

Programm

13:00 **Begrüßung**
M. Gehring, und H. Müther
Marsberg, Alfeld

Sektion I: Moderation C. Wrenzycki und K. Roschlau

13:15 **Nuclear transfer in mice.**
P. Mombaerts
Frankfurt

14:15 **Somatischer Kerntransfer beim Schwein mit hA20-transgenen Donorzellen**
M. Oropeza, B. Petersen, E. Lemme, A. Lucas Hahn, B. Barg-Kues, A.L. Queisser, D. Hermann, P. Hassel, W. Kues und H. Niemann
Mariensee

14:30 **Trächtigkeitsraten und –Verlauf nach Transfer geklonter Rinderembryonen von nicht selektierten Spendertiere**
U. Küchenmeister, A. Küchenmeister, F. Rings, K. Schellander und M. Hölker
Schönow, Bonn

14:45 **Polarisationsmikroskopie der Zona Pellucida als prognostisches Hilfsmittel zur Bestimmung des Entwicklungspotentials von Eizellen und Zygoten.**
A. Mohammadi-Sangcheshmeh, A. Naumann, , M. Koester, T. Schimming, F. Rings N. Ghanem, D. Tesfaye, M. Montag, K. Schellander und M. Hölker
Bonn

15:00 **Kaffepause (Vortrag Firma Pfizer, Industrieausstellung)**

Sektion II: Moderation S. Meinecke-Tillmann und H. Tenhumberg

16:00 **Vergleichende Darstellung der Proteine DNMT 1 und DNMT3a in fruehen bovinen Embryonalstadien aus In vivo- und In vitro-Produktion mittels Immunzytochemie**
S. Drallmeyer, K. Mueller, K.-G. Haderl, K. Korsawe, H. Niemann und C. Wrenzycki
Mariensee, Hannover

16:15 **Embryo-Biopsie-Transcriptomics: Ein potentielles Hilfsmittel zur Identifikation von Transkripten welche direkt korrelieren mit der Fähigkeit des Embryos nach Transfer eine Trächtigkeit zu etablieren.**
D. Tesfaye, KG. Hadler, N. Gahnem, F. Rings, K. Schellander und M. Hoelker
Bonn, Mariensee

16:30 **Beurteilung der Entwicklungskompetenz boviner Oozyten aus Follikeln mit unterschiedlicher Durchblutung der Follikelwand im Rahmen eines OPU&IVP-Programms**
A. Hanstedt, K. Höffmann, A. Hönnens und C. Wrenzycki
Hannover

16:45 **Eizellqualitaet in differenten Follikelpopulationen der Stute**
A. Vernunft, H. Alm, W. Kanitz und H. Torner
Dummerstorf

Sektion III: Moderation D. Tesfaye und J. Detterer

17:00 **Strategien zur Erhaltung genetischer Ressourcen bei Vögeln - Ergebnisse zur Kryokonservierung von Hahnensperma**
C. Ehling, L. Schindler, U. Taylor und D. Rath
Mariensee

17:15 **Interaktionen porziner Spermatozoen im Uterus**
U. Taylor, H. Zerbe, H.-M. Seyfert, H.-J. Schuberth und D. Rath
Mariensee, München, Dummerstorf, Hannover

17:30 **Auswirkungen der Blauzunge-Infektion auf die Spermaqualität von Besamungsbullen**
M. Jung
Schönow

17:45 **Die Geschichte des Embryo Transfers in Deutschland; Eine persönliche Sicht..**
S. Meinecke Tillmann
Hannover

18:05 **Abendveranstaltung**

Sektion IV: Moderation E. Hasenpusch und W. Kanitz

- 8:30 **Zum Einsatz von homöopathischen Präparaten im Rahmen des Embryotransfer beim Rind**
H. Enbergs
Bonn
- 8:45 **Embryotransfer und traditionelle chinesische Medizin; geht das?**
B. Wollgarten
Greifenberg
- 9:00 **Ultraschall- Einsatz in der Stoffwechselüberwachung**
H. Hauschulte
Soest
- 9:15 **Erste Erfahrungen mit dem Einsatz von gesextem Sperma im Gebiet des VOST und der WEU**
J. Detterer und H. Melbaum
Südbrookmerland, Haselünne
- 9:30 **Genetische Marker und deren Einfluß auf Zuchtprogramme der Zukunft.**
M. Hansen und S. König
Göttingen
- 10:30 **Kaffepause / Industrieausstellung**

Sektion V: Moderation B. Meinecke und H. Melbaum

- 11:15 **Von der Eizelle zum Embryo und von der Trächtigkeit zum Kalb. Wo stehen wir im internationalen Vergleich ?**
K. Roschlau, A. Kuwer, C. Kuhnert, D. Roschlau, U. Michaelis, J. Reinecke, P. Poppe, G. Kuwer
Verden
- 11:30 **Einfluss eines Vitrifications- und eines kontrollierten Kryokonservierungsverfahrens auf die Qualität in vitro produzierter Rinderembryonen**
H. Stinshoff, K. Höffmann, A. Hanstedt, D. Müller und C. Wrenzycki
Hannover
-

- 11:45 **Einfluss der Fütterung unterschiedlicher Konzentrationen an konjugierten Linolsäuren (CLA) auf die Entwicklungskompetenz der Eizellen laktierender Milchkühe**
K. Höffmann, A. Hanstedt, H. Stinshoff, E. Onnen-Lübben, S. Wilkening-Krass, H. Bollwein und C. Wrenzycki
Hannover
- 12:00 **Bemerkungen zum Follikelwachstum in sog. 2- und 3-Wellenzyklen beim Milchvieh**
J. Schneepli
Summaprada
- 12:15 **Embryogewinnungsrate nach Superovulation mit equinem Hypophysenextrakt (eFSH®) bei der Stute**
M. Köllmann, J. Probst*, C. Baackmann, J. Klewitz, E. Squires¹, H. Sieme
Hannover
- 12:30 **Embryotransfer beim Pferd- Ein Erfahrungsbericht**
P.-D. Henningsen
Glücksburg
- 12:45 **Verbesserung der Embryonengewinnungsraten durch modifizierte Gewinnungsverfahren bei Holstein Kühen an einer kommerziellen Embryotransferstation**
T. Wolgast, J. Detterer, W. Reuss, T. Schmidt, S. Meinecke-Tillmann
Südbrookmerland, Hannover
- 13:00 **Schlusswort, Einladung zum nächsten AET-D-Treffen**
M. Gehring, H. Tenhumberg
Marsberg, Landshut
-

Zusammenfassungen der Vorträge

Nuclear transfer in mice.

P. Mombaerts,

Max Planck Institute for Biophysics, Frankfurt

(ohne Abstract)

Somatischer Kerntransfer beim Schwein mit hA20-transgenen Donorzellen

M. Oropeza, B. Petersen, E. Lemme, A. Lucas-Hahn, B. Barg-Kues, A.L. Queisser, D. Herrmann, P. Hassel, W. Kues und H. Niemann

Forschungsbereich Biotechnologie, Institut für Nutztiergenetik (FLI), Mariensee
31535 Neustadt

Der somatische Kerntransfer ist ein sehr wichtiges Werkzeug für das Erstellen von transgenen Schweinen. Die verschiedenen Arbeitsschritte des somatischen Kerntransfers (Enukleation, Kerntransfer, Fusion, Aktivierung und Embryotransfer von Kerntransferkomplexen/geklonten Embryonen) sind im FLI, Mariensee bereits etabliert. Es wird mit genetisch modifizierten Fibroblasten als Spenderzellen, und in vitro-gereifte Oozyten von Schlachthofovarien als Empfängerzellen gearbeitet. Für das Generieren von hA20-transgenen Schweinen wurden hA20-transgene porcine fetale Fibroblasten (PFF) als Donorzellen verwendet. Das humane A20-Gen weist eine doppelte zytoprotektive Wirkung auf, einerseits reguliert es die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B nach Zytokinstimulation runter und moduliert dadurch die Aktivierung von Endothelzellen und zweitens verhindert es die Apoptose von Endothelzellen (Ferran C., 2006). Dies sind Eigenschaften, die beim Generieren von hA20-transgenen Schweineorganen für die Xenotransplantation von Bedeutung sind.

Vier Transfektionen mit dem modifizierten Expressionsvektor pCAGGSEhA20-IRESNEO wurden durchgeführt und 82 überlebende Zellklone wurden nach Selektion (G418) analysiert. Achtzig Zellklone wurden nach PCR auf Integration von hA20 und IRESNEO als positiv eingestuft. Der Zellklon 1E1 wurde anhand PCR- und RT-PCR-Ergebnisse als Donorzellklon ausgewählt und 2 synchronisierte Empfängersauen erhielten durch Embryotransfer jeweils 69 und 100 Kerntransferkomplexe. Beide Sauen waren am Tag 21 trächtig. Eine Trächtigkeit wurde am Tag 25 abgebrochen, um die Feten zu analysieren und die zweite Sau durfte austragen. Sämtliche Nachkommen waren A20-negativ, was auf eine fehlerhafte Selektion der Donorzellen zurückzuführen war. Es wurden ausgewählte Donorzellklone ein zweites Mal selektiert und daraus resultierten transgene Nachkommen.

Nach 8 Klonterminen mit 5 Donorzellklonen waren 12 von 16 Empfängersauen (75%) tragend. Es wurden insgesamt 1428 rekonstruierte Embryonen übertragen und daraus resultierten 16 Feten und 45 Ferkel. Die Integration des Transgens wurde mittels PCR und Southern Blot überprüft. Sechs von 16 Feten (37,5%) und 15 von 45 Ferkeln (33,3%) waren transgen. Zur Zeit werden die Tiere auf Expression des Transgens in verschiedenen inneren Organen untersucht.

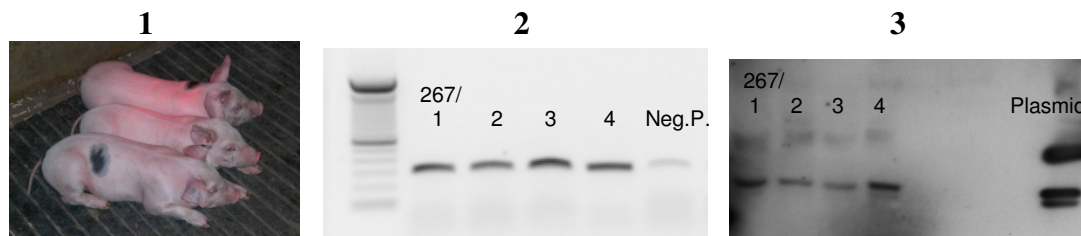


Bild 1: Die ersten hA20-transgenen Ferkel geboren am 02.01.08 (1 Ferkel ist innerhalb der ersten 24 Stunden gestorben).

Bild 2: PCR mit hA20-spezifischen Primern zeigt Integration des Transgens in allen 4 Ferkeln.

Bild 3: Der Southern Blot bestätigt die PCR-Ergebnisse. Alle 4 Ferkel sind hA20-transgen.

Literatur: Ferran C (2006) Protective Genes in the Vessel Wall: Modulators of Graft Survival and Function. Transplantation 82, 36-40

Trächtigkeitsraten und Trächtigkeitsverlauf nach Transfer geklonter Embryonen nicht selektierter Spendertiere unter standardisierten Bedingungen.

U. Küchenmeister¹, A. Küchenmeister¹, F. Rings², K. Schellander², M. Hölker²

¹: Tierarztpraxis Uwe Küchenmeister, Bernauer Chaussee 11, 16321 Schönow

²: Forschungsbereich Tierzucht, Institut für Tierwissenschaften, Universität Bonn

Über die Erfolgreiche Erstellung geklonter Rinder ist bereits zuvor berichtet worden. Präsentierte Entwicklungs- und Trächtigkeitsraten basieren bei wissenschaftlichen Publikationen jedoch zumeist auf selektierte Zelllinien deren Tauglichkeit für den Kerntransfer durch vorherige Experimente überprüft wurde und die routinemäßig hohe bis sehr hohe In Vitro Entwicklungsraten der geklonten Embryonen unterstützen. Darüber hinaus ist die Zahl der übertragenen Embryonen in der Regel zu klein um zuverlässige Entwicklungsraten abzulesen oder aber die Empfängertiere sind hinsichtlich Rasse, Alter und Gewicht stark verschieden, was eine wissenschaftliche Auswertung weiter erschwert. Ziel der vorliegenden Arbeit was es deshalb die Effizienz beim Klonen von Rindern, deren Zelllinien nicht wir auswählten, unter Nutzung einer standardisierten Empfängertierherde zu ermitteln. Zur Erstellung der geklonten Rinderembryonen kamen 4 Zelllinien (adulte Fibroblasten) zum Einsatz. Rindereizellen wurden für 21h maturiert sodann per Mikromanipulator enukleiert. Die Spenderzellen (Serumreduktion, 0,5% FCS für 5 Tage) wurden in den perivitellinen Spalt verbracht und die Fusion von „Entkernter Eizelle“ und Spenderzelle erfolge im elektrischen Feld (24V DC, 45 µsec). Nach anschließender chemischer Aktivierung (Ionomycin/6-DMAP) erfolgte die In Vitro Kultur in CR1aa Medium für 7 Tage bei 38,8°C, 5% CO₂ und 20% O₂. Embryonen die an Tag 7 das Blastozystenstadium erreicht hatten wurden im Eppendorfcup (CR1aa Medium bei 5% CO₂ equilibriert, kein Luftüberstand) bei 37°C für 5-6 Stunden transportiert und sodann nach Überführung in Emcare Holding Medium in die vorbereiteten Empfängertiere ipsilateral einzeln übertragen. Bei den Empfängertieren handelte es sich um 15 Monate alte Holsteinrinder. Diese waren 10 Tage vor Transfer einmalig mit 2ml PGF (Estrumate) vorsynchronisiert worden und wurden am Transfertag auf Vorhandensein eines „guten“ Gelbkörpers überprüft. Die Trächtigkeitsuntersuchungen erfolgten im Monatsrhythmus.

