammalian Sperm“ *Biology of Reproduction*. (83) Nr. 4 (2010), 507–513. doi:10.1095/biolreprod.109.083113
- Chebel, R. C., Demétrio, D. G. B. und Metzger, J. (2008): „Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds“ *Theriogenology*. (69) Nr. 1 (2008), 98–106. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.09.008
- Chebel, R. C., Santos, J. E. P., Reynolds, J. P., Cerri, R. L. A., Juchem, S. O. und Overton, M. (2004): „Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows“ *Animal Reproduction Science*. (84) Nr. 3–4 (2004), 239–255. doi:10.1016/j.anireprosci.2003.12.012
- Cheong, S. H., Nydam, D. V., Galvão, K. N., Crosier, B. M. und Gilbert, R. O. (2011): „Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows“ *Journal of Dairy Science*. (94) Nr. 2 (2011), 762–770. doi:10.3168/jds.2010-3439
- Chesta, P., Marañá, D., Peres, L. und Bó, G. A. (2006): „Effect of time of removal of a progesterone releasing device and GnRH treatment on the interval to and distribution of ovulations in superstimulated beef cows“ *Reproduction, Fertility and Development*. (18) Nr. 2 (2006), 288. doi:10.1071/RDv18n2Ab362
- Chrenek, P., Kubovičová, E., Olexíková, L., Makarevich, A. V., Toporczerová, S. und Ostró, A. (2015): „Effect of body condition and season on yield and quality of *in vitro* produced bovine embryos“ *Zygote*. (23) Nr. 6 (2015), 893–899. doi:10.1017/S0967199414000604
- Chupin, D. und Procureur, R. (1983): „Efficiency of pituitary extracts (FSH) for induction of superovulation in cattle“ *Animal Reproduction Science*. (6) Nr. 1 (1983), 11–23. doi:10.1016/0378-4320(83)90003-9

- Colazo, M. G. und Ambrose, D. J. (2014): Twin Pregnancies: An Observational Study from Two Alberta Dairy Herds. *WCDS Advances in Dairy Technology*. (Band 26, S. 376). doi:10.13140/2.1.2475.2647
- Conneely, O. M., Mulac-Jericevic, B. und Lydon, J. P. (2003): „Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms“ *Steroids*. (68) Nr. 10–13 (2003), 771–778. doi:10.1016/S0039-128X(03)00126-0
- Cook, N. B. und Reinemann, D. J. (2007): A tool box for assessing cow, udder and teat hygiene.
- Cooke, B. A. (1999): „Signal transduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms in the control of steroidogenesis“ *Molecular and Cellular Endocrinology*. (151) Nr. 1–2 (1999), 25–35. doi:10.1016/S0303-7207(98)00255-X
- Coton, M., Berthier, F. und Coton, E. (2008): „Rapid identification of the three major species of dairy obligate heterofermenters *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus parabuchneri* by species-specific duplex PCR“ *FEMS Microbiology Letters*. (284) Nr. 2 (2008), 150–157. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01206.x
- Coy, P., García-Vázquez, F. A., Visconti, P. E. und Avilés, M. (2012): „Roles of the oviduct in mammalian fertilization“ *Reproduction*. (144) Nr. 6 (2012), 649–660. doi:10.1530/REP-12-0279
- Cross, M. H. (1973): „Active Sodium and Chloride Transport Across The Rabbit Blastocoele Wall“ *Biology of Reproduction*. (8) Nr. 5 (1973), 566–575. doi:10.1093/biolreprod/8.5.566
- Crowe, M.A., Kelly, P., Driancourt, M.A., Boland, M.P. und Roche, J.F. (2001): „Effects of Follicle-Stimulating Hormone With and Without Luteinizing Hormone on Serum Hormone Concentrations, Follicle Growth, and Intrafollicular Estradiol and Aromatase Activity in Gonadotropin-Releasing Hormone-Immunized Heifers“ *Biology of Reproduction*. (64) Nr. 1 (2001), 368–374. doi:10.1095/biolreprod64.1.368
- Crozet, N. (1984): „Ultrastructural aspects of in vivo fertilization in the cow“ *Gamete Research*. (10) Nr. 3 (1984), 241–251. doi:10.1002/mrd.1120100304
- Curran, L., Baldassarre, H. und Bordignon, V. (2021): „In Vitro Production of Embryos from Prepubertal Holstein Cattle and Mediterranean Water Buffalo: Problems, Progress and Potential“ *Animals*. (11) Nr. 8 (2021), 2275. doi:10.3390/ani11082275
- Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J. F., Simard, R. E., Huang, J. und Lacroix, C. (1991): „Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*“ *Applied and Environmental Microbiology*. (57) Nr. 12 (1991), 3450–3455. doi:10.1128/aem.57.12.3450-3455.1991
- Dahiya, R. S. und Speck, M. L. (1968): „Hydrogen Peroxide Formation by Lactobacilli and Its Effect on *Staphylococcus aureus*“ *Journal of Dairy Science*. (51) Nr. 10 (1968), 1568–1572. doi:10.3168/jds.S0022-0302(68)87232-7
- Dalton, J. C., Nadir, S., Bame, J. H., Noftsinger, M. und Saacke, R. G. (2000): „The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows.“ *Journal of Animal Science*. (78) Nr. 8 (2000), 2081–2085. doi:10.2527/2000.7882081x
- Darrow, M. D., Lindner, G. M. und Goemann, G. G. (1982): „Superovulation and fertility in lactating and dry dairy cows“ *Theriogenology*. (17) Nr. 1 (1982), 84. doi:10.1016/0093-691X(82)90128-5
- Dascanio, J. J., Schweizer, C. und Ley, W. B. (2001): „Equine fungal endometritis“ *Equine Veterinary Education*. (13) Nr. 6 (2001), 324–329. doi:10.1111/j.2042-3292.2001.tb00122.x
- De Paula, A. T., Jeronymo-Ceneviva, A. B., Todorov, S. D. und Penna, A. L. B. (2015): „The Two Faces of *Leuconostoc mesenteroides* in Food Systems“ *Food Reviews International*. (31) Nr. 2 (2015), 147–171. doi:10.1080/87559129.2014.981825
- De Vries, M. J. und Veerkamp, R.F. (2000): „Energy Balance of Dairy Cattle in Relation to Milk Production Variables and Fertility“ *Journal of Dairy Science*. (83) Nr. 1 (2000), 62–69. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74856-9
- DeJarnette, J. M., Saacke, R. G., Bame, J. und Vogler, C. J. (1992): „Accessory sperm: their importance to fertility and embryo quality, and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle“ *Journal of Animal Science*. (70) Nr. 2 (1992), 484–491. doi:10.2527/1992.702484x
- Deng, Q., Odhiambo, J. F., Farooq, U., Lam, T., Dunn, S. M., Gänzle, M. G. et al. (2015a): „Intravaginally administered lactic acid bacteria expedited uterine involution and modulated hormonal profiles of transition dairy cows“ *Journal of Dairy Science*. (98) Nr. 9 (2015a), 6018–6028. doi:10.3168/jds.2014-8559

- Deng, Q., Odhiambo, John F., Farooq, U., Lam, T., Dunn, S. M. und Ametaj, B. N. (2015b): „Intravaginal Lactic Acid Bacteria Modulated Local and Systemic Immune Responses and Lowered the Incidence of Uterine Infections in Periparturient Dairy Cows“ *PLOS ONE*. (10) Nr. 4 (2015b), e0124167. doi:10.1371/journal.pone.0124167
- Deutscher Wetterdienst (Hrsg.) (2024): „Klimatologischer Rückblick auf 2023: Das bisher wärmste Jahr in Deutschland“ *Abteilung für Klimaüberwachung und Hydrometeorologie*. (2024).
- Diaz, T., Pancarci, S. M., Drost, M., Schmitt, E. J., Ambrose, J. D., Fredriksson, W. E. et al. (2001): „Effects of the Persistent Dominant Follicle on the Ability of Follicle Stimulating Hormone to Induce Follicle Development and Ovulatory Responses“ *Journal of Dairy Science*. (84) Nr. 1 (2001), 88–99. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74456-6
- Dieleman, S. J. und Bevers, M. M. (1987): „Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the preovulatory LH surge on time and number of ovulations in PMSG/PG-treated cows“ *Reproduction*. (81) Nr. 2 (1987), 533–542. doi:10.1530/jrf.0.0810533
- Dieleman, S. J. und Bevers, M. M. (1993): „Folliculogenesis and oocyte maturation in superovulated cattle“ *Molecular Reproduction and Development*. (36) Nr. 2 (1993), 271–273. doi:10.1002/mrd.1080360228
- Dieleman, S. J., Bevers, M. M., Vos, P. L. A. M. und de Loos, F. A. M. (1993): „PMSG/anti-PMSG in cattle: A simple and efficient superovulatory treatment?“ *Theriogenology*. (39) Nr. 1 (1993), 25–41. doi:10.1016/0093-691X(93)90022-w
- Dieleman, S. J., Bevers, M. M., Wurth, Y. A., Gielen, J. T. und Willemse, A. H. (1989): „Improved embryo yield and condition of donor ovaries in cows after PMSG superovulation with monoclonal anti-PMSG administered shortly after the preovulatory LH peak“ *Theriogenology*. (31) Nr. 2 (1989), 473–487. doi:10.1016/0093-691X(89)90552-9
- Dieleman, S. J., Kruip, Th. A. M., Fontijne, P., De Jong, W. H. R. und Van Der Weyden, G. C. (1983a): „Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone“ *Journal of Endocrinology*. (97) Nr. 1 (1983a), 31–42. doi:10.1677/joe.0.0970031
- Diskin, M. G. (2018): „Review: Semen handling, time of insemination and insemination technique in cattle“ *Animal*. (12) Nr. 1 (2018), s75–s84. doi:10.1017/S1751731118000952
- Diskin, M. G., Mackey, D. R., Roche, J. F. und Sreenan, J. M. (2003): „Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle“ *Animal Reproduction Science*. (78) Nr. 3–4 (2003), 345–370. doi:10.1016/S0378-4320(03)00099-X
- DLG, Ausschuss Technik in der Tierhaltung (2021): Vermeidung von Hitzestress bei Milchkühen. DLG Merkblatt 450, 2. Aufl., komplett überarbeitet.
- D'Occhio, M. J., Baruselli, P. S. und Campanile, G. (2019): „Metabolic health, the metabolome and reproduction in female cattle: a review“ *Italian Journal of Animal Science*. (18) Nr. 1 (2019), 858–867. doi:10.1080/1828051X.2019.1600385
- Domínguez, M. M. (1995): „Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows“ *Theriogenology*. (43) Nr. 8 (1995), 1405–1418. doi:10.1016/0093-691X(95)00126-S
- Donaldson, L. E. (1984): „Cattle breed as a source of variation in embryo transfer“ *Theriogenology*. (21) Nr. 6 (1984), 1013–1018. doi:10.1016/0093-691X(84)90396-0
- Dos Santos, R. M., Goissis, M. D., Fantini, D. A., Bertan, C. M., Vasconcelos, J. L. M. und Binelli, M. (2009): „Elevated progesterone concentrations enhance prostaglandin F2 α synthesis in dairy cows“ *Animal Reproduction Science*. (114) Nr. 1–3 (2009), 62–71. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.09.016
- Driancourt, M. A. (1991): „Follicular dynamics in sheep and cattle“ *Theriogenology*. (35) Nr. 1 (1991), 55–79. doi:10.1016/0093-691X(91)90148-7
- Drillich, M., Tesfaye, D., Rings, F., Schellander, K., Heuwieser, W. und Hoelker, M. (2012): „Effects of polymorphonuclear neutrophile infiltration into the endometrial environment on embryonic development in superovulated cows“ *Theriogenology*. (77) Nr. 3 (2012), 570–578. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.08.033
- Drobniewski, F. A. (1993): „*Bacillus cereus* and related species“ *Clinical Microbiology Reviews*. (6) Nr. 4 (1993), 324–338.

- Drost, M., Ambrose, J. D., Thatcher, M.-J., Cantrell, C. K., Wolfsdorf, K. E., Hasler, J. F. et al. (1999): „Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in florida“ *Theriogenology*. (52) Nr. 7 (1999), 1161–1167. doi:10.1016/S0093-691X(99)00208-3
- Ducibella, T. und Anderson, E. (1975): „Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: Prerequisites for morphogenesis of the blastocyst“ *Developmental Biology*. (47) Nr. 1 (1975), 45–58. doi:10.1016/0012-1606(75)90262-6
- Dunlap, S. E. und Vincent, C. K. (1971): „Influence of Postbreeding Thermal Stress on Conception Rate in Beef Cattle“ *Journal of Animal Science*. (32) Nr. 6 (1971), 1216–1218. doi:10.2527/jas1971.3261216x
- Ealy, A. D., Drost, M. und Hansen, P. J. (1993): „Developmental Changes in Embryonic Resistance to Adverse Effects of Maternal Heat Stress in Cows“ *Journal of Dairy Science*. (76) Nr. 10 (1993), 2899–2905. doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77629-8
- Ealy, A. D., Howell, J. L., Monterroso, V. H., Aréchiga, C. F. und Hansen, P. J. (1995): „Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants“ *Journal of Animal Science*. (73) Nr. 5 (1995), 1401–1407. doi:10.2527/1995.7351401x
- Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T. und Webster, G. (1989): „A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows“ *Journal of Dairy Science*. (72) Nr. 1 (1989), 68–78. doi:10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0
- Edwards, J. L. und Hansen, P. J. (1997): „Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock“ *Molecular Reproduction and Development*. (46) Nr. 2 (1997), 138–145. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199702)46:2<138::AID-MRD4>3.0.CO;2-R
- Edwards, J. Lannett, Ealy, A. D., Monterroso, V. H. und Hansen, Peter J. (1997): „Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos“ *Molecular Reproduction and Development*. (48) Nr. 1 (1997), 25–33. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199709)48:1<25::AID-MRD4>3.0.CO;2-R
- Egberts, J., Detterer, J., Park, A. und Meinecke-Tillmann, S. (2016b): „Exfoliative Endometrial Cytology in Embryo Donor Cows—Comparison of Sampling Localizations for the Diagnosis of Subclinical Endometritis“ *Veterinary Sciences*. (3) Nr. 4 (2016b), 35. doi:10.3390/vetsci3040035
- Egberts, J., Detterer, J., Park, A. und Meinecke-Tillmann, S. (2016a): Haben polymorphkernige neutrophile Granulozyten im Endometriumabstrich einen Einfluss auf die Embryonengewinnung bei Holstein-Spenderkühen? - Erste Ergebnisse -. *Tagungsband der 43. Jahrestagung AET-d*. (S. 22–23). Gehalten auf der 43. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder, Neustadt a.d. Aisch e.V.
- Eisenbach, M. und Giojalas, L. C. (2006): „Sperm guidance in mammals — an unpaved road to the egg“ *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. (7)Nr. 4 (2006), 276–285. doi:10.1038/nrm1893
- El-Banna, A. A. und Hafez, E. S. E. (1970): „Egg Transport in Beef Cattle“ *Journal of Animal Science*. (30) Nr. 3 (1970), 430–432. doi:10.2527/jas1970.303430x
- Elliott, L., McMahon, K. J., Gier, H. T. und Marion, G. B. (1968): „Uterus of the cow after parturition: bacterial content.“ *American Journal of Veterinary Research*. (29) Nr. 1 (1968), 77–81.
- Elsden, R. P., Hasler, J. F. und Seidel, G. E. (1976): „Non-surgical recovery of bovine eggs“ *Theriogenology*. (6) Nr. 5 (1976), 523–532. doi:10.1016/0093-691X(76)90120-5
- Elsden, R. P., Nelson, L. D. und Seidel, G. E. (1978): „Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin“ *Theriogenology*. (9) Nr. 1 (1978), 17–26. doi:10.1016/0093-691X(78)90049-3
- Elvin, J. A., Yan, C., Wang, P., Nishimori, K. und Matzuk, M. M. (1999): „Molecular Characterization of the Follicle Defects in the Growth Differentiation Factor 9-Deficient Ovary“ *Molecular Endocrinology*. (13) Nr. 6 (1999), 1018–1034. doi:10.1210/mend.13.6.0309
- Eppig, J. J. (1980): „Regulation of Cumulus Oophorus Expansion by Gonadotropins in vivo and in vitro“ *Biology of Reproduction*. (23) Nr. 3 (1980), 545–552. doi:10.1095/biolreprod23.3.545
- Eppig, J. J. (1981): „Prostaglandin E2 Stimulates Cumulus Expansion and Hyaluronic Acid Synthesis by Cumuli Oophori Isolated from Mice“ *Biology of Reproduction*. (25) Nr. 1 (1981), 191–195. doi:10.1095/biolreprod25.1.191

- Eppig, J. J. (1991): „Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells“ *BioEssays*. (13) Nr. 11 (1991), 569–574. doi:10.1002/bies.950131105
- Eppig, J. J. (2001): „Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals“ *Reproduction*. (122) Nr. 6 (2001), 829–838. doi:https://doi.org/10.1530/rep.0.1220829
- Eppig, J. J., Wigglesworth, K., Pendola, F. und Hirao, Y. (1997): „Murine Oocytes Suppress Expression of Luteinizing Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acid by Granulosa Cells“ *Biology of Reproduction*. (56) Nr. 4 (1997), 976–984. doi:10.1095/biolreprod56.4.976
- Eschenbach, D. A., Davick, P. R., Williams, B. L., Klebanoff, S. J., Young-Smith, K., Critchlow, C. M. et al. (1989): „Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis“ *Journal of Clinical Microbiology*. (27) Nr. 2 (1989), 251–256. doi:10.1128/jcm.27.2.251-256.1989
- Espeche, M. C., Pellegrino, M., Frola, I., Larriestra, A., Bogni, C. und Nader-Macías, M. E. F. (2012): „Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis“ *Anaerobe*. (18) Nr. 1 (2012), 103–109. doi:10.1016/j.anaerobe.2012.01.002
- Eyestone, W. H. und First, N. L. (1988): „Cell cycle analysis of early bovine embryos“ *Theriogenology*. (29) Nr. 1 (1988), 243. doi:10.1016/0093-691X(88)90071-4
- Fang, F., Li, Y., Lu, X., Wu, K., Zhou, L., Sun, Y. et al. (2023): „Effect of potential postbiotics derived from food-isolated *Lactobacillus parabuchneri* on different enterotypes of human gut microbiome“ *LWT - Food Science and Technology*. (182) (2023), 114782. doi:10.1016/j.lwt.2023.114782
- Fardini, Y., Chung, P., Dumm, R., Joshi, N. und Han, Y. W. (2010): „Transmission of Diverse Oral Bacteria to Murine Placenta: Evidence for the Oral Microbiome as a Potential Source of Intrauterine Infection“ *Infection and Immunity*. (78) Nr. 4 (2010), 1789–1796. doi:10.1128/IAI.01395-09
- Faust, M. A., McDaniel, B. T., Robison, O. W. und Britt, J. H. (1988): „Environmental and Yield Effects on Reproduction in Primiparous Holsteins“ *Journal of Dairy Science*. (71) Nr. 11 (1988), 3092–3099. doi:10.3168/jds.S0022-0302(88)79909-9
- Ferreira, R. M., Ayres, H., Chiaratti, M. R., Ferraz, M. L., Araújo, A. B., Rodrigues, C. A. et al. (2011): „The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts“ *Journal of Dairy Science*. (94) Nr. 5 (2011), 2383–2392. doi:10.3168/jds.2010-3904
- Ferris, R. A., McCue, P. M., Borlee, G. I., Glapa, Kristina E., Martin, K. H., Mangalea, Mihnea R. et al. (2017): „Model of Chronic Equine Endometritis Involving a *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm“ *Infection and Immunity*. (85) Nr. 12 (2017), e00332-17. doi:10.1128/IAI.00332-17
- Fijan, S., Fijan, T. und Connil, N. (2023): „Overview of Probiotic Strains of *Weizmannia coagulans*, Previously Known as *Bacillus coagulans*, as Food Supplements and Their Use in Human Health“ *Applied Microbiology*. (3) Nr. 3 (2023), 935–947. doi:10.3390/applmicrobiol3030064
- Filion, F., Bouchard, N., Goff, A. K., Lussier, J. G. und Sirois, J. (2001): „Molecular Cloning and Induction of Bovine Prostaglandin E Synthase by Gonadotropins in Ovarian Follicles Prior to Ovulation in Vivo“ *Journal of Biological Chemistry*. (276) Nr. 36 (2001), 34323–34330. doi:10.1074/jbc.M103709200
- Fischer, C., Drillich, M., Odau, S., Heuwieser, W., Einspanier, R. und Gabler, C. (2010): „Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis“ *Reproduction, Fertility and Development*. (22) Nr. 5 (2010), 818. doi:10.1071/RD09120
- Fissore, R. A., Dobrinsky, J. R., Balise, J. J., Duby, R. T. und Robl, J. M. (1992): „Patterns of Intracellular Ca²⁺ Concentrations in Fertilized Bovine Eggs“ *Biology of Reproduction*. (47) Nr. 6 (1992), 960–969. doi:10.1095/biolreprod47.6.960
- Fontes, P. K., Razza, E. M., Pupulim, A. G. R., Barros, C. M. und De Souza Castilho, A. C. (2019): „Equine chorionic gonadotropin increases estradiol levels in the bovine oviduct and drives the transcription of genes related to fertilization in superstimulated cows“ *Molecular Reproduction and Development*. (86) Nr. 11 (2019), 1582–1591. doi:10.1002/mrd.23243

