



Universität für Bodenkultur Wien  
Interuniversitäres Forschungsinstitut  
für Agrarbiotechnologie  
Konrad Lorenz Str. 20, A-3430  
Tulln,  
Tel.: +43 (0) 2272 66280 601  
Fax: +43 (0) 2272 66280 603  
Abteilung: **Biotechnologie in der  
Tierproduktion**  
**Prof. Dr. Mathias Müller**



---

## Endbericht

zum Forschungsprojekt

### **„Vergleichsstudie zum frühzeitigen Re-Transfer *in vitro*- produzierter Rinderembryonen für die Erzeugung tiefgefriertauglicher Embryonen und von Nachkommen“**

Projekt: Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und  
Wasserwirtschaft (BMLFUW)  
Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Kultur (BMBWK)

Forschungsprojekt Nr.: 1227, GZ 24.002/80-IIA 1a/00

Finanzierungspartner: FA. Xenogenetik Biotechnologie GmbH

Laufzeit: 36 Monate

Projektbeginn: 23. Mai 2001

Auftragsnehmer: Universität für Bodenkultur Wien  
Department: IFA-Tulln  
Abteilung Biotechnologie in der Tierproduktion  
Konrad-Lorenz-Str. 20  
3430 Tulln  
Tel. 02272 66280 601  
Fax 02272 66280 603

Projektleiter: Prof. DI DDr. G Brem  
Tel: 02272 66280 601

Projektpartner: FA. Xenogenetik Biotechnologie GmbH

## INHALTSANGABE

1	<b><u>Einleitung zum Projekt</u></b>	4
	Übersichtsdiagramm	6
2	<b><u>Projektarbeiten</u></b>	7
2.1	Follikelanbildung und Eizellgewinnung beim Rind:	7
2.1.1	Follikeldynamik als Voraussetzung zur Eizellgewinnung - Dominanzpunktion	9
2.1.2	Follikelentwicklung unter Einbeziehung steroidaler Hormone	14
2.1.3	Transvaginale ultraschallgeleitete Follikelpunktion - stationäre und ambulante Anwendung	24
2.2	<i>In vitro</i> -Produktion	37
2.2.1	Einsatz von Glutathion in der <i>In vitro</i> -Produktion	38
2.2.2	Einsatz von Swim-up Techniken	43
2.2.3	Untersuchungen zur Viskosität im Rahmen der <i>In vitro</i> - Fertilisation	48
2.2.4	Optimierung der <i>In vitro</i> -Befruchtung	53
2.2.5	Wirkung unterschiedlicher Proteinsupplementierungen auf die Embryonalentwicklung	60
2.2.6	Wirkung unterschiedlicher Proteinsupplementierungen auf die Kryokonservierung	65
2.2.7	Wirkung unterschiedlicher Proteinsupplementierungen auf die Morphologie	79
2.3	Entwicklungsdynamik im Eileiter	103
2.3.1	Entwicklungsdynamik tubaler Embryonalstadien beim Rind	103
2.4	<i>In vivo</i> -Kultur von Rinderembryonen	112
2.4.1	Untersuchungen zur Eileiterkultur <i>in vitro</i> -produzierter Rinderembryonen	113
2.4.2	Untersuchungen zur Etablierung eines Systems für die <i>In</i> <i>vivo</i> -Kultivierung von <i>in vitro</i> -produzierten Rinder- embryonen: Transfer von unterschiedlich entwickelten Embryonalstadien	124

2.4.3	<i>In vivo</i> -Kultur von <i>in vitro</i> -produzierten Embryonen im homologen Eileiter: eine technisch-methodische Adaptierung	131
2.4.4	Optimierung der <i>In vivo</i> -Kulturdauer zur effizienten Embryoproduktion	146
2.4.5	Einfluss der Kurzzeitinkubation von Samen mit Eizellen auf die weitere <i>In vivo</i> -Entwicklung	159
3	<b><u>Zusammenarbeit, Besuche, sonstige Kontakte im Rahmen des Projekts, Ausbildungs- und Fortbildungsmaßnahmen</u></b>	176
3.1	Projektbezogene Kontakte und Kooperationen	176
3.2	Besuche und Einsicht in die Arbeiten anderer Labors - Besuche von Instituten, Mitwirken an Arbeitskreisen	177
3.3	Wissenschaftliche Aktivitäten	178
3.3.1	Teilnahme an Konferenzen	178
3.3.2	Vorträge	179
3.3.3	Publikationen bzw. Abstracts	180
3.3.4	Poster	181
3.3.5	Eingereichte Manuskripte	182
3.4	Ausbildungs- und Weiterbildungsmaßnahmen	182
3.5	Projektbezogene Kontakte	183
4	<b><u>Kritische Betrachtung des Projekts</u></b>	184
4.1	1. Projektjahr	184
4.2	2. Projektjahr	186
4.3	3. Projektjahr	189
5	<b><u>Zusammenfassung/Summary</u></b>	190
5.1	Zusammenfassung	190
5.2	Summary	193
6	<b><u>Ausblick: Bewertung der Ergebnisse</u></b>	196
7	<b><u>Bedeutung des Projekts für internationale Zusammenarbeit bzw. Studien und Anwendungen</u></b>	198

## 1 Einleitung zum Projekt

Die „Künstliche Besamung“ stellt die derzeit weltweit am häufigsten genutzte Biotechnologie in der Landwirtschaft dar. Die Einsatzmöglichkeit der künstlichen Besamung übertraf zu Beginn alle Vorstellungen. Daher wurde diese Technik nicht, wie zuerst angekündigt, auf relative kurze Zeit eingesetzt, sondern hat bis heute eine fortwährende Weiterentwicklung mit maximalem Anwendungsspektrum erfahren. Klar definierte Ziele wie:

- 1) Hygienische Sanierung von Betrieben
- 2) Aufbau und Erhalt von Betrieben
- 3) Zuchttechnische Maßnahmen, Zuchtziele, Zuchtkontrolle

ließen der künstlichen Besamung ein breit angesetztes Interesse zukommen. Dieses Interesse für die Zuchtkontrolle auf der männlichen Tierebene ist ausschließlich darauf zurückzuführen, dass die Keimzellproduktion nach Eintritt der Geschlechtsreife in nahezu unerschöpflichen Maße abläuft, deren Gewinnung aus anatomischen Gründen einfach und wiederholt für die Routine geeignet ist.

Mittlerweile ist die Biotechnologie beim weiblichen Tier von erheblichen Fortschritten gekennzeichnet und erlaubt gleichfalls den Zugriff auf ein enormes Keimzellreservoir, das entgegen der männlichen Physiologie fötal in großer Zahl und endgültig angelegt wird und von diesem Zeitpunkt an langsam zugrunde geht. Nur wenige Eizellen in Follikelgruppen erreichen über regelmäßig wiederkehrende dynamische Prozesse das Antralstadium, welches die derzeitige Grundlage zu Synchronisationsmaßnahmen, Superovulation oder Eizellgewinnung darstellt.

In Anbetracht verspäteter, jedoch gleicher Einsatzmöglichkeiten für grundlegende züchterische Aspekte würde bei den weiblichen Tieren nun ein nahezu gleichbedeutender Maßstab analog zur künstlichen Besamung anzulegen sein. Ein entscheidender Aspekt für biotechnologische Anwendungen lag und liegt in der Erzeugung von Embryonen als die „früheste Form genetischer Vollständigkeit“ als Konsequenz der kombinierten Verwendung beider Elternteile. Zudem tragen innovative Verbesserungen auf dem Gebiet der Embryogewinnung und vor allem der Übertragung dem weitaus reproduktiveren Part des weiblichen Tieres (keimbewahrende Organanlage, Befruchtungsort, Embryonal- und Fötalentwicklung sowie die Geburt eines gesunden Kalbes) Rechnung und eröffnen zudem eine Verbindung von Wissenschaft (Erkenntnisse auf dem Gebiet der Reproduktion) mit der Praxis (Vermehrung und Erhalt von Nachkommen unter züchterisch relevanten Aspekten).

Obwohl der Weg zur Embryogewinnung komplizierter ist und mehrere Schritte beinhaltet, wurden im Jahr 2002 weltweit 790.000 Embryonen über Spülung bzw. die *In vitro*-Produktion (IVP) gewonnen und 620.000 Embryonen auf Empfängertiere transferiert (Thibier, 2003). Die IVP von Rinderembryonen zeichnet sich dadurch aus, dass Schritte der Embryonalentwicklung, von der unreifen Eizelle über die Befruchtung bis zum transfertauglichen Embryo, außerhalb des Tierkörpers im Labor vollzogen werden können. Insgesamt blickt die Entwicklung und Anwendung der IVP auf mehr als 25 Jahre zurück und stellt eine erhebliche Erweiterung zur konventionellen Superovulation dar. Dennoch lassen die jährlichen Zahlen zur Gewinnung und Übertragung von IVP-Embryonen mit einem minimalen Anteil an der Gesamtaktivität auf mangelnde Effizienz schließen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Unterschiedliche Gewinnungsmethoden von Embryonen und deren Auswirkung auf die Qualität

Teilschritte	Superovulation	<i>In vitro</i> -Produktion
<b>Synchronisation Superstimulation</b>	Notwendig	nicht notwendig, aber möglich
<b>Follikelreifung</b>	Reifung und Ovulation im Tier	Punktion von prämaturen Follikelnhalten und <i>In vitro</i> -Maturation
<b>Befruchtung</b>	meist durch 2 Besamungen	<i>In vitro</i> -Fertilisation
<b>Embryoentwicklung</b>	Im Eileiter und in der Gebärmutter	<i>In vitro</i> -Kultur
<b>Embryo- kryokonservierung</b>	Möglich	z.T. möglich, insgesamt schlechte Überlebenschancen
<b>Embryotransfer</b>	50 – 70 % Trächtigkeitsrate	30 – 50 % Trächtigkeitsrate
<b>Trächtigkeitsverlauf</b>	Unauffällig	vermehrt Aborte möglich
<b>Geburt</b>	Normalverteilt	z.T. schwere Geburten möglich
<b>Kälbergesundheit</b>	Unauffällig	ebenfalls Störungen möglich Large Offspring Syndrome (LOS)
<b>Wiederholung</b>	vereinzelt, in größeren Abständen	bis zu 2 mal pro Woche, über mehrere Monate <ul style="list-style-type: none"> <li>• molekulargenetische</li> <li>• chromosomale</li> <li>• morphologische</li> <li>• metabolische</li> <li>• zytokinetische</li> </ul>
<b>Embryoqualität</b>	meist gut	Unterschiede vorhanden

Dementsprechend stehen sich zur Embryogewinnung zwei Möglichkeiten gegenüber, die sich hinsichtlich der Spendertierbehandlung, der Embryogenese und des weiteren Einsatzes deutlich unterscheiden. Embryonen, die sich vollständig im Tier entwickeln, sind von signifikant besserer Qualität, aber in geringerem Maße zu gewinnen, während die IVP den Zugang zu einem wesentlich größeren Spenderbereich und auch zu einer höheren Anzahl an Eizellen schafft, deren Weiterentwicklung nur unter erheblichen qualitativen Einbußen vonstatten geht.

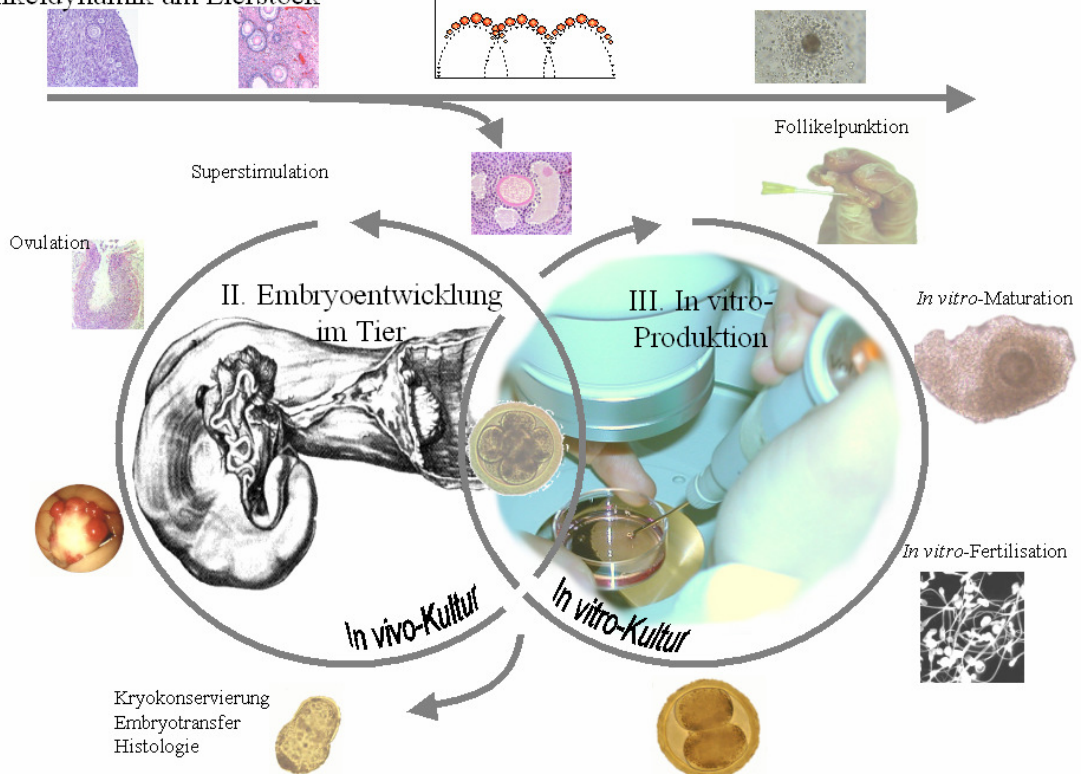
Ziel des Projektes war es, die Grundvoraussetzungen der IVP als zentrale Ausgangstechnik zu nutzen, wobei aber die Entwicklung der Eizelle/des Embryos im Tier im Vordergrund stand. Wissenschaftlicher Schwerpunkt dabei war die Nutzung des Eileiters zu unterschiedlichen Synchronitätszeitpunkten im Hinblick auf parallele *In vitro*-Entwicklungsabläufe, um schließlich aus praktischer Sicht den optimalen Zeitpunkt zu finden und das entsprechende Entwicklungsstadium über den erfolgreichen Transfer zur Kälberproduktion zu führen.

## Literatur

Thibier M. (2003): More than half a million bovine embryos transferred in 2002 a report from the IETS data retrieval committee. Embryo Transfer Newsletter, 21(4), 12-19.

## Versuchsschwerpunkte und Zusammenhänge

### I. Follikeldynamik am Eierstock



## 2 Projektarbeiten

### 2.1 Follikelanbildung und Einzellgewinnung beim Rind

Voraussetzung jeder biotechnologischen Nutzung von Embryonen zur Erzeugung von Nachkommen ist das Vorhandensein von Eierstöcken mit einem natürlichen Pool an Eizellen mit uneingeschränkter Follikeldynamik. Die eigentliche Phase, in der aus dem Pool antraler Follikel selektiv ein Follikel als sprungreifes Gebilde heranwächst, die hormonelle Stimulation zur Superovulation eingeleitet bzw. die Follikelpunktion durchgeführt wird, steht jedoch erst am Ende einer insgesamt langen Entwicklung der Eizelle. Der weitaus längere Entwicklungsabschnitt ist der „transienten Phase“ zuzuordnen, die sich als Entwicklung vom Primordialfollikel bis zum makroskopisch sichtbaren Tertiärfollikel beschreiben lässt (van den Hurk et al., 1997). In dem Moment, in dem der Follikel seine Ruhephase beendet, beginnt die eigentliche Entwicklung, d.h. Wachstum, Zellteilung und Differenzierung charakterisieren diesen Abschnitt (Hunter, 2003). Während dieser Zeit ist die Eizelle einer metabolisch aktiven Mikroumwelt ausgesetzt, unter deren Beteiligung sie verschiedenste Faktoren aufnimmt oder abgibt (Abbildung 1), um selber die morphologischen wie metabolischen Mindestvoraussetzungen zu erlangen, die zur finalen Bereitung notwendig sind (Webb et al., 1999). Verständlicherweise ist somit das Augenmerk vor allem auf die frühe Wachstumsphase der Follikel-Eizelleinheit zu richten, da z.B. viele der Proteine, die die embryonale Präimplantationsphase bestimmen, hier produziert werden (Telfer et al., 1999).

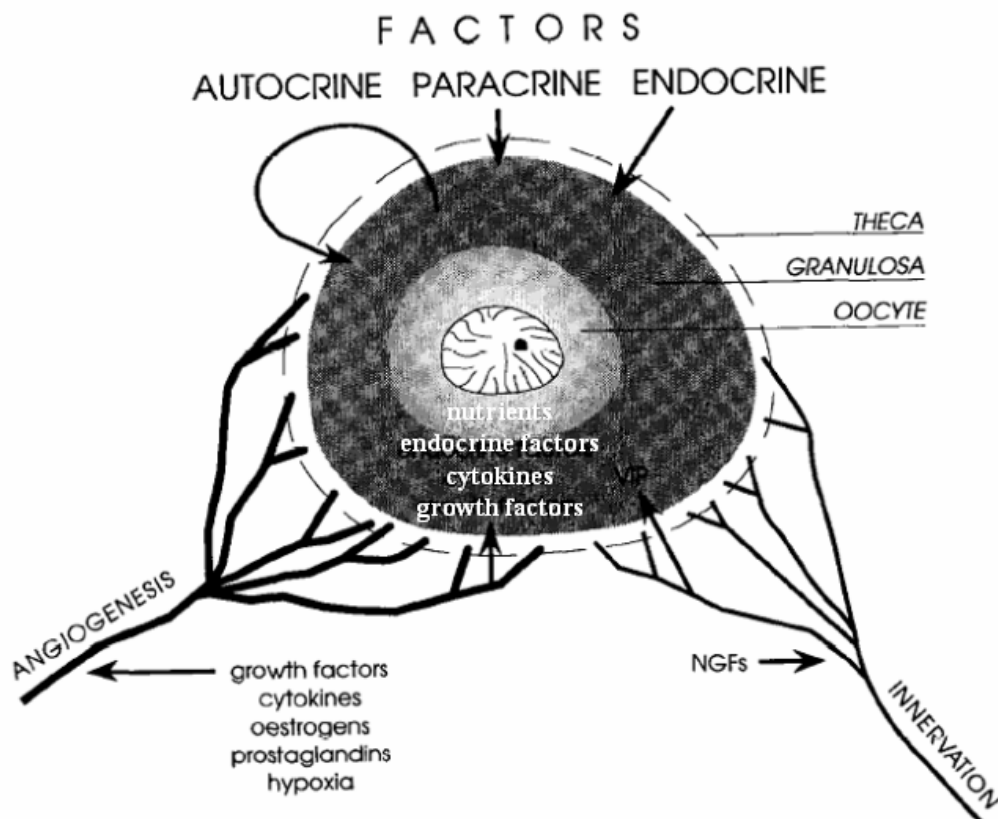


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer möglichen Regulation der präantralen Follikelentwicklung, die durch *In vivo*- und *In vitro*-Untersuchungen gestützt werden (van den Hurk et al., 1997).

Diese Betrachtungen legen nahe, dass ein primär „gesundes“ Eizell- und Follikelwachstum jegliche Grundlage zur weiteren Stimulation oder Gewinnung von Follikeln und Eizellen darstellt, um in weiterer Folge potentielle embryonale Entwicklungsvorgänge erwarten zu können (Rodriguez and Farin, 2004). Daher war es Ziel dieses Arbeitsabschnittes, Untersuchungen durchzuführen, die diese Voraussetzungen auch unter praktisch anwendbaren Aspekten berücksichtigen.

## **Literatur**

Hunter RHF (2003): II Formation and structure of ovaries: elaboration of follicular compartments In *Physiology of the Graafian Follicle and Ovulation* (ed. RHF Hunter), Cambridge University Press, UK.

van den Hurk R, Bevers MM, Beckers JF (1997): In-vivo and in-vitro development of preantral follicles, *Theriogenology* 47, 73-82.

Rodriguez KF, Farin CE (2004): gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reprod Fertil Dev* 16,55-67.

Telfer EE, Webb R, Moor RM, Gosden RG (1999): New approaches to increase oocyte yield from ruminants. *Anim Sci* 68,285-298.

Webb R, Gosden RG, Telfer EE, Moor RM (1999): Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Anim Sci* 68,257-284.



## 2.1.1 Follikeldynamik als Voraussetzung zur Eizellgewinnung – Dominanzpunktion

### 2.1.1.1 Einleitung

Die seit über zwei Jahrzehnten entwickelte und etablierte Follikelpunktion zur routinemäßigen Eizellgewinnung orientiert sich sehr eng an der physiologischen Follikeldynamik. Diese Follikeldynamik spiegelt sich beim Rind nach Eintritt der Geschlechtsreife in einem wellenförmigen Auftreten von Tertiärfollikeln an den Ovarien wieder (Fortune, 1994; Ginther et al, 1989; Pursley et al, 1993). Pro Ovarzyklus werden zwei bis drei Follikelwellen beobachtet, die einer charakteristischen Regelmäßigkeit unterliegen (Driancourt, 1991):

**Rekrutierungsphase:** Heranbilden von mehreren (ca. 6) kleineren (1-2 mm) Tertiärfollikeln, die im weiteren eine Größenzunahme erfahren ( $\leq 5$  mm).

**Selektionsphase:** In dieser Phase wird der größte Follikel aus der Rekrutierungsphase dominant, d.h. er unterdrückt die Freisetzung von Gonadotropinen aus dem Hypophysenvorderlappen; daraufhin wird das Wachstum der kleineren Follikel der Rekrutierungsphase eingestellt und somit weitere Vorgänge unterdrückt, die zur Erlangung der Entwicklungskompetenz führen würden.

Der dominante Follikel durchläuft drei Phasen:

- Wachstum** - Vergrößerung des Durchmessers
- Stasis** - kleine Veränderungen des Durchmessers
- Atresie** - Verkleinerung des Durchmessers

Um dieser Wachstumsunterdrückung kleinerer Follikel durch den dominanten Follikel vorzubeugen, hat sich in der Praxis die zweimal wöchentliche Follikelpunktion durchgesetzt (Gibbons et al., 1995; Broadbent et al., 1997; Garcia et al., 1996; Garcia und Salaheddine, 1998). Bei diesem Punktionsrhythmus befinden sich die heranwachsenden Follikel gerade in oder vor der Selektionsphase, d.h. der dominante Follikel übt seinen negativen Entwicklungseinfluss auf die kleineren Follikel noch nicht aus. Nachteil dieser zweimaligen Follikelpunktion pro Woche und über einen größeren Zeitraum ist die im optimalen Fall zu bewerkstellende permanente Vorbereitung bzw. Synchronisation von Empfängertieren und die labortechnisch und zeitaufwendige Bereitstellung aller *In vitro*-Abschnitte. Ziel des vorliegenden Abschnittes war die mehrfache Punktion größerer (dominanter) Follikel über einen längeren Zeitraum unter Beobachtung des weiteren Follikelpotentials für deren mögliche Gewinnung zu bestimmten Zeiten mit optimaler Follikelrepräsentanz am Eierstock.

### 2.1.1.1 Material

Für diese Studie wurden 10 Rinder mit regelmäßigen zyklischen Ovaraktivitäten ausgewählt. Im Diöstrus wurden diese Tiere durch zweimalige Applikation von PGF $2\alpha$  im Abstand von 12 Stunden synchronisiert. Am 5. Zyklustag wurden die Rinder alle 48 Stunden mit dem Ultraschallgerät (Sektorscanner, 7,5 MHz, Hitachi)

untersucht, und die vorhandenen Follikel entsprechend ihrer Größe in Klassen eingeteilt:

Kleine Follikel:	< 4 mm im Durchmesser
Mittlere Follikel:	4 – 8 mm im Durchmesser
Große Follikel:	> 8 mm im Durchmesser

Bei jeder Untersuchung wurden alle Follikel, die größer als 8 mm im Durchmesser waren, abpunktiert. Um die Dauer eines Zyklus abzudecken, wurden diese Untersuchungen über den Zeitraum von 20 Tagen durchgeführt.

### 2.1.1.3 Ergebnisse

10 Rinder wurden über 20 Tage alle 48 Stunden untersucht und bei Vorhandensein „großer Follikel“ einer Punktion unterzogen, d.h. insgesamt liegen dieser Studie 100 Ultraschalluntersuchungen bzw. Punktionssitzungen zugrunde. Während dieser Zeit wurde entsprechend der Follikelüberwachung eine Ovulation unterbunden. Über die angegebene Zeit wurde ein Follikelpotential von insgesamt 1842 Follikel protokolliert, die sich nach nachfolgendem Muster verteilt hatten. Vom Zyklustag 5 bis zum Tag 11 war ein deutlicher Anstieg in der Zahl der Follikel zu erkennen (Abbildung 2). Die meisten Follikel waren dabei in der Kategorie der „kleinen Follikel“ wiederzufinden. Mittlere und große Follikel spielten zahlenmäßig nur eine untergeordnete Bedeutung (unter 30%, siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Darstellung der Follikeldynamik unter dem Einfluss der Dominanzpunktion

Sitzung	Zyklustag	Follikelkategorien			
		n = 10 Rinder	< 4 mm	4 – 8 mm	> 8 mm
1	5		104	30	12
2	7		100	15	0
3	9		112	33	9
4	11		164	20	6
5	13		163	23	7
6	15		176	27	7
7	17		161	58	1
8	19		180	20	7
9	21		178	26	7
10	23		148	42	6
Summe			1486	294	62

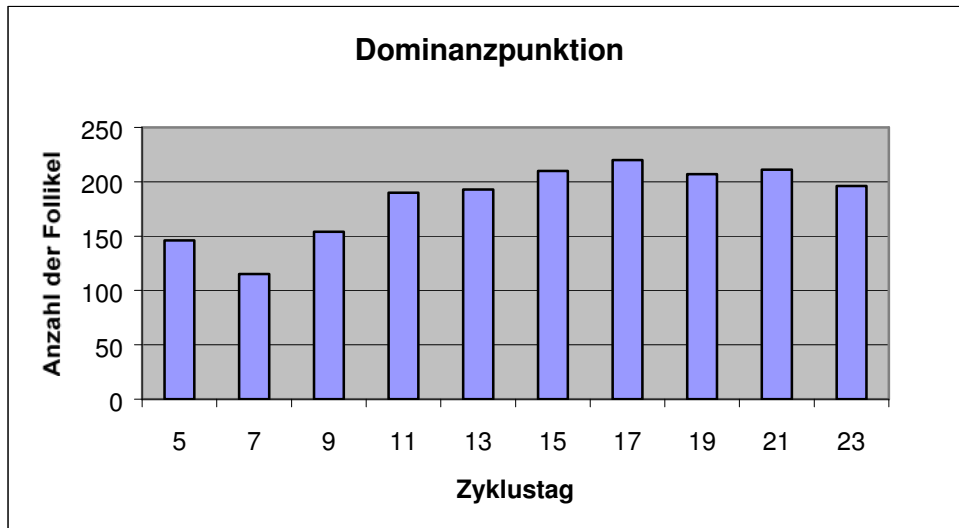


Abbildung 2: Darstellung der vorhandenen Follikel ( $n = 10$  Tiere), den Zyklustagen zugeordnet nach Dominanzpunktion

Im Durchschnitt wurde bei gut der Hälfte aller Tiere in jeder Sitzung ein dominanter Follikel abpunktiert. Abbildung 3 gibt ein Beispiel zum Verlauf der Follikelanbildung bei drei Rindern. Am 11. bzw. 13. Tag ist eine Stagnation der Follikelanbildung zu sehen, die über den weiteren Verlauf der Punktionsitzungen wieder zurückgehen.

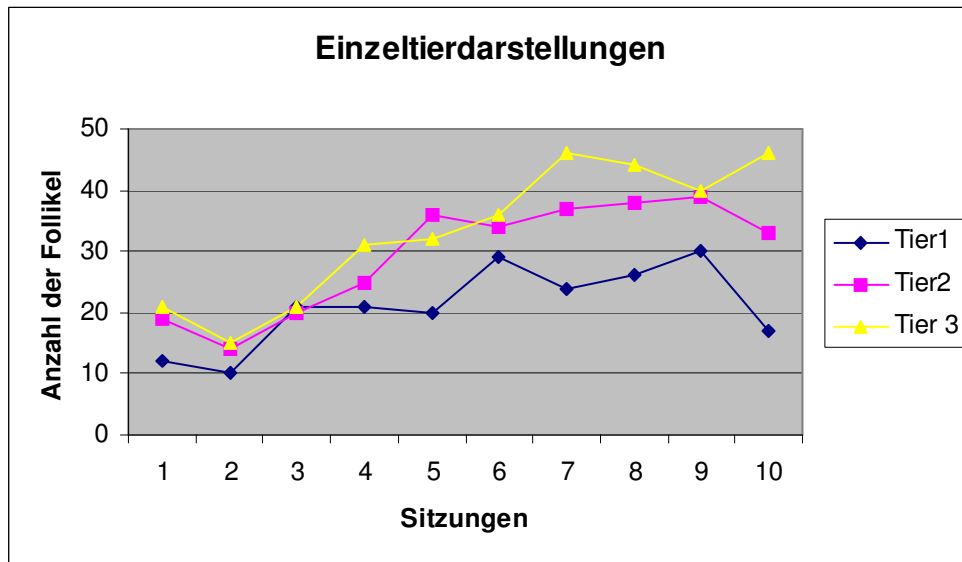


Abbildung 3: Darstellung der Follikelanbildung von drei Rindern im Rahmen einer 20-tägigen Dominanzpunktion

#### 2.1.1.4 Diskussion

Mit den Ergebnissen aus der Dominanzstudie konnte deutlich gezeigt werden, dass durch die Entfernung des größten Follikels dessen Hemmeffekt auf das Wachstum kleinerer Follikel ausbleibt. Auf diese Weise ergeben sich für das Projekt neue Ansätze zur gezielten Gewinnung von Eizellen, ohne auf eine zweimal wöchentliche Punktion zurückgreifen zu müssen. Wie aus den Darstellungen hervorgeht, kann diese Steigerung in der Anzahl ultraschalltechnisch erkennbarer Follikel bis um den 12. Zyklustag durchgeführt werden. Weitere Punktionen des dominanten Follikels führen zu keinem zusätzlichen Anstieg der Anzahl punktierbarer Follikel. Es ist außerdem ersichtlich, dass gegen Ende der Lutealphase die Anzahl der Follikel wieder abnimmt.

Für den Ausblick dieser Untersuchungen ergeben sich weitere Fragestellungen, deren fortführende Untersuchung im Projekt eine Ausschöpfung und Bereitstellung von Eizellen im Rahmen der Follikelpunktion in Aussicht stellt:

1. Ausdehnung der Untersuchungen zur Follikeldynamik über den Zeitraum einer Zykluslänge auf die Dauer der Follikulogenese (80 – 105 Tage), d.h. Erstellung eines Follikelprofils über 3 – 4 Ovarzyklen.
2. Nachdem aus den Ergebnissen ein Abfall der Follikelzahlen am Ende einer Lutealphase zu erkennen war, ist zu prüfen, unter welchen synergistischen Einflüssen das diöstrische Hormon Progesteron zur Follikeldynamik steht.
3. Es sind zusätzliche induktive Ansätze nötig, um das aufgezeigte Follikelpotential besser für die *In vitro*-Produktion ausnützen zu können.

#### 2.1.1.5 Literatur

Broadbent PJ, Dolman DF, Watt RG, Smith AK, Franklin MF (1997): Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle. *Theriogenology* 47, 1027-1040.

Driancourt MA (1991): Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology* 35, 55-79.

Fortune JE (1994): Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 50,225-232.

Garcia A, Cherdieu J, Rademakers A, Salaheddine M (1996): Once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration in the cow. 12e Réunion A.E.T.E.- Lyon, 13-14 September, 130.

Garcia A, Salaheddine M (1998): Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology* 50,575-585.

Gibbons JR, Beal WE, Krisher RL, Faber EG, Pearson RE, Gwazdauskas FC (1995): Effects of one- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology* 42,405-419.

Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP (1989): Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil* 87,223-230.

Pursley JR, Stevenson JS, Minton JE (1993): Ovarian follicular waves in dairy cows after administration of gonadotropin-releasing hormone at estrus. *J. Dairy Sci* 76, 2548-2560.

## 2.1.2 Follikelentwicklung unter Einbeziehung steroidaler Hormone

### 2.1.2.1 Einleitung

Zahlreiche Arbeitsgruppen berichteten über den Einsatz von Gestagenen, um eine bestmögliche Entwicklungskapazität der Eizelle in Hinblick auf die Embryoproduktion und Erzeugung einer Trächtigkeit zu gewährleisten. Bei Kälbern und Lämmern ist bekannt, dass die zusätzliche Gabe von Gestagenen erst die *In vitro*-Produktion von transfertauglichen Embryonen ermöglicht (Armstrong et al., 1992; Armstrong et al., 1997; Earl et al., 1994, Earl et al., 1995; Flynn et al., 2000; Tervit, 1996). Kühe, die bei der Vorstellung für die Embryogewinnung aus Superovulation Zysten aufweisen, werden im Standardverfahren mit Vaginal- oder Ohrimplantaten behandelt und zeigen - abhängig vom Ausmaß der zystösen Vorphase - überdurchschnittlich gute Superovulationsreaktionen. Für die Routinepunktion bzw. Superovulation wird bevorzugt zwei Tage vor Follikelstimulation zum Beispiel ein Ohrimplantat verwendet, dessen Einsatz eine stabilere Anzahl von Embryonen/Eizellen erwarten lässt (Lacaze et al., 1997). Eine besondere Bedeutung hat die Follikelpunktion unter dem Einfluss des Gestationsgelbkörpers in den ersten 3 Trächtigkeitsmonaten gezeigt (Meintjes et al., 1993). Da beim Rind mit dem Eintritt der Geschlechtsreife u.a. zyklische Vorgänge am Eierstock ablaufen, deren Diöstrus unter dem Einfluss des Progesterons bestimmt wird, hat sich der vorliegenden Teil der Untersuchung auf die Zusammenhänge zwischen diöstrischem Progesteron und der Follikeldynamik am Ovar über die Dauer von 3 Monaten konzentriert.

### 2.1.2.2 Methode

Insgesamt wurden 23 Rinder zu diesen Ultraschalluntersuchungen verwendet. In diesen Untersuchungen wurden ausschließlich die Follikel in ihrer Anzahl und Größe bestimmt und über die Dauer von 3 Zyklen registriert. Zu Beginn wurden alle Tiere mit PGF2 $\alpha$  synchronisiert und 3 Gruppen zugeordnet:

Gruppe N	10 Rinder	Ohne zusätzlich Behandlung
Gruppe P	5 Rinder	Rinder erhielten jeweils am 9., 11. und 13. Zyklustag 20 ml Progesteron (25 mg/ml)
Gruppe H	8 Rinder	Rinder wurden während der Dominanzphase der ersten Follikelwelle mit 1.500 I.U. hCG behandelt, um diese Follikel zusätzlich zur Ovulation zu bringen

endogenes Progesteron Gruppe N;

endogenes + exogenes Progesteron Gruppe P;

endogenes Progesteron unter dem Einfluss der 2. Ovulation Gruppe H.

Die Rinder wurden jeden zweiten Tag mittels Ultraschallgerät (Sektorscanner, 7,5 MHz, Hitachi) untersucht. Alle Rinder wurden nach der initialen Synchronisation tierindividuell zur Zyklus- und Follikelbeobachtung herangezogen, d.h. es wurden bei jedem Tier im 2-Tagesrhythmus über die Dauer von 3 Ovarzyklen die Follikel

unabhängig davon bestimmt, wie lange jeweils die einzelnen Zyklen dauerten. Im perioovulatorischen Zeitraum wurde täglich untersucht.

### 2.1.2.3 Ergebnisse

In insgesamt fast 1000 Ultraschalluntersuchungen konnte in allen drei Gruppen (Gruppe P, H, N) gezeigt werden, dass die Anzahl aller Follikel vom ersten bis zum dritten Zyklus zugenommen hat. Die Gruppe H wies über den gesamten Messzeitraum tendenziell eine höhere Anzahl von Follikeln auf als die Gruppen N und P (Abbildung 4).

Die Zunahme der Follikelzahlen war vor allem in der Kategorie der kleinen Follikel mit einem Durchmesser von  $< 4\text{mm}$  zu finden. Alle drei Messgruppen (Gruppe P, N, H) zeigten einen nahezu linearen Anstieg der Follikel über alle drei Zyklen (Tabelle 3).

Follikel mit einem Durchmesser  $> 4\text{mm}$  hingegen traten weniger häufig in Erscheinung und ließen auch ein uneinheitliches Verlaufsbild erkennen. Während die Follikel aus Gruppe N (Kontrollgruppe) konstant von Zyklus 1 bis 3 zunahmen, war bei den großen Follikeln ( $> 4\text{mm}$ ) aus Gruppe P (Progesterongruppe) eine Abnahme zu verzeichnen. Demgegenüber waren diese Follikel der Gruppe H keinem dieser Erscheinungsmuster zuzuordnen.

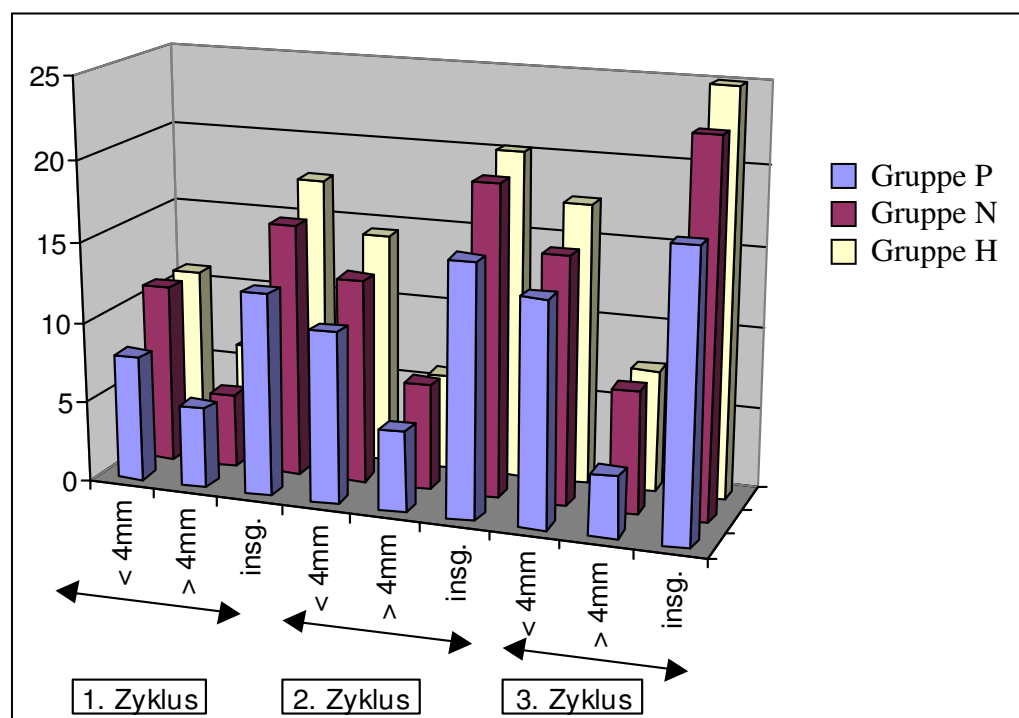


Abbildung 4: Rekrutierung der Follikelwellen in Abhängigkeit der Behandlungsgruppen

Tabelle 3: Rekrutierung der Follikelwellen

Zyklen	Follikeldurchmesser	Gruppe P	Gruppe H	Gruppe N
1. Zyklus	< 4mm	7,8	11,1	11,1
	> 4mm	5	6,5	4,6
	$\Sigma$ Follikel	12,5	17,6	15,7
2. Zyklus	< 4mm	10,6	14,4	12,7
	> 4mm	5	5,9	6,6
	$\Sigma$ Follikel	15,6	20,3	19,3
3. Zyklus	< 4mm	13,8	17,4	15,3
	> 4mm	3,8	7,6	7,6
	$\Sigma$ Follikel	17,6	25	22,9

In den untersuchten Gruppen (N, P, H) fiel weiterhin auf, dass Unterschiede bezüglich der Zykluslänge vorhanden waren. Die Tiere aus der Gruppe, die mit Progesteron während des Diöstrus behandelt wurden (Gruppe P), zeigten eine deutliche Zyklusverlängerung mit 22,8 Tagen gegenüber Tieren aus der Gruppe H mit 21,5 Tagen und der Gruppe N, die einen um einen weiteren Tag verkürzten Zyklus (20,4 Tage) aufwiesen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Einfluss von Progesteron auf die Zykluslängen

	Zyklus			
	I	II	III	$\Sigma$ I.-III.
<b>Versuchsgruppen</b>				
Gruppe H	21,3	21,9	21,3	21,5
Gruppe P	22,8	22,2	23,4	22,8
Gruppe N	20,5	21,0	19,8	20,4

Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, ist die Reihenfolge der Gruppen nach der Dauer der jeweiligen Zyklen geordnet über alle 3 Zyklen einheitlich. Dementsprechend zeigte die Gruppe P über alle 3 Zyklen die längsten Intervalle, gefolgt von der Gruppe H, während die Kontrollgruppe (Gruppe N) immer die kürzesten Zykluslängen aufwies.



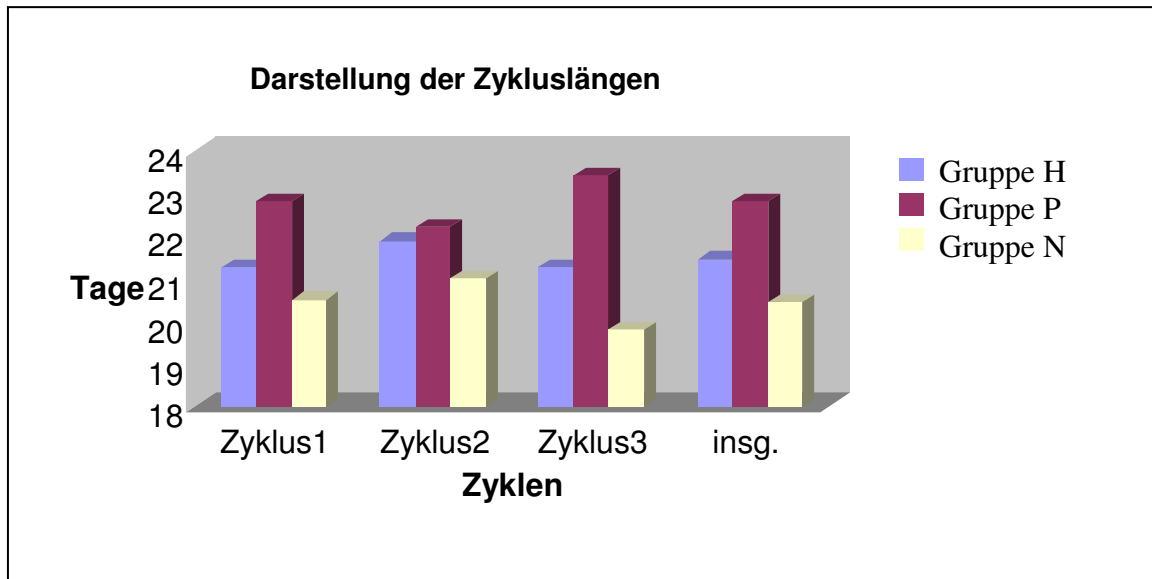


Abbildung 5: Darstellung der Zykluslängen aus 3 Zyklen in Abhängigkeit der Behandlungsgruppen

Aus der Betrachtung der Follikelwellen in den einzelnen Zyklen der verschiedenen Gruppen sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Während Tiere aus der Kontrollgruppe (Gruppe N) 2 bzw. 3 Follikelwellen pro Zyklus zeigten, waren alle Zyklen der Tiere aus der Gruppe H (2. Gelbkörper) durch drei Follikelwellen gekennzeichnet. Vier Tiere aus Gruppe P (zusätzliche Progesteronapplikation) entwickelten ausschließlich 2 Follikelwellen, bei einem Tier waren 3 Wellen zu erkennen.

Die einzelnen Wellen waren wiederum durch die Zeitintervalle auftretender Follikel charakterisiert. Bei der Gruppe H war die 3-wellige Follikelphase dadurch bestimmt, dass die 2. Follikelwelle deutlich länger gegenüber allen Tieren aus anderen Gruppen mit 3 Follikelwellen pro Zyklus war. In der Gruppe P fällt auf, dass bei allen vier Tieren mit 2 Follikelwellen pro Zyklus die 1. Follikelwelle an Länge überwog. Diese längere erste Follikelwelle zeigte zudem vom 2. zum 3. Zyklus hin eine zeitliche Ausdehnung. War im 1. Zyklus das Verhältnis der Tage aus erster und zweiter Welle  $12,8/10$ , so ergab sich für den dritten Zyklus ein Verhältnis von  $15/8$ . (Tabelle 5).

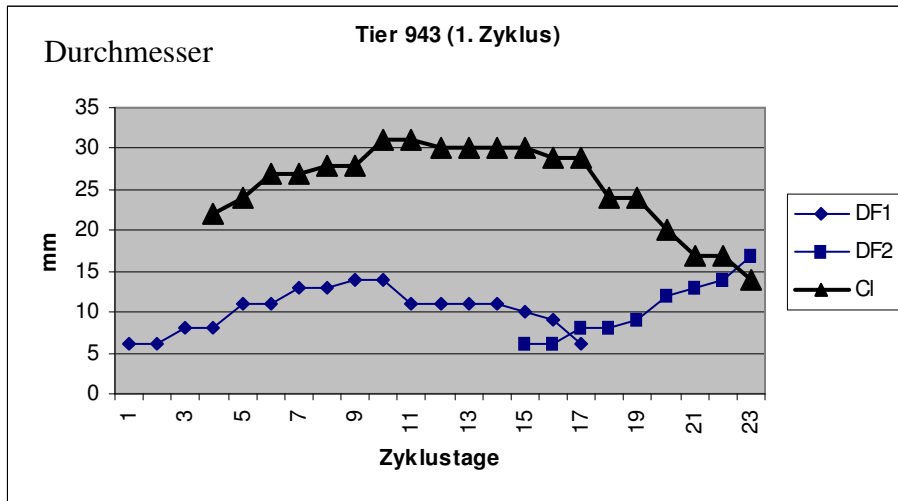
Tabelle 5: Einfluss von Progesteron auf die Länge der Follikelwellen

Versuchsgruppen	Zyklus 1			Zyklus 2			Zyklus 3			$\Sigma$ 1.-3. Zyklen		
	Tagen			Tagen			Tagen			Tagen		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Gruppe H	6,1	8,1	7	6,9	8,1	6,6	6,4	7,9	6,9	6,5	8,0	6,8
Gruppe P	9	8	6	9	6	7	9	8	8			
Gruppe P*	12,8	10		12,5	9,5		15	8		13,4	9,2	
Gruppe N	8,7	5,7	6,3	8,7	6,3	5,7	9,5	6	5	8,9	6	5,8
Gruppe N*	9,7	9,7		11,2	9,6		9,3	9,7		10,1	9,6	

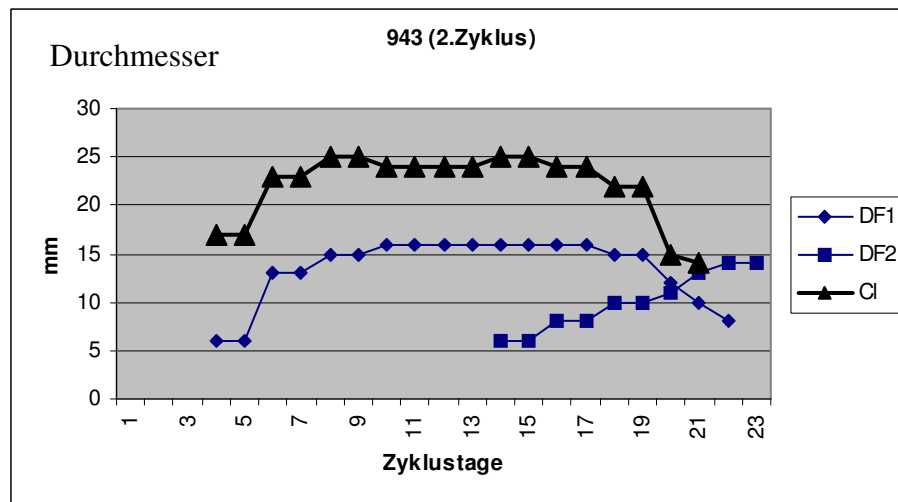
\* Tiere mit 2 Follikelwellen

Im weiteren sind Einzeltierdarstellungen der Gruppen P, N, und H dargestellt, die ein Gruppen-charakteristisches morphometrisches Profil der Gelbkörper und der die jeweiligen Follikelwellen kennzeichnenden dominanten Follikel wiedergibt (siehe Abbildung 6 bis 8).

