

**36. Jahrestagung der
Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer
deutschsprachiger Länder
(AET- d)**

am 18./19. Juni 2009

in der Hochschule Landshut



**in Zusammenarbeit mit der
Niederbayerischen Besamungsgenossenschaft
Landshut- Pocking e.G.**



Organisation und Leitung:

Martin Gehring Michael Hölker

Heinrich Tenhumberg

Wir bedanken uns bei unseren Sponsoren
für die finanzielle Unterstützung unserer
Tagung!

Goldsponsor



Our knowledge - Your success

Silbersponsoren



Bronzesponsoren



Wörrlein
Medizintechnik



Bayer HealthCare
Tiergesundheit



Bodenco B.V.



JANSSEN
ANIMAL HEALTH
is a division of
JANSSEN-CILAG GmbH

Vétoquinol
Signe de Passion

Pharmanovo

Sponsorenadressen

Bayer Health Care

Bayer Vital GmbH
Tiergesundheit
51368 Leverkusen

Bela-pharm GmbH & Co.KG

Lohnerstr.19
49377 Vechta

Bodenco B.V.

Otterkoog 9A
1822 BW Alkmaar, Holland

Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH

Bingerstr.173
55216 Ingelheim

Consarctic GmbH

Postfach 1138
63821 Schöllkrippen

IMV Technologies

Rue Clemenceau
Postfach 61300 L'aigle, France

Intervet Deutschland GmbH

Feldstraße 1a
85716 Unterschleißheim

Janssen Animal Health

Raiffeisenstr.8
41470 Neuss

Meggle Besamungsstation Rothmoos GmbH

Megglerstr. 6- 12
83512 Wasserburg

Merial GmbH

Am Söldnermoos 6
85399 Hallbergmoos

MINITÜB

Abfüll- und Labortechnik GmbH & Co. KG
Hauptstr.41
84184 Tiefenbach

Pfizer GmbH

Pfizerstr.1
76139 Karlsruhe

Pharmanovo GmbH

Sudetenstr.19
30559 Hannover

Vetoquinol GmbH

Parkstr.10
88212 Ravensburg

Virbac Tierarzneimittel GmbH

Rögen 20
23843 Bad Oldeslohe

Walter Wörrlein Medizintechnik

Breitstr.8
91522 Ansbach

Programm

- 13:00 **Begrüßung**
M. Gehring, und H. Tenhumberg
Marsberg, Landshut
- Sektion I: Moderation F. Becker und H. Tenhumberg
- 13:15 **Nutrition and Fertility in Dairy Cows**
Prof. Phil Garnsworthy
University of Nottingham, UK
- 14:55 **Präsentation unseres Goldsponsors Minitüb**
Sex-Y-Kit: Geschlechtsbestimmung von bovinen Embryonen
Frau Eva Häusler, *Area Sales Manager Minitüb*
- 15:05 **Kaffepause/ Industrieausstellung**
- Sektion II: Moderation C. Wrenzycki und R. Pokorny
- 16:00 **Einfluss von Doppelovulationen in der präsuperovulatorischen
Brunst bei Holstein Kühen auf Embryonengewinnung,
Embryonenqualität und Trächtigkeitsraten nach ET**
J. Detterer, T. Wolgast, W. Reuss, S. Meinecke-Tillmann
Südbrookmerland, Hannover
- 16:15 **Einsatz uterusmotilitätsfördernder Medikamente bei der
Embryonengewinnung - Auswirkungen auf die Embryoqualität
und die Trächtigkeitsraten nach Embryotransfer**
J. Detterer, T. Wolgast, W. Reuss, S. Meinecke-Tillmann
Südbrookmerland, Hannover
- 16:30 **Anti-Müller-Hormon (AMH): Ein valider Marker der
ovariellen Funktionsreserve zur Vorhersage der ovariellen
Reaktion auf Superovulationsbehandlungen**
A. Vernunft, F. Schneider und W. Kanitz
Dummerstorf
- 16:45 **Auswirkungen einer subklinischen Endometritis auf
Spülergebnis, Embryoqualität und embryonaler Genexpression**
M. Hölker, U. Küchenmeister, A. Mönich, F. Rings,
K. Schellander und D. Tesfaye
Bonn, Schönöw
-

Sektion III: Moderation U. Besenfelder und K. Roschlau

17:00 **Einfluss des Zyklusstadiums und des Alters der Tiere auf die Ergebnisse der in vitro Produktion von Rinderembryonen nach Schlachtung**

M. Reichenbach, H-D. Reichenbach und E. Wolf

München

17:15 **Beurteilung der Entwicklungskompetenz boviner Oozyten aus Follikeln mit unterschiedlicher Durchblutung der Follikelwand im Rahmen eines OPU / IVP-Programms**

A. Hanstedt, K. Höffmann, Ä. Honnens, C. Wrenzycki

Hannover

17:30 **Prediction of horse oocyte quality: Morphological and cellular aspects**

A. Mohammadi-Sangcheshmeh, E. Held, F. Rings, D. Tesfaye, K. Schellander und M. Hölker

Bonn

17:45 **Beschaffenheit der Zona pellucida equiner Eizellen in Relation zu deren Entwicklungspotential**

E. Held, A. Mohammadi-Sangcheshmeh, F. Rings, E. Tholen, D. Tesfaye, K. Schellander, M. Hoelker

Bonn

18:00 Wahl des 2. Vorsitzenden

Abendveranstaltung

Sektion IV: Moderation W. Kanitz und J. Detterer

- 8:45 **Variable funktionelle Kompetenz boviner dominanter Follikel**
J. Schneebeili
Summaprada
- 9:00 **Entwicklung einer Methode zur wiederholten transvaginalen, ultraschallgeleiteten Biopsie des Corpus luteums beim Rind**
E. Onnen-Lübben, S. Wilkening-Kraas, A. Hanstedt, H. Stinshoff, N. Beindorff, H. Bollwein und C. Wrenzycki
Hannover
- 9:15 **Einsatz verschiedener Progesteronpräparate (CIDR, PRID) in Kombination mit einer Prostaglandin-Applikation zur Brunst-synchronisation von Empfängertieren für den Embryotransfer**
R. Hovsepyan, H.-P. Nohner, C. Leiding und C. Wrenzycki
Neustadt a.d. Aisch, Hannover
- 9:30 **Dopplersonographische Untersuchungen zur Eignung von Empfängertieren im Rahmen des Embryotransfers beim Rind**
Ä. Honnens, L. Hosche, A. Kuwer, K. Roschlau, D. Roschlau, C. Wrenzycki, H. Bollwein Hannover,
Hannover, Nüchel
- 9:45 **Diskussion aktuelles Thema**
- 10:00 **Kaffepause / Industrieausstellung**

Sektion V: Moderation M. Hölker und H.-P. Nohner

- 11:00 **Endoskopische Gewinnung früher preimplantativer boviner Embryonen und In-Vivo -Kultur von IVM/IVF Embryonen im bovinen Oviduct durch transvaginale Endoskopie**
Prof. Urban Besenfelder
Wien
- 12:00 **Einfluß einer In-vivo-Kultur auf das mRNA Expressionsmuster präimplantatorischer Rinderembryonen**
K. Müller, D. Herrmann, S. Drallmeyer, K.-G. Haderl, K. Korsawe, K. Brüning, H. Niemann und C. Wrenzycki
Mariensee, Hannover
-

Sektion VI: Moderation S. Meinecke-Tillmann und H. Hauschulte

- 12:15 **OPS Vitrifikation als Alternative zur Gefrierkonservierung von Embryonen am Modell Ziege**
A.N. Al Yacoub, M. El-Gayar, M. Gauly und W. Holtz
Göttingen
- 12:30 **Einfluss eines Vitrifikation- und eines kontrollierten Kryokonservierungsverfahrens auf die Qualität in vitro produzierter Rinderembryonen**
H. Stinshoff, K. Brüning, A. Hanstedt, D. Müller, S. Wilkening-Kraas und C. Wrenzycki
Hannover
- 12:45 **Einfluss der Äquilibrationsdauer auf die Vitalität von Bullensperma nach dem Auftauen**
M. Jung, L. Rothe, M. Griga, C. Leiding, H. Nehring
Schönow, Neustadt a.d. Aisch, Hannover
- 13:00 **Auswirkungen einer Blauzungenvirus Typ 8 Infektion auf die Ejakulatqualität von Besamungsbullen**
A. Ligner, U. Janowitz, K. Rüdiger, H. Cramer, H. Bollwein und M. Jung
Schönow, Borken, Bonn, Hannover
- 13:15 **Schlusswort, Einladung zum nächsten AET-d-Treffen**
M. Gehring und M. Hölker
Marsberg, Bonn
-

**Zusammenfassungen
der Vorträge**

Nutrition and Fertility in Dairy Cows

Phil Garnsworthy

*University of Nottingham, School of Biosciences, Loughborough LE12 5RD, UK***INTRODUCTION**

Declining fertility presents a major challenge for dairy producers in many countries. In the UK, for example, average replacement rate currently exceeds 30% (Defra statistics: www.defra.gov.uk), and more than half of culls are due to failure to rebreed otherwise healthy animals (Esslemont & Kossaibati, 2002). Recent modelling suggests that the national dairy herd may be unsustainable in as few as ten years due to increasing calving interval and reduced fertility leading to a shortage of female replacements (Maas *et al.* 2009). Although there are negative genetic and phenotypic relationships between milk yield and fertility, poor fertility is not an inevitable consequence of high milk yields. There are high-yielding herds with good fertility and low-yielding herds with poor fertility. One of the key determinants of fertility is the balance between energy output and energy intake. Thus, any attempt to reduce milk yield by restricting nutritional inputs would be disastrous for cow health and fertility.

Nutrition can affect reproduction on both short-term (days) and medium-term (months) timescales. Physiologically, changes in nutrient supply alter metabolic signals to the brain and ovary, thereby coordinating ovarian function with metabolic status (Garnsworthy *et al.* 2008a). The objective of this paper is to illustrate some of the interactions between nutrition and fertility in cattle that suggest nutritional management strategies to improve reproductive success.

MINIMISING NEGATIVE ENERGY BALANCE

The first priority is to minimise the degree and duration of negative energy balance (NEB) during early lactation. Many studies have shown that rapid mobilisation of body fat reserves is associated with fertility and health problems in dairy cows (see reviews by Garnsworthy & Webb, 1999; Butler, 2003; Chagas *et al.* 2007). NEB, while not affecting the population of small ovarian follicles, adversely affects the size and ovulatory fate of the dominant follicle and extends the period of anoestrus (Diskin *et al.* 2003). Butler (2003) suggested that NEB causes attenuation of LH pulse frequency and low levels of blood glucose, insulin and IGF-I that collectively limit oestrogen production by dominant follicles. Butler (2005) reported that dairy cows losing more than one unit of body condition score (BCS) over the first 30 days *post partum* ovulated 20 days later than cows losing less than 0.5 units, and that conception rate decreased by 10 % per 0.5 unit BCS loss.

The main biological driver of BCS loss and NEB in dairy cows is BCS at calving (Garnsworthy, 2007). Cows have a genetically-determined BCS target that they try to achieve in the first three months of lactation, so cows which are fatter than their BCS target show reduced feed intakes (Garnsworthy & Topps, 1982; Garnsworthy, 2007). A recent meta-analysis (Figure 1) confirmed that modern dairy cows have genetically 'thinner' targets than cows available twenty years ago (Garnsworthy, 2007).

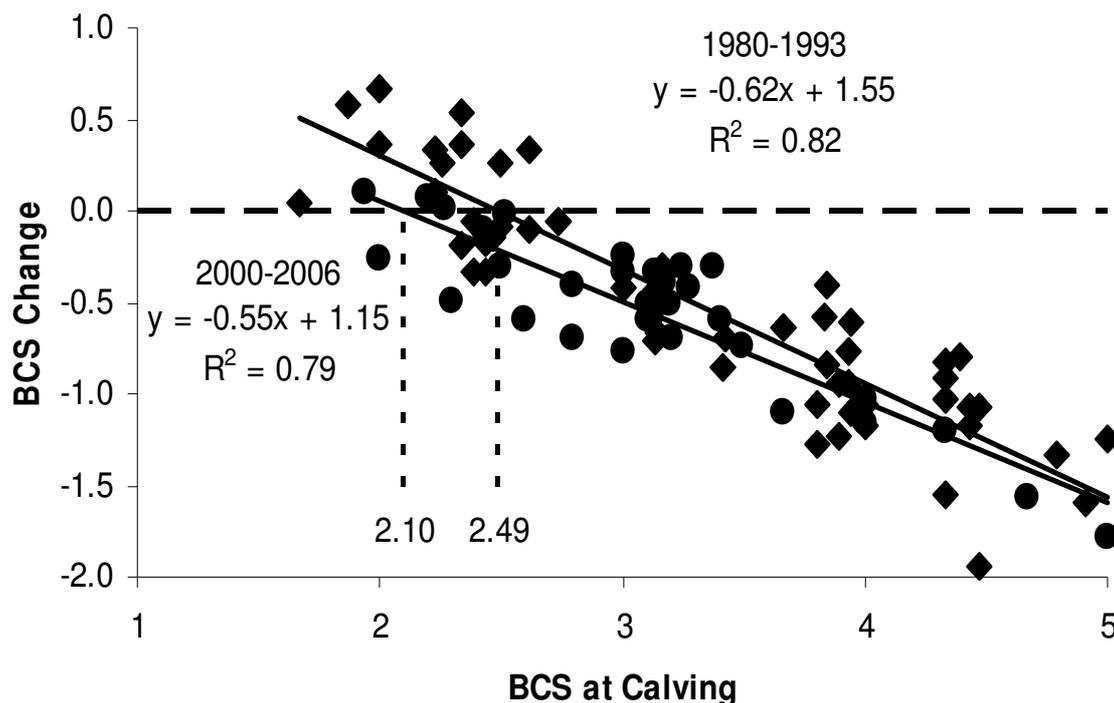


Figure 1. Relationship between BCS at calving and change in BCS over the first 10 – 12 weeks of lactation for studies published 1980 – 1993 (◆) compared with studies published 2000 – 2006 (●). Vertical dotted lines show BCS at calving that result in zero change in BCS, which has decreased from 2.49 in earlier studies to 2.10 in recent studies. Data are group means (converted to a 1 – 5 scale) from references listed in Garnsworthy (2007).

The **first nutritional strategy** to aid fertility, therefore, is to control BCS at calving. In dairy cows, the target should be 2.5 to 3.0 (1 to 5 scale), so that dry matter intake is not impaired by the negative feedback effect of body fat, and BCS loss is restricted to less than 0.5 units

(Garnsworthy, 2007). A study in Northern Ireland showed that high-genetic merit cows can maintain a condition score of 2.5 throughout lactation (Yan *et al.* 2006). It is important that BCS is manipulated by controlling energy supply during late lactation and not by restricting feed intake during the late dry period (Garnsworthy, 2007).

MEETING ENERGY AND NUTRIENT REQUIREMENTS

One of the major factors limiting both productive and reproductive performance of cattle is energy and nutrient intake. The **second nutritional strategy** to aid fertility is to provide high-quality diets during early lactation so that energy and nutrient intakes are not limited by dietary characteristics. A palatable, high-energy diet is required, but avoid excessive dietary fat (reduces rumen fibre digestion, decreases insulin, and stimulates body fat mobilisation), excessive starch (reduces rumen fibre digestion and encourages acidosis), and excessive

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion I

protein (stimulates body fat mobilisation). The key to high energy intakes is good forage quality (forage must be analysed), forage mixtures (grass silage mixed with maize or whole-

crop cereal silages leads to greater intakes than grass silage alone), palatable supplements (sugar beet pulp, brewers grains), and adequate concentrate allowance. Diets presented as total mixed rations (TMRs) produce greater intakes than the same ingredients fed separately because rumen fermentation is more stable throughout the day. Grazing can only support milk yields of 30 L/d in spring, 20 L/d in mid-season and 10 L/d in autumn – it is vital that buffer feeding is practiced for high-yielding cows at grass. High-protein diets should be avoided because these increase the rate of body fat mobilisation in early lactation (Garnsworthy & Jones 1987), thereby exacerbating NEB.

