

# Embryogewinnungsrate nach Superovulation mit equinem Hypophysenextrakt (eFSH<sup>®</sup>) bei der Stute

Melanie Köllmann, Jeanette Probst, Christine Baackmann, Jutta Klewitz, Edward S. Squires<sup>1</sup> und Harald Sieme

Klinik für Pferde und Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover and Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, USA<sup>1</sup>

## Zusammenfassung

Zur Steigerung der Effizienz des Embryotransfers wurde in den vergangenen Jahren wiederholt versucht Verfahren zur Superovulation bei der Stute zu etablieren. Bisherige Studien zeigten jedoch, dass der Einsatz von equinem Choriogonadotropin (eCG), heterologem FSH, anti-Inhibin Vakzinen, GnRH-Analoga oder porcinem FSH - aufgrund mangelhafter Effektivität und Nebenwirkungen - wenig viel versprechend für den kommerziellen Einsatz bei der Stute zu sein schien. Verschiedene Autoren berichteten, dass mit dem seit 2003 in den USA kommerziell erhältlichen gereinigten und standardisierten (10:1 Ratio von FSH:LH) equinem Hypophysenextrakt eFSH<sup>®</sup>. Superovulationen bei der Stute ausgelöst werden können. In der vorliegenden Studie wurden sechs zyklische genitalgesunde Stuten über 5 Zyklen untersucht und die Anzahl der Ovulationen und gewonnenen Embryonen aus den stimulierten Zyklen mit denen der Kontrollzyklen verglichen. Zyklus 1 und 3 wurden als Kontrollzyklen ohne Stimulation und Besamung definiert. Im zweiten und vierten Zyklus wurden die Stuten jeweils ab einer Follikelgröße von 22-25 mm mit einer zweimal täglichen Gabe von 12,5 mg eFSH<sup>®</sup> (Fa. Bioniche-Animalhealth, Athens, GA, USA) bis zu einer durchschnittlichen Follikelgröße von 32-35 mm stimuliert. Am zweiten Tag der eFSH<sup>®</sup> Behandlung wurden 250 µg Cloprostenol (Estrumate<sup>®</sup>) intramuskulär injiziert. Nach einer 36 Stunden dauernden „coasting period“ und Ovulationsinduktion mit humanem Choriogonadotropin (Ovogest<sup>®</sup>) wurden die Stuten 12 und 36 Stunden nach Ovulationsinduktion mit 750 Mio. progressiv motilen Spermien gekühlt (+5° C) gelagertem Sperma eines fertilen Warmbluthengstes inseminiert und eine Embryonengewinnung an Tag 6,5 nach Ovulation durchgeführt. Im fünften Zyklus wurde eine Embryonengewinnung nach Ovulationsinduktion und zweimaliger Besamung wie in den Zyklen 2 und 4, jedoch ohne vorherige Stimulation durchgeführt. In den 18 Kontrollzyklen und 12 eFSH<sup>®</sup> stimulierten Zyklen lag die Anzahl Ovulationen (OV) pro Stute bei den eFSH<sup>®</sup>-Zyklen mit durchschnittlich 4,4 Ovulationen deutlich über der durchschnittlichen Ovulationsrate in den Kontrollzyklen (1,3 OV). Bis zum Erreichen eines Follikeldurchmessers von >32-35 mm wurden im Mittel 4,0 Tage für die eFSH<sup>®</sup>-Behandlung benötigt. Die Embryonengewinnungsrate nach eFSH<sup>®</sup>-Stimulation lag im Gegensatz zu Kontrollzyklen ohne Superovulationsbehandlung (1,2 Embryonen) pro Stute bei  $\bar{x}$  2,9 Embryonen. Das aufgeführte eFSH<sup>®</sup>-Behandlungsschema ist geeignet um Superovulationen und höhere Embryonengewinnungsraten im Vergleich zu nicht stimulierten Zyklen bei der Stute zu erzielen. Nichtsdestotrotz sind die Embryonengewinnungsraten trotz guter Superovulationsergebnisse nicht konstant und von individuellen Unterschieden bestimmt. In aktuelle Studien wird daher der Einfluss der Follikeldynamik und Genitaldurchblutung auf die Embryonengewinnungsrate untersucht, um möglicherweise früher „gute“ von „nicht guten“ Spenderstuten im Rahmen eines Superovulationsprogrammes zu unterscheiden und damit einen effizienteren Einsatz zu ermöglichen.

**Schlüsselwörter:** Stute, Reproduktion, Embryotransfer, Superovulation, eFSH

## Embryo recovery rate following superovulation with equine pituitary extract (eFSH<sup>®</sup>) in mares

Embryo recovery from single ovulating mares is approximately 50% per estrous cycle, leading to a non-economical state of embryo transfer in the mare. An ability to consistently induce multiple follicles and ovulations in estrous cycling mares would enhance embryo recovery from donor mares, provide multiple follicles for collection of oocytes, and improve pregnancy rates from subfertile mares. There have been numerous approaches to superovulation of the mare. Injections of porcine FSH, inhibin vaccines, equine chorionic gonadotropin (eCG) and GnRH have been of limited success in stimulating multiple ovulations in the mare. Numerous studies have shown that injection of equine pituitary extract (EPE) will result in three to four ovulations per estrous cycle and two embryos. Recently, a commercial purified equine pituitary extract product (eFSH<sup>®</sup>) has been available. In the present study six normally cycling mares were investigated over five cycles and ovulation rate and embryo recovery rate were compared between control cycles and stimulated cycles. Cycle one and three were designed as control cycles without stimulation and insemination. In cycles 2 and 4 mares were treated with 12.5 mg eFSH<sup>®</sup> intramuscularly twice daily beginning when the diameter of the largest follicle was 20 to 25 mm. Prostaglandin was administered on the second day of eFSH<sup>®</sup> therapy. Treatment with eFSH<sup>®</sup> was continued until follicle(s) were 32-35 mm in diameter. The mares were subsequently allowed to 'coast' for 36 h, after which 2500 IU human chorionic gonadotropin were administered to induce ovulation. Mares were inseminated with 750 Mio. progressive motile sperms of a fertile warmblood stallion. Embryo recovery was performed 6.5 days following ovulation. In the last cycle (5) mares were treated and inseminated in the same way than in cycle 2 and 4, but without eFSH<sup>®</sup> stimulation. Ovulation rate in control cycles was lower (1.3 ovulations) than in eFSH<sup>®</sup> treated cycles (4.4 ovulations). The number of days of eFSH<sup>®</sup> treatment required for reaching a follicle size of 32-35 mm was on average 4.0 days. Embryo recovery rate in control mares was 1.2 per cycle, whereas in eFSH<sup>®</sup> treated mares  $\bar{x}$  2.9 embryos could be flushed. The eFSH<sup>®</sup> protocol used in this study was efficient to induce multiple ovulations and increase embryo recovery rate in mares. Nevertheless the number of embryos obtained is quite encouraging, individual mare variation is considerable. Being able to identify donor mares that respond favorably to eFSH based on follicular development, ovulation and embryo recovery would be a great advantage. In current studies a possible influence of follicle development and genital blood flow on embryo recovery rate is investigated to identify „good donor mares“ in a superovulation program.