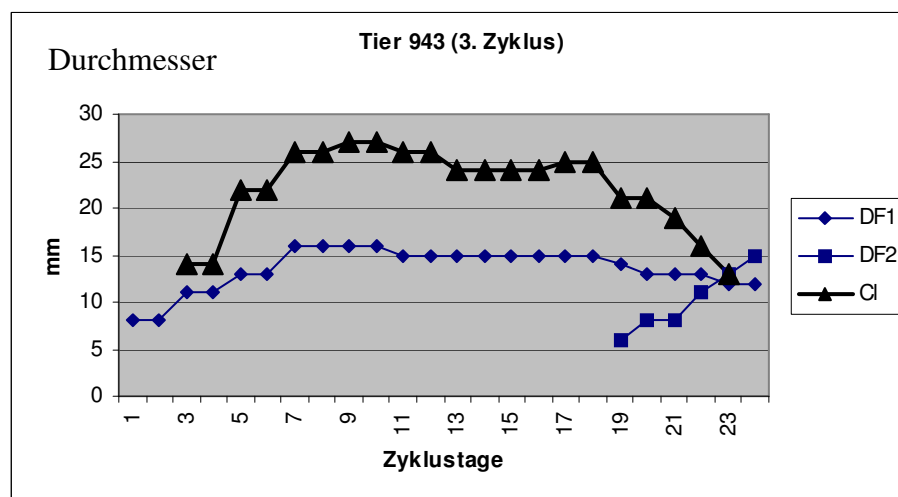
6.1



6.2



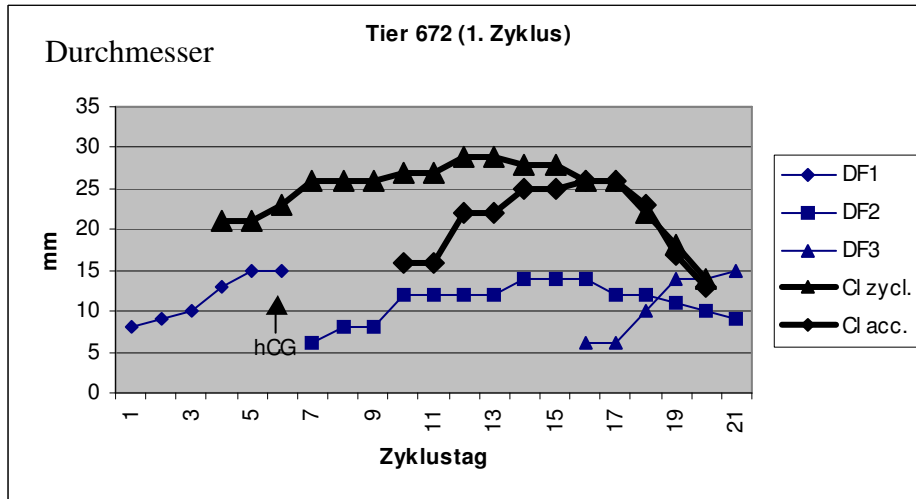
6.3



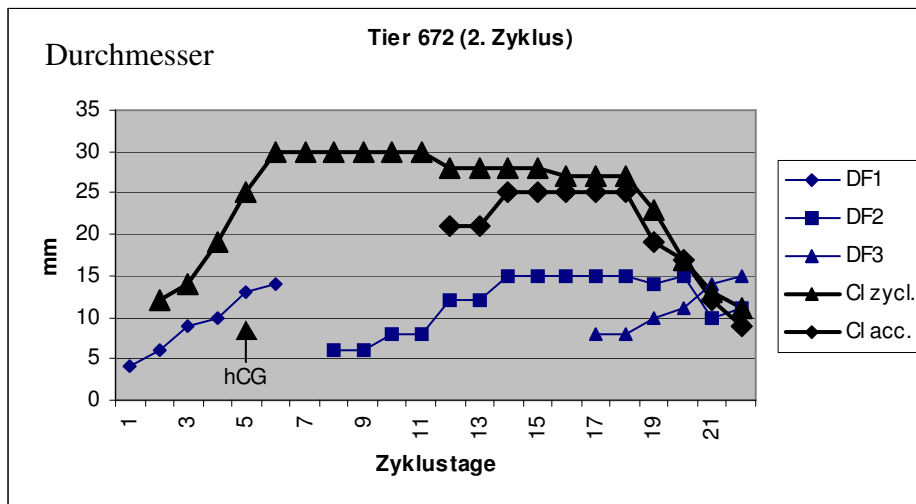
Abbildungen 6.1-6.3:

Einzelstierdarstellungen von Tier 943 aus der Gruppe P: Morphometrische Darstellung des Gelbkörpers (Cl) und der dominanten Follikel aus der ersten (DF1) und zweiten (DF2) Follikelwelle über die Zyklen 1 (6.1), 2 (6.2) und 3 (6.3).

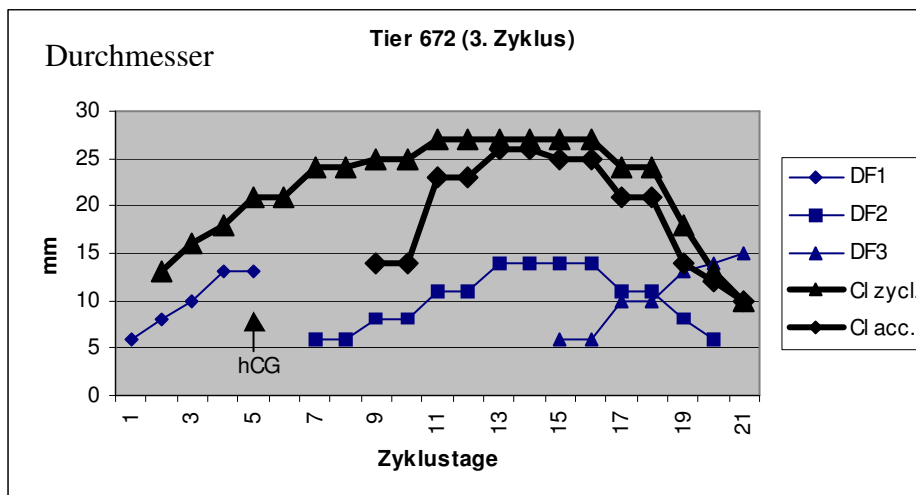
7.1



7.2



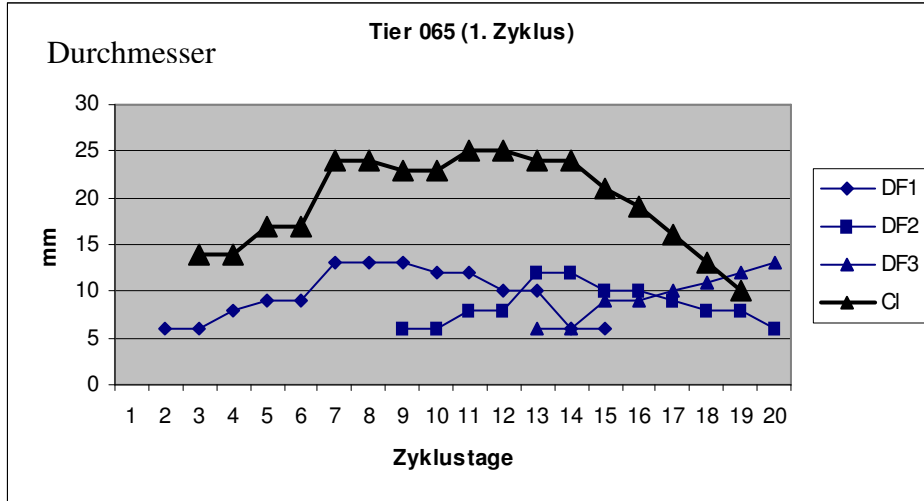
7.3



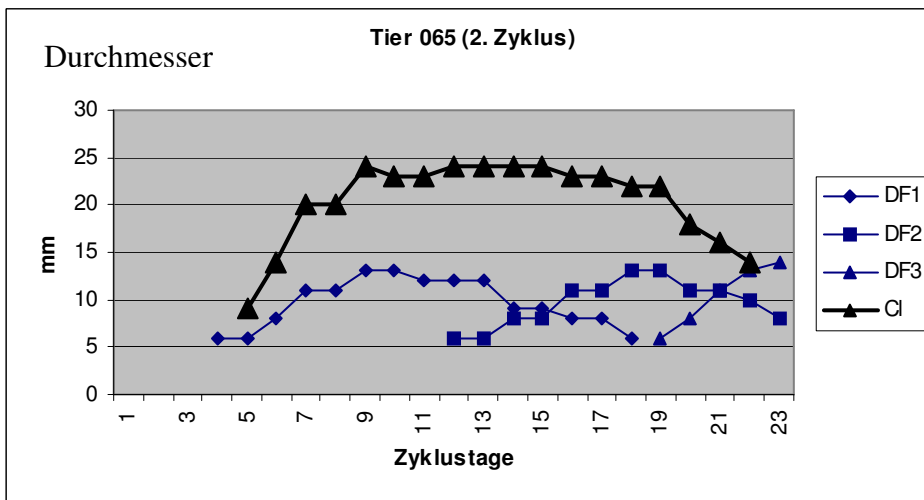
Abbildungen 7.1-7.3:

Einzeltdarstellungen von Tier 672 aus Gruppe H: Morphometrische Darstellung des zyklischen Gelbkörpers (CI zycl.) und des induzierten Gelbkörpers (CI acc.) sowie der dominanten Follikel aus der ersten (DF1), der zweiten (DF2) und der dritten (DF3) Follikelwelle über die Zyklen 1 (7.1), 2 (7.2) und 3 (7.3).

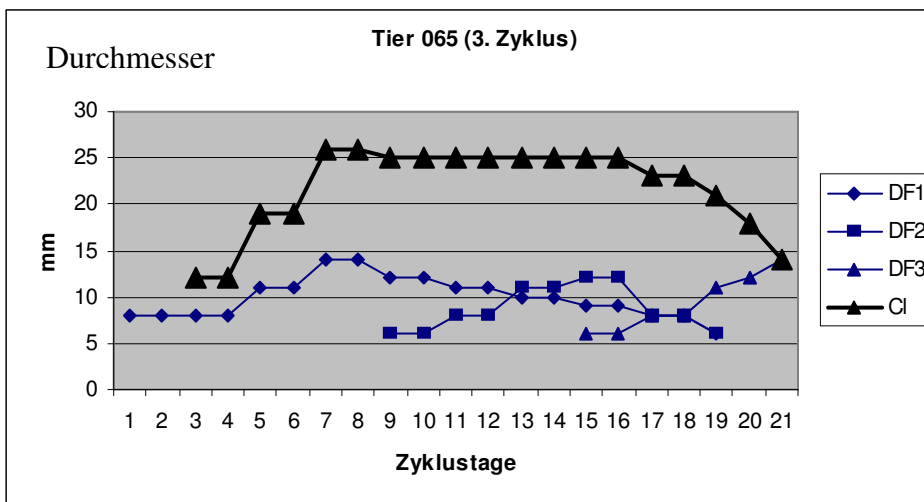
8.1



8.2



8.3



Abbildungen 8.1-8.3: Einzeltierdarstellungen von Tier 065 aus der Gruppe N: Morphometrische Darstellung des Gelbkörpers (Cl) und der dominanten Follikel aus der ersten (DF1), der zweiten (DF2) und der dritten (DF3) Follikelwelle über die Zyklen 1 (8.1), 2 (8.2) und 3 (8.3).

#### 2.1.2.4 **Diskussion**

Die Ergebnisse zeigen, dass über einen längeren Betrachtungszeitraum, welcher der Gesamtzeit einer Follikulogenese entspricht, die Follikelanbildung deutlich von der Progesteronanwesenheit beeinflusst werden kann. Da Rinder in den aufeinanderfolgenden Ovarzyklen Unterschiede in der Produktion des diöstrischen Progesterons aufweisen, wurden in der vorliegenden Studie Beobachtungsgruppen gebildet, die unterschiedlich mit Progesteron vorbereitet wurden. Der Kontrollgruppe, die keine weitere Behandlung erhalten hat, wurde eine Gruppe von Tieren gegenübergestellt (Gruppe P), die zur Unterstützung des endogenen Progesterons eine exogene Applikation erhalten hatten. Um in einer weiteren Gruppe (Gruppe H) auch auf dieses exogen zugeführte Progesteron zu verzichten und dennoch die Progesteronproduktion im Tier deutlich zu steigern, wurde hCG während der Dominanzphase des ersten dominanten Follikels verabreicht (Fricke et al., 1993; Diaz et al., 1998). Dadurch wurde bei jedem Tier dieser Gruppe eine zweite Ovulation ausgelöst und ein zweiter Gelbkörper angebildet.

In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten scheint die regelmäßige Manipulation der Eierstöcke (siehe Kontrollgruppe) ebenfalls eine vermehrte Follikelanbildung zu stimulieren. (Stubbings und Walton, 1995; Boni et al., 1997).

Entsprechend der Gruppenbildung und Gruppengröße lässt diese Arbeit erkennen, dass eine über mehrere Zyklen hinweg stabilisierte Progesteronbereitstellung folgende Einflüssen auf die Follikulogenese/ Follikeldynamik entfalten kann:

- Änderung in der Follikelrekrutierung
  - Vermehrte Anbildung kleiner Follikel
- Beeinflussung der Anzahl von Follikelwellen pro Zyklus
- Beeinflussung der Existenzdauer der Follikelwellen
- Zyklusdauer

Aus dieser Information ist zu folgern, dass bezüglich der Anzahl antraler Follikel zur weiteren Nutzung im Rahmen der Follikelpunktion und anschließender *In vitro*-Produktion oder Superovulation die Vorbereitungsphasen auf einen größeren Zeitraum (Follikulogenese) ausgedehnt werden sollten, in dem das diöstrische Progesteron eine wichtige modulierende Rolle spielt.

#### 2.1.2.5 **Literatur**

Armstrong DT, Holm P, Irvine B, Petersen BA, Stubbings RB, Mclean D, Stevens G, Seamark RF (1992): Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology* 38,667-678.

Armstrong DT, Kotaras PJ, Earl CR (1997): Advances in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reprod Fertil Dev* 9,333-339.

Boni R, Roelofsen MWM, Pieterse MC, Kogut J, Kruip TAM (1997): Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology* 48,277-289.

Diaz T, Schmitt JP, De La Sota RI, Thatcher MJ, Thatcher WW (1998): Human chorionic gonadotropin-induced alterations in ovarian follicular dynamics during the estrous cycle of heifers. *J Anim Sci* 76,1929-1936.

Earl CR, Irvine BJ, Armstrong DT (1994): Development of techniques for the production of viable embryos from six to seven week old lambs. *Proc Aust Soc Anim Prod* 20,428.

Earl CR, Irvine BJ, Kelly JM, Rowe JP, Armstrong DT. (1995): Ovarian stimulation protocols for oocyte collection and in vitro embryo production from 8 to 9 week old lambs. *Theriogenology* 43,203.

Flynn JD, Duffy P, Boland MP, Evans ACO (2000): Progestagen synchronisation in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of persistent follicle in cyclic ewe lambs. *Anim Reprod Sci* 62,285-296.

Fricke PM, Reynolds LP, Redmer DA (1993): Effect of human chorionic gonadotropin administered early in the estrous cycle on ovulation and subsequent luteal function in cow. *J Anim Sci* 71,1242-1246.

Lacaze S, Marquant - Le Guienne B, Delalleau N, Richet L, Maunas S, Nibart M, Humblot P (1997): Centralized in vitro embryo production after ultrasound guided bovine oocyte collection: effects of parity and superovulation treatment. *Theriogenology* 47,161.

Meintjes M, Bellow MS, Broussard JR, Paul JB, Godke RA (1993): Transvaginal aspiration of bovine oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for IVF. *Theriogenology* 39,266.

Stubbings RB, Walton JS. (1995): Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in holstein cows. *Theriogenology* 43,705-712.

Tervit HR. (1996): Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim Reprod Sci* 42,227-238.

### 2.1.3 Transvaginale ultraschallgeleitete Follikelpunktion – stationäre und ambulante Anwendung

#### 2.1.3.1 Einleitung

Ein Schwerpunkt im zweiten Projektjahr war die Anwendung neuerer Reproduktionstechnologien in österreichischen Zuchtbetrieben. Dies bedeutete nicht nur die Durchführung erarbeiteter Techniken, sondern umfasste eine integrierte Bestandserhebung und gegebenenfalls -sanierung. Im Anschluss daran bedurfte es einer Anpassung der Synchronisations- und Stimulationsprogramme an den jeweiligen Betriebsstatus.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen zur Follikelpunktion war die Erarbeitung einer praktikablen Vorgangsweise unter Berücksichtigung regionaler Gegebenheiten. Dies beinhaltete im wesentlichen die Integration der am Institut getesteten Verfahren in zuchtstrategische Überlegungen bei landwirtschaftlichen Betrieben. Nur durch die enge Verknüpfung von Forschungsarbeit und praktischer Anwendung unter Feldbedingungen können biotechnologische Methoden einer breiten Interessensgruppe zugänglich gemacht werden.

Seit den frühen 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts (Nicholas und Smith, 1983) findet die Methode der **M**ultiplen **O**vulation und des **E**mryo-**T**ransfers (MOET) verbreitet Anwendung in Zuchtprogrammen mit dem Ziel, eine größere Zahl an Nachkommen von genetisch hochwertigen Elite-Kühen zu erreichen (Lohuis, 1995). Mittlerweile werden über 500.000 Embryonen jährlich weltweit durch biotechnologische Methoden erzeugt und der Großteil dieser Embryonen wird auf Empfängertiere übertragen (Thibier, 2002).

Die MOET-Methode ist allerdings auf Tiere mit normaler Reproduktionsphysiologie beschränkt (Ward et al., 2000). Gerade Tiere mit einem hohen Leistungspotential erfüllen z.B. sehr oft diese Anforderungen eines klinisch – physiologisch einwandfreien Gesundheitsstatus nicht. Aus diversen Gründen sind nicht alle Rinder für die Embryoproduktion durch Superovulation zugänglich (Boland et al., 1991; Kelly et al., 1997; Kim et al., 2001; Mitchell et al., 1998; Sartori et al., 2003).

Die Follikelpunktion (OPU) mit anschließender *In vitro*-Produktion (IVP) von Rinderembryonen wurde vor über 25 Jahren als ergänzendes Verfahren zur Superovulation etabliert und bietet sehr vielseitig einsetzbare Möglichkeiten, da die einzige Voraussetzung an das Spendertier das Vorhandensein von Antralfollikeln am Ovar ist (Galli und Lazzari, 1996). OPU kann bei Spendertieren jeden Alters ab 2 Monaten bis ins hohe Alter durchgeführt werden. Selbst trächtige Tiere können bis zum 3. oder 4. Graviditätsmonat zur Eizellgewinnung herangezogen werden. Ein Interferieren mit dem physiologischen Reproduktionsstatus findet hier nicht statt, da dieses Verfahren ohne jegliche hormonelle Stimulation durchgeführt werden kann. Darüber hinaus wird sogar ein therapeutischer Effekt, vor allem beim Ovar – Zysten – Syndrom, beobachtet (Galli et al., 2001).

OPU/IVF ist heute eine assistierte Reproduktionstechnologie, mit der es möglich ist, über die Verkürzung der Generationsintervalle einen genetischen Fortschritt zu erreichen. Bereits vor Abschluss der ersten Laktationsperiode können Nachkommen zur Weiterzucht bereitgestellt werden (Merton et al., 2002).

Allerdings ist die Anwendung der OPU/IVF-Technik immer noch mit Nachteilen behaftet, die zu lösen es einer intensiven Forschung bedarf. Hierzu zählen niedrigere Trächtigkeitsraten nach Transfer, erhöhte frühembryonale Mortalität, unproportional große Nachkommen (Large Offspring Syndrom, LOS) sowie eine starke Variabilität in



den Ergebnissen (Farin et al., 2001; Kruip und den Daas, 1997; van Wagendonk et al., 2000; Young et al., 1998).

Der Erfolg des Ovum-Pick-Up (OPU) wird allgemein durch die Wiederfindungsrate (=Anzahl der gefundenen Oozyten / Anzahl der punktierten Follikel) charakterisiert (Pieterse et al., 1988). Diese Erfolgsrate wird durch eine Summe von Faktoren beeinflusst:

1.) Betriebsstandort: Fütterung und Haltung beeinflussen sehr stark die Entwicklungskompetenz als Ausdruck der Eizellqualität. Durch unterschiedliche Managementregimes ergeben sich Variationen in Fruchtbarkeitsparametern (z.B. Follikeldynamik) (Kruip et al., 1994). Zudem ist eine gewisse Selektion der Spendertiere von Vorteil (Merton et al., 2002).

2.) Alter der Spendertiere: Die Technik der Follikelpunktion zur Eizellgewinnung ermöglicht es schon bei Kälbern, transfertaugliche Embryonen zu erzeugen (Armstrong et al., 1997; Earl et al., 1995; Tervit, 1996). Bei graviden Tieren hat die Follikelpunktion unter dem Einfluss des Gestationsgelbkörpers im ersten Drittel der Trächtigkeit eine besondere Bedeutung (Meintjes et al., 1993).

3.) Stimulationsprotokoll: Die Frage nach dem am besten geeigneten Protokoll zur Ovarstimulation, um die höchste Zahl kompetenter Eizellen zu gewinnen, wird weltweit in vielen Embryotransfereinrichtungen diskutiert. Die Eizellgewinnung durch ultraschallgeleitete transvaginale Follikelpunktion (OPU) und die *In vitro*-Produktion erlauben die Erzeugung einer höheren Anzahl an transfertauglichen Embryonen im selben Zeitintervall als die herkömmliche Superovulation und Embryospülung (LOONEY et al., 1994). Um diese Vorgabe zu gewährleisten, bedarf es einerseits der Bereitstellung entwicklungscompetenter Oozyten und andererseits optimaler Laborbedingungen. Eine Vielzahl von unterschiedlichen Vorbehandlungsschemata der Eizellspender wurde und wird weltweit in den Reproduktionszentren erarbeitet, mit dem Ziel, die angestrebte Ausbeute an Eizellen pro Punktionseinheit zu erhöhen. Zur Anwendung kommen hierbei Releaser-Hormone (KOHRAM et al., 1998), Wachstumsfaktoren (Thatcher et al., 2001) Steroidhormone und Gonadotropine (Goodhand et al., 2000).

Die Stimulation mit multiplen FSH-Injektionen resultiert in einer höheren Oozytenzahl als eine nur einmalige Verabreichung von Gonadotropinen (Goodhand et al., 2000; Stubbings et al., 1993), wobei FSH in konstanter oder in abnehmender Dosierung angewendet wird. Hyttel et al. (1997) zeigten, dass Eizellen im präovulatorischen Follikel eine gewisse „Kapazitation“ – also Veränderungen zum Erlangen einer vollen Entwicklungskapazität – durchlaufen. Durch verschieden lange Zeitintervalle zwischen der Stimulation und der Eizellgewinnung können Bedingungen ähnlich wie in atretischen Follikeln geschaffen werden, und beeinflussen einerseits die Wiederfindungsrate nach der Punktion, andererseits die Eizell-Kompetenz (Blondin et al., 1997; Sirard et al., 1999). Unter Berücksichtigung der FSH-Dosis, dem Injektionsschema und dem Intervall zwischen letzter FSH-Injektion und OPU kann im Follikel eine für die weitere Entwicklung vorteilhafte Umgebung geschaffen werden.

### 2.1.3.2 **Material und Methode**

Insgesamt wurden im Zeitraum Juni 2002 bis Dezember 2002 69 Punktionstermine durchgeführt. Davon erfolgten 52 stationär am Institut und 17 ambulant in landwirtschaftlichen Betrieben in Niederösterreich, in der Steiermark und in Tirol. Es wurden 49 Kalbinnen und 20 Kühe zur Eizellgewinnung vorgestellt.

Die Tiere wurden in solcher Weise zyklussynchronisiert, dass sie sich zu Beginn der FSH-Injektionen jeweils im frühen Diöstrus (5. bis 8. Zyklustag) befanden. Bei allen Rindern wurde 42 bis 48 Stunden vor Stimulationsbeginn der dominante Follikel abpunktiert, um die Rekrutierung einer neuen Follikelwelle zu gewährleisten. Hinsichtlich der verabreichten Gonadotropin - Menge wurden 4 Versuchsgruppen untereinander verglichen:

Gruppe 1/1: 400 mg Folltropin (Fa. Vetrepharm, Ontario, Canada)  
 Gruppe 2/3: 267 mg Folltropin  
 Gruppe 1/3: 133 mg Folltropin  
 Gruppe ohne Stimulation: es wurde keine Stimulation durchgeführt

Alle Stimulationen erfolgten in Form von 6 intramuskulären Injektionen, jeweils im 12-stündigen Abstand. Die verabreichte Menge blieb entweder über den gesamten Zeitraum gleich (Gruppe „gleichbleibend“) oder wurde von der ersten zur letzten Injektion kontinuierlich gesenkt (Gruppe „abfallend“, siehe Abbildung 9).

Die Gewinnung der Eizellen erfolgte in einer Versuchsgruppe 36 Stunden nach der letzten Injektion (Gruppe 36 h), die anderen Tiere wurden 24 Stunden nach der Stimulation punktiert (Gruppe 24 h).

Die Aspiration der Oozyten erfolgte mit Hilfe der transvaginalen ultraschallgeleiteten Follikelpunktion. Hierfür wurde eine 7,5 MHz Sektorensode in einem Sondenträger (Fa. Minitüb) verwendet. Das Punktionssystem bestand aus einer 70 cm langen 17G Einweg-Kanüle (Ovum Pick-Up Aspiration Needle V-OPAA-1770, Cook, Australien) mit einer dazugehörigen Schlauchereinheit (Aspiration Line System, Cook, Australien). Die Follikelflüssigkeit wurde durch einen mit einer Vakuumpumpe (Labotec, Göttingen, Deutschland) erzeugten Unterdruck von 60 mmHg in ein Auffanggefäß geleitet. Die gewonnenen Punktate wurden mittels eines Embryofilters (Emcon, Wörrlein, Deutschland) von Beimengungen getrennt und in Petrischalen unter dem Stereomikroskop beurteilt.

Die gefundenen Eizellen wurden für 22 – 24 Stunden in MPM + FSH + 10% OCS maturiert (IVM). Anschließend wurden die maturierten Eizellen für 20 Stunden mit  $1 \times 10^6$  Spermien/ml inkubiert (IVF) und nachfolgend in das Kulturmedium (SOF + 10% OCS) überführt (IVK). Am Tag 7 wurden die Embryonen hinsichtlich ihrer Morphologie und ihres Weiterentwicklungszustandes beurteilt.

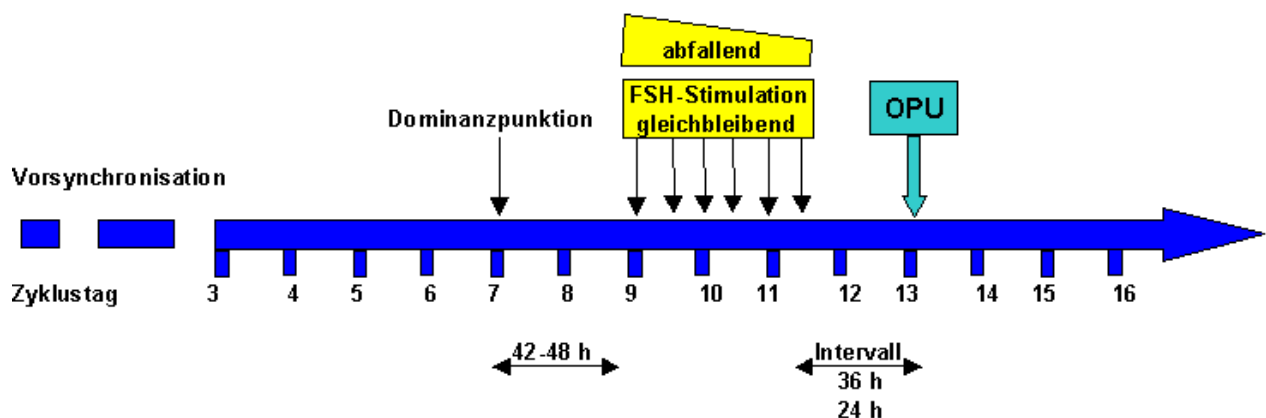


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Stimulations-Protokolls

### 2.1.3.3 Ergebnisse

Von den insgesamt 69 durchgeführten Punktionen erfolgten 52 stationär und 17 ambulant (Tabelle 7). Bei den ambulant behandelten Tieren wurden signifikant ( $p < 0,001$ ; t-Test) mehr Follikel punktiert als bei den am Institut verwendeten Rindern ( $23,88 \pm 6,32$  vs.  $14,62 \pm 7,83$ ). Die Zahl der erhaltenen Oozyten war in der ambulanten Gruppe signifikant ( $p < 0,005$ ; t-Test) höher als in der stationären Vergleichsgruppe ( $14,12 \pm 6,83$  vs.  $8,40 \pm 4,22$ ; Abbildung 10). Die Findungsrate, also die Prozentzahl der gefundenen Eizellen bezogen auf die Anzahl der punktierten Follikel, unterschied sich zwischen den beiden Gruppen nicht ( $57,5\%$  vs.  $59,1\%$ ;  $p > 0,3$ ; Chi-Quadrat-Test).

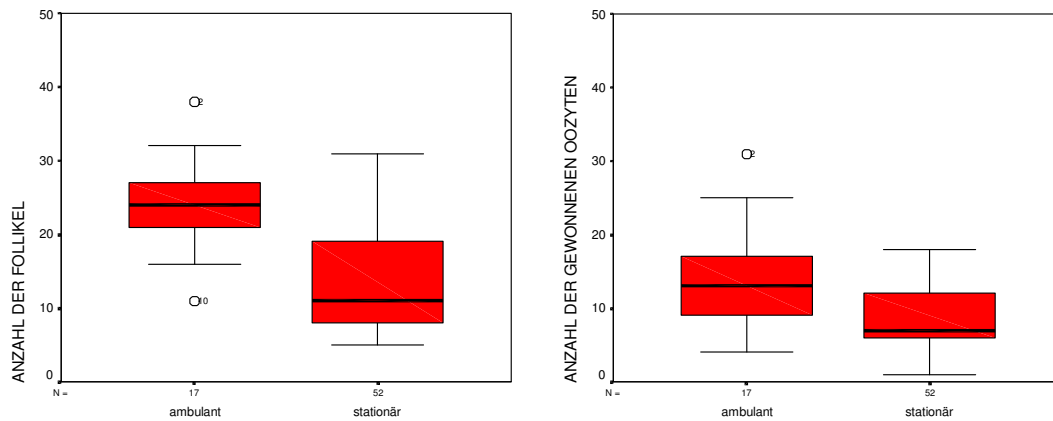


Abbildung 10: Zahl der punktierten Follikel und der gewonnenen Oozyten in Abhängigkeit von ambulant oder stationär durchgeführter Follikelpunktion

Bei der Punktion von Kühen ( $n = 20$ ) ergab sich, verglichen mit den Kalbinnen ( $n = 49$ ), eine höhere Zahl zu punktierender Follikel ( $20,55 \pm 8,95$  vs.  $15,41 \pm 7,87$ ;  $p < 0,05$ ; t-Test; Abbildung 11). Bei Kühen wurden mit  $12,85 \pm 6,77$  Oozyten je Tier eine signifikant größere Eizellanzahl gefunden, im Vergleich zu  $8,57 \pm 4,43$  Oozyten bei Kalbinnen ( $p < 0,05$ ; t-Test). Die errechnete Findungsrate lag bei Kühen wesentlich höher als in der Kalbinnen-Gruppe ( $62,5\%$  vs.  $55,6\%$ ;  $p < 0,05$ ; Chi-Quadrat-Test).

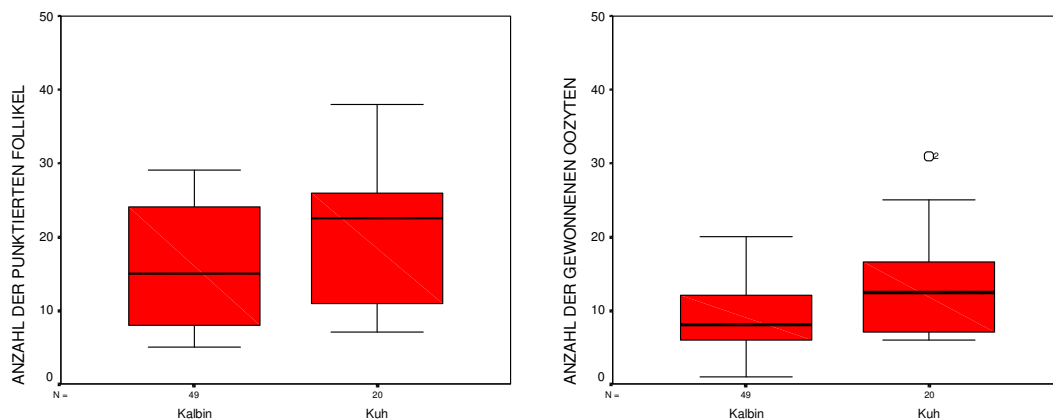


Abbildung 11: Zahl der punktierten Follikel und der gewonnenen Oozyten nach Follikelpunktion bei Kalbinnen oder Kühen

Tabelle 7: Darstellung der Follikelzahlen, der Anzahl an gefundenen Oozyten sowie die Findungsraten in Prozent in den jeweiligen Versuchsgruppen

		OPUs	Follikel punktiert	Oozyten gefunden	Findungsrate (%)
Ort	ambulant	17	23,88 ± 6,32	14,12 ± 6,83	57,5
	stationär	52	14,62 ± 7,83	8,40 ± 4,22	59,1
Alter	Kalbin	49	15,41 ± 7,87	8,57 ± 4,43	55,6
	Kuh	20	20,55 ± 8,95	12,85 ± 6,77	62,5
FSH-Dosis	1/1 FSH	17	21,94 ± 5,83	12,12 ± 4,30	55,2
	2/3 FSH	10	24,70 ± 7,29	15,90 ± 7,68	64,4
	1/3 FSH	21	16,67 ± 8,36	8,14 ± 4,26	48,9
	ohne Stimulation	21	9,33 ± 3,21	6,71 ± 2,83	71,9
Stimulations-Schema	gleichbleibend	34	18,97 ± 7,81	9,76 ± 4,79	51,5
	abfallend	14	23,21 ± 7,57	14,57 ± 6,99	62,8
Intervall	24 h	24	22,75 ± 6,55	13,79 ± 6,01	60,6
	36 h	24	17,67 ± 8,44	8,54 ± 4,46	48,3

Die Gegenüberstellung der verschiedenen FSH-Mengen zur Stimulation ergab eine tendenziell höhere Follikelzahl in der Gruppe „2/3 FSH“ als in der Gruppe „1/1 FSH“ (24,70 ± 7,29 vs. 21,94 ± 5,83). Verglichen mit den Gruppen „1/3 FSH“ (16,67 ± 8,36) und „ohne Stimulation“ (9,33 ± 3,21) zeigten die beiden erstgenannten Gruppen signifikant mehr Follikel ( $p < 0,05$ ; t-Test). Eine ähnliche Verteilung spiegelt sich bei der Oozytenzahl wieder. Die Gruppe „2/3 FSH“ zeigte mit 15,90 ± 7,68 gefundener Eizellen pro Punktioneinheit tendenziell eine höhere Ausbeute als die Gruppe „1/1 FSH“ mit 12,12 ± 4,30 Komplexen. Die Tiere aus den Gruppen „1/3 FSH“ (8,14 ± 4,26) und „ohne Stimulation“ (6,71 ± 2,83) lagen signifikant ( $p < 0,05$ ; t-Test) unter den Werten der Gruppen mit höherer FSH-Dosierung (Abbildung 12).

Mit 71,9% war die Findungsrate bei Tieren ohne Stimulation am höchsten. Ähnlich hohe Quotienten ergaben sich in der Gruppe „2/3 FSH“ (64,4%). Die beiden anderen Gruppen lagen signifikant ( $p < 0,05$ ; Chi-Quadrat-Test) hinter diesen Werten zurück: 55,2% in der Gruppe „1/1 FSH“ bzw. 48,9% in der „1/3 FSH“- Gruppe. Abbildung 15 gibt eine Übersicht über die Findungsraten der einzelnen Versuchsgruppen.

Es wurden auch 2 Versuchsgruppen hinsichtlich des Stimulationsschemas unterschieden. Zwischen Rindern mit 6 gleich großen FSH-Dosen (Gruppe „gleichbleibend“) und Tieren aus der Gruppe mit „abnehmender FSH-Menge“ (Gruppe „abfallend“) zeigte sich in der Follikelzahl kein signifikanter Unterschied (18,97 ± 7,81 vs. 23,21 ± 7,57,  $p > 0,05$ ; t-Test). Allerdings unterschied sich die Oozytenzahl in beiden Gruppen signifikant ( $p < 0,05$ ; t-Test): 9,76 ± 4,79 Oozyten / OPU bei gleichbleibender Gonadotropin-Menge stehen 14,57 ± 6,99 gefundene Eizellen je Sitzung bei reduzierter FSH-Dosis gegenüber (Abbildung 13). Auch lag die Findungsrate in der Gruppe „abfallend“ wesentlich höher als in der Vergleichsgruppe (62,8% vs. 51,5%;  $p < 0,001$ ; Chi-Quadrat-Test).

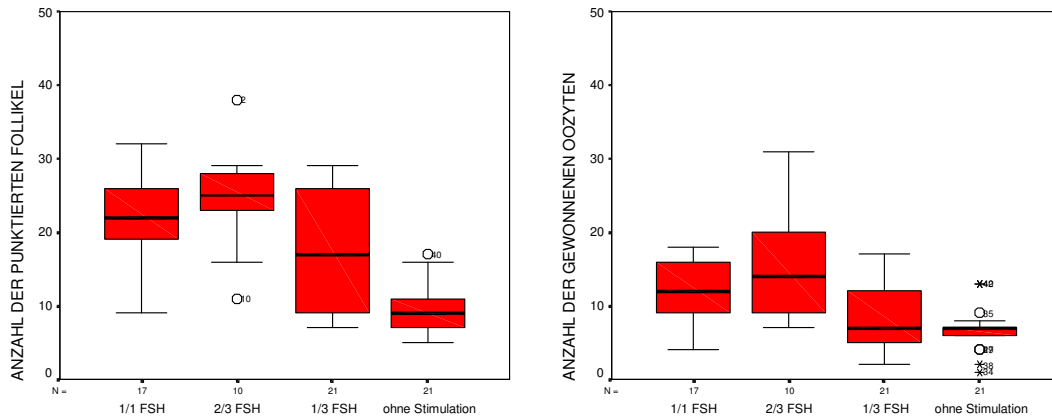


Abbildung 12: Zahl der punktierten Follikel und der gewonnenen Oozyten nach Follikelpunktion im Anschluss an eine Stimulation mit unterschiedlichen FSH-Dosierungen

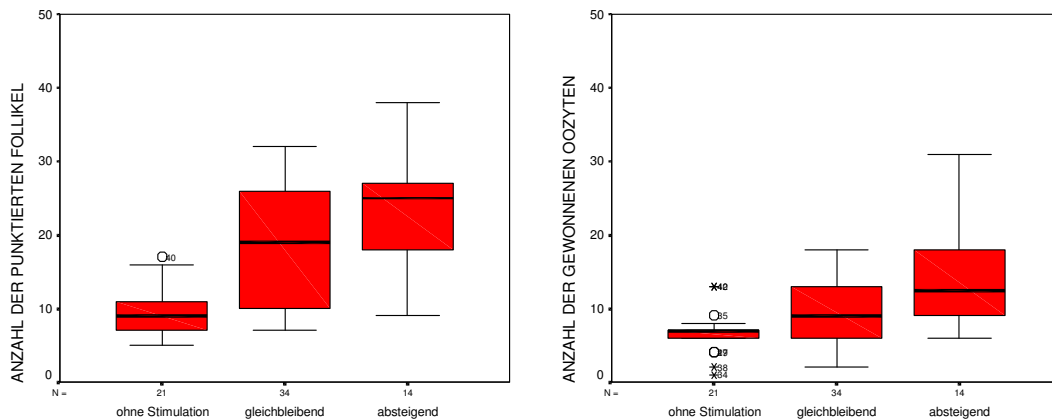


Abbildung 13: Zahl der punktierten Follikel und der gewonnenen Oozyten nach Follikelpunktion im Anschluss an die Stimulation mit gleichbleibendem oder abfallendem FSH-Applikationsschema. Zum Vergleich sind auch die Ergebnisse nach Punktion ohne vorhergehende FSH-Stimulation angeführt

Zudem wurden 2 Gruppen gebildet, die sich durch verschiedene Intervalle zwischen der letzten FSH-Injektion und dem Ovum Pick-up unterschieden. Bei 24 Tieren wurde ein Intervall von 24 Stunden zwischen Stimulationsende und Eizellgewinnung gelegt: in der Vergleichsgruppe ( $n = 24$ ) betrug diese Zeitspanne 36 Stunden. Die Tiere mit 24-stündigem Intervall tendierten zu höheren Follikelzahlen als Tiere mit 36-stündiger Zeitdifferenz ( $22,75 \pm 6,55$  vs.  $17,67 \pm 8,44$ ). Dieser Unterschied manifestierte sich in signifikanter Weise ( $p < 0,001$ ) auch in der Oozytenzahl ( $13,79 \pm 6,01$  vs.  $8,54 \pm 4,46$ ; Abbildung 14). Der aus Oozytenzahl und Anzahl der punktierten Follikel errechnete Quotient spiegelte eine signifikant höhere Findungsrate in der „24 Stunden“-Gruppe wieder, verglichen mit dem 36-stündigen Intervall (60,6% vs. 48,3%).

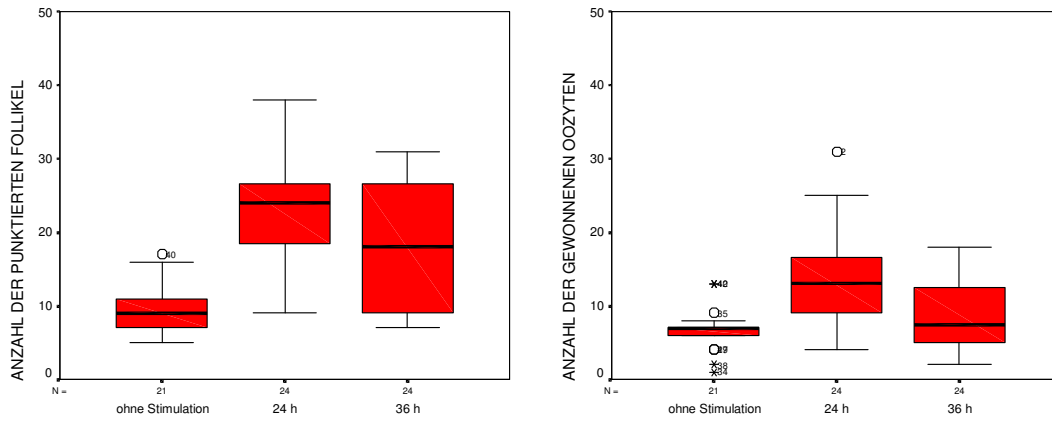


Abbildung 14: Zahl der punktierten Follikel und der gewonnenen Oozyten in Abhängigkeit von einem 24-stündigen oder 36-stündigen Intervall zwischen letzter FSH-Applikation und Punktion. Zum Vergleich sind auch die Ergebnisse nach Punktion ohne vorhergehender FSH-Stimulation angeführt

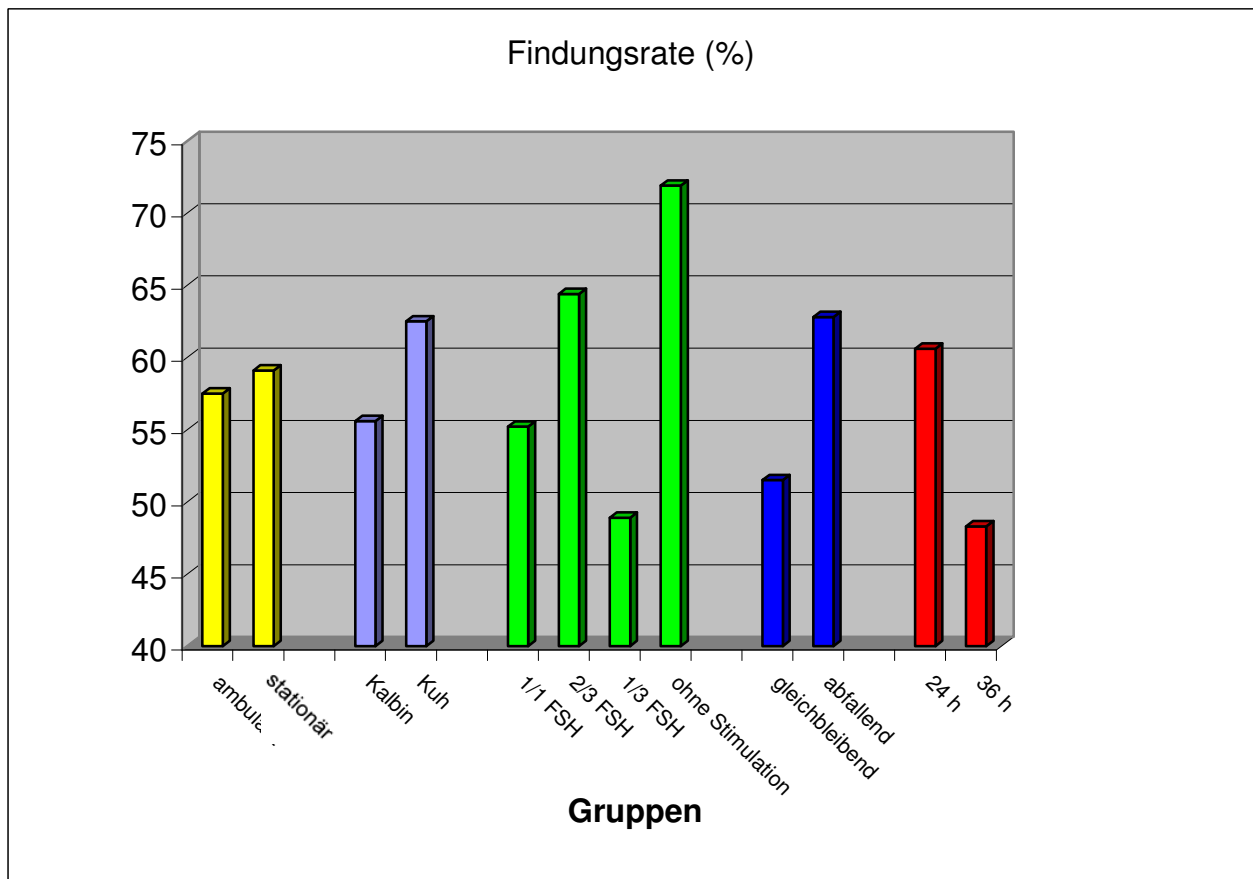


Abbildung 15: Findungsraten nach transvaginaler ultraschallgeleiteter Follikelpunktion in den einzelnen Versuchsgruppen

#### 2.1.3.4 Diskussion

Die in dem vorliegenden Schwerpunkt behandelte Untersuchung hatte zum Ziel, wesentliche Faktoren der Eizellgewinnung aufzunehmen, die grundlegend und praxisrelevant sind, um optimierte biotechnologische Verfahren für züchterische Vorhaben einsetzen zu können. Dazu wurden Kriterien berücksichtigt, die es in Betrieben unter besonderer Sorgfalt abzuwägen galt.

Ein wesentlicher Aspekt wurde in den Behandlungsmöglichkeiten in verschiedenen Betrieben gesehen, um eine breite Anwendung des Ovum-pick up zu ermöglichen.

Die ambulante Durchführung der Follikelpunktion ergab mit knapp 24 punktierten Follikeln und nahezu 15 gewonnenen Oozyten pro Termin bessere Ergebnisse als die am Institut ausgeführten OPU-Anwendungen. Hinsichtlich der Findungsrate war allerdings kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu erkennen. Eine Erklärung für die höheren Follikel- bzw. Oozytenzahlen in der ambulanten Gruppe liegt in der möglichen Vorselektion der Tiere. Eine Selektion der Spendertiere führt bei Embryoproduktions-Programmen zu einer deutlichen Verbesserung der Erfolgsraten (Merton et al., 2002). Die in dieses Projekt einbezogenen Betriebe stellen österreichische Elitebetriebe hinsichtlich Züchtungsfortschritt dar. Für die Versuche wurden nur genetisch besonders wertvolle und auf Fruchtbarkeit selektierte Tiere vorgestellt, um dem Aufwand und den Kosten Rechnung tragen zu können. Alle Betriebe wurden in einer Vorbereitungsphase nach den Richtlinien einer integrierten tierärztlichen Bestandsbetreuung erhoben (de Kruif et al., 1998). Management- und Fütterungsfehler wurden vor Versuchsbeginn korrigiert. Abbildung 16 zeigt anhand eines Beispiels einen Betrieb mit deutlichen Fütterungsfehlern (Proteinüberschuss).

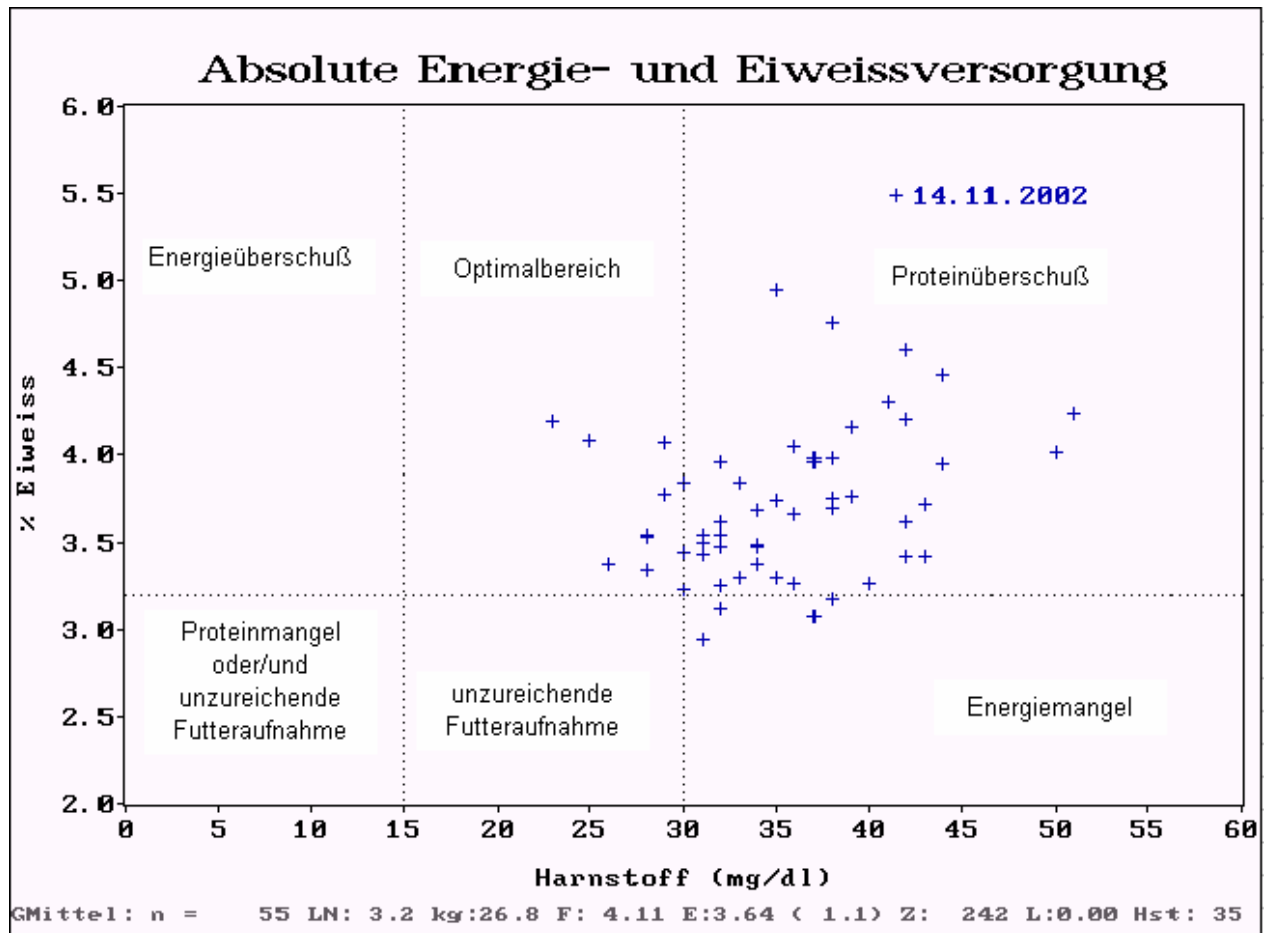


Abbildung 16: Betrieb mit erheblichen Fütterungsfehlern (Proteinüberschuss): 6-Felder-Tafel zur Darstellung der absoluten Energie- und Eiweißversorgungssituation durch Gegenüberstellung von Eiweiß- und Harnstoffgehalt

Ein weiterer Faktor, der in der Einteilung der Vergleichsgruppen berücksichtigt wurde, war das Alter der Tiere.