ALTERING DIET COMPOSITION

When the priorities of minimising NEB, controlling body condition score and meeting nutrient requirements for milk production have been addressed, diet composition can be altered to manipulate metabolic hormones. Different sources of dietary energy and protein modify partition of nutrients and responses in milk yield and composition. In particular, the proportions of energy supplied as starch, fibre and fat have major effects on milk fat and protein yield. Starch is a glucogenic energy source, so it stimulates synthesis of milk lactose and protein. Fibre and fat are ketogenic energy sources, so they stimulate synthesis of milk fat. These effects are mediated through changes in rumen fermentation, end products of digestion and substrate supply to the mammary gland, which are accompanied by changes in metabolic hormones that alter nutrient partitioning. Changes in metabolic hormones during early lactation alter the pattern of ovarian follicle growth and development, thereby influencing reproductive function (See reviews by Webb *et al.* 2004; Garnsworthy *et al.* 2008a). Therefore, a **third nutritional strategy** to aid fertility is to alter diet composition so as to manipulate metabolic hormones at key stages of the reproductive cycle. Features of this strategy are the main focus for the rest of this paper.

HORMONAL RESPONSES TO DIET COMPOSITION

We have recently completed a five-year programme examining dietary effects on metabolic hormones and fertility. Diets provided structured variation in total starch, site of starch digestion, fat, fibre, metabolisable protein, amino acid profile and forage type, within a narrow range of energy concentration (11.9-12.1 MJ ME/kg DM). Diets were based on mixtures of maize silage, grass silage, wheat, maize, sugar beet pulp, full-fat and extracted oilseed meals, and calcium salts of palm acid oil. In each experiment, cows were fed on a standard diet for the first 35 days of lactation and treatment diets between days 40 and 70. Plasma concentrations of growth hormone (GH), insulin-like growth factor-I (IGF-I) and leptin were not related to diet composition, although they were affected by animal factors,

such as milk yield, BCS and live weight. Plasma concentrations of insulin were positively related to dietary starch concentration, and results indicated that to maintain adequate insulin to glucagon ratio in cows at the start of the breeding period, dietary starch concentration should be above 160 g /kg DM (Garnsworthy *et al.* 2008b). Starch from wheat, maize and maize silage produced similar responses, however, so diets can be formulated to total starch content rather than rumen digestible or bypass starch (Garnsworthy *et al.* 2009a). Insulin was negatively related to dietary fat content, and results indicated that dietary total fat concentration should be below 50 g /kg DM to avoid depressing plasma insulin concentration in cows at the start of the breeding period (Garnsworthy *et al.* 2008c). Insulin was increased

also by branch-chain amino acids, particularly leucine (maize gluten is a good source), which is an insulin secretagogue (Docherty & Clark, 1994). However, responses to leucine depended on total dietary protein content: for low protein diets, the insulin to glucagon ratio was greater with high leucine; for high protein diets, the insulin to glucagon ratio was greater with low leucine because the high-protein, high-leucine diet stimulated milk yield (Garnsworthy *et al.* 2008d).

METABOLIC HORMONES AND REPRODUCTION

Postpartum anoestrus

Resumption of normal oestrous cycles postpartum occurred approximately 8 days later in dairy cows of high genetic merit compared with cows of low genetic merit (Gutierrez, *et al.* 2006). The high-merit cows had higher plasma GH concentrations and lower plasma insulin concentrations, even though there was no difference in milk yield, suggesting that changes in metabolic hormones may directly or indirectly influence reproduction. A subsequent study demonstrated that feeding a diet designed to increase insulin advanced the first ovulation postpartum from 48 days to 34 days and increased the proportion of cows ovulating within 50 days of calving from 55% to 90% (Gong *et al.* 2002).

The responses observed in the study of Gong *et al.* (2002) were independent of milk yield and energy balance. It appears that insulin acts as a metabolic signal to the reproductive system, signalling that energy status is good. The exact mechanism for this signalling is still unclear, but it probably involves interactions between insulin, IGFs, and gonadotrophins (Garnsworthy *et al.* 2008a). The roles of GH, IGF and leptin appear to be more concerned with milk yield, energy balance and body condition than with nutritional status because these hormones were not affected by changes in diet composition that induced large differences in insulin (Garnsworthy *et al.* 2008b,c,d; 2009a).

Follicle growth and oocyte quality

In our nutritional studies, we found that circulating insulin concentrations were associated with changes in numbers of follicles. Increasing dietary starch concentration was associated with greater numbers of small follicles and reduced numbers of medium-sized follicles (Figure 2), suggesting that although recruitment of follicles might be increased by higher insulin, follicular development might be impaired (Garnsworthy *et al.* 2008b). Fat supplementation of a high-starch (180 g/kg DM) diet increased the number of small follicles, but did not affect the number of medium-sized follicles and there was no benefit from supplementary fat above 8 g/kg DM (Figure 3). Taken together, these studies suggest that

both fatty acid supply and insulin have minimum thresholds, so increasing either factor stimulates follicle development only when the other is adequate (Garnsworthy *et al.* 2008c). In a study of amino acids and protein levels, there was no effect of dietary treatment on numbers of follicles in different size classes; we concluded that altering metabolic hormones through manipulation of amino acid supply and balance is unlikely to have a significant impact on ovarian function in dairy cows (Garnsworthy *et al.* 2008d).

Some of our studies showed that whilst high-insulin status may encourage early resumption of oestrous cycles, high insulin might not be beneficial for oocyte quality. For example, in the study of Fouladi-Nashta *et al.* (2005) cows fed on a high starch diet produced a significantly higher number of poor quality oocytes and a lower proportion of cleaved embryos that developed to the blastocyst stage. In another experiment, (Fouladi-Nashta *et al.* 2007), addition of fat to a high-starch diet reduced plasma insulin concentrations and

improved developmental competence of oocytes. These studies indicate that high insulin status could adversely affect oocyte quality, which is consistent with our studies in beef cattle (Adamiak *et al.* 2006).

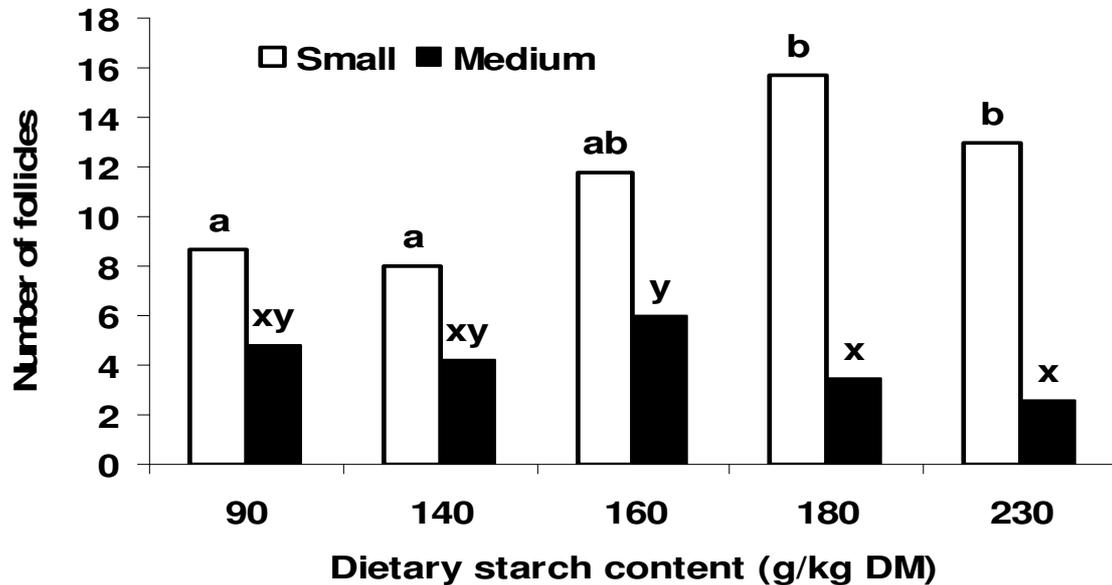


Figure 2. Numbers of small (<5 mm) and medium-sized (5-10 mm) ovarian follicles after a synchronised oestrus at 60 days in milk in high-yielding dairy cows fed on diets differing in starch content. Letters denote differences at $P < 0.05$. (Data from Garnsworthy *et al.* 2008b).

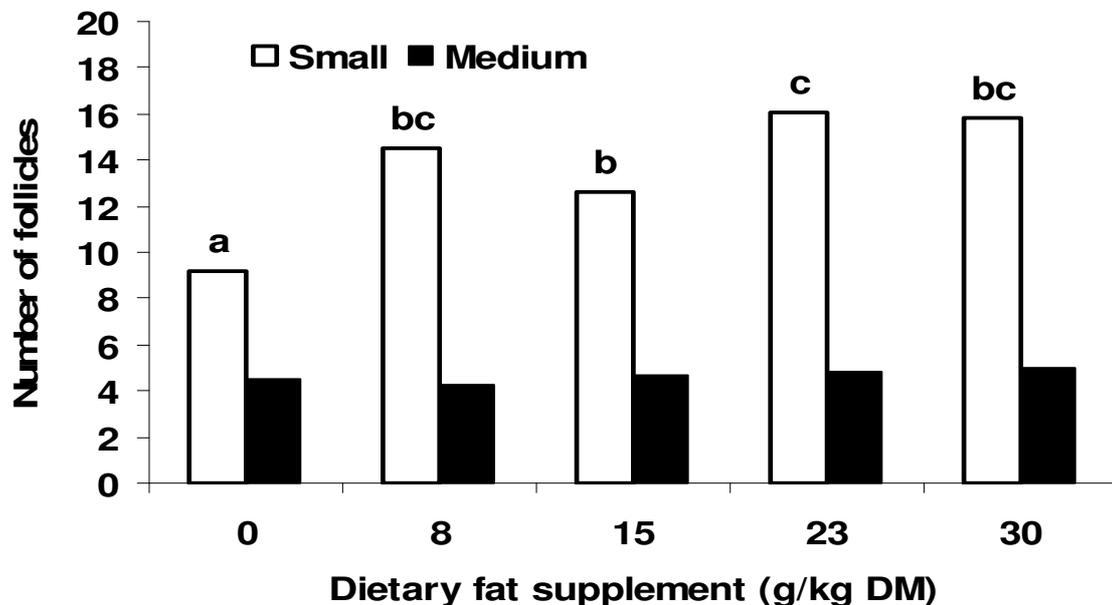


Figure 3. Numbers of small (<5 mm) and medium-sized (5-10 mm) ovarian follicles after a synchronised oestrus at 60 days in milk in high-yielding dairy cows fed on diets containing different levels of fat supplementation. Letters denote differences at $P < 0.05$. (Data from Garnsworthy *et al.* 2008c).

Optimum dietary strategy

There appears to be a conflict between nutritional strategies that stimulate ovarian activity postpartum and strategies that benefit oocyte quality. Higher plasma insulin concentrations have been associated with earlier resumption of oestrous cycles, but can have detrimental effects on oocyte competence. Our recent studies (Garnsworthy, *et al.* (2009b) have addressed these differential responses by examining nutritional strategies designed to enhance or impair cyclicity and oocytes at different stages of the reproductive cycle. In an initial experiment, strategies designed, to improve only one factor, or to impair both factors, resulted in pregnancy rates of 27% at 120 days in milk; a strategy designed to improve both factors resulted in a pregnancy rate of 60% ($P=0.03$). These strategies are currently being tested under commercial conditions.

CONCLUSIONS AND PRACTICAL APPLICATION

High genetic merit has been associated with poor fertility in dairy cows, but the relationship can be overcome. Fertility is influenced by a combination of factors that include genetic susceptibility, management, disease, milk yield, energy balance, body reserves and specific nutritional circumstances. Reproductive responses to nutrition are due to metabolic signals of nutrient status rather than availability of nutrients *per se*. It seems likely that the major influence of nutrition is through metabolic hormones, such as insulin, GH and leptin, which act through the IGF system to affect ovarian function at the tissue or cellular level. Insulin is the hormone most amenable to nutritional manipulation and has been shown to influence both cyclicity and oocyte quality. Responses to insulin vary at different stages of the reproductive cycle, but initial studies have shown that optimal nutritional strategies can be developed to improve fertility without compromising milk production. It should be stressed that dietary manipulation of metabolic hormones will restore fertility only if accompanied by strategies that minimise NEB and ensure adequate energy and nutrient intakes.

The optimum nutritional strategy varies with stage of lactation (Figure 4). In practice, it might be difficult to implement differential insulin manipulation on commercial farms. This would require the ability to feed cows individually on a high-insulin diet until they start to cycle and then change to a low-insulin diet. Where individual feeding is not possible, the next best system would be to group cows and to feed a high-insulin diet during the voluntary wait period (e.g. for the first 50 days of lactation) and then a low-insulin diet during the mating period. If grouping is not possible, then nutritional principles might still inform management

decisions at the herd level. A simple rule of thumb is that if cows are not cycling, then insulin needs to be stimulated by feeding a diet with a higher starch and/or lower fat content; if cows are cycling well but not conceiving, then insulin needs to be decreased by feeding a diet with lower starch and higher fat contents. Obviously this approach is a compromise, but the main objective is to avoid extremes.

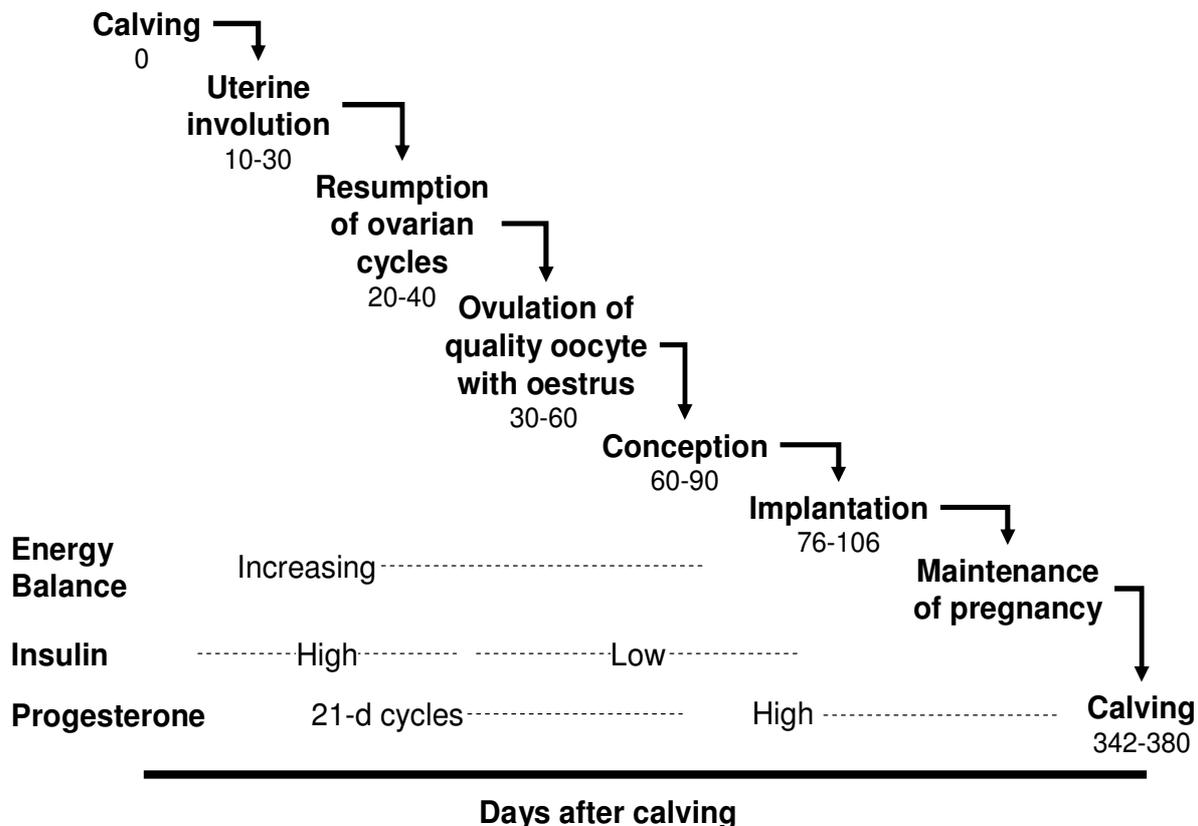


Figure 4. Sequence of reproductive events in the dairy cow. Each event depends on the success of preceding events. Numbers indicate optimum range (days after calving) to achieve an average calving interval of 365 days. Major temporal factors that influence success are: energy balance, which should start to increase early in lactation; insulin, which stimulates resumption of oestrous cycles, but may reduce oocyte quality; and progesterone, which is low during anoestrus, high during luteal phases of cycles, and low during follicular phases of cycles. (After Garnsworthy *et al.* 2008a).