**Keywords:** mare, reproduction, embryo transfer, superovulation, eFSH

## Einleitung

Im Rahmen der equinen Reproduktionsmedizin hat der Einsatz von Biotechnologien in den vergangenen Jahren kontinuierlich zugenommen. Dabei ist in den letzten zehn Jahren insbesondere die Zahl der Embryo Transfers (ETs) stetig gestiegen. Die IETS (International Embryo Transfer Society) gibt die Anzahl der ETs beim Pferd mit ca. 25.000 weltweit an. Dabei sind die USA, Argentinien und Brasilien mit etwa 80% der durchgeführten ETs führend, aber auch in Deutschland existieren jährlich mehr Embryotransferstationen und die Zahl der deutschlandweit durchgeführten ETs steigt stetig.

Trotz enormer technischer Weiterentwicklung ist die Wirtschaftlichkeit des Embryotransfers beim Pferd jedoch nach wie vor im Vergleich zu anderen landwirtschaftlichen Nutztieren verbesserungsbedürftig. Die Stute gehört zu den monovulatorischen Spezies und nach singulärer Ovulation ist eine Embryonengewinnungsrate von etwa 50% pro Zyklus zu erwarten (Squires und McCue 2007). Geht man von einer Trächtigkeitsrate von 75% bei der Rezipientenstute aus, so liegt die Wahrscheinlichkeit einer Trächtigkeit nach Embryotransfer bei etwa 35% pro Zyklus (Squires und McCue 2007). Dies führt aufgrund der hohen Decktaxen sowie Kosten von Spender- und Rezipientenstuten zu einer zurzeit nicht wirtschaftlichen Situation des Embryotransfers beim Pferd. Durch die vor allem beim Rind im Rahmen von Embryotransferprogrammen etablierte Superovulation (Induktion einer über die artspezifische Anzahl hinausgehenden Ovulationszahl) könnte die Embryonengewinnungsrate pro Zyklus gesteigert, Kosten gesenkt und zusätzlich gewonnene Embryonen tiefgefroren werden. In den vergangenen Jahren wurde wiederholt versucht Verfahren zur Superovulation bei der Stute zu etablieren.

Erste Versuche zur Auslösung von multiplen Ovulationen bei der Stute wurden durch den Einsatz von equinem Choriogonadotropin (eCG) durchgeführt. Doch auch in hohen Dosierungen führte der Einsatz von exogenem eCG nicht zu einer Superovulation bei der Stute (Allen 1982). Ginther und Bergfeld konnten zwar 1990 zeigen, dass GnRH- bzw. GnRH-Agonisten in der Übergangsphase im Frühjahr bei Stuten zu multiplen Ovulationen führen, durch eine zweimal tägliche Applikation von GnRH bei zyklischen Stuten kam es hingegen nicht zu einer Erhöhung der Ovulationen (Squires et al. 1989).

Da die Sekretion des Glykoproteins Inhibin durch den dominanten Follikel einer Follikelwelle physiologischerweise zu einer Suppression der FSH-Sekretion im Rahmen der Follikelselektion führt (Ginther et al. 2001), war ein weiterer Ansatz die Zahl der Ovulationen durch Inhibin Antikörper zu erhöhen. Eine aktive Immunisierung von Stuten gegen Inhibin führte in zwei Studien zwar zu einer Verdopplung der Ovulationen (McKinnon et al. 1992, McCue et al. 1993), ging jedoch auch mit unerwünschten lokalen Reaktionen am Injektionsort und einer über mehrere Wochen dauernden Behandlung einher, sodass der kommerzielle Einsatz einer Anti-Inhibin Vakzinierung nicht praktikabel schien.

Der Einsatz von porcinem FSH (pFSH) führte zwar zu einer geringfügigen Steigerung der Ovulationsrate, war jedoch durch hohe Variabilität der für multiple Ovulationen notwen-

digen Menge an pFSH sehr kostspielig. Mit einer Dosierung von 150 mg pFSH über durchschnittlich 6,4 Tage konnten Squires et al. 1986 eine geringe Steigerung der Ovulationsrate mit 1,6 Ovulationen erzielen. In einer anderen Studie wurden Stuten zweimal täglich für sechs Tage mit 8, 16 oder 32 mg pFSH behandelt. Die Ovulationsraten lagen bei 1,5-1,8 Ovulationen pro Stute (Fortune und Kimmich 1983).