- Food and Agriculture Organization of the United Nations und World Health Organization (Hrsg.) (2006): „Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation“. Reihe: FAO food and nutrition paper. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations : World Health Organization.
- Forde, N., Carter, F., Di Francesco, S., Mehta, J. P., Garcia-Herreros, M., Gad, A. et al. (2012): „Endometrial response of beef heifers on day 7 following insemination to supraphysiological concentrations of progesterone associated with superovulation“ *Physiological Genomics*. (44) Nr. 22 (2012), 1107–1115. doi:10.1152/physiolgenomics.00092.2012
- Fredheim, E. G. A., Klingenberg, C., Rohde, H., Frankenberger, S., Gaustad, P., Flægstad, T. et al. (2009): „Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*“ *Journal of Clinical Microbiology*. (47) Nr. 4 (2009), 1172–1180. doi:10.1128/JCM.01891-08
- Friedman, E., Voet, H., Reznikov, D., Dagoni, I. und Roth, Z. (2011): „Induction of successive follicular waves by gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F₂α to improve fertility of high-producing cows during the summer and autumn“ *Journal of Dairy Science*. (94) Nr. 5 (2011), 2393–2402. doi:10.3168/jds.2010-3939
- Gabler, C., Drillich, M., Fischer, C., Holder, C., Heuwieser, W. und Einspanier, R. (2009): „Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis“ *Theriogenology*. (71) Nr. 6 (2009), 993–1004. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.11.009
- Gabler, C., Fischer, C., Drillich, M., Einspanier, R. und Heuwieser, W. (2010): „Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum“ *Reproductive Biology and Endocrinology*. (8) (2010), 152. doi:10.1186/1477-7827-8-152
- Gad, A., Besenfelder, U., Rings, F., Ghanem, N., Salilew-Wondim, D., Hossain, M. M. et al. (2011): „Effect of reproductive tract environment following controlled ovarian hyperstimulation treatment on embryo development and global transcriptome profile of blastocysts: implications for animal breeding and human assisted reproduction“ *Human Reproduction*. (26) Nr. 7 (2011), 1693–1707. doi:10.1093/humrep/der110
- Galvão, K. N., Bicalho, R. C. und Jeon, S. J. (2019): „Symposium review: The uterine microbiome associated with the development of uterine disease in dairy cows“ *Journal of Dairy Science*. (102) Nr. 12 (2019), 11786–11797. doi:10.3168/jds.2019-17106
- Galvão, K. N., Frajblat, M., Brittin, S. B., Butler, W. R., Guard, C. L. und Gilbert, R. O. (2009): „Effect of prostaglandin F₂α on subclinical endometritis and fertility in dairy cows“ *Journal of Dairy Science*. (92) Nr. 10 (2009), 4906–4913. doi:10.3168/jds.2008-1984
- Gandolfi, F., Passoni, L., Modina, S., Brevini, T. A., Varga, Z. und Lauria, A. (1993): „Similarity of an oviduct-specific glycoprotein between different species“ *Reproduction, Fertility and Development*. (5) Nr. 4 (1993), 433–443. doi:10.1071/RD9930433
- Gani, M., Amin, M. M., Alam, M. G. S., Kayesh, M. E. H., Karim, M. R., Samad, M. A. et al. (2008): „Bacterial flora associated with repeat breeding and uterine infections in dairy cows“ *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*. (6) Nr. 1 (2008), 79–86. doi:10.3329/bjvm.v6i1.1342
- García Guerra, A., Tribulo, A., Yapura, J., Singh, J. und Mapletoft, R. J. (2012): „Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows“ *Theriogenology*. (78) Nr. 2 (2012), 353–360. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.02.010
- Garner, Duane L. (2006): „Flow cytometric sexing of mammalian sperm“ *Theriogenology*. (65) Nr. 5 (2006), 943–957. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.009
- Garoussi, M. T., Khosrave, A. R. und Havareshti, P. (2007): „Mycoflora of cervicovaginal fluids in dairy cows with or without reproductive disorders“ *Mycopathologia*. (164) Nr. 2 (2007), 97–100. doi:10.1007/s11046-007-9031-x
- Gärtner, M. A., Bondzio, A., Braun, N., Jung, M., Einspanier, R. und Gabler, C. (2015): „Detection and Characterisation of *Lactobacillus* spp. in the Bovine Uterus and Their Influence on Bovine Endometrial Epithelial Cells *In Vitro*“ *PLOS ONE*. (10) Nr. 3 (2015), e0119793. doi:10.1371/journal.pone.0119793
- Gendelman, M., Aroyo, A., Yavin, S. und Roth, Z. (2010): „Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos“ *Reproduction*. (140) Nr. 1 (2010), 73–82. doi:10.1530/REP-10-0055

- Genís, S., Bach, À., Fàbregas, F. und Arís, A. (2016): „Potential of lactic acid bacteria at regulating *Escherichia coli* infection and inflammation of bovine endometrium“ *Theriogenology*. (85) Nr. 4 (2016), 625–637. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.09.054
- Gerena, R. L. und Killian, G. J. (1990): „Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrous cycle“ *Journal of Experimental Zoology*. (256) Nr. 1 (1990), 113–120. doi:10.1002/jez.1402560114
- Ghasemi, F., Gonzalez-Cano, P., Griebel, P. J. und Palmer, C. (2012): „Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis“ *Theriogenology*. (78) Nr. 7 (2012), 1538–1547. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.06.022
- Gibbons, J. R., Wiltbank, M. C. und Ginther, O. J. (1999): „Relationship between Follicular Development and the Decline in the Follicle-Stimulating Hormone Surge in Heifers“ *Biology of Reproduction*. (60) Nr. 1 (1999), 72–77. doi:10.1095/biolreprod60.1.72
- Gilad, E., Meidan, R., Berman, A., Graber, Y. und Wolfenson, D. (1993): „Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows“ *Reproduction*. (99) Nr. 2 (1993), 315–321. doi:10.1530/jrf.0.0990315
- Gilbert, R. O., Shin, S. T., Guard, C. L., Erb, H. N. und Frajblat, M. (2005): „Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows“ *Theriogenology*. (64) Nr. 9 (2005), 1879–1888. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.04.022
- Gilchrist, R. B., Morrissey, M. P., Ritter, L. J. und Armstrong, D. T. (2003): „Comparison of oocyte factors and transforming growth factor- β in the regulation of DNA synthesis in bovine granulosa cells“ *Molecular and Cellular Endocrinology*. (201) Nr. 1–2 (2003), 87–95. doi:10.1016/S0303-7207(02)00429-X
- Gilchrist, R. B., Ritter, L. J. und Armstrong, D. T. (2001): „Mouse Oocyte Mitogenic Activity Is Developmentally Coordinated throughout Folliculogenesis and Meiotic Maturation“ *Developmental Biology*. (240) Nr. 1 (2001), 289–298. doi:10.1006/dbio.2001.0451
- Gilchrist, R. B., Ritter, L. J. und Armstrong, D. T. (2004): „Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals“ *Animal Reproduction Science*. (82–83) (2004), 431–446. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.05.017
- Gilula, N. B., Epstein, M. L. und Beers, W. H. (1978): „Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex.“ *The Journal of cell biology*. (78) Nr. 1 (1978), 58–75. doi:10.1083/jcb.78.1.58
- Ginther, O. J., Beg, M. A., Bergfelt, D. R., Donadeu, F. X. und Kot, K. (2001): „Follicle Selection in Monovular Species“ *Biology of Reproduction*. (65) Nr. 3 (2001), 638–647. doi:10.1095/biolreprod65.3.638
- Ginther, O. J., Bergfelt, D. R., Kulick, L. J. und Kot, K. (1998): „Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle“ *Theriogenology*. (50) Nr. 4 (1998), 507–519. doi:10.1016/S0093-691X(98)00157-5
- Ginther, O. J., Bergfelt, D. R., Kulick, L. J. und Kot, K. (2000): „Selection of the Dominant Follicle in Cattle: Role of Estradiol“ *Biology of Reproduction*. (63) Nr. 2 (2000), 383–389. doi:10.1095/biolreprod63.2.383
- Ginther, O. J., Knopf, L. und Kastelic, J. P. (1989): „Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves“ *Reproduction*. (87) Nr. 1 (1989), 223–230. doi:10.1530/jrf.0.0870223
- Ginther, O. J., Wiltbank, M. C., Fricke, P. M., Gibbons, J. R. und Kot, K. (1996): „Selection of the Dominant Follicle in Cattle“ *Biology of Reproduction*. (55) (1996), 1187–1194.
- Givens, M. D. (2018): „Review: Risks of disease transmission through semen in cattle“ *Animal*. (12) Nr. S1 (2018), s165–s171. doi:10.1017/S1751731118000708
- Gobbetti, M. und Calasso, M. (2014): *Streptococcus* | Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology*. (2. Aufl., S. 535–553). Elsevier.
- Gonella-Díaza, A. M., Mesquita, F. S., Da Silva, K. R., De Carvalho Balieiro, J. C., Dos Santos, N. P., Pugliesi, G. et al. (2017): „Sex steroids modulate morphological and functional features of the bovine oviduct“ *Cell and Tissue Research*. (370) Nr. 2 (2017), 319–333. doi:10.1007/s00441-017-2666-0

- Gordon, I., Boland, M. P., McGovern, H. und Lynn, G. (1987): „Effect of season on superovulatory responses and embryo quality in Holstein cattle in Saudi Arabia“ *Theriogenology*. (27) Nr. 1 (1987), 231. doi:10.1016/0093-691X(87)90108-7
- Goulding, D., Williams, D. H., Roche, J. F. und Boland, M. P. (1994): „Effect of exogenous progesterone on superovulatory response in heifers inseminated with fresh or frozen semen“ *Reproduction*. (100) Nr. 2 (1994), 505–510. doi:10.1530/jrf.0.1000505
- Goulding, D., Williams, D. H., Roche, J. F. und Boland, M. P. (1996): „Factors affecting superovulation in heifers treated with PMSG“ *Theriogenology*. (45) Nr. 4 (1996), 765–773. doi:10.1016/0093-691X(96)00006-4
- Graf, A., Krebs, S., Zakhartchenko, V., Schwalb, B., Blum, H. und Wolf, E. (2014): „Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (111) Nr. 11 (2014), 4139–4144. doi:10.1073/pnas.1321569111
- Granacher, O., Gabler, C. und Wrenzycki, C. (2023): „*Lactobacillus* conditioned medium supplemented during in vitro maturation of bovine oocytes helps to overcome the negative LPS effect“ *Reproduction in Domestic Animals*. (58) Nr. 13 (2023), 15.
- Granacher, O., Zimmer, B., Rabenau, B., Fries, A.-S., Gabler, C. und Wrenzycki, C. (2026): „Alterations in bovine COC due to LPS and/or *Lactobacillus*-conditioned medium supplementation during IVM are not transferred to the resulting embryos“ *Reproduction, Fertility and Development*. (38) Nr. 1 (2026), RDv38n1Ab64. doi:10.1071/RDv38n1Ab64
- Graves, W. M., Dowlen, H.H., Kiess, G. A. und Riley, T. L. (1991): „Evaluation of Uterine Body and Bilateral Uterine Horn Insemination Techniques“ *Journal of Dairy Science*. (74) Nr. 10 (1991), 3454–3456. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78535-4
- Griffin, J. F. T., Hartigan, P. J. und Nunn, W. R. (1974): „Non-specific uterine infection and bovine fertility: I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks post-partum“ *Theriogenology*. (1) Nr. 3 (1974), 91–106. doi:10.1016/0093-691X(74)90052-1
- Griffiths, G. S., Miller, K. A., Galileo, D. S. und Martin-DeLeon, P. A. (2008): „Murine SPAM1 is secreted by the estrous uterus and oviduct in a form that can bind to sperm during capacitation: acquisition enhances hyaluronic acid-binding ability and cumulus dispersal efficiency“ *Reproduction*. (135) Nr. 3 (2008), 293–301. doi:10.1530/REP-07-0340
- Grippio, A. A., Henault, M. A., Anderson, S. H. und Killian, G. J. (1992): „Cation Concentrations in Fluid from the Oviduct Ampulla and Isthmus of Cows During the Estrous Cycle“ *Journal of Dairy Science*. (75) Nr. 1 (1992), 58–65. doi:10.3168/jds.S0022-0302(92)77738-8
- Guilbault, L. A., Grasso, F., Lussier, J. G., Rouillier, P. und Matton, P. (1991): „Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle“ *Reproduction*. (91) Nr. 1 (1991), 81–89. doi:10.1530/jrf.0.0910081
- Guillomot, M., Fléchon, J.-E. und Wintenberger-Torres, S. (1981): „Conceptus attachment in the Ewe: an ultrastructural study“ *Placenta*. (2) Nr. 2 (1981), 169–181. doi:10.1016/S0143-4004(81)80021-5
- Guo, Y., Van Schaik, T., Jhamat, N., Niazi, A., Chanrot, M., Charpigny, G. et al. (2019): „Differential gene expression in bovine endometrial epithelial cells after challenge with LPS; specific implications for genes involved in embryo maternal interactions“ *PLOS ONE*. (14) Nr. 9 (2019), e0222081. doi:10.1371/journal.pone.0222081
- Gutiérrez-Reinoso, M. A., Aguilera, C. J., Navarrete, F., Cabezas, J., Castro, F. O., Cabezas, I. et al. (2022): „Effects of Extra-Long-Acting Recombinant Bovine FSH (bscrFSH) on Cattle Superovulation“ *Animals*. (12) Nr. 2 (2022), 153. doi:10.3390/ani12020153
- Gwazdauskas, F. C., Thatcher, W. W., Kiddy, C. A., Paape, M. J. und Wilcox, C. J. (1981): „Hormonal patterns during heat stress following PGF $_{2\alpha}$ -tham salt induced luteal regression in heifers“ *Theriogenology*. (16) Nr. 3 (1981), 271–285. doi:10.1016/0093-691X(81)90012-1
- Gwazdauskas, F. C., Thatcher, W. W. und Wilcox, C. J. (1973): „Physiological, Environmental, and Hormonal Factors at Insemination Which May Affect Conception“ *Journal of Dairy Science*. (56) Nr. 7 (1973), 873–877. doi:10.3168/jds.S0022-0302(73)85270-1
- Hafez, E. S. E., Sugie, T. und Gordon, I. (1963): „Superovulation and related phenomena in the beef cow. I. Superovulatory responses following PMS and HCG injections“ *Reproduction*. (5) Nr. 3 (1963), 359–379. doi:10.1530/jrf.0.0050359

- Hahn, J. (1978): „Die unblutige Eigewinnung beim Rind unter Berücksichtigung der Vorbereitung der Spendertiere und der Entwicklung der Eizellen in Eileiter und Gebärmutter“ *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*. (85) (1978), 113–152.
- Hajjar, R., Ambaraghassi, G., Sebahang, H., Schwenter, F. und Su, S.-H. (2020): „*Raoultella ornithinolytica*: Emergence and Resistance“ *Infection and Drug Resistance*. (13) (2020), 1091–1104. doi:10.2147/IDR.S191387
- Hamilton, W. J. und Laing, J. A. (1946): „Development of the egg of the cow up to the stage of blastocyst formation“ *Journal of Anatomy*. (80) Nr. 4 (1946), 194–204.
- Han, Y. W., Redline, R. W., Li, M., Yin, L., Hill, G. B. und McCormick, T. S. (2004): „*Fusobacterium nucleatum* Induces Premature and Term Stillbirths in Pregnant Mice: Implication of Oral Bacteria in Preterm Birth“ *Infection and Immunity*. (72) Nr. 4 (2004), 2272–2279. doi:10.1128/IAI.72.4.2272-2279.2004
- Hansen, P. J. (2019): „Reproductive physiology of the heat-stressed dairy cow: implications for fertility and assisted reproduction“ *Animal Reproduction*. (16) Nr. 3 (2019), 497–507. doi:10.21451/1984-3143-AR2019-0053
- Hartigan, P. J., Griffin, J. F. T. und Nunn, W. R. (1974): „Some observations on *Corynebacterium pyogenes* infection of the bovine uterus“ *Theriogenology*. (1) Nr. 5 (1974), 153–167.
- Hashmi, I., Bindschedler, S. und Junier, P. (2020): Chapter 18 - Firmicutes. *Beneficial microbes in agroecology: bacteria and fungi*. (S. 363–396). London: Academic press.
- Hasler, J. F. (1992): „Current Status and Potential of Embryo Transfer and Reproductive Technology in Dairy Cattle“ *Journal of Dairy Science*. (75) Nr. 10 (1992), 2857–2879. doi:10.3168/jds.S0022-0302(92)78049-7
- Hasler, J. F., Cardey, E., Stokes, J. E. und Bredbacka, P. (2002): „Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment“ *Theriogenology*. (58) Nr. 8 (2002), 1457–1469. doi:10.1016/S0093-691X(02)01044-0
- Hasler, J. F., McCauley, A. D., Schermerhorn, E. C. und Foote, R. H. (1983): „Superovulatory responses of Holstein cows“ *Theriogenology*. (19)Nr. 1 (1983), 83–99. doi:10.1016/0093-691X(83)90125-5
- Hawk, H., Conley, H. H., Wall, R. und Whitaker, R. (1988): „Fertilization rates in superovulating cows after deposition of semen on the infundibulum, near the uterotubal junction or after insemination with high numbers of sperm.“ *Theriogenology*. (29) Nr. 5 (1988), 1131–42. doi:10.1016/S0093-691X(88)80038-4
- Hawk, H. W., Cooper, B. S. und Conley, H. H. (1987): „Inhibition of sperm transport and fertilization in superovulating ewes“ *Theriogenology*. (28) Nr. 2 (1987), 139–153. doi:10.1016/0093-691X(87)90262-7
- Hawk, H. W. und Tanabe, T. Y. (1986): „Effect of Unilateral Cornual Insemination upon Fertilization Rate in Superovulating and Single-Ovulating Cattle“ *Journal of Animal Science*. (63) Nr. 2 (1986), 551–560. doi:10.2527/jas1986.632551x
- Hayakawa, H., Hirai, T., Takimoto, A., Ideta, A. und Aoyagi, Y. (2009): „Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm“ *Theriogenology*. (71) Nr. 1 (2009), 68–73. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.09.016
- Hendricks, K. und Hansen, P. J. (2010): „Consequences for the bovine embryo of being derived from a spermatozoon subjected to oxidative stress“ *Australian Veterinary Journal*. (88) Nr. 8 (2010), 307–310. doi:10.1111/j.1751-0813.2010.00585.x
- Herath, S., Fischer, D. P., Werling, D., Williams, E. J., Lilly, S. T., Dobson, H. et al. (2006): „Expression and Function of Toll-Like Receptor 4 in the Endometrial Cells of the Uterus“ *Endocrinology*. (147) Nr. 1 (2006), 562–570. doi:10.1210/en.2005-1113
- Herath, S., Lilly, S. T., Fischer, D. P., Williams, E. J., Dobson, H., Bryant, C. E. et al. (2009): „Bacterial Lipopolysaccharide Induces an Endocrine Switch from Prostaglandin F2 α to Prostaglandin E2 in Bovine Endometrium“ *Endocrinology*. (150) Nr. 4 (2009), 1912–1920. doi:10.1210/en.2008-1379
- Herath, S., Williams, E. J., Lilly, S. T., Gilbert, R. O., Dobson, H., Bryant, C. E. et al. (2007): „Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function“ *Reproduction*. (134) Nr. 5 (2007), 683–693. doi:10.1530/REP-07-0229