Insgesamt wurden im Rahmen der Studie 4 Bullen eingesetzt. Von 802 erstellten Kerntransferkomplexen teilten sich 631 (78,8%) und 139 (17,3%) entwickelten sich bis Tag 7 zur Blastozyste (Tabelle 1). Nach Transfer von 61 Klonembryonen etablierten 15 Empfängertiere eine Trächtigkeit an Tag 30 (24,6%). Von den Übertragenen Klonembryonen hatten 11 Empfängertiere Tag 180 (16,6%) und von diesen wiederum haben 9 Tiere Tag 210 (20,9%) erreicht (Tabelle 2). Der größte Anteil der verlorenen Trächtigkeiten erfolgte im Zeitraum zwischen dem 30. und 60. Trächtigkeitstag. Ein Empfängertier verkalbte zudem an Trächtigkeitstag 176. Insgesamt gingen jedoch bisher erstaunlich wenige fortgeschrittene Trächtigkeiten verloren. Während die In Vitro Entwicklungsraten sich für die 4 eingesetzten Bullen nicht unterscheiden scheint es jedoch in Hinblick auf die Trächtigkeitsraten deutliche Unterschiede zwischen Bulle A und Bulle B zu geben. Einige Trägartiere haben zwischenzeitlich den 240. Trächtigkeitstag erreicht und insbesondere der Zustand der Kälber nach Geburt wird von besonderem Interesse sein.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Klonierungsexperimenten unter Nutzung nicht selektierter Zelllinien.

Tabelle 1: In vitro Entwicklung von Kerntransferembryonen in Abhängigkeit zur eingesetzten Zelllinie

| Zelllinie | rekonstruierte Kerntransferkomplexe | 2- Zeller | D7- Blastozysten |
|--------------|--|--------------------|---------------------|
| Bulle A | 271 | 215 (79,3%) | 48 (17,7%) |
| Bulle B | 155 | 121 (78,0%) | 28 (18,0%) |
| Bulle C | 177 | 134 (75,7%) | 27 (15,2%) |
| Bulle D | 199 | 161 (80,0%) | 36 (18,1%) |
| total | 802 | 631 (78,7%) | 139 (17,3%) |

Tabelle 2: Etablierung und Verlauf von Trächtigkeiten nach Transfer von NT-Embryonen in Abhängigkeit zur eingesetzten Zelllinie

| Zelllinie | ET's | bisher erreichtes Trächtigkeitsstadium | | | |
|----------------------|-----------|--|-------------------|-------------------|------------------|
| | | ~D30 | ~D60 | ~D180 | ~D210 |
| Bulle A | 22 | 4 | 3 | 2* | 2 |
| Bulle A | 18 | 2 | 2 | 2 | |
| Total Bulle A | 40 | 6 | 5 | 4 | 2 |
| Bulle B | 21 | 9 | 7 | 7 | 7 |
| total | 61 | 15 (24,6%) | 12 (19,7%) | 11 (16,6%) | 9 (20,9%) |

* Trächtigkeit verloren an Tag 176

ZONA PELLUCIDA BIREFRINGENCE AS A PROGNOSTIC TOOL FOR DEVELOPMENTAL POTENTIAL OF BOVINE OOCYTES AND ZYGOTES: A STUDY USING POLSCOPE

Mohammadi-Sangcheshmeh A.¹, Naumann A.¹, Rings F.¹, Koester M.², Schimming T.², Ghanem N.¹, Phatsara C.¹, Tholen E.¹, Tesfaye D.¹, Montag M.², Schellander K.¹, Hölker M.¹

¹*Institute of Animal Science, Animal Breeding and Husbandry Group, University of Bonn, Bonn, Germany*

²*Department of Gynecological Endocrinology and Reproduction Medicine, University of Bonn, Bonn, Germany*

The identification of reliable non-invasive methods for assessment of oocyte and zygote developmental potential is one of the top priorities in the field of assisted reproduction. Brilliant cresyl blue (BCB) staining has been proved to be one of the most efficient non-invasive tools for oocyte quality assessment in different animal species. We have previously demonstrated that molecular and subcellular characteristics of bovine oocytes selected according to this test were extremely different. Interestingly, BCB+ oocytes shown over expression of ZP3 transcript compared to BCB- counterparts. Here, we would like to find out if oocyte quality is also reflected in zona pellucida architecture when assessing based on G6PDH activity and whether zona pellucida characteristics using the Polscope have a positive predictive value for the selection of oocytes and zygotes with better developmental potential.

Cumulus-oocyte complexes (COCs) were recovered from slaughterhouse ovaries by aspiration. In the first experiment, COCs were first incubated with 26 µM BCB stain for 90 min. Treated oocytes were then divided into BCB+ (coloured cytoplasm, low G6PDH activity) and BCB- (colourless cytoplasm, increased G6PDH activity) based on their ability to metabolize the stain. After denudation of cumulus cells, value for the birefringence peak (PV-Mean), the birefringence peak combined with the surface of the birefringence (CV-Mean) and the thickness of zona pellucida (WG-Mean) for oocytes of each group were analysed using polarized light microscopy and OCTAX polar AIDE-Software. In the second experiment, to reconfirm the usefulness of BCB test, oocytes were allocated into two groups: control and BCB treated (i.e., BCB+ and BCB-). Following IVM of the previously mentioned groups, all oocytes were fertilized in vitro and cultured till day 8. In the third and fourth experiments, MII oocytes were denuded and activated parthenogenetically or fertilized before denudation. Subsequently, birefringency of MII oocytes (directly after parthenogenetic activation) and zygotes (24h after start of IVF) were measured in the same way as described in the first experiment.

There was a clear differences ($P < 0.05$) for PV-Mean (41.364 vs. 45.719), CV-Mean (21.156 vs. 24.125) and WG-Mean (0.524 vs. 0.538) between BCB+ and BCB- oocytes. The cleavage rate was significantly higher ($P < 0.05$) for control (73.4%) and BCB+ oocytes (74.1%) than for BCB- group (65.6%). In addition, BCB+ oocytes yielded a significantly

higher blastocyst rate (Table1) than control or BCB– oocytes (29.9 vs. 23.0% and 13.2, respectively; $P<0.05$). Measuring the birefringence of parthenogenetically activated MII oocytes did not show any differences between those which cleaved within 48h and non cleaved ones. However, significant differences ($P<0.05$) in terms of PV-Mean (41.4 vs. 43.3) and CV-Mean (21.3 vs. 22.6) were observed at MII stage between oocytes which subsequently reached the blastocyst stage at day 7 and those which did not. Additionally, we found a significantly lower values of PV-Mean (47.1 vs. 51.5) and CV-Mean (24.7 vs. 27.1) for zygotes that cleaved within 48h compared to zygotes that did not cleave ($P<0.05$). Also PV-Mean (45.5 vs. 47.9) and CV-Mean (24.3 vs. 25.4) values for the zygotes which developed to the blastocyst stage at day 7 was significantly lower ($P<0.01$) in comparison with zygotes which did not developed to that developmental stage (Table2).

In conclusion, we successfully established an efficient non-invasive technique to predict the developmental competence of bovine MII oocytes and zygotes based on values for PV-Mean and CV-Mean which showed correlation with higher developmental competence. This may offer a great benefit for human assisted reproduction technology (ART) and identification of favourable MII oocytes will has potential to increase the blastocyst development rate after bovine somatic cell nuclear transfer.

Table1. Effect of selection for G6PDH activity via brilliant cresyl blue staining on embryonic development of in vitro matured and fertilized bovine oocytes (n = 1221).

| Group | No. COCs | Cleavage (%) | Blastocyst (%) |
|---------|----------|--------------------------|--------------------------|
| Control | 197 | 73.4 ± 2.30 ^a | 23.0 ± 3.94 ^a |
| BCB+ | 516 | 74.1 ± 3.23 ^a | 29.9 ± 3.83 ^b |
| BCB– | 508 | 65.6 ± 6.00 ^b | 13.2 ± 4.84 ^c |

Within columns, values with different letters (a, b, c) differ significantly ($P<0.05$).

Table2. Influence of different PV-Mean and CV-Mean values for zygotes on embryonic development at day7 (n = 415).

| Group | PV-Mean | CV-Mean |
|---------------|-------------------|-------------------|
| Blastocyst | 45.5 ^a | 24.3 ^a |
| No Blastocyst | 47.9 ^b | 25.4 ^b |

Within columns, values with different letters (a, b) differ significantly ($P<0.01$).

**Vergleichende Darstellung der Proteine DNMT1 und DNMT3a
in frühen bovinen Embryonalstadien
aus In vivo- und In vitro-Produktion mittels Immunzytochemie**

S. Drallmeyer¹, K. Müller¹, K.-G. Hadelers¹, K. Korsawe¹, H. Niemann¹
und C. Wrenzycki²

¹ Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Institut für Nutztiergenetik, Forschungsbereich
Biotechnologie, Mariensee, 31535 Neustadt

² Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für Rinder, Reproduktionsmedizinische
Einheit der Kliniken, 30173 Hannover

Einleitung:

Die DNA-Methylierung ist neben den Histonmodifikationen ein wichtiger epigenetischer Mechanismus in der frühen Embryonalentwicklung und spielt eine entscheidende Rolle bei der Transkriptionsregulation. Bei der Methylierung übertragen DNA-Methyltransferasen (DNMTs) eine Methylgruppe vom S-Adenosyl-L-Methionin auf die 5'-Position des Cytosinrings in CpG-Dinukleotiden. Dabei dient die DNMT1 überwiegend der Erhaltung der Methylierung bei der Replikation, während die DNMT3a/DNMT3b als De-novo-Methyltransferasen fungieren. Durch die Methylierung wird die Transkription in den meisten Fällen gehemmt. Daher ist für eine korrekte Transkriptionsregulation in der frühen Embryonalentwicklung das korrekte Methylierungsmuster der DNA von entscheidender Bedeutung. Beim Rind konnten für die DNMT1 und DNMT3a signifikante Unterschiede des mRNA-Gehaltes zwischen in vivo und in vitro produzierten präimplantatorischen Embryonen nachgewiesen werden (Höffmann et al. 2006, *Reprod., Fert. and Dev.* 231-232). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der In vitro-Produktion auf den Gehalt und die Lokalisation der Proteine DNMT1 und DNMT3a in frühen präimplantatorischen Rinderembryonen mittels Immunzytochemie und konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie untersucht.

Material und Methoden:

Embryonen wurden in vitro aus Schlachthofovarien nach IVP-Standardprotokollen erstellt. Für die Gewinnung der In vivo-Embryonen wurden 50 Färsen synchronisiert, nach Punktion des dominanten Follikels mittels Pluset® superovuliert und anschließend dreimal im Abstand von 12 Stunden besamt. Die Gewinnung der Zygoten – 16-Zell-Embryonen erfolgte mittels transvaginal endoskopisch durchgeführter Eileiterspülung (Besenfelder et al. 2001 *Theriogenology* 55, 837-845). Morulae und Blastozysten wurden durch eine konventionelle Uterusspülung gewonnen. Für die immunzytochemische Färbung wurden die Embryonen nach einer Vorbehandlung mit 3,7%igem PFA und 1%igem Triton X-100 zunächst in den primären Antikörpern anti-DNMT1 (1:50) bzw. anti-DNMT3a (1:25) und anschließend im fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper (Alexa Fluor® 647) inkubiert. Abschließend wurde eine Zellkernfärbung mit SYTOX® green durchgeführt. Die Darstellung der Proteine erfolgte an einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (LSM 510, Zeiss). Die Fluoreszenz-Intensität der Embryonen wurde mit dem ImageJ-Programm von JAVA gemessen. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA über die SigmaStat 2.0 Software (Jandel Scientific, San Rafael, CA).

Ergebnisse:

1) Spülungen:

Für die Gewinnung der Zygoten – 16-Zell-Embryonen wurden 50 Spülungen bei insgesamt 45 Tieren durchgeführt. Dabei konnten 419 Eizellen/Embryonen gewonnen werden, wovon 301 (72%) intakte Embryonen darstellten. Die Wiederfindungsrate lag bei 68%. Bei der reinen Uterusspülung wurden 10 Spülungen bei 5 Tieren durchgeführt. Dabei konnten 75 Stadien erspült werden, wovon 47 intakte, transfertaugliche Embryonen waren. Die Wiederfindungsrate lag hier bei 76%.