### Equines Hypophysenextrakt (EPE)

Die meisten Studien zur Superovulationsbehandlung bei Stuten wurden bisher mit equinem Hypophysenextrakt (EPE), das nach einer von Guillo und Combarnous (1983) beschrieben Technik aus Pferdehypophysen extrahiert wird, durchgeführt. Dabei war die Konzentration an LH (6-10 %) und FSH (2-4%) sowie deren Verhältnis zueinander nicht standardisiert. In initialen Studien (Douglas 1979, Woods und Ginther 1983) konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl der Ovulationen durch eine EPE-Behandlung auf durchschnittlich 2,3 bzw. 3,0 Ovulationen pro Stute steigern lässt. Squires et al. (1987) konnten eine Ovulationsrate von  $\approx$  3,8 OV pro Stute und eine Embryonengewinnungsrate von  $\approx$  2 Embryonen pro Stute nach EPE Behandlung, verglichen mit durchschnittlich 1,2 OV und 0,65 Embryonen bei nicht behandelten Kontrollstuten erzielen. Aufgrund mehrerer Studien der Colorado State University ( $\approx$  2,3-3,9 OV pro Stute) und den Ergebnissen an 170 mit EPE behandelten Stuten ( $\approx$  3,2 OV und  $\approx$  1,96 Embryonen pro Stute) konnte geschlossen werden, dass die Stute prinzipiell auf eine EPE-Behandlung anspricht und auch eine Steigerung der Anzahl gewonnener Embryonen zu erwarten ist. Faktoren, wie der Tag des Behandlungsbeginns bzw. die Größe des dominanten Follikels bei Behandlungsbeginn sowie Dauer, Frequenz und Dosis der Injektionen beeinflussten den Effekt von EPE maßgeblich. Viele der initialen Studien mit EPE (Woods und Ginther 1983) wurden zunächst ohne genaues Wissen über die Follikelentwicklung- und Selektion bei der Stute (Ginther et al. 2001) durchgeführt. Dippert et al. konnten 1992 feststellen, dass der Tag des Behandlungsbeginns einen Einfluss auf das Behandlungsergebnis zu haben scheint. Die Anzahl der Ovulationen war bei Stuten mit Behandlungsbeginn an Tag 5 (2,9) höher als die bei Stuten mit Behandlungsbeginn an Tag 12 (1,1). Da es bei der Stute im Rahmen der sich anbildenden Follikelwelle ab einer Follikelgröße von ca. 22-25 mm durch verschiedene Mechanismen zu einer Selektion eines dominanten Follikels und Unterdrückung der anderen Follikel der Anbildungswelle kommt, war das Stimulationsergebnis in einer Studie von Pierson und Ginther 1990 besser wenn die Follikel zu Behandlungsbeginn eine Größe von 15-20 mm, als eine Größe von 25-30 mm aufwiesen. Die Behandlung sollte folglich vor dieser Follikeldeviation, d.h. bei einer Follikelgröße von <25 mm stattfinden (Squires und McCue 2007).

Bezogen auf die Dauer, Frequenz und Dosis von EPE im Rahmen der Superovulationsbehandlung konnte gezeigt werden, dass eine zweimal tägliche Injektion vorteilhaft ( $\approx$  7,1 OV,  $\approx$  3,5 Embryonen) gegenüber einer einmal täglichen Behandlung ( $\approx$  2,4 OV,  $\approx$  1,6 Embryonen) ist (Alvarenga et al. 2001). Da nicht differenziert werden konnte ob der Vorteil der Behandlung in der zeitlichen Verteilung oder aber in der dadurch höheren Injektionsdosis lag, verglichen Scoggin et al. 2002 die Dosierungen 12,5 mg bzw. 25 mg in ein- oder

zweimaliger Applikation. Die höchste Embryonengewinnungsrate (2,6) konnte bei einer zweimaligen Gabe von 12,5 mg EPE erzielt werden.

### Equines FSH

Aufgrund der unterschiedlichen und häufig unbekanntem Zusammensetzung aus eFSH und eLH im EPE waren reproduzierbare Ergebnisse insgesamt schwer zu erreichen. Verschiedene Autoren berichteten, dass mit dem in den USA seit 2003 kommerziell erhältlichen, gereinigten und standardisierten (10:1 Ratio von FSH:LH) equinem Hypophysenextrakt (eFSH<sup>®1</sup>), Superovulationen bei der Stute ausgelöst werden können.

Mit dem in den USA kommerziell erhältlichen Präparat führten *Niswender* et al. 2003 die ersten Studien durch (Tabelle 1) und verglichen die Stimulationsantwort auf eFSH<sup>®</sup> anhand von zwei unterschiedlichen Dosierungen miteinander. Mit einer Dosierung von 2 x 25 mg pro Stute (n=10) konnten zwar eine bessere Follikelanbildung (6,7) und mehr Ovulationen (3,3) als in der Gruppe mit der Dosierung von 2 x 12 mg beobachtet werden, jedoch kam es auch zu einer hohen Anzahl anovulatorischer Follikel und keiner signifikanten Erhöhung der Trächtigkeitsraten (0,6 bzw. 0,8) im Gegensatz zur nicht behandelten Kontrollgruppe (0,6). Da in einem zweiten Versuch mit der zweimaligen Dosis von 12 mg und

einer Ovulationsinduktion mit hCG anstelle von Deslorelin gute Ovulationsraten (3,4 OV) und eine relativ hohe durchschnittliche Trächtigkeitsrate (1,8) erzielt wurde, wurde dieses Schema für alle weiteren Versuche übernommen. Im Gegensatz zu einem Kontrollzyklus konnte nach eFSH<sup>®</sup>-Behandlung (n=16) und Besamung mit Frischsperma eine höhere Anzahl an Ovulationen (3,6 vs. 1) und gewonnener Embryonen (0,5 vs. 1,9) erreicht werden (*Niswender* et al. 2003). Neben einer favorisierten Dosis von 2 x 12 mg und Ovulationsinduktion mittels hCG wurde von *Welch* et al. 2006 der Effekt des „coasting“ im Rahmen der Superovulationsbehandlung untersucht. „Coasting“ ist definiert als eine Zeitspanne nach der Follikelstimulation, in der keine weiteren Gonadotropine injiziert werden. Auch in der Studie von *Niswender* et al. konnte zum einen ein positiver Einfluss von eFSH<sup>®</sup> auf die Ovulationsrate (3,4 OV) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (1,1 OV) festgestellt werden (Tabelle 1), zum anderen waren die Ovulationsraten von Stuten mit einer „coasting period“ höher als Stuten mit sofortiger hCG Injektion. Die besten Ergebnisse (4,1 OV, 2,6 Embryonen) wurden bei einer zweimaligen Applikation von eFSH<sup>®</sup> (12,5 mg) und einer anschließenden „coasting period“ von 42 Stunden erzielt. Auch *Squires* et al. (2007) erreichten bei einer zweimal täglichen eFSH<sup>®</sup>-Gabe (12,5 mg) bessere Ovulationsergebnisse als bei einmal täglicher Gabe von 25 mg (4,2 vs. 2,8 OV). Darüber hinaus war die Anzahl gewonnener Embryonen nach zweimal täglicher Injektion und anschließender „coasting period“ von 30 Stunden höher (2,5 Embryonen) als ohne „coasting period“ (1,9