- Hertl, J. A., Gröhn, Y. T., Leach, J. D. G., Bar, D., Bennett, G. J., González, R. N. et al. (2010): „Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows“ *Journal of Dairy Science*. (93) Nr. 4 (2010), 1551–1560. doi:10.3168/jds.2009-2599
- Herzog, K., Strüve, K., Kastelic, J. P., Piechotta, M., Ulbrich, S. E., Pfarrer, C. et al. (2012): „*Escherichia coli* lipopolysaccharide administration transiently suppresses luteal structure and function in diestrous cows“ *Reproduction*. (144) Nr. 4 (2012), 467–476. doi:10.1530/REP-12-0138
- Heydari, S., Eidi, A., Kouhkan, F., Tvrdá, E. und Mohammadi-Sangcheshmeh, Abdollah (2020): „Effects of increasing lipopolysaccharide concentrations on in vitro developmental competence of ovine oocytes“ *Animal Reproduction*. (17) Nr. 2 (2020), e20190125. doi:10.1590/1984-3143-ar2019-0125
- Hill, J. und Gilbert, R. (2008): „Reduced quality of bovine embryos cultured in media conditioned by exposure to an inflamed endometrium“ *Australian Veterinary Journal*. (86) Nr. 8 (2008), 312–316. doi:10.1111/j.1751-0813.2008.00326.x
- Hizaki, H., Segi, E., Sugimoto, Y., Hirose, M., Saji, T., Ushikubi, F. et al. (1999): „Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP₂“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (96) Nr. 18 (1999), 10501–10506. doi:10.1073/pnas.96.18.10501
- Hobbs, J. G. und Kaye, P. L. (1986): „Glycine and Na⁺ transport in preimplantation mouse embryos“ *Reproduction*. (77) Nr. 1 (1986), 61–66. doi:10.1530/jrf.0.0770061
- Hockett, M. E., Almeida, R. A., Rohrbach, N. R., Oliver, S. P., Dowlen, H. H. und Schrick, F. N. (2005): „Effects of Induced Clinical Mastitis During Preovulation on Endocrine and Follicular Function“ *Journal of Dairy Science*. (88)Nr. 7 (2005), 2422–2431. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72920-9
- Hoedemaker, M., Mansfeld, R. und De Kruif, A. (2014): 3.2 Euter und Milchqualität. *Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind*. (3., überarbeitete. Aufl., S. 91–126). Stuttgart: Enke.
- Hoelker, M., Salilew-Wondim, D., Drillich, M., Christine, G.-B., Ghanem, N., Goetze, L. et al. (2012): „Transcriptional response of the bovine endometrium and embryo to endometrial polymorphonuclear neutrophil infiltration as an indicator of subclinical inflammation of the uterine environment“ *Reproduction, Fertility and Development*. (24) Nr. 6 (2012), 778–793. doi:10.1071/RD11171
- Hugentobler, S. A., Sreenan, J. M., Humpherson, P. G., Leese, H. J., Diskin, M. G. und Morris, D. G. (2010): „Effects of changes in the concentration of systemic progesterone on ions, amino acids and energy substrates in cattle oviduct and uterine fluid and blood“ *Reproduction, Fertility and Development*. (22) Nr. 4 (2010), 684–694. doi:10.1071/RD09129
- Huhtinen, M., Rainio, V., Aalto, J., Bredbacka, P. und Mäki-Tanila, A. (1992): „Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows“ *Theriogenology*. (37) Nr. 2 (1992), 457–463. doi:10.1016/0093-691X(92)90202-3
- Hunter, R. H. F. (1972): „Local actions of progesterone leading to polyspermic fertilization in pigs“ *Reproduction*. (31) Nr. 3 (1972), 433–444. doi:10.1530/jrf.0.0310433
- Hunter, R. H. F., Fléchon, B. und Fléchon, J. E. (1991): „Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: A scanning electron microscope study“ *Tissue and Cell*. (23) Nr. 5 (1991), 641–656. doi:10.1016/0040-8166(91)90020-T
- Hunter, R. H. F. und Wilmut, I. (1984): „Sperm transport in the cow : peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct“ *Reproduction Nutrition Development*. (24) Nr. 5A (1984), 597–608. doi:10.1051/rnd:19840508
- Hupka, Susanne (2000): *Erfolgsbeeinflussende Faktoren im Rahmen der Embryonengewinnung beim kommerziellen ET des Rindes unter besonderer Berücksichtigung verschiedener Superovulationsschemata und Besamungstypen- Eine retrospektive Studie* -. Dissertation. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover Verfügbar unter: https://elib.tiho-hannover.de/servlets/MCRFileNodeServlet/etd_derivate_00003270/hupkas_2000.pdf
- Hyttel, P., Callesen, H. und Greve, T. (1986a): „Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle“ *Reproduction*. (76) Nr. 2 (1986a), 645–656. doi:10.1530/jrf.0.0760645

- Hyttel, P., Callesen, H., Greve, T. und Schmidt, M. (1991): „Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle“ *Theriogenology*. (35) Nr. 1 (1991), 91–108. doi:10.1016/0093-691X(91)90150-C
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H. und Greve, T. (1997): „Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle“ *Theriogenology*. (47) Nr. 1 (1997), 23–32. doi:10.1016/S0093-691X(96)00336-6
- Hyttel, P., Greve, T. und Callesen, H. (1988): „Ultrastructure of in-vivo fertilization in superovulated cattle“ *Reproduction*. (82) Nr. 1 (1988), 1–13. doi:10.1530/jrf.0.0820001
- Iarovoi, Liviu, Holban, Tiberiu, Chiriacov, Galina, Cotos, Viorica, Cojuhari, Lilia und Cirstea, Natalia (2023): „Bacterium with *Leuconostoc pseudomesenteroides*“ *One Health & Risk Management*. (4) Nr. 1 (2023), 81–86. doi:10.38045/ohrm.2023.1.10
- IETS (Hrsg.) (2023): „2022 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals“ *Embryo Technology Newsletter*. (41) Nr. 4 (2023).
- IETS (Hrsg.) (2025): „2024 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals“ *Embryo Technology Newsletter*. (43) Nr. 4 (2025).
- Imhoff, J. F. (2005): Chromatiales ord. nov. In D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity, D.R. Boone, P. De Vos et al. (Hrsg.), *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. (S. 1–59). Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/0-387-28022-7_1
- Ireland, J. J., Mihm, M., Austin, E., Diskin, M. G. und Roche, J. F. (2000): „Historical Perspective of Turnover of Dominant Follicles During the Bovine Estrous Cycle: Key Concepts, Studies, Advancements, and Terms“ *Journal of Dairy Science*. (83) Nr. 7 (2000), 1648–1658. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)75033-8
- Ito, K., Miyamoto, H., Matsuura, M., Ishii, C., Tsuboi, A., Tsuji, N. et al. (2022): „Noninvasive fecal metabolic profiling for the evaluation of characteristics of thermostable lactic acid bacteria, *Weizmannia coagulans* SANK70258, for broiler chickens“ *Journal of Bioscience and Bioengineering*. (134) Nr. 2 (2022), 105–115. doi:10.1016/j.jbiosc.2022.05.006
- Jack, R. W., Tagg, J. R. und Ray, B. (1995): „Bacteriocins of gram-positive bacteria“ *Microbiological Reviews*. (59) Nr. 2 (1995), 171–200. doi:10.1128/mr.59.2.171-200.1995
- Jahnke, M. M. und Youngs, C. R. (2021): Superovulation in Cattle. *Bovine Reproduction*. (2. Aufl., S. 1032–1040). John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/9781119602484.ch82
- Jaiswal, R. S., Singh, J., Marshall, L. und Adams, G. P. (2009): „Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle“ *Theriogenology*. (72) Nr. 1 (2009), 81–90. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.02.014
- Jans, C., Meile, L., Lacroix, C. und Stevens, M. J. A. (2015): „Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis* / *Streptococcus equinus* complex (SBSEC)“ *Infection, Genetics and Evolution*. (33) (2015), 419–436. doi:10.1016/j.meegid.2014.09.017
- Jensen, A. M., Greve, T., Madej, A. und Edqvist, L.-E. (1982): „Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF2 α treated cow“ *Theriogenology*. (18)Nr. 1 (1982), 33–44. doi:10.1016/0093-691X(82)90046-2
- Jeon, S. J., Cunha, F., Vieira-Neto, A., Bicalho, R. C., Lima, Svetlana, Bicalho, M. L. et al. (2017): „Blood as a route of transmission of uterine pathogens from the gut to the uterus in cows“ *Microbiome*. (5) Nr. 1 (2017), 109. doi:10.1186/s40168-017-0328-9
- Johnson, E. L., Heaver, S. L., Walters, W. A. und Ley, R. E. (2017): „Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes“ *Journal of Molecular Medicine*. (95) Nr. 1 (2017), 1–8. doi:10.1007/s00109-016-1492-2
- Johnson, L. A. (2000): „Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art“ *Animal Reproduction Science*. (60–61) (2000), 93–107. doi:10.1016/S0378-4320(00)00088-9
- Johnson, W., Loskutoff, N., Plante, Y. und Betteridge, K. (1995): „Production of four identical calves by the separation of blastomeres from an in vitro derived four-cell embryo“ *Veterinary Record*. (137) Nr. 1 (1995), 15–16. doi:10.1136/vr.137.1.15
- Jones, A., Van Blerkom, J., Davis, P. und Toledo, A. A. (2004): „Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence“ *Human Reproduction*. (19) Nr. 8 (2004), 1861–1866. doi:10.1093/humrep/deh313

- Jousan, F. D., De Castro E Paula, L. A., Block, J. und Hansen, P. J. (2007): „Fertility of Lactating Dairy Cows Administered Recombinant Bovine Somatotropin During Heat Stress“ *Journal of Dairy Science*. (90) Nr. 1 (2007), 341–351. doi:10.3168/jds.S0022-0302(07)72635-8
- Jousan, F. D. und Hansen, P. J. (2007): „Insulin-like growth factor-I promotes resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock through actions independent of its anti-apoptotic actions requiring PI3K signaling“ *Molecular Reproduction and Development*. (74) Nr. 2 (2007), 189–196. doi:10.1002/mrd.20527
- Jurenka, J. S. (2012): „*Bacillus coagulans*“ *Alternative Medicine Review*. (17) Nr. 1 (2012), 76–78.
- Kadokawa, H., Tameoka, N., Uchiza, M., Kimura, Y. und Yonai, M. (2008): „Short Communication: A Field Study on the Relationship Between Body Condition and Embryo Production in Superovulated Holstein Yearling Heifers“ *Journal of Dairy Science*. (91) Nr. 3 (2008), 1087–1091. doi:10.3168/jds.2007-0642
- Kafi, Mojtaba und McGowan, Michael (1997): „Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle.“ *Animal reproduction science*. (48) Nr. 2–4 (1997), 137–57. doi:10.1016/S0378-4320(97)00033-X
- Kamano, S., Ikeda, S., Sugimoto, M. und Kume, S. (2014): „The Effects of Calcitonin on the Development of and Ca^{2+} Levels in Heat-shocked Bovine Preimplantation Embryos *In Vitro*“ *Journal of Reproduction and Development*. (60) Nr. 4 (2014), 317–323. doi:10.1262/jrd.2013-127
- Kanitz, W., Becker, F., Schneider, F., Kanitz, E., Leiding, C., Nohner, H.-P. et al. (2002): „Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination“ *Reproduction Nutrition Development*. (42) Nr. 6 (2002), 587–599. doi:10.1051/rnd:2002045
- Karg, H. v., Hoffmann, B. und Schams, D. (1969): „Verlauf der Blutspiegel an Progesteron, Luteinisierungshormon und Prolaktin während des Zyklus bei einer Kuh“ *Reproduction in Domestic Animals*. (4) Nr. 4 (1969), 149–153. doi:10.1111/j.1439-0531.1969.tb00157.x
- Karsch, F. J. (1987): „Central Actions of Ovarian Steroids in the Feedback Regulation of Pulsatile Secretion of Luteinizing Hormone“ *Annual Review of Physiology*. (49) Nr. 1 (1987), 365–382. doi:10.1146/annurev.ph.49.030187.002053
- Karstrup, C. C., Klitgaard, K., Jensen, T. K., Agerholm, J. S. und Pedersen, H. G. (2017): „Presence of bacteria in the endometrium and placentomes of pregnant cows“ *Theriogenology*. (99) (2017), 41–47. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.05.013
- Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S. et al. (2004): „Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows“ *Theriogenology*. (62) Nr. 1–2 (2004), 9–23. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.03.001
- Kasimanickam, Ramanathan, Duffield, Todd F, Foster, Robert A, Gartley, Cathy J, Leslie, Ken E, Walton, John S et al. (2005): „A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows“ *The Canadian Veterinarian Journal*. (46) Nr. 3 (2005), 255–259.
- Kaufmann, T. B., Drillich, M., Tenhagen, B.-A., Forderung, D. und Heuwieser, W. (2009): „Prevalence of bovine subclinical endometritis 4h after insemination and its effects on first service conception rate“ *Theriogenology*. (71) Nr. 2 (2009), 385–391. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.08.005
- Kelly, P., Duffy, P., Roche, J. F. und Boland, M. P. (1997): „Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns“ *Animal Reproduction Science*. (46) Nr. 1–2 (1997), 1–14. doi:10.1016/S0378-4320(96)01589-8
- Kerbrat, S und Disenhaus, C (2004): „A proposition for an updated behavioural characterisation of the oestrus period in dairy cows“ *Applied Animal Behaviour Science*. (87) Nr. 3–4 (2004), 223–238. doi:10.1016/j.applanim.2003.12.001
- Khan, M. I. R., Dias, F. C. F., Sirard, M. A., Adams, G. P. und Singh, J. (2013): „2 transcriptome analysis of granulosa cells from growing dominant follicle reveals age-associated changes at the time of follicle selection in aged beef cattle.“ *Reproduction, Fertility and Development*. (25) Nr. 1 (2013), 148. doi:10.1071/RDv25n1Ab2
- Khatir, H., Carolan, C., Lonergan, P. und Mermillod, P. (1997): „Characterization of calf follicular fluid and its ability to support cytoplasmic maturation of cow and calf oocytes“ *Reproduction*. (111) Nr. 2 (1997), 267–275. doi:10.1530/jrf.0.1110267

- Khatir, H., Lonergan, P., Carolan, C. und Mermillod, P. (1996): „Prepubertal bovine oocyte: A negative model for studying oocyte developmental competence“ *Molecular Reproduction and Development*. (45) Nr. 2 (1996), 231–239. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199610)45:2<231::AID-MRD17>3.0.CO;2-3
- Khudaier, B. Y. (2011): „*Leuconostoc mesenteroides* cause Nosocomial UTI At a tertiary care center in North India“ *Journal of Thi-Qar University*. (4) Nr. 6 (2011), 23–34.
- Kim, I. H., Suh, G. H., Lee, I. D. W. und Lee, I. C. S. (2001): „Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation, an embryo production in holstein cows“ *Theriogenology*. (55) Nr. 4 (2001), 937–945. doi:10.1016/S0093-691X(01)00455-1
- King, R. S., Anderson, S. H. und Killian, G. J. (1994): „Effect of Bovine Oviductal Estrus-Associated Protein on the Ability of Sperm to Capacitate and Fertilize Oocytes“ *Journal of Andrology*. (15) Nr. 5 (1994), 468–478. doi:10.1002/j.1939-4640.1994.tb00482.x
- King, W. A., Niar, A., Chartrain, I., Betteridge, K. J. und Guay, P. (1988): „Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment bovine embryos“ *Reproduction*. (82) Nr. 1 (1988), 87–95. doi:10.1530/jrf.0.0820087
- Klipper, E., Tatz, E., Kisliouk, T., Vlodavsky, I., Moallem, U., Schams, D. et al. (2009): „Induction of Heparanase in Bovine Granulosa Cells by Luteinizing Hormone: Possible Role during the Ovulatory Process“ *Endocrinology*. (150) Nr. 1 (2009), 413–421. doi:10.1210/en.2008-0697
- Knight, C. W., Patrick, T.E., Anderson, H. W. und Branton, C. (1951): „The Relation of Site of Semen Deposit to Breeding Efficiency of Dairy Cattle“ *Journal of Dairy Science*. (34) Nr. 3 (1951), 199–202. doi:10.3168/jds.S0022-0302(51)91694-3
- Koenneker, K., Schulze, M., Pieper, L., Jung, M., Schmicke, M. und Beyer, F. (2023): „Comparative Assessment of the Stress Response of Cattle to Common Dairy Management Practices“ *Animals*. (13) Nr. 13 (2023), 2115. doi:10.3390/ani13132115
- Kölle, S., Dubielzig, S., Reese, S., Wehrend, A., König, P. und Kummer, W. (2009): „Ciliary Transport, Gamete Interaction, and Effects of the Early Embryo in the Oviduct: Ex Vivo Analyses Using a New Digital Videomicroscopic System in the Cow“ *Biology of Reproduction*. (81) Nr. 2 (2009), 267–274. doi:10.1095/biolreprod.108.073874
- Kosugi, S., Dop, Cornelis Van, Geffner, M. E., Rabl, W., Carel, J-C., Chaussain, J-L. et al. (1995): „Characterization of heterogeneous mutations causing constitutive activation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty“ *Human Molecular Genetics*. (4) Nr. 2 (1995), 183–188. doi:10.1093/hmg/4.2.183
- Kronfeld, H., Kemper, N. und Hölzel, C. S. (2022): „Vaginal and Uterine Microbiomes during Puerperium in Dairy Cows“ *Agriculture*. (12) Nr. 3 (2022), 405. doi:10.3390/agriculture12030405
- Kruip, T. A. M., Cran, D. G., Van Beneden, T. H. und Dieleman, S. J. (1983): „Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo“ *Gamete Research*. (8) Nr. 1 (1983), 29–47. doi:10.1002/mrd.1120080105
- Kubovičová, E., Makarevič, A., Stádnik, L. und Holásek, R. (2013): „Effect of body condition and season on the yield and quality of cattle embryos“ *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. (2) Nr. special issue 1 (2013), 1426–1435.
- Kuijk, E. W., Van Tol, L. T. A., Van De Velde, H., Wubbolts, R., Welling, M., Geijssen, N. et al. (2012): „The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos“ *Development*. (139) Nr. 5 (2012), 871–882. doi:10.1242/dev.071688
- Kuroki, T., Ikeda, S., Okada, T., Maoka, T., Kitamura, A., Sugimoto, M. et al. (2013): „Astaxanthin ameliorates heat stress-induced impairment of blastocyst development In Vitro: –astaxanthin colocalization with and action on mitochondria–“ *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. (30) Nr. 5 (2013), 623–631. doi:10.1007/s10815-013-9987-z
- Kusama, K., Rashid, M. B., Kowsar, R., Marey, M. A., Talukder, A. K., Nagaoka, K. et al. (2021): „Day 7 Embryos Change the Proteomics and Exosomal Micro-RNAs Content of Bovine Uterine Fluid: Involvement of Innate Immune Functions“ *Frontiers in Genetics*. (12) (2021). doi:10.3389/fgene.2021.676791
- Kweon, O-K., Kanagawa, H., Takahashi, Y., Yamashina, H., Seike, N., Iwazumi, Y. et al. (1986): „Factors affecting superovulation response in cattle.“ *The Japanese Journal of Veterinary Science*. (48) Nr. 3 (1986), 495–503. doi:10.1292/jvms1939.48.495