ACKNOWLEDGEMENTS

Fertility research at Nottingham is funded by Defra, SEERAD, LINK, ABNA, BOCM PAULS and Provimi Ltd.

REFERENCES

- Adamiak, S.J., Powell, K., Rooke, J.A., Webb, R., Sinclair, K.D.** (2006) Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation development of bovine oocytes in vitro. *Reproduction*, **131**, 247–258.
- Butler W.R.** (2003) Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science*, **83**, 211–218.
- Butler, W.R.** (2005) Nutrition, negative energy balance and fertility in the postpartum dairy cow. *Cattle Practice*, **13**, 13–18.
- Chagas, L.M., Bass, J.J., Blache, D., Burke, C.R., Kay, J.K., Lindsay, D.R., Lucy, M.C., Martin, G.B., Meier, S., Rhodes, F.M., Roche, J.R., Thatcher, W.W., Webb R.** (2007) New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **90**, 4022–4032.
- Diskin M.G., Mackey D.R., Roche J.F., Sreenan J.M.** (2003) Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*, **78**, 345–370.
- Docherty, K., Clark, A.R.** (1994) Nutrient regulation of insulin gene expression. *FASEB Journal* **8**: 20–27.
- Esslemont, R.J., Kossaihati, M.A.** (2002) *The Costs of Poor Fertility and Disease in UK Dairy Herds*. DAISY Research Report No 5, Intervet UK Ltd, Milton Keynes.
- Fouladi-Nashta, A.A., Gutierrez, C.G., Garnsworthy P.C., Webb R.** (2005) Effects of dietary carbohydrates on oocyte/embryo quality and development in lactating dairy cattle. *Biology of Reproduction Special Issue* 135–136.
- Fouladi-Nashta, A.A., Gutierrez, C.G., Gong, J.G., Garnsworthy, P.C., Webb, R.** (2007) Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. *Biology of Reproduction*, **77**, 9–17.
- Garnsworthy, P.C.** (2007) Body condition score in dairy cows: targets for production and fertility. In: *Recent Advances in Animal Nutrition - 2006* (Eds. Garnsworthy, PC and Wiseman, J), 61–86, Nottingham University Press, Nottingham.
- Garnsworthy, P.C., Fouladi-Nashta, A.A., Mann, G.E., Sinclair, K.D., Webb, R.** (2009b) Effect of dietary-induced changes in plasma insulin concentrations during the early postpartum period on pregnancy rate in dairy cows. *Reproduction*, **137**, 759–768.
- Garnsworthy, P.C., Gong, J.G., Armstrong, D.G., Newbold, J.R., Marsden, M., Richards, S.E., Mann, G.E., Sinclair, K.D., Webb, R.** (2008d) Nutrition, metabolism and fertility in dairy cows: 3. amino acids and ovarian function. *Journal of Dairy Science*, **91**, 4190–4197.
- Garnsworthy, P.C., Gong, J.G., Armstrong, D.G., Mann, G.E., Sinclair, K.D., Webb, R.** (2009a) Effect of site of starch digestion on metabolic hormones and ovarian function in dairy cows. *Livestock Science*, In Press. doi:10.1016/j.livsci.2009.04.002.
- Garnsworthy, P.C., Jones, G.P.** (1987) The influence of body condition at calving and dietary protein supply on voluntary food intake and performance in dairy cows. *Animal Production*, **44**, 347–353.
- Garnsworthy, P.C., Lock, A.L., Mann, G.E., Sinclair, K.D., Webb, R.** (2008b) Nutrition, metabolism and fertility in dairy cows: 1. dietary energy source and ovarian function. *Journal of Dairy Science*, **91**, 3814–3823.
- Garnsworthy, P.C., Lock, A.L., Mann, G.E., Sinclair, K.D., Webb, R.** (2008c) Nutrition, metabolism and fertility in dairy cows: 2. dietary fatty acids and ovarian function. *Journal of Dairy Science*, **91**, 3824–3833.

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion I

- Garnsworthy, P.C., Sinclair, K.D., Webb, R.** (2008a) Integration of physiological mechanisms that influence fertility in dairy cows. *Animal*, **2**, 1144–1152.
- Garnsworthy, P.C., Topps, J.H.** (1982) The effect of body condition of dairy cows at calving on their food intake and performance when given complete diets. *Animal Production*, **35**, 113–119.
- Garnsworthy, P.C., Webb, R.** (1999) The Influence of nutrition on fertility in dairy cows. In *Recent Advances in Animal Nutrition - 1999* (Eds P.C. Garnsworthy and J. Wiseman), pp 39–57, Nottingham University Press, Nottingham.
- Gong, J.G., Lee, W.J., Garnsworthy, P.C. and Webb, R.** (2002) Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction*, **123**, 419–427.
- Gutierrez, C.G., Gong, J.G., Bramley, T.A., Webb, R.** (2006) Selection on predicted breeding value for milk production delays ovulation independently of changes in follicular development, milk production and body weight. *Animal Reproduction Science*, **95**, 193–205.
- Maas, J.A., Garnsworthy, P.C., Flint, A.P.F.** (2009) Modelling responses to nutritional, endocrine and genetic strategies to increase fertility in the UK dairy herd. *The Veterinary Journal*, **180**, 356–362.
- Webb, R., Garnsworthy, P.C., Gong, J-G., Armstrong, D.G.** (2004) Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*, **82**, E63–E74.
- Yan, T., Mayne, C.S., Keady, T.W.J., Agnew, R.E.** (2006) Effects of dairy cow genotype with two planes of nutrition on energy partitioning between milk and body tissue. *Journal of Dairy Science*, **89**, 1031–1042.

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion II

Einfluss von Doppelovulationen in der präsuperovulatorischen Brunst bei Holstein Kühen auf Embryonengewinnung, Embryonenqualität und Trächtigkeitsraten nach ET

J Detterer¹; T Wolgast¹; W Reuss¹; S Meinecke-Tillmann²

¹*Besamungs- und ET-Station Georgsheil, Südbrookmerland,*

²*Institut für Reproduktionsbiologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover;*

Doppelovulationen sind ein zunehmendes Problem bei hoch leistenden Milchkühen und stehen vermutlich oft im Zusammenhang mit hormonellen Imbalancen.

Im Vorfeld dieser Untersuchung war aufgefallen, dass von 28 Spendertieren mit Doppelgelbkörpern (DCL) zu Beginn der Superovulation fünf Tiere (18 %) nicht in Brunst kamen bzw. sechs Tiere (21 %) eine verzögerte Brunst mit schlechter Ovarreaktion zeigten.

Daraufhin wurden in der vorliegenden Studie die Ergebnisse von Spenderkühen mit zwei Corpora lutea zu Beginn der Superovulation (23/205; 11,2 %) mit den Resultaten der Tiere mit nur einem Gelbkörper (CL) zu diesem Zeitpunkt (182/205; 88,8 %) verglichen. Die Spendertiere der Rasse Holstein (1. - 12. Laktation) wurden mit Folltropin-V[®] (630 IU FSH, i.m.) superovuliert und nach Brunstinduktion mit 500 µg Cloprostenol i.m. (Estrumate[®]) und 25 mg Dinoprost i.m. (Dinolytic[®]) besamt. Ihre Ovarien wurden sowohl vor Beginn der Superovulation als auch unmittelbar im Anschluss an die Embryonengewinnung am Tag 7 ultrasonographisch untersucht. Die gewonnenen Eizellen/Embryonen (N = 2125) wurden nach den Kriterien der IETS beurteilt und die transfertauglichen Embryonen frisch oder nach Kryokonservierung in zyklussynchrone Empfängertiere auf den Zuchtbetrieben übertragen. Die statistische Auswertung wurde mit SAS[®] durchgeführt (Chi-Quadrat-Test, Prozedur CATMOD und Maximum-Likelihood-Varianzanalyse).

78 % (18/23) der Kühe mit DCL zeigten ein bilaterales Auftreten der Corpora lutea, während 22 % (5/23) der Tiere unilaterale Corpora lutea aufwiesen. Parallel zum altersbedingten Leistungsanstieg befanden sich die meisten Spender mit DCL in höheren Laktationsklassen mit einer Spitze von knapp 30 % in der 8. Laktation. Auffallend war, dass Kühe mit DCL später in der Laktation zur Embryonengewinnung herangezogen wurden (284 ± 152 d p.p.) als Tiere mit nur einem CL (250 ± 150 d p.p.). Die Anzahl der Gelbkörper nach Superovulation ($12,4 \pm 7,9$ vs. $13,6 \pm 7,7$ CL) und die absolute Embryonengewinnungsrate (73,1 % vs. 77,4 %), war bei den Spendertieren mit zwei Gelbkörpern bei Beginn der Superovulation ebenso niedriger wie die durchschnittliche Anzahl aller Embryonen/Eizellen ($9,1 \pm 7,8$ vs. $10,5 \pm 7,7$) und die durchschnittliche Anzahl der transfertauglichen Embryonen ($4,4 \pm 5,5$ vs. $5,9 \pm 5,4$). Außerdem wurde bei diesen Kühen ein deutlich höherer Prozentsatz an unbefruchteten Eizellen gefunden (48,3%, 101/209 vs. 38,9%, 745/1916). Auch die Embryonenqualität (21,7 %, 18/83 vs. 15,1 %, 162/1072 Klasse 2 und 3 Embryonen) war signifikant schlechter ($P < 0,05$) als bei den Spenderkühen mit nur einem Corpus luteum zu Beginn der Superovulation. Daraus resultierend war die Trächtigkeitsrate nach Transfer der Embryonen (N = 786) von den Spendertieren mit zwei Gelbkörpern ebenfalls signifikant niedriger (45%; 42/93 vs. 57%; 396/693; $P < 0,03$). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei den Spendern mit DCL höchstwahrscheinlich um Tiere gehandelt haben dürfte, die metabolische und/oder endokrinologische Probleme zu Beginn der Laktation hatten. Es wird deutlich, dass Kühe, die zwei Corpora lutea zu Beginn der Superovulation aufweisen, als Problemtiere eingestuft werden sollten.

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion II

Einsatz uterusmotilitätsfördernder Medikamente bei der Embryonengewinnung - Auswirkungen auf die Embryoqualität und die Trächtigkeitsraten nach Embryotransfer

J Detterer¹; T Wolgast¹; W Reuss¹; T; S Meinecke-Tillmann²

¹Besamungs und ET-Station Georgsheil, Südbrookmerland,

²Institut für Reproduktionsbiologie,

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Im Rahmen einer Arbeit zur Verbesserung der Embryonengewinnungsrate wurden Prostaglandin-F_{2α} und Oxytocin bei superovulierten Holsteinkühen kurz vor der Uterusspülung eingesetzt (Detterer et al. 2008). Dabei blieb die Frage offen, ob aus der zusätzlichen hormonellen Intervention negative Einflüsse auf die Embryonenqualität resultieren, die sich möglicherweise in erniedrigten Trächtigkeitsraten dokumentieren. In der vorliegenden Studie werden deshalb die Trächtigkeitsergebnisse nach Transfer dieser zusätzlich hormonell beeinflussten Embryonen mit denen nach Transfer konventionell gewonnener Embryonen verglichen.

Die Spendertiere der Rasse Holstein (1. - 12. Laktation) wurden mit Folltropin-V[®] (630 IU FSH, i.m.) superovuliert und nach Brunstinduktion mit 500 µg Cloprostenol i.m. (Estrumate[®]) und 25 mg Dinoprost i.m. (Dinolytic[®]) besamt. Ihre Einteilung in 6 Versuchsgruppen erfolgte danach zufällig: Gruppe 1 (n = 34) erhielt 12 - 16 Stunden vor der Embryonengewinnung eine luteolytische Dosis Dinoprost (25 mg in 5 ml Dinolytic[®], i.m.) und zu Beginn der Embryonengewinnung 10 IU Oxytocin (1 ml Oxytocin Albrecht[®], i.v.). Gruppe 2 (n = 32) wurde mit Dinoprost und einem Placebo (1 ml 0,9%ige NaCl-Lösung, i.v.) behandelt. Gruppe 3 (n = 30) erhielt ein Placebo (5 ml 0,9%ige NaCl-Lösung, i.m.) und Oxytocin. Den Kühen in Gruppe 4 (n = 25) wurde eine reduzierte Dosis Dinoprost (8,5 mg, i.m.) und Oxytocin appliziert. Gruppe 5 (n = 24) erhielt zweimal das Placebo, und Gruppe 6 (n = 29) diente als Standardkontrolle ohne jegliche zusätzliche Behandlung. Die Zeitpunkte der Medikamentenapplikationen in den Gruppen 2 - 5 entsprachen denen in Gruppe 1.

Die gewonnenen Eizellen/Embryonen wurden nach den Kriterien der IETS beurteilt und die transfertauglichen frisch oder nach Kryokonservierung in zyklussynchrone Empfängertiere auf den Zuchtbetrieben übertragen.

Die statistische Auswertung wurde mit SAS[®] durchgeführt (Chi-Quadrat-Test, Prozedur CATMOD und Maximum-Likelihood-Varianzanalyse).

Bei 174 Spülungen (jeweils Tag 7 des Zyklus) konnten insgesamt 2159 Embryonen bzw. Eizellen gewonnen werden. Hinsichtlich der Embryonenqualität bestanden keine Unterschiede zwischen den Gruppen 1 - 6.

Nach Transfer von insgesamt 794 Embryonen aus den Gruppen 1 - 6 lagen die jeweiligen Trächtigkeitsraten bei 55 % (68/123), 60 % (97/162), 53 % (67/126), 62 % (76/123), 50 % (62/124) bzw. 54 % (74/136). Die Unterschiede waren nicht signifikant ($P = 0,41$).

Die Behandlung mit Prostaglandin und Oxytocin zur Verbesserung der Embryonengewinnungsrate hat keinen negativen Einfluss auf die Embryonenqualität und die Trächtigkeitsraten.

Literatur: Detterer et al. 2008. *Reprod Dom Anim* 43(3):187.