**Tab 1** Übersicht über Studien zur Superovulation mit eFSH<sup>®</sup> bei Stuten und deren Ergebnisse  
Overview of superovulation studies performed with eFSH<sup>®</sup> in mares

Studie	(n)	Dosis (mg)	Freq. /Tag	Ø eFSH Tage (n) bis Foll. Gr.	PGF <sub>2α</sub> Tag 2	coasting (Std)	OV Induk	KB	Ø OV (n)	Ø Embr;T (n)	Embr/OV (%)
<i>Niswender</i> 2003	10	25	2 x	7,8 35mm	Ja	-	Desl	TG	3,3	0,6	18,2
	5	12	2x	7,5 35mm	Ja	-	Desl	TG	1,8	0,8	44,4
	5	12	2x	7,5 35mm	Ja	-	hCG	TG	3,4	1,8	52,9
	16	12	2x	7,7 35mm	Ja (ET) <sup>1</sup>	-	hCG	FS	3,6	1,9	52,8
	16 K	-	-	-	-	-	-	FS	1	0,5	50,0
<i>Welsh</i> 2006	19	12,5	2x	5,9 >35mm	Ja	-	hCG	FS	3,3	1,9	54
	17	12,5	2x	5,7 >32mm	Ja	42	hCG	FS	4,1	2,6	64
	18	25	1x	6,0 >32mm	Ja	54	hCG	FS	2,8	1,9	70
<i>Squires</i> 2007		12,5	2 x	35mm	Ja	--	hCG			1,9	
		12,5	2 x	32mm	Ja	30	hCG		4,2	2,5	
		25	1 x	35mm	Ja	30	hCG		2,8	1,8	
<i>McCue</i> 2006	10 K	-	-	35mm	-	-	hCG	FS	1,2	1	77,5
	15	12,5	2x	35mm	Ja	-	hCG	FS	5,4		
	10	12,5	2x	3Tage	Ja	ja >35mm	hCG	FS	3,8		

Abkürzungen: (n)= Anzahl; K= Kontrollgruppe; Freq.= Frequenz; Foll. Gr.= Follikelgröße im Durchmesser; OV= Ovulation; Induk= Induktion; Desl= Deslorelin; hCG= humanes Chorionadotropin; KB= künstliche Besamung, TG= Tiefgefriersperma; FS= Frischsperma; Embr=Embryonen; T= tragende Stuten; Emb/OV= Embryonengewinnungsrate pro Ovulation, (ET)<sup>1</sup>= Injektion von PGF<sub>2α</sub> am Tag des ET des vorangegangenen Zyklus= Tag 1 der eFSH<sup>®</sup> Gabe

**Tab 2** Übersicht der fünf untersuchten Zyklen und der jeweils durchgeführten Behandlungen. *Five investigated cycles and treatments*

Zyklus	eFSH® Behandlung	Ovulationsinduktion mit hCG	zweimalige Besamung	Embryonengewinnung Tag 6,5 nach OV
1	-	-	-	-
2	+	+	+	+
3	-	-	-	-
4	+	+	+	+
5	-	+	+	+

Abkürzungen: hCG = humanes Choriogonadotropin, OV = Ovulation

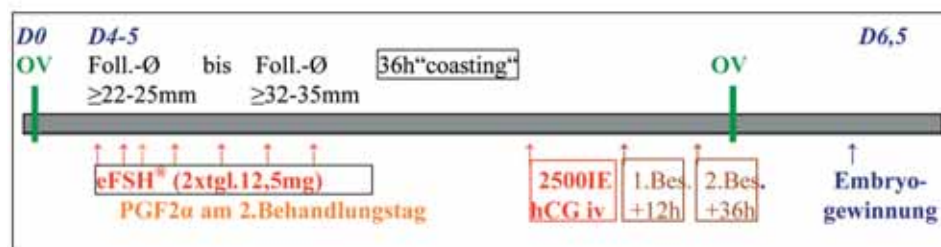
Embryonen). Basierend auf diesen Studien wurde von *Squires et al.* empfohlen mit der eFSH®-Stimulation (2x tgl. 12.5 mg) zu beginnen wenn der größte Follikel eine Größe von 22-25 mm Größe aufweist und die Behandlung fortzusetzen bis der Grossteil der sich anbildenden Follikel eine Größe von 32-35 mm hat. Am zweiten Tag der eFSH®-Behandlung sollte PGF2α zur Luteolyse injiziert werden. Nach einer „coasting period“ von 30-40 Stunden wird mittels hCG die Ovulation induziert und am darauf folgenden Tag inseminiert. Die Embryonenspülung sollte dann an Tag 7-8 nach Ovulation erfolgen (*Squires und McCue 2007*).

Trotz viel versprechender Ergebnisse im Rahmen der Anwendung von eFSH® und einer bis zu vierfachen Steigerung der Embryonengewinnung pro Zyklus, traten auch potentielle Probleme bei der eFSH®-Anwendung auf. Zwar ließen sich gute Stimulationsergebnisse reproduzieren, es traten jedoch sehr unterschiedliche Stimulationsantworten bei einzelnen Stuten auf. Bei zu hoher oder lang anhaltender Applikation wurden anovulatorische Follikel oder Überstimulation beobachtet (*Squires und McCue 2007*).

Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Studie die Ovulations- und Embryonengewinnungsraten an sechs genitalgesunden Stuten nach eFSH®-Behandlung mit Ergebnissen nach singulären Ovulationen verglichen

### Material und Methoden

Im Rahmen der Studie (genehmigter Tierversuch) wurden sechs zyklische genitalgesunde Stuten (4-14 Jahre) (3 Traber, 2 Warmblut, 1 Vollblut) in insgesamt fünf aufeinander folgenden



**Abb 1** Behandlungsschema der eFSH®-Behandlung in den Zyklen 2 und 4. (D=Tag, Foll.= Follikel, OV= Ovulation, Bes.=Besamung). *eFSH® treatment protocol in cycle 2 and 4. (D= day, Foll= follicle, OV= ovulation, Bes.= insemination).*

Zyklen untersucht (Tabelle 2). Zyklus 1 und 3 wurden als Kontrollzyklen ohne Superovulationsbehandlung und ohne Besamung definiert (Kontrolle). Im zweiten und vierten Zyklus wurden die Stuten jeweils mit eFSH®<sup>1</sup> stimuliert, nach Ovulationsinduktion zweimalig besamt und eine Embryonengewinnung durchgeführt. Im fünften Zyklus wurde eine Embryonengewinnung nach Ovulationsinduktion und zweimaliger Besamung und ohne vorherige Stimulation durchgeführt.