2) Proteinlokalisierung:

Die Proteine DNMT1 und DNMT3a konnten in allen Embryonen im Zytoplasma dargestellt werden. Abhängig vom Entwicklungsstadium und der Herkunft ist eine Translokation in den Zellkern zu beobachten (Tabelle 1).

Tabelle 1: Intensität der Kernfärbung im Vergleich zur Färbung des Zytoplasmas

| | Zygote | 2-Zell-Embryo | 4-Zell-Embryo | 8-Zell-Embryo | 10-16-Zell-Embryo | Morula | Blastozyste (ICM/TE) |
|-----------------|---------|---------------|---------------|---------------|-------------------|---------|----------------------|
| DNMT1: | | | | | | | |
| <u>In vitro</u> | o | o bis (-) | o bis - | o bis + | o bis + | o bis + | o/o bis - |
| <u>In vivo</u> | o bis - | o | o | o bis (+) | + bis o | + bis o | o/- |
| DNMT3a: | | | | | | | |
| <u>In vitro</u> | o bis - | o | o | o bis (-) | o bis - | o bis - | -/- |
| <u>In vivo</u> | o bis - | o bis (-) | o | o | + bis o | o | -/- |

o : Intensität der Kernfärbung identisch mit Färbung des Zytoplasmas

- : Intensität der Kernfärbung schwächer als die des Zytoplasmas

+ : Intensität der Kernfärbung deutlich stärker als die des Zytoplasmas

(-), (+): nur ein Embryo einer Gruppe zeigte dieses Merkmal

3) Fluoreszenz-Intensität:

Sowohl bei der DNMT1 als auch bei der DNMT3a können signifikante ($P \leq 0.05$) Unterschiede zwischen in vivo und in vitro produzierten Embryonen festgestellt werden.

So war die Fluoreszenz-Intensität bei der DNMT1 im 4-Zell-, im 10-16-Zell- und bei Morulae und Blastozysten bei den In vivo-Embryonen signifikant höher als bei den IVP-Embryonen.

Bei der DNMT3a zeigen die In vitro-Embryonen im 2-Zell-Stadium eine signifikant stärkere Fluoreszenz, während im 4-Zell-Stadium und bei den Blastozysten die Intensität bei der In vivo-Gruppe signifikant stärker war.

Schlussfolgerung:

Die signifikanten Unterschiede des Proteingehaltes der DNMT1 und DNMT3a zwischen in vivo und in vitro produzierten Embryonen sowie Abweichungen der Proteinlokalisierung im Zellkern deuten darauf hin, dass die IVP die Erhaltungs- und die De novo-Methylierung vor und nach der Aktivierung des embryonalen Genoms beeinflusst.

Embryo-Biopsie-Transcriptomics: Ein potentielles Hilfsmittel zur Identifikation von Transkripten welche direkt korrelieren mit der Fähigkeit des Embryos nach Transfer eine Trächtigkeit zu etablieren.

Tesfaye D, Hadler KG, Ghanem N, Rings F, Schellander K, Hölker M

*Forschungsbereich Tierzucht, Institute für Tierwissenschaften, Universität Bonn, Bonn
Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Löffler Institut, Mariensee, Neustadt*

Es ist bekannt, dass sich Blastozysten die aus IVP stammen in vielerlei Hinsicht von denen aus Vivo unterscheiden. Dies betrifft die Fähigkeit eine Trächtigkeit zu etablieren, das globale Genexpressionsmuster sowie andere metabolische Parameter. Trotz der Tatsache, dass ständig neue unterschiedliche Genexpressionen, die mit Entwicklungspotenzen von Embryonen korrelieren, entdeckt werden, ist bisher keine direkte Verknüpfung zwischen Genexpression und individuellem Entwicklungspotential erstellt worden. Daher braucht es eine gut etablierte Biopsie-Technik um Zellen von Embryonen vor dem Transfer zu gewinnen, ohne dass dies letale Effekte auf den Embryo hat. Daher war das Hauptziel dieser Studie die Analyse der Genexpression von Biopsien aus in vivo und in vitro erstellten Embryonen in Relation zur Entwicklung des Gegen-Split-Embryonen nach Transfer auf synchronisierte Empfängertiere. Unter Nutzung eines bovinene cDNA Array chips war somit die Identifikation von Kandidatengen die direkt mit der Entwicklungsfähigkeit des Embryonen verknüpft sind da Ziel. Dazu wurden intakte Blastozysten aus vivo und vitro gesplittet (30-40% vs. 60-70%). Der 60-70% Splitembryo wurde nachdem die Reexpansion abgewartet wurde sodann auf synchronisierte Empfängertiere übertragen. Auf der Basis des Trächtigkeitsverlaufs wurden die kleineren Split-Hälften von vivo und vitro Embryonen in 3 Gruppen aufgeteilt: G1 waren Embryonen die zu keiner Trächtigkeit führten, G2 waren Trächtigkeiten die resorbiert wurden und G3 waren Trächtigkeiten die zur Geburt eines Kalbes führten.

Die Array Analyse identifizierte 50 unterschiedlich exprimierte Gene bei vivo Blastozysten zwischen *nicht trächtig* vs. *geborenem Kalb* und 52 bei *Resorption* vs. *geborenem Kalb*. Ähnlich wurden bei vitro Blastozysten 52 unterschiedlich exprimierte Gene zwischen *nicht Trächtig* vs. *geborenem Kalb* und 58 Transkripte beim Vergleich zwischen *Resorption* und *geborenem Kalb* identifiziert. Spezielle Gen-Klassen die bei vitro und vivo Embryonen ähnlich exprimiert waren endeten mit dem selbem Trächtigkeitsergebnis. Zum Beispiel waren beide Arten von Blastozysten für die die Trächtigkeit nach Transfer ausblieb heraufreguliert für Gene wie calcium binding transcript (S100A10), ribosomal proteins, elongation factor alfa 1 (EEF1A1), mitochondrion transcript (FL405) und tumor necrosis factor (TNFa).

Blastozysten aus vivo und vitro die zur erfolgreichen Etablierung der Trächtigkeit und späteren Geburt eines Kalbes führten waren stark angereichert mit cytokeratin A (KRT8), ribosomal phosphoprotein (RPLPO), prostaglandin synthase-2 (COX-2) und bone morphogenetic protein (BMP15).

Bemerkenswerte Unterschiede wurden jedoch entdeckt zwischen vivo und vitro Embryonen die zur Resorption führten: Blastozysten aus vivo die zur Resorption führten waren hoch angereichert mit solchen Transkripten die ebenfalls hoch angereichert waren bei vitro Embryonen die zu keiner Trächtigkeit führten.

Zusammenfassend beweisen diese Ergebnisse das Embryonen aus vivo und vitro, trotz der Ähnlichkeit in den Trächtigkeitsverläufen, sehr ähnlich oder aber sehr verschieden hinsichtlich ihrer Genexpression sind.

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

A. Hanstedt¹, K. Höffmann¹, Ä. Honnens¹ und C. Wrenzycki^{1,2}

¹Klinik für Rinder, ²Reproduktionsmedizinische 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 stellt in der Rinderproduktion eine Alternative zur konventionellen Superovulation dar. Ein limitierender Faktor bei der Produktion transfertauglicher Embryonen ist die Qualität der verwendeten Oozyten. Farbdopplersonographische Blutflussmessungen an individuellen Follikeln könnten einen Hinweis auf das intrafollikuläre Milieu geben und dazu eingesetzt werden, Vorhersagen über die Entwicklungsfähigkeit der dazugehörigen Oozyte zu machen.

Ziel unserer Untersuchungen ist es, festzustellen, ob Unterschiede im Durchblutungsstatus der Follikelwand eine Aussage über die Entwicklungskompetenz der Oozyten zulassen.

In dieser Studie findet ein- oder zweimal wöchentlich eine OPU-Sitzung mit sechs Färsen und laktierenden Kühen des Lehr- und Forschungsguts der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover statt. Bei der Punktion wird die Anzahl, die 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 (KOK) werden bei IVP-Tauglichkeit innerhalb von 5 Stunden der In vitro-Reifung zugeführt. Anschließend findet eine In vitro-Fertilisation und eine In vitro-Kultivierung nach Standardprotokollen statt.

Eine Beurteilung der Embryonen bezüglich der Teilungsrate und der Entwicklungsrate erfolgt an Tag 7 und Tag 8.

Aus 26 OPU-Sitzungen mit folgender IVP ergaben sich folgende Ergebnisse:

| Durchschnittswerte | Punktion im 3/4-Tages-Intervall | | | Punktion im 7-Tages-Intervall | | |
|----------------------|---------------------------------|-------------------|--------|-------------------------------|-------------------|--------|
| | durchblutet | nicht durchblutet | gesamt | durchblutet | nicht durchblutet | gesamt |
| Punktierte Follikel | 213 | 245 | 458 | 129 | 140 | 269 |
| Gewonnene KOK | 72 | 102 | 174 | 51 | 83 | 134 |
| Anzahl KOKs für IVP | 63 | 81 | 144 | 46 | 66 | 112 |
| Teilungsrate (%) | 54,0 | 55,6 | 54,9 | 54,3 | 51,5 | 52,7 |
| Entwicklungsrate (%) | 25,4 ^a | 22,2 ^a | 23,6 | 23,9 ^a | 15,2 ^b | 18,8 |

a:b p ≤ 0,05

Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass bei einem 7-Tages-Intervall der OPU-Sitzungen die Durchblutung der Follikelwand ein geeigneter Parameter zu sein scheint, Oozyten mit einer erhöhten Entwicklungskompetenz zu selektieren. Im weiteren Verlauf der Experimente soll eine Bestimmung der Gehalte an Steroidhormonen in der Follikelflüssigkeit unterschiedlich durchbluteter Follikel erfolgen. Weiterhin wird das mRNA-Expressionsmuster verschiedener entwicklungsrelevanter Gene in Oozyten und Embryonen mittels RT-PCR untersucht.

Eizellqualität in unterschiedlichen Follikelpopulationen der Stute

A. Vernunft, H. Alm, W. Kanitz und H. Torner

Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie, Forschungsinstitut für die Biologie
landwirtschaftlicher Nutztiere, Dummerstorf

Im Vergleich zu anderen Nutztierarten, wie z.B. beim Rind, ist die In-vitro-Erzeugung von Embryonen beim Pferd noch ineffizient. Obwohl die Kernreifung der Oozyten in vitro mit gutem Erfolg durchgeführt werden kann, ist eine In-vitro-Fertilisation (IVF) der gereiften Oozyten ineffektiv. Lebend geborene Fohlen wurden nach IVF von in vivo gereiften Oozyten [1] und nach Intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) von in vitro gereiften Oozyten [2,3] erzielt.

Ein Grund für die niedrigen Befruchtungsraten nach IVF von in vitro gereifter Oozyten könnte eine unvollständige zytoplasmatische Ausreifung der Oozyten sein.

Die Entwicklungskompetenz von Cumulus-Oozyten-Komplexen (COK) der Stute nach IVF ist von der Cumulusemorphologie am Beginn der IVM abhängig, wobei die Gruppen mit expandierten COK eine vergleichsweise höhere Befruchtungsrate aufweisen [4,5]. Es konnte gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Ausreifung der verschiedenen COK-Klassen während der IVM unterschiedlich verläuft [6]. Equine Oozyten mit expandiertem Cumulus bei Reifungsbeginn weisen im Vergleich zu Oozyten mit kompaktem Cumulus in der ersten Phase der IVM Mitochondrien in zunehmender Aggregation ($p < 0.05$) auf. Die mitochondriale Aktivität in diesen Oozyten nimmt im Reifungsverlauf kontinuierlich zu, während sie in der anderen Gruppe zum Ende der Reifung abfällt [6]. Ein weiterer Marker für die Beurteilung der Entwicklungskompetenz von Oozyten ist der Nachweis der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase-Aktivität (G6PDH) im Ooplasma vor der IVM, der mit Hilfe der Brillant-Cresyl-Blau-Färbung (BCB) in Rinderoozyten etabliert wurde und zu einer Erhöhung der Blastozystenrate bei der Spezies Rind führte [7,8].

Das Ziel der Untersuchungen war es, die Reifungsvorgänge in Stutenoozyten in vivo anhand ausgewählter Parameter zu charakterisieren. Dazu wurden Oozyten aus präovulatorischen Follikeln, regressiven und progressiven Follikelpopulationen gewonnen und untersucht. Die Oozytengewinnung erfolgte durch transvaginale ultraschallgeleitete Follikelpunktionen (OPU) bei 14 Stuten, die während der Rosse ($n=44$ Punktionen) und bei heranwachsenden Follikelpopulationen noch vor Ausprägung eines dominanten Follikels ($n=79$ Punktionen) vorgenommen wurden. Untersuchungen zum Steroidgehalt (E_2/P_4) in der Follikelflüssigkeit konnten die klinische Einteilung der Follikelgruppen unterstützen.