Kühe zeigten bessere Ergebnisse als Kalbinnen. Im allgemeinen haben Kühe größere Ovarien als Jungrinder, da reproduktive Vorgänge am Eierstock schon längere Zeit ablaufen. Funktionelle Prozesse bringen morphologische Veränderungen des Gewebes mit sich. Khatir et al. (1997) wiesen auf das Fehlen von Rezeptoren für Gonadotropine und Wachstumsfaktoren bei Jungtieren hin, die zu einer herabgesetzten Ansprechbarkeit auf Stimulationsprotokolle führten.

In Anlehnung an bestehende Superovulationsschemata wurden verschiedene Dosierungen zur FSH-Substitution verglichen, um bei möglichst moderatem Hormoneinsatz das Wachstum mehrerer Follikel und damit deren Weiterentwicklungskapazität zu nutzen.

Bei Tieren, die ohne Stimulation punktiert wurden, erreichte man mit nahezu 72% die höchste Findungsrate. Das follikelstimulierende Hormon FSH führt zu einem Größenwachstum Gonadotropin-abhängiger Follikel. Dabei kommt es zu einer Zunahme des Volumens mit der dritten Potenz des Radius. Entsprechend bedeutet dies eine starke Vermehrung der Follikelflüssigkeit und in weiterer Folge eine reduzierte Wahrscheinlichkeit, dass sich die punktierte Eizelle im Punktat befindet, da



beim Kollabieren größerer kugelförmiger Strukturen randständige Flüssigkeitsvolumina durch die herabsinkende Follikelwand eingeschlossen werden. Die besten Ergebnisse wurden mit einer Dosis von 267 mg FSH erreicht ( $24,70 \pm 7,29$  Follikel bzw.  $15,90 \pm 7,68$  Oozyten). 400 mg FSH entspricht der zur Superovulation verabreichten Menge an Gonadotropinen. Ein Follikelpunktionsprotokoll sieht jedoch die Eizellgewinnung vor der Ovulation vor, sodass es durch die Administration der gesamten FSH-Menge zu einem zu großen Follikelvolumen kommt, wodurch wieder die Wahrscheinlichkeit der erfolgreichen Aspiration der Oocyte verringert wird.

Die besseren Ergebnisse in der Gruppe „abfallend“ als bei den Tieren mit konstanter FSH-Menge sind mit dem Verlauf der endogenen FSH-Konzentration zu erklären. Der Beginn einer Follikelwelle ist durch einen Anstieg der endogenen FSH-Konzentration charakterisiert, wodurch die Rekrutierung neuer Follikel ausgelöst wird. Mit der Selektion und dem Wachstum des dominanten Follikels wird vermehrt Inhibin und Östrogen gebildet, infolgedessen es zu einem Absinken der FSH-Konzentration kommt. Diese typische Wellencharakteristik der FSH-Konzentration während einer Follikelwelle wird mit einer exogenen FSH-Zufuhr in sinkenden Dosierungen fortgeführt.

Die Punktion 24 Stunden nach der letzten FSH-Injektion führte zu einer signifikant höheren Findungsrate als in der Vergleichsgruppe mit 36-stündigem Abstand zur letzten Injektion (60,6% vs. 48,3%). Einerseits ist über die Follikelgröße wiederum eine Erklärung dieses Unterschieds gegeben, andererseits kommt es nach Ende der Stimulation zu Maturationsvorgängen an den die Eizelle umgebenden Cumuluszellen, welche durch die Bildung einer extrazellulären Matrix gekennzeichnet sind. In diesem Zusammenhang könnte in morphologischen Aspekten der Grund für eine sinkende technische Effizienz gesehen werden, die bei standardisierten Punktionsverfahren in eine reduzierte Eizellausbeute mündet.

#### Schlussfolgerung und Ausblick

Im Laufe des zweiten Projektjahres wurden mehrere Protokolle zur Eizellgewinnung in landwirtschaftlichen Betrieben getestet. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen untermauern deutlich, dass neuere Embryoproduktionsverfahren nicht zwingend ortsgebunden an Versuchsstationen durchgeführt werden müssen. Die Daten beinhalten gleichzeitig die erfolgreiche Durchführung von OPU-Programmen unter sehr variablen, multifaktoriellen Voraussetzungen.

Den österreichischen Züchtern wird damit eine Alternative zu herkömmlichen, oft nicht erfolgsversprechenden Embryotransfermethoden angeboten, die wesentlich zu einem effektiveren Ausnützen bereits vorhandener genetischer Potenziale in den heimischen Rinderpopulationen beitragen kann. Es wird aber notwendig sein, mit betriebsspezifisch adaptierten Protokollen den Zugang zu einer bestmöglichen Effizienz in der *In vitro*-Produktion vorzubereiten.

#### 2.1.3.5 Literatur

Armstrong DT, Kotaras PJ, Earl CR (1997): Advances in production of embryos *in vitro* from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reprod Fertil Dev* 9,333-339.

Blondin P, Guilbault LA, Sirard MA (1997): The time interval between FSH-p administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology* 48,803-813.

Boland MP, Goulding D, Roche JF (1991): Alternative gonadotropins for superovulation in cattle. *Theriogenology* 35,5-17.

De Kruif A, Mansfeld R, Hoedemaker M (1998): Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind. Enke Verlag Stuttgart.

Earl CR, Irvine BJ, Kelly JM, Rowe JP, Armstrong DT (1995): Ovarian stimulation protocols for oocyte collection and *in vitro* embryo production from 8 to 9 week old lambs. *Theriogenology* 43,203.

Farin PW, Crosier AE, Farin CE (2001): Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 55,151-170.

Galli C, Crotti G, Turini P, Duchi R, Lazzari G (2001): Embryo production by ovum pick-up from live donors. *Theriogenology* 55,1341-1357.

Galli C, Lazzari G (1996): Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Anim Reprod Sci* 42,371-379.

Goodhand KL, Staines ME, Hutchinson JSM, Broadbent PJ (2000): *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen oestradiol and FSH. *Anim Reprod Sci* 63,145-58.

Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T (1997): Oocyte growth capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47,23-32.

Kelly P, Duffy P, Roche JF, Boland MP (1997): Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine pattern. *Anim Reprod Sci* 46,1-14.

Khatir H, Carolan C, Lonergan P, Merillod P (1997): Characterization of calf follicular fluid and its ability to support cytoplasmatic maturation of cow and calf oocytes. *J Reprod Fertil* 111,267-275.

Kim I, Son DS, Yeon SH, Choi SH, Park SB, Ryu IS, Suh GH, Lee DW, Lee CS, Lee HJ, Yoon JT (2001): Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology* 55,937-945.

Kohram H, Bousquet D, Durocher J, Guilbault LA (1998): Alteration of follicular dynamics and superovulatory responses by gonadotropin releasing hormone and follicular puncture in cattle: a field trial. *Theriogenology* 49,1165-1174.

Kruip TAM, Boni R, Wurth YA, Roelofsen MWM, Pieterse MC (1994): Potential use of ovum pick up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42,675-684.

Kruij TAM, den Daas JHG (1997): *In vitro* produced and cloned embryos: effects on pregnancy. *Theriogenology* 47,43–52.

Lohuis MM, (1995): Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology* 43,51-60.

Looney CR, Lindsey BR, Goseth CL, Johnson DL (1994): Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilisation (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology* 41,67-72.

Meintjes M, Bellow MS, Broussard JR, Paul JB, Godke RA (1993): Transvaginal aspiration of bovine oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for IVF. *Theriogenology* 39,266.

Merton JS, de Roos APW, Mullaart E, de Ruigh LD, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ (2003): Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59,651-674.

Mitchell BR, Martinez M, Bentley DM, Mapletoft RJ (1998): A comparison of estradiol 17/3 and gnrh in synchronizing follicle wave emergence on superovulatory response in Holstein cows. *Theriogenology* 49,380.

Nichlas FW, Smith C (1983): Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Anim Prod* 36,341-353.

Pieterse MC, Kappen KA, Kruij TAM, Taverne MAM (1988): Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30,751-762.

Sartori R, Suárez-Fernández CA, Monson RL, Guenther JN, Rosa GJM, Wiltbank MC (2003): Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. 60,1319-1330.

Sirard MA, Picard L, Dery M, Coenen K, Blondin P (1999): The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. *Theriogenology* 51,699-708.

Stubbings RB, Wasik C, Armstrong DT (1993): Ovarian response in calves to multiple versus single subcutaneous injection of follitropin. *Theriogenology* 39,321.

Tervit HR (1996): Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim Reprod Sci* 42,227-238.

Thatcher WW, Moreira F, Santos JEP, Mattos RC, Lopes FL, Pancarci SM, Risco CA (2001): Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 55,75-89 .

Thibier M. (2002): A contrasted year for the world activity of the animal embryo transfer industry. A report from the IETS Data Retrieval Committee. *Embryo Transfer Newsletter* 20 (4): 13-19.

van Wagtendonk AM, Mullaart E, de Roos APW, Merton JS, den Daas JHG, Kemp B, de Ruigh L (2000): Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 53,575-597.

Ward FA, Lonergan P, Enright BP, Boland MP (2000): Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. *Theriogenology* 54,433-446.

Young LE, Sinclair KD, Wilmut I (1998): Large offspring syndrome in cattle and sheep. *J Reprod Fertil* 3,155–163.

## 2.2 *In vitro*-Produktion

Die *In vitro*-Produktion von Rinderembryonen hat sich mittlerweile auf ein breites kommerzielles Spektrum ausgedehnt, um zusätzliche Embryonen für die tierzüchterische Selektion und zur Erhaltung bedeutender Linien einzusetzen. Im Rahmen des vorliegenden Projektes soll die IVP grundlegend zur Anwendung kommen und mittels weiterer Techniken auch in die Praxis überführt werden. Die *In vitro*-Produktion von Rinderembryonen besteht aus komplizierten Prozessen, die sich übersichtshalber in drei Schritte einteilen lassen, und von denen jeder der nachfolgenden Schritte die Embryo- und Fötalentwicklung maßgeblich beeinflusst. Der vorliegende „*In vitro*-Teil“ konzentriert sich daher auf sieben wesentliche Schwerpunkte, die in Summe die *In vitro*-Bedingungen optimieren und qualitative Voraussetzungen schaffen sollen, um die praktische Umsetzbarkeit zu gewährleisten.

- Einsatz von Glutathion in der *In vitro*-Produktion
- Einsatz von Swim-up Techniken
- Untersuchungen zur Viskosität im Rahmen der *In vitro*-Fertilisation
- Optimierung der *In vitro*-Fertilisation
- Wirkung unterschiedlicher Proteinsupplementierungen auf die Embryonalentwicklung
- Wirkung unterschiedlicher Proteinsupplementierungen auf die Kryokonservierung
- Wirkung unterschiedlicher Proteinsupplementierungen auf die embryonale Morphologie

## 2.2.1 Einsatz von Glutathion in der *In vitro*-Produktion

### 2.2.1.1 Einleitung

Die Sauerstoffkonzentration im Lumen des weiblichen Reproduktionstraktes beträgt nur etwa ein Drittel der Konzentration, die Anwendung für die *In vitro*-Produktion findet. Im Säugetiereileiter sind die Embryonen anfänglich einer Sauerstoffkonzentration von 5,3 - 8,7% ausgesetzt, die am Tag 3 nach der Ovulation bis auf 2% sinkt (Fischer und Bavister, 1993). Dagegen wird die Kultur von *In vitro*-Embryonen in einer Sauerstoffkonzentration von 5 bis 20% durchgeführt. Eine Sauerstoffkonzentration von ca. 20%, wie sie unter atmosphärischen Verhältnissen herrscht, kann in höherem Maß zur Produktion freier Radikale führen. Freie Radikale verursachen Dysfunktionen der Mitochondrien, führen zu DNA-, RNA- und Proteinschädigungen sowie auch zu einer verzögerten Fusion des Spermiums mit der Eizelle. Die Folge solcher Schäden zeigen sich in einer Retardierung des Embryowachstums *in vitro* und Apoptose der embryonalen Zellen besonders im Blastozystestadium (Ali et al., 2003; Yuan et al., 2003).

Zur Verhinderung einer oxidativen Schädigung *in vitro* ist es möglich, verschiedene Antioxidantien dem Medium beizumischen. Zur Reduzierung der Wirkung von freien Radikalen können extrazelluläre enzymatische Antioxidantien wie Superoxid Dismutase oder Katalase verwendet werden. Statt dieser enzymatischen Antioxidantien kann die Kultur mit metabolisierbaren Antioxidantien durchgeführt werden. Glutathion (GSH) ist ein natürliches Antioxidans, das sowohl in Samenzellen als auch in Eizellen vorkommt. Während der Maturation erhöht sich die intrazelluläre GSH-Konzentration und ist daher auch nach Beendigung der Maturation in der Eizelle ein guter biochemischer Indikator für die Eizellvitalität. Während der Fertilisation, wenn die denudierten Eizellen einer hohen Dichte von Samenzellen ausgesetzt sind, wirkt GSH positiv auf das Überleben des Embryos, aber negativ auf die Befruchtungsrate (Blondin et al., 1997).

Das Ziel des vorliegenden Abschnittes war es, zu untersuchen, ob die Zugabe von GSH in den einzelnen Schritten der IVP eine Wirkung auf die Entwicklung der Eizellen bis zum Blastozystestadium hat.

### 2.2.1.2 Methode

Ovarien wurden am Schlachthof gesammelt und in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) ins Labor transportiert. Aus den 2-8 mm großen Follikeln auf der Ovaroberfläche wurden Cumulus-Oozyten Komplexe (COC) mittels einer 21G Nadel und aufgesetztem Schlauchsystem mit Vakuum abpunktiert, in einem 50 ml Falconröhrchen aufgefangen und unter dem Stereomikroskop selektiert und umgesetzt. Nur COC mit kompakter Schichte der Cumuluszellen und regelmäßig granuliertem Ooplasma wurden für die weitere Kultur verwendet.

Diese COC wurden zweimal in Waschmedium (WM; Modified Parker Medium (MPM) + 10% Serum von östrischen Kühen (OCS)) und einmal in Maturationsmedium (WM+FSH) vorsichtig gewaschen, bevor sie in eine 4-Well-Schale überführt wurden. In jede Vertiefung der 4-Well-Schale mit 400 µl Maturationsmedium wurden etwa 30 - 50 Eizellen verbracht, mit dem gleichen Volumen an Paraffinöl überschichtet und im Brutschrank bei 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit für 22 - 24 h inkubiert.

Für die Befruchtung wurden die Spermien durch das „Swim Up“-Verfahren (Parrish et al., 1986) mit Tiefgefriersperma eines Bullen vorbereitet und in einer Endkonzentration von  $1 \times 10^6$  Spermien/ml dem Befruchtungsmedium zugegeben.

Die maturierten COC, die durch einen deutlich expandierten Cumulus gekennzeichnet waren, wurden in vorbereitete 4-Well-Schalen mit jeweils 400  $\mu$ l Befruchtungsmedium (Modified TALP Medium) und 40  $\mu$ l Heparin-Medium 90 Minuten später umgesetzt und mit 400  $\mu$ l Paraffinöl überschichtet. Eizellen und Spermien wurden für 20 - 22 h bei 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit koinkubiert.

Für die *In vitro*-Kultur wurden in jede Vertiefung einer 4-Well-Schale 400  $\mu$ l Kulturmedium (Synthetic Oviduct Fluid (SOF) + 10% OCS) vorgelegt und mit dem gleichen Volumen an Paraffinöl überschichtet. Die COC bzw. Embryonen wurden in einem Röhrchen mit Kulturmedium für 90 s gevortext, um die noch verbliebenen Cumuluszellen von der *Zona pellucida* abzulösen. Cumulusfreie Zygoten wurden im Kulturmedium zweimal gewaschen und in die vorbereitete 4-Well-Schale überführt. Die Embryonen wurden bei reduziertem O<sub>2</sub>-Gehalt (5% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> bei 39 °C) im Brutschrank inkubiert.

In diesem Versuch wurde Glutathion in die einzelnen Medien in einer Endkonzentration 0,1 mM eingemischt. Um bei etwaigem GSH-Effekt einen solchen den jeweiligen Phasen der *In vitro*-Produktion zuordnen zu können, wurde GSH während aller drei Schritte der IVP (IVM, IVF, IVK) getrennt und in Kombination getestet (siehe Tabelle 8). Als Kontrolle diente eine Gruppe kultivierter Eizellen, denen kein GSH zugegeben wurde. Am Tag 7 und Tag 8 wurde die Anzahl progressiver Entwicklungsstadien (Blastozysten) protokolliert.

Tabelle 8: Einsatz von GSH in verschiedenen Teilabschnitten der *In vitro*-Produktion

Versuch	IVM	IVF	IVK
1. (IVM)	GSH	0	0
2. (IVF)	0	GSH	0
3. (IVK)	0	0	GSH
4. (IVMK)	GSH	0	GSH
5. (IVMFK)	GSH	GSH	GSH
Kontrolle	0	0	0

IVM *In vitro*-Maturation

IVF *In vitro*-Fertilisation

IVK *In vitro*-Kultur

IVMK *In vitro*-Maturation und -Kultur

IVMFK *In vitro*-Maturation, -Fertilisation und -Kultur

GSH 0,1 mM Glutathion

### 2.2.1.3 Ergebnisse

Die Wirkung von 0,1 mM GSH im Medium während der IVP wurde in 5 verschiedenen Schritten getestet. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, wie in Tabelle 9 und Abbildung 17 dargestellt, wurde eine bessere Blastozystenrate am Tag 7 in der Gruppe mit GSH-Zusatz im Maturations- und Fertilisierungsmedium festgestellt. Ein GSH-Zusatz im Kulturmedium hatte keine Auswirkung auf das Entwicklungsergebnis am Tag 7, während bei verlängerter Kultur bis Tag 8 eher eine Entwicklungseinschränkung (IVK, IVMK, IVMFK) zu sehen war.

Tabelle 9: Einfluss von GSH-Zusatz zu den Medien der IVP auf die Blastozystenrate während der Maturation, Fertilisation und Kultur

Kulturbedingungen: 0,1mM Glutathion während:	Anzahl COC	Blastozysten, n	Tag 7 Anteil	Blastozysten, n	Tag 8 Anteil
IVM	81	24	29,6	34	42,0
IVF	88	26	29,5	34	38,6
IVK	86	21	24,4	30	34,9
IVMK	85	21	24,7	26	30,6
IVMFK	87	22	25,3	33	37,9
Kontrolle	87	21	24,1	34	39,1



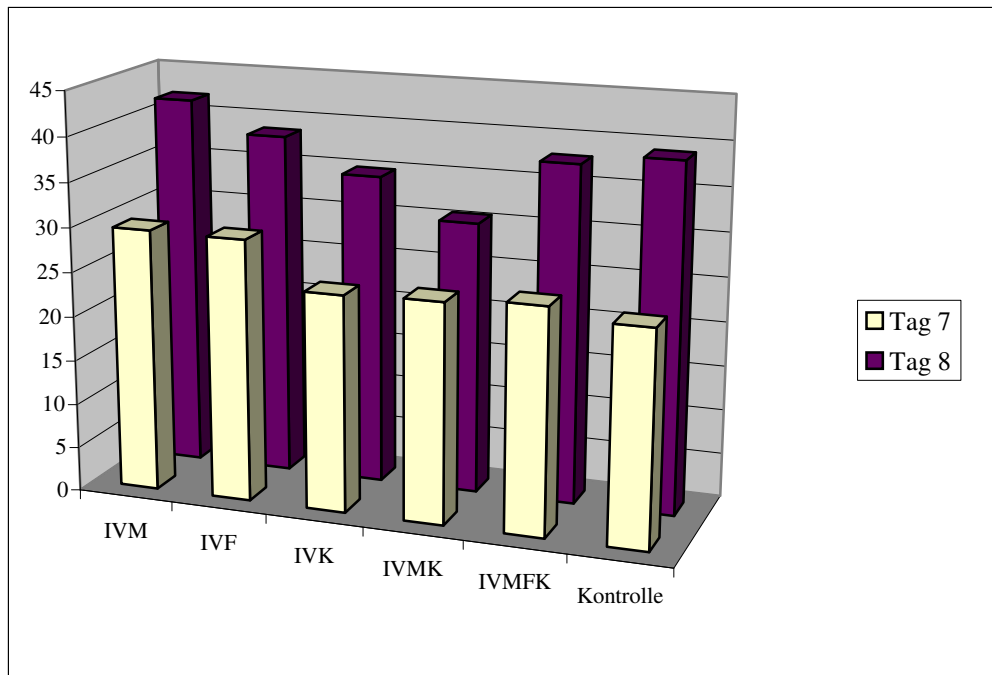


Abbildung 17: Blastozystenrate nach GSH-Zusatz zu den Medien der IVP während der Maturation, Fertilisation und Kultur

#### 2.2.1.4 Diskussion

Ziel dieses Untersuchungsabschnitts war es, den GSH-Einfluss *per se* auf die Entwicklung von IVP-Embryonen darzustellen, um eine GSH-Supplementierung zu Medien der IVP als Radikalfänger zu testen. Von den zur Verfügung stehenden Antioxidantien wurde das metabolisierbare Antioxidans Glutathion ausgewählt. Die in der Literatur beschriebenen Studien weisen jedoch unterschiedliche Effekte auf. Bei Verwendung des extrazellulären Antioxidans konnte nach Ali et al. (2003) keine Steigerung der Embryoproduktion ermittelt werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen den besten GSH-Effekt auf die Entwicklungsrate nach GSH-Zusatz zum Maturationsmedium. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von De Matos et al. (1997), die bei der Zugabe des GSH-Präkursors Cystein eine Verbesserung der Entwicklungsrate festgestellt haben. Für die weitere Entwicklung scheint GSH nur eine geringfügige oder keine protektive Wirkung mehr zu entfalten. Ergebnisse von Luvoni et al. (1996), die eine höhere Konzentration von Antioxidans auf die IVF untersuchten, bestätigten die wichtige Rolle des GSH noch während der *In vitro*-Fertilisation. Da die *In vitro*-Maturation und -Fertilisation meist bei atmosphärischem O<sub>2</sub>-Partialdruck durchgeführt wird, ist noch unklar, ob Glutathion während der IVK bei einer 5%-igen Sauerstoffkonzentration nötig ist. In dieser Studie wurde bei der GSH-Zugabe eine verminderte Blastozystenrate beobachtet. Bei einem bereits 7%-igen O<sub>2</sub>-Partialdruck in der IVK konnten Ali et al. (2003) mittels Cystein-Zusatz einen positiven Einfluss durch Senkung der intrazellulären Hydrogenperoxid-Konzentration nachweisen.

Glutathion als Medienzusatz in der *In vitro*-Produktion scheint hohe Sauerstoffpartialdrücke während der Maturation und evtl. während der Fertilisation zu kompensieren. Im Kulturmedium hingegen wird bereits ein geringer O<sub>2</sub>-Partialdruck zur Begasung des Synthetic Oviduct Fluid-Mediums eingesetzt, wobei dem

Inhaltsstoff Pyruvat eine Hydrogenperoxid-reduzierende Wirkung zugeschrieben wird. Insgesamt wird jedoch deutlich, dass der Einsatz von Radikalfängern nötig ist, um eine schützende Wirkung auf die frühe Entwicklung der Eizellen und Embryonen zu gewährleisten.

#### 2.2.1.5 Literatur

Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA (2003): Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 59, 939-949.

Blondin P, Coenen K, Sirard MA (1997): The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl* 18, 454-460.

De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M (1997): Glutathione synthesis of during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 57, 1420-1425.

Fischer B, Bavister BD (1993): Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 99, 673-679.

Luvoni GC, Keskinetepe L, Brackett BG (1996): Improvement of bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing medium. *Mol Reprod Dev* 43, 437-443.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, Eyestone WH, First NL (1986): Bovine *in vitro* fertilization with frozen - thawed semen. *Theriogenology* 25, 591-600.

Yuan YQ, Van Soom A, Coopman FOJ, Mintiens K, Boerjan ML, Van Zeveren A, De Kruif A, Peelman LJ (2003): Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vivo*. *Theriogenology* 59, 1585-1596.

## 2.2.2 Einsatz von Swim-up Techniken

### 2.2.2.1 Einleitung

Die Etablierung verschiedener Swim-up Techniken stellt die Voraussetzung zur Aufreinigung von Samenportionen aus dem Kryokonservierungsmedium sowie zur Einstellung von Samenkonzentrationen als Ausgleich unterschiedlicher Fertilisierungsvermögen von Samen unterschiedlicher Bullen für eine optimale Befruchtung in *In vitro*-Systemen dar. Swim-up Techniken bedienen sich dabei unterschiedlicher Medienzusammensetzungen, Dauer der Swim-up Ansätze, zum Teil verschiedener Temperaturen, vor- oder nachgeschalteter Waschvorgänge sowie verschiedener Volumens- bzw. Oberflächenverhältnisse der eingesetzten Samen- und Swim-up Medien. Aus den Überlegungen heraus, dass Verfahren zur Trennung von Samen in X- und Y-Chromosom tragende Spermien auf morphologisch, physikalisch und biochemisch messbaren Unterschieden beruhen (Seidel et al., 1999), ist es verständlich, dass laborcharakteristische Kennzahlen in Form einer Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses IVP-produzierter Kälber bestehen (Gutiérrez-Adán et al., 2001; van Wagtenonk-de Leeuw et al., 1998). Im weiteren ermöglichen diese Swim-up Techniken die Aufbereitung einer definierten Samenqualität und -quantität, um analog der *In vitro*-Fertilisierung eine *In vivo*-Fertilisierung durch Samenübertragung in die Ampulle des Eileiters durchzuführen. Entsprechende physikalisch/biochemische Parameter sollen erarbeitet werden, um mit dieser Kenntnis systematische Verschiebungen im Geschlechtsverhältnis von IVP-Kälber zugunsten der landwirtschaftlichen Produktionsrichtung erzeugen zu können. Teil dieser Untersuchung war die Verwendung verschiedener Swim-up Techniken, um deren Effizienz und Einsetzbarkeit für weiterführende Arbeiten zu testen.

### 2.2.2.2 Material

Für die Samentrennungen wurde Nativsperma von Kaninchen und kryokonserviertes Sperma von Rindern eingesetzt. Die Gewinnung von Nativsamen erfolgte mittels künstlicher Scheide für Kaninchen. Es wurden die Ejakulate von 12 Kaninchen gewonnen, gemischt und direkt im Anschluss an die Gewinnung im Labor unverdünnt für die Swim-up Verfahren eingesetzt. Rindersamen, der in Pailletten tiefgefroren war, wurde für 12 Sekunden bei 39 °C aufgetaut und im weiteren verdünnt (mit Kapazitationsmedium) oder unverdünnt getestet. Für das Swim-up Verfahren kamen folgende Techniken zum Einsatz (siehe Abbildungen 18-20):

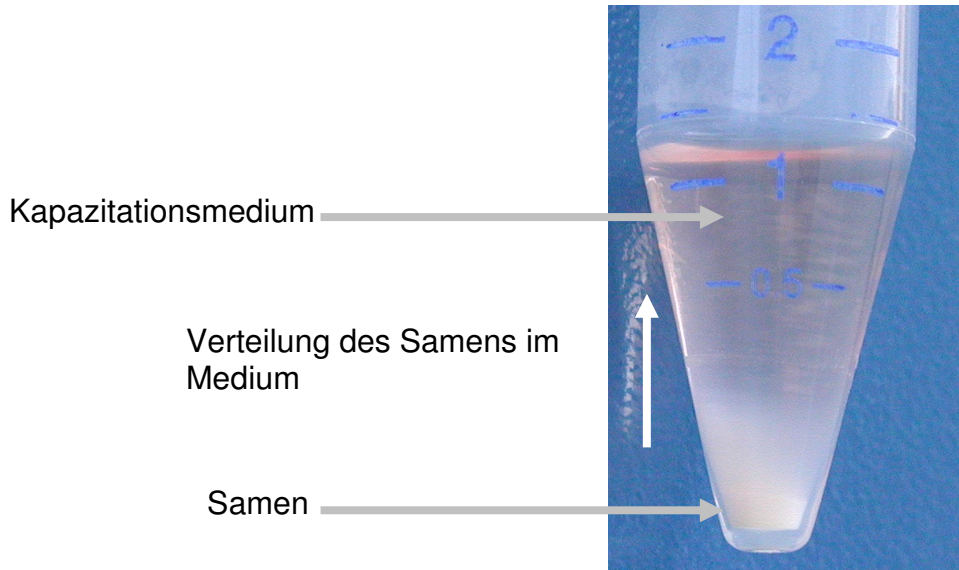


Abbildung 18: 1. Swim-up im Falcontube (14 ml graduiert), Standardverfahren

Befüllungsschema:

Nativsamen vom Kaninchen: 100  $\mu$ l Samen plus 1000  $\mu$ l Kapazitationsmedium

Kryo-Samen vom Rind: 100  $\mu$ l Samen, unverdünnt plus 1000  $\mu$ l Kapazitationsmedium

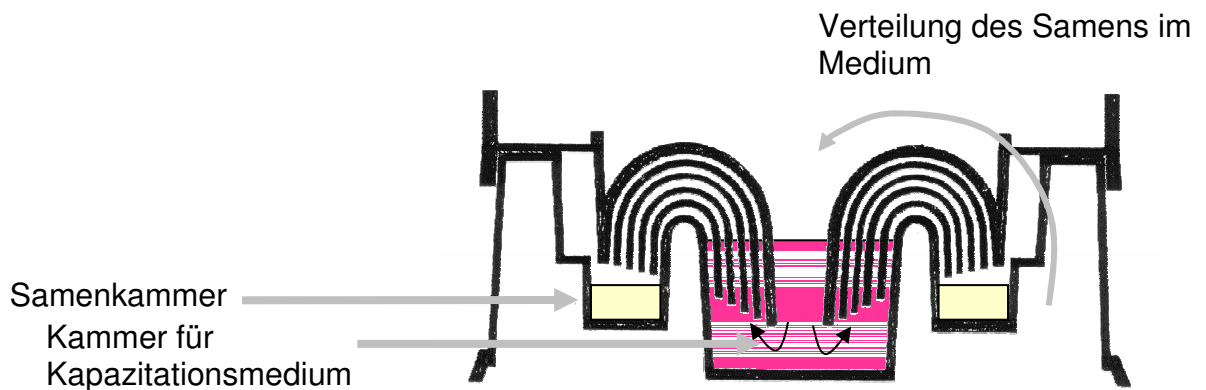


Abbildung 19: 2. Spermselector®, Kunststoff, Einmalprodukt

Befüllungsschema:

Nativsamen vom Kaninchen: 2000  $\mu$ l Samen plus 5000  $\mu$ l Kapazitationsmedium

Kryo-Samen vom Rind: 200  $\mu$ l Samen, verdünnt in 1 – 2 ml Kapazitationsmedium für die Samenkammer plus 1,5 – 2,5 ml Medium in die Kapazitationskammer

Aufbau analog Spermselector aus Kunststoff, die Kammern für Samen (a) und Kapazitationsmedium (b) sind jedoch wesentlich kleiner, es gibt lediglich eine kapillare Lamelle für den Übertritt von Samen in das Kapazitationsmedium

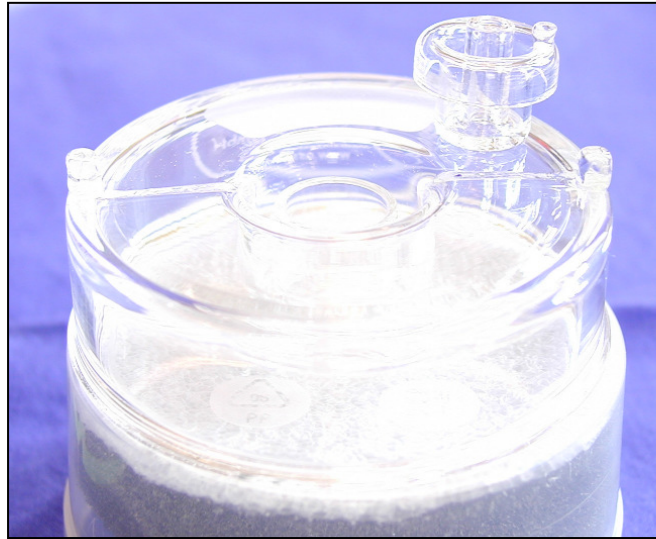
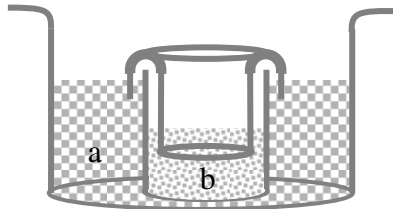


Abbildung 20: 3. Spermselector®, Prototyp, Glasprodukt

#### Befüllungsschema:

Nativsamen vom Kaninchen: 2000  $\mu$ l Samen plus 5000  $\mu$ l Kapazitationsmedium

Kryo-Samen vom Rind: 200  $\mu$ l Samen, verdünnt in 1 – 2 ml Kapazitationsmedium für die Samenkammer plus 1,5 – 2,5 ml Medium in die Kapazitationskammer

#### 2.2.2.3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 70 Swim-up Ansätze durchgeführt. In den Kaninchenejakulaten wurden im Mittel 450.000 Spermien/ $\mu$ l mittels Zählkammer nach Neubauer und einer Motilität von ca. 60% gemessen, bevor sie zur Verwendung kamen. In der Swim-up Technik mittels Spermselector (Kunststoff) konnte die höchste Anzahl an Spermien nach Swim-up gemessen werden. Die Spermienmotilität fiel nach dem Swim-up mit ca. 90% am besten für die konventionelle Methode aus. Die beiden Verfahren mittels Spermselector in der Glas- bzw. Kunststoffversion waren mit ca. 80% und 70% schlechter. Beim Rind wurden nach dem Auftauen der Pailletten Konzentrationen zwischen 30 Mio und 40 Mio Spermien pro Paillette (0,25 ml) ermittelt, von denen ca. 50% motil waren. Die Ergebnisse beim Rind (Kryo-Samen) sind vergleichbar mit denen vom Kaninchen (Nativsamen). Aus der Kunststoff-Spermselector-Kammer sind anteilig weniger Samen als nach Swim-up gewonnen worden, wie nach Verwendung von Nativsamen (Kaninchen). Insgesamt zeigt ein zeitlicher Verlauf der Entnahme von Kryo-Samen (Rind) nach Swim-up, dass mit zunehmender Zeit (von 30 Minuten bis 240 Minuten) weniger Samen gewonnen werden konnte (Tabelle 10).

Tabelle 10. Darstellung verschiedener Swim-up Verfahren für Nativsamen (Kaninchen) und tiefgefrorenem Rindersamen

	Vor dem Swim-up			Nach dem Swim-up		
	Zeit (Min)	Ansatz (Mio)	Motilität (%)	Ertrag (Mio)	Motilität (%)	Anteil (%)
<b>Kaninchen,</b>						
<b>Nativsamen</b>						
Swim up	45	45,04	60	3,62	88	8,03
Spermselector - Glas	45	450,40	62	2,09	82	0,41
Spermselector - Kunststoff	45	885,30	58	144,80	73	14,89
<b>Rindersamen</b>						
<b>tiefgefroren</b>						
Swim up	45	15,42	54	1,33	80	8,72
Spermselector - Glas	45	15,42	54	0,38	70	2,48
Spermselector - Kunststoff	30	24,47	50	3,05	50	12,40
	45	21,20	50	1,11	60	5,20
	60	29,71	50	2,68	37	8,58
	120	31,02	50	1,53	34	5,95
	240	31,66	50	0,82	47	2,60

#### 2.2.2.4 Diskussion

Wie aus den vorliegenden Ergebnissen hervorgeht, sind alle drei Verfahren sowohl für Nativsamen als auch für kryokonservierten Samen zur Gewinnung und Aufbereitung von Samen für *In vitro*-Zwecke als geeignet zu beurteilen. Von besonderer Bedeutung dabei sind die unterschiedlichen Beanspruchungen an die motilen Samen, die mittels der verschiedenen Swim-up Techniken repräsentiert werden. Besonders wichtig dabei erscheint die Gewinnung von Samen nach Swim-up, die während verschiedener Entnahmezeiten beurteilt wurden und in genügend großem Umfang zur weiteren Verwendung als tauglich eingestuft wurden. Aus den in der Methode skizzierten Verfahren ist ersichtlich, dass mittels der Verfahren unterschiedliche Ansprüche an die Spermienmotilität gestellt werden. Die konventionelle Methode im Röhrchen wird soviel Spermien im Kapazitationsmedium

aufweisen, wie sich nach der festgelegten Entnahmezeit immer noch bzw. dann erst im überschichteten Medium durch fortwährende Bewegung aufhalten. Ortsbewegliche Spermien, vor allem aber nicht bewegliche Spermien werden zurücksinken. Die Spermselectoren setzen die Bewältigung einer größeren Wegstrecke voraus, die die Spermien bis in die Kapazitationskammer zurückzulegen haben. Wurde einmal dieser Bewegungsaufwand geleistet und deren Bewegungsaktivität wieder vermindert, erfolgt keine gravimetrische Selektion. Die Ergebnisse lassen jedoch darauf schließen, dass sich eine große Anzahl von Spermien in den Lamellen aufhält und dennoch nach Beendigung des Versuches über die Lamellen in die Samenkammer zurückgesogen werden.

Für weitere Untersuchungen sind molekulargenetische Versuchsansätze zu wählen, in denen die Spermienzusammensetzung (X/Y) bzw. nach erfolgter *In vitro*-Fertilisation das Geschlecht der Embryonen zu bestimmen sind. Mit diesen Versuchsansätzen und weiteren Faktoren, die die Aktivität von X- bzw. Y-Spermien unterschiedlich beeinflussen, könnte eine Verschiebung innerhalb der geborenen Kälber zugunsten des gewünschten Geschlechts durchgeführt werden.

#### 2.2.2.5 Literatur

Gutierrez - Adan A, Lonergan P, Rizos D, Ward FA, Boland MP, Pintado B, De La Fuente J (2001): Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 55, 1117-1126.

Seidel GE., Johnson LA (1999): Sexing mammalian sperm – overview. *Theriogenology* 52, 1267-1272.

Van Wagtenonk - De Leeuw AM, Aerts BJG, Den Daas JHG (1998): Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos: a field study. *Theriogenology* 49, 883-894.

## 2.2.3 Untersuchungen zur Viskosität im Rahmen der *In vitro*-Fertilisation

### 2.2.3.1 Einleitung

Die *In vitro*-Fertilisation ist eine der zentralsten Ansatzpunkte der IVP. Maturierte Gameten werden unter einzigartigen Verhältnissen physiologischer und räumlicher Art in frühe embryonale Entwicklungsstadien überführt und bieten somit zahlreiche biotechnische Zugänge für eine effiziente Anwendung. Für den Einsatz im landwirtschaftlichen Betrieb bedeutet dies, dass Eizellen selbst von verschiedenen Spendertieren in sog. „Mikrotropfen“ mit einer definierten Minimalanzahl von Spermien inkubiert werden können, die zuvor in labortechnischer Weise „aufbereitet“ wurden.

Die *In vitro*-Befruchtung gewährleistet Bedingungen, die sowohl den Eizellen im Hinblick auf ihre Befruchtungsfähigkeit als auch den Spermien bezüglich ihrer Motilität und Kapazitation gerecht werden. *In vivo* sind die Spermien während des Transportes unterschiedlichen Körperflüssigkeiten ausgesetzt. Es wurde festgestellt, dass manche biologische Flüssigkeiten wie Serum, peritoneale oder folliculäre Flüssigkeiten die Spermienmotilität stimulieren können. Lenz et al. (1982) haben in der Follikelflüssigkeit Glykosaminoglykane (GAG) isoliert, die die Spermienmotilität und Akrosomenreaktion beeinflussen können. Zur Gruppe der GAG gehören z.B. Hyaluronsäure (HyA), Heparinsulfat und Chondroitinsulfat; sie kommen in allen Geweben und Körperflüssigkeiten vor. Hyaluronsäure ist primär an der Zelloberfläche zu finden, am Vorgang der Zelladhäsion beteiligt und ist eines der quantitativ am reichlichsten vorhandenen Glykoproteine in Gebärmutter-, Eileiter- oder Follikelflüssigkeit beim Rind (Lee und Ax, 1984). Die normale Konzentration von HyA in der Eileiter- und Uterusflüssigkeit vom Rind beträgt 0,04 - 1,83 bzw. 0,32 - 0,59 mg/ml (Stojkovic et al., 1999). Somit ist es wahrscheinlich, dass Glykosaminoglykane und besonders HyA die Entwicklung von der Eizellbefruchtung bis zum Blastozystestadium *in vivo* beeinflussen und unterstützen. Daher wurde die Wirkung von Hyaluronsäure während des „Swim-up“-Verfahrens bzw. während der Befruchtungsperiode auf die Blastozystenrate untersucht.

### 2.2.3.2 Methode

30 - 50 aus Ovarien geschlachteter Tiere gewonnene COC mit kompakter Cumuluszellschicht und regelmäßig granuliertem Ooplasma wurden nach dem Vorwaschen zweimal in Waschmedium (WM; Modified Parker Medium (MPM) + 10% Serum von östrischen Kühen (OCS)) und einmal in Maturationsmedium (WM+FSH) in jede Vertiefung einer 4-Well-Schale mit 400 µl Maturationsmedium überführt und mit dem gleichen Volumen an Paraffinöl überschichtet, und im Brutschrank bei 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit für 22 - 24 Stunden inkubiert.

Zur Spermiovorbereitung wurde das Swim-Up-Verfahren mit Tiefgefriersperma eines Bullen angewandt. Die Samenpailletten wurden 10 sec im 39 °C-Wasserbad aufgetaut, getrocknet und ihr Inhalt in 10 ml Röhrchen entleert. 15 ml Röhrchen wurden mit je 1 ml Kapazitationsmedium befüllt und vorsichtig mit 100 µl aufgetautem Sperma unterschichtet. Um eine Trennung von beweglichen und unbeweglichen Spermien zu erreichen, wurde der Ansatz im Röhrchen für 45 min bei 39 °C inkubiert. Der klare Überstand (ca. 800 µl) wurde in ein neues 15 ml Röhrchen



überführt und bei 200 g 15 min zentrifugiert. Die sedimentierten Spermien waren dann in der Röhrchenspitze als „Samenpellet“ zu sehen. Der Überstand wurde auf das 3-fache Pelletvolumen reduziert und das Samenpellet resuspendiert. Die Spermienkonzentration wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Menge an Spermien suspension errechnet, die notwendig war, um im Befruchtungsmedium eine Endkonzentration von  $1 \times 10^6$  Spermien/ml zu erreichen. Die maturierten COC, durch einen deutlich expandierten Cumulus gekennzeichnet, wurden in vorbereitete 4-Well-Schalen mit jeweils 400  $\mu$ l Befruchtungsmedium (Modified TALP Medium) und 40  $\mu$ l Heparin-Medium 90 Minuten später umgesetzt und mit 400  $\mu$ l Paraffinöl überschichtet. Eizellen und Spermien wurden für 20 – 22 Stunden bei 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit koinkubiert.

Für die *In vitro*-Kultivierung wurden in jede Vertiefung einer 4-Well-Schale 400  $\mu$ l Kulturmedium (Synthetic Oviduct Fluid (SOF) + 10% OCS) vorgelegt und mit dem gleichen Volumen an Paraffinöl überschichtet. Die COC bzw. Embryonen wurden in einem Röhrchen mit Kulturmedium für 90 s gevortext, um die noch verbliebenen Cumuluszellen von der *Zona pellucida* abzulösen. Von Kumulszellen befreite Zygoten wurden im Kulturmedium zweimal gewaschen und in die vorbereitete 4-Well-Schale überführt. Die Embryonen wurden bei reduziertem O<sub>2</sub>-Gehalt (5% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> bei 39 °C) im Brutschrank inkubiert. Die Embryonen wurden am Tag 7 und Tag 8 der Kultur beurteilt.

Der Einfluss der Hyaluronsäure wurde während des „Swim-up“-Verfahrens und während der *In vitro*-Befruchtung untersucht. In beiden Versuchen wurde jeweils 2 mg/ml Hyaluronsäure dem Medium zugegeben.

### 2.2.3.3 Ergebnisse

#### Swim-up

Die Wirkung von 2 mg/ml Hyaluronsäure während des „Swim-up“-Verfahrens wurde getestet. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, wie in Tabelle 11 und Abbildung 21 dargestellt, wurde kein Unterschied in der Blastozystenrate am Tag 7 oder Tag 8 festgestellt.

Tabelle 11: Einfluss von Hyaluronsäure im „Swim-up“-Verfahren auf die embryonale Entwicklungsrate

Swim-up	Anzahl von COC	Blastozysten, Tag 7		Blastozysten, Tag 8	
		n	Anteil%	n	Anteil%
Mit 2 mg/ml HyA	246	54	22,0	98	39,8
Kontrolle	219	50	22,8	85	38,8

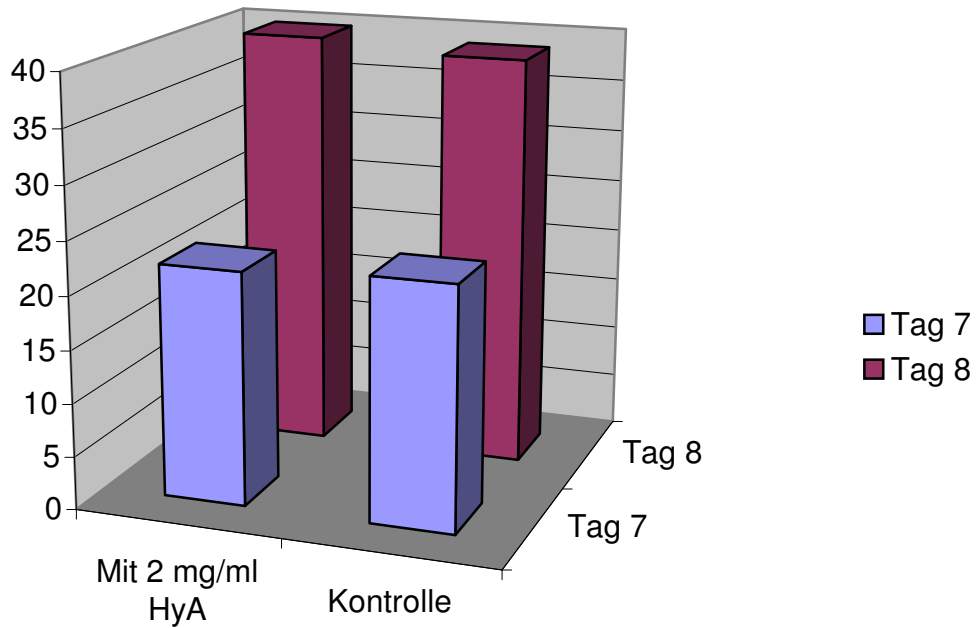


Abbildung 21: Hyaluronsäurevergleich im „Swim-up“-Verfahren

#### *In vitro*-Befruchtung

2 mg/ml Hyaluronsäure wurde dem Befruchtungsmedium zugesetzt und die Spermien für 20 – 22 Stunden mit den Eizellen kokubiert. Die Vergleichsgruppe enthielt keinen Hyaluronsäurezusatz. Wie aus Tabelle 12 und Abbildung 22 hervorgeht, war kein Unterschied in der Blastozystenrate sowohl am Tag 7 als auch am Tag 8 festzustellen.

Tabelle 12: Einfluss von Hyaluronsäure auf den Befruchtungsvorgang

<i>In vitro</i> -Fertilisation	Anzahl von COC	Blastozysten, Tag 7 n	Blastozysten, Tag 7 Anteil%	Blastozysten, Tag 8 n	Blastozysten, Tag 8 Anteil%
Mit 2 mg/ml HyA	242	70	28,9	96	39,7
Kontrolle	288	87	30,2	108	37,5

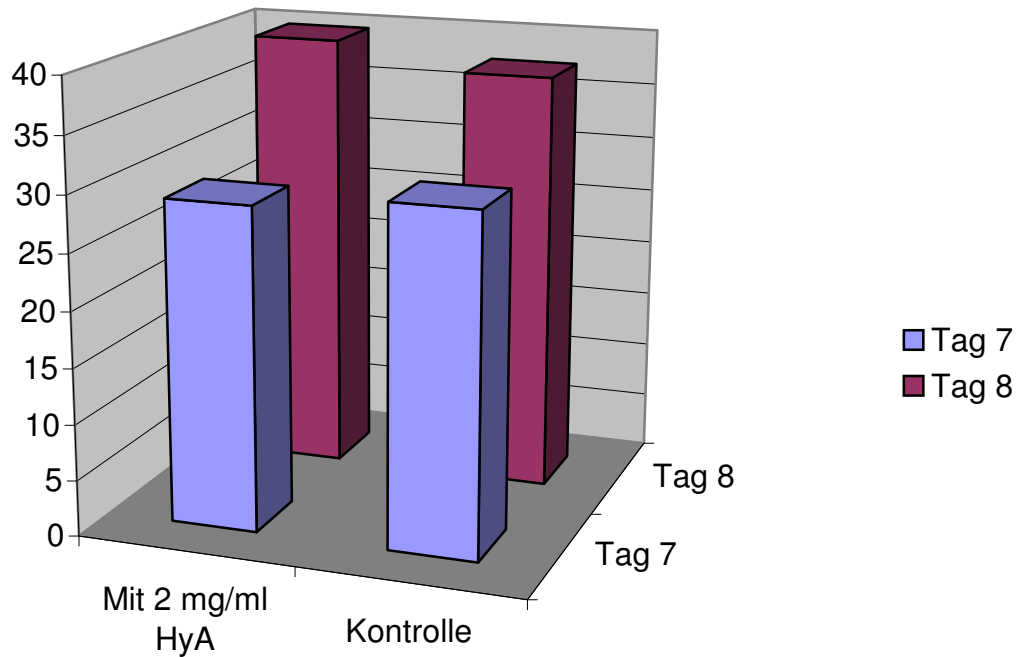


Abbildung 22: Entwicklungsraten nach *In vitro*-Fertilisation mit/ohne Hyaluronsäurezusatz

#### 2.2.3.4 Diskussion

Ziel dieser Teiluntersuchung war es, die Anwesenheit von Hyaluronsäure auf *In vitro*-Fertilisationsvorgänge zu untersuchen. Von besonderer Bedeutung dabei war die Tatsache, dass *in vitro* eine deutlich geringere Menge an Spermien eingesetzt wird, um eine Befruchtung zu erreichen, da gegenüber der physiologischen Situation im Labor

- Spermien direkt in das unmittelbare Umfeld der Eizellen gegeben werden
- lebende Spermien von toten Spermien getrennt und dann zugesetzt werden
- „unvollständig“ maturierte (Cumulus-Zone um die zu befruchtende Eizelle) Oozyten mit Spermien koinkubiert werden, deren Mechanismen zur Vermeidung der Polyspermie nur bedingt funktionieren
- Spermien in dennoch hoher Anzahl zeitgleich und intensiv am Befruchtungsvorgang beteiligt sind, d.h. Spermien haben weder eine lange Strecke von Endothelzellen zu überwinden noch weist das Medium, in dem sie sich befinden, einen annähernd gleichen Viskositätsgrad auf → unphysiologische Bewegungseigenschaften
- motilitätssteigernde Faktoren zur Erhöhung der Fertilisierungsrate zugegeben werden

Da *in praxi* ein mannigfaltiges Spektrum an Samen verschiedener Bullen eingesetzt werden soll, das in Summe aller zu ermittelnden Faktoren (Konzentration, Motilität, lebend-tot-Trennung im Swim up-Verfahren, ..... Befruchtungseigenschaft) ein nahezu standardisiertes Verfahren der IVF unmöglich macht, wurde als Konsequenz aus den genannten Faktoren die Viskosität des Fertilisierungsmediums dem

physiologischen Zustand angenähert, um die massiven Vorgänge der Fertilisation an ein zeitlich expandierteres Reaktionsvermögen der Eizelle anzupassen.