- Kyono, K., Hashimoto, T., Kikuchi, S., Nagai, Y. und Sakuraba, Y. (2019): „A pilot study and case reports on endometrial microbiota and pregnancy outcome: An analysis using 16S rRNA gene sequencing among IVF patients, and trial therapeutic intervention for dysbiotic endometrium“ *Reproductive Medicine and Biology*. (18) Nr. 1 (2019), 72–82. doi:10.1002/rmb2.12250
- Lam, X., Gieseke, C., Knoll, M. und Talbot, P. (2000): „Assay and Importance of Adhesive Interaction Between Hamster (*Mesocricetus auratus*) Oocyte-Cumulus Complexes and the Oviductal Epithelium“ *Biology of Reproduction*. (62) Nr. 3 (2000), 579–588. doi:10.1095/biolreprod62.3.579
- Land, J. A. und Evers, J. L. H. (2002): „*Chlamydia* infection and subfertility“ *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. (16) Nr. 6 (2002), 901–912. doi:10.1053/beog.2002.0319
- Landry, D. A., Bellefleur, A.-M., Labrecque, R., Grand, F.-X., Vigneault, C., Blondin, P. et al. (2016): „Effect of cow age on the in vitro developmental competence of oocytes obtained after FSH stimulation and coasting treatments“ *Theriogenology*. (86) Nr. 5 (2016), 1240–1246. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.064
- Lanuza, G. M., Fischman, M. L. und Barañao, J. L. (1998): „Growth Promoting Activity of Oocytes on Granulosa Cells Is Decreased upon Meiotic Maturation“ *Developmental Biology*. (197) Nr. 1 (1998), 129–139. doi:10.1006/dbio.1998.8865
- Larkin, W., Chesta, P., Looney, C., Bó, G. A. und Forrest, D. (2005): „Distribution of ovulation and subsequent embryo production using Lutropin and estradiol-17 β for timed AI of superstimulated beef heifers“ *Reproduction, Fertility and Development*. (18) Nr. 2 (2005), 289–290. doi:10.1071/RDv18n2Ab364
- Larson, J. E., Krisher, R. L. und Lamb, G. C. (2011): „Effects of supplemental progesterone on the development, metabolism and blastocyst cell number of bovine embryos produced in vitro“ *Reproduction, Fertility and Development*. (23) Nr. 2 (2011), 311–318. doi:10.1071/RD10106
- Larsson, B. (1988): „Sperm Distribution and Its Relation to Ovulation in Artificially Inseminated Heifers“ *Reproduction in Domestic Animals*. (23) Nr. 2 (1988), 56–64. doi:10.1111/J.1439-0531.1988.TB01081.X
- Laster, D. B. (1972): „Disappearance and uptake of [125I] FSH in the rat, rabbit, ewe and cow“ *Reproduction*. (30) Nr. 3 (1972), 407–415. doi:10.1530/jrf.0.0300407
- Laven, R. A., Scaramuzzi, R. J., Wathes, D. C., Peters, A. R. und Parkinson, T. J. (2007): „Recent research on the effects of excess dietary nitrogen on the fertility of dairy cows“ *Veterinary Record*. (160) Nr. 11 (2007), 359–362. doi:10.1136/vr.160.11.359
- LeBlanc, S. J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Bateman, K. G., Keefe, G. P., Walton, J. S. et al. (2002): „Defining and Diagnosing Postpartum Clinical Endometritis and its Impact on Reproductive Performance in Dairy Cows“ *Journal of Dairy Science*. (85) Nr. 9 (2002), 2223–2236. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74302-6
- Leese, H. J. und Gray, S. M. (1985): „Vascular perfusion: a novel means of studying oviduct function“ *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. (248) Nr. 5 (1985), E624–E632. doi:10.1152/ajpendo.1985.248.5.E624
- Lefebvre, R., Lo, M. C. und Suarez, S. S. (1997): „Bovine Sperm Binding to Oviductal Epithelium Involves Fucose Recognition“ *Biology of Reproduction*. (56) Nr. 5 (1997), 1198–1204. doi:10.1095/biolreprod56.5.1198
- Lerner, S. P., Thayne, W. V., Baker, R. D., Henschen, T., Meredith, S., Inskeep, E. K. et al. (1986): „Age, Dose of FSH and Other Factors Affecting Superovulation in Holstein Cows“ *Journal of Animal Science*. (63) Nr. 1 (1986), 176–183. doi:10.2527/jas1986.631176x
- Leroy, J. L. M. R., Genicot, G., Donnay, I. und Van Soom, A. (2005a): „Evaluation of the Lipid Content in Bovine Oocytes and Embryos with Nile Red: a Practical Approach“ *Reproduction in Domestic Animals*. (40) Nr. 1 (2005a), 76–78. doi:10.1111/j.1439-0531.2004.00556.x
- Leroy, J. L. M. R., Opsomer, G., De Vliegher, S., Vanholder, T., Goossens, L., Geldhof, A. et al. (2005b): „Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows“ *Theriogenology*. (64)Nr. 9 (2005b), 2022–2036. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.05.003

- Leroy, J. L. M. R., Van Soom, A., Opsomer, G., Goovaerts, I. G. F. und Bols, P. E. J. (2008): „Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part II Mechanisms Linking Nutrition and Reduced Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows“ *Reproduction in Domestic Animals*. (43) Nr. 5 (2008), 623–632. doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00961.x
- Leroy, J. L. M. R., Vanholder, T., Mateusen, B., Christophe, A., Opsomer, G., De Kruif, A. et al. (2005c): „Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro“ *Reproduction*. (130) Nr. 4 (2005c), 485–495. doi:10.1530/rep.1.00735
- Leroy, J. L. M. R., Vanholder, T., Opsomer, G., Van Soom, A. und De Kruif, A. (2006): „The *In Vitro* Development of Bovine Oocytes after Maturation in Glucose and β -Hydroxybutyrate Concentrations Associated with Negative Energy Balance in Dairy Cows“ *Reproduction in Domestic Animals*. (41) Nr. 2 (2006), 119–123. doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00650.x
- Lewis, G.S. (2003): „Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock“ *Reproductive Biology and Endocrinology*. (1) Nr. 1 (2003), 117. doi:10.1186/1477-7827-1-117
- Li, R., Norman, R. J., Armstrong, D. T. und Gilchrist, R. B. (2000): „Oocyte-Secreted Factor(s) Determine Functional Differences Between Bovine Mural Granulosa Cells and Cumulus Cells“ *Biology of Reproduction*. (63) Nr. 3 (2000), 839–845. doi:10.1095/biolreprod63.3.839
- Li, Z., Li, Y., Xiao, C., Yan, Z., Pan, R., Gao, Y. et al. (2022): „Genomic and metabolic features of the *Lactobacillus sakei* JD10 revealed potential probiotic traits“ *Microbiological Research*. (256) (2022), 126954. doi:10.1016/j.micres.2021.126954
- Liang, J., Li, C., Chen, Z., Guo, F., Dou, J., Wang, T. et al. (2024): „Progress of research and application of *Heyndrickxia coagulans* (*Bacillus coagulans*) as probiotic bacteria“ *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. (14) (2024), 1415790. doi:10.3389/fcimb.2024.1415790
- Liebich, H-G. (1990): XIV. Weibliche Geschlechtsorgane (Organa genitalia feminina). *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel*. (1. Auf., S. 258–259). Schattauer.
- Lietaeer, L., Bogado Pascottini, O., Hernandez-Sanabria, E., Kerckhof, F.-M., Lacoere, T., Boon, N. et al. (2021): „Low microbial biomass within the reproductive tract of mid-lactation dairy cows: A study approach“ *Journal of Dairy Science*. (104) Nr. 5 (2021), 6159–6174. doi:10.3168/jds.2020-19554
- Lim, H., Paria, B. C., Das, S. K., Dinchuk, J. E., Langenbach, R., Trzaskos, J. M. et al. (1997): „Multiple Female Reproductive Failures in Cyclooxygenase 2–Deficient Mice“ *Cell*. (91) Nr. 2 (1997), 197–208. doi:10.1016/S0092-8674(00)80402-X
- Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W. F., Myles, D. G. und Primakoff, P. (1994): „A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg.“ *The Journal of cell biology*. (125) Nr. 5 (1994), 1157–1163. doi:10.1083/jcb.125.5.1157
- Linares, T. und King, W. A. (1980): „Morphological study of the bovine blastocyst with phase contrast microscopy“ *Theriogenology*. (14) Nr. 2 (1980), 123–133. doi:10.1016/0093-691X(80)90099-0
- Lindblom, B., Hamberger, L. und Ljung, B. (1980): „Contractile Patterns of Isolated Oviductal Smooth Muscle Under Different Hormonal Conditions“ *Fertility and Sterility*. (33) Nr. 3 (1980), 283–287. doi:10.1016/S0015-0282(16)44595-4
- Lindsell, C. E., Murphy, B. D. und Maplettoft, R. J. (1986): „Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle“ *Theriogenology*. (26) Nr. 2 (1986), 209–219. doi:10.1016/0093-691x(86)90025-7
- Lonergan, P. und Sánchez, J. M. (2020): „Symposium review: Progesterone effects on early embryo development in cattle“ *Journal of Dairy Science*. (103) Nr. 9 (2020), 8698–8707. doi:10.3168/jds.2020-18583
- Lonvaud-Funel, A. (2014): *Leuconostocaceae* Family. *Encyclopedia of Food Microbiology*. (Band 2, S. 455–465). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00185-3
- Looney, C. R., Boutte, B. W., Archbald, L. F. und Godke, R. A. (1981): „Comparison of once daily and twice daily FSH injections for superovulating beef cattle“ *Theriogenology*. (15) Nr. 1 (1981), 13–22. doi:10.1016/S0093-691X(81)80014-3

- Lopez, H., Caraviello, D. Z., Satter, L. D., Fricke, P. M. und Wiltbank, M. C. (2005): „Relationship Between Level of Milk Production and Multiple Ovulations in Lactating Dairy Cows“ *Journal of Dairy Science*. (88) Nr. 8 (2005), 2783–2793. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72958-1
- López-Gatius, F. und Camón-Urgel, J. (1988): „Increase of pregnancy rate in dairy cattle after preovulatory follicle palpation and deep cornual insemination“ *Theriogenology*. (29) Nr. 5 (1988), 1099–1103. doi:10.1016/S0093-691X(88)80034-7
- López-Gatius, F. und Camón-Urgel, J. (1990): „Effect of side of insemination on transuterine transport of spermatozoa in superovulated dairy cattle“ *Theriogenology*. (33) Nr. 4 (1990), 843–849. doi:10.1016/0093-691X(90)90820-J
- López-Gatius, F., López-Béjar, M., Fenech, M. und Hunter, R. H. F. (2005): „Ovulation failure and double ovulation in dairy cattle: risk factors and effects“ *Theriogenology*. (63) Nr. 5 (2005), 1298–1307. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.06.010
- Lu, K. H. und Seidel, G. E. (2004): „Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm“ *Theriogenology*. (62) Nr. 5 (2004), 819–830. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.12.029
- Lucy, M. C. (2007): „The bovine dominant ovarian follicle“ *Journal of Animal Science*. (85) Nr. suppl_13 (2007), E89–E99. doi:10.2527/jas.2006-663
- Ludwig, W., Schleifer, K-H. und Whitman, W.B. (2015): „*Lactobacillales* ord. nov“ (W.B. Whitman, Hrsg.) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. (1) Nr. 1 (2015), 1. doi:10.1002/9781118960608.obm00058
- Ludwig, W., Schleifer, K-H. und Whitman, William B (2009): Revised road map to the phylum Firmicutes. In W. B. Whitman (Hrsg.), *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. (S. 1–13). New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-0-387-68489-5_1
- Lyu, C., Hua, L., Shi, Q., Zhang, Z., Xin, X., Chen, F. et al. (2020): „Identification of key bacterial populations affecting early embryonic development in cattle uterus“ *Animal Science Journal*. (91) Nr. 1 (2020), e13374. doi:10.1111/asj.13374
- Machado, S. A., Sharif, M., Wang, H., Bovin, N. und Miller, D. J. (2019): „Release of Porcine Sperm from Oviduct Cells is Stimulated by Progesterone and Requires CatSper“ *Scientific Reports*. (9) Nr. 1 (2019), 19546. doi:10.1038/s41598-019-55834-z
- Machado, V. S., Oikonomou, G., Bicalho, M. L. S., Knauer, W. A., Gilbert, R. und Bicalho, R. C. (2012): „Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene“ *Veterinary Microbiology*. (159) Nr. 3–4 (2012), 460–469. doi:10.1016/j.vetmic.2012.04.033
- Mackey, D. R., Sreenan, J. M., Roche, J. F. und Diskin, M. G. (1999): „Effect of Acute Nutritional Restriction on Incidence of Anovulation and Periovarian Estradiol and Gonadotropin Concentrations in Beef Heifers“ *Biology of Reproduction*. (61) Nr. 6 (1999), 1601–1607. doi:10.1095/biolreprod61.6.1601
- Madoz, L. V., Giuliadori, M. J., Jaureguiberry, M., Plöntzke, J., Drillich, M. und De La Sota, R. L. (2013): „The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows“ *Journal of Dairy Science*. (96) Nr. 7 (2013), 4333–4339. doi:10.3168/jds.2012-6269
- Madoz, L. V., Giuliadori, M. J., Migliorisi, A. L., Jaureguiberry, M. und De La Sota, R. L. (2014): „Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows“ *Journal of Dairy Science*. (97) Nr. 1 (2014), 195–201. doi:10.3168/jds.2013-6836
- Mahmood, T., Saridogan, E., Smutna, S., Habib, A. M. und Djahanbakhch, O. (1998): „The effect of ovarian steroids on epithelial ciliary beat frequency in the human Fallopian tube“ *Human Reproduction*. (13) Nr. 11 (1998), 2991–2994. doi:10.1093/humrep/13.11.2991
- Makarevich, A. V., Pivko, J., Kubovičová, E., Hegedušová, Z. und Louda, F. (2011): „Ovarian follicle atresia in dairy cows in relation to the body condition“ *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. (1) Nr. 3 (2011), 426–436.
- Makarevich, A. V., Stádník, L., Kubovičová, E., Hegedušová, Z., Holásek, R., Louda, F. et al. (2016): „Quality of preimplantation embryos recovered *in vivo* from dairy cows in relation to their body condition“ *Zygote*. (24) Nr. 3 (2016), 378–388. doi:10.1017/S0967199415000295

- Malayer, J. R., Hansen, P. J. und Buhi, W. C. (1988): „Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus“ *Journal of Experimental Zoology*. (248) Nr. 3 (1988), 345–353. doi:10.1002/jez.1402480313
- Maldonado, N. C., Ficooseco, C. A., Mansilla, F. I., Melián, C., Hébert, E. M., Vignolo, G. M. et al. (2018): „Identification, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria as probiotic for feedlot cattle“ *Livestock Science*. (212) (2018), 99–110. doi:10.1016/j.livsci.2018.04.003
- Malhi, P. S., Adams, G. P., Mapletoft, R. J. und Singh, J. (2007): „Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging“ *Reproduction*. (134) Nr. 2 (2007), 233–239. doi:10.1530/REP-07-0021
- Malhi, P. S., Adams, G. P., Mapletoft, R. J. und Singh, J. (2008): „Superovulatory response in a bovine model of reproductive aging“ *Animal Reproduction Science*. (109) Nr. 1–4 (2008), 100–109. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.12.002
- Malhi, P. S., Adams, G. P., Pierson, R. A. und Singh, J. (2006): „Bovine model of reproductive aging: Response to ovarian synchronization and superstimulation“ *Theriogenology*. (66) Nr. 5 (2006), 1257–1266. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.02.051
- Manjunatha, B. M., Devaraj, M., Gupta, P. S. P., Ravindra, J. P. und Nandi, S. (2009): „Effect of Taurine and Melatonin in the Culture Medium on Buffalo *In Vitro* Embryo Development“ *Reproduction in Domestic Animals*. (44) Nr. 1 (2009), 12–16. doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00982.x
- Manteca Vilanova, X., De Briyne, N., Beaver, B. und Turner, P. V. (2019): „Horse Welfare During Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) Production“ *Animals*. (9) Nr. 12 (2019), 1053. doi:10.3390/ani9121053
- Mapletoft, R. J., Bennett Steward, K. und Adams, G. P. (2002): „Recent advances in the superovulation in cattle“ *Reproduction Nutrition Development*. (42) Nr. 6 (2002), 601–611. doi:10.1051/rnd:2002046
- Mapletoft, R. J. und Bó, G. A. (2012): „The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle“ *Reproduction, Fertility and Development*. (24) Nr. 1 (2012), 278–283. doi:10.1071/RD11919
- Mapletoft, R. J. und Bó, G. A. (2013): „Innovative strategies for superovulation in cattle“ *Animal Reproduction*. (10) Nr. 3 (2013), 174–179.
- Mapletoft, R. J. und Bó, G. A. (2020): Chapter 1a. General sanitary procedures and considerations associated with in vivo-derived bovine embryos. *Manual of the International Embryo Technology Society*. (Volume 2., 5th Edition, S. 6)
- Marchiani, S., Baccani, I., Tamburrino, L., Mattiuz, G., Nicolò, S., Bonaiuto, C. et al. (2021): „Effects of common Gram-negative pathogens causing male genitourinary-tract infections on human sperm functions“ *Scientific Reports*. (11) Nr. 1 (2021), 19177. doi:10.1038/s41598-021-98710-5
- Mårdh, P.-A. (1991): „The vaginal ecosystem“ *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. (165) Nr. 4 (1991), 1163–1168. doi:10.1016/S0002-9378(12)90721-8
- Marsh, J. M. (1970): „The Stimulatory Effect of Luteinizing Hormone on Adenyl Cyclase in the Bovine Corpus Luteum“ *Journal of Biological Chemistry*. (245) Nr. 7 (1970), 1596–1603. doi:10.1016/S0021-9258(19)77135-X
- Martin, R., Mansfeld, R., Hoedemaker, M. und De Kruif, A. (2014): 3.3 Milchleistung und Fütterung. *Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind*. (3. überarbeitete. Aufl., S. 126–164). Stuttgart: Enke.
- Martins, C. M., Rodrigues, C. A., Vieira, L. M., Mapletoft, R. J., Bó, G. A., Sá Filho, M. F. et al. (2012): „The effect of timing of the induction of ovulation on embryo production in superstimulated lactating Holstein cows undergoing fixed-time artificial insemination“ *Theriogenology*. (78) Nr. 5 (2012), 974–980. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.05.007
- Mateus, L., Lopes Da Costa, L., Diniz, P. und Ziecik, A.J. (2003): „Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE2 and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis“ *Animal Reproduction Science*. (76) Nr. 3–4 (2003), 143–154. doi:10.1016/S0378-4320(02)00248-8