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion II

Anti-Müller-Hormon (AMH): Ein valider Marker der ovariellen Funktionsreserve zur Vorhersage der ovariellen Reaktion auf Superovulationsbehandlungen

A. Vernunft, F. Schneider und W. Kanitz

*Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie,
Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere, Dummerstorf*

Bereits 1947 wurde das Glykopeptidhormon AMH als testikulärer Faktor entdeckt, der während der Embryonalentwicklung durch Unterdrückung der Müller'schen Gänge die Ausprägung des männlichen Geschlechts steuert. Mit Beginn der Pubertät wird AMH auch durch die Granulosazellen im weiblichen Organismus gebildet. AMH wird von primären und frühen sekundären Follikeln als inhibierender Faktor sezerniert, nicht jedoch von Primordial- oder großen Antralfollikeln (Durlinger et al. 2002). Der Pool an potentiell reifungsfähigen Follikeln wird als ovarielle Funktionsreserve bezeichnet. Da AMH nur von Follikeln dieses Pools gebildet wird, gilt es als Marker der ovariellen Funktionsreserve. Die Serum-AMH-Konzentrationen korrelieren mit der Anzahl der potentiell reifungsfähigen Follikel des Ovars (Maus; de Vet et al. 2002). Im Vorfeld von Ovarstimulationsbehandlungen wird AMH in der Humanmedizin als Parameter zur Vorhersage der ovariellen Reaktion und zur Dosisbemessung regelmäßig genutzt. Niedrige Serum-AMH-Konzentrationen weisen auf eine eingeschränkte ovarielle Funktionsreserve und eine damit verbundene geringe Reaktion auf eine Hormonbehandlung hin. Um gleiche ovarielle Reaktionen zu erzielen, benötigen Patientinnen mit niedrigen AMH-Werten signifikant höhere rFSH-Dosen als Frauen mit hohen oder normalen Werten (La Marca et al. 2006). AMH unterliegt keinen zyklusabhängigen Schwankungen und gilt gegenüber Inhibin B und FSH als zuverlässigerer Parameter der ovariellen Funktionsreserve (de Vet et al. 2002). Erste Untersuchungen an Rindern konnten zeigen, dass hohe Serum-AMH-Konzentrationen stark positiv mit der Anzahl der 3-7mm großen Follikel zu Beginn der Superovulationsbehandlung und der Anzahl an Ovulationen am Ende der Behandlung korreliert waren. Rico et al. (2009) resümieren, dass auch bei Rindern AMH Konzentrationen im Plasma der Individuen indikativ für ihre Ansprechbarkeit auf Superovulationsprogramme sind.

Besonders bei der saisonalöstrischen Nutztierspezies Pferd ist bis heute eine zuverlässige und erfolgreiche Superovulationsbehandlung schwierig. Wir wollten der Frage nachgehen, ob Serum-AMH-Konzentrationen mit einem kommerziellen ELISA (DSL-10-14400; Beckman Coulter, USA) bei der Spezies Pferd bestimmt werden können und ob diese in Zusammenhang mit der Ovaraktivität stehen. Dazu griffen wir auf Daten und Blutproben von Stuten zurück, die wöchentlich wiederholt einer ultraschallgeleiteten Follikelaspiration zur Eizellengewinnung unterzogen wurden. Ausgewählt wurden vier Stuten, die im wöchentlichen Intervall konstant viele Follikel anbildeten (Gruppe A; $11,1 \pm 1,1$) und vier Stuten, die konstant wenige neue Follikel anbildeten (Gruppe B; $6,2 \pm 0,51$). Zur Analyse kamen Serumproben die bei 39 verschiedenen Aspirationsitzungen gewonnen wurden (A20/B19). Stuten mit durchschnittlich vielen aspirierbaren Follikeln zeigten gegenüber den Tieren mit wenigen Follikeln signifikant höhere Serum-AMH-Konzentrationen (A: $1,2 \pm 0,05$ ng/ml bzw. B: $0,6 \pm 0,04$ ng/ml, $p < 0,001$). Weiterhin beobachteten wir, dass die AMH-Konzentrationen über die verschiedenen Beprobungszeitpunkte individuell konstant blieben. Es besteht eine signifikante, positive Korrelation zwischen der Anzahl der wöchentlich neu angebildeten Follikel und der Höhe der Serum-AMH-Konzentration ($r=0,67$), jedoch nicht zwischen der Anzahl der gewonnenen Oozyten pro Aspirationsitzung und der Serum-AMH-Konzentration.

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion II

Zusammenfassend zeigten unsere Daten, dass bei Stuten ein hoher Serum-AMH-Spiegel auf ein hohes Follikelanbildungsvermögen (ovarielle Funktionsreserve) hinweist. Da das Vorhandensein vieler vitaler Follikel zu Beginn einer Superovulationsbehandlung die Embryonengewinnungsrate positiv beeinflusst (Rind: Kawamata et al. 1994), sollte geprüft werden, ob bei Stuten hohe Serum-AMH-Konzentrationen positiv mit Superovulationsergebnissen korreliert sind.

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion II

Auswirkungen einer subklinischen Endometritis auf Spülergebnis, Embryoqualität und embryonaler Genexpression

M. Hölker¹, U. Küchenmeister², A. Mönich², F. Rings¹, K. Schellander¹ und D. Tesfaye¹

¹*Institut für Tierzuchtwissenschaften, Tierzucht und Tierhaltung, Universität Bonn*

²*Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönnow e.V.*

Obwohl der Embryotransfer eine fest etablierte Technik darstellt schwanken die Spülergebnisse und die Qualität der Embryonen nach Superovulation stark. Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Einfluss einer subklinischen Endometritis, definiert durch den Prozentsatz an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten an der Oberfläche des Endometriums (PNM's), zu erforschen. Hierzu wurden 49 Kühe der Rasse Holstein innerhalb einer Betriebsstätte in 9 Druchgängen superovuliert und gespült. Für die Studie wurden nur Tiere herangezogen, welche sich 30-45 Tage post partum befanden und klinisch gesund waren. Sämtliche Kühe erhielten zweimalig eine Injektion PGF (Estrumate) jeweils gefolgt von einer Injektion GnRH (Receptal) zur Östrussynchronisation. Ab dem 11 Zyklustag erhielten die Tiere 2 mal täglich über 4 Tage FSH (Pluset), so dass alle Tiere zwischen dem 76-82 Tag post partum gespült werden konnten. Darüber hinaus wurde unmittelbar vor der Besamung sowie direkt vor der Spülung mit Hilfe eines Cytobrush ein Abstrich des Endometriums dorsal aus dem Corpus Uteri unmittelbar vor der Bifurcatio Uteri entnommen. Diese Abstriche wurden zytologisch analysiert und die zugehörigen Tiere in Abhängigkeit des Prozentsatzes an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN's) als subklinisch erkrankt (PMN > 0) oder als gesund (PMN = 0) klassifiziert. Da die Probennahme zweimalig erfolgte war eine Aussage über den Gesundheitsstatus zum Zeitpunkt der Besamung, wie auch zum Zeitpunkt der Spülung möglich. Von einem Teil der gespülten Embryonen wurden zwecks Qualitätsbestimmung die Gesamtzellzahl sowie die Zahl der apoptotischen Zellen ermittelt. Embryonen von subklinisch erkrankten Tieren und gesunden Tieren wurden zudem mittels MicroArray-Technology verglichen. Einige differentiell exprimierte Transkripte wurden darüber hinaus mittels real Time PCR bestätigt.

Insgesamt wurden 425 Embryonen gespült, wovon 258 tauglich erschienen (8,7 und 5,3 pro Tier). Nach Auswertung der zytologischen Befunde wurden 25 Tiere zum Zeitpunkt der Besamung als subklinisch erkrankt und 24 als gesund eingestuft (Tabelle 1). Zum Zeitpunkt der Spülung wurden 21 Tiere als subklinisch erkrankt und 28 Tiere als gesund eingestuft. Die Anzahl der durch 2 Untersucher palpatorisch ermittelten Gelbkörper unterschied sich zwischen gesunden und subklinisch erkrankten Kühen weder zum Zeitpunkt der Besamung (7,9 vs. 8,9) noch zum Spültermin (7,9 vs. 8,9). Allerdings erreichten Kühe welche zum Zeitpunkt der Besamung als gesund klassifiziert wurden, bezogen auf die Gelbkörperzahl eine signifikant höhere Entwicklungsrate zum transfertauglichen Embryo ($p < 0.05$) als subklinisch erkrankte Kühe (77,6% vs. 53,6%). Tiere welche zum Zeitpunkt der Besamung als gesund eingestuft wurden lieferten durchschnittlich 6,4 transfertaugliche Embryonen während als subklinisch erkrankt klassifizierte Tiere lediglich 4,0 taugliche Embryonen lieferten. Erstaunlicherweise lieferten jedoch Kühe die zum Spültermin als subklinisch erkrankt klassifiziert wurden mit durchschnittlich 5,8 tauglichen Embryonen besserer Spülergebnisse als zum Spültermin gesund klassifizierte Tiere (4,7).

Der Vergleich durch Färbung von 33 Morulae und Blastozysten von 6 gesunden Kühen und 70 Morulae und Blastozysten aus 7 subklinisch erkrankten Kühen zum Zeitpunkt der Spülung erbrachte weder Unterschiede in der Zellzahl (114,2 vs. 115,3) noch im Prozentsatz apoptotischer Zellen (3,4 % vs. 3,5 %).

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion II

Ein Vergleich des Genexpressionsprofils (Affimetrix) zwischen Embryonen aus gesunden und subklinisch erkrankten Kühen klassifiziert zum Zeitpunkt der Spülung erbrachte 20 differentiell exprimierte Transkripte. 12 Transkripte waren über-exprimiert und 8 waren unter-exprimiert in Embryonen aus subklinisch erkrankten Tieren. Die Auswertung ausgewählter Transkripte mittels real time PCR bestätigte die Ergebnisse der Microarrays (Abbildung 1).

Zusammenfassend wird deutlich, dass eine subklinische Endometritis, welche definiert nach unseren „strengen“ Kriterien in ca. 50 Prozent der Fälle auftritt, einen starken Einfluss auf die Entwicklungsrate der ovulierten Eizellen, wie auch auf die absolute Anzahl der transfertauglichen Embryonen hat. Während sich taugliche Embryonen von gesunden und subklinisch erkrankten Tieren weder morphologisch noch hinsichtlich Zellzahl und apoptotischen Zellindex unterscheiden, konnten markante Unterschiede hinsichtlich der Genexpression identifiziert werden. Ob diese Unterschiede darüber hinaus ein unterschiedliches Entwicklungspotential nach Transfer auf Empfängertiere bedingt soll in folgenden Studien eruiert werden.

Tabelle 1: Übersicht über die Spülergebnisse

| PMN class | PMN at AI | | PMN at Flushing | |
|-------------------|-----------|---------|-----------------|---------|
| | PMN = 0 | PMN > 0 | PMN = 0 | PMN > 0 |
| Animals (n) | 25 | 24 | 21 | 28 |
| Embryos (n) | 161 | 97 | 99 | 159 |
| Total flushed (n) | 248 | 177 | 152 | 273 |
| Development (%) | 64,9 | 54,8 | 65,1 | 58,2 |
| Embryos/ Cow (n) | 6,4 | 4,0 | 4,7 | 5,8 |

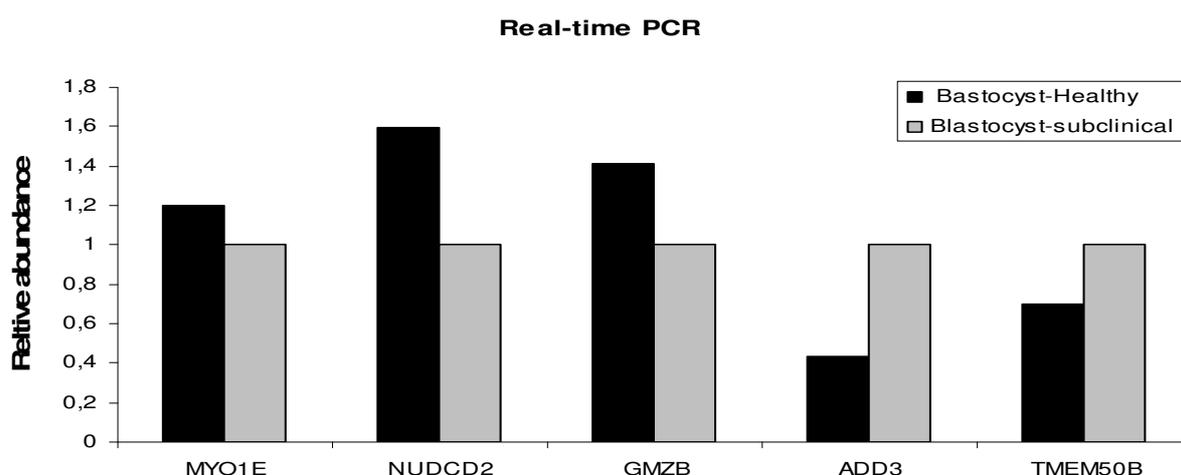


Abbildung 1: Transkriptexpression von Blastocysten gespült aus gesunden Kühen vs. Blastozysten aus subklinisch erkrankten Kühen zum Zeitpunkt der Spülung

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion III

Einfluss des Zyklusstadiums und des Alters der Tiere auf die Ergebnisse der *in vitro* Produktion von Rinderembryonen nach Schlachtung

M. Reichenbach^{1,3}, H-D. Reichenbach² und E. Wolf^{1,3}.

¹ Lehrstuhl f. Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der LMU-München

² Bayerische Landesanstalt f. Landwirtschaft - Institut f. Tierzucht

³ Bayerisches Forschungszentrum f. Fortpflanzungsbiologie, BFZF e.V.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Zyklusstadiums und des Alters der Tiere zum Zeitpunkt der Schlachtung auf die Ergebnisse der *in vitro* Produktion (IVP) von Embryonen an Ovarien geschlachteter Rinder untersucht. Im Zeitraum eines Jahres wurden am Schlachthof München von 148 zufällig ausgewählten Kühen der Rasse Deutsches Fleckvieh die Ovarien entnommen und in 30 °C warmen PBS ins Labor transportiert. Die morphologische Beurteilung der Ovarien in verschiedenen Stadien des ovariellen Zyklus erfolgte paarweise vor und nach einem Schnitt durch die Ovarien. Die Ovarien wurden in folgende Gruppen eingeteilt: Corpus luteum (CL) in Anbildung (A), CL in Blüte (B), CL in Rückbildung (R), Vorhandensein eines präovulatorischen (PF) oder eines dominanten Follikels (DF), Ovarialzysten und Afunktion der Ovarien. Die aus den Follikeln gewonnenen Eizellen wurden in Klassen eingeteilt und für 22 h in MPM mit 10 % OCS und 0,0125 IU LH/ml und 0,0250 IU FSH/ml maturiert. Die gereiften Eizellen wurden mit Spermia eines IVP getesteten Bullen nach Swim-up befruchtet. Nach 18 h Kokultur wurden die vermeintlichen Zygoten in SOF, angereichert mit 10% OCS und 40 µl/ml BME und 10 µl/ml MEM, kultiviert. Am Tag 3 (Tag 0 = IVF) wurde die Befruchtungsrate und an den Tagen 7 und 8 die Blastozystenrate ermittelt. Das Minimum der Anzahl an gewonnenen Eizellen lag bei 7 und reichte bis zu einem Maximum von 204 Eizellen pro Tier. Das Verhältnis von guten Eizellen (Kl. 1+2) zu moderaten Eizellen (Kl. 3+4) lag bei 1:1. Von allen Tieren konnten durchschnittlich 4,2 (Tag 7) und 5,2 (Tag 8) ET-taugliche Blastozysten (ET-tgl. E) erzeugt werden. Die IVP führte bei 23,5% der Tiere zu keinem ET-tgl. E (Tag 7), bei 39,9% zu 1-4 ET-tgl. E, bei 29,1% zu 5-10 ET-tgl. E, bei 6,1% zu 11-19 ET-tgl. E und bei 1,4% der Tiere zu mehr als 20 ET-tgl. E. Die durchschnittliche Anzahl an Eizellen war bei den Tieren, die älter als 8 Jahre waren (G4, n=12), am höchsten (80,6 Eizellen, p>0,05). Kühe im Alter von 3-5 Jahren (G2, n=49) und 6-8 Jahren (G3, n=18) hatten im Schnitt 63,9 und 58,1 Eizellen. Tiere unter 3 Jahren (G1, n=21) hatten im Durchschnitt 38,3 Eizellen. Es wurden bei zyklischen Ovarien ohne DF mehr Eizellen als bei Anwesenheit eines DF gewonnen (CLA, n=21: 54,8; CLB, n=18: 64,6 und CLR, n=12: 96,3) vs. (CLA-DF, n=10: 42,3; CLB-DF, n=25: 49,8 und CLR-DF n=16: 47,8). Bei Ovarialzysten (n=12) und bei Afunktion der Ovarien (n=14) wurden im Durchschnitt 67,7 bzw. 66,1 Eizellen gewonnen. Tiere mit PF (n=20) hatten im Schnitt 46,8 Eizellen. Das Zyklusstadium und das Alter der Tiere hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Befruchtungsrate. Es wurden signifikant (p>0,05) mehr ET-tgl. E bei den Tieren älter als 8 Jahre (G4) erzeugt als bei Tieren jünger als 3 Jahre (6,0 ET-tgl. E vs. G1: 1,6; G2: 4,5; G3: 3,7 ET-tgl. E). Bei Afunktion der Ovarien wurden im Schnitt die meisten Embryonen erzeugt (6,4 ET-tgl. E) jedoch waren die Unterschiede zu den anderen Gruppen nicht signifikant (CLA: 3,6; CLB: 3,4; CLR: 5,2; CLA-DF: 2,9; CLB-DF: 4,3; CLR-DF: 4,6; Ovarialzysten: 4,4; PF: 3,4 ET-tgl. E). In der vorliegenden Untersuchung wurden die Ergebnisse der IVP durch das Alter der geschlachteten Tiere beeinflusst. Dagegen übte der Zyklusstand der Tiere bei der Schlachtung keinen signifikanten Einfluss aus.