### Zyklen 1 und 3

In den Kontrollzyklen wurden die Anzahl der sich anbildenden Follikel und die Anzahl der Ovulationen pro Stute dokumentiert.

### Behandlungsschema in den eFSH-behandelten Zyklen 2 und 4 (Abb 1)

Nach Bestimmung des Ovulationszeitpunktes wurde die Follikelentwicklung im frühen Diöstrus täglich ultrasonographisch<sup>2</sup> beobachtet. Bei einer Follikelgröße von 22-25 mm im Durchmesser wurde die eFSH®-Stimulation begonnen. Den Stuten wurde eFSH® zweimal täglich (7.00 Uhr, 19.00 Uhr) intramuskulär in einer Dosierung von 12,5 mg verabreicht, bis die Follikel eine Größe von ca. 32-35 mm im Durchmesser aufwiesen. Am zweiten Tag der eFSH®-Behandlung wurden 250 µg Cloprostenol (Estrumate<sup>®3</sup>) intramuskulär injiziert. Nachdem die eFSH®-Behandlung bei einer erreichten Follikelgröße von 32-35 mm beendet wurde, wurden die Stuten für 36 Stunden nicht behandelt („coasting period“). Die Ovulation(en) wurde(n) nach 36 Stunden mit 2500 IE humanem Choriogonadotropin iv. (Ovogest<sup>®4</sup>) induziert. Die Stuten wurden 12 und 36 Stunden nach Ovulationsinduktion mit 750 Mio. progressiv motilen Spermien gekühlt (+5°C) gelagertem Sperma eines fertilen Warmbluthengstes inseminiert. Der genaue Ovulationszeitpunkt wurde durch ein vierstündiges Untersuchungsintervall festgelegt.

### Zyklus 5

In diesem Zyklus wurde die Ovulationsinduktion, Besamung und Embryonengewinnung wie in den Zyklen 2 und 4, jedoch

ohne vorangegangene eFSH®-Behandlung durchgeführt. Die Anzahl der Ovulationen und die Anzahl pro Stute gewonnener Embryonen wurden dokumentiert.

### Embryonengewinnung

In den Zyklen 2, 4 und 5 wurde die Embryonengewinnung an Tag 6,5 nach Ovulation durch transzervikales Einführen eines

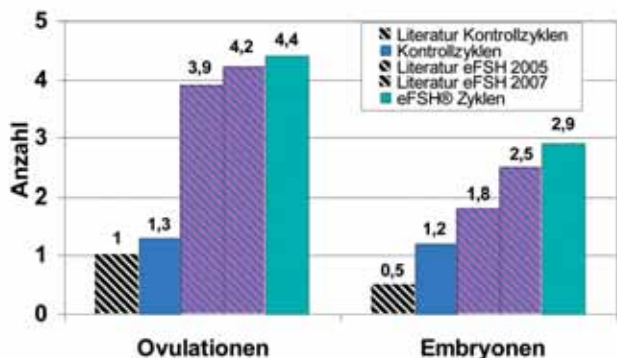
Ballonkatheters<sup>5</sup> und Spülung der Gebärmutter durchgeführt. Nach einmaliger Spülung mit viermal einem Liter Dulbecco's PBS Lösung wurde die durch einen 0,75µ Filter<sup>6</sup> aufgefangene Flüssigkeit unter dem Mikroskop auf Vorhandensein von Embryonen untersucht. Wurden nicht alle zu erwartenden Embryonen gefunden, wurde eine zweite Spülung mit viermal einem Liter PBS nach einmaliger intravenöser Injektion von 20 IE Oxytocin<sup>7</sup> durchgeführt. Jeder Stute wurden zur Luteolyse nach der Spülung 250 µg Cloprostenol intramuskulär injiziert.

## Ergebnisse

Alle sechs Stuten zeigten über den gesamten Untersuchungszeitraum ein regelmäßiges Zyklusverhalten und waren klinisch genitalgesund. Die intramuskulären Injektionen von eFSH<sup>®</sup> wurden von allen Stuten gut toleriert und es traten am Injektionsort keine unerwünschten Effekte auf.

Im Rahmen der durch eFSH<sup>®</sup> stimulierten Follikelanbildung konnten in den beiden behandelten Zyklen (2 und 4) eine durchschnittliche Anzahl von 5,6 Follikeln mit einer Größe von >25 mm pro Stute beobachtet werden. Die Variation lag bei den einzelnen Stuten zwischen zwei und 11 angebildeten Follikeln von >25 mm Größe. Demgegenüber kam es in den Kontrollgruppen zu einer durchschnittlichen Anzahl von 1,6 Follikeln von >25 mm Größe.

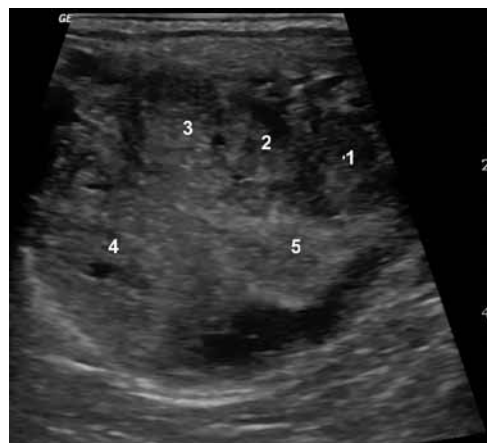
In den 18 Kontrollzyklen und 12 eFSH<sup>®</sup>-stimulierten Zyklen lag die Anzahl Ovulationen (OV) pro Stute bei den eFSH<sup>®</sup>-Zyklen mit durchschnittlich 4,4 Ovulationen pro Stute deutlich über der durchschnittlichen Ovulationsrate (1,2 OV) in den



**Abb 2** Übersicht über die durchschnittliche Anzahl der Ovulationen und gewonnenen Embryonen pro Stute in den Kontrollzyklen (n=18) und eFSH<sup>®</sup> behandelten Zyklen (n=12) dieser Studie im Vergleich zu Angaben aus der Literatur (Squires et al. 2005 ,2007) (schraffiert). *Ovulation rate and embryo recovery rate in contol cycles (n=18 and eFSH treated cycles (n=12) of the present study in comparison with earlier studies (Squires et al. 2005 ,2007).*