- Matsuyama, K., Miyakoshi, H. und Fukui, Y. (1993): „Effect of glucose levels during the in vitro culture in synthetic oviduct fluid medium on in vitro development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro“ *Theriogenology*. (40) Nr. 3 (1993), 595–605. doi:https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90412-X
- Maxwell, D. P., Masiey, J. M. und Kraemer, D. C. (1978): „Timing of ovulations in the superovulated bovine“ *Theriogenology*. (9) Nr. 1 (1978), Abstract.
- Maxwell, W. M. C., Evans, G., Hollinshead, F. K., Bathgate, R., De Graaf, S. P., Eriksson, B. M. et al. (2004): „Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox“ *Animal Reproduction Science*. (82–83) (2004), 79–95. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.04.013
- McCracken, J. A., Carlson, J. C., Glew, M. E., Goding, J. R., Baird, D. T., Green, K. et al. (1972): „Prostaglandin F₂ α identified as a Luteolytic Hormone in Sheep“ *Nature New Biology*. (238) Nr. 83 (1972), 129–134. doi:10.1038/newbio238129a0
- Medina-Bastidas, D., Camacho-Arroyo, I. und García-Gómez, E. (2022): „Current findings in endometrial microbiome: impact on uterine diseases“ *Reproduction*. (163) Nr. 5 (2022), R81–R96. doi:10.1530/REP-21-0120
- Meirelles, C., Kozicki, L. E., Weiss, R. R., Segui, M. S., Souza, A., Santos, I. W. D. et al. (2012): „Comparison between deep intracornual artificial insemination (dIAI) and conventional artificial insemination (AI) using low concentration of spermatozoa in beef cattle“ *Brazilian Archives of Biology and Technology*. (55) Nr. 3 (2012), 371–374. doi:10.1590/S1516-89132012000300006
- Mekibib, B., Belachew, M., Asrade, Biruhtesfa, Badada, G. und Abebe, R. (2024): „Incidence of uterine infections, major bacteria and antimicrobial resistance in postpartum dairy cows in southern Ethiopia“ *BMC Microbiology*. (24) Nr. 1 (2024), 4. doi:10.1186/s12866-023-03160-w
- Mihm, M. und Austin, E. J. (2002): „The final stages of dominant follicle selection in cattle“ *Domestic Animal Endocrinology*. (23) Nr. 1–2 (2002), 155–166. doi:10.1016/S0739-7240(02)00153-4
- Mihm, M., Baker, P. J., Ireland, J. L. H., Smith, G. W., Coussens, P. M., Evans, A. C. O. et al. (2006): „Molecular Evidence That Growth of Dominant Follicles Involves a Reduction in Follicle-Stimulating Hormone Dependence and an Increase in Luteinizing Hormone Dependence in Cattle“ *Biology of Reproduction*. (74) Nr. 6 (2006), 1051–1059. doi:10.1095/biolreprod.105.045799
- Mikkola, M., Andersson, M. und Taponen, J. (2015): „Transfer of cattle embryos produced with sex-sorted semen results in impaired pregnancy rate and increased male calf mortality“ *Theriogenology*. (84) Nr. 7 (2015), 1118–1122. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.06.012
- Mikkola, M., Hasler, J. F. und Taponen, J. (2020): „Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle“ *Reproduction, Fertility and Development*. (32) Nr. 2 (2020), 104. doi:10.1071/RD19279
- Mikkola, M. und Taponen, J. (2017a): „Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Follitropin or Pluset“ *Theriogenology*. (88) (2017), 84–88. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.09.052
- Mikkola, M. und Taponen, J. (2017b): „Quality and developmental rate of embryos produced with sex-sorted and conventional semen from superovulated dairy cattle“ *Theriogenology*. (87) (2017), 135–140. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.08.013
- Mirihagalle, S., Hughes, J. R. und Miller, D. J. (2022): „Progesterone-Induced Sperm Release from the Oviduct Sperm Reservoir“ *Cells*. (11) Nr. 10 (2022), 1622. doi:10.3390/cells11101622
- Mitchell, C. M., Haick, A., Nkwopara, E., Garcia, R., Rendi, M., Agnew, K. et al. (2015): „Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women“ *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. (212) Nr. 5 (2015), 611.e1-611.e9. doi:10.1016/j.ajog.2014.11.043
- Mitchell, J. (2011): „*Streptococcus mitis*: walking the line between commensalism and pathogenesis“ *Molecular Oral Microbiology*. (26) Nr. 2 (2011), 89–98. doi:10.1111/j.2041-1014.2010.00601.x
- Miyazaki, S.-I., Hashimoto, N., Yoshimoto, Y., Kishimoto, T., Igusa, Y. und Hiramoto, Y. (1986): „Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs“ *Developmental Biology*. (118) Nr. 1 (1986), 259–267. doi:10.1016/0012-1606(86)90093-X
- Monniaux, D., Chupin, D. und Saumande, J. (1983): „Superovulatory responses of cattle“ *Theriogenology*. (19)Nr. 1 (1983), 55–81. doi:10.1016/0093-691X(83)90124-3

- Moor, R.M., Kruip, Th.A.M. und Green, D. (1984): „Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation?“ *Theriogenology*. (21) Nr. 1 (1984), 103–116. doi:10.1016/0093-691X(84)90310-8
- Moore, D. E., Soules, M. R., Klein, N. A., Fujimoto, V. Y., Agnew, K. J. und Eschenbach, D. A. (2000): „Bacteria in the transfer catheter tip influence the live-birth rate after in vitro fertilization“ *Fertility and Sterility*. (74) Nr. 6 (2000), 1118–1124. doi:10.1016/S0015-0282(00)01624-1
- Moore, S. G., Ericsson, A. C., Pooock, S. E., Melendez, P. und Lucy, M. C. (2017): „Hot topic: 16S rRNA gene sequencing reveals the microbiome of the virgin and pregnant bovine uterus“ *Journal of Dairy Science*. (100) Nr. 6 (2017), 4953–4960. doi:10.3168/jds.2017-12592
- Moore, W. (1975): „The Control of Time of Oestrus and Ovulation and the Induction of Superovulation in Cattle“ *Australian Journal of Agricultural Research*. (26) Nr. 2 (1975), 295–304. doi:10.1071/AR9750295
- Moraes, J. G. N., Gull, T., Ericsson, A. C., Pooock, S. E., Caldeira, M. O. und Lucy, M. C. (2024): „The microbiome of the pregnant uterus in Holstein dairy heifers and cows assessed by bacterial culture and 16S ribosomal RNA gene sequencing“ *Frontiers in Microbiology*. (15) (2024), 1385497. doi:10.3389/fmicb.2024.1385497
- Moran, C., Quirke, J. F. und Roche, J. F. (1989): „Puberty in heifers: A Review“ *Animal Reproduction Science*. (18) Nr. 1–3 (1989), 167–182. doi:10.1016/0378-4320(89)90019-5
- Moreno, I., Codoñer, F. M., Vilella, F., Valbuena, D., Martinez-Blanch, J. F., Jimenez-Almazán, J. et al. (2016): „Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure“ *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. (215) Nr. 6 (2016), 684–703. doi:10.1016/j.ajog.2016.09.075
- Moreno, I., Garcia-Grau, I., Perez-Villaroya, D., Gonzalez-Monfort, M., Bahçeci, M., Barrionuevo, M. J. et al. (2022): „Endometrial microbiota composition is associated with reproductive outcome in infertile patients“ *Microbiome*. (10) Nr. 1 (2022), 1–17. doi:10.1186/s40168-021-01184-w
- Moresco, E. M. Y., LaVine, D. und Beutler, B. (2011): „Toll-like receptors“ *Current Biology*. (21) Nr. 13 (2011), R488–R493. doi:10.1016/j.cub.2011.05.039
- Morris, D. G., Grealy, M., Leese, H. J., Diskin, M. G. und Sreenan, J. M. (2001): *Cattle embryo growth, development and viability*. Dublin: Teagasc.
- Murdoch, W. J. und Gottsch, M. L. (2003): „Proteolytic Mechanisms in the Ovulatory Folliculo-Luteal Transformation“ *Connective Tissue Research*. (44) Nr. 1 (2003), 50–57. doi:10.1080/03008200390151963
- Murphy, B. D. und Martinuk, S. D. (1991): „Equine Chorionic Gonadotropin“ *Endocrine Reviews*. (12) Nr. 1 (1991), 27–44. doi:10.1210/edrv-12-1-27
- Murphy, M. G., Enright, W. J., Crowe, M. A., McConnell, K., Spicer, L. J., Boland, M. P. et al. (1991): „Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers“ *Reproduction*. (92) Nr. 2 (1991), 333–338. doi:10.1530/jrf.0.0920333
- Nadir, S., Saacke, R. G., Bame, J., Mullins, J. und Degelos, S. (1993): „Effect of freezing semen and dosage of sperm on number of accessory sperm, fertility, and embryo quality in artificially inseminated cattle“ *Journal of Animal Science*. (71) Nr. 1 (1993), 199–204. doi:10.2527/1993.711199x
- Nagashima, H., Kashiwazaki, N., Ashman, R. J., Grupen, C. G. und Nottle, M. B. (1995): „Cryopreservation of porcine embryos“ *Nature*. (374) Nr. 6521 (1995), 416–416. doi:10.1038/374416a0
- Nakao, T., Gamal, A., Osawa, T., Nakada, K., Moriyoshi, M. und Kawata, K. (1997): „Postpartum Plasma PGF Metabolite Profile in Cows with Dystocia and/or Retained Placenta, and Effect of Fenprostalene on Uterine Involution and Reproductive Performance.“ *Journal of Veterinary Medical Science*. (59) Nr. 9 (1997), 791–794. doi:10.1292/jvms.59.791
- Nasser, L. F., Adams, G. P., Bó, G. A. und Mapletoft, R. J. (1993): „Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers“ *Theriogenology*. (40) Nr. 7 (1993), 713–724. doi:10.1016/0093-691X(93)90207-L

- Nemeghaire, S., Argudín, M. A., Feßler, A. T., Hauschild, T., Schwarz, S. und Butaye, P. (2014): „The ecological importance of the *Staphylococcus sciuri* species group as a reservoir for resistance and virulence genes“ *Veterinary Microbiology*. (171) Nr. 3–4 (2014), 342–356. doi:10.1016/j.vetmic.2014.02.005
- Newcomb, R., Rowson, L. E. A. und Trouson, A. O. (1976): The entry of superovulated eggs into the uterus. *Egg Transfer in Cattle*. (Band 5491, S. 1–15). Gehalten auf dem Agriculture Research Seminar
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I. et al. (1998): „Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4“ *Cell*. (95) Nr. 3 (1998), 379–391. doi:10.1016/S0092-8674(00)81769-9
- Nickel, R., Schummer, A. und Seiferle, E. (2004): Weibliche Geschlechtsorgane von Rind, Schaf und Ziege. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band II - Eingeweide*. (9. Aufl., S. 424–433). Stuttgart: Parey. doi:10.1055/b-006-149399
- Niemann, H. (1986): „Möglichkeiten und Grenzen des Embryotransfers bei landwirtschaftlichen Nutztieren.“ *Tierärztliche Umschau*. (41) (1986), 625–633.
- Niwa, H., Miyazaki, J. und Smith, A. G. (2000): „Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells“ *Nature Genetics*. (24) Nr. 4 (2000), 372–376. doi:10.1038/74199
- Noakes, D. E. (2001): Part One: Normal Oestrous Cycles. In D.E. Noakes, G.C.W. England, T.J. Parkinson & G.H. Arthur (Hrsg.), *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. (8. Aufl.). W.B. Saunders.
- Nonogaki, T., Noda, Y., Goto, Y., Kishi, J. und Mori, T. (1994): „Developmental blockage of mouse embryos caused by fatty acids“ *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. (11) Nr. 9 (1994), 482–488. doi:10.1007/BF02215713
- Norris, R. P., Freudzon, M., Mehlmann, Lisa M., Cowan, A. E., Simon, A. M., Paul, D. L. et al. (2008): „Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption“ *Development*. (135) Nr. 19 (2008), 3229–3238. doi:10.1242/dev.025494
- Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A. et al. (2009): „Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte“ *Development*. (136) Nr. 11 (2009), 1869–1878. doi:10.1242/dev.035238
- Nowak, T. A., Jaśkowski, J. M., Szczepankiewicz, D. und Olechnowicz, J. (2011): „Quality and number of cumulus-oocyte complexes (COC) and concentrations of leptin and ghrelin in blood and follicular fluid depending on the body condition of cows“ *Medycyna Weterynaryjna*. (67) Nr. 2 (2011), 115–119.
- Nussbaum, H. (2012): Effects of silage additives based on homo- or heterofermentative lactic acid bacteria on methane yields in the biogas processing. *Proceedings of the XVI International Silage Conference*. (S. 452–453). Gehalten auf der XVI International Silage Conference, Hämeenlinna, Finland
- O'Hara, L., Scully, S., Maillo, V., Kelly, A. K., Duffy, P., Carter, F. et al. (2012): „Effect of follicular aspiration just before ovulation on corpus luteum characteristics, circulating progesterone concentrations and uterine receptivity in single-ovulating and superstimulated heifers“ *Reproduction*. (143) Nr. 5 (2012), 673–682. doi:10.1530/REP-11-0505
- Olds, D., Seath, D.M., Carpenter, M. C. und Lucas, H. L. (1953): „Interrelationships between Site of Deposition, Dosage, and Number of Spermatozoa in Diluted Semen and Fertility of Dairy Cows Inseminated Artificially“ *Journal of Dairy Science*. (36) Nr. 10 (1953), 1031–1035. doi:10.3168/jds.S0022-0302(53)91594-X
- Orihuela, P. A., Parada-Bustamante, A., Cortés, P. P., Gatica, C. und Croxatto, H. B. (2003): „Estrogen Receptor, Cyclic Adenosine Monophosphate, and Protein Kinase A Are Involved in the Nongenomic Pathway by Which Estradiol Accelerates Oviductal Oocyte Transport in Cyclic Rats“ *Biology of Reproduction*. (68) Nr. 4 (2003), 1225–1231. doi:10.1095/biolreprod.102.011395

- Orihuela, P. A., Parada-Bustamante, A., Zuñiga, L. M. und Croxatto, H. B. (2006): „Inositol triphosphate participates in an oestradiol nongenomic signalling pathway involved in accelerated oviductal transport in cycling rats“ *Journal of Endocrinology*. (188) Nr. 3 (2006), 579–588. doi:10.1677/joe.1.06448
- Ostad, E., Ataee, N. und Shokouhfar, M. (2024): „Antimicrobial Activity of *Bacillus Coagulans* Supernatant Against Human Enteric Pathogens“ *Shiraz E-Medical Journal*. (25) Nr. 10 (2024), e140293. doi:10.5812/semj-140293
- Ozawa, M., Sakatani, M., Yao, J., Shanker, S., Yu, F., Yamashita, R. et al. (2012): „Global gene expression of the inner cell mass and trophectoderm of the bovine blastocyst“ *BMC Developmental Biology*. (12) Nr. 1 (2012), 33. doi:10.1186/1471-213X-12-33
- Park, J-Y., Su, Y-Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S-L. C. und Conti, M. (2004): „EGF-Like Growth Factors As Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle“ *Science*. (303) Nr. 5658 (2004), 682–684. doi:10.1126/science.1092463
- Parr, E. L. und Parr, M. B. (1986): „Uptake of immunoglobulins and other proteins from serum into epithelial cells of the mouse uterus and oviduct“ *Journal of Reproductive Immunology*. (9) Nr. 4 (1986), 339–354. doi:10.1016/0165-0378(86)90034-3
- Pascottini, O. B., Dini, P., Hostens, M., Ducatelle, R. und Opsomer, G. (2015): „A novel cytologic sampling technique to diagnose subclinical endometritis and comparison of staining methods for endometrial cytology samples in dairy cows“ *Theriogenology*. (84) Nr. 8 (2015), 1438–1446. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.07.032
- Pascottini, O. B., Hostens, M., Dini, P., Vandepitte, J., Ducatelle, R. und Opsomer, G. (2016): „Distribution of inflammation and association between active and chronic alterations within the endometrium of dairy cows“ *Reproduction in Domestic Animals*. (51) Nr. 5 (2016), 751–757. doi:10.1111/rda.12742
- Pascottini, O. B., Van Schyndel, S. J., Spricigo, J. F. W., Rousseau, J., Weese, J. S. und LeBlanc, S. J. (2020): „Dynamics of uterine microbiota in postpartum dairy cows with clinical or subclinical endometritis“ *Scientific Reports*. (10) (2020), 12353. doi:10.1038/s41598-020-69317-z
- Paula-Lopes, F. F., Chase, C. C., Al-Katanani, Y. M., Krininger, C. E., Rivera, R. M., Tekin, S. et al. (2003): „Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures“ *Reproduction*. (125) Nr. 2 (2003), 285–294. doi:10.1530/rep.0.1250285
- Payton, R. R., Romar, R., Coy, P., Saxton, A. M., Lawrence, J. L. und Edwards, J. L. (2004): „Susceptibility of Bovine Germinal Vesicle-Stage Oocytes from Antral Follicles to Direct Effects of Heat Stress In Vitro“ *Biology of Reproduction*. (71) Nr. 4 (2004), 1303–1308. doi:10.1095/biolreprod.104.029892
- Peippo, J., Vartia, K., Kananen-Anttila, K., Rätty, M., Korhonen, K., Hurme, T. et al. (2009): „Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen“ *Animal Reproduction Science*. (111) Nr. 1 (2009), 80–92. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.02.002
- Peng, X-R., Hsueh, A. J. W., Lapolt, P. S., Bjersing, L. und Ny, T. (1991): „Localization of Luteinizing Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression in Ovarian Cell Types during Follicle Development and Ovulation“ *Endocrinology*. (129) Nr. 6 (1991), 3200–3207. doi:10.1210/endo-129-6-3200
- Perry, G. A., Walker, J. A., Rich, J. J. J., Northrop, E. J., Perkins, S. D., Beck, E. E. et al. (2020): „Influence of Sexcel™ (gender ablation technology) gender-ablated semen in fixed-time artificial insemination of beef cows and heifers“ *Theriogenology*. (146) (2020), 140–144. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.11.030
- Peter, A. T., Bosu, W. T. K. und DeDecker, R. J. (1989): „Suppression of preovulatory luteinizing hormone surges in heifers after intrauterine infusions of *Escherichia coli* endotoxin“ *American Journal of Veterinary Research*. (50) Nr. 3 (1989), 368–373. doi:10.2460/ajvr.1989.50.03.368
- Peter, A. T., Bosu, W. T. K. und Gilbert, R. O. (1990): „Absorption of endotoxin (lipopolysaccharide) from the uteri of postpartum dairy cows“ *Theriogenology*. (33) Nr. 5 (1990), 1011–1014. doi:10.1016/0093-691X(90)90062-X

- Peter, S., Gärtner, M. A., Michel, G., Ibrahim, M., Klopffleisch, R., Lübke-Becker, A. et al. (2018): „Influence of intrauterine administration of *Lactobacillus buchneri* on reproductive performance and pro-inflammatory endometrial mRNA expression of cows with subclinical endometritis“ *Scientific Reports*. (8) Nr. 1 (2018), 5473. doi:10.1038/s41598-018-22856-y
- Pi, D., Zhou, F., Bai, K., Liu, C., Xu, F. und Li, J. (2020): „*Raoultella ornithinolytica* Infection in the Pediatric Population: A Retrospective Study“ *Frontiers in Pediatrics*. (8) (2020), 362. doi:10.3389/fped.2020.00362
- Piersanti, R. L., Santos, J. E. P., Sheldon, I. M. und Bromfield, J. J. (2019): „Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha alter gene expression of oocytes and cumulus cells during bovine in vitro maturation“ *Molecular Reproduction and Development*. (86) Nr. 12 (2019), 1909–1920. doi:10.1002/mrd.23288
- Plöntzke, J., Madoz, L. V., De La Sota, R. L., Drillich, M. und Heuwieser, W. (2010): „Subclinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina“ *Animal Reproduction Science*. (122) Nr. 1–2 (2010), 52–57. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.07.006
- Polidoro, J. P., Howe, G. R. und Black, D. L. (1973): „The effect of adrenergic drugs on ovum transport through the rabbit oviduct“ *Reproduction*. (35) Nr. 2 (1973), 331–337. doi:10.1530/jrf.0.0350331
- Pothmann, H., Müller, J., Pothmann, I., Tichy, A. und Drillich, M. (2019): „Reproducibility of endometrial cytology using cytobrush technique and agreement for the diagnosis of subclinical endometritis between five predefined endometrial sites“ *Reproduction in Domestic Animals*. (54) Nr. 2 (2019), 350–357. doi:10.1111/rda.13367
- Prunner, I., Wagener, K., Pothmann, H., Ehling-Schulz, M. und Drillich, M. (2014): „Risk factors for uterine diseases on small- and medium-sized dairy farms determined by clinical, bacteriological, and cytological examinations“ *Theriogenology*. (82) Nr. 6 (2014), 857–865. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.06.015
- Pugh, D. G., Martin, M. T., Shull, J. W. und Bowen, J. M. (1986): „Endometrial candidiasis in five mares“ *Journal of Equine Veterinary Science*. (6)Nr. 1 (1986), 40–43. doi:10.1016/S0737-0806(86)80081-8
- Purwantara, B., Callesen, H. und Greve, T. (1994b): „Characteristics of ovulations in superovulated cattle“ *Animal Reproduction Science*. (37) Nr. 1 (1994b), 1–5. doi:10.1016/0378-4320(94)01321-7
- Purwantara, B., Schmidt, M., Callesen, H. und Greve, T. (1994a): „Follicular Development and Embryo Recovery Following 3 versus 8 FSH Injections in Heifers“ *Acta Veterinaria Scandinavica*. (35) Nr. 1 (1994a), 89–92. doi:10.1186/BF03548358
- Putney, D. J., Drost, M. und Thatcher, W. W. (1988b): „Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between Days 1 to 7 post insemination“ *Theriogenology*. (30) Nr. 2 (1988b), 195–209. doi:10.1016/0093-691X(88)90169-0
- Putney, D. J., Drost, M. und Thatcher, W. W. (1989a): „Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination“ *Theriogenology*. (31) Nr. 4 (1989a), 765–778. doi:10.1016/0093-691X(89)90022-8
- Putney, D. J., Mullins, S., Thatcher, W. W., Drost, M. und Gross, T. S. (1989b): „Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination“ *Animal Reproduction Science*. (19) Nr. 1–2 (1989b), 37–51. doi:10.1016/0378-4320(89)90045-6
- Putney, D. J., Thatcher, W. W., Drost, M., Wright, J. M. und DeLorenzo, M. A. (1988a): „Influence of environmental temperature on reproductive performance of bovine embryo donors and recipients in the southwest region of the united states“ *Theriogenology*. (30) Nr. 5 (1988a), 905–922. doi:10.1016/S0093-691X(88)80053-0
- Raccach, M. (2014): *Pediococcus*. *Encyclopedia of Food Microbiology*. (2. Aufl., S. 1–5). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00247-0
- Ralston, A. und Rossant, J. (2005): „Genetic regulation of stem cell origins in the mouse embryo“ *Clinical Genetics*. (68) Nr. 2 (2005), 106–112. doi:10.1111/j.1399-0004.2005.00478.x
- Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F. und Jespersen, L. (2013): „Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products“ *Food Microbiology*. (36) (2013), 22–29. doi:10.1016/j.fm.2013.03.010