Wie aus den vorliegenden Ergebnissen hervorgeht, wurde kein Effekt auf die Blastozystenrate in der IVP durch die Zugabe der Hyaluronsäure in physiologischer Konzentration (2 mg/ml HyA, Stojkovic et al., 1999) beobachtet. Shamsuddin und Rodriguez-Martinez (1993) konnten sogar durch Verwendung von 1 mg/ml HyA im „Swim-up“-Medium eine bessere Spermienmotilität und als Folge dessen auch eine bessere Entwicklungsrate ermitteln. Aus diesem Grund schlugen sie vor, dieses Verfahren besonders bei Bullen mit niedriger Samenbeweglichkeit nach dem Auftauen zu nutzen. Von ähnlichen Beobachtungen wird auch spezieübergreifend berichtet (Hamamah et al., 1996).

Um nun für die Praxis eine maximale „Bullentauglichkeit“ im *In vitro*-Fertilisationsverfahren zu erreichen, ist weiter zu klären

- welche optimale Konzentration von HyA *in vitro* die besten Ergebnisse erwarten lässt
- wie weit die Spermienkonzentration *in vitro* unter HyA gesteigert werden kann, um eine vollständige Fertilisation zu erreichen
- welche Rolle diese Substanz (HyA) im Rahmen einer Kurzzeit-*In vitro*-Produktion spielt (Transfermedium, GIFT)

Im Zusammenhang mit den Erkenntnissen aus dem Swim-up-Teil ist noch ein weiterer und wesentlicher Analyseschritt zu vollziehen, da verschiedene IVP-Laboratorien durch ein bestimmtes Geschlechterverhältnis der durch ET entstandenen IVP-Kälber charakterisiert sind. d.h. es ist bekannt, dass Y- und X-Spermien unterschiedliche Eigenschaften wie z.B. Spermienmotilität besitzen. Die Fraktionen, die sich aufgrund unterschiedlicher Spermiovorbehandlung und Behandlung während der Fertilisation ergeben, müssten hinsichtlich der Faktoren, die die X/Y-Zusammensetzung beeinflussen, bestimmt werden.

### 2.2.3.5 Literatur

Hamamah S, Wittemer C, Barthelemy C, Richet C, Zerimech F, Royere D, Degand P (1996): Identification of hyaluronic acid and chondroitin sulfates in human follicular fluid and their effects on human sperm motility and the outcome of *in vitro* fertilization. *Reprod Nutr Dev* 36, 43-52.

Lee CN., Ax RL (1984): Concentration and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J Dairy Sci* 67, 2006-209.

Lenz RW, Ax RL, Grimek HJ, First NL (1982): Proteoglycan from bovine follicular fluid stimulates an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 106, 1092-1098.

Shamsuddin M, Rodriguez-Martinez H (1993): Use of hyaluronic acid-selected spermatozoa for *in vitro* fertilization in the bovine. *J Reprod Fert Abstract Series No.* 11, 66 (Abs. 122).

Stojkovic M, Thompson JG, Tervit HR (1999): Effects of hyaluronic acid supplementation on *in vitro* development of bovine embryos in a two-step culture system. *Theriogenology* 51, 254.

## 2.2.4 Optimierung der *In vitro*-Befruchtung

### 2.2.4.1 Einleitung

Die *In vitro*-Produktion von Rinderembryonen stellt eine bereits gut etablierte Methode zur Herstellung von transfertauglichen Embryonen dar. Trotz nachweislicher Fortschritte in diesem Bereich ist die Qualität *in vitro*-produzierter Embryonen im Vergleich zu *ex vivo*-gewonnenen Embryonen wesentlich beeinträchtigt. Im Unterschied zur Blastozystenrate, die durch die Eizellqualität festgelegt ist, wird die Blastozystenqualität vornehmlich durch die Kulturbedingungen beeinflusst (Rizos et al., 2002). Aus diesem Grund wird die *In vivo*-Kultur von IVM/IVF Rinderembryonen auch gegenwärtig bei der Embryoproduktion erfolgreich eingesetzt. Zur Reduktion der Kulturdauer und zur Ausnutzung der optimalen *In vivo*-Bedingungen wurde der Eileiter nicht nur für die *In vivo*-Kultur, sondern auch für die *In vivo*-Befruchtung ausgenutzt. Bei der *In vivo*-Befruchtung wurden *in vitro*-gereifte, unbefruchtete Eizellen gemeinsam mit *in vitro*-kapazitierten Spermien in den Eileiter der Empfängertiere übertragen („Gametes Intra Fallopian Transfer“, GIFT). Allerdings haben die ersten beschriebenen GIFT-Versuche zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis geführt. Als mögliche Ursache für diesen Misserfolg wurde die asynchrone Reifung der Gameten und die unphysiologische Verteilung der Spermien nach dem Transfer im Eileiter betrachtet.

Zur Absicherung der erfolgreichen Befruchtung beim GIFT-Verfahren ist es nötig, diese Befruchtungsstörungen zu beseitigen. Als mögliche Lösung scheint sich die kurzdauernde Initiierung der *In vitro*-Befruchtung von IVM-Eizellen anzubieten. Nach der *In vitro*-Maturation befinden sich über 90% Eizellen in Metaphase II (Ectors et al., 1995). In diesem Stadium kommen Eizellen nach der Ovulation in den Eileiter. Allerdings ist die Lebensdauer dieser Eizellen nur 6-12 Stunden, im Unterschied von Spermien, die 30-48 Stunden überleben (Hunter und Greve, 1997; Ijaz et al., 1994). Spermien müssen vorher noch ihre Kompetenz zur Eizellpenetration erlangen. Beim Rind dauert die *In vivo*-Kapazitation etwa 6 Stunden (Gordon, 2003). Bei der *In vitro*-Kapazitation werden analog den physiologischen Bedingungen Glykosaminoglykane eingesetzt, von denen Heparin die größte Bedeutung erlangt hat (Parrish et al., 1989).

Der nächste, die Fertilisation beeinflussende, Faktor ist die Zeit der Eizellen-Spermien-Koinkubation. In dieser Zeit penetrieren Spermien die Eizelle, die anschließend geformten Vorkerne verschmelzen miteinander und die erste Teilung fängt an. Der entscheidende Punkt für die Befruchtung ist die Spermiumpenetration. Die nötige Zeit für diese Spermiumpenetration bei IVM-Eizellen mit Cumuluszellen und *Corona radiata* ist etwa 4 Stunden (Saeki et al., 1991, Pavlok, 2000). Nachfolgend wird die befruchtete Eizelle durch zwei verschiedene Mechanismen, den vitellinen Block und die Zonareaktion, vor Polyspermie geschützt. Das Auftreten der Polyspermie hängt aber unter *In vitro*-Bedingungen mit der Koinkubationszeit zusammen. Mit einer Verlängerung der Kulturzeit kann die Polyspermierate steigen (Sumantri et al., 1997).

Der nächste wichtige Faktor während der *In vitro*-Befruchtung ist die Spermienkonzentration. Im Gegensatz zu den Befruchtungsvorgängen im weiblichen Tier, in dessen Eileiter nur einzelne Spermien auf die Eizelle treffen, sind *in vitro* Tausende von Spermien für eine erfolgreiche Befruchtung nötig. Gordon (2003) berichtet, dass die Spanne der Spermienkonzentration in der IVF zwischen  $0,5 \times 10^6$

und  $5 \times 10^6$  Spermien/ml, in Abhängigkeit vom System, liegt. Mit erhöhter Anzahl von Spermien kann allerdings die Polyspermierate beträchtlich steigen.

Der vorliegende Arbeitsabschnitt hatte die Untersuchung einer erfolgreichen kurzfristigen *In vitro*-Inkubation von Spermien und Eizellen für den anschließenden Transfer in den Eileiter zum Schwerpunkt.

#### 2.2.4.2 Methode

30-50 aus Ovarien geschlachteter Tiere gewonnene COC mit kompakter Cumuluszellschicht und regelmäßig granuliertem Ooplasma wurden nach dem Vorwaschen (zweimal in Waschmedium (WM; Modified Parker Medium (MPM) + 10% Serum von östrischen Kühen (OCS)) und einmal in Maturationsmedium (WM+FSH)) in jede Vertiefung einer 4-Well-Schale mit 400  $\mu$ l Maturationsmedium überführt und mit dem gleichen Volumen an Paraffinöl überschichtet, und im Brutschrank bei 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit für 22 - 24 h inkubiert.

Zur Spermiovorbereitung wurde das Swim-up-Verfahren mit Tiefgefriersperma eines Bullen angewandt. Die Samenpailletten (2 Pailletten je Welle) wurden 10 sec im 39 °C-Wasserbad aufgetaut, getrocknet und deren Inhalt in 10 ml Röhrchen entleert. 15 ml Röhrchen wurden mit je 1 ml Kapazitationsmedium (Modified TALP Medium) und 100  $\mu$ l Kapazitationsmedium mit Heparin (Endkonzentration 20  $\mu$ g Heparin/ml) befüllt und vorsichtig mit 100  $\mu$ l aufgetautem Sperma unterschichtet. Um eine Trennung von beweglichen und unbeweglichen Spermien und eine Induktion der Kapazitation zu erreichen, wurden die Röhrchen für 45 min bei 39 °C im Brutschrank inkubiert. Der klare Überstand (ca. 900  $\mu$ l) wurde in einem neuen 15 ml Röhrchen gesammelt und bei 200 g für 15 min zentrifugiert. Die sedimentierten Spermien waren dann in der Röhrchenspitze als „Samenpellet“ zu sehen. Der Überstand wurde auf das 3-fache Pelletvolumen reduziert und das Samenpellet resuspendiert. Die Spermienkonzentration wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Menge an Spermien suspension errechnet, die notwendig war, um im Befruchtungsmedium eine Endkonzentration von  $5 \times 10^6$  Spermien/ml in den Versuchsgruppen und  $1 \times 10^6$  Spermien/ml in der Kontrollgruppe zu erreichen. Die maturierten COC, durch einen deutlich expandierten Cumulus gekennzeichnet, wurden in vorbereitete 4-Well-Schalen mit jeweils 400  $\mu$ l Befruchtungsmedium (Modified TALP Medium) mit Heparin (Endkonzentration 20  $\mu$ g Heparin/ml) 15 bis 30 Minuten vor der Zugabe der Spermien umgesetzt und mit 400  $\mu$ l Paraffinöl überschichtet. Eizellen und Spermien wurden in den Versuchsgruppen für 1, 2 und 4 Stunden und in der Kontrollgruppe für 20 - 22 h bei 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. In den Versuchsgruppen wurden die Eizellen mit den restlichen Cumuluszellen 1, 2 und 4 Stunden nach Beginn der Befruchtung zweimal in Kulturmedium gewaschen und in eine neue Welle mit 400  $\mu$ l Kulturmedium (Synthetic Oviduct Fluid (SOF) + 5% OCS) umgesetzt und mit dem gleichen Volumen an Paraffinöl überschichtet. Die weitere Kultur wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt (Siehe oben).

Für die *In vitro*-Kultivierung wurden in jede Vertiefung einer 4-Well-Schale 50  $\mu$ l Kulturmedium vorgelegt und mit Paraffinöl überschichtet. Die COC bzw. Embryonen wurden in einem Röhrchen mit PBS und 1 mg/ml BSA für 90 s gevortext, um die noch verbliebenen Cumuluszellen von der *Zona pellucida* abzulösen. Von Cumuluszellen befreite Zygoten wurden zweimal in Kulturmedium gewaschen und in die vorbereitete 4-Well-Schale überführt. Die Embryonen wurden bei reduziertem O<sub>2</sub>-

Gehalt (5% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> bei 39 °C) im Brutschrank inkubiert. Die Embryonen wurden am Tag 7 und Tag 8 der Kultur beurteilt.

Der Einfluss der Kulturdauer während der *In vitro*-Befruchtung auf die Entwicklungsrate wurde untersucht. Als Kontrolle diente die normale *In vitro*-Embryoproduktion.

### 2.2.4.3 Ergebnisse

Für diesen Versuchsansatz kamen insgesamt 812 Eizellen zum Einsatz. Nach 1-stündiger Kurzzeitinkubation entwickelten sich zuerst 13,2% Blastozysten (Tag 7) und nach einer weiteren 24-stündigen *In vitro*-Kultivierung 16,8%. Diese Blastozystenraten am 8. Kulturtag konnten über die Verlängerung der Kurzzeitinkubation der IVF von 2 auf 4 Stunden bzw. für 20 bis 22 Stunden (mit 1 Mio Spermien/ml) gesteigert werden (21,1%; 24,2%; 26,8%). Dieser Unterschied war jedoch nur zwischen der 1-stündigen Koinkubationsgruppe und der Kontrollgruppe am Tag 8 signifikant ( $p < 0,05$ ; Chi<sup>2</sup>-Test). Der Unterschied der anderen Gruppe war nur tendenziell ( $p > 0,05$ ). Weiterhin war auffällig, dass sich im gleichen Maß der Anteil an Blastozysten veränderte, der sich nach Tag 7 innerhalb der folgenden 24 Stunden entwickelte (siehe Tabelle 13 und Abbildung 23). Somit konnte beobachtet werden, dass sich mit zunehmender Eizell-Spermien-Koinkubationsdauer auch der relative Anteil an Blastozysten (bezogen auf die Anzahl der Eizellen) nach dem 7. Tag erhöhte (3,6%; 6,9%; 6,0%; 8,2%).

Tabelle 13: Einfluss der Eizell-Spermien-Koinkubationsdauer auf die *In vitro*-Embryoentwicklung

Gruppe	Anzahl von Eizellen	Blastozysten am Tag 7 (%)	Blastozysten am Tag 8 (%)	Rel. Blastozysten-zunahme (D7-8)
1 Stunde	220	29 (13,2)	37 (16,8) <sup>a</sup>	3,6 %
2 Stunden	247	35 (14,2)	52 (21,1)	6,9 %
4 Stunden	248	45 (18,1)	60 (24,2)	6,0 %
Kontrolle	97	18 (18,6)	26 (26,8) <sup>b</sup>	8,2 %

<sup>a,b</sup>  $p > 0,05$

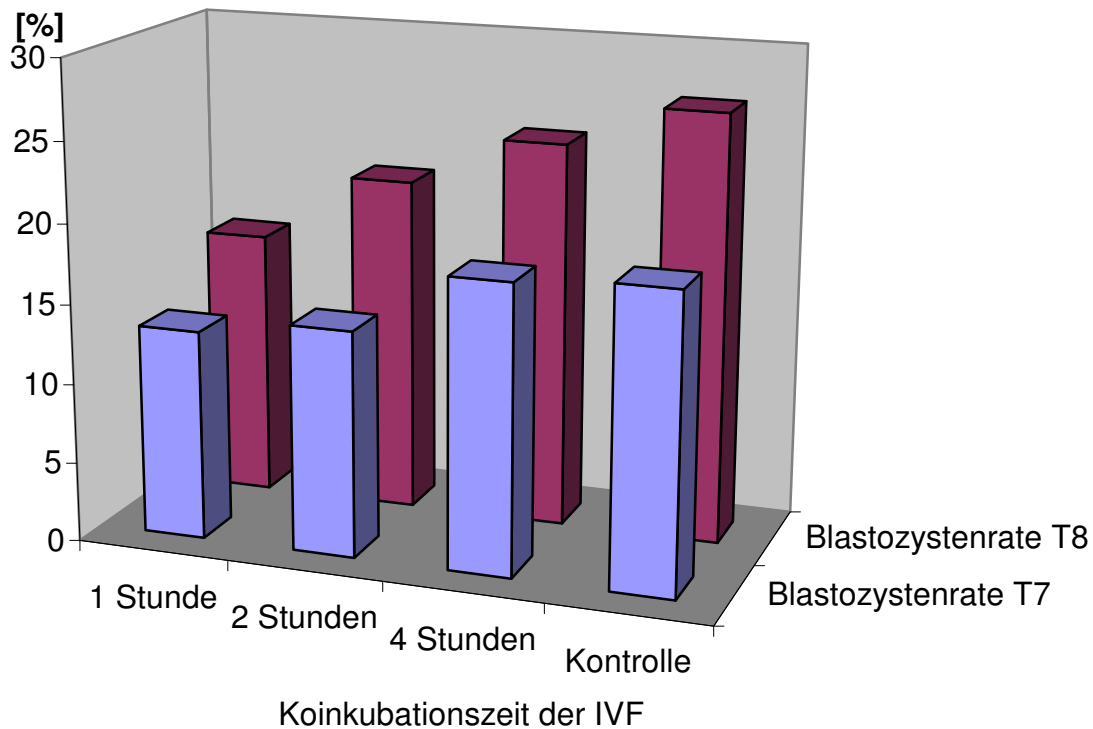


Abbildung 23: *In vitro*-Embryoentwicklung in Abhängigkeit von verschiedenen Eizell-Spermien-Koinkubationszeiten

#### 2.2.4.4 Diskussion

Ziel dieses Versuchsansatzes war es, die praktische Anwendung einer kurzzeitigen *In vitro*-Inkubation von Spermien und Eizellen zu untersuchen, um in diesem Projekt die bestmögliche Voraussetzung und einen Ansatz für ein erfolgreiches GIFT-Verfahren zu schaffen und die Dauer der IVF-Medienexposition so kurz wie möglich zu halten, da das verwendete IVF-Medium mehr an die Bedürfnisse der Spermien als an die Kultur von Embryonen adaptiert ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass die kurzdauernde *In vitro*-Eizell-Spermien-Koinkubation zu gleich hohen Blastozystenraten wie die normale IVP führen kann. Bisherige Untersuchungen anderer Autoren lieferten gegensätzliche Ergebnisse. Sumantri et al. (1997) bemerkten, dass eine Verkürzung der Koinkubationsdauer von 20 Stunden auf 5 Stunden zu einer 4-fachen Reduktion der Teilungsrate (85% vs. 20%) führte. Ward et al. (2002) haben nach einstündiger Koinkubation nur unerhebliche Teilungs- und Blastozystenraten erreicht. Eine Verlängerung der Koinkubation auf 5 Stunden verbesserte die Teilungs- und Blastozystenrate (37% und 19%), aber erst die 10-stündige Koinkubation führte zu optimalen Teilungs- und Blastozystenraten (64% und 32%). Ein Grund für niedrigere Teilungs- und Blastozystenraten nach kurzfristiger Koinkubation bei *In vitro*-Befruchtung sahen sie in der Barriere von Cumuluszellen und *Corona radiata*, durch die die Spermien zur *Zona pellucida* durchdringen müssen im Unterschied zur *In vivo*-Situation, wo die Eizelle bereits kurz nach der Ovulation von Cumuluszellen befreit ist. Im Gegensatz dazu haben Gomez und Diez (2000) keinen negativen Einfluss auf die Befruchtung von Rindereizellen nach einer nur



zweistündigen Spermien-Eizell-Koinkubation festgestellt. Zu einem ähnlichen Befund kamen auch die Ergebnisse dieser Studie, die für die 2- und 4-stündige Koinkubation keine Beeinflussung der Blastozystenrate aufwiesen, im Unterschied zur einstündigen Koinkubation, die am Tag 8 zur einer Reduktion der Blastozystenrate führte. Auch in Humanmedizin besteht eine Tendenz zu einer kurzzeitigen Spermien-Eizell-Koinkubation, die gleiche oder bessere Ergebnisse als das generell akzeptierte „langdauernde“ Protokoll erzielt (Quinn et al., 1998). Im Unterschied zur IVP beim Rind, wo die Eizellen nach gemeinsamer Koinkubation gleich von Cumuluszellen befreit werden, werden in der Humanmedizin intakte COC nach Koinkubation in frisches Befruchtungsmedium umgesetzt. Deshalb können in der Cumuluszellmasse befindliche Spermien später die Eizelle penetrieren (Gianaroli et al., 1996). Außerdem erhöhen die Cumuluszellen nicht nur die Anzahl von Spermien um die Eizelle, sondern erleichtern auch die Kapazitation, Akrosomreaktion und Penetration (Tanghe et al., 2002). Die kurze Koinkubation mit hoher Spermkonzentration minimiert auch die Produktion von freien Radikalen, die Peroxidation der Membranlipide und damit eine Beeinträchtigung der Spermienfunktionen verursachen kann (Quinn et al., 1998).

Voraussetzung für die Befruchtung ist die Erlangung der Kompetenz der Spermien vor der Zugabe zu den Eizellen. Deshalb wurden die Spermien schon während des Swim-up-Verfahrens im Medium mit Heparin inkubiert. Es wurde festgestellt, dass die Verwendung von 10 µg Heparin/ml Medium schon bei 10-minütiger Inkubation konstante und reproduzierbare Befruchtungsergebnisse in einem IVF-System im Swim-up-Verfahren ergab (Park et al., 1989; Parrish et al., 1986, 1989).

Die im Versuch angewendete Spermienkonzentration liegt im höheren Bereich der optimalen Spanne für die *In vitro*-Befruchtung von Rindereizellen, die von Gordon (2003) zwischen  $0,5 \times 10^6$  und  $5 \times 10^6$  Spermien/ml angegeben wird. Für die kurzdauernde Koinkubation wurde aber kein negativer Effekt auf die Blastozystenrate beobachtet. Tanghe et al. (2000) haben keine signifikante Beeinflussung der Befruchtung in definierten Konzentrationen von  $0,5 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^6$  Samenzellen je ml Fertilisationsmedium (entsprechend einem Verhältnis von  $5 \times 10^3$  bis  $50 \times 10^3$  Samenzellen je Eizelle) festgestellt. Nedambale et al. (2004) haben die Standard-IVF mit  $1 \times 10^7$  Spermien für 6 Stunden durchgeführt. Die Polyspermiegefahr kann aber durch die Masse von Cumuluszellen wesentlich reduziert werden (Galli et al., 2000). Aus diesen Untersuchungsergebnissen geht deutlich hervor, dass durch die Optimierung der *In vitro*-Befruchtung bei der kurzdauernden Samen-Eizellen-Koinkubation eine vergleichbare Blastozystenrate zur normalen IVP zu erreichen ist, und darüber hinaus mit dem GIFT-Verfahren hochwertige Embryonen nach *In vivo*-Kultivierung im Rindereileiter produziert werden können.

#### 2.2.4.5 Literatur

Ectors FJ, Koulischer L, Jamar M, Herens C, Verloes A, Remy B, Becker JF (1995): Cytogenetic study of bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 44, 445-450.

Hunter RHF, Greve T (1997): Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. *Reprod Dom Anim* 32, 137-141.

Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G (2003): Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59, 599-616.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fiorentino A, Tosti E, Panzelle S (1996): Reducing the time of sperm-oocyte interaction in human in-vitro fertilization improves the implantation rate. *Hum Reprod* 11, 166-171.

Gomez E, Diez C (2000): Spermatozoa affecting bovine embryo development in vitro attach to matured cumulus-oocyte complexes within two hours of co-culture. *Theriogenology* 53, 421.

Gordon I (2003): Laboratory production of cattle embryos. In *Biotechnology in agriculture*. Wallingford: CAB International.

Nedambale TL, Dinnyés A, Groen W, Dobrinsky JR, Tian XC, Yang X (2000): Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, In Press.

Park CH, Ohgoda O, Niwa K (1989): Penetration of bovine follicular oocytes by frozen- thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. *J Reprod Fert* 86, 577-582.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL (1989): Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 41, 683-689.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL (1986): Bovine in vitro fertilization with frozen - thawed semen. *Theriogenology* 25, 591-600.

Pavlok A (2000): D-penicillamine and granulosa cells can effectively extend the fertile life span of bovine frozen-thawed spermatozoa in vitro: effect on fertilization and polyspermy. *Theriogenology* 53, 1135-1146.

Quinn P, Lydic ML, Ho M, Bastuba M, Hendee F, Brody SA (1998): Confirmation of the beneficial effects of brief co-incubation of gametes in human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 69, 399-402.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P (2002): Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Repro Dev* 61, 234-248.

Saeki K, Kato H, Hosoi Y, Miyake M, Utsumi K, Iritane A (1991): Early morphological events of in vitro fertilized bovine oocytes with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 35, 1051-1058.

Sumantri C, Boediono A, Ooe M, Murakami M, Saha S, Suzuki T (1997): The effect of sperm-oocyte incubation time on in vitro development using sperm from a tetraparental chimeric bull. *Anim Reprod Sci* 48, 187-195.

Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A (2002): Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. *Mol Reprod Dev* 61, 414-424.

Tanghe S, Van Soom A, Talebkhan Garoussi M, Mintiens K, de Kruif A (2000): Sperm-egg ratios above 5000:1 do not improve in vitro fertilization rates in the bovine. *J Reprod Fertil, Abstract Series* 25, 91.

Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P (2002): Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57, 2105-2117.

## 2.2.5 Wirkung unterschiedlicher Proteinsupplementierungen auf die Embryonalentwicklung

### 2.2.5.1 Einleitung

Obwohl die Qualität der gewonnenen Eizellen die Voraussetzung für alle folgenden *In vitro*-Schritte darstellt und maßgeblich durch ihre Entwicklungskompetenz den Anteil derjenigen Eizellen bestimmt, die sich bis zur Blastozyste entwickeln, übt dennoch das Kulturmilieu den größten Einfluss auf die Blastozystenqualität aus (Rizos et al., 2002b). Dies wird durch zahlreiche Versuche bestätigt, in denen *in vitro*-produzierte Zygoten im Schafeileiter *in vivo* kultiviert wurden, um generelle Eigenschaften wie z.B. die Kryotoleranz der gewonnenen Embryonen entscheidend zu verbessern (Enright et al., 2000). In der Entwicklungsperiode nach der Fertilisation finden Vorgänge statt, in denen der Embryo morphologische Strukturen aufbaut, die ihm die qualitative Ausstattung für eine kompetente Weiterentwicklung geben. Beispielhaft soll die erste mitotische Teilung, die Aktivierung des embryoeigenen Genoms (Überwindung des sog. „Zellblocks“), Kompaktierungsvorgänge im Morulastadium sowie die deutlich sichtbaren Formationsabläufe der Blastozysten genannt werden (Rizos et al., 2002a).

Die konventionellen *In vitro*-Kulturen von Rinderembryonen werden in den sogenannten „nicht definierten Medien“ mit Serum oder Serumderivaten als Proteinzusatz durchgeführt. Seren enthalten eine Vielzahl von Komponenten in komplexer Zusammensetzung (Proteine, Mineralstoffe, Spurenelemente, Vitamine, Aminosäuren, Energiesubstrate, Wachstumsfaktoren, Hormone, Salze, Puffersubstanzen) und werden dem Medium in einer Größenordnung von 2 - 20% zugesetzt. Die Ergänzung von Medien mit Seren zeigt zwar deutliche Auswirkungen auf die Kultur (↑Blastozysten- und ↑Schlupfrate), es sind jedoch auch negative Begleiterscheinungen erkennbar (Bavister, 1995). In Anwesenheit des Serums wurde ein biphasischer Entwicklungseffekt festgestellt. Serum kann frühere Teilungsstadien hemmen, spätere Stadien allerdings in ihrer Entwicklung in der Art fördern, dass Blastozystenstadien früher in der Kultur erscheinen (Gutierrez-Adan et al., 2001). Die *In vitro*-Kultur von Rinderembryonen in Gegenwart von Serum führt zu höheren Vorkommen kongenitaler Missbildungen und zur Geburt von Kälbern mit größerem Körpergewicht (Large Offspring Syndrom, LOS) (Van Wagendonk de Leeuw et al., 1998). Eine Langzeitexposition des Embryos mit Serumbestandteilen kann auch morphologische sowie metabolische Veränderungen im Embryo hervorrufen (Crosier et al., 2001). Die *In vitro*-Kultur in Anwesenheit von Serum führte bei Rinderblastozysten zu einer Zunahme an zytoplasmatischen Vesikeln, Lipidtropfen und zur Bildung abnormaler bzw. immaturer Mitochondrien (Shamsuddin und Rodriguez-Martinez, 1994). Die Gewinnung von Blastozysten beim Rind in Serum-freiem Medium lieferte eine der *In vivo*-Situation vergleichbare Morphologie, wobei die Anzahl der Blastozysten gegenüber der Serumzugabe deutlich reduziert war (Keskintepe et al., 1995).

Der vorliegende Arbeitsabschnitt hatte die Untersuchung eines Einflusses unterschiedlicher Konzentrationen an Serum und bovinem Serumalbumin (BSA) im Medium auf die Blastozystenrate und -dynamik zum Schwerpunkt, um optimale *In vitro*-Mindestvoraussetzungen im Rahmen des Projektzieles zu erhalten und einschätzen zu können.

### 2.2.5.2 Methode

Die *In vitro*-Produktion wurde analog den Versuchen aus den Punkten 2.2.3.2 und 2.2.4.2 durchgeführt. Dementsprechend wurde die Eizellgewinnung von Schlachthofovarien, die IVM und die IVF methodisch gleich ausgeführt.

Die *In vitro*-Kultur wurde in 4-Well-Schalen mit jeweils 400 µl Kulturmedium angesetzt und mit dem gleichen Volumen an Paraffinöl überschichtet. Für die Bildung der Versuchsgruppen wurde das Kultursystem (SOF-Medium) mit OCS (Östrus Cow Serum) oder BSA (Bovines Serum Albumin) in unterschiedlicher Konzentration (OCS: 1%, 5%, und 10%; BSA: 3 und 6 mg/ml mit und ohne Fettsäuren) angereichert. Die COC bzw. die Embryonen wurden in einem Röhrchen mit Kulturmedium für 90 s gevortext, um die noch verbliebenen Cumuluszellen von der *Zona pellucida* abzulösen. Die Zygoten wurden im Kulturmedium zweimal gewaschen und in die vorbereiteten 4-Well-Schalen überführt. Die Embryonen wurden bei reduziertem O<sub>2</sub>-Gehalt (5% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> bei 39 °C) im Brutschrank inkubiert. Am Tag 7 und 8 wurde die Entwicklung im Stereomikroskop beurteilt, zusätzlich wurden von jeder Gruppe Embryonen elektronenmikroskopisch untersucht.

### 2.2.5.3 Ergebnisse

Insgesamt bewegten sich die Blastozystenraten der Kulturstage 7 und Tag 8 im Bereich von 5,7 bis 29,1% bzw. 14,6 bis 39,1%. Wie aus Tabelle 14 und Abbildung 24 hervorgeht, wurde ein deutlicher Unterschied zwischen Gruppen mit OCS und BSA beobachtet ( $p < 0,001$ ; Chi<sup>2</sup>-Test). Die Blastozystenraten der mit OCS behandelten Kulturgruppen von Tag 7 und Tag 8 betragen 19,9 bis 29,1% bzw. 31,0 bis 39,1%. Im Unterschied dazu wiesen die BSA-Kulturgruppen Blastozystenraten von Tag 7 und Tag 8 von nur 5,7 bis 12,5% bzw. 14,6 bis 20,7% auf. In der OCS-Gruppe wurden die besten Ergebnisse in 5%-iger OCS-Kultur erreicht. Die Ergebnisse aus den Kulturen mit 1% OCS und 10% OCS unterschieden sich hingegen nicht. In den Kulturgruppen mit BSA ohne Fettsäure waren mehr Blastozysten zu finden als in den Gruppen mit fettsäurehaltigem BSA, aber der Unterschied war nicht signifikant. Generell war die Entwicklungsgeschwindigkeit in den OCS-Gruppen höher als in den BSA-Gruppen, da von allen gewonnenen Blastozysten in den OCS-Gruppen etwa 2/3 der Blastozysten schon am Tag 7 beobachtet wurden, wohingegen die Blastozysten in den BSA-Gruppen am Tag 7 nur zur Hälfte zu finden waren ( $p < 0,001$ ; Chi<sup>2</sup>-Test).

Tabelle 14: Einfluss von *Östrus-Cow-Serum* (OCS)- bzw. von *Bovinem Serum Albumin* (BSA)-Zusatz auf die Embryonalentwicklung *in vitro*

Kulturbedingungen	Anzahl COC	Blastozysten, Tag 7		Blastozysten, Tag 8	
		n	Anteil %	n	Anteil %
SOF+10%OCS	224	47	21,0	72	32,1
SOF+5%OCS	471	137	29,1	184	39,1
SOF+1%OCS	261	52	19,9	81	31,0
SOF+3mgBSA ohne FS	450	47	10,4	88	19,6
SOF+3mgBSA mit FS	158	9	5,7	23	14,6
SOF+6mgBSA ohne FS	440	55	12,5	91	20,7
SOF+6mgBSA mit FS	168	15	8,9	32	19,0

FS: Fettsäuren

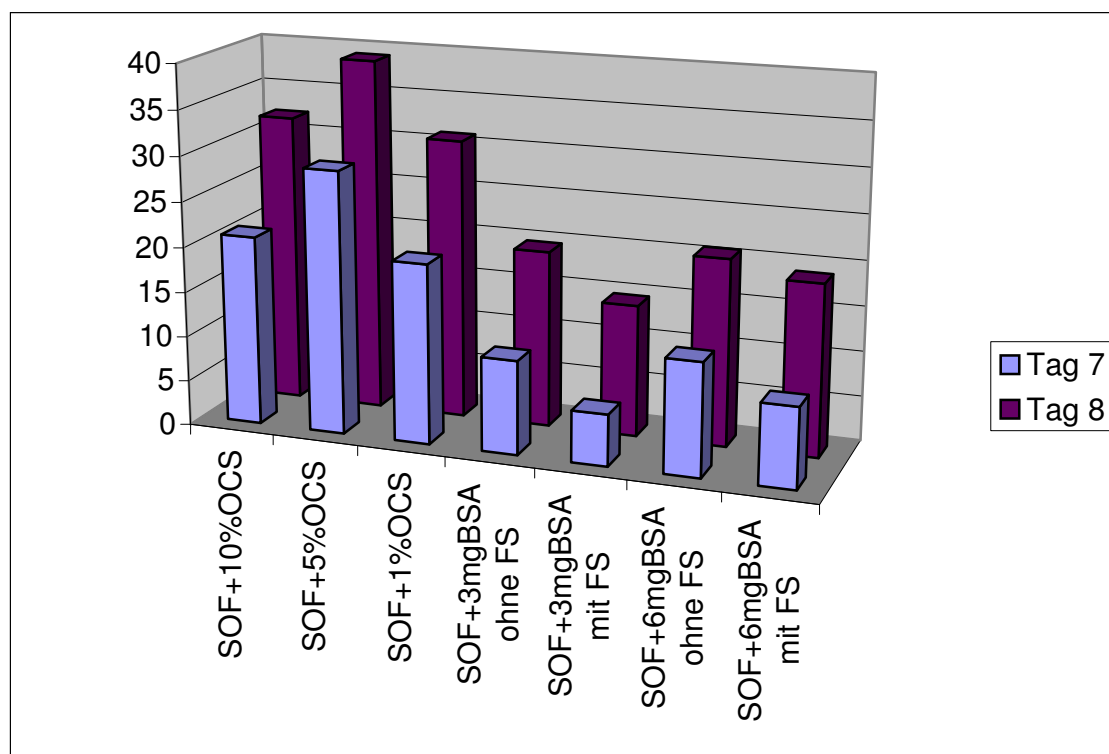


Abbildung 24: Entwicklungsdynamik in der IVP in Abhängigkeit von verschiedenen Proteinergänzungen

#### 2.2.5.4 Diskussion

Das Ziel dieses Versuchsansatzes war die Untersuchung der für die praktische Anwendung routinemäßig eingesetzten und gleichzeitig als kritisch zu beurteilenden Zusätze zum Kulturmedium, um die bestmöglichen Voraussetzungen einer optimierten *In vitro*-Embryoproduktion zu schaffen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Kultur mit OCS zu deutlich höheren Blastozystenraten als die Kultur mit BSA führt. Dies belegen auch Studien von Lonergan et al. (1999), die nach Zugabe von 3 mg/ml BSA zu SOF eine bessere Blastozystenentwicklung registrierten als bei Kultur in proteinfreiem SOF; die Verwendung von 10%-igem fötalem Kälberserum in SOF resultierte in einer signifikant höheren Blastozysten- und Schlüpftrate. Yoshioka et al. (1997) erhielten ähnliche Ergebnisse, wenn sie SOF mit BSA (3 mg/ml) durch SOF mit 5% fötalem Kälberserum ersetzen. Ein besonderes Augenmerk ist zudem auf die Vielzahl an qualitativ unterschiedlichen BSA-Produkten zu richten, die je nach Aufreinigungsgrad z.T. chemische, d.h. nichtbiologische Kontaminanten mit nicht vorhersagbarem (toxischem) Kultureinfluss besitzen. Daher wären Produkte mit rekombinantem BSA, die günstigeren Herstellungsverfahren ohne Rückstandsbildung unterliegen, zu bevorzugen (Grey et al., 1992).

Der kommerzielle Aspekt einer OCS-Verwendung ist in der Steigerung transferierbarer Embryonen am Tag 7 zu sehen. Die Versuchsgruppen aus dem vorliegenden Experiment, denen OCS zum Kulturmedium zugegeben wurde, zeigten deutlich mehr Blastozysten am Tag 7 als die BSA-Gruppen. Nicht nur die Verwendung von Serum von Kühen, sondern auch fötales Kälberserum übt diesen Kultureffekt aus. So konnten Van Langendonck et al. (1998) beobachten, dass es nach Zusatz von fötalem Kälberserum zur schnelleren Entwicklung von Blastozysten kam. Die Entwicklungsbeschleunigung wurde vor allem zwischen dem 9-16-Zellstadium und dem Erscheinen der Morulastadien in Kultur beobachtet, wodurch die ersten Blastozysten um 0,9 Tage früher erschienen. Yoshioka et al. (1997), die dieses allgemeine Phänomen der um 1 Tag früher entwickelten Blastozysten in SOF-Medium mit fötalem Kälberserum anstelle von BSA bestätigten, folgerten daraus eine vorzeitige Blastulation mit weniger Zellen aus dem Morulastadium heraus als bei Embryonen mit „verzögerter“ Entwicklung.

Aus diesen Untersuchungsergebnissen geht deutlich hervor, dass durch die Optimierung des *In vitro*-Produktionssystems *per se* Verbesserungen im Bereich der Blastozystenrate zu erreichen sind, und darüber hinaus in Kombination mit einer „Kurzzeit-IVP“ und frühzeitigem Re-Transfer hochwertige Embryonen für die Anwendung im Zuge des Projektzieles erhalten werden können.

#### 2.2.5.5 Literatur

Bavister BD (1995): Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. Human Reprod Update 1,91-148.

Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP (2000): Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs. *in vivo*: Implications for early embryo development and quality. Theriogenology 54, 659-673.

Grey CW, Morgan PM, Kane MT (1992): Purification of an embryotrophic factor from commercial bovine serum albumin and its identification as citrate. *J Reprod Fertil* 94,471-480.

Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos D, Ward FA, Boland MP, Pintado B, De La Fuente J (2001): Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 55,1117-1126.

Lonergan P, O`Keaney-Flynn M, Boland MP (1999): Effect of protein supplementation and presence of antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology* 51,1565-1576.

Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P (2002a): Bovine culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod* 68,236-243.

Rizos D., Ward F., Duffy P., Boland MP., Lonergan P. (2002b): Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61,234-248.

Van Langendonck A, Donnay I, Schuurbiers N, Auquier P, Carolan C, Massip A, Dessy F (1997): Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *J Reprod Fertil* 109,87-93.

Van Wangtendonk De Leeuw AM, Aerts BJG, Den Daas JHG (1998): Abnormal offspring following *in vitro* production of bovine preimplantation embryos: a field study. *Theriogenology* 49,883-894.

Yoshioka K, Othman AM, Taniguchi T, Yamanaka H, Sekikawa K (1997): Differential patterns of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA. *Theriogenology* 48,997-1006.



## 2.2.6 Wirkung unterschiedlicher Proteinsupplementierungen auf die Kryokonservierung

### 2.2.6.1 Einleitung

Lange Zeit waren Untersuchungen zur *In vitro*-Produktion von Rinderembryonen darauf ausgerichtet, die frühe Embryonalentwicklung bis zum Stadium der Blastozyste zu ermöglichen bzw. den Anteil jener Eizellen, die sich nach erfolgter Befruchtung bis zur Blastozyste weiterentwickelten, zu erhöhen. Schon bald gelangte man zur Einsicht, dass die auf verschiedenste Weise *in vitro*-produzierten Embryonen zum Teil beträchtliche Unterschiede in Hinblick auf ihre Weiterentwicklungsfähigkeit aufwiesen. Sehr deutlich zeigen sich diese Unterschiede, wenn die Embryonen Belastungen wie der Kryokonservierung ausgesetzt werden. Einerseits spiegelt die Fähigkeit des Embryos, dieser Belastung standzuhalten, seine Qualität wider, andererseits soll und muss ein Embryo, auch hinsichtlich der Praktikabilität der *In vitro*-Produktion bzw. der Konservierungsmethode, in der Lage sein, auch nach Tiefgefrierung und anschließender Übertragung die weitere Entwicklung fortzusetzen.

Neben Kriterien, die in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Konservierungsverfahren selbst stehen, sind es vor allem die zu konservierenden Embryonen bzw. deren Qualität, die für den möglichen Erfolg oder Misserfolg der Kryokonservierung verantwortlich zeichnen. Fukuda et al. (1990) berichteten erstmals von der Geburt eines *in vitro*-produzierten Kalbes nach vorheriger Kryokonservierung. Fanden anfangs Konservierungsverfahren, die sich in der Arbeit mit auf natürliche Weise entstandenen Rinderembryonen bewährt hatten, Anwendung, wurde bald erkannt, dass *in vitro*-produzierte Rinderembryonen ungleich empfindlicher auf Abkühlung und Gefrierung reagierten (Leibo und Luskutoff, 1993) und entsprechende Modifizierungen verlangten (Agca et al., 1994). Wichtige Faktoren, die die Embryogefriertoleranz beeinflussen, sind die Kulturbedingungen und das Embryoalter.

Die *In vitro*-Produktion von Rinderembryonen erfolgt vielfach unter Verwendung von Protein oder Serum im Kulturmedium und kann dazu führen, dass die Embryonen große Mengen an Lipiden, vor allem in den Trophektoderm-Zellen akkumulieren (Ferguson und Leese, 1999). Diese intrazellulären Lipide werden für die geringere Gefriertoleranz ebenso wie für das geringere spezifische Gewicht *in vitro*-produzierter Rinderembryonen verantwortlich gemacht (Leibo et al., 1995; Leibo und Luskutoff, 1993; Pollard und Leibo, 1993). In Anlehnung an eine Methode zur Entfernung intrazellulärer Lipide bei Schweineembryonen (Nagashima et al., 1994, 1999) gelang es tatsächlich, die Gefriertoleranz *in vitro*-produzierter Rinderembryonen zu erhöhen (Leibo et al., 1995). Nach Ansicht von Ushijima et al. (1999) bleibt nach teilweiser Lipidentfernung im Stadium der Zygote die normale Entwicklungsfähigkeit erhalten und resultiert in einer positiven Beeinflussung der Gefriertoleranz. Dem stehen Beobachtungen von Diez et al. (1996) gegenüber, die unter Anwendung dieses Verfahrens die erhöhte Gefriertoleranz zwar bestätigen, die embryonale Entwicklungskompetenz aber sehr wohl beeinträchtigt sehen. Murakami et al. (1998)

wiederum konnten auch keine verbesserte Gefriertoleranz von Rinderembryonen - allerdings im 8-Zellstadium - feststellen.

Wie die mögliche Protein- bzw. Serumverwendung im Kulturmedium scheinen auch das jeweils verwendete Kulturmedium bzw. -verfahren selbst die Gefriertoleranz *in vitro*-produzierter Rinderembryonen nachhaltig zu beeinflussen. Der Effekt beschrieben Van Soom et al. (1996) für die Verwendung von *Ménézo B2-Medium* bzw. TCM-199 zur *In vitro*-Kultivierung und stellten ihre Resultate in Bezug zur Zellzahl der *Inner Cell Mass*; die verzögerte Ausbildung der ICM und die größere Variabilität in deren Zellzahl bei Verwendung von *Ménézo B2-Medium* mag mit ein Grund für die reduzierte Gefriertoleranz sein, insofern als die Belastung durch die Kryokonservierung einen Teil der embryonalen Zellen zu zerstören vermag, ohne den Embryo als Ganzes abzutöten. Hasler et al. (1997) allerdings konnten diesen Zusammenhang mit der Gefriertoleranz *in vitro*-produzierter Rinderembryonen bei Verwendung von *Ménézo B2-Medium* bzw. TCM-199 nicht bestätigen. Diese mögliche Diskrepanz zwischen Beförderung der frühen Embryonalentwicklung einerseits und Beeinflussung der Gefriertoleranz andererseits legten auch IMAI et al. (2002) im Vergleich von CR1-Medium und TCM-199 dar; ihrer Untersuchung zufolge war die Überlebensrate nach Kryokonservierung unter Verwendung von CR1-Medium produzierter Rinderembryonen signifikant erniedrigt.

Imai et al. (2002) führten ihre Untersuchung alternativ auch als Ko-Kultur mit somatischen Zellen durch, und generell wird die Ko-Kultivierung in der frühen Embryonalentwicklung in Hinblick auf die Tiefgefriertauglichkeit der resultierenden Embryonen von verschiedenen Arbeitsgruppen als anderen *In vitro*-Kultivierungsverfahren überlegen angesehen (Leibo und Luskutoff, 1993; Massip et al., 1993; Voelkel und Hu, 1992).

War die temporäre *In vivo*-Kultivierung früher Embryonalstadien in der Anfangszeit der *In vitro*-Produktion von Rinderembryonen die einzige Möglichkeit, die Arretierung der Entwicklung zum Zeitpunkt der embryoeigenen Genomaktivierung zu umgehen, so findet dieses Kultivierungsverfahren trotz des damit verbundenen Mehraufwandes heute, in Hinblick auf die Verbesserung der Embryoqualität, wieder vermehrt Verwendung. In Übereinstimmung mit Rizos et al. (2001) wird diese Qualitätssteigerung, gekennzeichnet durch die erhöhte Gefriertoleranz der resultierenden Blastozysten, in weiteren Arbeiten von Enright et al. (2000), Lonergan et al. (2003) bzw. Rizos et al. (2002, 2003) bestätigt.

Embryoalter und das jeweilige Entwicklungsstadium scheinen, selbst bei Verwendung identischer Methoden, erheblichen Einfluss auf den Erfolg der Kryokonservierung zu haben (Dinnyes et al., 1996, 1999; Pollard und Leibo, 1993). Eizellen und frühe Embryonalstadien beim Rind sind in hohem Maß empfindlich gegenüber Abkühlung. Weiter fortgeschrittene Embryonalstadien scheinen dagegen sowohl konventionelle Gefrierverfahren als auch die Vitrifikation, ein alternatives Verfahren zur Konservierung von biologischem Material, ungleich besser zu tolerieren.

Das Ziel des vorliegenden Abschnittes war es, zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Kulturbedingungen - temporäre *In vivo*-Kultur bzw. Veränderungen in der Proteinergänzung im Kulturmedium - und Embryoalter eine Wirkung auf die Embryogefriertoleranz haben.

### 2.2.6.2 Methode

An Tag 7 und Tag 8 der *In vitro*-Produktion (3mg/ml und 6 mg/ml BSA bzw. 1%, 5% und 10% OCS) und an Tag 7 der GIFT-Gruppe (siehe *In vivo*-Kultur - GIFT-Verfahren) erfolgte unter lichtmikroskopischer Betrachtung die morphologische Beurteilung und Selektion der Embryonen.

Zur Beurteilung des Entwicklungsstadiums wurden die Kriterien nach Tabelle 15 herangezogen, wobei für die Kryokonservierung Embryonen der Entwicklungsstadien *Blastozyste* (Code 6) und *expandierte Blastozyste* (Code 7) Verwendung fanden.

Tabelle 15: Codierung embryonaler Entwicklungsstadien beim Rind in Anlehnung an Merton (2002)

Code	Entwicklungsstadium	morphologische Beschreibung
5	frühe Blastozyste	<i>Blastocoel</i> < 50%
6	Blastozyste	<i>Blastocoel</i> > 50%, ICM und Trophoblast sind unterscheidbar
7	expandierte Blastozyste	Zunahme des Gesamtdurchmessers des Embryos, Verdünnung der <i>Zona pellucida</i>
8	schlüpfende Blastozyste	Eröffnung der <i>Zona pellucida</i> , teilweiser Austritt des Embryos aus der <i>Zona pellucida</i>
9	geschlüpfte Blastozyste	vollkommen geschlüpfter Embryo, leere <i>Zona pellucida</i>

Die Beurteilung der morphologischen Integrität der Embryonen wurde anhand der in Tabelle 16 ausgewiesenen Kriterien durchgeführt; zur Kryokonservierung fanden ausschließlich Embryonen der Qualitätsklasse I Eingang.