Die COK wurden nach der Gewinnung in Abhängigkeit vom Cumuluszustand in BCB inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Oozyten nach der Einteilung in BCB⁺ und BCB⁻ parallel mit MitoTracker Orange (Bestimmung der mitochondrialen Aktivität und – Aggregation) und Hoechst 33342 (Bestimmung der Chromatinkonfiguration) gefärbt.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede der G6PDH-Aktivität in Oozyten in Abhängigkeit von den Follikelpopulationen und dem COK-Zustand beobachtet werden.

Der Chromatinstatus, die mitochondriale Aktivität und -Aggregation in den Oozyten war abhängig von den Follikelpopulationen.

Progressive Follikelpopulationen enthielten gehäuft COK mit fibrillärem Diplotän und hoher mitochondrialer Aktivität, während Oozyten aus regressiven Follikelpopulationen gehäuft COK mit kondensiertem Diplotän und geringeren mitochondrialen Aktivitäten aufwiesen ($p < 0.05$). Pyknotisches Chromatin wurde nur in Oozyten aus regressiven Follikelpopulationen nachgewiesen.

Höhere mitochondriale Aktivitäten konnten gleichsam bei Oozyten mit expandierten COK und Oozyten mit Corona radiata gegenüber kompakten COK nachgewiesen werden ($p < 0.01$), was darauf hinweist, dass es sich bei Oozyten mit Corona radiata und expandierten COK um eine Oozytenpopulation handeln könnte. Expandierte COK wiesen zudem eine höhere mitochondriale Aktivität auf, wenn sie aus präovulatorischen oder progressiven Follikeln gewonnen wurden ($p < 0.05$).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die Qualitätsparameter von Oozyten der Stute während der folliculären Entwicklung verändern und damit der Entwicklungsstand der Follikelpopulation die Qualität der Oozyten beeinflusst.

Referenzen

1. Palmer et al., J Reprod Fertil 1991; Suppl44:375-384
2. Galli et al., Anim reprod Sci 2007; 98:39-55
3. Hinrichs et al., Theriogenology 2007; 68:521-529
4. Alm et al., Theriogenology 2001, 56:817-829
5. Hinrichs et al., Biol. Reprod. 2005, 72:1142-1150
6. Torner et al., Reprod. Dom. Anim. 2007, 42 :176-183
7. Alm et al., Theriogenology 2005, 63:2194-2205
8. Torner et al., Reproduction 2008, 135 :197-212

Strategien zur Erhaltung genetischer Ressourcen bei Vögeln- Ergebnisse zur Kryokonservierung von Hahnensperma

Christine Ehling, Lothar Schindler, Ulrike Taylor, Detlef Rath
Forschungsbereich Biotechnologie, Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut

Die Erhaltung tiergenetischer Ressourcen ist ein Forschungsschwerpunkt am Institut für Nutztiergenetik. Da die Vogelgrippe eine permanente Gefahr für die Geflügelbestände darstellt, hat die Arbeitsgruppe für tiergenetische Ressourcen am Institut die Anlage einer Genreserve für Rassegeflügel beschlossen. Für die Erhaltung genetischer Ressourcen bei Vögeln gibt es verschiedene Strategien. Neben der üblichen Lebenderhaltung sind die Kryokonservierung von blastodermalen Zellen bzw. primordialen Keimzellen zur Erzeugung von Keimbahnchimären sowie das Einfrieren und die Transplantation von Eierstocks- bzw. Hodengewebe und das Einfrieren von Sperma entwickelt und erheblich verbessert worden.

Um schnell handlungsfähig zu sein, fiel die Entscheidung auf die Strategie der Tiefgefrierkonservierung von Hahnensperma. Da es dafür noch kein zufriedenstellendes Standardverfahren gibt, wurde zunächst eine Methode erarbeitet. Es wurden zwei Hahnensperma- Verdüner, Poultry Extender aus Wageningen nach Woelders (PE) und Blumberger Verdüner nach Schramm (BB), und zwei Gefrierschutzmittel

(Dimethylacetamid = DMA und Dimethylformamid = DMF) getestet. Die DMA- bzw. DMF-Endkonzentrationen betragen 5,2% bzw. 6,5%. Es standen neun Hähne (7 New Hampshire- und 2 White Leghorn-Hähne) zur Verfügung. Sie wurden wöchentlich zweimal mit der Massagemethode abgesamt. Die einzelnen Ejakulate wurden in zwei Schritten verdünnt, erstmals unmittelbar nach Samengewinnung bei Raumtemperatur 1:2 mit Kühlverdüner und das zweite Mal im Kühlraum bei 5°C auf eine Endverdünnung von 1:3 mit Gefrierverdüner. Das vorverdünnte Sperma wurde innerhalb von 20 Minuten auf 5°C abgekühlt und unmittelbar nach Zugabe der Gefrierverdüners konfektioniert. Das Sperma wurde im Kühlraum in Mini-Pailletten (0,25 ml) abgefüllt und im auf -100°C vorgekühlten Einfrierautomaten (IceCube 14 S, Sy-Lab Geräte GmbH Österreich) bei einer Einfrierate von 130°C/min eingefroren. Das Auftauen erfolgte im Wasserbad bei 5°C. Sowohl vor als auch nach dem Einfrieren wurde die Motilität, die Morphologie sowie die Lebensfähigkeit der Spermien untersucht. Letztere Untersuchung erfolgte flowzytometrisch nach Färbung mit Propidiumjodid.

Das beste Ergebnis nach Auftauen wurde mit dem Blumberger Verdüner, der 6,5% DMF enthielt, erzielt (Tabelle 1). Die Spermienmotilität nach Auftauen lag bei 50%, der Anteil lebender Spermien betrug 75% und der Anteil morphologisch abweichender Spermien lag bei 19%. Gegenwärtig läuft ein Inseminationsversuch, um die Fertilität der tiefgefrorenen/aufgetauten Spermien zu prüfen.

Tabelle 1: Vergleich von Frischsperma (F) und tiefgekühltem Hahnensperma (TK) in den vier Verdünnervarianten (7 New Hampshire Hähne)

| | | Lebende Spermien F (%) | Lebende Spermien TK (%) | Motilität F (%) | Motilität TK (%) | Morph. Defekte F (%) | Morph. Defekte TK (%) |
|------------------|-----------|------------------------|-------------------------|-----------------|------------------|----------------------|-----------------------|
| PE DMF (n=35) | \bar{x} | 99,07 | 73,51 | 90,00* | 45,43 | 8,97 | 32,46* |
| | \pm SD | 0,44 | 8,31 | 0,00 | 11,66 | 6,50 | 19,57 |
| BB DMF (n=42) | \bar{x} | 98,92 | 74,48 | 86,19* | 47,86 | 7,10 | 19,48* |
| | \pm SD | 0,65 | 6,61 | 5,39 | 12,69 | 4,81 | 9,52 |
| PE DMA (n=67) | \bar{x} | 98,41 | 51,73# | 88,96+ | 40,22 | 7,76 | 17,46 |
| | \pm SD | 1,23 | 7,59 | 2,96 | 8,89 | 5,04 | 7,05 |
| BB DMA (n=33) | \bar{x} | 98,20 | 60,65# | 82,73+ | 39,09 | 7,36 | 16,64 |
| | \pm SD | 1,09 | 5,42 | 7,71 | 8,33 | 2,99 | 7,53 |

* p=0,013 Motilität Frisch bzw. p=0,006 Morph. Defekte TK (Mann-Whitney Rank Sum Test) innerhalb DMF-Variante

p<0,001 (Equal Variance Test) innerhalb DMA-Variante

+ p<0,001 (Mann-Whitney Rank Sum Test) innerhalb DMA

Interaktionen porziner Spermatozoen im UterusUlrike Taylor¹, Holm Zerbe², Hans-Martin Seyfert³, Hans-Joachim Schubert⁴, Detlef Rath¹¹ Institut für Nutztiergenetik, Mariensee (FLI)² Klinik für Wiederkäuer, Tierärztliche Fakultät, LMU München³ Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere, Dummerstorf⁴ Arbeitsgemeinschaft Immunologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

Um die Anwesenheit von Spermien im Ovidukt zum Zeitpunkt der Ovulation zu gewährleisten, existieren im weiblichen Genitaltrakt Spermienreservoirs. Das am besten untersuchte Reservoir befindet sich im Eileiter. Dort werden ca. 10 000 - 20 000 Spermien gebunden, die unmittelbar der Befruchtung dienen. Das Reservoir füllt sich bei Schweinen innerhalb der ersten 2 Stunden nach Besamung. Trotz der relativ geringen Menge an Spermien, die zur Füllung des Eileiterreservoirs benötigt werden, ist bei der herkömmlichen künstlichen Besamung von Sauen, wobei Spermien kurz hinter der Zervix abgesetzt werden, eine Konzentration von mindestens 3 Milliarden Spermien pro Besamungsdosis notwendig, um befriedigende Befruchtungsergebnisse zu erzielen. Erfolgt die Besamung dagegen ovulationsnah direkt in den Eileiter sind ca. 100 000 – 200 000 Spermien ausreichend. Dieses Phänomen lässt auf rigide Selektionsvorgänge im Uterus schließen. Zur Klärung, ob die Bindung an uterine Zellen Bestandteil solcher Selektionsmechanismen ist, wurden zum einen Interaktionen von Spermien mit endometrialen Epithelzellen untersucht. Da beim Schwein der Besamungsakt in Abhängigkeit vom Verdüner innerhalb weniger Stunden zum massiven Einwandern von neutrophilen Granulozyten (PMN) führt, wurde darüber hinaus auch die Bindung von Spermien an PMN geprüft .

Zur Untersuchung von Spermien-Epithelzell-Interaktionen wurde ein ex-vivo-Modell entwickelt. Dafür wurden Uterussegmente (10 cm) von ovulationsnah geschlachteten, synchronisierten, präpuperalen Jungsauen mit 100×10^6 Spermien „inseminiert“ und für 60 min bei 38°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Segmente gespült. Die in der Spülflüssigkeit enthaltenen Spermien wurden durchflußzytometrisch gezählt und mittels Propidiumjodid- bzw. JC-1-Färbung hinsichtlich der Integrität ihrer Plasmamembran (PM) und ihres Mitochondrienmembranpotentials (MMP) untersucht. Während von den Spermien mit geschädigter PM und ohne MMP $93 \pm 12\%$ wieder erspült werden konnten, waren es bei den Spermien mit intakter PM und funktionierendem MMP nur $55 \pm 7\%$. Das Ergebnis indiziert, dass ca. die Hälfte aller motilen und membranintakten Spermien an das Uterusepithel gebunden hatte. Vermutlich verhindert diese Bindung den Verlust befruchtungsfähiger Spermien durch den Rückfluss, der unmittelbar nach Besamung einsetzt und durch aktive retrograd gerichtete Uteruskontraktionen verursacht wird. Möglicherweise entsteht so ein dem Ovidukt vorgeschaltetes Reservoir, in dem selektiv nur intakte Spermien gespeichert werden.

Weitere in-vivo-Untersuchungen ergaben, dass die Spermien-Epithelzell-Bindung jedoch nicht nur Konsequenzen für das Spermium hat. Dazu wurden synchronisierte, präpuperales Jungsauen ovulationsnah mit 1×10^9 Spermien in Seminalplasma oder Ebersamenverdünner besamt, drei Stunden später geschlachtet und die endometriale Expression von GM-CSF, IL-10, CXCL8, TNF- α und TGF- β gemessen. Als Kontrollen dienten unbehandelte Tiere bzw. uterine Infusionen mit den Medien allein. Während Seminalplasma bzw. Ebersamenverdünner

ohne Spermien dazu führte, dass IL-10, CXCL8, TNF- α und TGF- β signifikant stärker exprimiert wurden als ohne Infusion, konnte in Anwesenheit von Spermien eine

Hochregulierung nur noch für CXCL8 festgestellt wurden. Diese Ergebnisse deuten auf eine aktive Modulation der initialen uterinen Immunantwort auf die Besamung durch Interaktionen von Spermien und endometrialen Epithelzellen, wodurch Faktoren beeinflusst werden, die ultimativ die embryo-maternale Kommunikation betreffen.

In-vitro-Koinkubationsversuche dienten der Untersuchung von Interaktionen zwischen Spermien und neutrophilen Granulozyten. Motile, immobilisierte bzw. membrangeschädigte Spermien wurden für 60 min bei 38°C mit aus dem peripheren Blut gewonnenen Neutrophilen inkubiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass ausschließlich eine Subpopulation intakter Spermien mit PMN in direkten Kontakt trat (45 \pm 3%). Interessanterweise konnte keine Phagozytose beobachtet werden. Membrangeschädigte Spermien banden praktisch nicht (3 \pm 2%). Immobilisierte Spermien wurden nur reduziert gebunden (20 \pm 2%). Zur Zeit wird geprüft, ob der Spermien-PMN-Kontakt eventuell langfristig wieder gelöst wird und die Spermien auf diese Weise Reifungsimpulse erhalten, oder ob durch die Bindung apoptotische Prozesse in den Spermien ausgelöst werden und somit eine negative Spermioselektion durchgeführt wird.