- Rasolomboahanginjatovo, H. S., Chorfi, Y., Dupras, R., Mills, L. und Lefebvre, R. (2014): „Effect of superovulation on uterine and serum biochemical parameters and its potential association with transferable embryos in Holstein dairy cows“ *Journal of Veterinary Science*. (15) Nr. 2 (2014), 273–281. doi:10.4142/jvs.2014.15.2.273
- Ratchamak, R., Thananurak, P., Boonkum, W., Semaming, Y. und Chankitisakul, V. (2022): „The Melatonin Treatment Improves the Ovarian Responses After Superstimulation in Thai-Holstein Crossbreeds Under Heat Stress Conditions“ *Frontiers in Veterinary Science*. (9) (2022), 888039. doi:10.3389/fvets.2022.888039
- Rebordão, M. R., Carneiro, C., Alexandre-Pires, G., Brito, P., Pereira, C., Nunes, T. et al. (2014): „Neutrophil extracellular traps formation by bacteria causing endometritis in the mare“ *Journal of Reproductive Immunology*. (106) (2014), 41–49. doi:10.1016/j.jri.2014.08.003
- Reis, A., Rooke, J. A., McCallum, G. J., Staines, M. E., Ewen, M., Lomax, M. A. et al. (2003): „Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced in vitro“ *Reproduction, Fertility and Development*. (15) Nr. 5 (2003), 275–284. doi:10.1071/RD03004
- Renegar, R. H., Hafs, H. D., Britt, J. H. und Carruthers, T. D. (1978): „Luteolysis, growth hormone, glucocorticoids, prolactin and milk production in lactating dairy cows given prostaglandin F₂ α“ *Journal of Animal Science*. (47) Nr. 2 (1978), 532–537.
- Reynolds, L. P., Millaway, D. S., Kirsch, J. D., Infeld, J. E. und Redmer, D. A. (1990): „Growth and in-vitro metabolism of placental tissues of cows from Day 100 to Day 250 of gestation“ *Reproduction*. (89) Nr. 1 (1990), 213–222. doi:10.1530/jrf.0.0890213
- Rhoads, M. L., Rhoads, R. P., Gilbert, R. O., Toole, R. und Butler, W. R. (2006): „Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows“ *Animal Reproduction Science*. (91) Nr. 1–2 (2006), 1–10. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.02.009
- Ricci, A., Gallo, S., Molinaro, F., Dondo, A., Zoppi, S. und Vincenti, L. (2015): „Evaluation of Subclinical Endometritis and Consequences on Fertility in Piedmontese Beef Cows“ *Reproduction in Domestic Animals*. (50) Nr. 1 (2015), 142–148. doi:10.1111/rda.12465
- Richards, J. S., Russell, D. L., Robker, R. L., Dajee, M. und Alliston, T. N. (1998): „Molecular mechanisms of ovulation and luteinization“ *Molecular and Cellular Endocrinology*. (145) Nr. 1–2 (1998), 47–54. doi:10.1016/S0303-7207(98)00168-3
- Rieger, D., Loskutoff, N. und Betteridge, K. J. (1992): „Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro“ *Reproduction, Fertility and Development*. (4) Nr. 5 (1992), 547–557. doi:10.1071/RD9920547
- Rincón, J. A. A., Gindri, P. C., Mion, B., Ferronato, G. Á., Barbosa, A. A., Maffi, A. S. et al. (2019): „Early embryonic development of bovine oocytes challenged with LPS in vitro or in vivo“ *Reproduction*. (158) Nr. 5 (2019), 453–463. doi:10.1530/REP-19-0316
- Risco, C. A., Donovan, G. A. und Hernandez, J. (1999): „Clinical Mastitis Associated with Abortion in Dairy Cows“ *Journal of Dairy Science*. (82) Nr. 8 (1999), 1684–1689. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75397-X
- Risvanli, A., Kalender, H., Safak, T., Yuksel, B. F. und Karagulle, B. (2022): „Mixed Bacteriological Isolation Percentages from the Uterus of Cows Slaughtered due to Infertility.“ *Advancements in Life Science*. (9) Nr. 4 (2022), 521–525.
- Rivera, F. A., Mendonça, L. G. D., Lopes, G., Santos, J. E. P., Perez, R. V., Amstalden, M. et al. (2011): „Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows“ *Reproduction*. (141) Nr. 3 (2011), 333–342. doi:10.1530/REP-10-0375
- Rivera, R. M., Kelley, K. L., Erdos, G. W. und Hansen, P. J. (2004): „Reorganization of Microfilaments and Microtubules by Thermal Stress in Two-Cell Bovine Embryos“ *Biology of Reproduction*. (70) Nr. 6 (2004), 1852–1862. doi:10.1095/biolreprod.103.024901
- Rivera, R. M., Kelley, K. L., Erdos, G. W. und Hansen, P. J. (2003): „Alterations in Ultrastructural Morphology of Two-Cell Bovine Embryos Produced In Vitro and In Vivo Following a Physiologically Relevant Heat Shock“ *Biology of Reproduction*. (69) Nr. 6 (2003), 2068–2077. doi:10.1095/biolreprod.103.020347
- Robertson, I. und Nelson, R. E. (2009): „Chapter 9. Certification and identification of embryos“ *Manual of the International Embryo Transfer Society*. (4) (2009), 86–105.

- Rocha, A., Randel, R. D., Broussard, J. R., Lim, J. M., Blair, R. M., Roussel, J. D. et al. (1998): „High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in but not in cows“ *Theriogenology*. (49) Nr. 3 (1998), 657–665. doi:10.1016/S0093-691X(98)00016-8
- Roche, J. F. (1996): „Control and regulation of folliculogenesis – a symposium in perspective“ *Reviews of Reproduction*. (1) (1996), 19–27. doi:10.1530/ror.0.0010019
- Roche, J. F., Mihn, M., Diskin, M. G. und Ireland, J. J. (1998): „A Review of Regulation of Follicle Growth in Cattle“ *Journal of Animal Science*. (76) Nr. suppl_3 (1998), 16–29. doi:10.2527/1998.76suppl_316x
- Rodrigues, P., Limback, D., McGinnis, L. K., Plancha, C. E. und Albertini, D. F. (2008): „Oogenesis: Prospects and challenges for the future“ *Journal of Cellular Physiology*. (216) Nr. 2 (2008), 355–365. doi:10.1002/jcp.21473
- Roelofs, J. B., Bouwman, E. G., Dieleman, S. J., Van Eerdenburg, F. J. C. M., Kaal-Lansbergen, L. M. T. E., Soede, N. M. et al. (2004): „Influence of repeated rectal ultrasound examinations on hormone profiles and behaviour around oestrus and ovulation in dairy cattle“ *Theriogenology*. (62) Nr. 7 (2004), 1337–1352. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.02.002
- Roelofs, J.B., Van Eerdenburg, F.J.C.M., Soede, N.M. und Kemp, B. (2005): „Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle“ *Theriogenology*. (63) Nr. 5 (2005), 1366–1377. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.07.009
- Rönkä, E., Malinen, E., Saarela, M., Rinta-Koski, M., Aarnikunnas, J. und Palva, A. (2003): „Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*“ *International Journal of Food Microbiology*. (83) Nr. 1 (2003), 63–74. doi:10.1016/S0168-1605(02)00315-X
- Rosenberger, G. (Hrsg.) (1977): Geschlechtsapparat - Weibliches Genitale. *Die klinische Untersuchung des Rindes*. (2., völlig Neubearb. und erweit., S. 373–404). Berlin, Hamburg: Paul Parey.
- Roth, Z., Arav, A., Bor, A., Zeron, Y., Braw-Tal, R. und Wolfenson, D. (2001): „Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows“ *Reproduction*. (122) Nr. 5 (2001), 737–744. doi:10.1530/rep.0.1220737
- Roth, Z. und Hansen, P. J. (2005): „Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation“ *Reproduction*. (129) Nr. 2 (2005), 235–244. doi:10.1530/rep.1.00394
- Roth, Z., Meidan, R., Braw-Tal, R. und Wolfenson, D. (2000): „Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows“ *Reproduction*. (120) Nr. 1 (2000), 83–90. doi:10.1530/jrf.0.1200083
- Rowland, G., Forsey, T., Moss, T., Steptoe, P. C., Hewitt, J. und Darougar, S. (1985): „Failure of in vitro fertilization and embryo replacement following infection with *Chlamydia trachomatis*“ *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. (2) Nr. 3 (1985), 151–155.
- Ruoff, K. L. (1988): „*Streptococcus anginosus* („*Streptococcus milleri*“): the unrecognized pathogen“ *Clinical Microbiology Reviews*. (1) Nr. 1 (1988), 102–108.
- Ruoff, K. L., Miller, S. I., Garner, C. V., Ferraro, M. J. und Calderwood, S. B. (1989): „Bacteremia with *Streptococcus bovis* and *Streptococcus salivarius*: clinical correlates of more accurate identification of isolates“ *Journal of Clinical Microbiology*. (27) Nr. 2 (1989), 305–308. doi:10.1128/jcm.27.2.305-308.1989
- Saacke, R. G., Dalton, J. C., Nadir, S., Nebel, R. L. und Bame, J. H. (2000): „Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality“ *Animal Reproduction Science*. (60–61) (2000), 663–677. doi:10.1016/S0378-4320(00)00137-8
- Saacke, R. G., Dejarnette, J. M., Bame, J. H., Karabinus, D. S. und Whitman, S. S. (1998): „Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle?“ *Theriogenology*. (50) Nr. 1 (1998), 117–128. doi:10.1016/S0093-691X(98)00119-8
- Saini, P., Singh, M. und Kumar, P. (2019): „Fungal endometritis in bovines“ *Open Veterinary Journal*. (9) Nr. 1 (2019), 94–98. doi:10.4314/ovj.v9i1.16
- Sakatani, M., Alvarez, N. V., Takahashi, M. und Hansen, P. J. (2012): „Consequences of physiological heat shock beginning at the zygote stage on embryonic development and expression of stress response genes in cattle“ *Journal of Dairy Science*. (95) Nr. 6 (2012), 3080–3091. doi:10.3168/jds.2011-4986

- Sakatani, M., Kobayashi, S.-I. und Takahashi, M. (2004): „Effects of heat shock on in vitro development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos“ *Molecular Reproduction and Development*. (67) Nr. 1 (2004), 77–82. doi:10.1002/mrd.20014
- Salasel, B., Mokhtari, A. und Taktaz, T. (2010): „Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows“ *Theriogenology*. (74) Nr. 7 (2010), 1271–1278. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.05.033
- Sales, J. N. S. und Souza, J. C. (2005): „Timing of artificial insemination and embryo production in superovulated Holstein cattle“ *Animal Reproduction*. (2) Nr. 3 (2005), 183–186.
- Salisbury, G. W. und Vandemark, N. L. (1951): „The Effect of Cervical, Uterine and Cornual Insemination on Fertility of the Dairy Cow“ *Journal of Dairy Science*. (34) Nr. 1 (1951), 68–74. doi:10.3168/jds.S0022-0302(51)91671-2
- Sandals, W. C. D., Curtis, R. A., Cote, J. F. und Martin, S. W. (1979): „The Effect of Retained Placenta and Metritis Complex on Reproductive Performance in Dairy Cattle A Case Control Study“ *The Canadian Veterinary Journal*. (20) (1979), 131–135.
- Sanderson, N. und Martinez, M. (2020): „A single administration of a long-acting recombinant ovine FSH (roFSH) for cattle superovulation“ *Theriogenology*. (154) (2020), 66–72. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.04.037
- Santos, N. R., Lamb, G. C., Brown, D. R. und Gilbert, R. O. (2009): „Postpartum endometrial cytology in beef cows“ *Theriogenology*. (71) Nr. 5 (2009), 739–745. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.09.043
- Sartori, R., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, S. A., Guenther, J. N., Parrish, J. J. und Wiltbank, M. C. (2002): „Fertilization and Early Embryonic Development in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter“ *Journal of Dairy Science*. (85) Nr. 11 (2002), 2803–2812. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74367-1
- Sartori, R., Souza, A. H., Guenther, J. N., Caraviello, D. Z., Geiger, L. N., Schenk, J. L. et al. (2004): „Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm“ *Animal Reproduction*. (1) Nr. 1 (2004), 86–90.
- Sartori, R., Spies, C. und Wiltbank, M. C. (2017): „Effects of dry matter and energy intake on quality of oocytes and embryos in ruminants“ *Reproduction, Fertility and Development*. (29) Nr. 1 (2017), 58–65. doi:10.1071/RD16395
- Sartori, R., Suárez-Fernández, C. A., Monson, R. L., Guenther, J. N., Rosa, G. J. M. und Wiltbank, M. C. (2003a): „Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers“ *Theriogenology*. (60) Nr. 7 (2003a), 1319–1330. doi:10.1016/S0093-691X(03)00147-X
- Saumande, J. (1980): „Concentrations of luteinizing hormone, oestradiol-17 β and progesterone in the plasma of heifers treated to induce superovulation“ *Journal of Endocrinology*. (84) Nr. 3 (1980), 425–437. doi:10.1677/joe.0.0840425
- Savini, V., Catavittello, C., Bianco, A., Balbinot, A. und D’Antonio, D. (2009): „Epidemiology, Pathogenicity and Emerging Resistances in *Staphylococcus pasteurii*: From Mammals and Lampreys, to Man“ *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. (4) Nr. 2 (2009), 123–129. doi:10.2174/157489109788490352
- Savio, J. D., Keenan, L., Boland, M. P. und Roche, J. F. (1988): „Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers“ *Reproduction*. (83) Nr. 2 (1988), 663–671. doi:10.1530/jrf.0.0830663
- Sawa, N., Okamura, K., Zendo, T., Himeno, K., Nakayama, J. und Sonomoto, K. (2010): „Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* QU 15“ *Journal of Applied Microbiology*. (109) Nr. 1 (2010), 282–291. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04653.x
- Sayari, A., Agrebi, N., Jaoua, S. und Gargouri, Y. (2001): „Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus simulans* lipase“ *Biochimie*. (83) Nr. 9 (2001), 863–871. doi:10.1016/S0300-9084(01)01327-X
- Scenna, F.N., Edwards, J.L., Rohrbach, N.R., Hockett, M.E., Saxton, A.M und Schrick, F.N (2004): „Detrimental effects of prostaglandin F2 α on preimplantation bovine embryos“ *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. (73) Nr. 3–4 (2004), 215–226. doi:10.1016/j.prostaglandins.2004.02.001

- Schallenberger, E., Ulrich, P., Möstl, E., Fuchs, S. und Tenhumberg, H. (1994): „Induction of superovulation in cattle comparing single subcutaneous and repeated epidural with standard intramuscular administration of FSH“ *Theriogenology*. (41) Nr. 1 (1994), 290. doi:10.1016/S0093-691X(05)80200-6
- Schams, D., Menzer, C., Schallenberger, E., Hoffmann, B., Hahn, J. und Hahn, R. (1978): Some Studies on Pregnant Mare Serum Gonadotrophin (PMSG) and on Endocrine Responses after Application for Superovulation in Cattle. In J.R. Sreenan (Hrsg.), *Control of Reproduction in the Cow*. (S. 122–143). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-009-9753-0_7
- Schellander, K. (2005): 18 Gewinnung und Übertragung von Embryonen („Embryotransfer“). In H. Geldermann (Hrsg.), *Tier-Biotechnologie*. . Stuttgart: Eugen Ulmer GmbH & Co.
- Schenk, J. L., Brink, Z. und Suh, T. K. (2005): „Use of competitive fertilization to evaluate a simpler laser for flow cytometric sexing of bovine sperm“ *Reproduction, Fertility and Development*. (17) Nr. 2 (2005), 306. doi:10.1071/RDv17n2Ab310
- Schenk, J. L., Suh, T. K. und Seidel, G. E. (2006): „Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm“ *Theriogenology*. (65) Nr. 2 (2006), 299–307. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.04.026
- Schiewe, M. C., Looney, C. R., Johnson, C. A., Hill, K. G. und Godke, R. A. (1987): „Transferable embryo recovery rates following different insemination schedules in superovulated beef cattle“ *Theriogenology*. (28) Nr. 4 (1987), 395–406. doi:10.1016/0093-691X(87)90244-5
- Schnorr, B. und Kressin, M. (2011): 7 Befruchtung, Fertilisation. *Embryologie der Haustiere* (6., aktualisierte Aufl., S.36–41). Stuttgart: Enke.
- Schrick, F. N., Hockett, M. E., Saxton, A. M., Lewis, M. J., Dowlen, H. H. und Oliver, S. P. (2001): „Influence of Subclinical Mastitis During Early Lactation on Reproductive Parameters“ *Journal of Dairy Science*. (84) Nr. 6 (2001), 1407–1412. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)70172-5
- Schrick, F. N., Inskeep, E. K. und Butcher, R. L. (1993): „Pregnancy Rates for Embryos Transferred from Early Postpartum Beef Cows into Recipients with Normal Estrous Cycles“ *Biology of Reproduction*. (49)N r. 3 (1993), 617–621. doi:10.1095/biolreprod49.3.617
- Seidel, G. E. (2006): „Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation“ *Theriogenology*. (65) Nr. 1 (2006), 228–235. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.025
- Seidel, G. E. und Garner, D. L. (2002): „Current status of sexing mammalian spermatozoa“ *Reproduction*. (124) Nr. 6 (2002), 733–743. doi:10.1530/rep.0.1240733
- Seidel, G. E., Schenk, J. L., Herickhoff, L. A., Doyle, S. P., Brink, Z., Green, R. D. et al. (1999): „Insemination of heifers with sexed sperm“ *Theriogenology*. (52) Nr. 8 (1999), 1407–1420. doi:10.1016/S0093-691X(99)00226-5
- Sharma, N., Batoo, A. S., Huma, Z. I., Kour, S., Misri, J. und Hussain, K. (2017): „Impact of mastitis on reproductive performance in dairy animals: A review“ *Theriogenology Insight - An International Journal of Reproduction in all Animals*. (7) Nr. 1 (2017), 41. doi:10.5958/2277-3371.2017.00015.8
- Shaw, D. W. und Good, T. E. (2000): „Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle“ *Theriogenology*. (53) Nr. 8 (2000), 1521–1528. doi:10.1016/S0093-691X(00)00294-6
- Sheikh, S. S., Amr, S. S. und Lage, J. M. (2005): „Acute Placental Infection Due to *Klebsiella pneumoniae*: Report of a Unique Case“ *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. (13) Nr. 1 (2005), 49–52. doi:10.1155/2005/560841
- Sheldon, I. M. und Dobson, H. (2004): „Postpartum uterine health in cattle“ *Animal Reproduction Science*. (82–83) (2004), 295–306. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.04.006
- Sheldon, I. M., Lewis, Gregory S., LeBlanc, S. und Gilbert, R. O. (2006): „Defining postpartum uterine disease in cattle“ *Theriogenology*. (65) Nr. 8 (2006), 1516–1530. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.08.021
- Sheldon, I. M., Noakes, D. E., Rycroft, A. N. und Dobson, H. (2002a): „Effect of postpartum manual examination of the vagina on uterine bacterial contamination in cows“ *Veterinary Record*. (151) Nr. 18 (2002a), 531–534. doi:10.1136/vr.151.18.531