Tabelle 16: Codierung embryonaler Entwicklungsstadien nach ihrer Qualität (nach IETS *Manual*, 1998)

Code	Klassifizierung und morphologische Beschreibung
1	<p><i>Exzellent, sehr gut</i></p> <p>Symmetrischer und kugelförmiger Embryo, dessen Blastomeren einheitlich in Größe, Farbe und Dichte sind; der Embryo befindet sich im erwarteten Entwicklungsstadium und wenigstens 85% der embryonalen Masse erscheinen intakt und lebensfähig; die <i>Zona pellucida</i> ist glatt und zeigt keine Schädigungen der Oberfläche.</p>
2	<p><i>Gut</i></p> <p>Moderate Unregelmäßigkeiten in Form des Embryos bzw. in Größe, Farbe oder Dichte der Blastomeren; wenigstens 50% der embryonalen Masse erscheinen intakt und lebensfähig.</p>
3	<p><i>Schlecht</i></p> <p>Deutliche Unregelmäßigkeiten in Form des Embryos bzw. in Größe, Farbe oder Dichte der Blastomeren; wenigstens 25% der embryonalen Masse erscheinen intakt und lebensfähig.</p>
4	<p><i>Tot, degeneriert</i></p> <p>Degenerierende Embryonen, Eizellen oder Zygoten: nicht lebensfähig.</p>

#### *Durchführung der Kryokonservierung*

Alle zur Kryokonservierung vorgesehenen Embryonen wurden nach Beurteilung und Selektion in mPBS gespült und bis zur unmittelbaren Verwendung aufbewahrt.

Als Kryoprotektivum wurde ausschließlich Ethylenglykol (1,5 M Ethylenglykol + 0,1 M Sukrose in emCare®, Fa. ICP, Auckland, Neuseeland) verwendet.

Alle für die unmittelbare Verwendung bestimmten Medien (mPBS zur zwischenzeitlichen Aufbewahrung, Ethylenglykol) wurden vor Verwendung zu- bzw.

vorbereitet und bei Raumtemperatur bereitgestellt. Nach der jeweils gegebenen Anzahl an zu konservierenden Embryonen wurden dieselben in Gruppengrößen von 2 bis 6 aus dem Aufbewahrungsmedium aufgenommen, zweimal in Ethylenglykol gespült und bis zur Konfektionierung in Ethylenglykol zur Äquilibration belassen.

Die Konfektionierung erfolgte in Kunststoffpailletten (Mini-Paillette - 0,25 ml, Fa. Minitüb, Abfüll- und Labortechnik GmbH & Co.KG, Tiefenbach, Deutschland), wobei jede Paillette nach folgendem Schema befüllt wurde, wobei die Volumina jeweils durch eine Luftblase voneinander getrennt waren:

Kryoprotektivum ( $\frac{1}{3}$  bis  $\frac{1}{2}$  der Paillettenlänge)

Kryoprotektivum inklusive Embryonen in minimalem Volumen

Kryoprotektivum ( $\frac{1}{3}$  bis  $\frac{1}{2}$  der Paillettenlänge)

Nach erfolgter Konfektionierung wurden alle befüllten Pailletten luftdicht verschlossen und bis zum Beginn der Tiefgefrierung in waagerechter Position gelagert.

Vom Erstkontakt der Embryonen mit Kryoprotektivum bis zum Beginn der eigentlichen Kryokonservierung war eine Zeitdauer von maximal 10 Minuten zur Äquilibration bei Raumtemperatur vorgesehen.

Die Kryokonservierung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Embryonen erfolgte im Gefriergerät Thermostat Phoenix P1 - C50P (Fa. Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Das Gefriergut wurde horizontal in flüssigen Alkohol (-6 °C, Aufbewahrungsdauer 10 Minuten) verbracht, wobei 5 Minuten nach Verbringung die Kristallbildung (*seeding*) ausgelöst wurde. Die langsame Abkühlung erfolgte entsprechend einer Kühlrate von 0,3 °C/min, ehe bei Erreichen der vorläufigen Endtemperatur von -35 °C das Umsetzen (*plunging*) des Gefrierguts und dessen weitere Lagerung in flüssigem Stickstoff (-196 °C) ausgeführt wurde.

Alle kryokonservierten Embryonen wurden bis zum Auftauen für wenigstens 21 Tage in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

#### *Auftauen der Embryonen und nachfolgende In vitro-Kultivierung*

Alle zum Auftauen vorgesehenen Embryonen wurden nach ihrer Entnahme aus flüssigem Stickstoff nacheinander für jeweils 10 Sekunden unter leichter Bewegung bei Raumtemperatur an Luft und nachfolgend für jeweils 20 Sekunden vorsichtig in Wasser (25 °C) geschwenkt. Die Pailletten wurden jeweils für sich eröffnet und ihr Inhalt in eine leere Kunststoffschale entleert; die Embryonen wurden, soweit auffindbar, aufgenommen, mehrmals im nachfolgend verwendeten Kulturmedium gespült und bis zur eigentlichen *In vitro*-Folgekultivierung ebendort aufbewahrt.

Die *In vitro*-Folgekultivierung wurde analog der *In vitro*-Kultivierung durchgeführt; alle der jeweiligen Versuchsgruppe zugehörigen Embryonen wurden in einer Gruppengröße von 10 bis 35 Embryonen in die jeweiligen Vertiefungen der Kulturschale (50 µl Kulturmedium/Vertiefung) zur *In vitro*-Folgekultivierung verbracht. Als Kulturmedium fand ausschließlich SOF + MEM + BME + OCS, 5% Verwendung.

Die *In vitro*-Folgekultivierung wurde bei 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 5% O<sub>2</sub> unter maximaler Luftfeuchtigkeit für weitere 3 Tage durchgeführt, wobei nach jeweils 24 Stunden eine lichtmikroskopische Beurteilung auf stattgefundene Reexpansion und morphologische Unversehrtheit erfolgte. An allen drei Beurteilungstagen (24, 48 bzw. 72 Stunden nach Auftauen) wurde die jeweilige Anzahl reexpandierter Embryonen

der verschiedenen Versuchsgruppen verzeichnet. Die Überlebensrate an den jeweiligen Beurteilungstagen entsprach dem prozentuellen Verhältnis an verzeichneten Embryonen zur jeweiligen Anzahl folgekultivierter Embryonen in den jeweiligen Kulturgruppen.

Zusätzlich wurde 72 Stunden nach Auftauen die Anzahl aus ihrer *Zona pellucida* geschlüpfter Blastozysten verzeichnet; die entsprechende Schlupfrate wurde als prozentueller Anteil an geschlüpften Blastozysten zur Gesamtzahl an reexpandierten Blastozysten zum Beurteilungstermin 72 Stunden nach Auftauen angegeben.

### 2.2.6.3 Ergebnisse

Insgesamt wurden für die Kryokonservierung 735 Embryonen aus *In vitro*-Kultur und von 435 Blastozysten nach temporärer *In vivo*-Kultivierung verwendet.

*Kryokonservierung von Rinderembryonen an Tag 7 der In vitro-Produktion bzw. nach In vivo-Fertilisierung und temporärer In vivo-Kultivierung im homologen Rindereileiter*

An Tag 7 der *In vitro*-Produktion wurden insgesamt 289 Blastozysten für die Kryokonservierung ausgewählt, zur vergleichenden Beurteilung waren gleichzeitig 31 Blastozysten nach *In vivo*-Fertilisierung und temporärer *In vivo*-Kultivierung verfügbar. Die Überlebensrate aller *in vitro*-produzierten Tag 7-Embryonen war zu jedem Beurteilungszeitpunkt geringer als 10%, den höchsten Wert erreichte die Versuchsgruppe OCS, 1% mit 6,1% Überlebensrate 24 Stunden nach Auftauen; demgegenüber lag die Überlebensrate *in vivo*-fertilisierter und -kultivierter Embryonen zu jedem Beurteilungszeitpunkt über 70% und erreichte ihren höchsten Wert mit 74,2% Überlebensrate 48 Stunden nach Auftauen. Somit war die Überlebensrate *in vivo*-fertilisierter und -kultivierter Rinderembryonen gegenüber zur Gänze *in vitro*-produzierten Rinderembryonen zu jedem Beurteilungszeitpunkt signifikant höher ( $p < 0,001$ ; Chi-Quadrat-Test). Die detaillierten Ergebnisse zur Kryokonservierung von Rinderembryonen an Entwicklungstag 7 sind in Tabelle 17 wiedergegeben und in Abbildung 25 grafisch dargestellt.

Die Schlupfrate *in vivo*-fertilisierter und -kultivierter Rinderembryonen 72 Stunden nach Auftauen erreichte einen Wert von 90,9%; demgegenüber war in allen Versuchsgruppen zur Gänze *in vitro*-produzierter Rinderembryonen keine Blastozyste in der Lage, aus ihrer *Zona pellucida* zu schlüpfen.

Tabelle 17: Kryokonservierung von Rinderembryonen an Entwicklungstag 7

<i>In vitro</i> -Proteinergänzung bzw. Kulturart	24 h			48 h		72 h		72 h - SR	
	N	n	%	n	%	n	%	n	%
BSA, 3 mg/ml	54	3	5,6 <sup>a</sup>	1	1,9 <sup>a</sup>	1	1,9 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>
BSA, 6 mg/ml	48	1	2,1 <sup>a</sup>	1	2,1 <sup>a</sup>	1	2,1 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>
OCS, 1%	66	4	6,1 <sup>a</sup>	1	1,5 <sup>a</sup>	0	0,0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>
OCS, 5%	65	2	3,1 <sup>a</sup>	0	0,0 <sup>a</sup>	0	0,0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>
OCS, 10%	56	2	3,6 <sup>a</sup>	0	0,0 <sup>a</sup>	0	0,0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>
<i>in vivo</i>	31	22	71,0 <sup>b</sup>	23	74,2 <sup>b</sup>	22	71,0 <sup>b</sup>	20	90,9 <sup>b</sup>

24 h, 48 h, 72 h: Beurteilungszeitpunkt nach Auftauen der kryokonservierten Embryonen

72 h – SR: Schlupfrate nach 72 Stunden (im Verhältnis zur Anzahl reexpandierter Blastozysten nach 72 Stunden)

N: Anzahl kryokonservierter Embryonen

n : Anzahl reexpandierter Blastozysten nach 24, 48 bzw. 72 Stunden

<sup>a, b</sup> : Werte in einer Spalte unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,001$ ; Chi-Quadrat-Test)

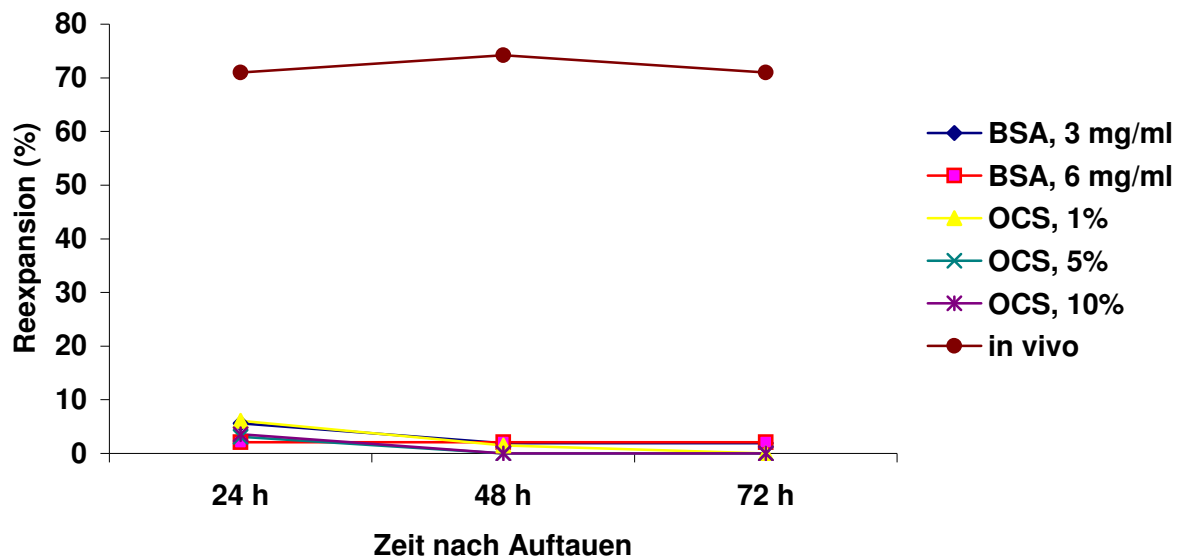


Abbildung 25: Kryokonservierung von Rinderembryonen an Entwicklungstag 7

#### Kryokonservierung von Rinderembryonen an Tag 8 der *In vitro*-Produktion

An Tag 8 der *In vitro*-Produktion wurden insgesamt 446 Blastozysten für die Kryokonservierung ausgewählt; Embryonen aus *In vivo*-Fertilisierung und temporärer *In vivo*-Kultivierung waren nicht in ausreichender Anzahl verfügbar und wurden somit nicht in die vergleichende Untersuchung einbezogen.

Die Überlebensrate aller *in vitro*-produzierten Tag 8-Embryonen war zu jedem Beurteilungszeitpunkt ähnlich gering wie für *in vitro*-produzierte Embryonen an Entwicklungstag 7. Den höchsten Wert erreichte die Versuchsgruppe OCS, 1% mit 10,0% Überlebensrate 24 Stunden nach Auftauen und war damit von den Versuchsgruppen BSA, 6 mg/ml und OCS, 10% mit Überlebensraten 24 Stunden nach Auftauen von 2,0 bzw. 0% signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ; Chi-Quadrat-Test). An beiden noch folgenden Beurteilungszeitpunkten, 48 und 72 Stunden nach Auftauen, waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mehr vorhanden.

Eine einzige Tag 8-Blastozyste der Versuchsreihe 2 war in der Lage, aus ihrer *Zona pellucida* zu schlüpfen (Versuchsgruppe OCS, 5%), und erreichte damit eine Schlupfrate von 100%. Die Ergebnisse zur Kryokonservierung von Rinderembryonen an Entwicklungstag 8 sind im Detail in Tabelle 18 und grafisch in Abbildung 26 wiedergegeben.



Tabelle 18: Kryokonservierung von Rinderembryonen an Entwicklungstag 8

<i>In vitro</i> -Proteinergänzung bzw. Kulturart	N	24 h		48 h		72 h		72 h - SR	
		n	%	n	%	n	%	n	%
BSA, 3 mg/ml	111	4	3,6	1	0,9	0	0,0	0	0 <sup>c</sup>
BSA, 6 mg/ml	99	2	2,0 <sup>a</sup>	2	2,0	2	2,0	0	0 <sup>c</sup>
OCS, 1%	70	7	10,0 <sup>b</sup>	1	1,4	1	1,4	0	0 <sup>c</sup>
OCS, 5%	93	4	4,3	1	1,1	1	1,1	1	100,0 <sup>d</sup>
OCS, 10%	73	0	0,0 <sup>a</sup>	0	0,0	0	0,0	0	0 <sup>c</sup>

24 h, 48 h, 72 h: Beurteilungszeitpunkt nach Auftauen der kryokonservierten Embryonen

72 h – SR: Schlupfrate nach 72 Stunden (im Verhältnis zur Anzahl reexpandierter Blastozysten nach 72 Stunden)

N: Anzahl kryokonservierter Embryonen

n : Anzahl reexpandierter Blastozysten nach 24, 48 bzw. 72 Stunden

<sup>a, b</sup> : Werte in einer Spalte unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ; Chi-Quadrat-Test)

<sup>c, d</sup> : Werte in einer Spalte unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,001$ ; Chi-Quadrat-Test)

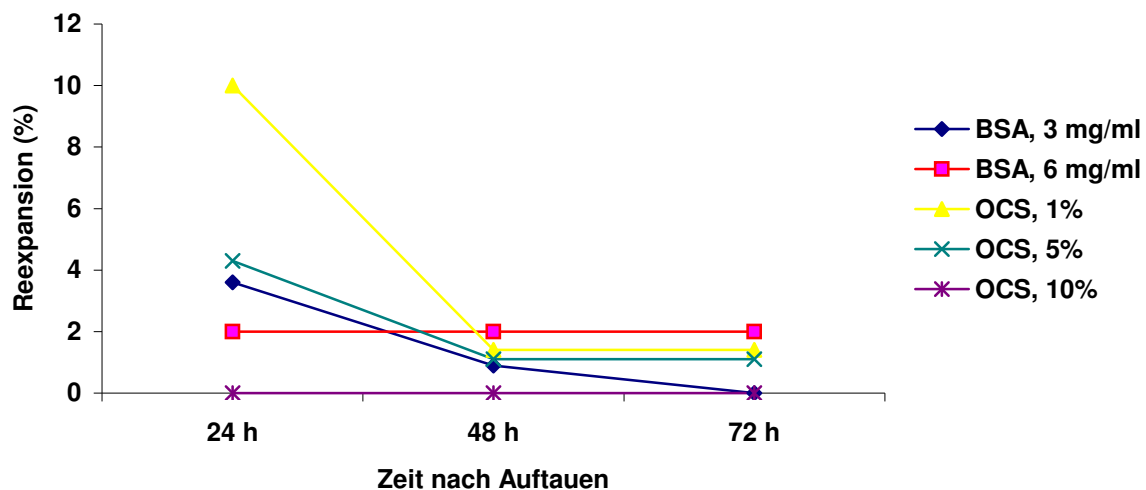


Abbildung 26: Kryokonservierung von Rinderembryonen an Entwicklungstag 8

#### 2.2.6.4 Diskussion

Das Ziel dieses Versuchansatzes war die Untersuchung unterschiedlicher Kulturbedingungen sowie des Embryoalters auf die Embryogefriertoleranz, um die bestmögliche Kulturbedingungen zu erreichen, die für eine anschließende Kryokonservierung optimale Überlebensraten gewährleisten.

Die erzielten Ergebnisse zeigten, dass die Kulturbedingungen die Embryogefriertoleranz wesentlich beeinflussen. Im Vergleich der Blastozysten nach *In vivo*-Fertilisierung und temporärer *In vivo*-Kultivierung im Rindereileiter zu *in vitro*-produzierten Embryonen wurden signifikant bessere Überlebensraten *in vivo*-fertilisierter und -kultivierter Embryonen festgestellt. Diese Ergebnisse entsprechen denjenigen anderer Autoren, die IVM/IVF-Embryonen im Schafeileiter kultivierten. Rizos et al. (2001) haben bestätigt, dass die *In vivo*-Kultur im Eileiter eine Qualitätssteigerung, gekennzeichnet durch erhöhte Gefriertoleranz der resultierenden Blastozysten, verursacht. Pugh et al. (2001) ermittelten auch eine Verbesserung der Trächtigkeitsrate nach Transfer eingefrorener/aufgetauter, *In vivo* (im Schafeileiter) kultivierter Embryonen gegenüber *in vitro*-produzierter Embryonen, ein Unterschied, der nach Transfer frischer Embryonen nicht vorhanden war. Enright et al. (2000) haben niedrigere Überlebens- und Schlupfraten nach *In vitro*-Kultur als nach *In vivo*-Kultur im Eileiter beobachtet.

Bei allen untersuchten *In vitro*-Gruppen lag die Reexpansion, sowohl am Tag 7 als auch am Tag 8, unter 10%. Diese Ergebnisse könnten mit dem verwendeten Medium zusammenhängen. Obwohl das SOF Medium im Vergleich mit TCM-199 die Blastozystenrate erhöht, wurde von einem negativen Einfluss auf die Kryotauglichkeit *in vitro*-produzierter Blastozysten berichtet. Holm et al. (1994) stellten die beiden Medien SOF und CR1 zur *In vitro*-Kultivierung früher Embryonalstadien beim Rind einander gegenüber; war in der Anzahl derjenigen Eizellen, die sich nach erfolgter Befruchtung bis zum Stadium der Blastozyste weiterentwickelten, keine Differenz erkennbar, so ergab sich bei Verwendung von CR1-Medium eine wesentlich höhere Überlebensrate nach Tiefgefrierung gegenüber der Verwendung von SOF-Medium. Ein ähnliches Bild zeichnen Rizos et al. (2001),

indem sie die Verwendung von SOF-Medium ohne Ko-Kultur der Ko-Kultivierung mit TCM-199 gegenüberstellten; erwies sich die *In vitro*-Kultivierung in SOF-Medium bezüglich der Entwicklungsrate bis zum Stadium der Blastozyste als überlegen, so kehrte sich nach Vitrifikation der Embryonen das Bild um und signifikant mehr Embryonen aus Ko-Kultivierung blieben nach der Kryokonservierung am Leben (43,5% gegenüber 0%), wenngleich Embryonen nach temporärer Zwischenkultur im Schafeileiter noch einmal eine signifikant höhere Überlebensrate (78,3%) aufwiesen. An beiden Entwicklungstagen wurden bessere Ergebnisse in Gruppen mit niedrigerer Proteinerergänzung (OCS und BSA) erreicht. Ein ähnlicher Befund wurde von Rizos et al. (2001) ermittelt. Nach der Zugabe FKS oder erhöhte Konzentration von BSA (16 mg/ml vs. 3 mg/ml) war die Blastozystenqualität, die durch die Kryotoleranz klassifiziert wurde, signifikant verschlechtert. In einem folgenden Versuch haben Rizos et al. (2003) beobachtet, dass die Kryotoleranz der *In vitro*-Blastozysten durch Serumverzicht im Medium auf ein mittleres Niveau zwischen *in vitro*-produzierten Embryonen mit Serum und *in vivo*-kultivierten Embryonen steigt. Die Gefriertoleranz reflektiert Unterschiede in strukturellen Aufbau der Embryonen sowie Unterschiede in mRNA-Expression. Fair et al. (2001) haben ermittelt, dass Rinderembryonen nach *In vivo*-Kultivierung im Schafeileiter nur geringfügige morphologische Unterschiede zu *ex vivo*-Embryonen nach Superovulation aufwiesen. Im Gegenteil zeigten *In vitro*-Embryonen viele Anzeichen, die mit reduzierter Kryotoleranz zusammenhängen, z.B. verbreiteter perivitelliner Raum, Vakuolen, Reduktion der Microvilli und Interzellularverbindungen und steigende Lipidakkumulation. Ähnliche Unterschiede wurden auch in unserem Versuch beobachtet (siehe morphologische Beurteilung). Arbeiten von Abe et al. (1999, 2002), Dinnyes et al. (1996) bzw. Semple et al. (1995) zur *In vitro*-Produktion von Rinderembryonen ohne jeglichen Serumzusatz zum Kulturmedium bestätigen den Zusammenhang von *In vitro*-Kultivierung, intrazellulärer Lipidakkumulation und Gefriertoleranz. Neben der Aufnahme von Lipiden aus dem Serum wird die Akkumulation der Lipide als Folge der Insuffizienz im mitochondrialen Metabolismus diskutiert (Crosier et al., 2001). Auch eine Beeinflussung der Transkription von Genen, die Auswirkungen auf die Gefriertoleranz der Embryonen haben können, wird durch das Vorhandensein von Serum im Kulturmedium in Betracht gezogen (Rizos et al., 2003).

Im Gefrierverhalten der Blastozysten von Entwicklungstag 7 bzw. 8 wurde kein markanter Unterschied beobachtet. Dieser Befund stimmt mit anderen Arbeiten überein, die diesbezüglich keinen Unterschied erkennen ließen (Hasler et al., 2001; Martinez et al., 2002). Demgegenüber stehen Arbeiten, die das Stadium der expandierten Blastozyste am Tag 7 nach Befruchtung der Eizelle als am Geeignetsten zur Kryokonservierung ansehen (Dinnyes et al., 1999; Hasler et al., 1995, 1997; Pugh et al., 2000; Sommerfeld und Niemann, 1999).

Aus unseren Untersuchungsergebnissen geht deutlich hervor, dass die *In vivo*-Kultivierung eine signifikante Verbesserung der Gefriertoleranz gegenüber der langdauernden *In vitro*-Kultur hervorruft. Die beabsichtigte Verbesserung der Kryofähigkeit von *In vitro*-Embryonen durch eine Reduktion der Proteinerergänzung im Kulturmedium konnte nicht erreicht werden. Aus diesem Grund kann eine vergleichbare Blastozystenqualität mit *ex vivo*-Embryonen diesen Ergebnissen zufolge nur in Kombination einer „Kurzzeit-IVP“ und vorübergehenden *In vivo*-Kultivierung erzielt werden.

#### 2.2.6.5 Literatur

Abe H, Yamashita S, Itoh T, Satoh T, Hoshi H (1999): Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Mol Reprod Dev* 53,325-335.

Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H (2002): Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* 61,57-66.

Agca Y, Monson DL, Northey DM, Abas Mazni O, Rutledge JJ (1994): Post-thaw survival and pregnancy rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification. *Theriogenology* 41,154.

Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE (2001): Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol Reprod* 64,1375-1385.

Diez C, Le Bourhis D, Heyman Y, Renard JP (1996): Effect of partial lipid removal from in vitro produced bovine zygotes on further development in vitro and on the freezing tolerance of blastocysts. *Theriogenology* 45,166.

Dinnyes A, Carolan C, Lonergan P, Massip A, Mermillod P (1996): Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced in vitro in synthetic oviduct fluid. *Theriogenology* 46,1425-1439.

Dinnyes A, Lonergan P, Fair T, Boland MP, Yang X (1999): Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of in vitro-produced bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 53,318-24.

Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP (2000): Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: Implications for early embryo development and quality. *Theriogenology* 54,659-673.

Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA, Boland MP (2001): Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. *Mol Reprod Dev* 58,186-195.

Ferguson EM, Leese HJ (1999): Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J Reprod Fertil* 116,373-378.

Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, Toyoda Y (1990): Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. *Biol Reprod* 42,114-119.

Hasler JF (2001): Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56,1401-15.

Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA (1995): Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43,141-152.

Hasler JF, Hurtgen PJ, Jin ZQ, Stokes JE (1997): Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology* 48,563-579.

Holm P, Smith S, Callesen H (1994): Post-thaw in vitro viability of bovine blastocysts produced in vitro in different media and gas atmospheres. Proc. 10th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association. Fondation Marcel Mérieux, Lyon, France, 182.

Imai K, Matoba S, Dochi O, Shimohira I (2002): Different factors affect developmental competence and cryotolerance in in vitro produced bovine embryo. *J Vet Med Sci* 64,887-91.

Leibo SP, Loskutoff NM (1993): Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 39,81-94.

Leibo SP, Pollard JW, Martin A (1995): Chilling and freezing sensitivity of "reassembled" in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 43,265.

Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP (2003): Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction in Domestic Animals* 38,259-67.

Manual of the International Embryo Transfer Society, 3<sup>rd</sup> edition, 1998.

Martinez AG, Valcarcel A, de las Heras MA, de Matos DG, Furnus C, Brogliatti G (2002): Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. *Anim Reprod Sci* 73,11-21.

Massip A, Mermillod P, Wils C, Dessy F (1993): Effects of dilution procedure and culture conditions after thawing on survival of frozen bovine blastocysts produced in vitro. *J Reprod Fertil* 97,65-69.

Merton S (2002): Morphological evaluation of embryos in domestic species. In: Van Soom A, Boerjan M. (Eds.): *Assessment of mammalian embryo quality*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 33-55.

Murakami M, Otoi T, Sumantri C, Suzuki T (1998): Effects of centrifugation and lipid removal on the cryopreservation of in vitro produced bovine embryos at the eight-cell stage. *Cryobiology* 36,206-212.

Nagashima H, Cameron RDA, Kuwayama M, Young M, Beebe L, Blackshaw AW, Nottle MB (1999): Survival of porcine delipated oocytes and embryos after cryopreservation by freezing or vitrification. *J Reprod Devel* 45,167-176.

Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF, Nottle MB (1994): Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol Reprod* 51,618-622.

Pollard JW, Leibo SP (1993): Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived bovine embryos. *Theriogenology* 39,287.

Pugh PA, Tervit HR, Niemann H (2000): Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. *Anim Reprod Sci* 58,9-22.

Pugh A, Cox S, Peterson J, Ledgard A, Forsyth J, Cockrem K, Tervit R (2001): Culture of bovine embryos in sheep oviducts improves frozen but not fresh embryo survival. *Theriogenology* 55,314.

Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P (2003): Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod* 68,236-243.

Rizos D, Ward F, Boland MP, Lonergan P (2001): Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology* 56,1-16.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P (2002): Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61, 234-48.

Semple ME, Betteridge KJ, Leibo SP (1995): Cryopreservation of in vitro-derived bovine embryos produced in a serum-free culture system. *Theriogenology* 43,320.

Sommerfeld V, Niemann H (1999): Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology* 38,95-105.

Ushijima H, Yamakawa H, Nagashima H (1999): Cryopreservation of bovine pre-morula-stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. *Biol Reprod* 60,534-539.

Van Soom A, Boerjan M, Ysebaert MT, De Kruif A (1996): Cell allocation to the inner cell mass and the trophectoderm in bovine embryos cultured in two different media. *Mol Reprod Dev* 45,171-182.

Voelkel SA, Hu YX (1992): Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenology* 37,1117-1131.

## 2.2.7 Wirkung unterschiedlicher Proteinsupplementierungen auf die Morphologie

### 2.2.7.1 Einleitung

Die lichtmikroskopische Beurteilung von Rinderembryonen anhand ihrer Morphologie basiert auf bestimmten Kriterien, die mit der Qualität des Embryos in Verbindung gebracht werden können. Parameter wie Vorhandensein bzw. Fehlen zellulärer Fragmente, gleich- bzw. ungleichmäßige Teilungen, Ausmaß und Zeitpunkt der Kompaktierung sowie Farbe und Struktur des Embryos liefern wichtige Anhaltspunkte zur Beurteilung. Schon lichtmikroskopisch sind Veränderungen dieser Art sehr gut erkennbar, und - gerade in Verbindung mit Alter und Entwicklungsstadium des Embryos zum Zeitpunkt der Beurteilung, die einen wichtigen Hinweis auf mögliche Entwicklungsverzögerungen geben - bieten so eine einfache und rasche Möglichkeit, erste Aussagen zur Embryoqualität zu treffen. Klassifizierungsschemata nach Lindner und Wright (1983) bzw. in Ableitung davon eine vereinfachte Form der *International Embryo Transfer Society* (IETS Manual, 1998) lassen eine sehr gute Einschätzung der Embryoqualität zu. Allerdings erschwert die große Heterogenität *in vitro*-produzierter Embryonen die unmittelbare Anwendung dieser Bewertungsmethoden auch auf *in vitro*-produzierte Embryonen (Farin et al., 1995, 1999). So resultieren gleiche Qualitätsklassifizierungen *in vitro*-produzierter bzw. *in vivo*-entwickelter Rinderembryonen in der Regel in signifikant geringeren Trächtigkeitsraten der erstgenannten Gruppe (Farin und Farin, 1995; Galli und Lazzari, 1996; Hasler, 1998; Hasler et al., 1995; Merton, 2002).

Tabelle 19 gibt diesbezüglich Daten wieder, wie sie von Hasler (1998) angegeben wurden.

Tabelle 19: Trächtigkeitsraten nach Transfer *in vitro*-produzierter bzw. *in vivo*-entwickelter Rinderembryonen unterschiedlicher Qualität (nach Hasler, 1998)

Embryonen	Anzahl an übertragenen Embryonen	Trächtigkeitsrate	
		Qualität	Qualität
		1	2
<i>in vitro</i>	4606	56	41
<i>in vitro</i> , tiefgefroren	67	42	30
<i>in vivo</i>	599	76	67
<i>in vivo</i> , tiefgefroren	517	64	-

Genaueren Einblick in die morphologischen Vorgänge der Embryonalentwicklung als die einfache lichtmikroskopische Untersuchung bietet die elektronenmikroskopische Darstellung; die ungleich höhere Auflösung und die Verwendung ultradünner Schnittpräparate erlaubt die detaillierte Betrachtung und Beurteilung von kleinsten

Zellstrukturen und Zellorganellen. Dem steht allerdings die notwendige Aufbereitung des Embryos und damit dessen Untergang als größter Nachteil des Verfahrens gegenüber. Dennoch kann die grundsätzliche ultrastrukturelle Untersuchung von Embryonen einen wichtigen Beitrag nicht nur zur Morphologie sondern auch zu damit in Verbindung stehenden physiologischen und molekularen Vorgängen liefern (Maddox-Hyttel und Boerjan, 2002).

Mit der Befruchtung der Eizelle und der Wiederherstellung des diploiden Chromosomensatzes entwickelt sich mit der Zygote ein neuer Organismus; schon allein unter Berücksichtigung der volumetrischen Gegebenheiten ist es nahe liegend, dass die Ultrastruktur der Zygote in erster Linie derjenigen der Eizelle entspricht. Während der Entwicklung der Eizelle, ihrer Prämaturation und abschließenden Maturation erhält die Eizelle ihre strukturelle Ausstattung für die folgende Befruchtung und frühe embryonale Entwicklung (Fair et al., 1997; Hyttel et al., 1986, 1987, 1988a, 1988b).

Mit Einsetzen der ersten Zellteilungen beginnt nach und nach die Aktivierung des embryoeigenen Genoms. Ist in den ersten Zellzyklen die transkriptionelle Aktivität nur gering ausgeprägt (Hay-Schmidt et al., 2001; Plante et al., 1994), so beginnt im vierten Zellzyklus, d.h. im 8- bis 16-Zell-Stadium, eine erste umfangreiche Transkription embryonaler Gene (Camous et al., 1986); damit einher gehen deutliche Veränderungen in der ultrastrukturellen Erscheinung des Embryos, deren Markanteste die Ausbildung funktionell aktiver Kernkörperchen ist (Laurincik et al., 2000).

Von der zweiten Zellteilung an können regelmäßig asynchrone Teilungen beobachtet werden, die Zellzyklen der einzelnen Embryonalzellen können sich dabei bis zu einer Teilung unterscheiden (Massip et al., 1983). Der Embryo wird in Hinblick auf die Anzahl seiner Zellen in der Regel nur bis zum 16-Zell-Stadium beschrieben; das maubbeerartige Aussehen lässt die Bezeichnung als *Morula* durchaus gerechtfertigt erscheinen. In diesem Entwicklungsstadium, mitunter etwas früher, findet bei *in vivo*-entwickelten Rinderembryonen der Übertritt vom Eileiter in die Gebärmutter statt (El-Banna und Hafez, 1970). Etwa zur selben Zeit werden auch erste Anzeichen interzellulärer Verbindungen zwischen den Blastomeren des Embryos sichtbar, die im nächstfolgenden Zellzyklus in den lateroapikalen Bereichen der oberflächlich liegenden Blastomeren als *tight junctions* die Voraussetzung für die Ausbildung des Trophektoderms darstellen (Plante und King, 1994).

Van Soom et al. (1997) setzt den Beginn der Kompaktierung, für *in vitro*-produzierte wie für *in vivo*-entwickelte Rinderembryonen gleichermaßen, um das 32-Zell-Stadium an. Vereinzelt ist bei *in vitro*-produzierten Rinderembryonen allerdings auch schon im 8- bis 16-Zell-Stadium diese Kompaktierung nachweisbar (Merton, 2002). Voraussetzung für die Kompaktierung, ebenso wie für die später folgende Blastulation, ist die stattfindende Polarisierung der embryonalen Zellen (Gualtieri et al., 1992), die von Koyama et al. (1993) im 16-Zell-Stadium beobachtet wurde. Mit Beginn der Kompaktierung geht auch die individuelle Konturierung der einzelnen Zellen verloren und zwei verschiedene Zelltypen - äußere Zellen als Vorstufe der Trophektodermzellen, und innere Zellen, die sich in weiterer Folge zur *Inner Cell Mass* entwickeln - können unterschieden werden. Erstere stehen in enger und dichter Verbindung zueinander, während bei letzteren lediglich umschriebene Membrankontakte zu verzeichnen sind.

Interzellulärverbindungen zwischen den Zellen des Trophektoderms einerseits und zu den Zellen der ICM andererseits gewährleisten die funktionelle und strukturelle Integrität des Embryos (Betteridge und Flechon, 1988; Mohr und Trounson, 1981). Die Ausbildung fester Zellverbindungen (*tight junctions*) zwischen den



Zellmembranen oberflächlich liegender Blastomeren ist Voraussetzung für die folgende Blastulation, die an Tag 6 bis 7 nach der Befruchtung einsetzt. Einem aktiven Transportmechanismus folgend wird Natrium durch die äußere Zellschicht transportiert und auf diese Weise ein Ionengradient gebildet, der zur osmotischen Akkumulation von Flüssigkeit im Embryoinneren führt (Brison und Leese, 1994; Gualtieri et al., 1992; Watson, 1992) - das *Blastocoel*, ein mit Flüssigkeit gefüllter Hohlraum, entsteht. Der Größe des Hohlraums entsprechend wird zwischen frühen Blastozysten - das *Blastocoel* beansprucht weniger als 50% der embryonalen Masse - und Blastozysten mit entsprechend größerem *Blastocoel* unterschieden. Unter bestimmten *In vitro*-Bedingungen kann diese Hohlraumbildung auch an mehreren umschriebenen Stellen im Embryo auftreten, die physiologische Relevanz einer solchen Erscheinung ist unklar, in jedem Fall aber wird die morphologische Beurteilung solcher Embryonen erschwert (Merton, 2002). Van Soom et al. (1997) beschrieben die beginnende Bildung des *Blastocoels* für *in vivo*-entwickelte Embryonen nach dem 32- bis 64-Zell-Stadium, während *in vitro*-produzierte Embryonen bereits früher erste Anzeichen einer Hohlraumbildung zeigten. Mit Ausbildung der Blastozyste wird die Differenzierung zwischen Trophektoderm und Embryonalknoten klar erkennbar. Zu den deutlich konturierten Membranstrukturen der trophektodermalen Zellverbindungen wird im Zytoplasma der entsprechenden Zellen ein Netzwerk an Intermediärfilamenten sichtbar (Maddox-Hyttel und Boerjan, 2002).

Farbe und Struktur der einzelnen Blastomeren bzw. der Blastozyste in ihrer Gesamtheit sind ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Embryoqualität. Als Folge der geringer ausgeprägten Kompaktierung erscheint das *Morula*-Stadium bei *in vitro*-produzierten Rinderembryonen gegenüber *in vivo*-entwickelten Embryonen weniger abgerundet, die äußeren Zellgrenzen sind als leicht gewölbte Konturen sichtbar, die Blastomeren selbst wirken dunkler und voluminöser. Ähnlich präsentiert sich das Bild im Blastozyste-Stadium (Thompson, 1997; Van Soom und De Kruif, 1992).

Während der gesamten frühembryonalen Entwicklung sind im Zytoplasma der Zellen Lipidtropfen sichtbar; mit zunehmender Expansion der Blastozyste nimmt deren Anzahl und Volumen ab - eine Tatsache, die auf ihre Funktion als energetische Reserve in der frühen Entwicklung hinweist (Maddox-Hyttel und Boerjan, 2002). *In vitro*-produzierte Embryonen weisen gegenüber *in vivo*-entwickelten Embryonen generell ein größeres Maß an Lipidakkumulation auf. Wiederum ist es die Verwendung von Serum zur *In vitro*-Kultivierung, die unmittelbar damit in Verbindung gebracht wird. (Dorland et al., 1994; Thompson et al., 1995).

In diesem Zeitraum wird auch eine grundlegende Veränderung in der Struktur der Mitochondrien erkennbar; neben der für Wiederkäuer einzigartigen *hooded form* der Mitochondrien, deren Zahl von nun an kontinuierlich abnimmt, treten erstmals und in weiterer Folge in zunehmender Anzahl Mitochondrien von länglich-ovoider Form mit deutlich erkennbaren *Cristae transversae* in Erscheinung (Abe et al., 1999; Betteridge und Flechon, 1988). Mit Hilfe morphometrischer Analysen versuchten Crosier et al. (2000) strukturelle Unterschiede im *Morula*-Stadium zu objektivieren und in Verbindung mit der Art der frühembryonalen Kultivierung zu bringen. Während der relative Volumensanteil an Lipiden und Vakuolen nach *In vitro*-Kultivierung signifikant erhöht war, zeigten *in vivo*-entwickelte *Morula*-Stadien bei differenzierter Betrachtung der mitochondrialen Ausstattung einen signifikant höheren Anteil reifer Mitochondrien. In einer entsprechenden Folgestudie an Blastozyste-Stadien beim Rind waren signifikante Unterschiede in Hinblick auf die relativen Volumensanteile an

Lipiden bzw. Mitochondrien - jeweils zu Lasten *in vitro*-produzierter Embryonen zu erkennen (Crosier et al., 2001).

Die äußere Oberfläche des Embryos zur *Zona pellucida* muss - neben dem Abschluss des Embryos nach außen - auch die Verbindung zu diesem Außen bewerkstelligen, vor allem in Hinblick auf ihre absorptive Funktion (Betteridge und Flechon, 1988). Ermöglicht wird diese vielfältige Aufgabe durch die Ausbildung von *Microvilli* - fingerförmige Ausstülpungen der Zellmembran - deren Gesamtheit eine erhebliche Vergrößerung der Zelloberfläche verursacht.

In der Frühphase der Embryonalentwicklung wird der wachsende Embryo nach außen hin durch die *Zona pellucida* abgeschlossen. Mit fortschreitender Entwicklung, namentlich mit der beginnenden Expansion der Blastozyste durch kontinuierlichen Flüssigkeitseinstrom, erreicht die nun als expandiert bezeichnete Blastozyste etwa den eineinhalbfachen Durchmesser ihrer ursprünglichen Größe. Damit einher geht eine entsprechende Dehnung der *Zona pellucida*, die zusehends dünner wird. Während dieses Stadiums der expandierten Blastozyste, das bis zu zwei Tagen andauern kann, kann es zum wiederholten Kollabieren und Reexpandieren des Embryos kommen (Massip und Mulnard, 1980; Massip et al., 1982). Dieses wiederholte Kollabieren und Reexpandieren, der kontinuierlich zunehmende Flüssigkeitsdruck im Inneren der Blastozyste sowie enzymatische Prozesse führen an Tag 8 bis 11 nach der Befruchtung schließlich zur Eröffnung der *Zona pellucida* - das Stadium der geschlüpften Blastozyste ist erreicht, und damit die notwendige Voraussetzung für eine mögliche Implantation des Embryos, die beim Rind um Tag 18 bis 19 nach der Befruchtung zu beobachten ist (Menino und Williams, 1987; Merton, 2002).

Der vorliegende Arbeitsabschnitt hatte zum Schwerpunkt, verschiedene Proteinerergänzungen im Kulturmedium bzw. alternativ die temporäre *In vivo*-Kultivierung (GIFT) in ihrer Auswirkung auf die Embryomorphologie zu untersuchen.

### 2.2.7.2 Methode

Zur vergleichenden Beurteilung morphologischer Kriterien *in vitro*-produzierter Blastozysten (kultiviert in SOF mit 1%, 5% oder 10% OCS und 3 mg/ml oder 6 mg/ml BSA) wurden Blastozysten nach *In vivo*-Fertilisierung und temporärer *In vivo*-Kultivierung (*Gamete Intra Fallopian Tubal Transfer*, GIFT) bzw. *Ex vivo*-Blastozysten nach Spülung superovulierter Rinder herangezogen.

An Tag 7 der *In vitro*- bzw. *In vivo*- oder *Ex vivo*-Produktion erfolgte unter lichtmikroskopischer Betrachtung die morphologische Beurteilung der in Kultur gegebenen Embryonen. Auf Basis des vorliegenden Entwicklungsstadiums und der gegebenen morphologischen Integrität erfolgte die Selektion der Blastozysten zur weiteren Verwendung (siehe Punkt 2.2.6.2 zur Kryokonservierung). Zur licht- und elektronenmikroskopischen Beurteilung wurden lediglich Embryonen an Entwicklungstag 7 im Entwicklungsstadium *Blastozyste* (Code 6) der Qualitätsklasse I herangezogen.

Die Herstellung aller zur Beurteilung der Embryoqualität herangezogenen Semidünn- und Ultradünnschnittpräparate wurde dankenswerterweise am Institut für Histologie und Embryologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführt.

Aus jeder zu untersuchenden Versuchsgruppe wurden wenigstens 5 Blastozysten zur Herstellung von Semidünnschnittpräparaten verwendet; daraus wurden in Folge jeweils wenigstens 3 Blastozysten je Versuchsgruppe zur Herstellung von

Ultradünnschnittpräparaten ausgewählt; von jeder dieser ausgewählten Blastozysten wurden wenigstens 5 Ultradünnschnittpräparate angefertigt.

Blastozysten, die zur licht- und elektronenmikroskopischen Beurteilung vorgesehen waren, wurden für 2 bis 4 Stunden in Glutaraldehyd (2,5%, in 0,1 M Sörensenpuffer pH 7,38) fixiert und nachfolgend bis zur weiteren Verwendung in Sörensenpuffer pH 7,38 bei 4 °C aufbewahrt. Zur Lipid-Fixierung erfolgte eine 1- bis 2-stündige Inkubation in Osmiumtetroxid (1%, in 0,1 M Sörensenpuffer pH 7,38) bei Raumtemperatur mit nachfolgender dreimaliger Spülung in Wasser. Der Entwässerung der Blastozysten mit Ethanol (50%, 70%, 80%, 96% und 100%, jeweils zweimal für jeweils 10 Minuten) folgte die Einbettung in EPON- Kunstharz; vorhandener Ethanol wurde durch zweimalige Inkubation in 1,2-Propylenoxid (PO) für jeweils 10 Minuten ersetzt. Anschließend wurden die Embryonen jeweils für eine Stunde in PO/EPON-Kunstharz (1:1) bzw. PO/EPON-Kunstharz (1:3) inkubiert, zwischenzeitlich bzw. am Ende mit 1800 g zentrifugiert und für wenigstens 12 Stunden in reinem EPON-Kunstharz bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die abschließende Aushärtung des EPON-Kunstharzes mit den darin eingebetteten Blastozysten erfolgte bei 60 °C für eine Dauer von 48 Stunden.

Zur Bestimmung geeigneter Bereiche für die elektronenmikroskopische Beurteilung wurden in einem ersten Arbeitsschritt Semidünnschnittpräparate (Schnittdicke 0,5 µm) angefertigt (Reichert Ultracut S, Fa. Leica, Wien, Österreich) und mit Touluidinblau-Lösung für 20 Sekunden gefärbt; nachfolgend wurden die Schnittpräparate auf einen mit Wasser benetzten Objektträger überführt, getrocknet, mit wenig Wasser gespült, abermals getrocknet und lichtmikroskopisch analysiert.

Von zur elektronenmikroskopischen Beurteilung als geeignet angesehenen Bereichen wurden Ultradünnschnittpräparate in einer Schnittdicke von 60 bis 70 nm angefertigt, auf ein Trägernetz aus Kupfer (200 Mesh - 3,05 mm, Gristine Gröpl, G2450C) übertragen und für wenigstens 12 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Zur weiteren Kontrastierung wurden die mit den Schnittpräparaten versehenen Kupfernetze mit Uranylacetat (2%, in Methanol - Einwirkdauer 7 Minuten) und Bleizitrat-Lösung (n. Reynolds - Einwirkdauer 5 Minuten) versehen - zwischenzeitlich in Wasser geschwenkt und getrocknet - und zur elektronenmikroskopischen Beurteilung (Elektronenmikroskop EM 900, Fa. Zeiss, Wien, Österreich) bereitgestellt.

### 2.2.7.3 Ergebnisse

#### *Lichtmikroskopische Beurteilung von Rinderembryonen an Entwicklungstag 7 im Auflicht*

Unabhängig der Art der frühen Kultivierungsphase ließen alle beurteilten Embryonen eine merkliche Unterscheidung von *Inner Cell Mass* und *Blastozoel* zu. Allerdings waren Kompaktheit und Abgrenzbarkeit der *Inner Cell Mass* sowohl bei *Ex vivo*-Embryonen als auch bei Embryonen nach *In vivo*-Fertilisierung und -Kultivierung erkennbar markanter ausgeprägt als bei allen zur Gänze *in vitro*-produzierten Embryonen, unabhängig der Art und Menge der Proteinergänzung. Zugleich erschienen *Ex vivo*-Embryonen und Embryonen nach *In vivo*-Fertilisierung und -Kultivierung in ihrer Gesamtheit homogener und heller - eine Erscheinung, die bei *in vitro*-produzierten Embryonen ansatzweise erkennbar war; Blastozysten aus beiden BSA-ergänzten Versuchsgruppen wirkten, ebenso wie Blastozysten der OCS-

ergänzten Gruppen mit steigender Serumkonzentration, ungleich dunkler und stärker granuliert.

Abbildung 27 stellt exemplarisch *in vitro*-produzierte Embryonen *Ex vivo*-Embryonen und Embryonen nach *In vivo*-Fertilisierung und temporärer *In vivo*-Kultivierung gegenüber.

**3xBild**

*Lichtmikroskopische Beurteilung von Rinderembryonen an Entwicklungstag 7 im Durchlicht*

In Analogie zur lichtmikroskopischen Beurteilung im Auflicht legte die Beurteilung der Semidünnschnittpräparate im Durchlicht Unterschiede primär zwischen *Ex vivo*-Embryonen und Embryonen nach *In vivo*-Fertilisierung und -Kultivierung einerseits und *in vitro*-produzierten Embryonen andererseits offen. Alle beurteilten Präparate der beiden erstgenannten Gruppen zeigten eine sehr dünne Lage an Trophoblastzellen in unmittelbarer Nähe zur *Zona pellucida* - ein Befund, der bei den zur Gänze *in vitro*-produzierten Blastozysten nicht durchgehend zu beobachten war; regelmäßig waren zwischen äußerer Trophoblastoberfläche und *Zona pellucida* degenerierte Zellmassen in variablem Ausmaß erkennbar, die folglich regionale Ablösungen des Trophoblast von der *Zona pellucida* bedingten. Trophoblastzellen und Zellen der *Inner Cell Mass* erschienen sowohl bei *Ex vivo*-Embryonen als auch bei *in vivo*-fertilisierten und -kultivierten Embryonen kompakt und homogen dunkel gefärbt, nur vereinzelt waren punktförmige Aufhellungen sichtbar. Im Gegensatz dazu wirkten *Inner Cell Mass* und Trophoblastzellen der *in vitro*-produzierten Blastozysten inhomogen in ihrer Farbe, zum Teil auch in ihrer Struktur - gekennzeichnet durch erkennbare Spalten zwischen den Zellen der *Inner Cell Mass*; zahlreiche Aufhellungen bedingten ein inhomogenes und deutlich granuliertes Erscheinungsbild, wobei steigende Konzentrationen an BSA bzw. OCS im Kulturmedium tendenziell großvolumigere Aufhellungen hervorriefen.

Abbildung 28 stellt exemplarisch *in vitro*-produzierte Embryonen *Ex vivo*-Embryonen und Embryonen nach *In vivo*-Fertilisierung und temporärer *In vivo*-Kultivierung gegenüber.