Die Resultate der durchgeführten Untersuchungen weisen darauf hin, dass Spermien bereits vor dem Ovidukt selektiven Prozessen unterworfen werden. Darüber hinaus zeigten die Versuche das Potential uteriner Spermieninteraktionen, die initiale uterine Immunantwort zu modulieren.

Auswirkungen der Infektion mit dem Blauzungenvirus auf die Geschlechtsgesundheit und die Spermaqualität von Besamungsbullen

M. Jung¹, U. Janowitz², A. Ligner¹, K. Rüdiger¹

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

*Rinder Union West e.G.*²

In dieser Studie wurden die Auswirkungen einer Infektion mit dem Blauzungenvirus auf die Spermaqualität von Besamungsbullen untersucht. Zusätzlich wurden mittels einer sonographischen Untersuchung der Hoden und der akzessorischen Geschlechtsdrüsen organische Veränderungen dargestellt. Die Infektion dieser Tiere erfolgte im Zeitraum von August bis Oktober 2007. Alle Bullen zeigten keinerlei klinische Symptome einer Blauzungeninfection. Es wurde jeweils im Abstand von vier Wochen eine Blutprobe zur Virusdiagnostik mittels PCR entnommen. Die Tiere zeigten erst in den Untersuchungen Anfang April bzw. Mai 2008 eine Elimination des Virus. Im April 2008 erfolgte eine sonographische Untersuchung mit dem Ultraschallgerät Titan der Firma Sonosite. Bei 40 % der Besamungsbullen war eine Veränderung in den Hoden zu erkennen. Bei diesen Veränderungen handelte es sich um unterschiedlich stark ausgeprägte Fibrosierungen. Des Weiteren wurde eine computergestützte Graustufenanalyse (GSA) durchgeführt. Diese konnte jedoch keine Anhaltspunkte für Veränderungen in der Gewebestruktur liefern.

Die Fibrosierung des Hodengewebes kann durch die einmalige Untersuchung nach Durchlaufen der BTV Infektion leider nicht eindeutig der Infektion zugeordnet werden. Der Anteil der Bullen, welche diese Fibrosierungen aufwiesen, war jedoch deutlich höher als bisher in Routineuntersuchungen bei nicht infizierten Jungbullen ermittelte Werte. Dies legt den kausalen Zusammenhang zwischen BTV Infektion und Veränderung des Hodengewebes zumindest nah.

Von 13 Bullen konnten Ejakulate für eine spermatologische Untersuchung gewonnen werden. Dabei wurden sowohl native Formol-fixierte als auch tiefgefrierkonservierte Proben erstellt. Von sechs Bullen standen tiefgefrorene Ejakulate aus dem Zeitraum vor der Infektion sowie in dem Zeitraum von Dezember 2007 bis April 2008 in 14 tägigem Rhythmus gewonnene Ejakulate für eine Verlaufsuntersuchung zur Verfügung. Die während der Infektion produzierten Ejakulate zeigten Abweichungen in ihrer Motilität und vor allem in ihrer

morphologischen Beschaffenheit. Besonders auffällig war der hohe Anteil an Spermien mit einer Schwanzverkrümmung. Mit der Elimination des Virus zeigte sich bei fast allen Bullen wieder eine Normalisierung der Ejakulatsqualität. Vor allem der Anteil morphologisch veränderter Spermien nahm wieder ab.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Infektion mit dem Blauzungenvirus die Produktivität von Besamungsbullen einschränken kann. Scheinbar verbessert sich die Produktivität nach dem Abklingen der Infektion wieder. Um genauere Aussagen zum Schweregrad der Qualitätsminderung und vor allem zu Langzeitschäden durch eine BTV Infektion bei Besamungsbullen treffen zu können, ist das Fortführen genannter Untersuchungen unerlässlich.

Diese Untersuchung wurde gefördert von der Arbeitsgemeinschaft deutscher Rinderzüchter e.V. (ADR).

Zum Einsatz von homöopathischen Präparaten im Rahmen des Embryotransfer beim Rind

H. Enbergs

Zusammenfassung

Die Wirtschaftlichkeit der Milchproduktion hängt in erheblichem Masse von der Gesundheit und Fruchtbarkeit der Milchkühe ab. Eine Abgangsrate aller MLP-Kühe von 39,6%, davon allein 20,8% infolge von Unfruchtbarkeit und 34,6% aufgrund von Erkrankungen, verdeutlicht die prekäre Situation (ADR 2005). Da der Deckungsbeitrag pro Kuh mit zunehmender Anzahl von Laktationen wächst, geht durch die kurze Nutzungsdauer ein erheblicher Teil des möglichen Gewinns verloren.

Homöopathische Medikamente bieten auch für die Rinderpraxis folgende Vorteile: 1. Sie wirken über die einschlägigen körper- bzw. organeigenen Regelmechanismen - insofern schonend umfassend und auch nachhaltig. 2. Sie hinterlassen keine messbaren Rückstände in den von den Tieren stammenden Lebensmitteln und in der Umwelt. 3. Es entstehen keine Verluste durch Wartezeiten. Das Vertrauen der Verbraucher in das gesunde Lebensmittel Milch wird gestärkt. Sie dienen somit dem Umwelt- und Verbraucherschutz. 4. Negative Nebenwirkungen werden nicht beobachtet. 5. Nach EG-Recht wird biologisch wirtschaftenden Betrieben der Einsatz von Medikamenten der Phytotherapie und Homöopathie vorgeschrieben.

Im Referat werden verschiedene Einsatzmöglichkeiten von homöopathischen Präparaten im Rahmen des Embryotransfers anhand von Ergebnissen nahe liegender kontrollierter Studien aufgezeigt. 1. Behandlung ovarieller Dysfunktionen (Ovarialzysten, Anöstien) von möglichen Spenderkühen. 2. Vorbehandlung von Spenderkühen vor der Gewinnung von Oozyten bzw. Embryonen. 3. Anregung zur Prüfung des Einsatzes von Homöopathica zur Optimierung der Qualität von Oozyten, Samenzellen und Embryonen bzw. der Konzeptionsergebnisse

Zu Indikation 1.: Im Rahmen des Fertilitätsdienstes einer Zuchtorganisation wurden 4848 Milchkühe gynäkologisch untersucht. 1418 Kühe waren erkrankt. Dabei betrug der Anteil an ovariellen Störungen 24% (13% Zysten, 186 Kühe, 11% Anöstrie, 155 Kühe). In einer Vergleichsuntersuchung wurden die Kühe innerhalb der beiden Indikationsgruppen nach Anfall alternierend entweder wie bisher im Service üblich mit einem Hormonpräparat (HCG, Ovogest, Intervet, Unterschleißheim) oder mit einem entsprechend ausgewählten homöopathischen Präparat (Ovarium compositum ad us. vet., Hormeel ad us. vet., Biol. Heilmittel Heel, Baden Baden) behandelt. An den genutzten Parametern (Güstzeit, Besamungsindex, Post-Therapiezeit, Erstträchtigkeitsrate, Gesamtträchtigkeitsrate, Abgänge) gemessen, war die homöopathische Behandlung mit den homöopathischen Kombinationspräparaten bei der Behandlung von Zysten (Ovarium compositum) der bisher praktizierten konventionellen Behandlung (Ovogest) klinisch gleichwertig, bei der Behandlung von Anöstrien (Hormeel) signifikant überlegen.

Zu Indikation 2: Einfluss einer Vorbehandlung von Spenderkühen (Folltropin, Receptal, Ovarium compositum) auf das Ergebnis der transvaginalen Follikelpunktion (Böttcher, 1998). Dabei wurde u.a. bei Jungrindern durch die Behandlung mit Ovarium compositum eine signifikant höhere Rate an Follikeln ≥ 8 mm gewonnen und bei Altkühen die Gewinnungsrate an Oozyten gegenüber den Kontrollkühen signifikant gesteigert. Insbesondere bei Schlachtkühen erbrachte die Vorbehandlung mit diesem Präparat gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme IVP-tauglicher Oozyten, der Befruchtungsrate, der Morulastadien und der Blastozystenrate. Außerdem war die Ovarium comp.-Gruppe nach den Kriterien Anzahl IVP-tauglicher Oozyten und der Morulastadien einer entsprechenden Receptal-Gruppe signifikant überlegen. Insgesamt entstanden bei Applikation von Receptal nach IVP 4,3 \pm 0,6 Embryonen, von Ovarium compositum 4,3 \pm 0,7 Embryonen gegenüber der Kontrolle mit 1,0 \pm 0,6 Embryonen. Aufgrund der beachtlichen Ergebnisse empfiehlt der Autor weitere Untersuchungen mit Ovarium comp.

Zu Indikation 3: Aus den signifikant positiven Ergebnissen einer kontrollierten Untersuchung (mittels Durchflußzytometrie) zur Wirkung von homöopathischen Zubereitungen von intermediären Katalysatoren und Antioxidantien auf die Mitochondrienaktivität von Samenzellen werden Vorschläge zu einer kontrollierten Prüfung ihres Einsatzes zur Optimierung der Qualität von Embryonen und der Ergebnisse ihrer Übertragung abgeleitet.

Literatur

- Aziz D. M.: Flow cytometric evaluation of the influence of certain homeopathic drugs on the mitochondrial activity of bovine sperm cells. Vet. Med. Diss. Leipzig 2004
- Böttcher St.: Versuche zur Gewinnung von Oozyten bei Kühen und Färsen mit Hilfe der ultraschallgeleiteten transvaginalen Follikelpunktion (OPU) sowie Untersuchungen zur Beeinflussung der Oozytenqualität aus Ovarien geschlachteter Zuchttiere zur In-vitro-Produktion von Embryonen. Vet. Med. Diss. Tierärztl. Hochsch. Hannover (1998)
- Enbergs H., B. Sensen: Therapie von Ovarialzysten und Anöstrien bei Milchkühen. Biol Tiermed 2007, 7-14
- Sensen B.: Vorkommen von Fruchtbarkeitsstörungen beim Rind und Vergleich verschiedener Therapieformen im Rahmen eines Sterilitätsservices. Vet. med. Diss. Univ. Leipzig (2004).

Embryotransfer und traditionelle chinesische Medizin; geht das?

B. Wollgarten

Greifenberg

(ohne Abstract)

Ultraschall- Einsatz in der Stoffwechselüberwachung

H. Hauschulte

Embryotransfereinrichtung der RUW, Soest

(ohne Abstract)

Erste Erfahrungen mit dem Einsatz von gesextem Sperma im -Gebiet des VOST und der WEU

J. Detterer¹ und H. Melbaum²

¹ *Besamungs- und ET-Station Georgsheil
des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter, 26624 Südbrookmerland;*
² *Besamungsstation Haselünne der Weser-Ems-Union, Haselünne*

Auch wenn bereits seit dem Jahr 2000 gesextes Sperma auf dem Markt ist, wurde es bis zum letzten Jahr nur im begrenzten Umfang eingesetzt. Das knappe Zuchtrinderangebot und entsprechend hohe Zuchtviehpreise haben zu einer neuen Situation geführt.

Der in den letzten Monaten deutlich gestiegenen Nachfrage nach gesextem Sperma, wird inzwischen durch ein relativ großes Angebot an verfügbaren Bullen Rechnung getragen. Weiterentwicklungen bei den Flowzytometern könnten zu einem noch größeren Angebot an gesextem Sperma beitragen (Garner und Seidel Jr., 2008).

In den Zuchtgebieten des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter (VOST) und der Weser-Ems-Union steht den Betrieben seit Herbst 2007 gesextes Sperma von stationseigenen Bullen zur Verfügung.

Da das Sperma während der Trennung einer starken Belastung ausgesetzt ist und die einzelne Samendosis nur niedrige Konzentrationen enthält, sind beim Einsatz des gesexten Spermas einige Punkte zu beachten. Nach einem optimalen Samenhandling beim Auftauen sollten möglichst nur Jungrinder mit einer uneingeschränkter Fruchtbarkeitslage besamt werden (De Jarnette et al., 2008).

Der wirtschaftliche Erfolg beim Einsatz von gesextem Sperma hängt neben der Trächtigkeitsrate auch von der Differenz der Preise für Bullen- bzw. Kuhkälber ab.

So kommt man bei einer Trächtigkeitsrate von 50% bei einer Preisdifferenz von 250 € zwischen männlichen und weiblichen Kälbern in die Gewinnzone.

Im VOST-Gebiet wurden von August 2007 bis Ende April 2008 in 510 Betrieben insgesamt 3.484 Besamungen mit gesextem Sperma durchgeführt. Dies entspricht einem Anteil von 1,7 % an allen Besamungen.