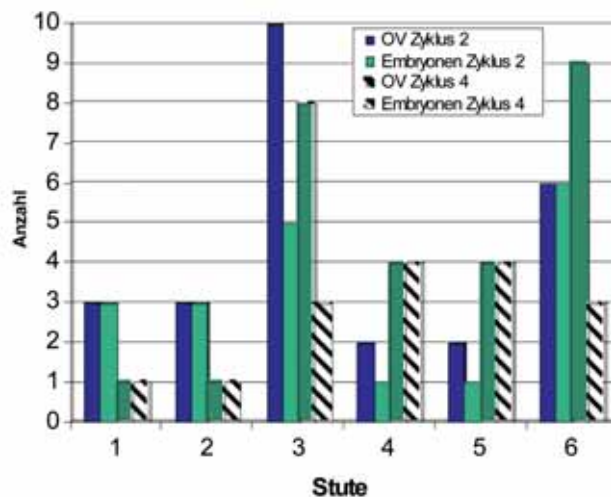
Kontrollzyklen (Abb. 2). Die Variation der Anzahl der Ovulationen lag dabei in den eFSH<sup>®</sup>-Zyklen zwischen 1 und 10 Ovulationen pro Stute (Abb. 3). Im Seitenvergleich beider Ovarien konnte kein Unterschied in der Gesamtanzahl der Ovulationen (links 26 OV /rechts 27 OV) festgestellt werden. In den 18 Kontrollzyklen traten bei einer Stute in allen drei Kontrollzyklen, bei einer weiteren Stute in einem Zyklus spontane Doppelovulationen auf. Insgesamt kamen in den eFSH<sup>®</sup>-

Zyklen 21,5 %, in den Kontrollzyklen 25 % der über 25 mm großen Follikel nicht zur Ovulation und bildeten sich zurück. Lediglich bei einer Stute kam ein Follikel >35 mm nicht zur Ovulation und luteinisierte. Bis zum Erreichen eines Follikeldurchmessers von >32-35 mm wurden im Mittel 4,0 Tage für die eFSH<sup>®</sup>-Behandlung benötigt.



**Abb 3** Ultrasonographisches Bild eines Ovars mit 5 Gelbkörpern nach Superovulationsbehandlung mit eFSH<sup>®</sup> (40 Stunden nach Ovulationsinduktion mit hCG ). *Ultrasonogramm showing five corpora lutea following superovulation treatment with eFSH<sup>®</sup> (40 hours following hCG-induced ovulation).*

In 12 mit eFSH<sup>®</sup>-stimulierten Zyklen konnten insgesamt 35 Embryonen gewonnen werden. Die Anzahl der nach eFSH<sup>®</sup>-Stimulation gewonnener Embryonen (Abb. 2) lag mit durchschnittlich 2,9 Embryonen pro Stute höher als in den 6 Zyklen ohne Superovulationsbehandlung (Ø 1,2 Embryonen pro Stute). Die Embryonengewinnungsrate pro Ovulation betrug somit in den eFSH<sup>®</sup>-Zyklen 65,9%. Die Anzahl der gewonnenen Embryonen unterschied sich zwischen dem ersten (19 Embryonen) und zweiten (16 Embryonen) Stimulationszyklus nicht. Bei steigender Anzahl der Ovulationen pro Stute konnte jedoch eine Tendenz der Abnahme der relativ gewonnenen Embryonen erkannt werden (Abb. 4).



**Abb 4** Darstellung der Anzahl der Ovulationen und gewonnenen Embryonen pro Stute (n=6) in den mit eFSH<sup>®</sup> stimulierten Zyklen (2 und 4). *Number of ovulations and embryos per mare (n=6) in eFSH<sup>®</sup> treated cycles (2 and 4).*

## Diskussion

Aufgrund des enormen Anstiegs der in Deutschland in den letzten Jahren durchgeführten Embryotransfers beim Pferd (FN-Bericht Zucht 2006), ist eine Verbesserung der Wirtschaftlichkeit über Superovulation bei der Stute sinnvoll. Das in dieser Studie durchgeführte eFSH®-Behandlungsschema (Abb. 1) ist geeignet um Superovulationen und höhere Embryonengewinnungsraten im Vergleich zu nicht stimulierten Zyklen bei der Stute zu erzielen. Im Vergleich zu den Kontrollzyklen konnten sowohl die durchschnittliche Anzahl der Ovulationen (OV) pro Stute (1,3 vs. 4,4) als auch die Anzahl gewonnener Embryonen (1,2 vs. 2,9) gesteigert werden.

In den Kontrollzyklen traten neben singulären Ovulationen in vier Zyklen spontane Doppelovulationen auf. Dies führte zu einer durchschnittlichen Anzahl von 1,3 OV pro Stute. Das Auftreten spontaner Doppelovulationen bei der Stute ist mit einer Variation von 2-22% beschrieben (Stabenfeldt et al. 1972, Ginther et al. 1982), wobei neben der Rasse (Warmblut: 12-15%, Vollblut: 22%) auch der Reproduktionsstatus und der Saisonzeitpunkt einen Einfluss zu haben scheinen. Auch im eigenen Stutengut zeigte die Vollblutstute in allen drei Kontrollzyklen spontane Doppelovulationen. Verglichen mit Angaben vorangegangener Studien (Niswender et al. 2003, McCue et al. 2007, Squires und McCue 2007) liegt die durchschnittliche Anzahl der Ovulationen der Kontrollzyklen dieser Studie im zu erwartenden Bereich. Vergleicht man hingegen die Anzahl der in den Kontrollzyklen gewonnenen Embryonen, so liegen die Ergebnisse dieser Studie mit durchschnittlich 1,2 gewonnener Embryonen pro Stute und einer resultierenden Embryonengewinnungsrate/OV von 92,3 % pro Zyklus deutlich über den zu erwartenden Werten von durchschnittlich 50% pro Zyklus. McCue et al. konnten 2006 in einer vergleichenden Studie in der Kontrollgruppe (n=10) nach Ovulationsinduktion mit hCG und zweimaliger Insemination an Tag 6,5 nach Ovulation durchschnittlich 1 Embryo pro Stute (Embryonengewinnungsrate/OV= 77,5%) gewinnen. Ein intensives Management und die ovulationsnahe Insemination mit ausreichend dosiertem Frischsperma eines fertilen Hengstes erklären zu großem Anteil die guten Ergebnisse.