3xBild

### Elektronenmikroskopische Beurteilung von Rinderembryonen an Entwicklungstag 7

Die *Zona pellucida* der untersuchten Embryonen ließ in allen Untersuchungsgruppen regelmäßige Vernetzungen erkennen und war bei allen Untersuchungsgruppen, sowohl innerhalb der Gruppen als auch zwischen den Gruppen - über ihren gesamten Verlauf von annähernd gleich bleibender Dicke. Eine gravierende Verschiedenheit wurde allerdings in der Struktur vor allem zur äußeren Oberfläche der *Zona pellucida* hin festgestellt; war diese bei *Ex vivo*-Embryonen und Embryonen nach *In vivo*-Fertilisierung und -Kultivierung homogen und nach außen hin weitgehend glatt und klar begrenzt, so zeigten Embryonen aller *In vitro*-Kulturgruppen Spalträume in und zunehmende Zerklüftung der *Zona pellucida* nach der äußeren Oberfläche hin. Eine Besonderheit ließen die *Zonae pellucidae in vivo*-fertilisierter und -kultivierter Blastozysten insofern erkennen, als regelmäßig radiär nach außen strahlende Spalträume, teils mit darin erkennbaren Zellen bzw. Zellresten, vorhanden und an der Oberfläche vereinzelt Zellen vorzufinden waren. Ablösungen der Trophoblastzellen von der *Zona pellucida*, wie sie bei der lichtmikroskopischen Beurteilung im Durchlicht nur bei Vorhandensein degenerierter Zellmassen erkennbar waren, ließen sich bei elektronenmikroskopischer Betrachtung differenzierter darstellen. Neben dem Vorhandensein degenerierter Zellmassen waren Spaltbildungen zur *Zona pellucida* hin in allen zur Gänze *in vitro*-produzierten Embryonen erkennbar; Blastozysten beider BSA-ergänzten Untersuchungsgruppen zeigten über die gesamte Oberfläche zahlreiche, regelmäßig vorhandene Spaltbildungen, während bei Embryonen der OCS-ergänzten Untersuchungsgruppen diese Spaltbildungen im Besonderen im Bereich vorhandener *Mikrovilli* zu beobachten waren - in Bereichen ohne *Mikrovilli*-Ausbildung lagen die Trophoblastzellen unmittelbar der *Zona pellucida* an. Bei allen *Ex vivo*-Embryonen und Embryonen nach *In vivo*-Fertilisierung und -Kultivierung waren derart gestaltete Spaltbildungen zwischen Trophoblastzellen und *Zona pellucida*, auch bei vorhandenem *Mikrovilli*-Besatz, nicht zu befunden. Embryonen der Kulturgruppen OCS, 5% und, in zunehmendem Ausmaß, OCS, 10% zeigten im Bereich vorhandener Spalträume zwischen Trophoblastzellen und *Zona pellucida* Bereiche von regelmäßig erscheinender Struktur, die in ihrer Farbe eindeutig von der *Zona pellucida* abzugrenzen waren.

Die äußere Oberfläche der Trophoblastzellen von *Ex vivo*-Embryonen war von einem dichten und lückenlosen Saum von *Mikrovilli* bedeckt; in der überwiegenden Mehrzahl flach aneinander gereiht, waren nur vereinzelt Bereiche mit aufrecht ausgebildeten *Mikrovilli* vorhanden, ohne allerdings eine Spaltbildung zur *Zona pellucida* erkennen zu lassen. Einen sehr ähnlichen Eindruck vermittelte die Ausbildung der *Mikrovilli* bei *in vivo*-fertilisierten und -kultivierten Embryonen mit der Einschränkung, dass vereinzelt Bereiche ohne *Mikrovilli*-Besatz festzustellen waren. Demgegenüber war die Ausbildung von *Mikrovilli* in allen *in vitro*-produzierten Embryonen deutlich eingeschränkt; oftmals nur sporadisch vorhanden, waren in unregelmäßigen Abständen auch Bereiche ohne jegliche Ausbildung von *Mikrovilli* zu befunden. Anders als in beiden erstgenannten Gruppen waren die vorhandenen *Mikrovilli* nicht flach aneinandergereiht, sondern ragten, vielfach senkrecht zur Zelloberfläche und in unterschiedlichster Form und Länge, in den Spaltraum zur *Zona pellucida*. Im Besonderen bei *in vivo*-fertilisierten und -kultivierten Embryonen bildeten Gruppen von *Mikrovilli* in regelmäßig wiederkehrender Abfolge augenscheinlich gebündelte Protrusionen, die radiär in die *Zona pellucida* einstrahlten und zum Teil in räumlicher Verbindung standen mit den erwähnten radiären Spalträumen in der *Zona pellucida*. Ähnlich gestaltete, wenn auch weniger deutlich ausgebildete, und nur



vereinzelt vorhandene Protrusionen gebündelter *Microvilli* waren bei Embryonen der Kulturgruppen *OCS, 5%* und *OCS, 10%* vorhanden, in deren Nähe wiederum, diesmal allerdings innerhalb der *Zona pellucida*, Bereiche von regelmäßig erscheinender Struktur vorhanden waren.

Die innere Begrenzung zum *Blastocoel* bzw. die dem *Blastocoel* zugewandte Verbindung der Trophoblastzellen untereinander war in allen untersuchten Gruppen strukturell ähnlich ausgebildet; *Microplicae* - faltenartig ineinander greifende Verbindungen zwischen den Zellen - bildeten einen lückenlosen Abschluss des *Blastocoels* nach außen. In der jeweiligen Ausformung dieser Verbindungen erschienen allerdings bei Embryonen aus reiner *In vitro*-Produktion diese einander überlappenden Zellbereiche weniger zahlreich ausgebildet als bei *Ex vivo*-Embryonen und *in vivo*-fertilisierten und -kultivierten Embryonen. Die lateralen Zellränder benachbarter Trophoblastzellen zeigten, unabhängig der Untersuchungsgruppe, kompakte Zellverbindungen in Form von Schlussleistenkomplexen mit desmosomalen Verbindungen, *Zonulae adhaerentes* und, in den lateroapikalen Bereichen, *tight junctions*; zum Teil waren von diesen Zellverbindungen in das Zellinnere ausstrahlende Bündel von Intermediärfilamenten sichtbar.

Bei Embryonen der OCS-ergänzten Kulturgruppen war in den Bereichen mit degenerierten Zellresten zwischen Trophoblastoberfläche und *Zona pellucida*, die bereits lichtmikroskopisch im Durchlicht erkennbar waren, im Detail sichtbar, dass die vorhandenen Trophoblastzellen weiterhin an ihrer Oberfläche, wenn auch spärlich, *Microvilli* ausgebildet hatten.

Abbildung 29 (a, b) stellt *Zona pellucida* und Trophoblastzellen exemplarisch *in vitro*-produzierte Embryonen, *Ex vivo*-Embryonen und Embryonen nach *In vivo*-Fertilisierung und temporärer *In vivo*-Kultivierung gegenüber.

7xBild



Die Zellen der *Inner Cell Mass* waren in allen Untersuchungsgruppen klar voneinander abgrenzbar, Zellzwischenräume waren, wenigstens in den vitalen Bereichen, nur in geringem Ausmaß vorhanden; allerdings waren in *in vitro*-produzierten Embryonen wiederholt Bereiche mit augenscheinlich degenerierten Zellen und Zellresten auszumachen, die in diese Zellzwischenräume ausgeschieden schienen. Die Zellränder im Bereich der *Inner Cell Mass* waren bei allen Untersuchungsgruppen annähernd glatt verlaufend, die erkennbaren Zell-zu-Zell-Verbindungen waren jeweils nur über kurze Bereiche vorhanden; *Microplacae*, bei Zellen des Trophoblast ein häufig wiederkehrender Befund, waren nur vereinzelt zwischen den Zellen der *Inner Cell Mass* zu befunden.

Die Zellkerne der Trophoblast- und *Inner Cell Mass*-Zellen waren bei allen untersuchten Gruppen aktiv und wiesen einen relativ hohen Anteil an Euchromatin auf; Kernkörperchen (*Nucleoli*) sind in zahlreichen Zellen deutlich ausgebildet.

Erkennbare Unterschiede waren bezüglich der mitochondrialen Ausstattung der untersuchten Embryonen festzustellen; in allen Untersuchungsgruppen vorhanden, war auch innerhalb der einzelnen Gruppen eine große Variabilität in der Ausbildung der Mitochondrien auszumachen. *Ex vivo*-Embryonen vermittelten in dieser Hinsicht, verglichen mit allen anderen Gruppen, einen relativ homogenen Eindruck; in Größe und Form weitgehend einheitlich waren viele Mitochondrien mit deutlich ausgebildeten *Cristae transversae* zu befunden, wenngleich ebenso Mitochondrien mit nur spärlicher oder gänzlich fehlender *Cristae*-Ausbildung vorzufinden waren. Demgegenüber waren Größe und Form der Mitochondrien im Besonderen in beiden BSA-ergänzten Gruppen und in hoch konzentrierten OCS-Gruppen (5 und 10%) sehr variabel und vielfältig, in ihrer Ausformung waren neben spärlicher oder fehlender *Cristae*-Ausbildung sehr wohl auch Mitochondrien mit gut ausgebildeten *Cristae transversae* vorhanden. In den eben angeführten Untersuchungsgruppen waren wiederholt Vakuolenbildungen im Inneren der Mitochondrien zu erkennen, während homogen dunkle Bereiche in der Mitochondrienmatrix bei allen Gruppen festzustellen waren.

Lipideinschlüsse in den Zellen zeigten markante Unterschiede zwischen *Ex vivo*-Embryonen und *in vivo*-fertilisierten und -kultivierten Embryonen zum Einen und zur Gänze *in vitro*-produzierten Embryonen zum Anderen auf. In Embryonen beider erstgenannten Gruppen waren Lipide nur vereinzelt vorzufinden, in Struktur und Farbe erschienen sie homogen hellgrau gefärbt; lediglich in Zellen der *Inner Cell Mass* waren einzelne größere, auch inhomogene Lipideinschlüsse auszumachen. Von ähnlicher Struktur, homogen hellgrau, waren Lipide der Embryonen aus OCS-ergänzter *In vitro*-Kultur - allerdings ungleich zahlreicher und in ihrer Größe sehr variabel; vor allem mit zunehmender Serumkonzentrierung im Kulturmedium überwogen großvolumige Lipideinschlüsse und erreichten in der Gruppe OCS, 10% zum Teil enorme Ausdehnung. Bei diesen großvolumigen Lipiden war, möglicherweise durch ebendiese Größe bedingt, eine Kondensation bzw. Verdichtung des Inhalts an den Lipidrändern festzustellen. Gänzlich verschieden stellten sich Lipideinschlüsse in Embryonen beider BSA-ergänzten Kulturgruppen dar; in ihrer Farbe heller und in ihrer Struktur außerordentlich inhomogen - augenscheinlich faserig und nur undeutlich vom umgebenden Zellplasma abgrenzbar, waren sie mit höherer BSA-Konzentrierung im Kulturmedium (6 mg/ml) zahlreicher und zunehmend von unterschiedlicher Größe.

Eine semiquantitative Bestimmung der vorhandenen Lipideinschlüsse und Mitochondrien verdeutlichte die markante Verschiedenheit von *ex vivo*- bzw. *in vivo*-fertilisierten und -kultivierten Embryonen einerseits und *in vitro*-produzierten Embryonen andererseits; lag das Verhältnis der Anzahl Lipideinschlüsse zu

Mitochondrien in beiden erstgenannten Gruppen im Bereich 1 : 15 bis 1 : 20, so war in allen *in vitro*-produzierten Gruppen die Verhältniszahl im Bereich 1 : 2 bis 1 : 4 zu finden.

Ähnlich zu den Befunden an der Trophoblastoberfläche waren vereinzelt in Embryonen aus *In vitro*-Produktion auch im Bereich der *Inner Cell Mass*, konkret innerhalb degenerierter Zellen und Zellreste, Regionen mit regelmäßig erscheinender Struktur zu befunden (Untersuchungsgruppe *BSA, 6 mg/ml* und *OCS, 5%*).

Keine grundsätzlichen Verschiedenheiten zwischen den untersuchten Gruppen waren im Vorhandensein von *Apoptotic Bodies* festzustellen; sie waren ebenso in *ex vivo*- und *in vivo*-fertilisierten und -kultivierten Embryonen wie in Embryonen der Untersuchungsgruppen *OCS, 5%* und *OCS, 10%* vereinzelt sichtbar.

Abbildung 30 (a, b) stellt *Inner Cell Mass* exemplarisch *in vitro*-produzierte Embryonen *Ex vivo*-Embryonen und Embryonen nach *In vivo*-Fertilisierung und temporärer *In vivo*-Kultivierung gegenüber.



7xBild

#### 2.2.7.4 Diskussion

Das Ziel dieses Versuchsansatzes war die Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Proteinzusätze zum Kulturmedium auf die Embryomorphologie, um die bestmöglichen Voraussetzungen einer optimierten *In vitro*-Embryoproduktion zu schaffen. Gleichzeitig wurde die temporäre *In vivo*-Kultivierung im Rindereileiter elektronenmikroskopisch in Hinblick auf die Blastozystenqualität untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass Kompaktheit und Abgrenzbarkeit der *Inner Cell Mass* sowohl bei *Ex vivo*-Embryonen als auch bei Embryonen nach *In vivo*-Fertilisierung und -Kultivierung erkennbar markanter ausgeprägt und in ihrer Gesamtheit homogener und heller sind als bei allen zur Gänze *in vitro*-produzierten Embryonen, unabhängig der Art und Menge der Proteinergänzung. Auch bei der Beurteilung der Semidünnschnitte wirkten *Inner Cell Mass* und Trophoblastzellen *in vitro*-produzierter Blastozysten inhomogen in ihrer Farbe und deutlich granuliert, wobei steigende Konzentrationen an BSA bzw. OCS im Kulturmedium tendenziell großvolumigere Aufhellungen hervorriefen. Ein ähnliches Bild wurde auch bei anderen Autoren beobachtet. Vor allem bei Verwendung von Serum im Kulturmedium wirken Farbe und Struktur der Blastozyste gegenüber *in vivo*-entwickelten Embryonen verändert, die Farbe wird dunkler, die Struktur granulierter. Allerdings scheint auch die alternative Verwendung bestimmter Serumalbumine eine dementsprechende Dunkelfärbung hervorrufen zu können (Thompson, 1997).

Die Farbe des Embryos wird von mehreren Faktoren beeinflusst; neben dem Vorhandensein von pyknotischen Zellen und Zellabbauprodukten sowie der Anzahl an embryonalen Zellen insgesamt ist hier vor allem die regelmäßig beobachtete Ansammlung von Lipiden im Zytoplasma der embryonalen Zellen als relevanter Faktor zu nennen. Menge, Größe und Verteilung dieser Lipidtropfen im Zytoplasma bestimmen ganz erheblich die Hell- bzw. Dunkelfärbung des Embryos (Merton, 2002). Diese Behauptung wurde auch in unserer elektronenmikroskopischen Untersuchung bestätigt, in der markante Unterschiede zwischen *Ex vivo*-Embryonen und *in vivo*-fertilisierten und -kultivierten Embryonen zum Einen und zur Gänze *in vitro*-produzierten Embryonen zum Anderen festgestellt wurden. In Embryonen beider erstgenannten Gruppen waren Lipide nur vereinzelt vorzufinden. Unterschiede wurden auch innerhalb der *In vitro*-Gruppen bemerkt. Lipide in der Embryonen aus OCS-ergänzter *In vitro*-Kultur waren zahlreicher und größer; vor allem mit zunehmender Serumkonzentrierung im Kulturmedium überwogen großvolumige Lipideinschlüsse und erreichten in der Gruppe OCS, 10% zum Teil enorme Ausdehnung. Im Gegensatz dazu zeigten Embryonen beider BSA-ergänzten Kulturgruppen Lipide, die heller, mit höherer BSA-Konzentrierung im Kulturmedium zahlreicher und zunehmend von unterschiedlicher Größe und nur undeutlich vom Zytoplasma abzugrenzen waren. In der qualitativen Umsetzung dieser gewonnenen Information sei z.B. der Einfluss der Lipidtropfen auf die Kryotoleranz erwähnt. Embryonen mit vermehrten Lipideinschlüssen sind für die Tiefgefrierkonservierung nicht geeignet (Fair et al., 2001). Ferguson und Leese (1999) erkannten, dass der Triglyzeridgehalt vom 9-16-Zellstadium bis zur geschlüpften Blastozyste in der Gegenwart von Serum steigt. Diese Lipidakkumulation könnte aber auch durch eine Insuffizienz des Mitochondrienmetabolismus bei *In vitro*-Embryonen verursacht werden (Crosier et al., 2001). Auch Untersuchungen von Dorland et al. (1994) an Schafblastozysten deuten auf einen Zusammenhang von Serumverwendung, Lipidanhäufung und mitochondrialen Strukturveränderungen hin; demzufolge bewirkt die Verwendung von Serum im Kulturmedium degenerative Veränderungen in den Mitochondrien mit der Folge einer ungenügenden bzw. fehlenden Metabolisierung



vorhandener Lipide. Aus diesem Grund wurde die mitochondriale Ausstattung untersucht. Trotz einer großen Variabilität innerhalb der einzelnen Gruppen wurden bei Ex vivo-Embryonen zahlreiche Mitochondrien mit deutlich ausgebildeten *Cristae transversae* vorgefunden. Demgegenüber waren im Besonderen in beiden BSA-ergänzten Gruppen und in hoch konzentrierten OCS-Gruppen (5 und 10%) in vielen Fällen Mitochondrien mit spärlicher oder fehlender *Cristae*-Ausbildung vorhanden. Auch nach einer semiquantitativen Bestimmung des Verhältnisses der Anzahl an Lipideinschlüssen zu Mitochondrien zwischen *ex vivo*- bzw. *in vivo*-fertilisierten und -kultivierten Embryonen einerseits und *in vitro*-produzierten Embryonen andererseits wurden markante Unterschiede beobachtet. Zu ähnlichen Befunden kamen auch Abe und Hoshi (2003), Shamsuddin und Rodriguez-Martinez (1994) bzw. Stojkovic et al. (2001) in ihren Arbeiten zu *in vitro*-produzierten Rinderembryonen; neben einer ausgeprägten Lipidakkumulation beobachteten sie auch ungleich mehr unreife Mitochondrien bei Verwendung von Serum im Kulturmedium.

Die *Zona pellucida* hat in allen Gruppen über ihren gesamten Verlauf annähernd gleich bleibende Dicke aufgewiesen. Ein Unterschied wurde in der Struktur vor allem zur äußeren Oberfläche der *Zona pellucida* hin festgestellt. Homogen, nach außen hin weitgehend glatt und klar begrenzt bei *Ex vivo*-Embryonen und Embryonen nach *In vivo*-Fertilisierung und -Kultivierung, ließ demgegenüber die *Zona pellucida* bei *In vitro*-Kulturgruppen Spalträume in und zunehmende Zerklüftung nach der äußeren Oberfläche hin erkennen. Abe et al. (1999) bescheinigten der *Zona pellucida* *in vivo*-entwickelter Rinderembryonen auch eine homogene und kompakte Struktur in ihrer gesamten Ausdehnung; dem stellten sie eine nach außen hin zunehmende Porosität und Auflockerung der *Zona* bei *in vitro*-produzierten Embryonen gegenüber. Die Porosität von *In vitro*-Embryonen könnte mit der Befruchtung mit einer hohen Anzahl von Spermien oder mit der mechanischen Entfernung der Cumuluszellen zusammenhängen.

*Microvilli*, die sich an der äußeren Oberfläche befinden, vermitteln den Kontakt des Embryos nach außen. Im Unterschied zu *Ex vivo*-Embryonen, die einen dichten und lückenlosen Saum von *Microvilli* aufwiesen, und *in vivo*-fertilisierten und -kultivierten Embryonen, bei denen vereinzelt Bereiche ohne *Microvilli*-Besatz festzustellen waren, wurde bei allen *in vitro*-produzierten Embryonen nur eine eingeschränkte Ausbildung von *Microvilli*, vielfach senkrecht zur Zelloberfläche und in unterschiedlichster Form und Länge, festgestellt. Ähnlich beschrieben Abe et al. (1999) eine geringere Anzahl an bzw. deutlich kürzer ausgebildete *Microvilli* bei *in vitro*-produzierten Rinderembryonen, und vermuteten auch darin eine mögliche Ursache für deren mitunter exzessive Lipidanhäufung. Shamsuddin und Rodriguez-Martinez (1994) verbinden diese Abweichung mit einer reduzierten Absorptionskapazität der Embryonen.

Die Interzellularverbindungen wurden sowohl zwischen Trophoblastzellen, wie zwischen Zellen der ICM untersucht. *Microplacae*, als einander überlappende Zellbereiche zwischen den Trophoblastzellen, erschienen bei Embryonen aus reiner *In vitro*-Produktion weniger zahlreich ausgebildet als bei *Ex vivo*-Embryonen und *in vivo*-fertilisierten und -kultivierten Embryonen. Die Zellen der *Inner Cell Mass* wiesen in allen Gruppen nur in geringem Ausmaß Zellzwischenräume, die besonders bei *in vitro*-produzierten Embryonen mit degenerierten Zellen und Zellresten ausgefüllt waren, auf. Die erkennbaren Zell-zu-Zell-Verbindungen waren jeweils nur über kurze Bereiche vorhanden. Einer Untersuchung von Abe et al. (1999) zum Vergleich *in vitro*-produzierter und *in vivo*-entwickelter Embryonen zufolge wurden bei ersterer Gruppe *tight junctions* und desmosomale Kontaktbereiche - obschon vorhanden - in geringerer Anzahl, weniger gut entwickelt und sich über jeweils kürzere

Membranbereiche erstreckend ermittelt. Untersuchungen zur Ausbildung interzellulärer Verbindungen veranschaulichen bestehende Unterschiede nach Art der frühen Kultivierung; so wiesen Diffusionsversuche bei *in vitro*-produzierten Rinderembryonen auf eine deutliche Reduktion bzw. ein völliges Fehlen von funktionalen Zellverbindungen in Form von *gap junctions* gegenüber *in vivo*-entwickelten Rinderembryonen hin (Boni et al., 1999; Prather und First, 1993). Demnach erfolgt deren Ausbildung bei *in vitro*-produzierten Rinderembryonen erst im Blastozyste-Stadium, und das auch nur in verringertem Ausmaß gegenüber *in vivo*-entwickelten Embryonen (Boni et al., 1999). Ein sehr ähnliches Bild zeichnen auch Shamsuddin und Rodriguez-Martinez (1994) bei Vergleichsstudien zur *In vitro*-Kultivierung mit bzw. ohne Serumverwendung; neben verstärkter Lipidanhäufung und verzögerter Mitochondrienentwicklung ist es wiederum die nur spärliche Ausbildung an Interzellularverbindungen, die durch die Zugabe von Serum hervorgerufen wird. Ebenso belegen mehrere Studien von Wrenzycki et al. (1996, 1998) die Relevanz der frühembryonalen Kultivierung - *in vivo* bzw. *in vitro* - für die Transkription von Connexin 43, einem für die Ausbildung von *gap junctions* mitverantwortlichen Gen. Die einsetzende Kompaktierung lässt den Embryo kompakter und runder erscheinen, der perivitelline Raum zur *Zona pellucida* hin wird dementsprechend größer. Ausmaß und Grad dieser Kompaktierung sind wesentlich zur Beurteilung des *Morula*-Stadiums und des Embryonalknotens der Blastozyste. Unter bestimmten *In vitro*-Bedingungen kann diese Kompaktierung weniger markant sein (Hasler et al., 1995; Merton et al., 1998; Van Soom et al., 1992), wodurch vor allem die Beurteilung in Hinblick auf mögliche Zellfragmente erschwert wird. Demgegenüber erscheinen *in vitro*-befruchtete Embryonen, die *in vivo* kultiviert wurden, in dieser Hinsicht normal (Galli und Lazzari, 1996). Damit einher gehen auch Befunde von Crosier et al. (2001), die relativ erhöhte Volumensanteile an Interzellularspalten bei *in vitro*-produzierten Rinderblastozysten mit einer reduzierten Ausbildung an Interzellularverbindungen in Verbindung brachten.

Aus diesen Untersuchungsergebnissen geht deutlich hervor, dass durch die Verkürzung der *In vitro*-Kultivierungsphase eine Verbesserungen in Hinblick auf die Blastozystenqualität zu erreichen ist, und darüber hinaus in Kombination einer „Kurzzeit-IVP“ mit frühzeitigem Re-Transfer hochwertige Embryonen für die praktische Anwendung erhalten werden können. Die getesteten Veränderungen in der Proteinergänzung im Kulturmedium haben zu keiner deutlichen Verbesserung der Blastozystenqualität geführt. Zu dem wurde beobachtet, dass morphologische Unterschiede mit steigender Konzentration an Proteinergänzung im Kulturmedium im Vergleich zu *in vivo*-kultivierten Embryonen evidenter wurden.

#### 2.2.7.5 Literatur

Abe H, Hoshi H (2003): Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *J Reprod Dev* 49, 193-202.

Abe H, Yamashita S, Itoh T, Satoh T, Hoshi H (1999): Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Mol Reprod Dev* 53, 325-335.

Betteridge KJ, Fléchon JE (1988): The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology* 29, 155-187.

Boni R, Tosti E, Roviello S, Dale B (1999): Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. *Biol Reprod* 61, 1050-1055.

Brison DR, Leese HJ (1994): The role of exogenous energy substrates in blastocoele fluid accumulation in the rat. *Zygote* 2, 69-77.

Camous S, Kopecny V, Flechon JE (1986): Autoradiographic detection of the earliest stage of [3H]-uridine incorporation into the cow embryo. *Biol Cell* 58, 195-200.

Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE (2000): Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod* 62, 1459-1465.

Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE (2001): Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod* 64, 1375-1385.

Dorland M, Gardner DK, Trounson AO (1994): Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J Reprod Fertil* 13, 25.

El-Banna AA, Hafez ES (1970): Egg transport in beef cattle. *J Anim Sci* 30, 430-432.  
Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T, Boland M. (1997): Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat Embryol* 195, 327-36.

Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA, Boland MP (2001): Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. *Mol Reprod Dev* 58, 186-195.

Farin PW, Farin CE (1995): Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biol Reprod* 52, 676-82.

Farin PW, Britt JH, Shaw DW, Slenning BD (1995): Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology* 44, 339-349.

Farin PW, Slenning BD, Britt JH (1999): Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology* 52, 659-670.

Ferguson EM, Leese HJ (1999): Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J Reprod Fertil* 116, 373-378.

Galli C, Lazzari G (1996): Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal Reproduction Science* 42, 371-379.

Gualtieri R, Santella L, Dale B (1992): Tight junctions and cavitation in the human pre-embryo. *Mol Reprod Dev* 32, 81-87.

Hasler JF (1998): The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production and embryo transfer in domestic animals with emphasis on the bovine. *J Anim Sci* 76 (Suppl. 3), 52-74.

Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA (1995): Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43, 141-152.

Hay-Schmidt A, Viuff D, Greve T, Hyttel P (2001): Transcriptional activity in in vivo developed early cleavage stage bovine embryos. *Theriogenology* 56, 167-176.

Hyttel P, Xu KP, Greve T (1988a): Scanning electron microscopy of in vitro fertilization in cattle. *Anat Embryol* 178, 41-46.

Hyttel P, Xu KP, Greve T (1988b): Ultrastructural abnormalities of in vitro fertilization of in vitro matured bovine oocytes. *Anat Embryol* 178, 47-52.

Hyttel P, Xu KP, Smith S, Callesen H, Greve T (1987): Ultrastructure of the final nuclear maturation of bovine oocytes in vitro. *Anat Embryol* 176, 35-40.

Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T (1986): Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *J Reprod Fertil* 78, 615-625.

Koyama H, Yang X, Jiang S, Suzuki H, Foote RH (1993): Analysis of polarity of bovine and rabbit blastomeres by scanning electron microscopy. *Theriogenology* 39, 249.

Laurincik J, Thomsen PD, Hay-Schmidt A, Avery B, Greve T, Ochs RL, Hyttel P (2000): Nucleolar proteins and nuclear ultrastructure in preimplantation bovine embryos produced in vitro. *Biol Reprod* 62, 1024-1032.

Lindner GM, Wright RW (1983): Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20, 407-416.

Maddox-Hyttel P, Boerjan M (2002): Electron microscopy of prehatching mammalian embryos: the ultrastructure of cattle, swine and horse embryos. In: Van Soom A, Boerjan M. (Eds.): *Assessment of mammalian embryo quality*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 295-333.

Manual of the International Embryo Transfer Society, 3<sup>rd</sup> edition, 1998.

Massip A, Mulnard J (1980): Time-lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen-thawed cow blastocysts. *J Reprod Fertil* 58, 475-478.

Massip A, Mulnard J, Vanderzwalmen P, Hanzen C, Ectors F (1982): The behaviour of cow blastocyst in vitro: cinematographic and morphometric analysis. *J Anat* 1982 134, 399-405.

Massip A, Zwijsen W, Mulnard J (1983): Cinematographic analysis of the cleavage of the cow egg from 2-cell to 16-cell stage. *Arch Biol* 94, 99-106.

Menino AR Jr, Williams JS (1987): Activation of plasminogen by the early bovine embryo. *Biol Reprod* 36, 1289-1295.

Merton S (2002): Morphological evaluation of embryos in domestic species. In: Van Soom A, Boerjan M. (Eds.): Assessment of mammalian embryo quality. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 33-55.

Merton S, van Wagendonk-de Leeuw AM, den Daas JHG (1998): Factors affecting birth weight of IVP calves. *Theriogenology* 49, 293.

Mohr LR, Trounson AO (1981): Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol Reprod* 25, 1009-1025.

Plante L, King WA (1994): Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by in vitro and in vivo fertilization. *J Assist Reprod Genet* 11, 515-529.

Plante L, Plante C, Shepherd DL, King WA (1994): Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. *Mol Reprod Dev* 39, 375-383.

Prather RS, First NL (1993): Cell-to-cell coupling in early-stage bovine embryos: A preliminary report. *Theriogenology* 39, 561-567.

Shamsuddin M, Rodriguez-Martinez H(1994): A simple, non-traumatic swim-up method for the selection of spermatozoa for in vitro fertilization in the bovine *Animal Reproduction Science* 36, 61-75.

Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB, Wolf E (2001): Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* 64, 904-909.

Thompson JG (1997): Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod Fertil Dev* 9, 341-54.

Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, McMillan WH, Tervit HR (1995): Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod* 53, 1385-1391.

Van Soom A, Boerjan ML, Bols PE, Vanroose G, Lein A, Coryn M, de Kruif A (1997): Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. *Biol Reprod* 57, 1041-1049.

Van Soom A, Van Vlaenderen I, Mahmoudzadeh AR, Deluyker H, de Kruif A (1992): Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 38, 905-919.

Watson AJ (1992): The cell biology of blastocyst development. *Mol Reprod Dev* 33, 492-504.

Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H (1996): Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *J Reprod Fertil* 108, 17-24.

Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H (1998): Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA. *J Reprod Fertil* 112, 387-398.

## 2.3 Entwicklungsdynamik im Eileiter

### 2.3.1 Entwicklungsdynamik tubaler Embryonalstadien beim Rind

#### 2.3.1.1 Einleitung

Etwa 24-28 Stunden nach der Ovulation und erfolgreicher Befruchtung vollzieht die Zygote die erste Teilung in zwei Blastomeren. Im 2-Zell-Stadium sind die mitotischen Spindelapparate der Rinderblastomeren im rechten Winkel zueinander angeordnet, im 4-Zell-Stadium bilden sie ein Kreuz. Von der zweiten Teilung an, die am Tag 2 beginnt, teilen sich die Blastomeren nicht mehr synchron. Die Zellzyklen der einzelnen Blastomeren können sich bis zu einer ganzen Teilung unterscheiden (Massip et al., 1983). Die sich früher teilenden Embryonen haben eine größere „inner cell mass“ (ICM) als die sich später teilenden. Das 4-Zell-Stadium wird 36-50 Stunden, das 8-Zell-Stadium 50-64 Stunden und das 16-Zell-Stadium 80-86 Stunden nach der Ovulation erreicht (Barnes und Eyestone, 1990; Betteridge und Fléchon, 1988). Mit fortschreitenden Teilungen wird ein Zählen der Blastomeren durch vermehrte Bildung lipidhaltiger Vakuolen erschwert. Der Embryo wird hinsichtlich der Blastomerenanzahl nur bis zum 16-Zell-Stadium beschrieben. Im 8- bis 16-Zell-Stadium, das 72-84 Stunden nach der Ovulation erreicht wird, findet der Übertritt in die Gebärmutter statt (EL-Banna und Hafez, 1970).

Trotzdem einzelne Blastomeren klar unterscheidbar sind, verlieren sie im 32-Zell-Stadium ihre scharfen Konturen und unterziehen sich der Kompaktierung, die eine wichtige Vorbereitung zur Bildung von Trophoblast, Embryonalknoten (ICM) und Blastozystenhöhle ist. Die Phase der Kompaktierung wird um den Tag 5-6 nach der Fertilisation beobachtet (van Soom et al., 1992). Am Tag 7 bildet sich durch Aufnahme von Flüssigkeit ein Hohlraum zwischen den Blastomeren, das sogenannte Blastocoel, und die kompakte Morula wird zur frühen Blastozyste. Die äußeren Blastomeren bilden den Trophoblast, die inneren den Embryonalknoten (ICM), aus dem sich die Frucht entwickelt. Die frühe Blastozyste hat einen Durchmesser von etwa 160 µm und besteht aus ca. 100 Zellen (Linares u. King, 1980). Am Tag 8 erreicht der Durchmesser der expandierten Blastozyste das Eineinhalbfache der ursprünglichen Größe des Embryos. Die expandierte Blastozyste, die nun aus etwa 200 Zellen besteht, schlüpft am Tag 9 durch die Zona pellucida, die durch proteolytische Enzymaktivität zunehmend aufgelöst wird (Menino und Williams, 1987). Die ursprünglich sphärische Form der geschlüpften Blastozyste wird am Tag 12 oval, um den Tag 18-19 beginnt beim Rind die Implantation. Untersuchungen über die Erstellung chronologisch zusammenhängender Entwicklungsvorgänge im Eileiter, die ein Gesamtbild aus der Eileiterphase eines Embryos wiedergibt, sind jedoch nicht vorhanden. Abbildung 31 gibt eine Übersicht über die bestehenden Möglichkeiten zur Gewinnung von frühen Embryonalstadien beim Rind.

Daher war es Teilaufgabe des Projektes, eine Aufstellung von Entwicklungsvorgängen im Eileiter unter verschiedenen hormonellen Einflüssen zu erstellen.



Abbildung 31: Möglichkeiten zur Gewinnung früher Embryonalstadien beim Rind

### 2.3.1.2 Material und Methoden

Innerhalb der 3 Projektjahre wurden für die Gewinnung von Embryonen aus dem Eileiter 119 Spendertiere zur Superovulation vorbereitet. Dazu wurde den Tieren im Diöstrus zwischen Tag 9 und 12 der Inhalt des dominanten Follikels durch ultraschallgeleitete Punktion abgesaugt. 36 bis 42 Stunden später erfolgte die Induktion des Follikelwachstums entweder mittels eCG (Folligon®, Intervet, Boxmeer, Holland) oder pFSH (Folltropin®-V, Vetrepharm, London, Ontario, Canada). Aufgrund unterschiedlicher Halbwertszeiten wurde eCG nur einmalig, pFSH im Abstand von 12 Stunden über die Dauer von 4 Tagen und in sinkender Dosierung (8 Injektionen) appliziert. Am 4. Tag nach Induktionsbeginn wurde die Luteolyse durch zweimalige Injektion von Prostaglandin (Cloprostenol, Estrumate®, Essex Tierarznei, München, Deutschland) eingeleitet. 24 Stunden später erfolgte zeitgleich mit einer hCG-Applikation (Chorulon®, Intervet, Boxmeer, Holland) die erste von 3 im 12-Stundenabstand folgenden Besamung (siehe Abbildung 32). Die endoskopischen Spülungen wurden ab 24 Stunden nach dem angenommenen Fertilisationszeitpunkt durchgeführt. Dabei wurden die Embryonen vom Eileiter in die Gebärmutter gespült, von wo aus sie dann über die konventionelle Methode der Embryogewinnung mittels eines herkömmlichen Ballonspülkatheters gewonnen werden konnten.

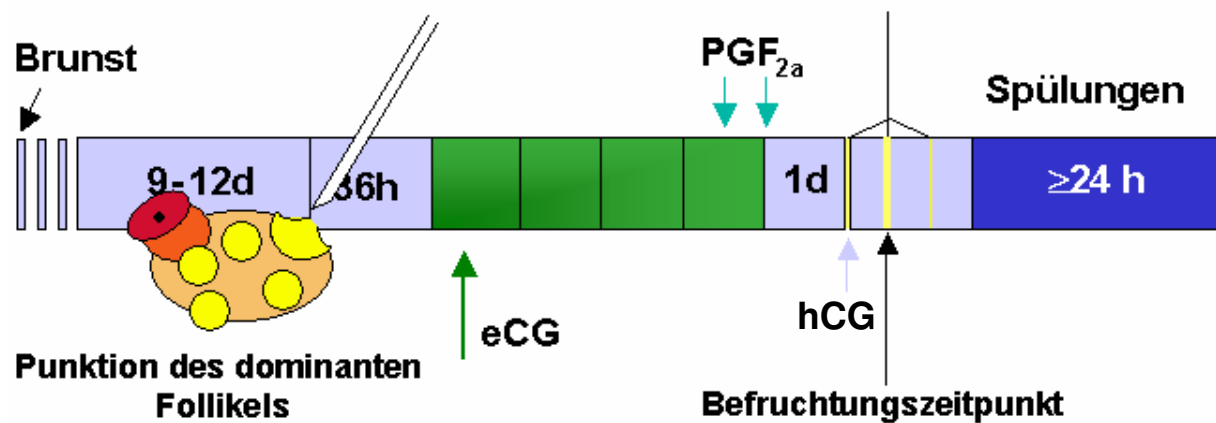
Die Spülung der Tiere erfolgte in einem separaten Behandlungsraum, in dem die Spender über ein Fressfanggitter und seitlichen Begrenzungseinrichtungen fixiert waren. Nach Applikation einer Epiduralanästhesie (4-6ml Xylanest® purum 2%, Gebro Pharma, Fieberbrunn, Österreich), Reinigung und Desinfektion der Anogenitalregion wurde zunächst ein Uterusspülkatheter im linken Uterushorn



platziert und fixiert. Der Luer-Anschluss des Ballonspülkatheters (Wörrlein, Ansbach, Deutschland) wurde über einen Drei-Wegehahn mit einer mediumgefüllten Spülflasche, die über dem Tier angebracht wurde, und mit einem unter dem Gebärmutterniveau liegenden Embryofilter verbunden. Somit konnte wechselweise Medium von der Flasche in die Gebärmutter gelangen, welches nach Umstellen des Drei-Wegehahns aus der Gebärmutter in den Embryofilter gelangte. Spüldruck und -fluss unterlagen somit dem Prinzip eines Schwerkraft-Spülsystems, um die Embryonen aus der Gebärmutter gewinnen zu können.

### Stimulation des Follikelwachstums mittels eCG

#### künstliche Besamungen



### Stimulation des Follikelwachstums mittels pFSH:

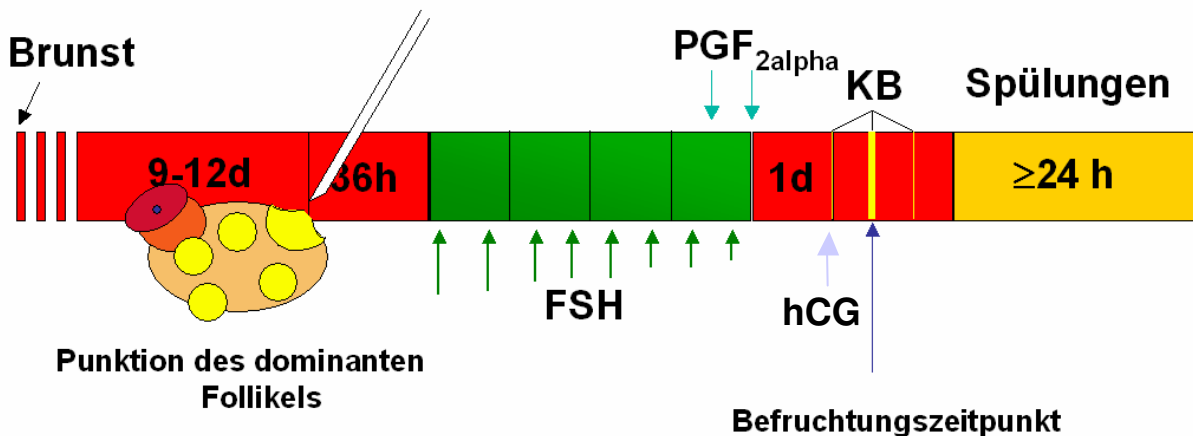


Abbildung 32: Vorbereitung der Spendertiere zur Gewinnung tubaler Embryonalstadien mittels unterschiedlicher Superovulationsstimulation

Zur Spülung der Embryonen aus dem Eileiter in die Gebärmutter wurde ein Endoskop (50 cm lang, Durchmesser 12 mm, starr, 0°-prograde Optik, mit einem parallelen Arbeitskanal, Fa. Karl Storz, Wien) über das dorsale Scheidendach in der Becken-/Bauchhöhle platziert. Zuerst wurden Gebärmutter, Eileiter und Eierstöcke im Ganzen beurteilt. Im weiteren wurden dann die Reaktionsgebilde (Follikel, Zysten, Ovulationen) bestimmt. Durch die Anhebung des jeweiligen Eierstocks mit Bändern konnte der zugehörige Eileiter derart dargestellt werden, dass eine im Arbeitskanal liegende Spülkanüle via Infundibulum in die Ampulle inseriert werden konnte. Nach überprüfen des korrekten Sitzes der Spülkanüle wurden die Embryonen aus dem Eileiter mit 20-60 ml Spülflüssigkeit (PBS+10%FKS) in den Uterus gespült. Eine erfolgreiche Spülung zeichnete sich dadurch aus, dass schon während der Eileiterspülung Spülflüssigkeit über den Uterusspülkatheter in den Embryofilter floss (Abbildung 33). Nach Beendigung der Eileiterspülung wurde die Spülkanüle aus dem Eileiter zurückgezogen und der Uterus mit weiteren 200-400 ml des Spülmediums ausgespült.

Die rechte Seite wurde analog gespült. Nach der beidseitigen Spülung wurden Endoskop und Gebärmuttersspülkatheter entfernt. Eine Nachversorgung der Tiere war nicht notwendig. Die Embryonen wurden aus dem Auffangsystem in Petrischalen ( $\varnothing$  100 mm) überführt und unter der Stereolupe isoliert, bewertet und für weitere Untersuchungen konserviert.

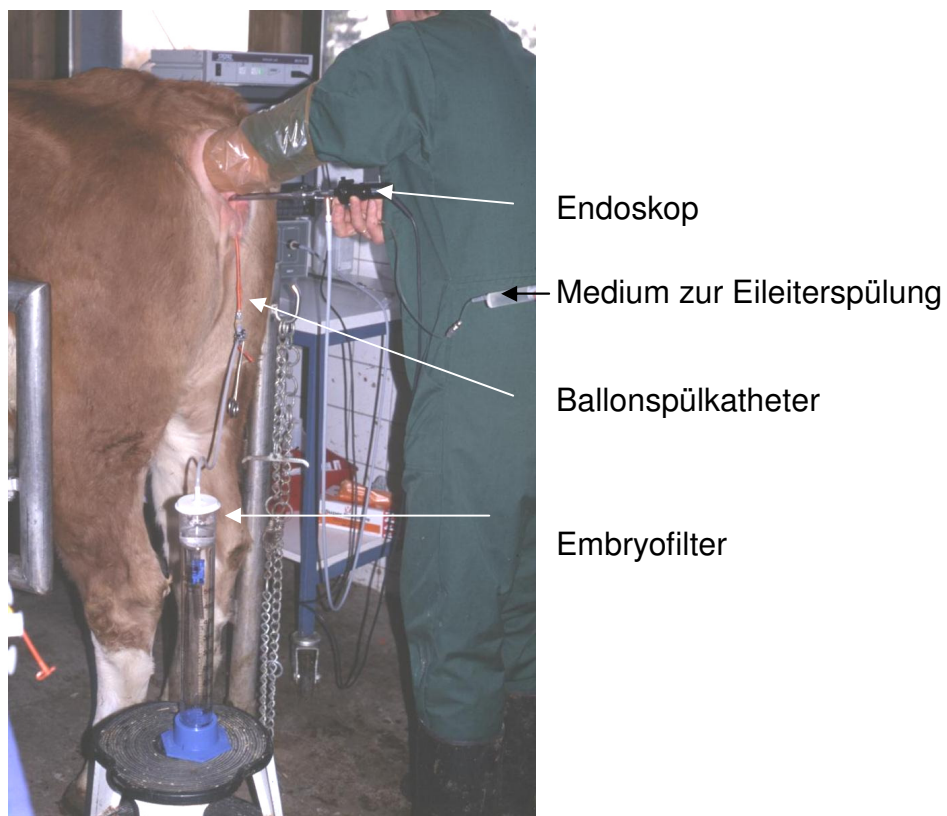


Abbildung 33: Spülung von Eileiter und Gebärmutter beim Rind

### 2.3.1.3 Ergebnisse

Insgesamt wurden durch die Vorbereitung von 119 Spendertieren 2068 Follikel induziert, die entweder ein ovulationsreifes Stadium erreichten und als Gelbkörper zu erkennen waren oder als vergrößerte, nicht ovulierte Follikel bestehen blieben. 1582 Corpora lutea konnten gezählt werden. Die endoskopische Spülung resultierte in der Gewinnung 1411 Komplexen wie Embryonen (von der Zygote bis zum 16-Zellstadium), unbefruchtete Eizellen bzw. degenerierte Zellen (mikroskopisch nicht mehr zu erkennen, ob nicht befruchtet oder befruchtet aber nicht weiterentwickelt und degeneriert) und leere Zonae. Von diesen 1411 Komplexen waren 87,7% Embryonen in den verschiedenen Teilungsstadien (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Übersicht zur Gewinnung tubaler Stadien beim Rind

	FSH	eCG	Total	$\chi^2$ -Test
Ovulation/Funktionsgebilde	74,9%	78,6%	1582 / 2068	p = 0,50
Ovulationsrate	92,8%	84,7%	1411 / 1582	p = 0,07
Entwicklungsrate	87,7%	76,7%	1098 / 1411	p = 0,73

Funktionsgebilde: durch eCG oder pFSH stimulierte Follikel und Corpora lutea

Ovulationsrate: Anzahl gewonnener Komplexe x 100 / Anzahl Corpora lutea

Entwicklungsrate: Embryonen x 100 / Anzahl gewonnener Komplexe

Die Stimulation der Follikelanbildung mittels pFSH resultierte in 23 Funktionsgebilden pro Spendertier, während in der eCG-Gruppe lediglich 13 Gebilde zu zählen waren. Dementsprechend konnten auch in der pFSH-Gruppe 17,22 Corpora lutea beobachtet werden. Diese Zahl fiel in der eCG-Gruppe um 60% kleiner aus. Weiterhin bestimmend für die zwei unterschiedlichen Behandlungsgruppen war das Erscheinungsbild der Follikel an der Ovaroberfläche. So hatten zwar die Spendertiere aus der eCG-Gruppe nur halb so viele Follikel wie die pFSH-Gruppe, die Follikel auf den Eierstöcken der eCG-Gruppe waren aber deutlich größer und zum Teil hämorrhagisch unterlaufen. Auch die Anzahl der gespülten Komplexe und der gewonnenen Embryonen in der pFSH-Gruppe war nahezu doppelt so hoch wie in der eCG-Gruppe. Diese insgesamt effektivere Behandlung von Spendertieren mit pFSH war statistisch signifikant ( $p < 0,001$ , siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: Ergebnisse aus der Superovulationsbehandlung mit eCG bzw. mit pFSH

Parameter	F S H – G r u p p e			e C G – G r u p p e		
	N	Mittelwert	Std.	N	Mittelwert	Std.
Funktionsgebilde	51	22,98	10,12	68	13,18	7,43
Corpora lutea	51	17,22	8,89	68	10,35	6,41
Follikel	51	5,76	4,08	68	2,82	2,74
Gespülte Komplexe	51	15,98	9,30	68	8,76	5,40
Embryonen	51	12,57	7,37	68	6,72	4,83
Nicht entwickelt	51	3,41	5,14	68	2,04	3,44

Funktionsgebilde: durch eCG oder pFSH stimulierte Follikel und Corpora lutea

Anova: Corpora lutea	- p < 0,001
Follikel	- p < 0,001
Funktionsgebilde	- p < 0,001
gesp. Komplexe	- p < 0,001
Embryonen	- p < 0,001

Die Entwicklungsdynamik unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Behandlungen ergab ein relativ einheitliches Bild (siehe Abbildung 34), d.h. die Gewinnung und Verteilung von Embryonen im Zwei- bis Sechzehnzellstadium war ausgewogen. Auffällig hingegen war die Gewinnung von Zygoten. Von der pFSH-Gruppe waren signifikant ( $p < 0,001$ ) mehr Zygoten zu gewinnen als bei Tieren der eCG-Gruppe (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Embryonale Entwicklungsdynamik in Abhängigkeit zur Superovulationsbehandlung

Parameter	F S H – G r u p p e			e C G – G r u p p e		
	N	Mittelwert	Std.	N	Mittelwert	Std.
Zygoten	51	4,14	6,91	68	1,47	3,74
2-Zellstadium	51	1,98	3,44	68	0,78	1,52
4-Zellstadium	51	1,98	3,83	68	1,32	2,00
8-Zellstadium	51	3,49	5,59	68	2,43	3,79
16-Zellstadium	51	0,98	2,06	68	0,72	1,72

Anova: Zygoten – p = 0,001

### Superovulation (FSH/eCG)

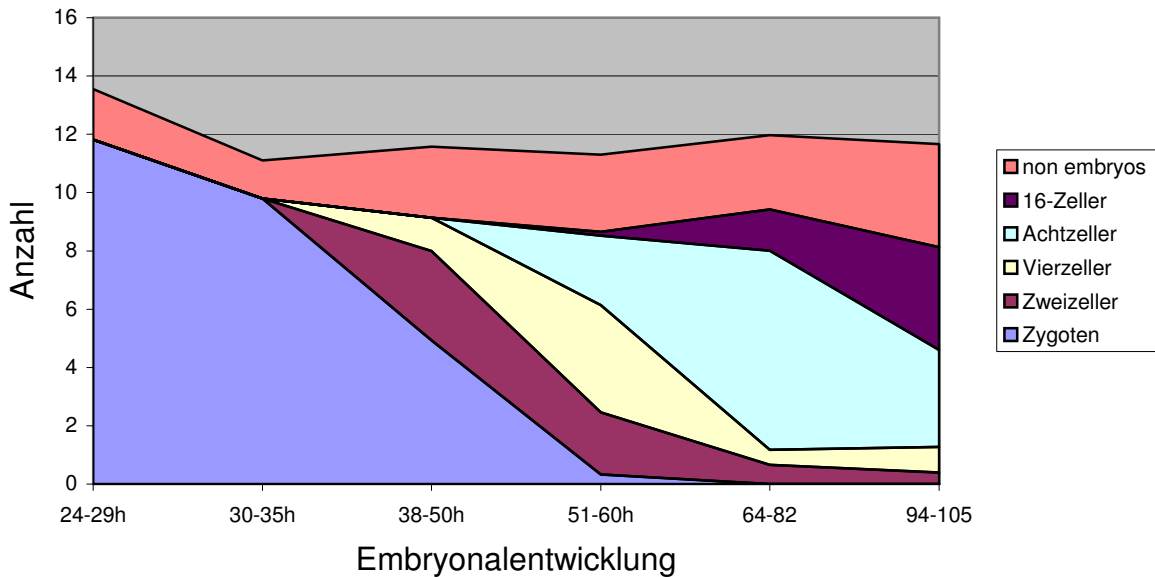


Abbildung 34: Zeitliches Auftreten der unterschiedlichen Embryonalstadien bei Embryospülung aus dem Eileiter 24-126h nach der Befruchtung

#### 2.3.1.4 Diskussion

Die in diesem Arbeitsschritt des Projektes dargestellte Entwicklungschronologie präimplantativer Embryonalstadien stellt in dieser Form eine bislang einzigartige Beschreibung dar. Über ein breites Zeitspektrum von 126 Stunden konnten zusammenhängend alle Stadien gewonnen und damit die physiologische Entwicklungsbreite aufgezeigt werden. Exemplarisch sei hier auf die Embryonen im 8-Zellstadium hingewiesen, die beim Rind die Überwindung des Zellblocks darstellen, d.h. die Aktivierung des embryoeigenen Genoms erfolgt in diesem Entwicklungszustand. Aus der Entwicklung im Eileiter ist zu erkennen, dass ein erheblicher Anteil an Embryonen in diesem Stadium verharret und erst nach deutlich fortgeschrittener Zeit mehr progressive Stadien auftreten. Die Abbildung 34 erscheint besonders geeignet zur Gegenüberstellung von Embryonen, die sich *in vitro* entwickeln, um anhand der Entwicklungsunterschiede zum Beispiel den Grad der Retardierung in Relation mit der Entwicklungskapazität des Embryos setzen zu können. Besonders wertvoll wird diese Darstellung vor allem im Bereich der *In vivo*-Kultur sein, da es ein Hauptziel dieses Projekts war, die frühe *In vitro*-Phase durch Teilschritte der *In vivo*-Kultur zu ersetzen. Erst ein Vergleich der dann wiedergewonnenen Embryonen mit Entwicklungsstadien aus dieser Studien könnte mehr Einsicht in kulturelle Differenzen geben.