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion III

Beurteilung der Entwicklungskompetenz boviner Oozyten aus Follikeln mit unterschiedlicher Durchblutung der Follikelwand im Rahmen eines OPU / IVP-Programms

A. Hanstedt, K. Höffmann, Ä. Honnens, C. Wrenzycki

*Klinik für Rinder, Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken,
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover,
Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover*

Das Ovum pick up (OPU) in Kombination mit der In-vitro-Produktion (IVP) von Embryonen hat sich in der Rinderproduktion mittlerweile zu einer Alternative zur konventionellen Superovulation entwickelt. Ein limitierender Faktor bei der Produktion transfertauglicher Embryonen stellt die Qualität der verwendeten Oozyten dar. Blutflussmessungen an individuellen Follikeln könnten einen Hinweis auf das intrafollikuläre Milieu geben und dazu eingesetzt werden, Vorhersagen über die Entwicklungsfähigkeit der im Follikel befindlichen Eizelle zu machen.

Ziel unserer Untersuchungen ist es, Aufschluss über die Entwicklungskompetenz von Oozyten aus Follikeln mit unterschiedlichem Durchblutungsstatus zu gewinnen.

In dieser Studie fand ein- bzw. zweimal wöchentlich eine OPU-Sitzung mit sechs Versuchstieren statt. Die von uns genutzten Tiere waren allgemeingesunde Färsen und laktierende Kühe des Lehr- und Forschungsguts der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover in Ruthe.

Bei der Punktion wurde die Anzahl, Größe und die qualitative Durchblutung der Follikelwand von Follikeln mit einer Mindestgröße von 3 mm Durchmesser bestimmt.

Die nach Durchblutungsstatus der Follikelwand getrennt gewonnenen Kumulus-Oozyten-Komplexe wurden bei IVP-Tauglichkeit innerhalb von 5 Stunden der In vitro-Reifung zugeführt. Anschließend fanden eine In-vitro-Fertilisation und eine In-vitro-Kultivierung nach Standardprotokollen statt. Im weiteren Verlauf wurden die Embryonen bezüglich der Teilungs- und der Entwicklungsrate an Tag 7 und Tag 8 beurteilt.

Unsere Ergebnisse aus der In vitro-Produktion zeigten eine signifikante Herabsetzung der Entwicklungsraten, wenn die eingesetzten Eizellen durch einmal wöchentlich durchgeführtes OPU gewonnen wurden und aus Follikeln ohne erkennbare Durchblutung stammten.

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion III

Ein Teil der Eizellen (ohne Kumuluszellen) und der Blastozysten aus der IVP wurden eingefroren. Mittels RT-qPCR erfolgte die Bestimmung der mRNA-Gehalte entwicklungsrelevanter Gene. Dabei wurde bei den Oozyten die Transkriptmenge des HSP70, des ZAR-1-, des BMP15-, des GDF-9-, des DNMT1a-, -1b- und -3a- sowie des HDAC2-Gens ermittelt, bei den Blastozysten jene des HSP70-, des DNMT1a- und -3a-, des GLUT1-, des GLUT3-, des G6PD- und des HDAC2-Gens.

Aus der zweifaktoriellen Varianzanalyse der Ergebnisse der Eizellen mit anschließendem Bonferroni –t-test ergaben sich folgende Zusammenhänge:

| Einflussfaktor | HSP70 | ZAR-1 | BMP15 | GDF-9 | DNMT1a | DNMT1b | DNMT3a | HDAC2 |
|----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| Punktionsintervall | ns | s | s | s | s | ns | s | s |
| Durchblutungsstatus | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Interaktion | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

s = signifikant ($p \leq 0,05$), ns = nicht signifikant

Bei den Untersuchungen der Blastozysten zeigte sich lediglich der mRNA-Gehalt der G6PD beeinflusst durch das Intervall. Für dieses Transkript konnte desweiteren eine signifikante Interaktion zwischen dem Punktionsintervall und dem Durchblutungsstatus der Follikel aufgezeigt werden. Weiterhin hatte der Durchblutungsstatus der Follikel, aus denen die Eizellen stammten, keine signifikante Auswirkung auf den mRNA-Gehalt der untersuchten Blastozysten.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass das Punktionsintervall zwischen den OPU-Sitzungen, aber nicht der Durchblutungsstatus der Follikel, einen Einfluss auf den mRNA-Gehalt verschiedener entwicklungsrelevanter Gene in den gewonnenen Oozyten hat.

Gefördert durch die H.W. Schaumann-Stiftung

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion III

Prediction of horse oocyte quality: Morphological and cellular aspects

A. Mohammadi-Sangcheshmeh, E. Held, F. Rings, D. Tesfaye, K. Schellander
and M. Hoelker

*Institute of Animal Science, Animal Breeding and Husbandry Group, University of Bonn,
Bonn, Germany*

During the past decade, procedures for assisted reproduction have rapidly developed for clinical use in the horse. As a key factor in these procedures, oocyte quality profoundly affects fertilisation rate, early embryonic survival, maintenance of pregnancy and even fetal development. Therefore, identification of reliable predictors of oocyte quality will be important to raise the efficiency of horse embryo production. Although, most studies performed so far in horse oocytes have considered the effect of initial cumulus morphology (according to their degree of expansion) on developmental potential, the predictive value of the criterion is controversial and still there is no standard selection criterion for this animal. Previous studies in different species showed that oocytes presenting with a low activity of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) were more often associated with high potential of embryonic development. The G6PD enzyme is active in the growing oocyte but has decreased activity in oocytes that have finished their growth phase. To determine whether G6PD activity could be used to select developmentally competent horse oocytes before in vitro maturation (IVM), a prospective study was conducted using brilliant cresyl blue (BCB) staining as an indicator of G6PD activity and developmental potential. BCB test is based on the capability of the G6PD to convert the BCB stain from blue to colourless. Meanwhile, we re-evaluated the effect of initial cumulus morphology on the developmental potential of horse oocyte.

For our experiments, oocytes were recovered from slaughterhouse-collected mares' ovaries by slicing the ovary followed by scraping the follicles using bone curette. In experiment 1, oocytes were classified according to their initial cumulus morphology as having compact (Cp) or expanded (Ex) cumulus cells. After maturation, oocytes with first polar body were subjected to intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using frozen-thawed stallion spermatozoa and then cultured in DMEM-F12 medium for a period of 8 days to determine the blastocyst rate. In experiment 2, the recovered oocytes were exposed to 26 μ M BCB for 90 min and classified prior to IVM as having either a low activity of G6PD (blue cytoplasm; BCB+) or a high activity of G6PD (colourless cytoplasm; BCB-). After IVM, oocytes with first polar body were fertilized and cultured in the same way as described for the first experiment. The data were evaluated by Chi-square test, and all results with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

The results for experiment 1 are presented in Table 1. The rate of maturation to metaphase II (MII) was significantly lower in Cp oocytes (40.2%) than in Ex oocytes (58.4%). In terms of the proportion of cleaved embryos recorded two days after ICSI, there was no significant differences among the two oocyte categories (47.5% in Cp vs. 50.7% in Ex). Significant differences among groups were also observed on day after ICSI, when the embryos reached the blastocyst stage. The proportion of the Ex

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion III

oocytes that developed into blastocysts was significantly higher (16/134; 11.9%) than that of the Cp oocytes (3/80; 3.8%).

Table 1: Maturation rate and embryo development in horse oocytes related to their initial cumulus morphology.

| Treatments | Ex | Cp |
|---------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| No. of oocytes | 250 | 209 |
| MII rate [(n/n) %] | (146/250) 58.4 ^a | (84/209) 40.2 ^b |
| No. of cultured oocytes | 134 | 80 |
| Cleavage rate [(n/n) %] | (68/134) 50.7 ^a | (38/80) 47.5 ^a |
| Blastocyst of oocyte [(n/n) %] | (16/134) 11.9 ^a | (3/80) 3.8 ^b |

Within rows, numbers with different superscripts are statistically different ($P < 0.05$).

Results for Experiment 2 are shown in Table 2. The proportion of oocytes with first polar body was 58.9% for BCB+ group and 28.1% for BCB- group, showing a significantly higher maturation rate for those oocytes staining positively for BCB. Whereas the BCB+ group exhibited a 49.4% cleavage rate, the BCB- group showed a significant reduction (30.6%) in terms of the proportion of cleaved embryos. The difference was also reflected in the number of blastocyst obtained on day 8 after ICSI and BCB- oocytes yielded a significantly lower blastocyst rate (1/62; 1.6%) than the BCB+ oocytes (8/85; 9.4%).

Table 2: Maturation rate and embryo development in horse oocytes related to their cytoplasm BCB coloration.

| Treatments | BCB+ | BCB- |
|---------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| No. of oocytes | 382 | 295 |
| MII rate [(n/n) %] | (225/382) 58.9 ^a | (83/295) 28.1 ^b |
| No. of cultured oocytes | 85 | 62 |
| Cleavage rate [(n/n) %] | (42/85) 49.4 ^a | (19/62) 30.6 ^b |
| Blastocyst of oocyte [(n/n) %] | (8/85) 9.4 ^a | (1/62) 1.6 ^b |

Within rows, numbers with different superscripts are statistically different ($P < 0.05$).

Our data clearly indicate that the Ex oocytes had higher developmental competence than the Cp oocytes, and also our observations confirm that G6PD activity before IVM is a reliable predictor of horse oocytes viability and developmental potential. Consequently, this might enhance success rates for those horse technologies which currently have low efficiencies, such as nuclear transfer.

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion III

Beschaffenheit der Zona pellucida equiner Eizellen in Relation zu deren Entwicklungspotential

E. Held, A. Mohammadi-Sangcheshmeh., F. Rings, E. Tholen., D. Tesfaye, K. Schellander, M. Hoelker

Institut für Tierzuchtwissenschaften, Tierzucht und Tierhaltung, Universität Bonn, Bonn

Die Vermessung der Zona pellucida mit Hilfe der Polarisationslichtmikroskopie zur Beurteilung der Entwicklungskompetenz von Oozyten und Embryonen hat sich in den letzten Jahren bereits in der Humanmedizin etabliert. In unserer Studie haben wir diese Methode bei equinen Oozyten angewandt um zu testen, ob eine prospektive Einteilung der Eizellen nach ihrem späterem Entwicklungspotential möglich ist.

Um die Eizellen mit vermeintlich gutem und schlechtem Entwicklungspotential zu gruppieren, teilten wir diese in einem erstem Versuch anhand ihrer Kumulismorphologie (kompaktierter Kumulus vs. Expandierter Kumulus) und in einem 2. Versuch nach Glucose-6-P-DH Aktivität (BCB+ vs. BCB-) ein. Aus Untersuchungen an equinen Eizellen, z.B. von Hinrichs et al. (2002) ist bekannt, dass Expandierte-Eizellen eine signifikant höhere Entwicklungskompetenz aufweisen als kompaktierte- Eizellen. In einer Studie aus unserem Hause zeigte sich ebenfalls ein starker Zusammenhang zwischen der BCB-Färbung und der späteren Entwicklungskompetenz.

Nach Denudierung der Kumuluszellen wurde die Dicke der inneren Zona Schicht (CVMean) und die Intensität der Doppellichtbrechung (PVMean) mit Hilfe des Polarisationslichtmikroskops der Firma OCTAX und der speziellen polar AIDE Software vermessen.

Wie in Abbildung 1 dargestellt, erhielten wir in der Gruppe der immaturen Eizellen für beide Parameter signifikante Unterschiede, wenn die Eizellen nach Kumulismorphologie eingeteilt worden waren. Die Dicke der inneren Zona Schicht ist bei Expandierten Eizellen signifikant dünner als bei Kompaktierten-Eizellen. Bei der Intensität der Doppellichtbrechung verhält sich dies gegenläufig. Die Expandierten Eizellen haben signifikant höhere Werte als Kompaktierte Eizellen. Das deutet auf eine dichtere und geordnetere Struktur der inneren Zona Schicht hin. Bei den Eizellen, die auf Grund ihrer Glucose-6-Phosphat- Dehydrogenase-Aktivität in BCB+ und BCB- eingeteilt wurden, konnten wir hinsichtlich der Beschaffenheit der Zona Pellucida keine signifikanten Unterschiede feststellen. Es besteht demnach keine Korrelation zwischen den Zona Parametern und der G6PDH- Aktivität (Abb. 2).

In einem weiteren Versuch wurden die Eizellen nach der Maturation vermessen. Hier unterschieden sich Eizellen mit ausgeschleustem Polkörper deutlich von denen ohne Polkörper hinsichtlich der Zona Dicke und der Intensität ihrer Doppellichtbrechung.

Eizellen mit expandierten Kumuluszellen und Polkörper wiesen eine dickere innere Zona Schicht und eine geringere Doppellichtbrechungsintensität auf, als Eizellen mit expandiertem Kumulus ohne Polkörper.

Die deutlichen Unterschiede in den Messwerten, die wir bei Betrachtung der immaturen und maturen Eizellen erhielten, bestätigen zudem die Ergebnisse aus anderen Studien, die eine Veränderung der Struktur der Zona pellucida während der Maturation herausstellen.

Aus unseren Untersuchungen ergibt sich, dass Korrelationen zwischen der Beschaffenheit der Zona Pellucida, der Morphologie der Kumuluszellen und dem Entwicklungspotential vorliegen. Die polarisationslichtmikroskopische Selektion der Eizellen scheint demnach erfolgversprechend. Unterschiede im G6PDH- Stoffwechsel beeinflussen zwar die Entwicklungskompetenz, spiegeln sich jedoch nicht in der Beschaffenheit der Zona pellucida wieder.