- Sheldon, I. M., Noakes, D. E., Rycroft, A. N., Pfeiffer, D. U. und Dobson, H. (2002b): „Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle“ *Reproduction*. (123) Nr. 6 (2002b), 837–845. doi:10.1530/rep.0.1230837
- Shields, B. E., Tschetter, A. J. und Wanat, K. A. (2016): „*Staphylococcus simulans*: An emerging cutaneous pathogen“ *JAAD Case Reports*. (2) Nr. 6 (2016), 428–429. doi:10.1016/j.jdc.2016.08.015
- Shobharani, P., Padmaja, R. J. und Halami, P. M. (2015): „Diversity in the antibacterial potential of probiotic cultures *Bacillus licheniformis* MCC2514 and *Bacillus licheniformis* MCC2512“ *Research in Microbiology*. (166) Nr. 6 (2015), 546–554. doi:10.1016/j.resmic.2015.06.003
- Sirard, M. A. und Lambert, R. D. (1985): „In Vitro Fertilization of Bovine Follicular Oocytes Obtained by Laparoscopy“ *Biology of Reproduction*. (33) Nr. 2 (1985), 487–494. doi:10.1095/biolreprod33.2.487
- Smitz, J. E. und Cortvriendt, Rg (2002): „The earliest stages of folliculogenesis in vitro“ *Reproduction*. (123) Nr. 2 (2002), 185–202. doi:10.1530/rep.0.1230185
- Snijders, S. E. M., Dillon, P., O’Callaghan, D. und Boland, M. P. (2000): „Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows“ *Theriogenology*. (53) Nr. 4 (2000), 981–989. doi:10.1016/S0093-691X(00)00244-2
- Soares, J. G., Martins, C. M., Carvalho, N. A. T., Nicacio, A. C., Abreu-Silva, A. L., Campos Filho, E. P. et al. (2011): „Timing of insemination using sex-sorted sperm in embryo production with *Bos indicus* and *Bos taurus* superovulated donors“ *Animal Reproduction Science*. (127) Nr. 3–4 (2011), 148–153. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.08.003
- Sorensen, R. A. und Wassarman, P. M. (1976): „Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte“ *Developmental Biology*. (50) Nr. 2 (1976), 531–536. doi:10.1016/0012-1606(76)90172-X
- Soto, P., Natzke, R. P. und Hansen, P. J. (2003): „Identification of Possible Mediators of Embryonic Mortality Caused by Mastitis: Actions of Lipopolysaccharide, Prostaglandin F_{2α}, and the Nitric Oxide Generator, Sodium Nitroprusside Dihydrate, on Oocyte Maturation and Embryonic Development in Cattle“ *American Journal of Reproductive Immunology*. (50) Nr. 3 (2003), 263–272. doi:10.1034/j.1600-0897.2003.00085.x
- Spilman, C. H. und Harper, M. J. K. (1975): „Effects of Prostaglandins on Oviductal Motility and Egg Transport“ *Gynecologic and Obstetric Investigation*. (6) Nr. 3–4 (1975), 186–205. doi:10.1159/000301516
- Srinivasan, M., Muthukumar, S., Rajesh, D., Kumar, V., Rajakumar, R., Akbarsha, M. A. et al. (2022a): „The Exoproteome of *Staphylococcus pasteuri* Isolated from Cervical Mucus during the Estrus Phase in Water Buffalo (*Bubalus bubalis*)“ *Biomolecules*. (12) Nr. 3 (2022a), 450. doi:10.3390/biom12030450
- Srinivasan, M., Rengarajan, R. L., Dhanasekaran, D., Akbarsha, M. A. und Archunan, G. (2022b): „*Staphylococcus pasteuri* (BCVME2) Resident in Buffalo Cervical Vaginal Mucus: A Potential Source of Estrus-Specific Sex Pheromone(s)“ *Journal of Chemical Ecology*. (48) (2022b), 7–15. doi:10.1007/s10886-021-01311-9
- Steinhauser, C. B., Looney, C. R., Hasler, J. F. und Renaud, P. (2018): „Retrospective analysis of superstimulation with Folltropin®-V in Wagyu versus other beef breeds.“ *Animal Reproduction*. (15) Nr. 3 (2018), 553.
- Stoebel, D. P. und Moberg, G. P. (1982): „Repeated Acute Stress During the Follicular Phase and Luteinizing Hormone Surge of Dairy Heifers“ *Journal of Dairy Science*. (65) Nr. 1 (1982), 92–96. . American Dairy Science Association doi:10.3168/jds.s0022-0302(82)82157-7
- Stroud, B. (2006): Consequences of Mishandling Frozen Semen and Embryos. (S. 34–44). Gehalten auf der Joint Convention Proceedings, Ottawa, Ontario, Kanada: American Embryo Transfer Association & Canadian Embryo Transfer Association.
- Stroud, B. und Hasler, J. F. (2006): „Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others“ *Theriogenology*. (65) Nr. 1 (2006), 65–76. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.10.007
- Strzemiński, P. J. (1989): „Effect of bovine seminal plasma on neutrophil phagocytosis of bull spermatozoa“ *Reproduction*. (87) Nr. 2 (1989), 519–528. doi:10.1530/jrf.0.0870519

- Sun, D., Wu, R., He, X., Wang, S., Lin, Y., Han, X. et al. (2011): „Development of a Multiplex PCR for Diagnosis of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* from Cows with Endometritis“ *Agricultural Sciences in China*. (10) Nr. 10 (2011), 1624–1629. doi:10.1016/S1671-2927(11)60160-0
- Sun, Q.-Y. (2003): „Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs“ *Microscopy Research and Technique*. (61) Nr. 4 (2003), 342–348. doi:10.1002/jemt.10347
- Suzuki, C., Yoshioka, K., Iwamura, S. und Hirose, H. (2001): „Endotoxin induces delayed ovulation following endocrine aberration during the proestrous phase in Holstein heifers“ *Domestic Animal Endocrinology*. (20) Nr. 4 (2001), 267–278. doi:10.1016/S0739-7240(01)00098-4
- Sveberg, G., Rogers, G. W., Cooper, J., Refsdal, A. O., Erhard, H.W., Kommisrud, E. et al. (2015): „Comparison of Holstein-Friesian and Norwegian Red dairy cattle for estrus length and estrous signs“ *Journal of Dairy Science*. (98)Nr. 4 (2015), 2450–2461. doi:10.3168/jds.2014-8905
- Takeo, S., Goto, H., Kuwayama, T., Monji, Y. und Iwata, H. (2013): „Effect of Maternal Age on the Ratio of Cleavage and Mitochondrial DNA Copy Number in Early Developmental Stage Bovine Embryos“ *Journal of Reproduction and Development*. (59) Nr. 2 (2013), 174–179. doi:10.1262/jrd.2012-148
- Talbot, P., Geiske, C. und Knoll, M. (1999): „Oocyte Pickup by the Mammalian Oviduct“ *Molecular Biology of the Cell*. (10)Nr. 1 (1999), 5–8. doi:10.1091/mbc.10.1.5
- Tamburrino, L., Marchiani, S., Muratori, M., Luconi, M. und Baldi, E. (2020): „Progesterone, spermatozoa and reproduction: An updated review“ *Molecular and Cellular Endocrinology*. (516) (2020), 110952. doi:10.1016/j.mce.2020.110952
- Tao, Z., Zhang, L., Zhang, Q., Lv, Tao, Chen, R., Wang, L. et al. (2019): „The Pathogenesis Of *Streptococcus anginosus* In Aerobic Vaginitis“ *Infection and Drug Resistance*. (10) (2019), 3745–3754. doi:10.2147/IDR.S227883
- Tariq, A., Seekford, Z. K. und Bromfield, J. J. (2025): „Inflammation during oocyte maturation reduces developmental competence and increases apoptosis in blastocysts“ *Biology of Reproduction*. (2024), ioae180. doi:10.1093/biolre/ioae180
- Teixeira, P. (2014): *Lactobacillus* | *Lactobacillus brevis*. *Encyclopedia of Food Microbiology*. (2. Aufl., S. 418–424). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00178-6
- Törnell, J., Billig, H. und Hillensjö, T. (1990): „Resumption of rat oocyte meiosis is paralleled by a decrease in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) and is inhibited by microinjection of cGMP“ *Acta Physiologica Scandinavica*. (139) Nr. 3 (1990), 511–517. doi:10.1111/j.1748-1716.1990.tb08953.x
- Tríbulo, A., Rogan, D., Tribulo, H., Tribulo, R., Alasino, R. V., Beltramo, D. et al. (2011): „Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V“ *Animal Reproduction Science*. (129) Nr. 1–2 (2011), 7–13. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.10.013
- Tríbulo, A., Rogan, D., Tribulo, H., Tribulo, R., Maplettoft, R. J. und Bó, G. A. (2012): „Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan“ *Theriogenology*. (77) Nr. 8 (2012), 1679–1685. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.12.013
- Van Soom, A., Boerjan, M. L., Bols, P. E. J., Vanroose, G., Lein, A., Coryn, M. et al. (1997): „Timing of Compaction and Inner Cell Allocation in Bovine Embryos Produced in Vivo after Superovulation“ *Biology of Reproduction*. (57) Nr. 5 (1997), 1041–1049. doi:10.1095/biolreprod57.5.1041
- Van Soom, A., Van Vlaenderen, I., Mahmoudzadeh, A. R., Deluyker, H. und De Kruif, A. (1992): „Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage“ *Theriogenology*. (38) Nr. 5 (1992), 905–919. doi:10.1016/0093-691X(92)90165-N
- Van Vliet, J. H. und Van Eerdenburg, F. J. C. M. (1996): „Sexual activities and oestrus detection in lactating Holstein cows“ *Applied Animal Behaviour Science*. (50) Nr. 1 (1996), 57–69. doi:10.1016/0168-1591(96)01068-4

- Vanderhyden, B. C. und Tonary, Angela M. (1995): „Differential Regulation of Progesterone and Estradiol Production by Mouse Cumulus and Mural Granulosa Cells by a Factor(s) Secreted by the Oocyte“ *Biology of Reproduction*. (53) Nr. 6 (1995), 1243–1250. doi:10.1095/biolreprod53.6.1243
- Vanholder, T., Leroy, J. L. M. R., Soom, A. V., Opsomer, G., Maes, D., Coryn, M. et al. (2005): „Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro“ *Animal Reproduction Science*. (87) Nr. 1–2 (2005), 33–44. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.09.006
- Vasconcelos, J. L. M., Sangsritavong, S., Tsai, S. J. und Wiltbank, M. C. (2003): „Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows“ *Theriogenology*. (60) Nr. 5 (2003), 795–807. doi:10.1016/S0093-691X(03)00102-X
- Verma, S., Katoch, R. C., Jand, S. K., Sharma, B. M. und Nigam, P. (1999): „Short Communication: Mycobiotic Flora of Female Genitalia of Buffaloes and Cows with Reproductive Disorders“ *Veterinary Research Communications*. (23) (1999), 337–341.
- Verstraelen, H., Vieira-Baptista, P., De Seta, F., Ventolini, G., Lonnee-Hoffmann, R. und Lev-Sagie, A. (2022): „The Vaginal Microbiome: I. Research Development, Lexicon, Defining “Normal” and the Dynamics Throughout Women’s Lives“ *Journal of Lower Genital Tract Disease*. (26) Nr. 1 (2022), 73–78. doi:10.1097/LGT.0000000000000643
- Walker, W. L., Nebel, R. L. und McGilliard, M. L. (1996): „Time of Ovulation Relative to Mounting Activity in Dairy Cattle“ *Journal of Dairy Science*. (79) Nr. 9 (1996), 1555–1561. doi:10.3168/jds.S0022-0302(96)76517-7
- Wang, L., Wang, J., Du, Liyu, Fang, X. und Liao, Z. (2022): „Application of *Weizmannia coagulans* in the medical and livestock industry“ *Annals of Microbiology*. (72) Nr. 1 (2022), 30. doi:10.1186/s13213-022-01687-3
- Wang, M.-L., Liu, M.-C., Xu, J., An, L.-G., Wang, J.-F. und Zhu, Y.-H. (2018a): „Uterine Microbiota of Dairy Cows With Clinical and Subclinical Endometritis“ *Frontiers in Microbiology*. (9) (2018a), 2691. doi:10.3389/fmicb.2018.02691
- Wang, Y., Li, A., Jiang, X., Zhang, H., Mehmood, K., Zhang, L. et al. (2018b): „Probiotic Potential of *Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Lactobacillus* Strains Isolated From Yaks“ *Frontiers in Microbiology*. (9) (2018b), 2987. doi:10.3389/fmicb.2018.02987
- Westermann, S., Drillich, M., Kaufmann, T. B., Madoz, L. V. und Heuwieser, W. (2010): „A clinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows“ *Theriogenology*. (74) Nr. 7 (2010), 1248–1255. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.05.028
- Wheater, D. M., Hirsch, A. und Mattick, A. T. R. (1952): „Possible Identity of ‘Lactobacillin’ with Hydrogen Peroxide produced by Lactobacilli“ *Nature*. (170) Nr. 4328 (1952), 623–624. doi:10.1038/170623a0
- Wieler, L. H., Ewers, C. und Selbitz, H.-J. (2015): 12 Grampositive sporenbildende Stäbchenbakterien. In H.-J. Selbitz, U. Truyen & P. Valentin-Weigand (Hrsg.), *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. (10., aktualisierte Aufl., S. 289–314). Stuttgart: Enke Verlag.
- Wildt, L., Häusler, A., Marshall, G., Hutchison, J. S., Plant, T. M., Belchetz, P. E. et al. (1981): „Frequency and Amplitude of Gonadotropin-Releasing Hormone Stimulation and Gonadotropin Secretion in the Rhesus Monkey“ *Endocrinology*. (109) Nr. 2 (1981), 376–385. doi:10.1210/endo-109-2-376
- Wiley, H. E., Bowen, M. J., Massey, J. M., Amoss, M. S., Blake, R. W. und Kraemer, D. C. (1982): „The effect of FSH on sperm transport in cattle“ *Theriogenology*. (17) Nr. 1 (1982), 113 (abstract). doi:10.1016/0093-691X(82)90157-1
- Wiley, L. M. (1988): „Trophectoderm: The First Epithelium to Develop in the Mammalian Embryo“ *Scanning Microscopy*. (2) Nr. 1 (1988), 417–426.
- Williams, B. L., Gwazdauskas, F. C., Whittier, W. D., Pearson, R. E. und Nebel, R. L. (1988): „Impact of Site of Inseminate Deposition and Environmental Factors That Influence Reproduction of Dairy Cattle“ *Journal of Dairy Science*. (71) Nr. 8 (1988), 2278–2283. doi:10.3168/jds.S0022-0302(88)79804-5

- Williams, E. J., Fischer, D. P., Noakes, D. E., England, G. C. W., Rycroft, A., Dobson, H. et al. (2007a): „The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow“ *Theriogenology*. (68)Nr. 4 (2007), 549–559. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.04.056
- Williams, E. J., Fischer, D. P., Noakes, D. E., England, G. C. W., Rycroft, A., Dobson, H. et al. (2007b): „The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow“ *Theriogenology*. (68) Nr. 4 (2007), 549–559. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.04.056
- Williams, E. J., Herath, S., England, G. C. W., Dobson, H., Bryant, C. E. und Sheldon, I. M. (2008a): „Effect of *Escherichia coli* infection of the bovine uterus from the whole animal to the cell“ *Animal*. (2) Nr. 8 (2008a), 1153–1157. doi:10.1017/S1751731108002413
- Williams, E. J., Sibley, K., Miller, A. N., Lane, E. A., Fishwick, J., Nash, D. M. et al. (2008b): „The Effect of *Escherichia coli* Lipopolysaccharide and Tumour Necrosis Factor Alpha on Ovarian Function“ *American Journal of Reproductive Immunology*. (60) Nr. 5 (2008b), 462–473. doi:10.1111/j.1600-0897.2008.00645.x
- Wilson, J. M., Jones, A. L., Moore, K., Looney, C. R. und Bondioli, K. R. (1993): „Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle stimulating hormone“ *Animal Reproduction Science*. (33) Nr. 1–4 (1993), 71–82. doi:10.1016/0378-4320(93)90107-3
- Wolfenson, D., Lew, B. J., Thatcher, W. W., Graber, Y. und Meidan, R. (1997): „Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows“ *Animal Reproduction Science*. (47) Nr. 1–2 (1997), 9–19. doi:10.1016/S0378-4320(96)01638-7
- Wolfenson, D. und Roth, Z. (2019): „Impact of heat stress on cow reproduction and fertility“ *Animal Frontiers*. (9) Nr. 1 (2019), 32–38. doi:10.1093/af/vfy027
- Wolfenson, D., Sonogo, H., Bloch, A., Shaham-Albalancy, A., Kaim, M., Folman, Y. et al. (2002): „Seasonal differences in progesterone production by luteinized bovine thecal and granulosa cells“ *Domestic Animal Endocrinology*. (22) Nr. 2 (2002), 81–90. doi:10.1016/S0739-7240(01)00127-8
- Wolfenson, D., Thatcher, W. W., Badinga, L., Savi0, J. D., Meidan, R., Lew, B. J. et al. (1995): „Effect of Heat Stress on Follicular Development during the Estrous Cycle in Lactating Dairy Cattle“ *Biology of Reproduction*. (52) Nr. 5 (1995), 1106–1113. doi:10.1095/biolreprod52.5.1106
- Wolgast, Therese (2009): *Versuche zur Verbesserung der Embryonengewinnungsrate durch den Einsatz uterusmotilitätsfördernder Medikamente an einer kommerziellen Embryotransferstation für Rinder*. Dissertation. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover
- Wrenzycki, C. (2022): „Interaction of sperm cells with the female reproductive tract in cattle: Focus on neutrophil extracellular trap formation“ *Animal Reproduction Science*. (246) (2022), 107056. doi:10.1016/j.anireprosci.2022.107056
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carnwath, J.W. und Niemann, H. (1998): „Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA“ *Reproduction*. (112) Nr. 2 (1998), 387–398. doi:10.1530/jrf.0.1120387
- Wyder, A. B., Boss, R., Naskova, J., Kaufmann, T., Steiner, A. und Graber, H. U. (2011): „*Streptococcus* spp. and related bacteria: Their identification and their pathogenic potential for chronic mastitis – A molecular approach“ *Research in Veterinary Science*. (91) Nr. 3 (2011), 349–357. doi:10.1016/j.rvsc.2010.09.006
- Xia, Y. W., Cornelius, A. J., Donnelly, C. G., Bicalho, R. C., Cheong, S. H. und Sones, J. L. (2017): „Metagenomic analysis of the equine placental microbiome.“ *Clinical Theriogenology*. (9) Nr. 3 (2017), 452.
- Xu, Z., Allen Garverick, H., Smith, G. W., Smith, M. F., Hamilton, S. A. und Youngquist, R. S. (1995): „Expression of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acids in Bovine Follicles during the First Follicular Wave“ *Biology of Reproduction*. (53) Nr. 4 (1995), 951–957. doi:10.1095/biolreprod53.4.951
- Yadav, M. C., Walton, J. S. und Leslie, K. E. (1986): „Timing of the onset and duration of ovulation in superovulated beef heifers“ *Theriogenology*. (26) Nr. 4 (1986), 509–521. doi:10.1016/0093-691X(86)90042-7