In den mit eFSH®-behandelten Zyklen dieser Studie konnte mit einer durchschnittlichen Anzahl von 4,4 OV pro Stute eine vergleichbar gute Ovulationsrate erzielt werden (s. Abb.2).

Die Anzahl der Ovulationen variierte dabei in den mit eFSH® behandelten Zyklen zwischen 1 und 10 Ovulationen pro Stute. Dieses Phänomen der unterschiedlich individuellen Stimulierbarkeit konnten auch Squires et al. 2007 beobachten. Sie erklärten die unterschiedliche Stimulationsantwort mit einem zunächst scheinbar beobachteten negativen Alterseffekt, konnten in einer weiteren Studie jedoch keine signifikante Korrelation zwischen dem Alter der Stuten (3-15) und der Anzahl der Ovulationen bzw. Anzahl gewonnener Embryonen feststellen. Alle Stuten dieser Studie lagen mit einem Alter von 4-14 Jahren innerhalb dieser Altersgrenze.

Auch ein Effekt des Zyklus auf das Stimulationsergebnis (1. eFSH®-Zyklus/ 2. eFSH®-Zyklus) konnte im eigenen Material nicht festgestellt werden (Abb. 4). Ebenso stellten Squires et al. 2006 keine Korrelation zwischen den behandelten Zyklen (n=80) und der Anzahl der Ovulationen fest. Auch hatte es

keinen Einfluss auf die Anzahl der Ovulationen ob Zyklen jeweils alternierend oder aufeinander folgend mit eFSH® stimuliert wurden (McCue et al. 2006).

Verglichen mit der Kontrollgruppe (1,2 Embryonen) konnte die durchschnittliche Anzahl der gewonnenen Embryonen pro Stute nach eFSH®-Behandlung (2,9) analog zu vorangegangenen Studien deutlich gesteigert werden. Verglichen mit Ergebnissen früherer Studien (Tab. 1, Abb. 2) sind die Ergebnisse gewonnener Embryonen vergleichsweise hoch. Dies könnte zum einen an einem über die Zeit verbesserten Anwendungsschema für eFSH®, jedoch auch an weiteren die Embryonengewinnungsrate generell beeinflussenden Faktoren (Management, Fertilität, Alter der Stuten, Fertilität des Hengstes, Art, Dosis des eingesetzten Spermias, Durchführung der Embryonenspülung ect.) liegen. Nichtsdestotrotz sind die Embryonengewinnungsraten trotz guter Superovulationsergebnisse nicht konstant. Vielmehr konnte im eigenen Patientengut gezeigt werden, dass eine sehr gute ovarielle Stimulation (>6 Ovulationen) in niedrigeren Embryonengewinnungsraten resultiert (Abb. 4 Stute 3 und 6). Auch Squires et al. stellten in Untersuchungen von 2006 fest, dass bei etwa 25% der mit eFSH®-behandelten Stuten trotz guter ovarieller Stimulation kein Embryo zu gewinnen war, bei anderen Stuten hingegen bis zu sieben Embryonen pro Zyklus gewonnen werden konnten. Es bestand zwar eine starke Korrelation zwischen der Anzahl der präovulatorischen Follikel und der Anzahl der Ovulationen, jedoch nicht zwischen der Anzahl der Ovulationen und der Anzahl der gewonnenen Embryonen. Traten mehr als fünf präovulatorische Follikel auf, nahm die relativ gewonnene Anzahl Embryonen ab. Als mögliche Ursachen wurden Hindernisse im Rahmen der Befruchtung bzw. Embryonenverluste im Eileiter aber auch mögliche Behinderungen bei der Aufnahme der Eizellen in den Eileiter im Zuge einer Ovulation mehrerer Follikel diskutiert.

Um den bisher teuren Einsatz von eFSH® zu optimieren, wurden weitere Faktoren, die die Reaktion auf die eFSH®-Stimulation beeinflussen, von Squires et al. 2006 an 40 Stuten, die in zwei Jahren über mehrere Zyklen behandelt wurden zusammengefasst. Die Anzahl der eFSH®-Behandlungstage, und damit eine Reduktion der erheblichen Kosten, konnte bei Stuten, die bei Behandlungsbeginn auch Follikel von <25 mm Größe aufwiesen, erzielt werden. In dieser Studie wurde eine durchschnittliche eFSH®-Behandlungsdauer von 4,0 Tagen benötigt. Dabei scheint es entscheidend zu sein den Behandlungsbeginn an der durchschnittlichen Follikelgröße und nicht an einem festen Zyklustag festzulegen. McCue et al. stellten 2006 fest, dass sich die Behandlungsdauer signifikant verlängert (Ø 8,2 Tage) wenn jeweils aufeinander folgende Zyklen mit eFSH® stimuliert werden. Lagen zwischen den behandelten Zyklen jeweils Unbehandelte, lag die durchschnittliche Anzahl der eFSH®-Behandlung bei 4,1 Tagen.

Durch die in der Literatur beschriebenen und auch in dieser Studie festgestellten individuellen Schwankungen bzgl. der Stimulationsantwort wäre eine „Vorhersehbarkeit“ bzgl. „guter Spenderstuten“ sinnvoll. Dazu wurden von Squires et al. (2006) Stuten, bei denen pro Spülung im Durchschnitt mindestens 1,5 Embryonen gewonnen werden konnten, als „gute Spenderstuten“ definiert. Diese Stuten wiesen bei Behandlungsbeginn eine höhere Anzahl an Follikeln der Größe 11-15mm und 16-20mm auf als „schlechte Spen-

derstuten“ (<1,5 Embryos pro Spülung) (Squires et al. 2006). Anhand dieser ovariellen Follikelcharakteristik könnten in Zukunft „gute“ von „schlechten“ Spenderstuten selektiert werden.