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion III

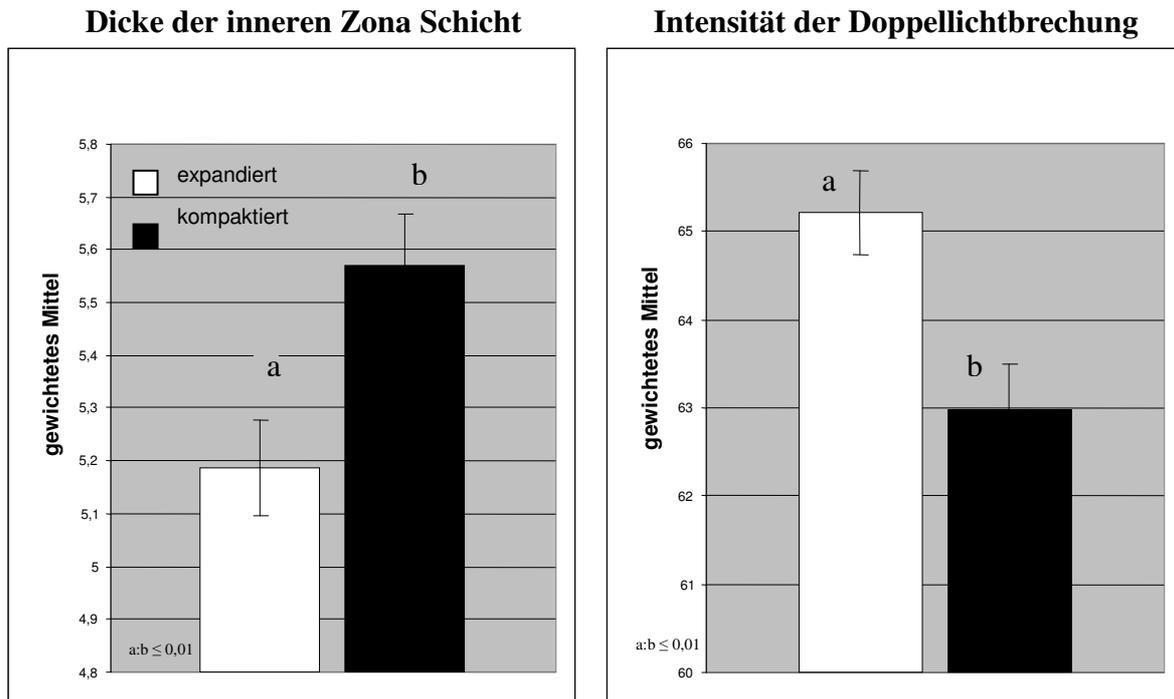


Abb. 1: Überblick über die Unterschiede zwischen kompaktierten und expandierten Eizellen für die Parameter CVMean (Dicke der inneren Zona Schicht) und PVMean (Intensität der Doppellichtbrechung). Säulen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind signifikant verschieden voneinander (a:b ≤ 0,01)

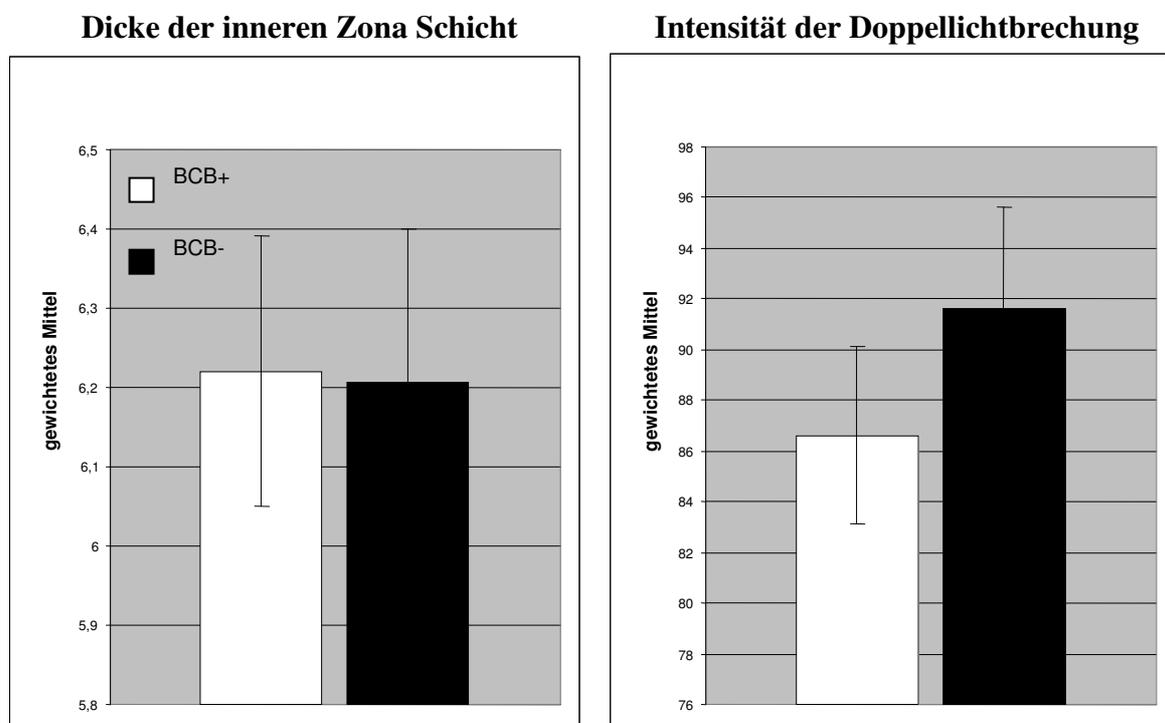


Abb. 2: Überblick über die Unterschiede zwischen BCB+ und BCB- Eizellen für die Parameter CVMean (Dicke der inneren Zona Schicht) und PVMean (Intensität der Doppellichtbrechung).

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion IV

Variable funktionelle Kompetenz boviner dominanter Follikel

Schneebeli Jürg;

Schauenberg 91; CH-7421 Summaprada; Schweiz

Entsprechend der Anzahl dominanter Follikel [DF], die im Verlaufe der Lutealphase gestaffelt auftreten, können beim Milchvieh die allermeisten Brunstzyklen entweder als sog. 2- oder als 3-Wellen-Zyklen [2-WZ; 3-WZ] bezeichnet werden. Im Mittel sind 3-WZ nur wenig länger als 2-WZ, ihre Follikelwellen entstehen nicht nur in verkürzten Intervallen, sondern neigen auch dazu, einander gegenseitig deutlich zu überlagern. Es ist noch weitgehend unklar, wie die Unterschiede zwischen 2- und 3-WZ physiologisch zu deuten sind. Zudem fragt sich, inwiefern bisherige Kriterien für Follikelmanipulationen während der Lutealphase den Verhältnissen in 2- und 3-WZ gleicherweise gerecht werden.

In dieser Studie wurden Korrelationen zwischen klinisch erfassbaren Parametern des Follikelwachstums in 2- und 3-WZ vergleichend untersucht. Dazu standen Daten aus 209 Zyklen (133 2-WZ; 76 3-WZ) von Braunvieh-Milchkühen zur Verfügung, deren Ovaraktivität kontinuierlich in 1- bis 2-tägigen Intervallen palpatorisch überwacht worden war. In 2-WZ waren für beide Follikel der Anbildungszeitpunkt (erstmalige Erkennung) und die Verweildauer (Intervall zwischen erster und letztmaliger Erkennung) negativ miteinander korreliert (DF: $r = -0.463$; Brunstfollikel [BF]: $r = -0.579$). In 3-WZ war eine ähnliche Korrelation nur für den BF zu beobachten ($r = -0.489$), während die entsprechenden Werte für den ersten ($r = -0.287$) und zweiten DF ($r = -0.266$) deutlich tiefer lagen. Sowohl in 2- als auch in 3-WZ waren die Intervalle zwischen aufeinanderfolgenden DF stets positiv mit der Verweildauer des bereits persistierenden Follikels korreliert (r zwischen 0.314 und 0.402). Anders als in 3-WZ, war der Zeitpunkt der Anbildung des ersten DF in 2-WZ negativ mit dem Intervall bis zum Erscheinen des nachfolgenden Follikels korreliert ($r = -0.383$). Alle aufgeführten Korrelationskoeffizienten sind mit $p < 0.05$ von 0 verschieden. Weder in 2- noch in 3-WZ konnte eine Korrelation zwischen den Verweilfristen aufeinanderfolgender DF festgestellt werden.

Es ist zu beachten, dass alle erfassten Parameter lediglich indirekte Indikatoren des physiologischen Status eines Follikels sind. Da Beziehungen zwischen mehrheitlich polyfaktoriell beeinflussten Merkmalen untersucht wurden, konnten kaum hohe Korrelationskoeffizienten erwartet werden. Von primärem Interesse waren aber Unterschiede zwischen vergleichbaren Korrelationen und weniger deren absolute Grösse. Gemäss den vorliegenden Beobachtungen erlangen offenbar nicht alle dominanten Follikel die gleiche funktionelle Kompetenz. Obwohl sich erfahrungsgemäss jeder DF potentiell bis zur Ovulationsreife weiterentwickeln kann, scheint die Fähigkeit, lange zu persistieren und das Wachstum nachfolgender Blasen zu hemmen je nach Situation unterschiedlich ausgeprägt zu sein. Die Anzahl der Follikelwellen pro Zyklus dürfte massgeblich von der funktionellen Kompetenz des jeweils ersten DF abhängen. Ist dieser nicht in der Lage, zu Beginn der Luteinisierung die Anbildung eines Nachfolgers lange zu verhindern, so wird über einen frühen Start der 2. Follikelwelle indirekt das Auftreten eines 3. DF begünstigt. Als wesentlicher Modulator der Follikelwellen ist die jeweils aktuelle

Progesteronsekretion zu vermuten. Individuellen Variationen der Gelbkörperaktivität während der Anbildungs- und der Blütephase sollte in dieser Hinsicht vermehrt Beachtung geschenkt werden. Die bisher allgemein beachteten Kriterien für Manipulationen des Follikelwachstums beim Rind werden der variablen funktionellen Kapazität der DF kaum gerecht. Einfache Optimierungsmöglichkeiten, die nicht mit immensem diagnostischem

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion IV

Aufwand verbunden wären, scheint es aber kaum zu geben. Die manchmal praktizierte Ablation oder Inaktivierung bestehender DF vor Beginn gewisser Eingriffe kann zwar helfen, Ausgangssituationen zu vereinfachen, echte Einheitsbedingungen ergeben sich dadurch aber nicht.

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion IV

Entwicklung einer Methode zur wiederholten transvaginalen, ultraschallgeleiteten Biopsie des Corpus luteums beim Rind

E. Onnen-Lübben¹, S. Wilkening-Kraas¹, A. Hanstedt¹, H. Stinshoff¹, N. Beindorff¹,
H. Bollwein¹ und C. Wrenzycki^{1,2}

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, ¹ Klinik für Rinder,

² Reproduktionsmedizinische Einheiten der Kliniken,

Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover

Die transvaginale, ultraschallgeleitete Corpus luteum (CL)-Biopsie beim Rind stellt eine Methode zur wiederholten Gewinnung von Gelbkörpergewebe von ein und demselben CL dar, ohne dabei dessen Funktion zu beeinflussen. Ziel dieser Studie war es, die Technik der wiederholten CL-Biopsie zu etablieren und validieren.

Zunächst wurde der optimale Einstechwinkel der Biopsienadel (18 gauge, Fa. Somatex) an Schlachthofovarien sowie Gewicht und Größe der CL-Biopsien zu verschiedenen Zeitpunkten des Zyklus bestimmt. Anschließend wurden zyklische HF-Kühe synchronisiert (Ov-Synch-Programm) und künstlich besamt. An Tag 6, 13 und 20 nach der Insemination erfolgte die Biopsieentnahme, nachdem die Tiere zuvor eine Epiduralanästhesie (3,0 ml Procasel, 60 mg Procainhydrochlorid) erhalten hatten. Anschließend wurde nach trockener Reinigung des äußeren Genitales der Biopsie Pick Up (BPU)-Träger vaginal eingeführt. Unter Ultraschallkontrolle erfolgte eine transvaginale Gelbkörperbiopsie. Das Vorliegen einer Trächtigkeit wurde an Tag 32 und Tag 40 mit Hilfe eines Ultraschallgerätes (GE Logiq Book, 7,5 MHz Sonde (GE 8C-RS)) überprüft. Danach erfolgte bei den tragenden Tieren eine erneute CL-Biopsie an Tag 42. Alle Gewebeproben wurden für nachfolgende histologische Studien in Formalinlösung fixiert. Vor jeder CL-Biopsie wurde zur Analyse von Progesteron (P4) eine Blutprobe genommen. Mit Hilfe der Dopplersonographie war es möglich, die Durchblutung des CL im Angio-Color-Mode aufzuzeichnen und mit der Software Pixelflux (Chameleon Software, Leipzig) auszuwerten.

Die Biopsieentnahme war in 90% der Fälle erfolgreich. Die durchschnittliche Größe eines Bioptates betrug 11 x 1mm und wies ein durchschnittliches Gewicht von 4,3 mg auf (min: 3,2 mg, max: 5,7mg). Die Kühe, an denen eine Biopsie entnommen wurde, zeigten ähnliche

Progesteronkonzentrationen im Plasma wie Kontrolltiere ohne Biopsie auf. Im Plasma der tragenden Kühe konnten physiologische Progesteronkonzentrationen mit gleichzeitig ansteigender Durchblutungsfläche des Corpus luteums nachgewiesen werden. Die Qualität des gewonnenen Gewebes ließ eine histologische Untersuchung zur Bestimmung der großen Lutealzellen zu.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die transvaginale, ultraschallgeleitete CL-Biopsie eine mikroinvasive Methode zur wiederholten Entnahme von Gelbkörpergewebe während der frühen Trächtigkeit darstellt, ohne die Funktion des CL zu beeinträchtigen.

Danksagung: Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Wr154/1-1), Institut für Tierernährung (FLI) in Braunschweig

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion IV

Einsatz verschiedener Progesteronpräparate (CIDR, PRID) in Kombination mit einer Prostaglandin-Applikation zur Brunstsynchronisation von Empfängertieren für den Embryotransfer

R. Hovsepyan¹, H.-P. Nohner¹, C. Leiding¹ und C. Wrenzycki²

¹*Besamungsverein Neustadt a.d. Aisch e.V., Karl-Eibl-Str. 17-27, 91413 Neustadt a.d. Aisch*

²*Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für Rinder, Reproduktionsmedizinische Einheiten der Kliniken, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover*

Die Brunstsynchronisation stellt die Voraussetzung für einen erfolgreichen Embryotransfer, eine terminorientierte Besamung und eine Rationalisierung des fortpflanzungsbiologischen Herdenmanagements bei Kühen und Jungrinder dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Eignung verschiedener Progesteron-Präparate (PRID oder CIDR) in Kombination mit einer Prostaglandin-Applikation für die Brunstsynchronisation beim Rind zu untersuchen. CIDR-Vaginalspangen sind seit März 2008 für die Anwendung beim Rind zugelassen. Das Anwendungsgebiet liegt in der Kontrolle des Brunstzyklus bei zyklischen Tieren, einschließlich der Brunstsynchronisation. Die mit der CIDR-Spange erzielten Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen der PRID-Spirale verglichen. Zur Untersuchung wurden die Empfängertiere der Rasse Fleckvieh zufällig in zwei Gruppen aufgeteilt und erhielten unabhängig vom Zyklusstand für sieben Tage entweder eine Spange (CIDR) oder eine Spirale (PRID). Einen Tag vor Entfernen des Implantats wurde allen Tieren ein Prostaglandinpräparat (Estrumate, 2ml) verabreicht. Gemäß Herstellerangaben ist mit einem Eintritt der Brunst 48 bis 72 Stunden nach dem Entfernen der Spirale/Spange zu rechnen. Sieben Tage nach der Brunst erfolgte der Transfer tiefgefrorener Embryonen. Die Auswahl der Empfängertiere erfolgte dabei anhand der Größe und Qualität des gebildeten Gelbkörpers. Die rektale Trächtigkeitsuntersuchung erfolgte 25 bzw. 35 Tage nach dem Embryotransfer. Um den Verlauf der Plasmalogesteronkonzentration während des Zyklus zu bestimmen, wurden in bestimmten zeitlichen Abständen (siehe Abbildung) Blutproben genommen und mittels ELISA auf Progesteron hin untersucht.