- Yadav, M., Sunita und Shukla, P. (2022): „Probiotic potential of *Weissella paramesenteroides* MYP5.1 isolated from customary dairy products and its therapeutic application“ *3 Biotech.* (12) (2022), 9. doi:10.1007/s13205-021-03074-2
- Yamamoto, T., Iwata, H., Goto, H., Shiratuki, S., Tanaka, H., Monji, Y. et al. (2010): „Effect of maternal age on the developmental competence and progression of nuclear maturation in bovine oocytes“ *Molecular Reproduction and Development.* (77) Nr. 7 (2010), 595–604. doi:10.1002/mrd.21188
- Yang, M. Y. und Fortune, J. E. (2008): „The Capacity of Primordial Follicles in Fetal Bovine Ovaries to Initiate Growth In Vitro Develops During Mid-Gestation and Is Associated with Meiotic Arrest of Oocytes1“ *Biology of Reproduction.* (78) Nr. 6 (2008), 1153–1161. doi:10.1095/biolreprod.107.066688
- Yoshino, O., McMahon, E., Sharma, S. und Shimasaki, S. (2006): „A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse“ *Proceedings of the National Academy of Sciences.* (103) Nr. 28 (2006), 10678–10683. doi:10.1073/pnas.0600507103
- Zang, L.-Y., Cosma, G., Gardner, H. und Vallyathan, V. (1998): „Scavenging of reactive oxygen species by melatonin“ *Biochimica et Biophysica Acta.* (1425) Nr. 3 (1998), 469–477. doi:10.1016/S0304-4165(98)00099-3
- Zerbe, H., Schuberth, H.-J., Engelke, F., Frank, J., Klug, E. und Leibold, W. (2003): „Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares“ *Theriogenology.* (60) Nr. 2 (2003), 209–223. doi:10.1016/S0093-691X(02)01376-6
- Zhang, Q., Pan, Y., Wang, M., Sun, L., Xi, Y., Li, M. et al. (2022): „In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from the vagina of yak (*Bos grunniens*)“ *PeerJ.* (10) (2022), e13177. doi:10.7717/peerj.13177
- Zhang, S., Li, P., Lee, S., Wang, Y., Tan, c. und Shang, N. (2024): „*Weizmannia coagulans*: an Ideal Probiotic for Gut Health“ *Food Science and Human Wellness.* (13) Nr. 1 (2024), 16–26. doi:10.26599/FSHW.2022.9250002
- Zhao, J.-L., Ding, Y.-X., Zhao, H.-X., He, X.-L., Li, P.-F., Li, Z.-F. et al. (2014): „Presence of superantigen genes and antimicrobial resistance in *Staphylococcus* isolates obtained from the uteri of dairy cows with clinical endometritis“ *Veterinary Record.* (175) Nr. 14 (2014), 352–352. doi:10.1136/vr.102302
- Zhao, S.-J., Pang, Y.-W., Zhao, X.-M., Du, W.-H., Hao, H.-S. und Zhu, H.-B. (2017): „Effects of lipopolysaccharide on maturation of bovine oocyte in vitro and its possible mechanisms“ *Oncotarget.* (8) Nr. 3 (2017), 4656–4667. doi:10.18632/oncotarget.13965
- Zhao, Y., Vanderkooi, S. und Kan, F. W. K. (2022): „The role of oviduct-specific glycoprotein (OVGP1) in modulating biological functions of gametes and embryos“ *Histochemistry and Cell Biology.* (157) Nr. 3 (2022), 371–388. doi:10.1007/s00418-021-02065-x
- Zheng, J., Johnson, M. L., Redmer, D. A. und Reynolds, L. P. (1996): „Estrogen and progesterone receptors, cell proliferation, and c-fos expression in the ovine uterus during early pregnancy.“ *Endocrinology.* (137) Nr. 1 (1996), 340–348. doi:10.1210/endo.137.1.8536633

12 Anhang

12.1 Muster Superovulationsplan



VOST-ET (D-ETR-050 EWG)
Am Bahndamm 4
26624 Südbrookmerland

Telefon: 0491/8004-300
Telefax: 0491/8004-322
Email: J.Detterer@vost.de
Internet: <http://www.vost.de>

ET-Vorbereitungsplan

Kuh:		Hb.-Nr.
Besitzer:		

Der Besitzer ist dafür verantwortlich, dass von dem Spendertier eine DNA-Karte vorliegt!

Spendertier in Brunst:	
------------------------	--

Donnerstag.03.06.21	morgens	2 ml FSH =	Pluset®	Pluset mit 10,5ml des Lösungsmittels auflösen.
Donnerstag.03.06.21	abends	2 ml FSH		
Freitag.04.06.21	morgens	1,2 ml FSH		
Freitag.04.06.21	abends	1,2 ml FSH		
Samstag.05.06.21	morgens	1 ml FSH		
Samstag.05.06.21	abends	1 ml FSH und		
Sonntag.06.06.21	morgens	0,8 ml FSH + 2 ml	Estrumate®	Konventionelles Sperma: 1. Besamung ca. 12 Stunden nach Brunstbeginn durchführen! 2. Besamung ca. 12 Stunden später. Gesextes Sperma: 1. Besamung ca. 16-20 Stunden nach Brunstbeginn durchführen. Die zweite Besamung ca. 6-8 Stunden
Sonntag.06.06.21	abends	0,8 ml FSH + 5 ml	Dinolytic®	
Montag.07.06.21	morgens			
Montag.07.06.21	abends		Brunstbeobachtung	
Dienstag.08.06.21	morgens		Brunstbeobachtung	
Dienstag.08.06.21	abends		1. Besamung	
Mittwoch.09.06.21	morgens		2. Besamung + 5 ml Receptal®	
Montag.14.06.21	abends		5 ml Dinolytic® 12 - 16 Stunden vor Spülung	
Dienstag.15.06.21	Spülung auf dem Betrieb nach Absprache			

Bei Einsatz von zwei versch. Bullen "Mischbarkeit" klären!
(Göttingen: 05513923434)

Medikamente im Kühlschrank aufbewahren! Alle Spritzen in den Muskel geben!
Nicht aufgebrauchte Medikamente müssen zurückgegeben werden!
Plusetrete bitte in kleinen Portionen einfrieren.
Wartezeiten Milch: FSH: 0 Tage; Estrumate: 0 Tage Dinolytic: 0 Tage

Die exakte Einhaltung des Behandlungsplanes und eine genaue Brunstbeobachtung von Spender- und Empfängertieren sind Grundvoraussetzungen für einen erfolgreichen Embryotransfer!

Bei besonderen Sperma Wünschen (z.B. gesextes Sperma) bitte rechtzeitig den Techniker informieren bzw. bestellen!

Wichtige Telefonnummern: J. Detterer 0162/2340011 H. Hinrichs 0162/2340027 A. Park 0162/2340029
M. Stein 0162/2340047

12.2 Einzeltierprotokolle

12.2.1 Protokoll zur Voruntersuchung

Befundbogen - Startuntersuchung

In-vivo Embryonenprojekt

Versuchsinformationen

Laufende Nr.	Heutiges Datum	Besitzer	Ort	Untersuchende Person

Vorbericht

Ohrmarke	Rasse	Geburtsdatum	Laktationen	Anzahl Superovu. - Insg. in dieser Lakt.

Letzte Kalbung	Geburtsverlauf	Letzte Brunst	Brunstintensität	Milchleistung letzte Milchkontrolle (+Datum)

Allgemeinuntersuchung zum Startzeitpunkt (Zyklustag 8-14)

Allgemeinverhalten	Ingestionsverhalten	Exkretionsverhalten	Pflegezustand	Ernährungszustand/ BCS

Haltung	Körpertemp.	Herzfrequenz	Atemfrequenz	Kot

Habitus

Gynäkologische Untersuchung zum Startzeitpunkt (Zyklustag 8-14)

Äußerlich

Rektal - Uterusbefunde

Ausfluss	Vulva	Größe	Konsistenz	Symmetrie

Rektalsonographie - Ovarbefunde

Ovar links: Größe [cm]	
Corpus luteum [cm]	Blase [cm]
Bild-Nr im Gerät:	

Ovar rechts: Größe [cm]	
Corpus luteum	Blase
Bild-Nr im Gerät:	

Vaginale Untersuchung

Portio vaginalis			Portio und Scheidengewölbe	
Form	Öffnungsgrad	Farbe	Feuchtigkeitsgrad	Schleimhautoberfl.

Geschlechts gesundheit	Superovulation eingeleitet?

Erläuterung zum Versuchsprotokoll
Versuchsinformationen & Vorbericht

Lfd. Nr	1-30
Ohrrmarke	laut VVVO
Rasse	Rasseschlüssel der ADR; 1=sbt, 2=rft...10=DSN
Geburtsverlauf	alleine(1), leicht(2), schwer(3) (Starke Zughilfe, Torsio uteri, Kaiserschnitt) oder keine Angaben (0)
Brunstintensität	deutlich(1), schwach (2), sehr stark(3), keine äußeren Anzeichen(0)

Allgemeinuntersuchung

Allgemeinverhalten	ruhig und aufmerksam (1), apathisch(2), unruhig(3), aufgereg(4), sehr aufgereg(5)
Ingestionsverhalten	ungestört(1), gestört(2), nicht beobachtet (0)
Exkretionsverhalten	ungestört(1), gestört(2), nicht beobachtet(0)
Pflegezustand (Hygienescore Card n. Cook)	1-4
Ernährungszustand (BCS n. Edmondson)	1-5
Haltung	gerade Rückenlinie (1), leicht aufgekrümmte Rückenlinie (2), stark aufgekrümmte Rückenlinie (3)
Körpertemperatur	38,0-39,0°C(1), <38,0°C(2), >39,0°C(3)
Herzfrequenz	65-80/min(1), <65/min(2), >80/min(3)
Atemfrequenz	15-35/min(1), <15/min(2), >35/min(3)
Kot	reichlich, mittelbreitig, mäßig zerkleinert, grünoliv, keine Beimengungen (1), verändert (2)
Habitus	nicht (1), ggr.(2), mgr(3), hgr(4) erkranktes Tier

Gynäkologische Untersuchung

Ausfluss	kein(1), klar(2), mukopurulent(3), purulent(4)
Vulva	o.b.B.(1), Ödem(2), mangelnder Schlus(3), Schrägstellung(4), Verletzung(5)
Größe	unter der Hand versammelbar, Hörner je 1-Finger stark(1); unter der Hand versammelbar, Hörner je 2-Finger stark(2); fast unter der Hand versammelbar, Hörner je 3-Finger stark(3)
Konsistenz	schlaff, wenig kontraktionsbereit(1); mittelmäßig kontraktionsbereit(2), stark kontraktionsbereit(3)
Symmetrie	symmetrisch(1), assymetrisch rechts(2), assymetrisch links(3)
Ovar-Größe	0-...cm x 0-...cm
C./Blase Ø	0-...cm
Form	rosettenförmig (1), zapfenförmig(2), breit verlaufend(3), schlaff, lappig überhängend (4)
Öffnungsgrad	geschlossen(1), strohalmstark geöffnet (2), bleistiftstark geöffnet(3), fingerstark geöffnet(4), 2 Finger stark geöffnet(5), 3 Finger stark geöffnet(6)
Farbe	blassrosa(1), blass(2), hyperämisch(3), dtl. krankhafte Rötung(4), sehr starke schmutzige Rötung(5)
Feuchtigkeitgrad	mäßig feucht(1), trocken(2), wenig feucht(3), stark feucht(4), Flüssigkeitsansammlung (5)
Schleimhautoberfläche	glatt(1), rau(2)
Geschlechtsgesundheit	ungestört(1), gestört(2)
Superovulation eingeleitet?	ja(1), nein(2)

12.2.2 Protokoll zur Besamung

In Vivo Embryonenprojekt

Befundbogen – Besamung

Versuchsinformationen

Laufende Nr.: _____ Ohrmarke: _____

Betrieb: _____

Besamende Person: _____

Brunst

Erste Brunstwahrnehmung Datum: _____ Uhrzeit: _____

Brunstidentifikation: ☐ Hilfsmittel: _____ [Name]☐ Aktivitätsmessung ☐ Aufsprungdetektoren☐ andre: _____☐ Werte: _____☐ visuell: Häufigkeit am Tag: _____☐ gar nichtBrunstintensität: ☐ keine äußeren Anzeichen☐ schwach ☐ deutlich ☐ sehr stark☐ Aufspringen ☐ Stehen ☐ Vaginalschleim ☐ Milchrückgang☐ Schwellung der Scham ☐ Rötung der Scham

Rektale Untersuchung

Gebärmutter: Größe: ☐ I - unter der Hand zu versammeln, Hörner 1 Finger-stark☐ II - unter der Hand zu versammeln, Hörner 2 Finger-stark☐ III - fast unter der Hand zu versammeln, Hörner 3 Finger-starkKonsistenz: ☐ I - schlaff, wenig kontraktionsbereit☐ II - mittelmäßig kontraktionsbereit☐ III - stark kontraktionsbereitSymmetrie: ☐ symmetrisch☐ asymmetrisch: ☐ rechts größer ☐ links größer

Besamungsvorgang

1. Besamung

Datum: _____ Uhrzeit: _____

Sperma: ☐ ungesext ☐ gesext

Bulle: _____

Vorschub der Besamungspipette: ☐ < 1min ☐ 1-5min ☐ > 5min☐ nicht möglich

2. Besamung

Datum: _____ Uhrzeit: _____

Sperma: ☐ ungesext ☐ gesext

Bulle: _____

Vorschub der Besamungspipette: ☐ < 1min ☐ 1-5min ☐ > 5min☐ nicht möglich

3. Besamung

Datum: _____ Uhrzeit: _____

Sperma: ☐ ungesext ☐ gesext

Bulle: _____

Vorschub der Besamungspipette: ☐ < 1min ☐ 1-5min ☐ > 5min☐ nicht möglich

12.2.3 Protokoll zum Tag der Embryonengewinnung

Befundbogen - Embryonengewinnung

In-vivo Embryonenprojekt

Versuchsinformationen

Laufende Nr.	Spüldatum	Tage nach der Besamung	Uhrzeit	Auffälligkeiten seit Besamung

Vorbericht

Allgemeinuntersuchung am Tag der Embryonengewinnung

Allgemeinverhalten	Haltung	Körpertemp.	Kot	Habitus

Gynäkologische Untersuchung am Tag der Embryonengewinnung

Äußerlich

Rektal - Uterusbefunde

Ausfluss	Vulva	Größe	Konsistenz	Symmetrie

Rektalsonographie - Ovarbefunde

Ovar links: Größe	
Anzahl Corpora lutea	Anzahl Blasen
Bild-Nr. Gerät:	

Ovar rechts: Größe	
Anzahl Corpora lutea	Anzahl Blasen
Bild-Nr. Gerät:	

Embryonengewinnung

Rechts

Vorschub Spülkatheter	Menge eingeführter Spülflüssigkeit	Menge rückgewon. Spülflüssigkeit	Trübung rückgewon. Spülfl.	Blutbeimengung rückgewon. Spülfl.

Links

Vorschub Spülkatheter	Menge eingeführter Spülflüssigkeit	Menge rückgewon. Spülflüssigkeit	Trübung rückgewon. Spülfl.	Blutbeimengung rückgewon. Spülfl.

Embryonenbewertung

Rechts

Embryonen gesamt	Taugliche Embryonen	Nicht taugliche Embryonen	davon: Unbefruchtete E.	davon: Degenerierte E.

Links

Embryonen gesamt	Taugliche Embryonen	Nicht taugliche Embryonen	davon: Unbefruchtete E.	davon: Degenerierte E.

Klassifizierung der tauglichen Embryonen - *Rechts*

↓Qualität/ Stadium →	3	4	5	6	7
1					
2					
3					

Links

↓Qualität/ Stadium →	3	4	5	6	7
1					
2					
3					

Erläuterung zum Versuchsprotokoll**Versuchsinformationen & Vorbericht**

Lfd. Nr 1-30

Allgemeinuntersuchung

Allgemeinverhalten

ruhig und aufmerksam (1), apathisch(2), unruhig(3), aufgeregt (4), sehr aufgeregt (5)

Haltung

gerade Rückenlinie (1), leicht aufgekrümmte Rückenlinie (2), stark aufgekrümmte Rückenlinie (3)

Körpertemperatur

38,0-39,0°C(1), <38,0°C(2), >39,0°C(3)

Kot

reichlich, mittelbreiig, mäßig zerkleinert, grünoliv, keine Beimengungen (1), verändert (2)

Habitus

nicht (1), ggr.(2), mgr(3), hgr(4) erkranktes Tier

Gynäkologische Untersuchung

Ausfluss

kein(1), klar(2), mukopurulent(3), purulent(4)

Vulva

o.b.B.(1), Ödem(2), mangelnder Schluss(3), Schrägstellung(4), Verletzung(5)

Größe

unter der Hand versammelbar, Hörner je 1-Finger stark(1); unter der Hand versammelbar, Hörner je 2-Finger stark(2); fast unter der Hand versamm, Hörner je 3-Finger stark(3)

Konsistenz

schlaff, wenig kontraktionsbereit(1); mittelmäßig kontraktionsbereit(2), stark kontraktionsbereit(3)

Symmetrie

symmetrisch(1), asymmetrisch rechts(2), asymmetrisch links(3)

Ovar-Größe

0-...cm x 0-...cm

Anzahl Corpora lutea / Blasen

bis 10: genaueste mögliche Angabe, ab 10: >10

Embryonengewinnung

Vorschub Spülkatheter

<1min(1), 1-5min(2), >5min(3), nicht möglich(0)

Menge eingeführter Spülfl.

0-...ml

Menge rückgewonnener Spülfl.

0-...ml

Trübung rückgewonnener Spülfl.

0-5

Blutbeimengungen rückgewon. Spülfl.

0-5

Klassifizierung der Embryonen

Qualität und Sadtien

nach IETS-Standard

13 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 28.04.2026

Alexandra Krebbers

14 Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich Frau **Prof. Dr. Christine Wrenzycki** meinen ganz besonderen Dank aussprechen, die die Idee für das Thema dieser Dissertation gegeben und damit den Grundstein für diese Arbeit gelegt hat. Vielen Dank für deine umfassende wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und deine jederzeit freundliche und unterstützende Art während der Entstehung der Arbeit.

Des Weiteren danke ich **Dr. Jan Detterer** von der Embryotransferstation des VOST in Georgsheil von Herzen für seine Bemühungen um das Entstehen und die Durchführung dieser Arbeit. Danke Jan für deinen ganzen Einsatz, die stets tatkräftige Unterstützung, dein offenes Ohr bei den vielen Fragen, die ich dir ständig gestellt habe und für die unermüdliche Bereitschaft zum Korrekturlesen. Ohne dich hätte ich das Ganze nicht geschafft.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn **Dr. Christoph Gabler** für die intensive Auswertung der mikrobiologischen Proben an der Freien Universität Berlin.

Ebenfalls möchte ich allen im Institut für Lebensmittelqualität der LUFA Nord-West und im Institut für Veterinärmedizinische Lebensmittelwissenschaft der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Mithilfe bei der Auswertung der mikrobiologischen Proben danken.

Weiterhin gilt mein herzlicher Dank **Marit Stein** und **Arno Park** von der Embryotransferstation des VOST, die bei den vielen Voruntersuchungen und Spülungen tatkräftig mitgeholfen haben. Auch dem gesamten Team der Besamungsstation danke ich für jede noch so kleine Hilfe bei Bestellungen, Versand und anderen Angelegenheiten. Ein besonderer Dank geht ebenfalls an die Züchter des VOST, die ihre wertvollen Spenderkühe für diesen Versuch bereitgestellt haben. Außerdem gilt mein Dank dem Verein Ostfriesischer Stammviehzüchter für die finanzielle Unterstützung.

Ein weiterer Dank geht an Herrn **Andreas Schaubmar** und Frau **Prof. Dr. Kathrin Büttner** der AG Biomathematik für die ausführliche statistische Auswertung und die großartige Hilfe trotz anfänglicher Missverständnisse.

An dieser Stelle möchte ich auch dem Vieh- und Fleischhandel A. Rolfes GmbH für die Bereitstellung der Schlachtuteri sowie allen Mitarbeitern vor Ort, die mir im Schlachtprozess assistiert haben, danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei all den Menschen bedanken, die mir in dieser Zeit mit ihrer moralischen Unterstützung zur Seite standen. Danke an **Inga**, denn ohne unsere Online-Sessions wäre ich bestimmt nicht so produktiv gewesen. Danke **Magnus**, dass du nie aufgehört hast, an mich und meine Kraft zu glauben.

ISBN: 978-3-86345-806-5



Verlag der DVG Service GmbH

An der Alten Post 2 • 35390 Gießen

Tel.: 0641 984446-0 • Fax: 0641 984446-25

E-Mail: info@dvj.de • Web: www.dvj.de