Die durchschnittliche Non-Return-Rate-56-Tage (NRR-56) liegt bei 62,2% (2.139 Erstbesamungen), was einer Differenz von 11.4 Prozentpunkten zu den Besamungen mit konventionellem Sperma (16.752 Erstbesamungen) von denselben

Bullen im selben Zeitraum entspricht. Die Differenz bei der Non-Return-Rate-90-Tage (NRR-90) beträgt 12,2 Prozentpunkte (54,9% zu 67,1%).

Bei den Bullen liegen die NRR-56 zwischen 56,8% und 63,9% und die NRR-90 zwischen 48,3% und 60,3%.

Bei den Technikern ist eine große Spannweite bei den Non-Return-Raten festzustellen (NRR-56: 41,2% - 73,0%; NRR-90:31,2% - 67,8%).

Probleme bei der Follikeldiagnose und der Hornbesamung dürften die Hauptursache für die unbefriedigenden Ergebnisse einzelner Techniker sein.

Eine Befragung der Techniker ergab, dass das Einhalten der Empfehlungen zum Einsatz von gesextem Sperma Voraussetzung für gute Ergebnisse ist. Trotzdem werden zum Teil sehr unterschiedliche Ergebnisse in den verschiedenen Betrieben erzielt.

Im letzten Jahr berichteten wir über sehr unbefriedigende Ergebnisse beim Einsatz von gesextem Sperma beim Embryotransfer. Bei fünf Spenderkühen konnten gerade einmal 3 transfertaugliche Embryonen gewonnen werden. Inzwischen wurden drei Jungrinder nach der Besamung mit gesextem Sperma gespült. Dabei konnten 15 transfertaugliche Embryonen gewonnen werden.

Auch bei der In-Vitro-Fertilisation wurde ein erneuter Anlauf mit gesextem Sperma unternommen. Über die ersten Ergebnisse wird im Vortrag berichtet.

Der Einsatz von gesextem Sperma bei der Besamung scheint sich in den Gebieten des VOST und der WEU zu etablieren. Trächtigkeitsraten von mindestens 50% sind Voraussetzung für einen wirtschaftlichen Erfolg.

Dabei sind noch weitere Untersuchungen hinsichtlich der zum Teil sehr unterschiedlichen Ergebnisse zwischen einzelnen Bullen, Betrieben und Technikern notwendig.

Beim Embryotransfer können bei Jungrindern mit gesextem Sperma akzeptable Ergebnisse erzielt werden.

Literatur:

DeJarnette et al. (2008): Effect of Sex-Sorted Sperm Dosage on Conception Rates in Holstein Heifers and Lactating Cows. J.Dairy Sci. 91:1778-1785

D.L. Garner, G.E. Seidel Jr. (2008): History of commercializing sexed semen for cattle. Theriog. 69: 886 - 895

Genetische Marker und deren Einfluss auf Zuchtprogramme der Zukunft

Maria Hansen und Sven König

Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Georg-August-Universität Göttingen

Die Geschichte der molekularen Tierzucht erlebte ihre Geburtsstunde mit der Etablierung richtungsweisender Verfahren wie der Polymerasekettenreaktion (Vervielfältigung der im Mikrogrammbereich vorliegenden DNA) und der DNA-Sequenzierung. Aber auch die Entschlüsselung des Genoms der wichtigsten Modellorganismen und Haustierrassen bieten den heutigen Tierzüchtern ungeahnte Möglichkeiten. Eine zentrale Rolle spielen dabei die variablen Bereiche des Genoms, wie beispielsweise hochpolymorphe Mikrosatelliten oder Einzelbasenaustausche. Mikrosatelliten sind Wiederholungen diverser DNA-Muster im Genom, wobei hier die Anzahl der Repeateinheiten charakteristisch ist. Einzelbasenaustausche (SNP für Single Nucleotide Polymorphism) sind die häufiger vorkommende Variationen im Genom, Schätzungen gehen beim Säugetier von einem SNP pro 1000 bp bei einem Umfang von ca. 3 Milliarden bp des Gesamtgenoms aus. Hier beschränkt sich die genetische Variation auf einen einzelnen Locus im Genom, allerdings kann hier die Betrachtung auf mehrere nebeneinander liegende SNPs über das gesamte Chromosom erweitert werden, die dann einen so genannten Haplotypen bilden. Diese genetischen Marker ermöglichen es, Unterschiede zwischen Populationen, zum anderen aber auch zwischen Individuen einer Population zu beobachten und zu begründen. In der Tierzucht hat die markergestützte Selektion die in sie gesetzten hohen Erwartungen bislang jedoch kaum erfüllen können. In allen Tierarten beruht der Zuchtfortschritt nach wie vor auf den klassischen Methoden der Zuchtwertschätzung auf der Basis von Leistungsprüfungsdaten. Molekulargenetische Informationen werden bislang nur punktuell genutzt. Allerdings kündigt sich ein Paradigmenwechsel an: Der Ansatz der „genombasierten Selektion“ könnte sowohl die Methoden der Zuchtwertschätzung revolutionieren, als auch zu ganz neuen Strukturen von Zuchtprogrammen führen.

Genombasierte Selektionsverfahren sind möglich auf Grund der rasanten technischen Entwicklung in den vergangenen Jahrzehnten und der Verfügbarkeit so genannter SNP-Chips, die auf einer daumennagelgroßen Plastik- oder Glasplatte einen Großteil des Zielgenoms gebunden haben und so direkt zur Typisierung genutzt werden können. Es werden heute schon kommerziell Chips (Mikroarrays) angeboten, mit denen 48'000 SNPs zu Kosten von wenigen Hundert Schweizer Franken pro Tier bestimmt werden können. Der eigentliche Grundgedanke der genombasierten Selektion ist Folgender: Man kann sich das Genom eines Tieres als Aneinanderreihung von kleinen Chromosomensegmenten, so genannten Haplotypen, vorstellen, also dass z.B. die 3 Milliarden Basenpaare des Gesamtgenoms in 3000 Haplotypen unterteilt werden, die jeweils eine Million Basenpaare umfassen. Jeder Haplotyp kommt in mehreren Varianten in der Population vor, die mittels der SNP-Marker

eindeutig gekennzeichnet sind. Bezogen auf ein Leistungs- oder ein funktionales Merkmal ist unter dem üblichen genetischen Modell zu erwarten, dass einige wenige Haplotypen Gene mit großen Effekten tragen, eine größere Anzahl von Haplotypen Gene mit kleinen Effekten beherbergen, und der größte Anteil der Haplotypen keinen Effekt auf das Leistungsmerkmal aufweisen. Anhand geeigneter Daten können diese Haplotypeneffekte in der bestehenden Population geschätzt werden. Der geschätzte Zuchtwert eines Tieres ist dann die Summe der geschätzten Effekte aller Haplotypen, die das Tier trägt.

Erzeugt man nun einen Nachkommen, so kann auf der Basis einer SNP-Typisierung bestimmt werden, welche Haplotypen dieses Tier trägt. Wieder ist der geschätzte Zuchtwert des Nachkommen die Summe der Effekte aller seiner Haplotypen, wobei die Schätzwerte auf Leistungsdaten der Elterngeneration basieren. Der geschätzte „genomische Zuchtwert“ ist somit sofort verfügbar, wenn das Tier seine genetische Identität erlangt hat, also z.B. auch schon für Embryonen. Das bedeutet auch eine Abkehr von der bisherigen Pedigree-basierten Zuchtwertschätzung (BLUP-Tiermodell) hin zu einem Haplotypen-basierten BLUP-Ansatz, wobei Verwandteninformationen eine viel geringere Rolle spielen.

Wie muss nun ein Zuchtprogramm aussehen, welches das Potenzial der genombasierten Selektion in mehr Zuchtfortschritt und/oder in geringere Züchtungskosten umsetzt? Der Ansatz ist prinzipiell in allen Tierarten anwendbar, soll aber am Beispiel der Rinderzucht dargestellt werden, da er hier konzeptionell am weitesten durchdacht ist. Der wesentliche Faktor ist, dass schon bei jungen Tieren beiderlei Geschlechts eine Genauigkeit der Zuchtwertschätzung in Form einer Korrelation der geschätzten mit den wahren Zuchtwerten von bis zu $r = 0.75$ erreicht wird. Solche Genauigkeiten werden bislang bei Bullen erst nach dem Testeinsatz und bei Kühen praktisch gar nicht erreicht. In Rinderzuchtprogrammen besteht die größte Effizienzreserve in der Verkürzung des Generationsintervalls auf der Bullenseite durch Verzicht auf die Nachkommenprüfung. Ein genombasiertes Zuchtprogramm würde also in jeder Generation eine große Zahl (z.B. 1000) Bullenkälber mit hohem Pedigreezuchtwert auf SNP-Basis typisieren und anhand der genomischen Zuchtwerte die besten als potenzielle Zuchtbullen auswählen. Nur diese werden als Zuchttiere aufgezogen und unmittelbar nach Erreichen der Zuchtreife eingesetzt. Modellrechnungen auf Basis der Struktur des kanadischen Holsteinzuchtprogramms kamen zu dem Ergebnis, dass eine konsequente Umsetzung der genombasierten Selektion zu einer Verdoppelung des Zuchtfortschritts pro Jahr bei einer Reduzierung der Züchtungskosten um 90 Prozent führen kann. Der wichtigste Vorbehalt gegenüber dem Konzept der genombasierten Selektion ist, dass bisher noch keine (öffentlich zugänglichen) praktischen Erfahrungen bzgl. der konkreten Umsetzung vorliegen. Trotzdem belegen die genannten Zahlen das enorme Potenzial des vorgeschlagenen Ansatzes und sollten für jede Zuchtorganisation Anlass genug sein, sich mit den Möglichkeiten genombasierter Selektionsstrategien sehr ernsthaft auseinanderzusetzen.

Von der Eizelle zum Embryo und von der Trächtigkeit zum Kalb.

Wo stehen wir im internationalen Vergleich?

K. Roschlau, A. Kuwer, C. Kuhnt, Daniela Roschlau, Ute Michaelis, J. Reinecke, Petra Poppe, Gunda Kuwer

MASTERRIND GmbH, ET-Station Nüchel 1, D-27612 Loxstedt

Bezug nehmend auf die von den internationalen Embryotransfergesellschaften (IETS, AETE) veröffentlichten Zahlen, wurden 2006 weltweit 670.711 gespülte (+ 58.533 zu 2005) und 291.845 In vitro produzierte (+ 25.854 zu 2005) Embryonen des Rindes transplantiert. Diese Daten belegen deutlich die wachsende Bedeutung des Embryotransfers.

Die überwiegende Zahl der gespülten (In vivo) Rinderembryonen wurde in Nordamerika übertragen (44%). Europa ordnet sich mit einem Anteil von 13,1% (87.841 Transfers) knapp hinter Südamerika ein. Innerhalb Europas werden die meisten Spülungen (5915) und Transfers (28.442) in Frankreich durchgeführt. Hinter den Niederlanden platzierte sich Deutschland mit 2445 Spülungen und 13.106 übertragenen Embryonen an dritter Stelle. Die meisten Spülungen in Deutschland werden bei den Rassen Holstein Friesian (schwarz- und rotbunt) sowie Fleckvieh durchgeführt. Dabei werden bei letzteren mit 8 – 10 transfertauglichen Embryonen je Spülung deutlich bessere Ergebnisse erzielt, als bei den Holsteins mit 4 – 6 Embryonen.

Neben dem Rind wächst das Interesse am Embryotransfer auch bei anderen Tierarten. So wurden 2006 beim Schaf 56.519 Embryonen ausgespült, bei der Ziege waren es 23.826, bei Hirschen 791, beim Schwein 57.537 und beim Pferd 27.138.

Starke Zunahmen sind hinsichtlich der Übertragung In vitro-produzierter Embryonen des Rindes zu verzeichnen. Bezogen auf die veröffentlichten Zahlen in Süd- und Nordamerika (204.500 bzw. 134.000 Transfers) sowie in Asien (87.000 Transfers) ist der Anteil von Europa mit 13.900 erzeugten Embryonen (2,4%) gering. Bei der Wertung dieser Daten ist zu berücksichtigen, dass in verschiedenen Regionen der Welt unterschiedliche Rassen zur Embryonenerzeugung genutzt werden und zum anderen die Oocyten sowohl über ovum pick up (OPU) von lebenden Tieren als auch nach Schlachtung direkt aus den Eierstöcken gewonnen werden. So produzieren in Südamerika mehrere hundert Teams Embryonen nach OPU überwiegend von der Rasse Nelore (*Bos indicus*), bei der in einer OPU-Sitzung je Tier oft 100 – 500 Eizellen gewonnen und bis zu 100 Embryonen produziert werden können. Insbesondere in den USA wird eine große Zahl von Embryonen aus Eizellen von Eierstöcken (unbekannter

individueller Herkunft, aber Rasse Holstein) erzeugt. Zur Befruchtung wird oft gesextes Spermia (X-Spermien) eines Top-Bullen verwendet. Die Embryonen werden in synchronisierte Kühe in großen Milchviehherden verpflanzt (anstelle einer Besamung). Die Trächtigkeitsraten liegen zwar lediglich bei 25-30%, die Nachkommen sind allerdings dann überwiegend weiblich.