Insgesamt wurden im Rahmen der Studie 68 Färsen untersucht, wovon 43 eine PRID-Spirale und 25 eine CIDR-Spange erhielten. Von den untersuchten Tieren verloren drei die Spirale (PRID) und eines die Spange (CIDR). Nach zwei Tagen waren 62 der 64 verblieben Versuchstiere brünstig (PRID - 38 Tiere (95%) und CIDR - 24 Tiere (100%)). Bei der rektalen Gelbkörperkontrolle erwiesen sich 56 der Tiere als ET-tauglich (PRID 34 Tiere (85%) und CIDR 22 Tiere (92%)). Am 30. Tag der Trächtigkeit lag

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion IV

die Trächtigkeitsrate bei den PRID-Tieren bei 47% (16 Tiere) und bei CIDR-Tieren bei 64% (14 Tiere). Diese Werte waren signifikant ($p \leq 0.05$) unterschiedlich. Bei Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt wurden keine weiteren Embryonalverluste festgestellt. Die folgende Abbildung stellt den Verlauf der mittleren Progesteronkonzentrationen im Blutplasma aller Versuchstiere dar. Dabei wiesen die Konzentrationsverläufe beider eingesetzter Gestagenpräparate prinzipiell eine hohe Ähnlichkeit zueinander auf. Lediglich während der ersten zwei Stunden des Versuchstages wurden bei den PRID-Tieren deutlich höhere Progesteronkonzentrationen im Blutplasma festgestellt als bei den CIDR-Tieren. Dies könnte auf die größere Oberfläche der PRID-Spirale zurückzuführen sein, die eine schnellere Adsorption der abgegebenen Stoffe durch das Blut zu begünstigen scheint. Die höheren Anfangskonzentrationen haben möglicherweise einen positiven Einfluss auf die Etablierung einer Trächtigkeit.

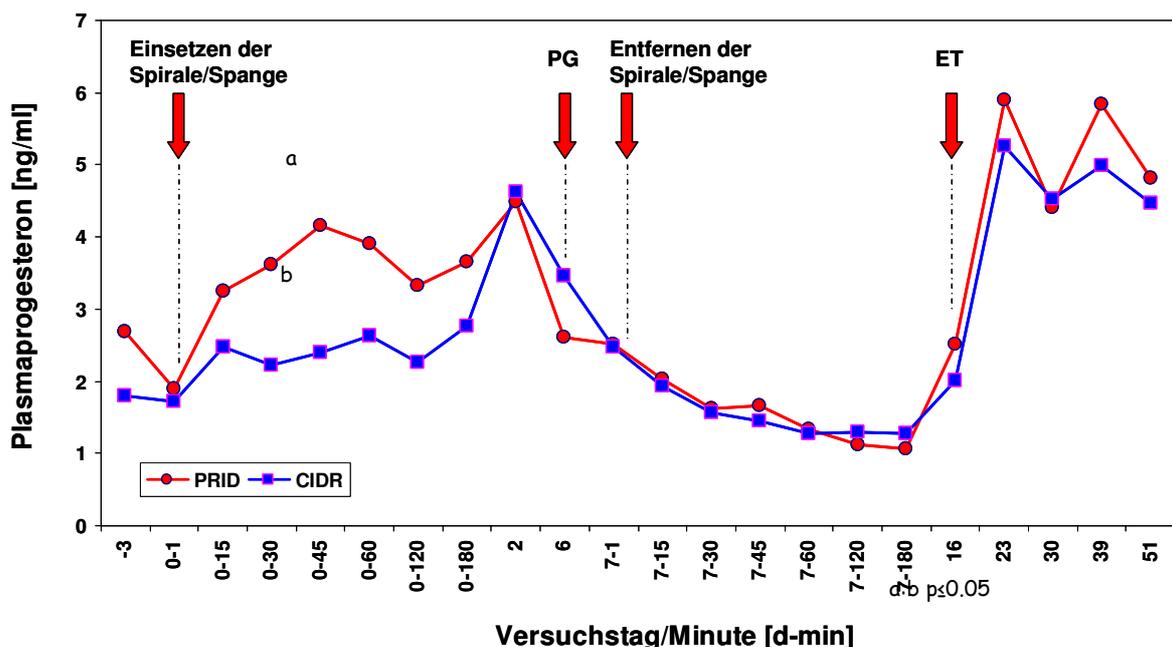


Abbildung 1: Verlauf der Progesteronkonzentration im Blutplasma bei allen trächtigen Versuchstieren

Die Ergebnisse zeigen, dass die mit CIDR-Spangen behandelten Tiere höhere Synchronisations- und Trächtigkeitserfolge aufwiesen als die mit PRID-Spiralen behandelten Versuchstiere.

Gefördert durch die Karl-Eibl-Stiftung

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion IV

Dopplersonographische Untersuchungen zur Eignung von Empfängertieren im Rahmen des Embryotransfers beim Rind

Ä. Honnens¹, L. Hosche¹, A. Kuwer², K. Roschlau², D. Roschlau², C. Wrenzycki^{1,3},
H. Bollwein¹

¹ *Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*

² *Embryotransfer Station Nückel, Masterrind GmbH, Loxstedt*

³ *Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*

Die optimale Selektion von Empfängertieren bildet neben einem guten Management und dem Einsatz qualitativ guter Embryonen die Grundlage für zufrieden stellende Trächtigkeitserfolge nach Embryotransfer (ET) beim Rind und ist somit ausschlaggebend für die Wirtschaftlichkeit kommerzieller boviner ET-Programme. Jedoch kommt es trotz der Anwendung moderner Selektionskriterien und dem Transfer guter Embryonen nach wie vor zu variablen Trächtigkeitsergebnissen, deren fehlende Vorhersagbarkeit den Einsatz des Embryotransfers beim Rind limitiert.

In der Humanmedizin gibt es Hinweise darauf, dass die Beurteilung von Perfusionsverhältnissen im weiblichen Genitale nützlich sein könnte, um im Rahmen von In-vitro-Fertilisations- und ET-Programmen infertiler Frauen die Implantationsaussichten für einen Embryo zu beurteilen. Es wurde gezeigt, dass bei einem relativ niedrigen Blutfluss in der A. uterina während der Lutealphase die Aussichten für die Etablierung einer Schwangerschaft gering sind. Weiterhin wird vermutet, dass eine reduzierte Durchblutung des Gelbkörpers mit verringerten Schwangerschaftsraten einhergeht.

Ziel dieser Studie war es mit Hilfe der transrektalen Dopplersonographie erstmals an Färsen zu untersuchen, wie sich der luteale und uterine Blutfluss nach Embryotransfer verhalten, und zu überprüfen, ob beim Rind Zusammenhänge zwischen der Durchblutung des inneren Genitales und dem Trächtigkeitserfolg nach Embryotransfer bestehen. Von besonderem Interesse war dabei die Überprüfung, inwiefern mit Hilfe der dopplersonographischen Untersuchung vor dem Transfer der Trächtigkeitserfolg vorherzusagen und somit noch vor der Übertragung der Embryonen die Eignung eines Empfängertieres abzuschätzen ist.

Es wurden 35 Färsen untersucht, die im Rahmen des ET-Programms in der ET-Station Nückel der Masterrind GmbH als Empfängertiere fungierten. Die Färsen bekamen 6 (n=16) bzw. 7 (n=19) Tage (Tag 6) nach der Ovulation (Tag 0) je einen Embryo transzervikal in den Uterus übertragen. Es handelte sich um *in vitro* produzierte Embryonen der Qualitätsklasse 1 oder 2

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion IV

(laut den Richtlinien der IETS). Die dopplersonographischen Untersuchungen fanden unmittelbar vor dem Transfer (Tag 6) und an den Tagen 8, 10, 13, 15, 17 und 20 statt. Am Tag 25 wurden mittels B-Mode Sonographie 21 Färsen als tragend und 22 Färsen als nicht tragend diagnostiziert. Dopplersonographisch wurden die Durchblutung des Corpus luteums und der ipsilateral dazu gelegenen Arteria uterina untersucht, wobei als Parameter für den lutealen Blutfluss die durchblutete Fläche (LBF) und für die uterine Durchblutung die mittlere maximale Blutflussgeschwindigkeit (TAMV) herangezogen wurden.

Der luteale Blutfluss der nicht tragenden Färsen stieg ($p < 0,05$) zwischen den Tagen 6 und 10 an und blieb ($p > 0,05$) bis Tag 15 auf diesem Niveau. An Tag 17 nahm LBF deutlich ($p < 0,05$) ab und erreichte nach einer weiteren Senkung ($p < 0,05$) an Tag 20 seinen Minimalwert. Die LBF-Werte der tragenden Färsen stiegen ($p < 0,05$) zwischen den Tagen 6 und 8 deutlich an und blieben ($p > 0,05$) nach einem weiteren Anstieg ($p < 0,05$) zwischen den Tagen 10 und 13 bis Tag 20 auf hohem Niveau. Die tragenden Färsen wiesen an den Tagen 15 und 20 höhere ($p < 0,05$) LBF-Werte als die nicht tragenden Färsen auf. Der Variationskoeffizient (VK) der LBF-Werte lag an den einzelnen Tagen zwischen 0,18 und 0,54 (nicht tragend) und 0,25 und 0,44 (tragend). Sowohl bei den tragenden als auch den nicht tragenden Färsen war ein biphasischer Blutflussanstieg in der A. uterina zu verzeichnen. Während der erste Anstieg ($p < 0,05$) der TAMV-Werte bei den tragenden Färsen bereits zwischen den Tagen 6 und 8 eintrat, war dieser bei den nicht tragenden Färsen erst zwischen den Tagen 6 und 13 zu verzeichnen. Die TAMV-Werte fielen ($p < 0,05$) danach in beiden Gruppen bis Tag 17 auf Minimalwerte ab, gefolgt von einem erneuten Anstieg ($p < 0,05$) zwischen den Tagen 17 und 20. Die TAMV-Werte der nicht tragenden Färsen waren an den Tagen 6, 10, 13 und 21 gegenüber denjenigen der tragenden Färsen erhöht ($p < 0,05$). Der VK der TAMV-Werte lag an den einzelnen Tagen zwischen 0,20 und 0,29 (nicht tragend) und 0,20 und 0,32 (tragend).

Die Ergebnisse zeigen einen Anstieg im lutealen und uterinen Blutfluss innerhalb von zwei Tagen nach dem ET nur bei den an Tag 25 als tragend diagnostizierten Färsen. Überraschenderweise zeigten diese Färsen unmittelbar vor dem Transfer sowie in der 2. Trächtigswoche eine geringere uterine Blutflussgeschwindigkeit als die nicht tragenden Färsen. Aufgrund der Variabilität der uterinen TAMV-Werte zwischen den einzelnen Färsen scheint anhand dieses Parameters jedoch keine vorausgehende Beurteilung eines Empfängertieres möglich. Entsprechendes gilt für die TAMV- und LBF-Werte bezüglich einer frühzeitigen Trächtigsdiagnose.

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion V

Endoskopische Gewinnung früher preimplantativer boviner Embryonen und In-Vivo - Kultur von IVM/IVF Embryonen im bovinen Oviduct durch transvaginale Endoskopie

Prof. Urban Besenfelder

Reproduktionszentrum - Wieselburg, Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich

(Vortrag)

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion V

Einfluss einer In-vivo-Kultur auf das mRNA-Expressionsmuster präimplantatorischer Rinderembryonen

K. Müller¹, D. Herrmann¹, S. Drallmeyer¹, K.-G. Hadeler¹, K. Korsawe¹, K. Brüning²,
H. Niemann¹ und C. Wrenzycki²

¹ *Institut für Nutztiergenetik (FLI), Forschungsbereich Biotechnologie, Mariensee*

² *Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für Rinder,
Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken, Hannover*

Die In-vitro-Produktionssysteme für bovine Embryonen haben in den letzten Jahren eine enorme Verbesserung erfahren. In vitro produzierte Embryonen weisen jedoch noch immer Unterschiede zu in vivo generierten auf. Neuere Studien zeigen, dass die Qualität der Embryonen durch eine (Zwischen-)Kultur im homologen Eileiter erheblich gesteigert werden kann. Ziel unserer Untersuchungen war es, die Qualität solcher in vivo kultivierter Embryonen auf molekularer Ebene zu analysieren.

Bovine Zygoten wurden nach In-vitro-Reifung und –Befruchtung denudiert und zufällig auf zwei Gruppen verteilt. Zygoten der Gruppe 1 wurden in SOF-Medium in vitro bis Tag 7 kultiviert, während die Zygoten der Gruppe 2 per transvaginaler Endoskopie in den Eileiter synchronisierter Empfängertiere übertragen wurden. An Tag 7 erfolgte die Rückgewinnung mittels kombinierter Eileiter- und Uteruspülung, ebenfalls per transvaginaler Endoskopie. Anschließend wurden die Embryonen morphologisch klassifiziert. Embryonen von superovulierten Spendertieren dienten als Kontrollen. Morulae und Blastozysten wurden von allen Gruppen bei -80°C bis zur mRNA-Analyse mittels RT-qPCR eingefroren. Die untersuchten Transkripte spielen eine wichtige Rolle bei der Glukoseaufnahme [solute carrier 2A member 3 and 8, SLC2A3 and SLC2A8, auch GLUT3, GLUT8 genannt], der DNA-Methylierung [DNA-Methyltransferase 1 and 3a (DNMT1, DNMT3a)] und der Histon-Methylierung [Histon-Methyltransferase (SUV39H1)].

Insgesamt wurden 40 Eileitertransfers durchgeführt, von denen 18 erfolgreich verliefen. Insgesamt wurden 640 Zygoten übertragen (30-50 pro Transfer). Die Wiederfindungsrate betrug 59,9% (381/640). Die Teilungsrate lag bei 80,6% (307/381) und die Entwicklungsrate zu Morulae und Blastozysten bei 19,4% (74/381).

In vivo kultivierte und in vivo gewonnene Embryonen wiesen ein ähnliches Transkriptionsmuster für die untersuchten Gene auf und unterschieden sich signifikant von dem in vitro produzierter Embryonen.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Qualität der generierten Embryonen maßgeblich durch die Kulturbedingungen beeinflusst wird.

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion VI

OPS Vitrifikation als Alternative zur Gefrierkonservierung von Embryonen am Modell Ziege

A.N. Al Yacoub, M. El-Gayar, M. Gauly und W. Holtz

Department für Nutztierwissenschaften, Albrecht-Thaer-Weg 3, 37075 Göttingen

Unter Vitrifikation versteht man ein Verfahren bei dem Flüssigkeiten unter Zusatz hoher Konzentrationen von Gefrierschutzmitteln durch ultraschnelle Kühlung auf -196 °C zu einem glasartigen Zustand ohne Eiskristall-Bildung erstarren. Zur Vitrifikation von Säugerembryonen (Maus, Rind) entwickelten Vajta et al. (1998) unter Verwendung dünn ausgezogener Pailletten das sogenannte „open pulled straw“ (OPS) Verfahren. In der vorliegenden Untersuchung wurden Blastocysten von Burenziegen vergleichend sowohl nach dem OPS Verfahren als auch auf konventionellem Wege tiefgefroren und anschließend auf synchronisierte Empfängerziegen übertragen (2 Embryonen/Empfänger). Von 25 Empfängern, die OPS vitrifizierte Blastocysten erhielten, lammten 22 (88%) mit einer durchschnittlichen Wurfgröße von 1.5; somit betrug die embryonale Überlebensrate 67 %. Von 22 Empfängern auf die konventionell eingefrorene Blastocysten transferiert wurden, lammten 10 (45 %) mit einer durchschnittlichen Wurfgröße von 1.8; die embryonale Überlebensrate belief sich auf 42 %. Die Überlegenheit der OPS Vitrifikation zur Gefrierkonservierung von Blastocysten ließ sich leider nicht auf Morulae und geschlüpfte Blastocysten erweitern. Die Embryonen der Ziege unterscheiden sich nicht maßgeblich von denen des Rindes. Deshalb ist davon auszugehen, dass das Vitrifikationsverfahren in Zukunft auch im Rinder-ET zunehmend Anwendung finden wird.