Neben parallelen Studien zur IVP von Embryonen geben diese Untersuchungen auch Hinweise zur Stimulationsqualität und Eileiternmigration wieder. Daher sind offensichtliche qualitative Unterschiede der Stimulation (FSH/eCH: Molekülgröße, Antigenität, Halbwertszeit, FSH/LH-Effekt) in einer inadäquaten und asynchronen Vorbereitung der verschiedenen Kompartimente (somatische Zellen im Follikel, Zytoplasma der Eizelle, Kern der Eizelle) und in einer insgesamt sehr heterogenen

Gruppe von Follikeln (Dieleman et al., 2002) zu suchen. Zahlreiche Untersuchungen bestätigen, dass ungefähr nur ein Drittel aller Spendertiere 5 und mehr Embryonen liefern, während die anderen Tiere deutlich darunter liegen, weil sie keine ovarielle Reaktion zeigen oder aus der Gebärmutter keine oder meist nur unbefruchtete Eizellen gespült werden können (Boland et al., 1991 ; Fricke et al., 1994 ; Galli et al., 2003; Kelly et al., 1997; Mitchell et al., 1998; Kim et al., 2001; Sartori et al., 2003). Da im Rahmen der Superovulation immer an eine „überphysiologische“ Stimulation zu denken ist, sind Störungen in der Eileitermigration ebenfalls denkbar. Besonders auffällig in diesem Zusammenhang sind die guten Ergebnisse aus der Stimulation mit pFSH in Kombination mit der endoskopischen Eileiterspülung und bestätigen sowohl die Überlegenheit von pFSH gegenüber eCG als auch den Vorteil einer vollständigen Spülung von Eileiter und Gebärmutter (Newcomb und Rowson, 1975).

### 2.3.1.5 Literatur

Barnes FL, Eyestone WH (1990): Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology* 33, 141-152.

Boland MP, Goulding D, Roche JF (1991): Alternative gonadotropins for superovulation in cattle. *Theriogenology* 35,5-17.

Betteridge KJ, Fléchon JE (1988): The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology* 29, 155-187.

Dieleman SJ, Hendriksen PJM, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycky C, Kruij TAM, Niemann H, Gadella BM, Bevers MM Vos PLAM (2002): Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* 57,5-20.

El-Banna AA, Hafez ESE (1970): Egg transport in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 30, 430-432.

Fricke PM, Kirsch JD, Reynolds LP, Redmer DA (1994): Studies of FSH-P induced follicular growth in cows. *Theriogenology* 42,43-53.

Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G (2003): Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59,599-616.

Kelly P, Duffy P, Roche JF, Boland MP (1997): Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine pattern. *Anim Reprod Sci* 46,1-14.

Kim I, Son DS, Yeon SH, Choi SH, Park SB, Ryu IS, Suh GH, Lee DW, Lee CS, Lee HJ, Yoon JT (2001): Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology* 55,937-945.

Linares T, King WA (1980): Morphological study of the bovine blastocyst with phase contrast microscopy. *Theriogenology* 14; 123-133.

Massip A, Zwijsen W, Mulnard J (1983): Cinematographic analysis of the cleavage of the cow egg from 2-cell to 16-cell stage. *Arch. Biol.* 94, 99-106.

Menino AR, Williams JS (1987): Activation of plasminogen by the early bovine embryo. *Biol. Reprod.* 36, 1289-1295.

Mitchell BR, Martinez M, Bentley DM, Mapletoft RJ (1998): A comparison of estradiol 17/3 and gnrh in synchronizing follicle wave emergence on superovulatory response in Holstein cows. *Theriogenology* 49,380.

Newcomb R, Rowson LEA (1975). A technique for the simultaneous flushing of ova from the bovine oviduct and uterus. *Vet Rec* 96:468-469.

Sartori R, Suárez-Fernández CA, Monson RL, Guenther JN, Rosa GJM, Wiltbank MC (2003): Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. 60,1319-1330.

van Soom A, van Vlaenderen I, Mahmoudzadeh AR, Deluyker H, Kruif A (1992): Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 38, 905-919.

## 2.4 *In vivo*-Kultur von Rinderembryonen

Die *In vivo*-Kultur von Rinderembryonen stellt ein wichtiges Ziel im Rahmen der Arbeiten des drei Jahre umfassenden Projektes dar. Mit dieser *In vivo*-Kultur werden elementare reproduktionstechnische Schritte gesetzt, um die einzelnen ineinandergreifenden dynamischen physiologischen Abläufe im periovulatorischen und präimplantativen Zeitraum denen der *In vitro*-Manipulation gegenüberzustellen. Beim weiblichen Rind ist trotz vorzeitigen Verlust von Eizellen im noch sehr jungen Alter der Tiere und auch während der Entwicklungsphase der Eizellen auf einem langen Weg bis zur befruchtungstauglichen Oozyte das ovarielle Erscheinungsbild stetig wiederkehrender antraler Follikel, die in Gruppe auftreten und durch ihr schubartiges Wechselspiel einem Wellencharakter unterliegen, ein deutlicher Hinweis auf das Vorhandensein einer großen Anzahl von entwicklungs-kompetenten Eizellen gegeben. Besonders der letzte Entwicklungsabschnitt der folliculären Eizellphase, die Ovulation und die von Fimbrien getragene Aufnahme der Eizelle *via* Infundibulum in die Ampulle des Eileiters mit anschließender Befruchtung, nach der auch die Cumuluszellen ihre Aufgabe an der Eizelle beendet haben und sich von ihr lösen, und schließlich die Wanderphase im Eileiter, der zeitgerecht Transport, Ernährung und Entwicklung bis zum Übergang in die Gebärmutter bewerkstelligt, stellen Voraussetzungen zur Erfüllung von Vorgängen im Tier dar, die sehr präzise ablaufen und von kleinsten Abweichungen erheblich gestört werden können. Da die hormonelle Superstimulation zwar einen gewissen Anteil an Embryonen sehr guter Qualität liefert und weltweit ein vielseitiges Interesse erweckt hat, wurde überdies vor über 30 Jahren die frühzeitige Gewinnung von Eizellen am Eierstock mit anschließender *In vitro*-Produktion von Embryonen im Labor unter Umgehung der komplizierten physiologischen Abläufe entwickelt und etabliert. Dieser *In vitro*-Produktion steht ein maßgeblicher Anteil an Eizellen zur Verfügung, aus denen sich nach dem derzeitigen Verständnis reproduktionsphysiologischer Abläufe extrakorporal Embryonen entwickeln sollen, deren Kompetenz bis zur Einnistung und schließlich zum gesunden Kalb reicht. Obwohl einige Jahrzehnte der *In vitro*-Produktion erfolgreich zu einem enormen Informationsgewinn beigetragen haben, erlaubt es diese Reproduktionstechnik nicht, Embryonen in annähernd gleichem Umfang zu gewinnen und einzusetzen, wie es durch die Superovulation bislang erreicht wird.

Die in diesem Untersuchungsabschnitt folgenden Arbeiten zur *In vivo*-Kultur von Rinderembryonen im nicht ligierten Eileiter von zyklussynchronisierten Rindern haben folgende Aufgaben zum Ziel:

- Verständnis der reproduktionsphysiologischen Abläufe
- Übertragung des Kenntnisstandes in die IVP
- Verbindung von IVP und Entwicklungskompetenz im Tier  
→ Gewinnung von qualitativ hochwertigen Embryonen



## 2.4.1 Untersuchungen zur Eileiterkultur *In vitro*-produzierter Rinderembryonen

### 2.4.1.1 Einleitung

*In vitro*-produzierte Embryonen unterscheiden sich deutlich von den *ex vivo*-gewonnenen Embryonen (Farin und Farin, 1995; Wright und Ellington, 1995; Thompson, 1997; Holm et al., 2002). Trotz vielfältiger Merkmalerhebung auf oozytärer und embryonaler Ebene kommt letztendlich den Ergebnissen nach Transfer von IVP-Embryonen auf synchronisierte Rezipienten mit Trächtigkeitsrate sowie Kälbergeburtsdaten die größte Bedeutung zu. Diese Erhebungen sind jedoch sehr aufwändig. Aus diesem Grund wird das Augenmerk auf Parameter gerichtet, die in ihrer Gesamtheit der Embryobeurteilung vor allem für Vergleichsuntersuchungen besondere Verwendung finden. U.a. wurden *in vivo*-produzierte Embryonen nach biochemischen Maßstäben beurteilt, um für die *In vitro*-Kultur optimale Voraussetzungen zu schaffen (z.B. energetischer Metabolismus und Proteinsynthese) (Thompson, 1997; siehe Tabelle 23).

Tabelle 23.: Biochemische Unterschiede zwischen *In vivo*- und *In vitro*-Blastozysten von Wiederkäuern (nach Thompson, 1997)

Parameter	<i>In vitro</i> vs. <i>In vivo</i>
ATP-Produktion	=
O <sub>2</sub> -Aufnahme	=
Glukose-Aufnahme	=
Glukose-Oxidation	<
Pyruvat-Ausnutzung	=
Aminosäure-Aufnahme	<

= : kein Unterschied; <: Wert war kleiner für *in vitro*-produzierte Embryonen

Diese Unterschiede lassen sich anhand morphologischer und kultureller Eigenschaften deutlicher darstellen (siehe Tabelle 24).

Da bislang diese markanten Unterschiede auf Ganzzeitkultur (IVP) bzw. Embryogewinnung aus dem Tier (*In vivo*-Entwicklung) basieren, ist es einer der wichtigsten Schwerpunkte in diesem Projekt, über Teilschritte der Entwicklung (Maturation, Fertilisation, Teilungsaktivität bis zur Morula bzw. Blastozyste) die unterschiedlich gewonnenen Embryonalstadien in ihrer frühen Entwicklung vom *In vivo*-Bereich in die Kulturphase und umgekehrt zu überführen, um diese Teilschritte in ihrer Bedeutung für die Embryonalentwicklung besser einschätzen zu können.

Dazu wurden in dieser ersten Versuchsphase Eizellen und Zygoten auf temporäre Empfänger übertragen und wiedergewonnen, um anhand dieser ersten Information Faktoren wie Kulturmedien, Synchronität der Empfänger, Rückgewinnungsrate etc. für gezielte weitere Versuche bestimmen zu können.

Tabelle 24: Unterschiede zwischen *in vivo*- und *in vitro*-gewonnenen Embryonen  
(nach Greve et al. 1984, 1987, 1993, ergänzt nach Thompson, 1997)

	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Morphologie	Perivitelliner Raum nimmt 30-40% der Zona einer kompaktierten Morula ein	kein oder nur schmaler perivitelliner Raum
Kompaktierung	Stark	Gering
Farbe		dunkler, mit mehr Vakuolen
Dichte	>1,30	<1,14
Zellzahl		meist weniger Zellen, selten mehr
ICM	20-25% der Zellen einer expandierten Blastozyste	Wenig (12-15%)
Größe	150-190 µm, nach Expandierung bis 1,5 fach größer	große Variabilität
Aktivierung des embryonalen Genoms	Beginn: 2-Zell-Stadium Hauptaktivierung: 8-Zell-Stadium	Hinweise auf Transkription ab dem 2-Zell-Stadium
Entwicklungsrate	Kompaktierte Morula: Tag 6 Blastozyste: Tag 7 Schlupf: Tag 9	Zeitgleich bzw. verspätet
Temperatur-empfindlichkeit	Kältetoleranz bis 0 °C	< 15 °C eingeschränkte Entwicklung
Tiefgefrierverfahren	Rel. Kryostabil	Kryolabil

### 2.4.1.2 Material und Methoden

#### Tiervorbereitung

Für diesen Versuchsabschnitt wurden 73 Jungkalbinnen der Rasse Fleckvieh vorbereitet. Die Auswahl dieser Trägartiere erfolgte aufgrund von Voruntersuchungen auf regelmäßige zyklische Aktivitäten. Die Tiere wurden mittels Prostaglandin (Cloprostenol, Estrumate®, Essex Tierarzt, München, Deutschland) synchronisiert oder es wurden Tiere verwendet, die zum entsprechenden Zeitpunkt eine natürliche Brunst zeigten. Die Brunstkontrolle wurde zweimal täglich durchgeführt. Der Zeitpunkt, an dem erste Anzeichen der Brunst zu erkennen waren, wurde als Tag 0 festgelegt.

#### Embryogewinnung

Eierstöcke wurden an einem nahegelegenen Schlachthof gesammelt und in 25°C bis 30°C warmer phosphatgepufferter Lösung (PBS) ins Labor am IFA-Tulln transportiert. Die Eierstöcke wurden mehrfach in PBS-Lösung gewaschen und punktiert. Dazu wurde ein Punktionsystem verwendet, das aus einer 20 G Nadel, einem Perfusorschlauch und einem 50 ml Falconröhrchen bestand, welche an ein Vakuumgerät (Micro-Macrosauger, Labotect, Göttingen, Deutschland) angeschlossen waren. Es wurde bei einem Unterdruck von 60 mmHg punktiert. Alle Follikel in der Größenordnung von 2 mm bis 8 mm wurden aspiriert. Die Cumulus-Oozyten-Komplexe (COC) wurde unter einem Stereomikroskop herausgesucht, beurteilt und für den weiteren Einsatz selektiert und gruppiert. Es wurden nur COC verwendet, die mindestens 2 bis 6 geschlossene Cumuluszelllagen und gleichzeitig ein dunkles, homogenes granuliertes Zytoplasma aufwiesen. Diese COC wurden in Gruppe zu je 25 bis 50 eingeteilt und zur Maturation in 400 µl mit Mineralöl überschichtete Tropfen überführt. Die *In vitro*-Maturation wurde in TCM-199 vollzogen, welches mit 1,4 mg HEPES, 0,8 mg NaHCO<sub>3</sub>, 0,25 mg Pyruvat, 50 µg Gentamycin, 4 IU pFSH (Folltropin®-V, Vetrepharm, London, Ontario, Kanada) und 10% (v/v) „estrous cow serum“ (OCS) pro Milliliter supplementiert wurde.

Nach einer Maturationszeit von ungefähr 22 Stunden wurden die Oozyten mit expandiertem Cumulus in 4-Well-Schalen übertragen, die mit 400 µl Fertilisationsmedium (Fert-TALP, mit 6 mg/ml BSA und 20 µg/ml Heparin) vorbereitet waren. Anschließend wurde Tiefgefriersamen bei 37°C bis 39°C aufgetaut und in modifiziertem Tyrode-Medium (Sperm-TALP) einem Swim up-Verfahren unterzogen (Parrish et al., 1986). Die im Swim up-Verfahren gewonnenen Samen wurden durch Zentrifugation konzentriert und dem Fertilisationsmedium in einer Endkonzentration von 1 Mio Samen pro ml zugesetzt. Samen und COC wurden für 20 bis 22 Stunden koinkubiert.

Nach der Fertilisierung wurden die Eizellen von Cumulus befreit und zweimalig in Kulturmedium gewaschen bevor sie endgültig in ölüberschichtete 50µl Tropfen Kulturmedium (synthetic oviduct medium SOF; 10% BSA) überführt wurden. Die *In vitro*-Kultur wurde bei 5% CO<sub>2</sub> und 5% O<sub>2</sub> für 24 bis 84 Stunden durchgeführt, bevor die Embryonen in den verschiedenen Teilungsstadien zur *In vivo*-Kultur auf temporäre Empfänger transferiert wurden.

#### *In vivo*-Kultur

Nach der kurzzeitigen *In vitro*-Kultur wurden die Embryonen aus dem ölüberschichteten Tropfen in Petrischalen (Ø 35 mm) mit reinem Kulturmedium überführt und der Transfer wurde vorbereitet. Die generelle Vorbereitung der Tiere

wurde analog zur Gewinnung von tubalen Stadien nach Superovulation durchgeführt. Ein speziell für die *In vivo*-Kultur entwickeltes Transfersystem wurde mit den Embryonen beladen. Das Transfersystem bestand aus einer 50 µl Glaskapillare (Borosilikatglas, Brand, Deutschland), einem Perfusorschlauch (Braun, Melsungen, Deutschland) und einer aufgesetzten 1 ml-Spritze. Die Kapillare war Bischofsstab-ähnlich gebogen, sodass die Öffnung der Kapillarenspitze wieder in Richtung des anderen Endes der Kapillare zeigte. Somit wurde gewährleistet, dass beim tiefen Inserieren der Kapillare in den Eileiter (5 – 8 cm) kein Eileiterepithel abgeschilfert wurde und sich der Eileiter während des Insertionsvorganges über die Krümmung der Kapillare auffädeln ließ. Die Embryonen wurden immer unilateral transferiert, wobei meist die Seite der Ovulationsstelle gewählt wurde.

Nach 3 bis 6 Tagen wurden die Embryonen zurückgewonnen. Da mit dieser Arbeit generelle Untersuchungen zur Übertragung und Rückgewinnung eingeleitet wurden, wurden die Transfers in zeitlicher Nähe zur Ovulation bzw. später und die Rückgewinnung auf verschiedenste Weisen durchgeführt. Wie in Tabelle 25 gezeigt wird, wurden die Embryonen durch Spülung der Gebärmutter und/oder des Eileiters im Zusammenhang mit der Gebärmutter bei den gleichen bzw. bei verschiedenen Tieren vorgenommen.

Mit den Versuchsgruppen 1-3 sollte über den Verbleib der Embryonen im Eileiter bzw. die Migration über den uterotubalen Übergang hinaus in die Gebärmutterhornspitze mehr Information gewonnen werden. Die Gruppen 4 und 5 sollten mehr Aufschluss darüber geben, welcher Zeitpunkt günstiger für den Transfer zur *In vivo*-Kultur ist. Der Schwerpunkt dieser Ausführungen wurde zu Beginn des Projektes gelegt, um das generelle Vorgehen, technische Details und Tiersynchronisationen für die weiter im Projekt anstehenden Untersuchungen zu optimieren.

Tabelle 25: Gruppeneinteilung zu Transfer und Rückgewinnung der Embryonen

Gruppe	Tierzahl n	Kennzeichen
1	36	Embryogewinnung nur aus der Gebärmutter
2	13	Embryogewinnung aus dem Eileiter und der Gebärmutter
3	4	Fraktionierte Embryogewinnung zuerst aus der Gebärmutter dann aus Eileiter/Gebärmutter
4	8	ET von Embryonen im 2- bis 4-Zellstadium am Tag 1 und 2 nach der Ovulation
5	12	ET von Embryonen im 8-Zellstadium am Tag 3 nach der Ovulation

Insgesamt standen 2280 Embryonen zur Verfügung, die in den jeweiligen Gruppen übertragen wurden.

#### 2.4.1.3 Ergebnisse

In Gruppe 1 wurden 1365 Embryonen (Zygote bis 8-Zellstadium) auf 36 Empfängertiere übertragen. Nach Spülung der Gebärmutter am Tag 7 konnten 404 Embryonen wiedergefunden werden (Gewinnungsrate: 29,6%), von den sich 48 (Entwicklungsrate: 11,9%) zu Blastozysten weiterentwickelt hatten. 53 Embryonen wurden kontralateral übertragen, wobei 26 aus der Gebärmutter gespült wurden, von denen auch 6 Embryonen im Blastozystenstadium waren.

Bei 13 Tieren in Gruppe 2 wurden 454 Embryonen (2- bis 8-Zellstadium) übertragen, von den nach kombinierter Eileiter-/Uterusspülung 268 Embryonen (Gewinnungsrate: 59,0%) wiedergewonnen werden konnten. Insgesamt hatten sich in dieser Gruppe 97 (Entwicklungsrate: 36,2%) Embryonen zu Blastozysten weiterentwickelt. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 35 graphisch zusammengestellt.

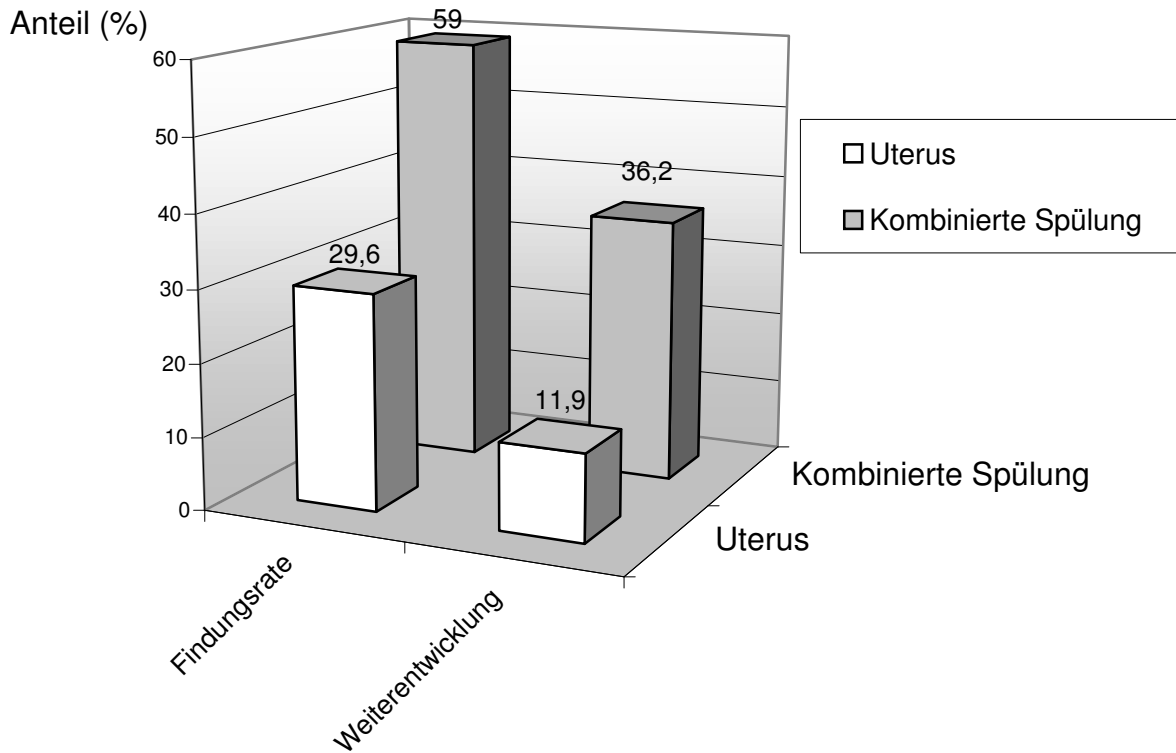


Abbildung 35: Ergebnisse aus der Embryospülung von Uterus bzw. Eileiter und Uterus (Kombinierte Spülung)

Bei weiteren 4 Empfängertieren aus Gruppe 3 wurde zuerst die Gebärmutter und dann der Eileiter im Zusammenhang mit der Gebärmutter gespült. Von 100 übertragenen Embryonen wurden 31 Embryonen (31%) nach Gebärmuttersspülung gewonnen, während die Spülung von Eileiter und Gebärmutter die Anzahl der Embryonen auf insgesamt 65 erhöhte (65%). In dieser Gruppe entwickelten sich 17 Embryonen (Entwicklungsrate: 26,2%) bis zum Blastozystestadium. Zur Übersicht sind in Tabelle 26 die Daten der einzelnen Spülungen aufgelistet.

Tabelle 26: Ergebnisse aus der Spülung von Eileiter bzw. Eileiter und Gebärmutter nach *In vivo*-Kultur von IVP-Embryonen

Empfänger	Transferierte Embryonen (n)	Embryonalstadien	Embryogewinnung (n)		
			Gebärmutter	Gesamt	Blastozysten
1	27	2-4 Zeller	13	15	0
2	25	4-8 Zeller	10	17	7
3	28	4-8 Zeller	7	15	1
4	20	16 Zeller	1	18	9
Summe	100		31	65	17

162 Embryonen im 2 bis 4-Zellstadium wurden auf 8 Empfänger transferiert und alle über die kombinierte Eileiter-/Uterusspülung wiedergewonnen. Von 75 gespülten Embryonen (46,3%) hatten sich 10 zu Blastozysten (13,3%) entwickelt (Tabelle 27).

Tabelle 27: Ergebnisse aus der *In vivo*-Kultur von Embryonen im 2- bis 4-Zellstadium

Empfänger	Transferierte Embryonen (n)	Embryonalstadien	Gewonnene Embryonen(n)	
			Gesamt	Blastozysten
1	30	2 Zeller	21	0
2	10	2 Zeller	5	2
3	10	2 Zeller	5	1
4	13	2 Zeller	7	0
5	22	2-4 Zeller	18	0
6	24	2-4 Zeller	5	1
7	24	2-4 Zeller	5	1
8	29	2-4 Zeller	9	5
Summe	162		75	10

Aus der 5. Gruppe konnten 199 Embryonen im 8-Zellstadium übertragen und 68 (34,2%) zurückgewonnen werden. Von diesen hatten sich jedoch 36,8% (25 Embryonen) zu Blastozysten weiterentwickelt. Diese 25 Embryonen stammten ausschließlich aus Transfers, die ipsilateral durchgeführt worden waren. Bei zwei Tieren wurden Embryonen kontralateral übertragen; trotz der erfolgreichen Gewinnung konnte keine Weiterentwicklung zu Blastozysten beobachtet werden (Tabelle 28).

Tabelle 28: Ergebnisse aus der *In vivo*-Kultur von Embryonen im 8-Zellstadium

Empfänger	Transferierte Embryonen (n)	Transferierte Seite	Gewonnene Embryonen(n)	
			Gesamt	Blastozysten
1	11	Ipsilateral	8	3
2	11	Ipsilateral	1	0
3	12	Ipsilateral	8	5
4	17	Ipsilateral	7	3
5	18	Ipsilateral	6	2
6	19	Ipsilateral	14	8
7	25	Ipsilateral	2	2
8	27	Ipsilateral	1	1
9	15	Ipsilateral	2	1
10	14	Ipsilateral	2	0
11	19	Kontralateral	6	0
12	11	Kontralateral	11	0
<b>Total</b>	<b>199</b>		<b>68</b>	<b>25</b>

#### 2.4.1.4 Diskussion

Diese Studie stellt mit den erreichten Ergebnissen zur *In vivo*-Kultur von Embryonen die derzeit erste und einzige erfolgreiche Methode bei Rindern dar. Die bislang gewonnenen Informationen zu *In vivo*-Untersuchungen wurden auf operativem Wege über Kaninchen, Schaf und Rind (Boland 1984 ; Xu et al., 1987; Lu et al., 1988; Galli et al., 2003) erhalten, deren Einsatz aufgrund invasiver Vorgehen und möglicher postoperativer Probleme (Blutungen, Verwachsungen etc.,) in der Regel auf die einmalige Verwendung begrenzt war. Als Beispiel sei die Embryoproduktion aus der



Arbeitsgruppe Galli (Galli et al., 2001) erwähnt. Diese Arbeitsgruppe zeigte mit dem Umfang ihrer Tätigkeit im Rahmen der routinemäßigen Follikelgewinnung mit nachgeschalteter Kurzzeit *In vitro*-Produktion und folgender *In vivo*-Kultur die Notwendigkeit, qualitativ hochwertige Rinderembryonen zu produzieren. So wurden in den Jahren 1997 bis April 2000 33.000 Eizellen mittels Follikelpunktion bei Rindern gewonnen. Nach erfolgter *In vitro*-Teilung wurden diese Embryonen in ligierte Schafeileiter übertragen. Insgesamt konnten 8.392 transfertaugliche Embryonen und 6784 tiefgefriertaugliche Embryonen produziert werden. Nach dem Transfer von Embryonen aus der Schafeileiterkultur wurden keine Unterschiede zu den Transfers von *Ex vivo*-Embryonen festgestellt. Embryonen, die in 1,4 M Ethylenglykol tiefgefroren und nach dem Auftauen direkt transferiert wurden, zeigten eine um 10% schlechtere Entwicklungsrate (Trächtigkeitsrate) als *Ex vivo*-Embryonen. Diese positive Entwicklung *in vivo*-zwischenkultivierter Embryonen setzte sich bis zur Geburt fort. Die Trächtigkeitsdauer wurde im Durchschnitt nur um 1 Tag und die perinatale Sterblichkeit um 0,9% überschritten (Galli et al., 2001). Diese sehr umfangreiche Studie lässt die in diesem Projekt vorgestellte Methode unter Verwendung der homologen Spezies unter einfacheren und wiederholbaren Voraussetzungen als ein geeignetes Verfahren erscheinen, um beim Rind vermehrt *In vitro*- vs. *In vivo*-Studien bei gleichzeitiger und effizienter Nachkommensproduktion in der Landwirtschaft zu bewerkstelligen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung, dass ein Großteil der Embryonen nicht bis in die Gebärmutterhornspitze wandert und für weitere Untersuchungen die zusammenhängende Spülung von Eileiter und Gebärmutter notwendig ist. Dieses Phänomen scheint sich nicht nur auf die *In vivo*-Kultursituation allein zu beschränken, zumal Newcomb und Rowson bereits 1975 nach Superovulation die Spülung von Uterus und Eileiter ebenfalls getrennt, aber chirurgisch durchführten und feststellten, dass im Eileiter weitere, nicht migrierte Embryonen zu finden waren.

Im weiteren konnten klare Hinweise erhalten werden, dass sowohl der Transfer verschiedener Embryonalstadien zu verschiedenen Synchronisationszeitpunkten der Tiere als auch beide Seiten (ipsilater/kontralateral) zur *In vivo*-Kultur geeignet sind. Trotz geringer Weiterentwicklung aus den einzelnen kontralateralen Transfers (Gruppe 1 und Gruppe 5) ist bei der gezeigten Spülrate anzunehmen, dass bei Zyklussynchronität beide Seiten zur Übertragung und Rückgewinnung geeignet sind. Die Anzahl der transferierten Embryonen pro Empfängertier wurde mit 10 bis 30 Embryonen relativ gering gehalten, um sicherzustellen, dass kein sogenannter „over crowding effect“ entsteht und ein degenerativer Masseneffekt selbst einen negativen Einfluss auf entwicklungs kompetente Embryonen ausübt. In anderen Untersuchungen wurden 5 bis 10-mal so viele Embryonen auf Schafe (Enright et al. 2000) und Rinder (Peura und Aalto, 1989) transferiert und dennoch keine negativen Einflüsse auf die Wiederfindungsrate und die Weiterentwicklung der Embryonen beobachtet.

Mit dieser Studie konnte bereits gezeigt werden, dass *in vitro*-produzierte Embryonen bereits nach kurzzeitiger *In vitro*-Kultur erfolgreich zur *In vivo*-Kultur im Rindereileiter weiterentwickelt werden können. Weitere Untersuchungen sind durchzuführen, die mehr Auskunft über mögliche, eileiterähnliche Flüssigkeitszusammensetzungen, -bewegungen und Aktivitätszustände geben und den Eileiter funktionell mehr integrieren, um die Weiterentwicklungskapazität optimal zu nützen.

#### 2.4.1.5 Literatur

Boland MP (1984): Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mamalian eggs. *Theriogenology* 21,126-137.

Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP (2000): Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs. in vivo: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology* 54,659-673.

Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G (2001): Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55,1341-1357.

Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G (2003): Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59,599-616.

Greve T, Bousquet D, King WA, Betteridge KJ (1984): In vitro fertilization and cleavage of in vivo matured bovine oocytes. *Theriogenology* 22,151-165.

Greve T, Xu KP, Callesen H, Hyttel P (1987): In vivo development of in vitro fertilized bovine oocytes matured in vivo versus in vitro. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer* 4,281-285.

Greve T, Avery B, Callesen H (1993): Viability of in vivo and in vitro-produced bovine embryos. *Reprod Dom Anim* 28,164-169.

Farin PW, Farin CE (1995): Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biol Reprod* 52,676-682.

Holm P, Booth PJ, Callesen H (2002): Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction* 123,553-565.

Lu KH, Gordon I, McGovern H, Gallagher M (1988): Production of cattle embryos by in vitro maturation and fertilization of follicular oocytes and their subsequent culture in vivo in sheep. *Theriogenology* 29,272.

Newcomb R, Rowson LEA (1975): A technique for the simultaneous flushing of ova from the bovine oviduct and uterus. *Vet Rec* 96,468-469.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL (1986): Bovine in vitro fertilization with frozen - thawed semen. *Theriogenology* 25,591-600.

Peura T, Aalto J (1989): Pregnancies resulting from bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Suomen Eläinlääkärilehti* 95,69-73.

Thompson JG (1997): Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod Fertil Dev* 9,341-354.

Wright RW, Ellington J (1995): Morphological and physiological differences between in vivo and in vitro produced preimplantation embryos from livestock species. *Theriogenology* 44,1167-1189.

Xu KP, Greve T, Callesen H, Hyttel P (1987): Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fert* 81,501-504.

## 2.4.2 Untersuchungen zur Etablierung eines Systems für die *In vivo*-Kultur von *in vitro*-produzierten Rinderembryonen: Transfer von unterschiedlich entwickelten Embryonalstadien

### 2.4.2.1 Einleitung

Aktuelle Erkenntnisse auf dem Gebiet der *In vivo*-Kultur von Rinderembryonen haben gezeigt, dass die *In vitro*-Produktion *per se* einen enormen Beitrag zur Bereitstellung von Embryonen leistet, deren Qualität jedoch wiederum einschränkend auf die kommerzielle Nutzung wirkt (Galli et al., 2003). So konnten Galli und Mitarbeiter (Galli et al., 2003) für die letzten 10 Jahre erfolgreich 17.500 Embryonen für Fleischrinder gewinnen und kryokonservieren. Es wird als die einzige derzeit gängige Methode beschrieben, Embryonen zu erhalten und erfolgreich einzusetzen, die qualitativ ähnlich den Embryonen aus MOET-Programmen sind. Dieses Verfahren ist auf die Anwendung am Schaf begrenzt und erfordert eine spezielle chirurgische Expertise. Die Notwendigkeit, qualitativ hochwertige Embryonen unter kompliziertem Aufwand zu produzieren, beschränken dieses Einsatzgebiet zur Embryoproduktion für wissenschaftliche bzw. für kommerzielle Zwecke im Einzugsgebiet des Labors (Galli et al., 2003; Greve et al., 1987, 1993; Farin und Farin, 1995; Holm et al., 2002; Thompson 1997).

Die bereits im ersten Projektjahr begonnenen Untersuchungen zur temporären *In vivo*-Kultur *in vitro*-produzierter Rinderembryonen wurden im zweiten Projektjahr fortgesetzt. Die im ersten Bericht beschriebenen Übertragungen von Gameten (GIFT) und Zygoten (ZIFT) wurden im zweiten Projektjahr weitergeführt. Im Mittelpunkt der Arbeiten standen dabei die Etablierung eines verlässlichen Zeitschemas, nach dem Embryonen zu einem bestimmten Zeitpunkt auf „Zwischenempfänger“ übertragen und wiedergewonnen werden können.

### 2.4.2.2 Material und Methode

Mittels transvaginaler Endoskopie wurden die Methoden GIFT (Gametes Intra-Fallopian Transfer) und ZIFT (Zygotes Intra-Fallopian Transfer) sowie der Transfer *in vitro*-weiterentwickelter Embryonalstadien durchgeführt (Methodik siehe Offert/Appendix VII).

Kurzbeschreibung:

Die Eileiter-*In vivo*-Kultur von Rinderembryonen ist ein Vorgang, bei dem *in vitro*-produzierte Embryonen oder Gameten in den Eileiter zyklussynchroner Empfängertiere (*In vivo*-Kultur-Tiere, IVK-Tiere) für 3-7 Tage zwischenkultiviert werden, um diese Embryonen am Tag 7 oder 8 (in speziellen Fragestellungen auch später) der Embryonalentwicklung nach dem Zeitschema, das in Abbildung 36 wiedergegeben ist, wiederzugewinnen.

Die *In vivo*-Kultur ist methodisch betrachtet eine Kombination aus endoskopischem Eileitertransfer und der nach erfolgter *In vivo*-Kultur endoskopischen Eileiterspülung (Spülung des Eileiters mit nachfolgender Uterusspülung). Zeitlich betrachtet sind für den endoskopischen Transfer nur wenige Minuten anzusetzen und die Spülung läuft ebenfalls im zeitlichen Rahmen einer konventionellen Tag 7-Spülung ab. Sowohl der Transfer als auch die Spülung sind aufgrund ihrer einfachen Anwendung auch

ambulant durchzuführen. Die transvaginale Endoskopie ist mittlerweile zu einem standardisierten Verfahren entwickelt worden, welches durch minimal invasives Vorgehen erlaubt, über eine ca. 3 mm dünne Gewebeschicht zwischen Vagina und Bauchhöhle ein speziell entwickeltes Endoskop bis unmittelbar vor den Reproduktionsorganen zu positionieren. Unter rektaler Kontrolle werden Uterus, Eileiter und Ovarien leicht angehoben, um über ein an das Endoskop angeschlossenes Kamera-Monitorssystem die Organe beurteilen und den Transfer bzw. die Spülung durchführen zu können.

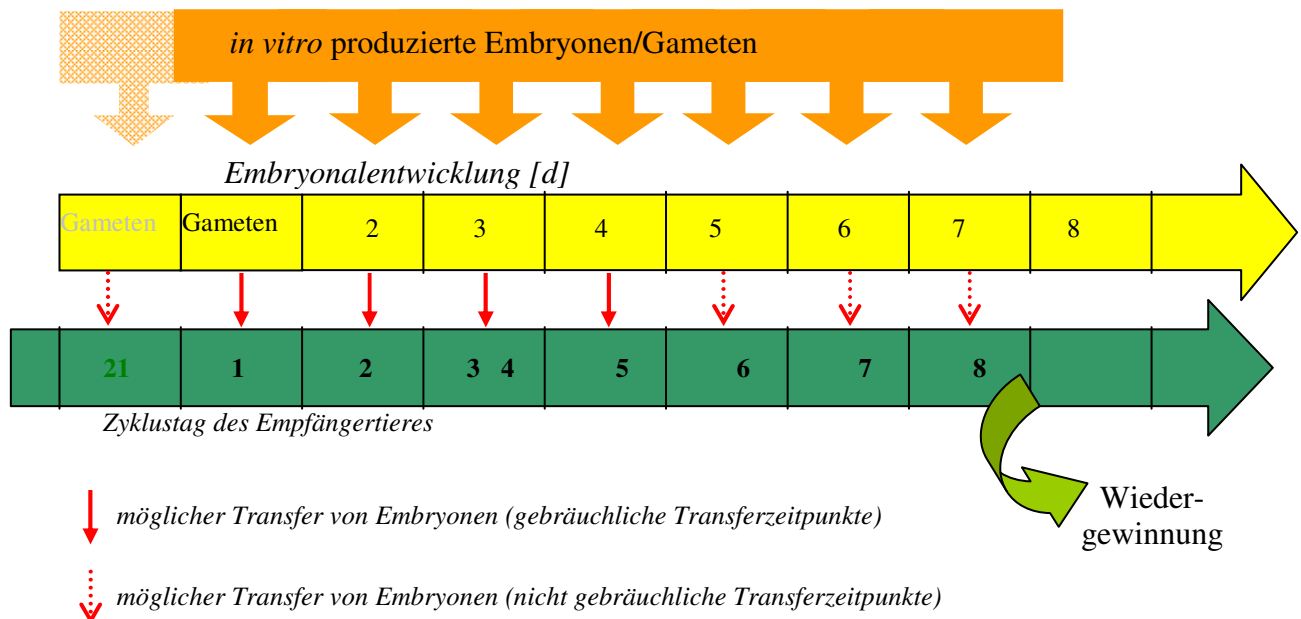


Abbildung 36: Zeitschema zur *In vivo*-Kultur – Kombination der *In vitro*-Phase mit der *In vivo*-Entwicklung

Insgesamt wurden für diese *In vivo*-Kulturuntersuchungen 81 temporäre Empfänger der Rasse Fleckvieh aus der Herde am IFA-Tulln/Abteilung BT entsprechend vorhandener regelmäßig erscheinender Zyklusaktivitäten ausselektiert. Für die Auswertung waren folgende Angaben von besonderer Bedeutung:

1. Alter der Embryonen
2. Zeitpunkt der Übertragung zyklussynchronisierter Rinder
3. Dauer der *In vivo*-Kultur

#### 2.4.2.3 Ergebnisse

Es wurden insgesamt 81 Tieren als Rezipienten zur *In vivo*-Kultur *in vitro*-produzierter Rinderembryonen verwendet. 3170 Embryonen wurden übertragen, von denen 1241 (39%) wiedergewonnen werden konnten. 326 Embryonen (10,3%) hatten sich zu den für den Spülzeitpunkt erwarteten Stadien weiterentwickelt.

Der Transfer der Embryonen erfolgte vom Tag 0 (Zygotenstadium) bis zum Tag 4 (spätes 16-Zell-Stadium), die Spülung der Embryonen erfolgte zwischen Tag 2 (4- bis 8-Zell-Stadium) und Tag 7 der Embryonalentwicklung (Morula- bzw.

Blastozystenstadium). Dementsprechend ergab sich eine Kulturdauer von 1 bis 6 Tagen.

Drei Hauptparameter wurden zur Charakterisierung des IVK-Zeitschemas herangezogen: (a) Das Alter der Embryonen zum Zeitpunkt des Transfers, (b) die Kulturdauer *in vivo* sowie (c) das Alter der Embryonen zum Zeitpunkt der Spülung.

Aus der Abbildung 37 ist ersichtlich, dass sich im Zweizell- und Vierzellstadium übertragene Embryonen besser weiterentwickeln als frühere oder spätere Stadien, auch wenn die Wiederfindungsrate für spätere Stadien höher erscheint, war die Gesamteffizienz bei den Embryonen am Tag 2 am besten.

Die Kulturdauer hat keinerlei Effekte auf die Weiterentwicklung oder die Wiederfindungsrate. Aus Abbildung 38 ist ersichtlich, dass beide Parameter nicht mit der Zeit korrelieren. Statistisch betrachtet ergab sich auch kein Zusammenhang zwischen der Weiterentwicklungsrate und dem Alter der Embryonen zum Zeitpunkt der Spülung (Abbildung 39).

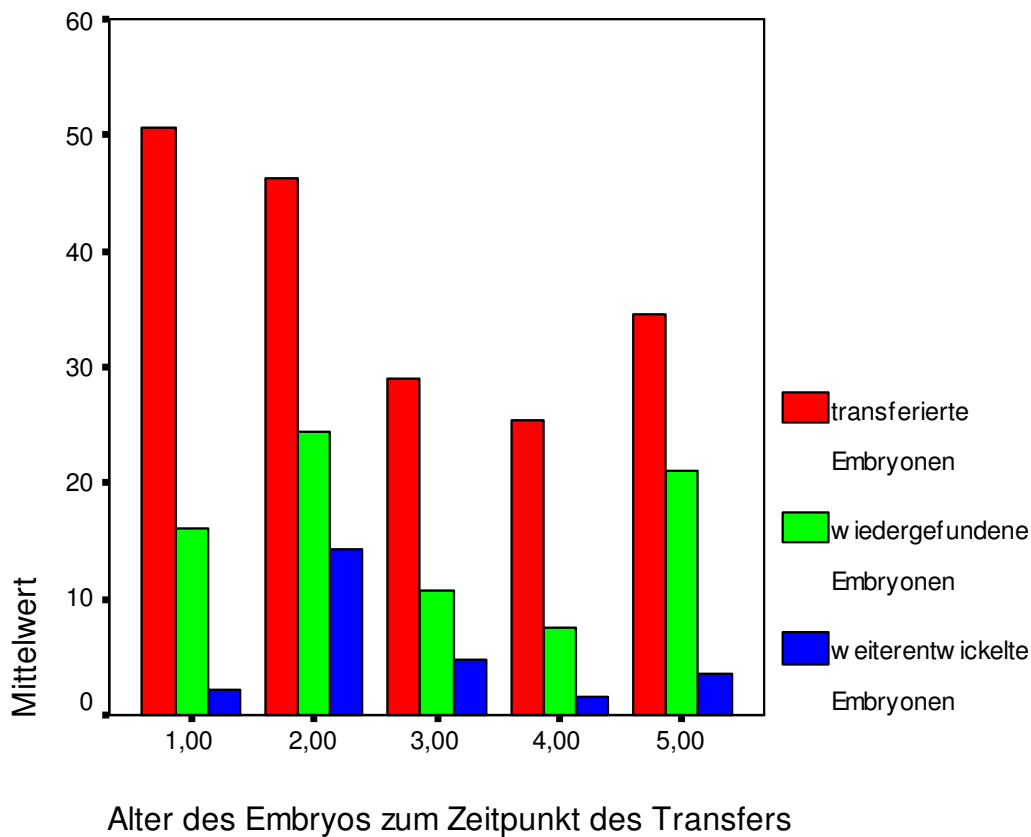


Abbildung 37: IVK-Spülggebnisse gruppiert nach dem Alter der transferierten Stadien [d]

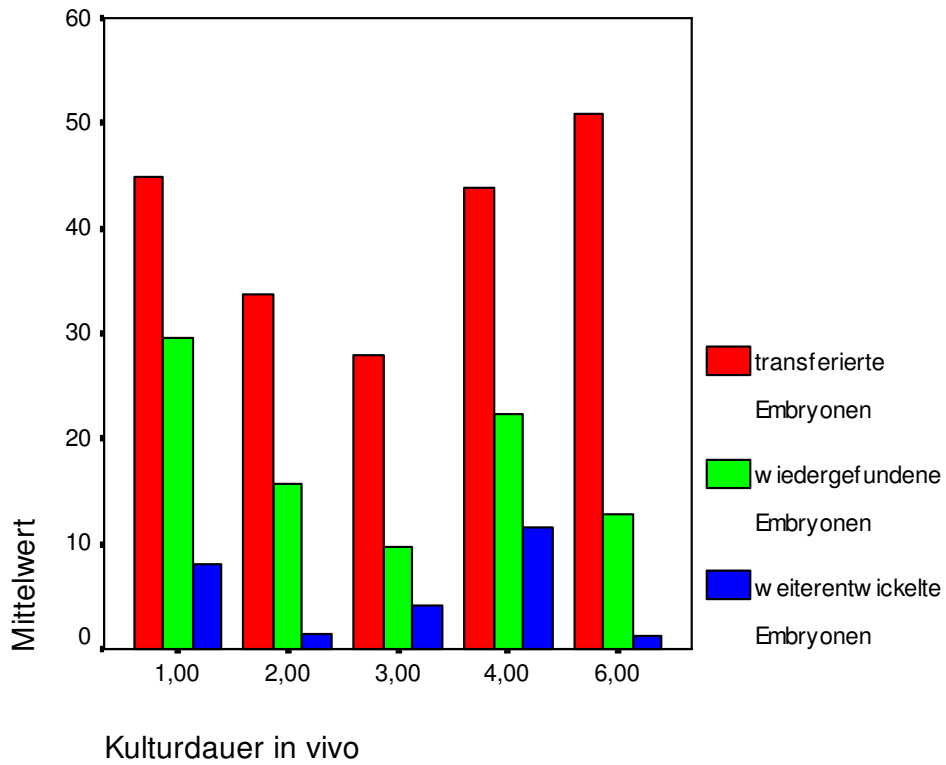


Abbildung 38: IVK-Spülgelbteergebnisse gruppiert nach der Zeitdauer der IVK [d]

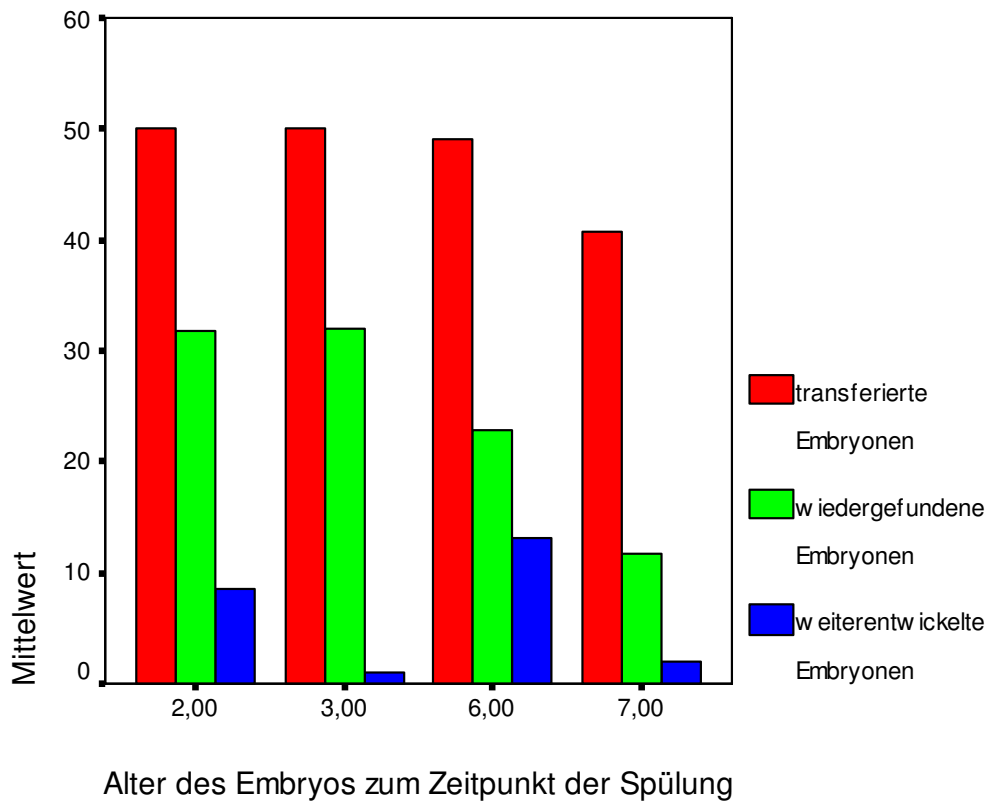


Abbildung 39: IVK-Spülgelbteergebnisse gruppiert nach dem Alter der gespülten Stadien [d]

Die Berücksichtigung aller genannten Parameter ergab, dass sich prinzipiell alle tubalen Stadien für eine IVK eignen, besonders jedoch die Embryonen früher Phasen. Um schlechtere Spülergebnisse für fortgeschrittenere Stadien (expandierte Blastozysten) zu vermeiden, empfiehlt es sich, die IVK schon vor diesem Stadium zu beenden.