## Fazit

Das aufgeführte eFSH®-Behandlungsschema ist geeignet um Superovulationen und höhere Embryonengewinnungsraten im Vergleich zu nicht stimulierten Zyklen bei der Stute zu erzielen. Dennoch sind die Embryonengewinnungsraten trotz guter Superovulationsergebnisse nicht konstant. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass eine sehr gute ovarielle Stimulation in niedrigeren Embryonengewinnungsraten resultiert. In eigenen aktuellen Untersuchungen wird daher der Einfluss der Follikeldynamik und Genitaldurchblutung auf die Embryonengewinnungsraten untersucht, um möglicherweise früher „gute“ von „nicht guten“ Spenderstuten im Rahmen eines Superovulationsprogrammes zu unterscheiden.

Mit der Möglichkeit der Superovulation bei der Stute durch eFSH® und verbesserten Einfrierverfahren für Embryonen könnte der Embryotransfer auch beim Pferd in Zukunft einen höheren wirtschaftlichen Stellenwert erlangen. Zurzeit jedoch limitieren die bisher noch erheblichen Kosten (pro Zyklus ca. 400-500 US Dollar) den kommerziellen Einsatz von eFSH®. Verbesserte Anwendungsschemata sowie verbesserte Techniken zur Embryonengewinnung und Tiefgefrierung könnten in Zukunft jedoch einen effizienteren und kostengünstigeren Einsatz ermöglichen.

## Herstelleradressen

- 1 Bioniche-Animalhealth, Athens, GA, USA
- 2 Logig P5, General Electrics, München
- 3 Essex Tierarzney, München
- 4 Intervet, Unterschleißheim
- 5 Embryospülkatheter, Minitüb, Tiefenbach
- 6 EZ Way Filter, SPI, Canton, TX, USA
- 7 Oxytocin® Fa. WDT, Garbsen

## Danksagung

Die Studie wird gefördert durch die Mehl-Mülhens-Stiftung und das Niedersächsische Landgestüt Celle

## Literatur

- Allen W. R. (1982) Embryo Transfer in the Horse. Mammalian Egg Transfer. C. E. Adams. Boca Raton, Florida, CRC Press: 135-154
- Alvarenga M. A., McCue P. M., Bruemmer J., Neves Neto J. R. und Squires E. L. (2001) Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. *Theriogenology* 56, 879-887
- Dippert K. D., Hofferer S., Palmer E., Jasko D. J. und Squires E. L. (1992) Initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using equine pituitary extract with or without GnRH analogue. *Theriogenology* 38, 695-710
- Douglas R. H. (1979) Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine. *Theriogenology* 11, 33-46
- Fortune J. E. und Kimmich T. L. (1983) Purified pig FSH increases the

- rate of double ovulation in mares. *Equine Vet J* 15 (Suppl.), 95
- Ginther O. J., Beg M. A., Bergfelt D. R., Donadeu F. X. und Kot K. (2001) Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod* 65, 638-647
- Ginther O. J. und Bergfelt D. R. (1990) Effect of GnRH treatment during the anovulatory season on multiple ovulation rate and on follicular development during the ensuring pregnancy in mares. *J Reprod. Fertil.* 88, 119-126
- Ginther O. J., Douglas R. H. und Lawrence J. R. (1982) Twinning in mares: A survey of veterinarians and analyses of theriogenology records. *Theriogenology* 18, 333-347
- Guillo F. und Combarous Y. (1983) Purification of equine gonadotropins and comparative study of their acid-dissociation and receptor binding specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 755, 229-236
- McCue P. M., Hughes J. R. und Lasley B. L. (1993) Effect on ovulation rate of passive immunization of mares against inhibin. *Equine Vet. J.* 15 Suppl., 103-106
- McCue P. M., LeBlanc M. M. und Squires E. L. (2007) eFSH in clinical equine practice. *Theriogenology* 68, 429-433
- McCue P. M., Logan N., Alonso M. A. und Squires E. L. (2006) Superovulation of mares: effect of eFSH treatment during consecutive or alternate cycles and as short-term therapy before follicular divergence. *Anim. Reprod. Sci.* 94, 404-407
- McKinnon A. O., Brown R. W., Pashen R. L., Greenwood P. E. und Vasey J. R. (1992) Increased ovulation rates in mares after immunisation against recombinant bovine inhibin alpha-subunit. *Equine Vet. J.* 24, 144-146
- Niswender K. D., Alvarenga M. A., McCue P. M., Hardy Q. P. und Squires E. L. (2003) Superovulation in cycling mares using Equine Follicle Stimulation Hormone (eFSH). *J. Equine Vet. Sci.* 23, 497-500
- Pierson R. A. und Ginther O. J. (1990) Ovarian follicular response of mares to an equine pituitary extract after suppression of follicular development. *Anim. Reprod. Sci.* 22, 131-144
- Scoggin C. F., Meira C., McCue P. M., Carnevale E. M., Nett T. M. und Squires E. L. (2002) Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. *Theriogenology* 58, 151-164
- Squires E. L., Garcia R. H., Ginther O. J., Voss J. L. und Seidel G. E. jr. (1986) Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. *Theriogenology* 26, 661-670
- Squires E. L., Logan N., Welch P. M. und McCue P. M. (2006) Factors affecting the response to administration of equine FSH. *Anim. Reprod. Sci.* 94, 408-410
- Squires E. L. und McCue P. M. (2007) Superovulation in mares. *Anim. Reprod. Sci.* 99, 1-8
- Squires E. L., McKinnon A. O., Carnevale E. M., Morris R. und Nett T. M. (1987) Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 35, 399-403
- Squires E. L., Rowley H. R. und Nett T. M. (1989) Comparison of pulsatile versus constant release of GnRH for superovulation in mares. *J. Anim. Sci. (Suppl)* 65, 391-392 (Abstract)
- Stabenfeldt G. H., Hughes J. P. und Evans J. W. (1972) Ovarian activity during the estrous cycle of the mare. *Endocrinology* 90, 1379-1384
- Welch S. A., Denniston D. J., Hudson J. J., Bruemmer J., McCue P. M. und Squires E. L. (2006) Exogenous eFSH, Follicle Coasting, and hCG as a Novel Superovulation Regime in Mares. *J. Equine Vet. Sci.* 26, 262-270
- Woods G. L. und Ginther O. J. (1983) Induction of multiple ovulations during the ovulatory season in mares. *Theriogenology* 20, 347-55

Dr. Melanie Köllmann  
Wissenschaftliche Angestellte  
Klinik für Pferde  
Bischofsholer Damm 15,  
30173 Hannover  
melanie.koellmann@tiho-hannover.de