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion VI

Einfluss eines Vitrifikation- und eines kontrollierten Kryokonservierungsverfahrens auf die Qualität in vitro produzierter Rinderembryonen

H. Stinshoff¹, K. Brüning¹, A. Hanstedt¹, D. Müller¹, S. Wilkening-Kraas¹ und
C. Wrenzycki^{1,2}

¹ *Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*

² *Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover*

Die In-vitro-Produktion (IVP) boviner Embryonen hat in den letzten Jahren nicht zuletzt durch die Weiterentwicklung assoziierter Techniken, wie z.B. dem Ovum-Pick-Up (OPU), enorme Verbesserungen erfahren und wird bereits vielfach in der Praxis angewandt. Obwohl große Anstrengungen unternommen wurden, die Kultursysteme immer weiter zu verbessern, unterscheiden sich in vitro gewonnene Embryonen hinsichtlich der Morphologie, der Genexpressionsmuster, metabolischer Parameter und der Gefriertauglichkeit deutlich von in vivo gewonnenen Embryonen (Wrenzycki et al., 2005; Lonergan et al., 2006).

Von den zur Verfügung stehenden Methoden zur Kryokonservierung scheint die Vitrifikation besser geeignet zu sein, in vitro produzierte Embryonen einzufrieren, als die konventionellen langsamen Verfahren (Dobrinisky 2002; Seidel 2006).

Ziel der Untersuchungen ist es, den Einfluss des Einfrierens durch Vitrifikation oder konventioneller Kryokonservierung auf die Qualität in vitro produzierter Rinderembryonen auf molekularer Ebene darzustellen.

Bovine Blastozysten wurden nach einem Standardprotokoll für die IVP erstellt (Wrenzycki et al., 2001; SOF plus BSAaa). Die Blastozysten wurden entweder vitrifiziert (PBS mit Ethylenglycol und DMSO; VitriStore, Fa. Gynemed) oder langsam eingefroren (1,5 M Ethylenglycol; Freeze Control, Fa. Minitüb). Nach dem Auftauen wurden die Embryonen aus beiden Gruppen für 48h Stunden kultiviert. Nach 24 h und 48 h erfolgte die Beurteilung der Reexpansions- und Schlupfrate.

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion VI

| | Reexpansionsrate (24h) | Schlupfrate (48 h) |
|--|---------------------------|-----------------------|
| Vitrifizierte Embryonen (n=91) | 80,2% (73) | 59,3% (54) |
| Konventionell kryo- konservierte Embryonen (n=103) | 73,8% (76) | 55,3% (57) |

Diese Daten zeigen, dass mit beiden Methoden ähnliche Überlebensraten bei in vitro produzierten Embryonen nach dem Auftauen erzielt werden können.

Um potentielle Unterschiede bezüglich der Embryonenqualität bestimmen zu können, wurden die geschlüpften Embryonen für die RT-qPCR in silikonisierten Eppendorf-Cups bei -80 °C gelagert.

Anschließend erfolgte die Untersuchung der mRNA-Gehalte bezüglich der Expression folgender entwicklungsrelevanter Gentranskripte: HSP70, GLUT1, GLUT3, E-cad, ZO-1, DNMT 3a, IF τ , DcII. Nach der statistischen Auswertung ließen sich folgende signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen und einer Kontrollgruppe feststellen:

| | HSP70 | GLUT1 | ZO-1 | GLUT3 | DNMT3a | IF τ | DcII | E-cad |
|------------------|-------|-------|------|-------|--------|-----------|------|-------|
| Ctl vs. V | s | s | s | ns | ns | ns | s | ns |
| Ctl vs. K | s | s | s | s | s | s | ns | ns |
| V vs. K | ns | ns | ns | ns | ns | s | ns | ns |

Ctl = Kontrollgruppe

K = konventionell kryokonserviert

V = Vitrifiziert

s = significant ($p \leq 0,05$), ns = nicht signifikant

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl das Einfrieren selbst als auch die Art des Einfrierens einen Einfluss auf die mRNA-Expression entwicklungsrelevanter Gene hat.

Abschließend wird eine Lebend-Tot-Färbung an geschlüpften Embryonen beider Einfriergruppen und einer Kontrollgruppe durchgeführt werden.

*Die vorliegende Arbeit wurde unterstützt von der H.W. Schaumann Stiftung
und der Firma Gynemed, Lensahn.*

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion VI

Einfluss der Äquilibrierungsdauer auf die Vitalität von Bullensperma nach dem Auftauen

M. Jung¹, L. Rothe¹, M. Griga², C. Leiding², H. Nehring¹

¹ Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V.

² Besamungsverein Neustadt/Aisch e.V.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde untersucht, in welcher Weise sich eine unterschiedliche Äquilibrierungsdauer des Spermias auf die Vitalitätsparameter nach dem Auftauen auswirkt. Es wurden Ejakulate einer Besamungsstation, die eine Mindestmenge von 700 Pailletten erwarten ließen in diese Studie aufgenommen. Die Spermaaufbereitung erfolgte nach dem Standardverfahren der Station. Die Spermienzahl pro Paillette wurde auf 15 Millionen festgelegt.

Das gesamte verdünnte Sperma wurde in den Verdünnungsgläsern bei 4 °C äquilibriert. Nach 1, 2, 3, 4, 5, 24 und 28 Stunden wurden Anteile entnommen, konfektioniert und eingefroren. Die Pailletten wurden in einem Wasserbad bei 37° C für 11 Sekunden aufgetaut und anschließend analysiert.

Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgte anhand des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien im Resistenztestes, des Bewegungsverhaltens im computergestützten Motilitätsanalyseverfahren sowie der flowzytometrischen Erfassung des Akrosomen- und Membran-zustandes. Im Durchschnitt stiegen alle erfassten Motilitätsparameter von der Variante mit einer Stunde Äquilibrierungsdauer bis zur Variante mit 28 Stunden kontinuierlich an (Abbildung 1). Die mittlere Bahngeschwindigkeit VAP steigerte sich um 6,0 µm/s (p = 0,01) von 61,5 µm/s auf 67,5 µm/s bei der Verlängerung der Äquilibrierungsdauer von einer Stunde auf 24 Stunden.

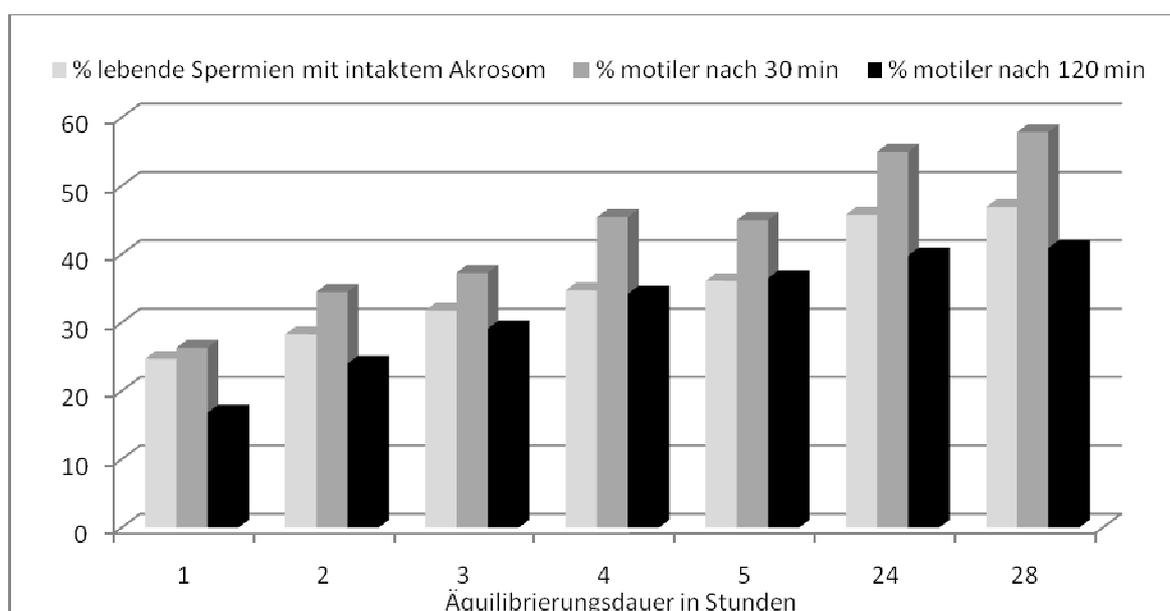


Abbildung 1: Einfluss verschiedener Äquilibrierungszeiten auf das Motilitätsverhalten nach dem Auftauen

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion VI

Bezüglich des Anteils lebender Spermien mit intaktem Akrosom, zeigte sich die gleiche Tendenz wie bei den Motilitätsparametern. Die Werte bewegten sich im Bereich von 24,7 % (Variante 1 Stunde Äquilibrationsdauer) bis 46,9 % (Variante 28 Stunden Äquilibrationsdauer).

Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen den immensen Einfluss der Äquilibrationsdauer auf die Qualität der aufgetauten Spermachargen.

Aus den vorliegenden Ergebnissen können folgende Schlüsse gezogen werden:

- Bei der Gefrierkonservierung von Bullensperma beeinflusst die Äquilibrationsdauer die Motilität der Spermien und die Intaktheit von Zell- und Akrosomenmembran lebender Spermien nach dem Auftauen. Die Werte steigen zwischen 1 und 28 Stunden Äquilibrationsdauer an.
- Eine Äquilibrationsdauer \leq zwei Stunden ist zu kurz, um optimale Auftauwerte zu erhalten.
- Im Bereich zwischen 3 bis 5 Stunden Äquilibrationsdauer gibt es leicht ansteigende Auftauwerte. Die übliche Verfahrensweise, die von einer Mindestäquilibrationsdauer von drei Stunden ausgeht, ist somit bestätigt.
- Mit einer Äquilibration zwischen 24 - 28 Stunden lassen sich die besten Auftauwerte erzielen.

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion VI

Auswirkungen einer Blauzungenvirus Typ 8 Infektion auf die Ejakulatqualität von Besamungsbullen

A Ligner¹, U Janowitz², K Rüdiger¹, H Cramer³, H Bollwein⁴, M Jung¹

¹*Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönnow e.V.*

²*Rinderunion West eG*

³*Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter e.V.*

⁴*Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*

Im Jahr 2006 wurde in Deutschland erstmals das Blauzungenvirus (Blue Tongue Virus, BTV) vom Serotyp 8 bei Wiederkäuern nachgewiesen, das von Stechmücken der Gattung *Culicoides* übertragen wird. Über die Auswirkungen auf das germinative Gewebe und damit die spermatologische Leistung bei Zucht- und Deckbullen in Folge der BTV-Infektion konnte bisher keine Aussage getroffen werden. Prinzipiell ist das BT-Virus für Schäden aller gut durchbluteten Gewebe bekannt (Endothelschäden), wodurch gerade das Hodengewebe als Ort der Schädigung nicht auszuschließen ist. Die vorliegende Studie sollte Aufschluss über die Auswirkungen einer BTV-8 Infektion auf die Spermaqualität von Besamungsbullen geben. Dabei wurde speziell die Spermaqualität über die verschiedenen Phasen des Infektionsgeschehens sowie die Entwicklung der Spermaqualität nach letztmaligem Virusgenomnachweis beurteilt.

Untersucht wurden 6 Wartebullen (1,5 bis 3,5 Jahre), die sich zwischen August und Oktober 2007 mit BTV-8 infiziert haben. Die Ejakulatgewinnung erfolgte im zweiwöchigen Rhythmus von Dezember 2007 bis September 2008. Insgesamt wurden pro Bulle 21 Ejakulate untersucht, von denen 2 Ejakulate aus der Präinfektionszeit stammten. Die Untersuchung des Blutes auf Virusgenom war von Oktober bis April bzw. Mai bei allen Bullen positiv (PCR+). Die Ejakulatdaten wurden auf Unterschiede zwischen der Zeit, in der Virusgenom nachweisbar war und der Zeit, in der kein Virusgenom mehr nachgewiesen wurde untersucht (PCR+ vs. PCR-). Bestimmt wurden die Spermienmotilität vor dem Einfrieren (MOT) und nach dem Auftauen (tMOT) mittels computergestützter Motilitätsanalyse (SpermVision[®]) sowie geschätzt im Thermoresistenztest über 180 Minuten (thMOT_{min}). Weiterhin wurde die Sperminemorphologie anhand einer Formaldehyd fixierten Probe im Phasenkontrastmikroskop bestimmt. Durchflusszytometrische Untersuchungen fanden zur Bestimmung des Akrosomenzustandes und der Plasmamembranintegrität (FITC-PNA/PI Färbung) sowie des DNA-Fragmentationsindex (Anteil chromatindefekter Spermien, SCSA[™]) statt. Im April 2008 wurde eine sonografische Untersuchung des Hodengewebes durchgeführt.

Das mittlere Ejakulatvolumen aller 126 Ejakulate lag bei 5,8 ml und die mittlere Ejakulatdichte bei $1,4 \times 10^9$ Spermien/ml. Diese Parameter waren in der Zeit des positiven Virusgenomnachweises nicht verändert ($p > 0,05$) im Vergleich zu der Zeit, in der kein Virusgenom nachgewiesen wurde.

Die Spermienmotilität änderte sich ($p < 0,01$) in Abhängigkeit vom PCR-Ergebnis (PCR-: MOT 78%, tMOT 57%, thMOT₃₀ 70% vs. PCR+: MOT 61%, tMOT 48%, thMOT₃₀ 58%). Die deutlichsten Veränderungen in der Spermienmorphologie waren am Spermenschwanz erkennbar. In der PCR positiven Zeit wiesen die Ejakulate deutlich erhöhte ($p < 0,01$) Anteile (Median) an Spermien mit gerollten Schwänze auf (PCR-: 11,5% vs. PCR+: 22%), dabei lag

36. AET-d Zusammenfassung der Vorträge Sektion VI

der Maximalwert in der Zeit des positiven Virusgenomnachweises bei 68%. Bei zwei Bullen war in den Ejakulaten (jeweils n=9) von Mai bis September 2008 trotz negativem Virusgenomnachweis weiterhin ein mittlerer Anteil an Spermien mit gekrümmten Schwänzen von 35% bzw. 28% feststellbar.

In der Sonografie des Hodengewebes konnten bei 3 Bullen fibrotische Herde in unterschiedlicher Größe und Anzahl als hyperechogene Bezirke dargestellt werden.

Die Infektion mit BTV-8 führt bei Besamungsbullen zu einer Depressionen der Spermaqualität. Besonders betroffen sind dabei die Motilität der Spermien im originären und kryokonservierten Ejakulat sowie die Spermienmorphologie. Hier ist der deutlich erhöhte Anteil an Spermien mit gekrümmten Schwänzen vorherrschend. Die spermatologischen Veränderungen sind vornehmlich in der Zeit des Virusgenomnachweises (PCR positiv) erkennbar. Bei 4 von 6 Bullen trat eine Normalisierung der Ejakulatsqualität ein, sodass von einer temporären Depression der Spermaqualität gesprochen werden kann. Bei zwei Bullen scheint die Qualitätsminderung persistent zu sein, da diese Bullen sechs Monate nach letztmaligem Virusgenomnachweis im Blut weiterhin hohe Anteile an Spermien mit gekrümmten Schwänzen aufwiesen. Die Ejakulate aller sechs Bullen zeigten eine Normalisierung der Spermienmotilität. Eine Aussage über den Zusammenhang der BTV-Infektion und dem Auftreten der fibrotischen Herde ist auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht möglich, da keine sonografischen Untersuchungen vor der Infektion stattgefunden haben. Studien anderer Autoren weisen jedoch darauf hin, dass es im Zuge einer Virusinfektion zur Ausbildung derartiger fibrotischer Herde im germinativen Hodengewebe kommen kann. Allgemein ist fraglich, ob die dargestellten Verschlechterungen der Spermaqualität spezifisch für die BTV-Infektion sind oder ob das allgemeine Infektionsgeschehen ursächlich verantwortlich ist. Es wird vermutet, dass das Ausmaß der spermatologischen Beeinträchtigung in Zusammenhang steht mit der aufgenommenen Virusmenge und der Intensität der Immunreaktion des einzelnen Tieres.

Das Projekt wurde gefördert durch die Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter e.V., Bonn