Auf der ET-Station der MASTERRIND in Nückel wurden in den letzten sechs Jahren stabil jährlich etwa 300 Kühe und Rinder der Rasse Holstein-Friesian gespült. Im letzten Geschäftsjahr konnte diese Zahl um mehr als 50 Spülungen auf 366 gesteigert werden, dabei wurden im Durchschnitt 4,6 transfertaugliche Embryonen gewonnen.

In vitro-Embryonen werden auf der ET-Station seit 12 Jahren produziert. In den letzten fünf Jahren wurden dazu Eizellen aus jährlich etwa 1400 OPU-Sitzungen verwendet. Im Geschäftsjahr 2006/2007 wurden bei 1407 Sitzungen insgesamt 2794 Blastozysten (Spermia von 159 verschiedenen Bullen in der Befruchtung) erzeugt – im Durchschnitt 2,3 Embryonen je Sitzung bei Kühen und 1,5 bei Rindern. Die Unterschiede in den Entwicklungsraten bei Rindern und Kühen ergeben sich aus zwei Gründen. Zum einen werden bei Rindern weniger Eizellen durch die Punktion gewonnen, als bei Kühen (8,5 gegenüber 11). Von den gewonnenen Eizellen entsprechen in beiden Fällen etwa 56% den Qualitätskriterien 1 und 2, allerdings ist die Entwicklungskompetenz bei den Eizellen von Rindern geringer (Blastozystenrate 26,8%), als bei denen von Kühen (Blastozystenrate 34,8%).

Hinsichtlich der erzielten Trächtigkeitsraten unterscheiden sich In vivo- und In vitro-Embryonen signifikant. Nach Informationen von F. Müller und C. Niewöhner (2006/2007), die sowohl In vivo- als auch In vitro-Embryonen (aus Nückel) in landwirtschaftlichen Betrieben transplantierten, sortieren sich die Trächtigkeitsergebnisse wie folgt: In vivo, frisch 69,6% (n = 115), In vivo, tiefgefroren 62,0% (n = 221), In vitro, frisch 60,7% (n = 211) und In vitro, tiefgefroren 44,9% (n = 149). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die frisch übertragenen IVP-Embryonen vor dem Transfer teilweise bis zu 12 Stunden in „Embryo Holding Solution“ transportiert wurden. Auf der Station in Nückel liegen die Trächtigkeitsergebnisse mit frischen IVP-Embryonen bei 51%, wobei Embryonen, die schon am Tag 6 als Blastozysten vorliegen, besser anwachsen als solche, die dieses Stadium erst am Tag 7 erreichen (61% gegenüber 47%). Die Ergebnisse mit tiefgefrorenen IVP-Embryonen entsprechen denen, die auch im Feld durch Müller und Niewöhner erreicht wurden.

**Einfluss eines Vitrifikations- und eines kontrollierten
Kryokonservierungsverfahrens auf die Qualität
in vitro produzierter Rinderembryonen**
-Erste Ergebnisse-

H. Stinshoff¹, K. Höffmann¹, A. Hanstedt¹, D. Müller¹ und C. Wrenzycki^{1,2}

¹Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

²Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken
Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover

Die In vitro-Produktion (IVP) boviner Embryonen hat in den letzten Jahren enorme Fortschritte erfahren und wird bereits vielfach in der Praxis angewendet. Trotz der Verbesserungen der Kultursysteme unterscheiden sich in vitro produzierte Rinderembryonen jedoch nach wie vor von in vivo generierten Embryonen. Unterschiede wurden hinsichtlich der Morphologie, der Entwicklungsgeschwindigkeit, metabolischer Parameter, der Genexpressionsmuster und der Gefriertauglichkeit beschrieben (Wrenzycki et al., 2005; Lonergan et al., 2006). Von den zur Verfügung stehenden Methoden zur Kryokonservierung boviner in vitro produzierter Rinderembryonen scheinen die Vitrifikationstechniken besser geeignet zu sein als die kontrollierten, langsamen Tiefgefrierverfahren (Dobrinsky 2002; Seidel 2006). Ziel der Untersuchungen ist es, den Einfluss der Vitrifikation und des kontrollierten Tiefgefrierens auf die Qualität in vitro produzierter Rinderembryonen nach dem Auftauen darzustellen.

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

Die vorläufigen Ergebnisse der Studie sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

| | Reexpansionsrate | Schlupfrate |
|---|------------------|-------------|
| Vitrifizierte Blastozysten (n=23) | 47% | 21% |
| Kontrolliert eingefrorene Blastozysten (n=29) | 58% | 37% |

Die ersten Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass mit beiden verwendeten Einfrierverfahren ähnliche Überlebensraten bei in vitro produzierten Rinderembryonen nach dem Auftauen erzielt werden können.

Einfluss der Fütterung unterschiedlicher Konzentrationen an konjugierten Linolsäuren (CLA) auf die Entwicklungskompetenz der Eizellen laktierender Milchkühe

K. Höffmann¹, A. Hanstedt¹, H. Stinshoff¹, E. Onnen-Lübben¹, S. Wilkening-Krass¹,
H. Bollwein¹ und C. Wrenzycki^{1,2}

¹Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

²Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken
Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover

Die Ursachen für die herabgesetzte Fertilität der Hochleistungskühe sind multifaktoriell. Hochleistungskühe befinden sich in der peripartalen Phase in einer negativen Energiebilanz, da die Energiemenge, die zur Aufrechterhaltung der metabolischen Funktionen und der Milchbildung benötigt wird, nicht durch die Futteraufnahme des Tieres abgedeckt wird. Die ungenügende Energieversorgung führt u.a. zu einer Verschlechterung der Reproduktionsleistung. Niedrige Trächtigkeitsraten und eine Erhöhung der frühen embryonalen Mortalität sind die Folge. Konjugierte Linolsäuren (CLA) beeinflussen den Fettstoffwechsel dramatisch. Bei Milchkühen kommt es zu einer Milchfettdepression. Dadurch kann die negative Energiebilanz abgeschwächt und die negativen Auswirkungen auf das Follikelwachstum können abgemildert werden.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss einer CLA-Supplementation auf die Ovarfunktion bei Milchkühen zu untersuchen. Hierzu wurde die Entwicklungskompetenz der Oozyten analysiert.

Insgesamt wurden 44 hochtragende Kühe und Färsen des Instituts für Tierernährung (FLI Braunschweig) in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe erhielt keine CLA-Supplementation (Kontrolle; n=15 Tiere), die zweite Gruppe erhielt eine niedrige (niedrig: 50g/Tag, n=15 Tiere) und die dritte eine hohe (hoch: 100g/Tag, n=14 Tiere) CLA-Supplementierung. Ab Tag 45 ± 3 p.p. wurde mit der Synchronisation der Tiere begonnen. Anschließend erfolgte die Eizellgewinnung mittels ultraschallgeleiteter transvaginaler Follikelpunktion (ovum pick-up, OPU). Die OPU-Sitzungen fanden einmal wöchentlich in drei aufeinander folgenden Wochen statt. Hierbei erfolgte auch eine Dokumentation der Anzahl der Follikel. Die IVP-tauglichen Kumulus-Oozyten-Komplexe wurden einem Standardprotokoll für die In vitro-Produktion zugeführt. An Tag 3 erfolgte die Bestimmung der Teilungsraten und an Tag 8 die Bestimmung der Entwicklungsraten. Die hohe CLA-Supplementation steigerte die Anzahl der Follikel pro Tier und OPU-Sitzung signifikant verglichen mit der Gruppe ohne CLA-Supplementation (hoch: 5,6 ± 2,1 Follikel; niedrig 4,6 ± 1,7 Follikel; ohne: 4,1 ± 0,8 Follikel). Signifikant mehr Eizellen, die von Tieren der hohen und niedrigen Gruppe gewonnen wurden, teilten sich im Vergleich zu denen von nicht supplementierten Tieren (hoch: 51,7 ± 9,9, niedrig 48,4 ± 9,7, ohne 35,7 ± 8,1). Die Entwicklungsraten an Tag 8 waren signifikant höher bei den von hoch supplementierten Tieren gewonnenen Oozyten gegenüber denen der beiden anderen Gruppen (hoch: 19,1 ± 6,5, niedrig: 8,8 ± 7,8, ohne: 8,7 ± 6,4). Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass eine hohe CLA-Supplementation bei Tieren nach der Kalbung das Entwicklungspotential der von ihnen gewonnenen Oozyten verbessern kann.

Bemerkungen zum Follikelwachstum in sog. 2- und 3-Wellen-Zyklen beim Michvieh

Schneebeli Jürg; Schauenberg 91; CH-7421-Summaprada; Schweiz

In Lutealphasen normalzyklischer Milchkühe wachsen in der Regel entweder 2 oder 3 dominante Follikel (DF) zeitlich gestaffelt heran, wobei sich der letzte schliesslich zur ovulatorischen Blase der nachfolgenden Brunst entwickelt. Die beiden als 2- bzw. 3-Wellen-Zyklus (2-WZ; 3-WZ) bezeichneten Varianten gelten als alternative Formen ungestörter Ovarfunktion, und man nimmt an, dass die Zahl der Follikelwellen und die Zykluslänge miteinander korreliert seien. In dieser Studie wurde das Follikelwachstum in 2- und 3-WZ anhand klinischer Parameter vergleichend untersucht, um primär zu klären, inwiefern beide Varianten tatsächlich als physiologisch äquivalent zu betrachten seien. Zudem interessierte die Frage, wie allenfalls bei Manipulationen der Ovaritätigkeit den spezifischen Gegebenheiten in 2- und 3-WZ Rechnung getragen werden könnte.

Die vorgelegten Ergebnisse stammen von 80 Braunvieh-Milchkühen und -Rindern deren Ovaritätigkeit im Verlaufe von 186 Zyklen mittels transrektaler Palpation kontinuierlich überwacht worden war (Intervall: 1-2 Tage). Als Zeitpunkt der An- bzw. Rückbildung eines DF galt der Termin seiner erst- bzw. letztmaligen Erkennung, und die dazwischen liegende Spanne wurde als Verweildauer des Follikels bzw. als Länge der Follikelwelle bezeichnet. Die statistischen Angaben zu den Versuchsdaten stammen aus Boxplot-Auswertungen. 117 der 186 beobachteten Zyklen erwiesen sich als 2-WZ, 69 als 3-WZ. Die Variabilität aller erfassten Parameter war in beiden Gruppen beachtlich. Dies ist zu berücksichtigen, wenn bei der nachfolgenden Beschreibung der Einzelergebnisse vereinfachend nur auf Medianwerte Bezug genommen wird. 2-WZ waren im Mittel kürzer als 3-WZ (20d vs 22d; $p < 0.05$). In beiden Gruppen war die erste Follikelwelle deutlich länger (2-WZ: 12d; 3-WZ: 11d) als jene des ovulatorischen Follikels (2-WZ: 6d; 3-WZ: 5d) und die zweite Welle der 3-WZ wies einen dazwischen liegenden Wert auf (8d). Sowohl die erste als auch die ovulatorische Follikelwelle waren in 3-WZ tendenziell, aber nicht signifikant kürzer als in 2-WZ. In 3-WZ tauchte der zweite DF früher (d_{12}) und der dritte (ovulatorische) Follikel später (d_{18}) auf als der zweite (ovulatorische) Follikel

(d₁₅) in 2-WZ ($p < 0.05$). Partielle Überlagerungen der End- und Anfangsphase aufeinanderfolgender Follikelwellen waren in 3-WZ wesentlich häufiger und deutlicher ausgeprägt als in 2-WZ.

2-WZ und 3-WZ können nicht vorbehaltlos als physiologisch äquivalente Formen der Ovaraktivität betrachtet werden. Anders als bisher allgemein vermutet, ist die Anbildung eines zusätzlichen DF in den meisten Fällen wohl weniger einer Zyklusverlängerung als vielmehr einem beschleunigten Rhythmus der Follikelstimulation während der Lutealphase zuzuschreiben. Es bleibt zu prüfen, welche Bedeutung die individuell unterschiedliche Progesteronsekretion der Gelbkörper hinsichtlich des Variantenreichtums der Follikelwellen hat. Hinweise aus anderen Studien sprechen durchaus dafür, dass Progesteron während der ganzen Lutealphase DF nicht nur daran hindert zu ovulieren, sondern auch deren Wachstum moduliert. Gemäss den vorliegenden Beobachtungen ist es nicht möglich, ohne enormen diagnostischen Aufwand bei Manipulationen der Ovaritätigkeit die speziellen Verhältnisse in 2- und in 3-WZ zu berücksichtigen.

Embryogewinnungsrate nach Superovulation mit equinem Hypophysenextrakt (eFSH®) bei der Stute

M. Köllmann, J. Probst, C. Baackmann, J. Klewitz, E. Squires¹, H. Sieme*

Klinik für Pferde und Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

¹Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, USA

*Vortragende

Der equine Embryotransfer ist bei singular ovulierenden Stuten aufgrund der geringen Embryonengewinnungsraten von ~50% zurzeit nicht wirtschaftlich. In den vergangenen Jahren wurde wiederholt versucht Verfahren zur Superovulation bei der Stute mit dem Ziel einer höheren Embryonengewinnungsrate zu etablieren.

Durch eine Superovulationsbehandlung mit aufgereinigtem equinem Hypophysenextrakt (eFSH®) kann die Ovulationsrate und somit die Embryonengewinnungsrate gesteigert werden. In vorangegangenen Studien traten während der Behandlung jedoch gehäuft anovulatorische Follikel oder Überstimulationen der Ovarien auf.

In dieser Studie sollen die Embryonengewinnungsraten nach eFSH® Behandlung mit Ergebnissen nach singularen Ovulationen verglichen werden.

Dazu wurden 6 allgemein- und genitalgesunde Stuten über 5 Zyklen untersucht und die Anzahl an Ovulationen und gewonnenen Embryonen aus den stimulierten Zyklen mit denen des Kontrollzyklus verglichen. Bei Zyklus 1 und 3 handelt es sich um Kontrollzyklen ohne Stimulationsbehandlung und künstliche Besamung. In Zyklus 2 und 4 wurden die Stuten einer eFSH® Behandlung unterzogen, nach Ovulationsinduktion künstlich besamt und eine Embryonengewinnung an Tag 6,5 postovulationem durch transzervikale Uterusspülung vorgenommen. Im 5. Zyklus wurde eine Embryonengewinnung nach Ovulationsinduktion und zweimaliger Besamung, entsprechend Zyklus 2 und 4, jedoch ohne vorherige Stimulationsbehandlung durchgeführt.

In 18 Kontrollzyklen und 12 eFSH®-stimulierten Zyklen lag die Anzahl an Ovulationen (OV) pro Stute bei den eFSH-Zyklen mit durchschnittlich 4,4 OV deutlich über der durchschnittlichen Ovulationsrate in den Kontrollzyklen (1,3 OV). Auch die Embryonengewinnungsrate war in den eFSH® behandelten Zyklen mit Ø 2,9 Embryonen im Gegensatz zu der Kontrollgruppe (Ø 1,2 Embryonen) deutlich erhöht. Die Verwendung von eFSH® ist geeignet um Superovulationen und höhere Embryonengewinnungsraten im Vergleich zu nicht-stimulierten Zyklen bei der Stute zu erzielen. Durch die Möglichkeit der Superovulation mithilfe eFSH® kann die Effizienz des Embryotransfers bei der Stute in Zukunft verbessert werden.

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

Embryotransfer beim Pferd – ein Erfahrungsbericht

P.-D. Henningsen, Glücksburg

Seit einigen Jahren werden wir wiederholt mit der Frage nach dem Embryo-Transfer beim Pferd konfrontiert. Dabei haben wir uns stets relativ distanziert verhalten, weil mir der zeitliche Aufwand, die Schwierigkeiten bei der zeitlichen Planung und insbesondere die Vorbereitung und Bereitstellung der Empfängerstuten zu problematisch erschienen. Das größte Problem ist und bleibt jedoch die geringe Erfahrung und Erfolgsquote beim Tiefgefrieren von Pferdeembryonen.

Der Anlass nun doch einen ET beim Pferd vorzunehmen ergab sich, als ein Rinderzüchter bei dem wir den Rinder-ET durchführen eine unheilbar erkrankte Zuchtstute unbedingt spülen wollte. Nach längerem Nachfragen und Drängen des Rinderzüchters willigten wir ein und besorgten uns die nötigen Utensilien (Spülkatheter für Pferde, Y-Schlauch und Spülmedium). Der Haustierarzt übernahm die Follikelkontrollen und die Besamung. Im August letzten Jahres erfolgte nun die Spülung. Nach Reinigung und Desinfektion der Vulva sowie des Scheidenvorhofes schob ich den Spülkatheter unter vaginaler Kontrolle vorsichtig durch die Zervix. Vor dem inneren Zervixring setze ich den Ballon mit 40 – 60 ml Luft. Anschließend flossen 1 – 2 Liter Spülmedium durch den Y-Schlauch in den Uterus und unter Massage über das Scheidendach wieder zurück. Diesen Vorgang wiederholte ich bis 4 Liter Spülmedium verbraucht waren. Nach der Filtrierung im Miniflush-Filter folgte die Embryosuche unter dem Mikroskop.

Die Spülung verlief komplikationslos am sehr frühen Tag 7. Wir hatten eine junge Blastozyste und eine unbefruchtete Eizelle, obwohl bei den Follikelkontrollen keine Doppelovulation bemerkt wurde.

Alles was wir nicht hatten war eine Empfängerstute, sie rosste „pünktlich“ 10 Tage zu spät. Also musste der Embryo eingefroren werden. Auf der ET-Tagung 2006 in Celle wurde über die erfolgreiche TG-Konservierung mit Ethylenglykol ohne Vitrifikation berichtet und so habe ich mich auch für dieses einfachere Verfahren entschieden.

Nach dem Waschen wurde der Embryo für 10 min in Ethylenglykol überführt und nach dem Aufziehen in eine 0,25 ml Paillette in das Alkoholbad bei 5,2 °C für mindesten 5 Minuten gehalten bevor das Seeding ausgelöst wurde. Nach frühesten weiteren 5 Minuten startete das Einfrierprogramm mit einer Einfriergeschwindigkeit von 0,35 °C pro Minute bis auf - 32 C und Sturzkühlung in flüssigem Stickstoff.

Zehn Tage später erfolgte die Übertragung. Nach Reinigung und Desinfektion von Vulva und Scheidenvorhof erfolgte die Übertragung unter rektaler Kontrolle analog zum Rinder-Transfer. Sicherlich kommt einem hierbei die Erfahrung aus dem Rinder-ET zugute, da die Stuten im Darm etwas verspannter und die Uteri eher dilatierter sind und somit die Übertragung noch „feinfühlicher“ durchgeführt werden muss. Die exakte Placierung des Embryos hingegen ist beim Pferd wiederum unbedeutender. Vielfach wird die Übertragung beim Pferd auch unter vaginaler Kontrolle vorgenommen, die in meinen Augen aber sicherlich ein erhöhtes Kontaminationsrisiko in sich birgt.

Zwei Wochen später konnte sonographisch eine Trächtigkeit diagnostiziert werden. Das Ergebnis bestätigte sich mit 7 Wochen. Leider führte die Trächtigkeit im 6. Monat zum Abort, es war ein unauffälliger männlicher Fetus.

Schlussfolgernd aus dieser und den darauffolgenden Spülungen möchte ich sagen, dass der Embryotransfer beim Pferd sich im wesentlichen in folgenden Punkten vom ET beim Rind unterscheidet:

Keine Superovulation, d. h. weniger Aufwand in der Vorbereitung, aber der Spültermin ist schlechter planbar, insbesondere bei der TG-Spülung sollten es keine älteren Blastozysten sein, ältere Stuten sollten jedoch lieber am Tag 8 gespült werden, Temperament der Pferde, Zwangsstand benutzen, höheres Gefahrenpotential, einzelne unbefruchtete Eizellen werden nicht gewonnen, daher schlechtere Kontrolle über die Spülung, Wiederholungs-Spülungen sofort oder zeitversetzt, ganz andere Empfängerproblematik, höherer ökonomischer Wert des Embryos, höherer Gesamtaufwand und somit höhere Kosten des Embryotransfers und auch nicht unbedeutend – eine ganz andere Klientel.

Für die Zukunft denke ich, dass der Embryotransfer beim Pferd auch hier in Deutschland eine stärkere Bedeutung erlangen wird. Eine Empfängerstutenherde in Belgien (Keros) bietet schon ihre Dienstleistung auch in Deutschland inklusive einem organisierten Kurierdienst an.

Verbesserung der Embryonengewinnungsraten durch modifizierte Gewinnungsverfahren bei Holstein Kühen an einer kommerziellen Embryotransferstation**Wolgast, T¹; Detterer, J¹; Reuss, W¹; Schmidt, T²; Meinecke-Tillmann, S³****1 Besamungs- und ET-Station Georgsheil, Südbrookmerland****2 Intergen GmbH; Höchstädt****3 Institut für Reproduktionsbiologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover**

Während der letzten 30 Jahre wurden bei der Embryonengewinnung von superovulierten Rindern und Kühen Ausspülraten zwischen 65 und 75 % erreicht. Ursache dafür könnten suboptimale Gewinnungstechniken und der Verbleib von Embryonen im Reproduktionstrakt der Spendertiere sein.

Ziel dieser Arbeit war es, die Ausspülraten im kommerziellen Embryotransfer durch den Einsatz von uterotonisch wirkenden Medikamenten zu verbessern, welche die Lösung der Embryonen durch myometriale Kontraktionen unterstützen sollten.

Nach Superovulation mit 630 IU FSH (Folltropin-V[®]) in einer absteigenden Dosierung zweimal täglich über 4 Tage und Östrusinduktion mit 500µg Cloprostenol (2 ml i.m. Estrumate[®]) und 25 mg Dinoprost (5 ml i.m. Dinolytic[®]) wurden 174 Holsteinkühe zwischen der 1. und der 12. Laktation in 5 Versuchsgruppen eingeteilt. Vier dieser Versuchsgruppen wurden vor der Embryonengewinnung mit verschiedenen Medikamenten und / oder Placebo behandelt und zwei Uterushornspülungen, sowie einer Vaginalspülung unterzogen, während die fünfte Gruppe als Kontrollgruppe fungierte. Gruppe A (n=36) erhielt eine luteolytische Dosis Dinoprost (25 mg Dinoprost in 5 ml i.m. Dinolytic[®]) 12 bis 16 Stunden vor der Spülung und 10 IE Oxytocin (10 IE in 1 ml i.v. Oxytocin Albrecht[®]) unmittelbar vor Beginn der Embryonengewinnung. Gruppe B (n=34) wurde mit Dinoprost und Placebo (1 ml i.v. 0,9 % isotone Kochsalzlösung) behandelt. Gruppe C (n=37) erhielt Placebo (5 ml i.v. 0,9 % isotone Kochsalzlösung) und Oxytocin. Gruppe D (n=31) erhielt zweimal Placebo (gleiches Zeitschema wie bei Gruppe A beschrieben). Die Kontrollgruppe (E) beinhaltete 36 Tiere. Die Gewinnung der Embryonen erfolgte durch einen einzigen ET-Techniker. Jedes Uterushorn wurde separat mit 400 ml DPBS sieben Tage nach der ersten Besamung gespült. 30 Minuten nach Abschluss der ersten Uterushornspülung wurde die Prozedur mit der gleichen Menge Spülflüssigkeit wiederholt (Gruppen A – D), um den Erfolg des Einsatzes der uterotonischen Medikamente zu überprüfen. Außerdem wurden bei diesen Gruppen Vaginalspülungen durchgeführt, um ausschließen zu können, dass Embryonen möglicherweise durch einen beschleunigten Transport durch den Uterus und anschließenden Ausstoß in die Vagina verloren gegangen sein könnten. Die Embryonen wurden getrennt nach Spülungen und Uterushörnern gezählt und nach den Kriterien der IETS klassifiziert. Die Corpora lutea wurden nach Ende der Spülung mittels Ultraschall (7,5 MHz, Sonovet 2000[®]) dokumentiert und gezählt. Die Ausspülraten konnten anschließend berechnet werden.

Nach der ersten Spülung lagen die Embryonengewinnungsraten für die Gruppen A – E bei 78,1 %, 81,2 %, 74,7 %, 72,4 % und 73,9 %. Der Zugewinn nach der Doppelspülung war in der Placebogruppe D mit 6,7 % am deutlichsten (Zugewinn durch Zweitspülung für die Gruppen A – C: Gruppe A: 3,5 %, B: 2,3 % und C: 3,3 %). Nach der Doppelspülung wurde in den Gruppen A – D eine Gesamtausspülrate (1. und 2. Spülung) von 81,6%, 83,5 %, 78,0% und 79,1 % erzielt, während in der Standardkontrolle E die Ausspülrate bei 73,9 % lag.

Die Anzahl der zusätzlich gewonnenen Embryonen/Eizellen war in Gruppe D im Vergleich zu den Gruppen A – C signifikant höher ($p < 0,05$), was die Hypothese bestätigt, dass durch den

Medikamenteneinsatz die Embryonengewinnungsrate in der ersten Uterushornspülung gesteigert werden konnte.

Bei den Vaginalspülungen konnten keine Embryonen/Eizellen gewonnen werden.

Der Einsatz von Dinoprost und Oxytocin hatte keinen negativen Einfluss auf die Embryoqualität und die Trächtigkeitsraten der gewonnen Embryonen. So bestanden bei Trächtigkeitsraten zwischen 50 und 61 % keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Abschließend kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Applikation von Dinoprost die Embryonengewinnungsrate im kommerziellen Embryotransfer ohne großen Aufwand verbessert. Empfehlenswert ist daher eine Behandlung der Spenderkühe mit einer luteolytischen Dosis Dinoprost 12 - 16 Stunden vor der Embryonengewinnung.