Die vorliegenden Ergebnisse aus den IVK-Versuchen ergeben sich aus Daten von streng selektierten Gruppen. Insgesamt wurde jedoch ein sehr heterogenes Bild der *In vivo*-Kultivierung beobachtet. Während bei einigen Tieren wenige bis keine Embryonen wiedergewonnen werden konnten bzw. sich von den wiedergewonnenen Komplexen nur vereinzelt Embryonen im Morula- bzw. Blastozystestadium zeigten, wurden bei anderen Tieren nahezu alle transferierten Embryonen wiedergefunden. Auffällig war außerdem, dass die ovulierten Eizellen aus der Empfängersynchronisation meist im Spülmedium gefunden wurden. Eine detaillierte Aufstellung der IVK-Vorversuchsergebnisse bietet Tabelle 29.

#### 2.4.2.4 Diskussion

Ziel dieses Untersuchungsabschnittes war es, mit den ersten *In vivo*-Versuchen aus dem ersten Projektjahr einen Vorversuchsrahmen für die *In vivo*-Kulturbedingungen aufzustellen, um aus diesen ersten Ergebnissen weitere gezielte Aktionen ansetzen zu können. Obwohl über alle transferierten Stadien hinweg ein sehr heterogenes Ergebnis gewonnen wurde, lässt doch prinzipiell ein wesentlicher Teil der sehr guten Resultate auf eine potentielle Nutzung des Eileiters zur Embryonalentwicklung schließen. Jährlich werden ca. 700.000 Embryonen im Morula- bzw. Blastozystestadium per Superovulation und *In vitro*-Produktion gewonnen, von denen ungefähr 500.000 auf Rezipienten übertragen werden (Thibier, 2002). Diese Übertragungen von Embryonen in die Gebärmutter hatten zur Folge, dass die entsprechenden Techniken, Medien und Protokolle sehr verfeinert werden konnten. Diese Zahl verdeutlicht zum einen die Notwendigkeit, züchterische Rahmenbedingungen mittels Embryotransfer erfüllen zu können. Auf der anderen Seite stellen diese Zahlen u.a. ein sehr hohes Potential an gewonnenen Embryonen aus der Gebärmutter dar, über deren unmittelbare Entwicklung bis zur Morula und Blastozyste vor der Migration in die Gebärmutter nur sehr wenig bekannt ist. Eine essentielle Information, die in diesem wichtigen Zusammenhang fehlt, ist die zum Teil sehr stark schwankende Effizienz der Embryogewinnung als Maß und Ausdruck komplizierter aufeinanderfolgender reproduktionsphysiologischer Prozesse, die in vielen Bereichen gestört sind. Konsequenterweise ist damit auch die Weiterentwicklung der Embryonen unterbrochen, was sich durch erhebliche Einbußen in der Zahl für die Superovulation tauglicher Tiere, der Eierstocksreaktion der Tiere auf die Hormone, der Anzahl ovulierter Eizellen sowie den weiteren Befruchtungs-, Weiterentwicklungs- und Migrationsereignissen negativ niederschlägt; d.h. die Summe einer am Ende gewonnenen Zahl an Embryonen beinhaltet immer einen erheblichen Verlust im Vorfeld und gleicht somit symbolisch betrachtet der Spitze eines auf den Kopf gestellten Eisbergs.



Tabelle 29: Ergebnisse der IVK-Vorversuche. Zusammenfassung der *In vivo*-Kultur *in vitro*-produzierter Embryonen

Embryoalter (Transfer) [d]	Kulturdauer <i>in vivo</i> [d]	Embryoalter (Spülung) [d]		Anzahl transferierte Embryonen	Anzahl wieder- gefundene Embryonen	Anzahl weiter- entwickelte Embryonen
0	1	7	n	2	2	2
			Mittelwert	34,5	21	3,5
			Summe	69,00	42	7
	7	7	n		6	6
			Mittelwert		17	3,3
			Summe		102	20
1	1	2	n	4	4	4
			Mittelwert	50	34	10,5
			Summe	200	136	42
	2	2	n	1	1	1
			Summe	50	23	1
			3	n	1	1
	Summe	50		41	2	
	4	3	n	1	1	1
			Summe	50	23	0
	6	7	n	34	34	34
			Mittelwert	50,8	12,98	1,2
			Summe	1727	439	42
2	4	6	n	7	7	7
			Mittelwert	50	25,4	15
			Summe	350	178	105
	7	7	n	1	1	1
			Summe	20	18	9
			3	3	6	n
Mittelwert	47,2	18,2				10
Summe	189	73				40
7	7	n		12	12	12
		Mittelwert		21,4	6,7	2,1
		Summe		257	81	25
4	7	7	n	3	3	3
			Mittelwert	35,3	16,7	8,7
			Summe	106	50	26
4	2	7	n	4	5	5
			Mittelwert	25,5	7	1,4
			Summe	102	35	7
Gesamt			n	81	81	81
			Mittelwert	42,8	15,3	4,0
			Summe	3170	1241	326

Wie aus mehreren Kontakten zu Arbeitsgruppen bekannt wurde, gestaltet sich der chirurgische Transfer von Embryonen in die Eileiter als besonders schwierig, da die Wiederfindungsrate aus der Gebärmutter am Tag 7 nahezu ohne jeden Erfolg blieb. Dieser Aussage stehen wiederum die Resultate aus den endoskopischen Spülungen gegenüber, die mit einer hohen Findungsrate auf einen exakt terminierten Migrations- und Weiterentwicklungsprozess im Eileiter hinweisen (sofern die Befruchtung erfolgreich ablief).

Daher ist diesen Voruntersuchungen zu entnehmen, dass generell eine erfolgreiche *In vivo*-Kultur möglich ist, es jedoch weiterer und tiefgreifender Untersuchungen bedarf, um Einblicke in die prinzipiellen „Mechanismen des Eileiters“ zu erhalten.

#### 2.4.2.5 Literatur

Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G (2003): Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59,599-616.

Greve T, Xu KP, Callesen H, Hyttel P (1987): *In vivo* development of *in vitro* fertilized bovine oocytes matured *in vivo* versus *in vitro*. *Journal of in vitro Fertilization and Embryo Transfer* 4,281-285.

Greve T, Avery B, Callesen H (1993): Viability of *in vivo* and *in vitro*-produced bovine embryos. *Reprod Dom Anim* 28,164-169.

Farin PW, Farin CE (1995): Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: survival and fetal development. *Biol Reprod* 52,676-682.

Holm P, Booth PJ, Callesen H (2002): Kinetics of early *in vitro* development of bovine *in vivo*- and *in vitro*-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction* 123,553-565.

Thibier M (2002): A contrasted year for the world activity of the animal embryo transfer industry- A report from the IETS Data Retrieval Committee. *Embryo Transfer Newsletter* 20(4),13-19.

Thompson JG (1997): Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod Fertil Dev* 9,341-354.

### 2.4.3 ***In vivo*-Kultur von *in vitro*-produzierten Embryonen im homologen Eileiter: eine technisch-methodische Adaptierung**

#### 2.4.3.1 **Einleitung**

Bereits zu Beginn der IVP-Entwicklung wurde der heterologe Eileiter (Schaf, Kaninchen) zur Kultivierung von IVM/IVF-Embryonen genützt, um eine von externen sowie *in vitro*-bedingten Faktoren unabhängige Entwicklung zu gewährleisten. Neben dem derzeit bestehenden einzigen Routineverfahren zur Gewinnung von Embryonen aus *In vivo*-Kultur im ligierten Schafeileiter (Galli et al., 2001) hat sich bis dato keine adäquate Technik zur Nutzung des homologen Rindereileiters als „temporärer Inkubator“ durchgesetzt. Der bislang zwar angestrebte, aber dennoch sehr komplizierte und aufwändige Zugang zum Rindereileiter für die *In vivo*-Kultur präimplantativer Stadien war chirurgischen Eingriffen vorbehalten. Die verwendeten Systeme konnten eine Beeinträchtigung der Eileitermotorik nicht ausschließen (Schmidt et al., 1997), und es bedurfte zudem einer entsprechenden postoperativen Nachversorgung. Reichenbach et al. (1994) verwendet für laparoskopische Follikelpunktionen einen transvaginalen Zugang zum Ovar. Besenfelder und Brem (1998) entwickelten über diese transvaginale endoskopische Verbindung den Zugang zum Rindereileiter und legten damit den Grundstein für eine mögliche Routineanwendung.

Die Untersuchungen zur routinemäßigen Etablierung der *In vivo*-Kultur *in vitro*-produzierter Embryonen im Rindereileiter beinhalten die Berücksichtigung verschiedener Parameter, die alle Aufschluss darüber geben sollen, in welcher Art und Weise der Transfer methodisch verbessert werden kann, um einen Entwicklungs- und Migrationsanschluss der Embryonen an die physiologische Eileiterdynamik zu erhalten.

Von besonderer Bedeutung dabei ist, dass zum Zeitpunkt von Ovulation, Befruchtung und Entwicklung des Embryos im Eileiter physiologisch koordinierte und ineinandergreifende Prozesse ablaufen, die durch physiomechanische und entwicklungs-dynamische Besonderheiten gekennzeichnet sind. Allein die Topographie des Eileiters lässt ein komplexes System erkennen, das sowohl nach spontaner Brunst wie auch nach hormoneller Superstimulation die Eizellen im Cumulus-Oozyten-Komplex und in der Follikelflüssigkeit aus dem Follikel im Eileiter aufnimmt und hier zeit- und ortsgerechte Entwicklungsvorgänge stattfinden. Der Transfer von frühembryonalen Stadien in den Rindereileiter bedarf daher der Berücksichtigung mannigfaltiger Voraussetzungen, um erfolgreich Embryonen zur temporären Kultur transferieren zu können.

Die Auswahl der zu transferierenden Stadien berücksichtigt verschiedene Parameter, die Aufschluss darüber geben, in welcher Art und Weise der Transfer methodisch verbessert werden kann, um einen Entwicklungs- und Migrationsanschluss der Embryonen an die physiologische Eileiterdynamik zu erhalten.

Nach der Ovulation wird die Eizelle mittels zilientrager Zellen der Eileiterfimbrien in das *Infundibulum* geleitet. Innerhalb der nächsten 8 – 10 Stunden wird die Eizelle durch die *Ampulla* bis an den Übergang zum *Isthmus* transportiert, wohingegen diese Transportdauer bei Kaninchen mit 6 - 15 Minuten und bei Schweinen mit 30 - 45 Minuten angegeben wird (El-Banna und Hafez, 1970). Crisman et al. (1980) gaben die Geschwindigkeit der Eizellbewegung durch die *Ampulla* mit 0,23 cm/Stunde an

und fanden einen linearen Zusammenhang zwischen Lokalisation der Eizelle im Eileiter und der Zeit nach der Ovulation. Die Geschwindigkeit der Eizellbewegung durch die *Ampulla* erhöhte sich auf 0,42 cm/Stunde nach Applikation vom Progesteron; Östradiol hingegen zeigte keinen Effekt (Crisman und McDonald, 1980). Der Transportmechanismus der Eizellen durch den Eileiter scheint noch nicht vollständig geklärt. Der Fluss der Eileiterflüssigkeit und die Kontraktionen der Muskulatur zum Ovulationszeitpunkt wirken in Bewegungsrichtung der Spermien, also von der Gebärmutter weg in Richtung *Infundibulum* und somit entgegen dem Eizelltransport. Daraus wurde abgeleitet, dass die Eizelle im Eileiter aktiv von den Kinozilien, die Kontakt mit der großen, rauen Oberfläche des Cumulus-Oozyten-Komplexes haben, weitergeleitet wird.

Ziel dieses Projektabschnittes war es, *in vitro*-produzierte Embryonen unter angepassten, optimalen Bedingungen in den Eileiter Zyklus-synchronisierter Rinder so zu übertragen, dass eine effiziente Findungsrate mit einer optimierten Entwicklungsrate der Embryonen kombiniert werden kann.

#### 2.4.3.2 Material und Methode

##### Empfängertiere

Insgesamt standen 69 Rinder der Rasse Fleckvieh für diesen Versuch zur Verfügung. Allen Tiere wurden gemäß des Standardverfahrens vorselektiert und den jeweiligen Gruppen zugeordnet (siehe Tabelle 30) Die Vorbereitung der Empfängertiere sowie die Durchführungen der *In vivo*-Kultur entsprechen ebenfalls dem Routineverfahren (siehe zuvor beschriebene Versuche).

Tabelle 30: Tierverteilung auf die jeweiligen Versuchsgruppen

Gruppen	Gruppengröße
Transfermedium mit Hyaluronsäure supplementiert	20
Zygoten, die von Cumuluszellen befreit wurden	11
Zygoten mit Cumuluszellen	15
“Gamete Intra-Fallopian Transfer“- GIFT	11
Embryonen, in Alginat eingebettet	12
Gesamt	69

## Technisch – methodische Adaptionen des Transfersystems

### a.) Kapillarenform

Der endoskopische Transfer von Embryonen sowie die Spülung von Embryonen aus dem Eileiter *per se* sind mittlerweile etablierte Verfahren und stellen eines der geeignetsten Verfahren auf minimal invasiver Ebene dar, bei dem der potentielle Entwicklungseinfluss des Eileiters auf die Embryonen in der homologen Spezies genützt werden kann (Besenfelder et al., 2001; Havlicek et al., 1999). Die Weiterentwicklung bestehender Transfersysteme bestand in einer Adaption der Transferkapillare an die anatomisch–morphologischen Strukturen der Eileiterampulle. Es wurden in Vorversuchen Modifikationen der Transferkapillare angestellt, um einerseits Irritationen physiomechanischer Mechanismen, welche für die Migration im Eileiter von essenzieller Bedeutung sind, zu minimieren, andererseits aber ein tiefes, zielgerichtetes Absetzen der transfertauglichen Komplexe zu gewährleisten. Die Anatomie des Eileiters steht dabei im Mittelpunkt des Interesses, um technisch adaptierte Vorgänge in Einklang mit funktionell-anatomischen Voraussetzungen zu bringen. Die Mucosa des Eileiters formt längsverlaufende primäre, sekundäre und tertiäre Schleimhautfalten. Das von ihr begrenzte Lumen ist sehr eng, so dass die Cumuluszellen der ovulierten Eizelle und auch die Embryonen in engem Kontakt mit ihr stehen (siehe Abbildung 40). Um hier ein schonendes Transferverfahren zu ermöglichen, wurde eine 90 mm lange Glaskapillare (Transferpettor Caps, 100-200 µl, Fa Brandt Wertheim Deutschland) an den Durchmesser der Eileiterampulle mit 2,75 mm adaptiert, über einer Flamme abgerundet und um etwas mehr als 90° an ihrem vorderen Ende gebogen. An der Basis der Biegung wurde anschließend eine gegengerichtete Krümmung angeschmolzen, so dass eine bischofsstabähnliche Form der Glaskapillare erreicht wurde (Abbildung 41). Diese spezielle Gestaltung des Transfersystems erlaubte ein minimal invasives, aber zugleich maximal tiefes und schonendes Absetzen der Embryonen in der Eileiterampulle.

### b.) Silikonisieren des Transfersystems

Cumulus-Oozyten-Komplexe weisen starke Adhäsionseigenschaften auf, die durch die proteoglykanhaltige Organisation der extrazellulären Cumulus-Matrix bedingt ist und für den Transport im Eileiter wesentlich sind. Diese Haftkräfte führen zur Adhäsion der Transferstadien an der mikroporösen Glaskapillarenwand des Transfersystems. Die verwendeten Transferkapillaren wurden deshalb mit Dimethyldichlorsilicium beschichtet, um eine mikroskopisch glatte Oberfläche, an der es zu keiner Adhäsion kommt, zu schaffen. Dazu wurden die Kapillaren mit Alkohol und Aceton entfettet und anschließend 12 Stunden in eine Silikon-Chloroform-Lösung (5% Dimethyldichlorsilicium + 95% Chloroform) eingelegt. Die Beschichtung wurde bei 240°C für 4 Stunden eingebrannt.

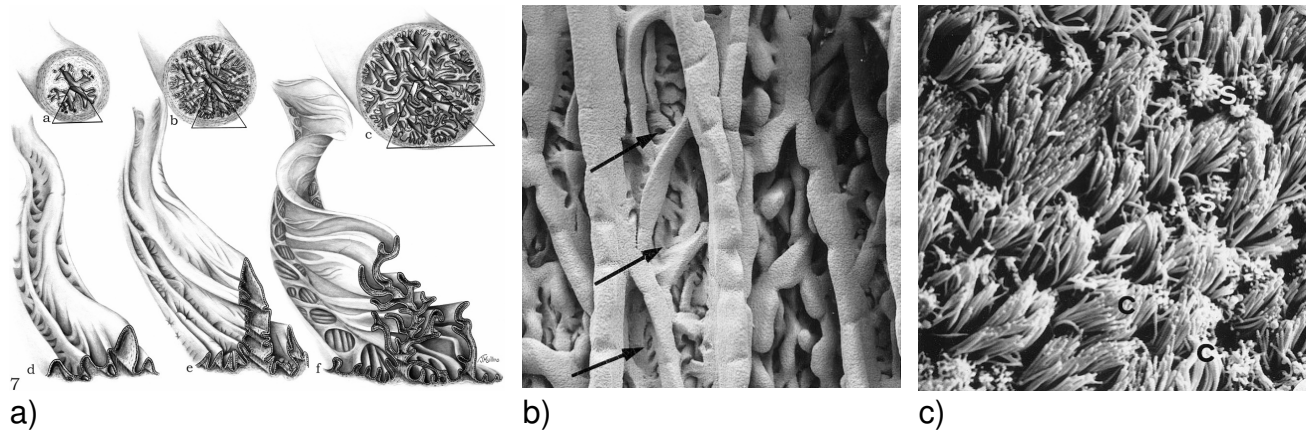


Abbildung 40: Anatomisch-histologischer Aufbau des Eileiters - Schematische Darstellung der Eileiterschleimhaut sowie histologische Darstellungen (b ampullar-isthmischer Übergang, c Infundibulum), nach Yániz et al., 2000

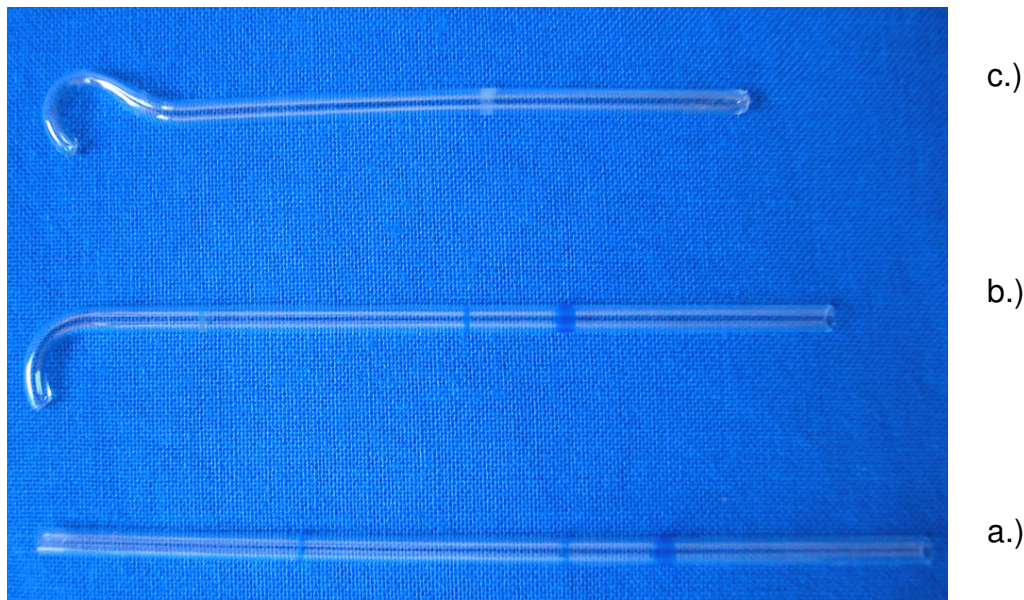


Abbildung 41: Glaskapillare zur Insertion in den Eileiter: a.) Transferpettor Caps, b.) um 90° gebogene Kapillare, c.) bischofsstabähnliche Form des modifizierten Transfersystems

### Strukturell-funktionelle Betrachtungen frühembryonalen Stadien

Es wurden, unter Erwägung strukturell-funktioneller Eigenschaften, folgende Vergleichsgruppen ausgewählt:

Gruppe "Hyaluronsäure": In Anlehnung an die chemisch-physiologische Zusammensetzung der extrazellulären Matrix von Cumulus-Oozyten-Komplexen wurde dem Transfermedium 6 mg/ml Hyaluronsäure zugesetzt. Im expandierten Cumulus ist Hyaluronsäure in einer Konzentration von 0,5 – 1 mg/ml die vorherrschende Komponente, die dem Cumuluskomplex viskös-elastische Eigenschaften verleiht (Zhuo und Kimata, 2001). Die Aufnahme und der Transport

der ovulierten COC durch den Eileiter stellen einen komplexen Prozess dar, welcher auf dem Zusammenspiel von Zilienbewegungen und Adhäsionskräften beruht. Die Adhäsion ereignet sich spezifisch zwischen granulären und filamentären Elementen der Matrix mit kronenförmig angeordneten Rezeptoren an der Zilienspitze (Lam et al., 2000). Durch die Beimengung von Hyaluronsäure in das Transfermedium wurde versucht, physiologisch-strukturelle Eigenschaften der ovulierten Cumulus-Oozyten-Komplexe zu imitieren. In dieser Gruppe wurden die nach der *In vitro*-Fertilisation (IVF) noch an der Eizelle haftenden Cumuluszellen mechanisch entfernt. Die denudierten Zygoten wurden in das hyaluronsäurehaltige Transfermedium (HepesTL-SOF) verbracht. Im weiteren war ein Zusammenhalt der transferierten Komplexe im hyaluronsäurehaltige Medium für die unmittelbar dem Transfer folgende Zeit vorgesehen, um ein (vorzeitiges) Abfließen (z.B. Reflux) der Embryonen zu verhindern.

Gruppe „Zygoten ohne Cumulus“: Im Gegensatz zur Gruppe „Zygoten mit Cumulus“ wurden die expandierten Cumulusstrukturen im Anschluss an die Fertilisation beseitigt. Die Ergebnisse dieser Gruppe sollten Aufschluss über die Bedeutung der Cumuluszellen für den Weitertransport der übertragenen Stadien geben.

Gruppe „Zygoten mit Cumulus“: In dieser Versuchsgruppe wurde der (expandierte) Cumulus nach der Befruchtung nicht entfernt, um die für den Eizelltransport durch den Eileiter essenziellen Hafteigenschaften zu gewährleisten (siehe Abbildung 46).

Gruppe „GIFT“: *In vitro*-murierte Cumulus-Oozyten-Komplexe wurde unmittelbar vor dem Transfer zusammen in der Transferkapillare aufgenommen. Pro Transfer wurden 2 Mio Spermien in die Kapillare überführt.

Gruppe „Alginate“: Der Flüssigkeitsstrom im Eileiter ist in der periovulatorischen Zeitspanne retrograd dem Eizelltransport in Richtung *Infundibulum* gerichtet. Das Volumen der Eileiterflüssigkeit ändert sich im Verlauf des Sexualzyklus und ist von Änderungen der Östrogen- und Progesteronkonzentration im Blut abhängig. Durch eine in den Eileiter eingeführte Kanüle wurde über mehrere Zyklen hindurch Eileiterflüssigkeit gewonnen. Dabei wurde festgestellt, dass es zum Zeitpunkt der Brunst, d.h. unter Östrogendominanz, ein Sekretionsmaximum gibt, welches 1,2 ml/24 h beträgt. Dagegen ist die Menge der gewonnenen Flüssigkeit im Diöstrus (Tag 2 - 5: 0,4 ml/24 h), also bei beginnender Progesteronsekretion, deutlich erniedrigt (Kilian et al., 1987; Killian et al., 1989; Roberts et al., 1975; Stanke et al., 1974). Dieser retrograde Flüssigkeitsstrom könnte in den ersten Tagen *post ovulationem* zum Ausschwemmen der denudierten Zygoten in die freie Bauchhöhle führen.

Alginate, ein aus Seetang gewonnenes Polysaccharid, ist ein semipermeables und biologisch abbaubares Substrat, welches in einer netzartigen Struktur – ähnlich dem expandiertem Cumuluskomplex – organisiert ist. Zahlreiche Arbeiten belegen, dass Alginate die frühembryonale Weiterentwicklung nicht nachteilig beeinflusst (Adaniya et al., 1993; Cosby und Dukelow, 1990; Yaniz et al., 2002). Alginate wird innerhalb von 48 – 72 Stunden wieder abgebaut. Das Einbetten in Alginate ermöglicht es, eine dreidimensional-vernetzte Hülle zu schaffen, welche entgegen der runden Form des im Durchmesser kleineren Embryos dem retrograden Strom widersteht.

Die Embryonen wurden nach der Befruchtung von den Cumuluszellen befreit und in 1,5%-iges Natrium-Alginate überführt. Das Aushärten des Mikrogels erfolgte in

1,5%-igem Kalziumchlorid. Die hochviskösen Polymerformen (siehe Abbildung 45) wurden mit einer gezogenen Glaspipette aufgenommen.

Das Befüllen der gebogenen Transferkapillare erfolgte über die vordere Öffnung (Abbildung 42), um die Kapillare mit den Komplexen so dicht wie möglich zu beladen. Mit einem Minimum an Mediumvolumen wurden dann die Komplexe im Eileiter abgesetzt.

Die Transfers und die Rückgewinnung der jeweiligen Stadien wurden in den entsprechenden Gruppen, wie in dem unter Punkt 2.4.1.2 vorgestellten Verfahren, durchgeführt.

Am Tag 7 wurden die wiedergefundenen Embryonen hinsichtlich ihres Entwicklungsstadiums direkt nach der Spülung beurteilt. Die gewonnenen Embryonen wurden zusätzlich für 24 Stunden einer *In vitro-Kultur* (IVK) unterzogen.

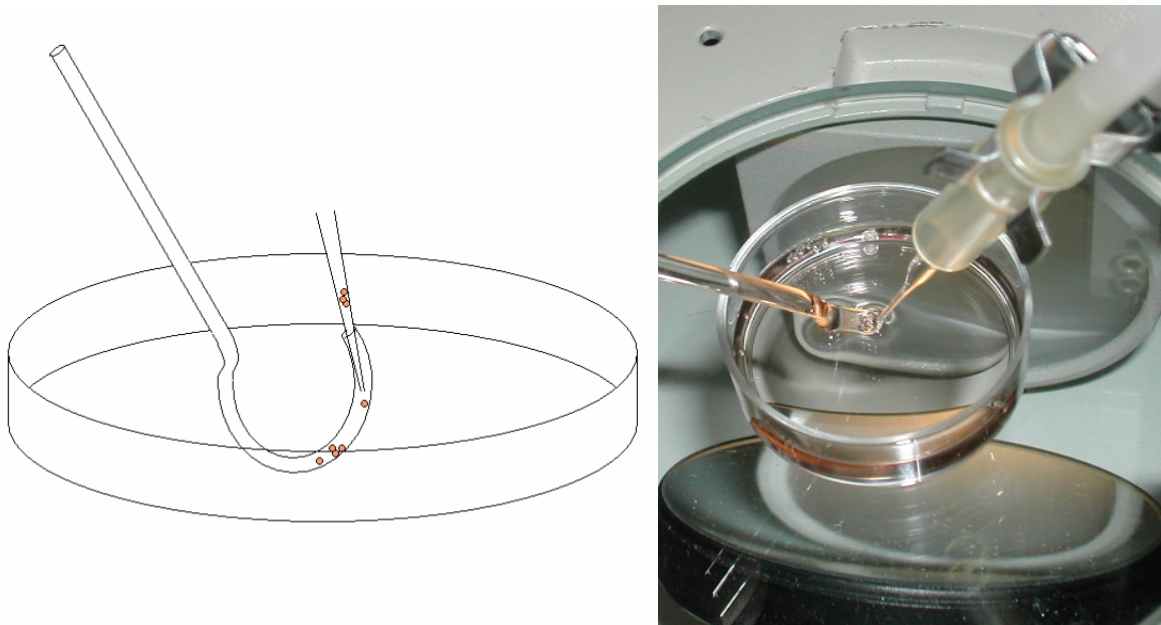


Abbildung 42: Befüllen der Transferkapillare: Schematische Darstellung und Darstellung unter dem Mikroskop

### 2.4.3.3 Ergebnisse

Es wurden insgesamt 2619 frühembryonale Entwicklungsstadien bei 69 *In vivo*-Kulturterminen transferiert. Von diesen transferierten Stadien konnten 913 Objekte am Tag 7 zurückgewonnen werden. Das ergibt eine Wiederfindungsrate von 34,9%. Von den gespülten Stadien waren am Tag der Spülung 104 Blastozysten. Daraus errechnet sich eine Weiterentwicklungsrate von 11,4%. Im Anschluss an die 24-stündige IVK erhöhte sich die Blastozystenanzahl auf 150, was einer Blastozystenrate von 16,4% entspricht. Diese Gewinnungsraten sind jedoch sehr deutlich von den in den verschiedenen Gruppen durchgeführten Transfers abhängig. Insgesamt wurde die Findungsrate durch alle Versuchsgruppen signifikant beeinflusst, die durch Modifikationen der Eizell- oder Embryomorphologie oder der Viskosität des Transfermediums gegeben war (siehe Tabelle 31). In der „Alginat“-



Gruppe und in der „GIFT“-Gruppe waren die Findungsraten mit 70,5% und 63,1% die höchsten aller Versuchsgruppen und unterschieden sich signifikant von den anderen Gruppen ( $p < 0,001$ ). Die Gruppen „Zygoten mit Cumulus“ (56,1%), „Zygoten ohne Cumulus“ (29,6%) und „Hyaluronsäure“ (12,9%) lagen dementsprechend deutlich darunter. Der Unterschied der Gruppe mit deutlich schlechteren Findungsraten untereinander war ebenfalls signifikant ( $p < 0,001$ ). Der Transfer von maturierten Cumulus-Oozyten-Komplexen mit Spermien (GIFT) ergab zwar eine geringfügig bessere Findungsrate als der Transfer von Zygoten mit „Rest“-Cumulus nach Befruchtung bzw. resultierte in einer etwas schlechteren Findungsrate gegenüber den in Alginat eingebetteten Embryonen, statistisch betrachtet war aber dieses Ergebnis der „GIFT“-Gruppe nicht signifikant (Abbildung 43).

Die Ergebnisse der embryonalen Weiterentwicklung entsprachen nicht der Verteilung der Findungsraten der einzelnen Versuchsgruppen, d.h. gute Findungsraten beinhalteten nicht gleichzeitig auch eine gute Weiterentwicklung: am Tag 7 konnte ein höherer Anteil ( $p < 0,05$ ;  $\chi^2$ -Test) an weiterentwickelten Embryonen bis zur Blastozyste in der „Hyaluronsäure“-Gruppe (16,3%) und „GIFT“-Gruppe (15,9%) beobachtet werden als in der „Alginat“-Gruppe (7,7%), der Gruppe „Zygoten mit Cumulus“ (8,1%) und „Zygoten ohne Cumulus“ (10,6%).

Nach einem weiteren Kulturtag der gewonnenen Embryonen im Inkubator zeigte sich, dass sich in den verschiedenen Versuchsgruppen weitere Blastozysten entwickelt hatten, die tags zuvor als solches noch nicht zu erkennen waren. Dementsprechend war die Entwicklungsrate am Tag 8 in der „Alginat“-Gruppe im Vergleich zu den „GIFT“- und „Zygoten mit Cumulus“-Gruppen signifikant schlechter (11,0% vs. 20,5% vs. 18,4%;  $p < 0,05$ ;  $\chi^2$ -Test). Die Tag 8 Ergebnisse aus der „Alginat“-Gruppe unterschieden sich jedoch nicht von denen der „Zygoten ohne Cumulus“- (14,3%) und der „Hyaluronsäure“ (17,0%)-Gruppe (Abbildung 44). Der größte Blastozystenzuwachs zwischen Tag 7 und Tag 8 war in der Gruppe der „Zygoten mit Cumulus“ ( $p = 0,002$ ;  $\chi^2$ -Test) zu registrieren, während die anderen Versuchsgruppen diesen Entwicklungsunterschied weniger stark ( $p > 0,05$ ;  $\chi^2$ -Test) erkennen ließen.

Tabelle 31: Spülgelbisse nach *In vivo*-Kultur in den einzelnen Versuchsgruppen

Gruppen	Zygoten/Oozyten			B l a s t o z y s t e n	
	Transfers	Transferiert	Gewonnen	Tag 7	Tag 8
	n	n	n, (%)	n, (%)	n, (%)
Hyaluronsäure	20	1091	141 (12,9) <sup>a</sup>	23 (16,3) <sup>a</sup>	24 (17,0)
Zygoten ohne					
Cumulus	11	544	161 (29,6) <sup>b</sup>	17 (10,6)	23 (14,3)
Zygoten mit Cum.	15	417	234 (56,1) <sup>c</sup>	19 (8,1) <sup>b</sup>	43 (18,4) <sup>a</sup>
GIFT	11	309	195 (63,1) <sup>e</sup>	31 (15,9) <sup>a</sup>	40 (20,5) <sup>a</sup>
Alginat	12	258	182 (70,5) <sup>d</sup>	14 (7,7) <sup>b</sup>	20 (11,0) <sup>b</sup>
Gesamt	69	2619	913 34,9%	104 (11,4)	150 (16,4)

“Hyaluronsäure”: Transfer von Zygoten im Transfermedium, das mit 6 mg/ml Hyaluronsäure angereichert wurde.

“Zygoten ohne Cum.”: Transfer von Zygoten, die zuvor von Cumuluszellen befreit wurden.

“Zygoten mit Cumulus”: Transfer von Zygoten, die noch von Cumuluszellen umgeben waren.

“GIFT”: Transfer von *in vitro*-maturierten Cumulus-Oozyten-Komplexen zusammen mit kapazitierten Spermien.

“Alginat”: Transfer von Zygoten, die zuvor in Alginat eingebettet wurden.

Gewonnene Embryonen: <sup>a-e</sup> Werte der gleichen Spalte mit unterschiedlicher Kennzeichnung unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,001$ ), ausgenommen <sup>c,e</sup>:  $p = 0,067$  und <sup>d,e</sup>:  $p = 0,074$ .

Tag 7 Blastozysten: <sup>a,b</sup> Werte der gleichen Spalte mit unterschiedlicher Kennzeichnung unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ).

Tag 8 Blastozysten: <sup>a,b</sup> Werte der gleichen Spalte mit unterschiedlicher Kennzeichnung unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ).

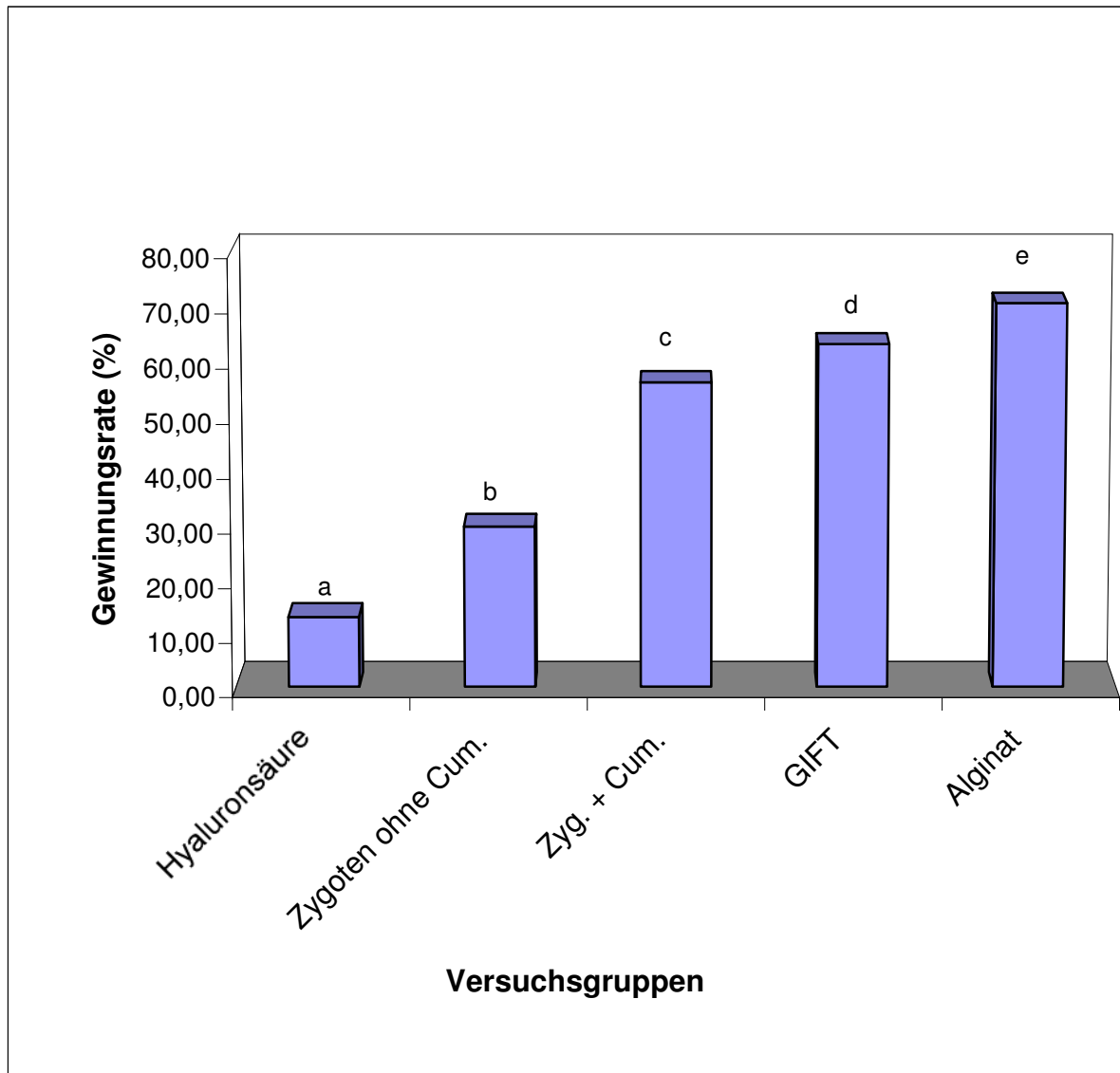


Abbildung 43: Wiederfindungsrate nach *In vivo*-Kultur in den einzelnen Vergleichsgruppen

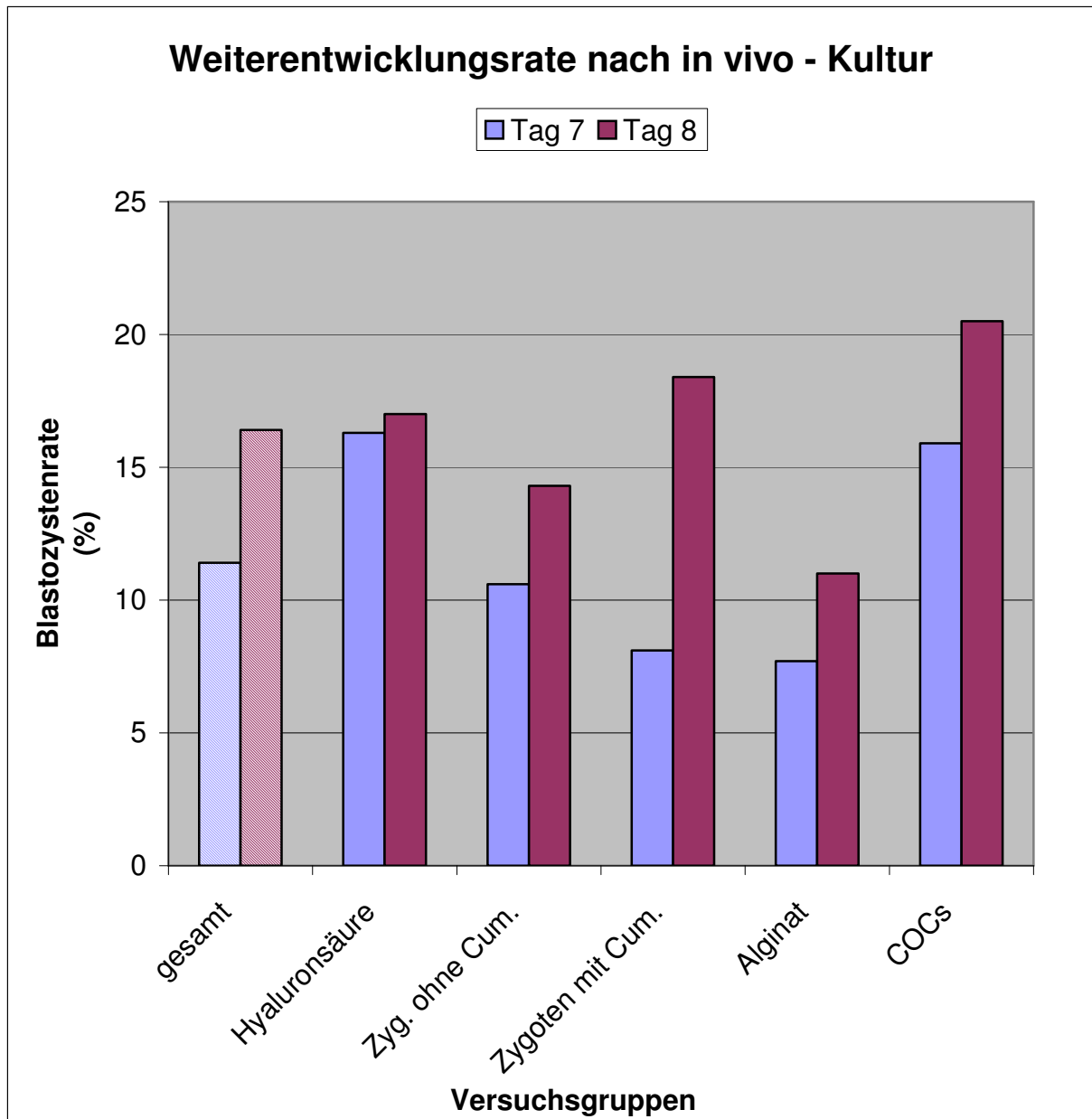


Abbildung 44: Weiterentwicklungsrate am Tag 7 bzw. Tag 8 in den jeweiligen Vergleichsgruppen

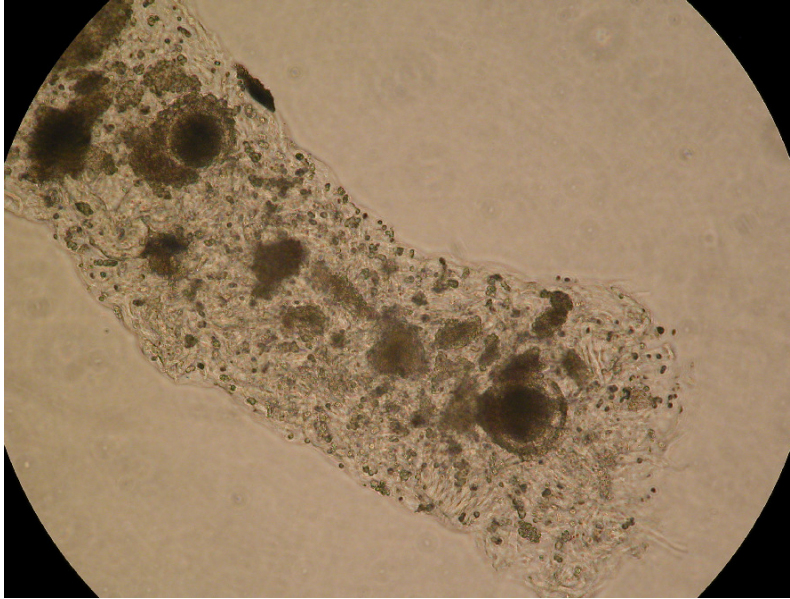


Abbildung 45: Netzartige Struktur des die denudierten Zygoten umgebenden Alginats vor dem Befüllen des Transfersystems

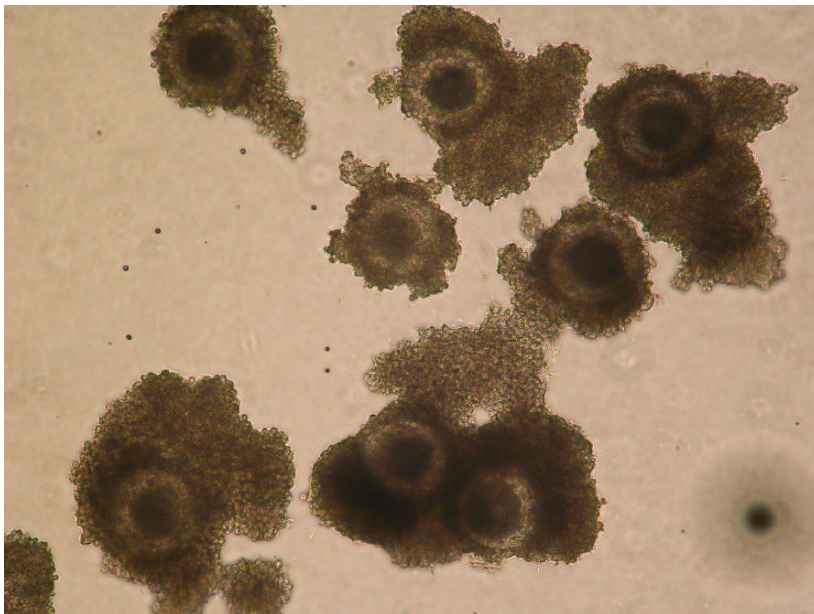


Abbildung 46: Expandierte Cumulus-Oozyten-Komplexe nach der IVM

#### 2.4.3.4 Diskussion

Ziel dieses Versuchsabschnittes war es, gegenüber den aufgeführten Vorversuchen eine systematische Weiterentwicklung des Verfahrens der *In vivo*-Kultur in Richtung einer Steigerung der Findungsrate zu etablieren. Wie aus den Ergebnissen eindeutig hervorgeht, ist abseits der reinen Embryostruktur eine Morphologie Voraussetzung, die dem Cumulus-Oozyten-Komplex während der Ovulation entspricht.

Der Transfer von in Alginat eingebetteten Embryonen resultierte in der höchsten Findungsrate (70,5%). Mit dieser morphologischen Veränderung sollte in diesem

Versuch der expandierten Form einer Cumulusmaturation Rechnung getragen werden, um im Anfangsteil der *Ampulle* die Größenordnungen zu bewahren und den Anschluss an Migrationsprozesse herzustellen. Alginat ist ein natürlich vorkommendes Polysaccharid aus Seealgen, welches sich unter Beisein von Kalziumchlorid zu einer Embryokapsel verfestigen lässt, die sich aber wieder innerhalb von 48 Stunden im Eileiter auflöst (Eaton et al., 1990; Adaniya et al., 1993). Die vorliegenden Ergebnisse geben jedoch keine weiteren Hinweise in Bezug auf Migration der Embryonen im Eileiter. Es bleibt unklar, ob der Alginat-Embryokomplex bis zu seiner Auflösung am Ort der Übertragung im Eileiter bleibt oder ob dieser Komplex tatsächlich im Eileiter einer Wanderphase unterliegt. Eine Wanderphase wäre jedoch in dem Zusammenhang denkbar insofern, als auch nach dem Transfer von 500 µm großen Mikrokügelchen ein Transport dieser Gebilde im Kanincheneileiter beobachtet wurde (Bourdage und Halbert, 1988). Der wichtigste Grund der Alginateinbettung in diesem Versuch lag darin, primär den Verlust der Embryonen nach Transfer in einem sehr aktiven und dynamischen Eileiter zu verhindern. Die Gegenüberstellung der Gruppen „COC mit Samen - GIFT“, „Zygoten mit Cumulus“ und „Zygoten ohne Cumulus“ lässt die Bedeutung der Cumulusstruktur für den physiologischen Eizelltransport im Eileiter vermuten. Die höheren Findungsraten der „Alginat“-Gruppe und der „GIFT“-Gruppe gegenüber der Gruppe „Zygoten mit Cumulus“ sind damit in Richtung struktureller Beeinträchtigung der Embryohülle zu interpretieren. Diese Information ist von essentieller Bedeutung beim Transfer von IVP- Embryonen in den nicht ligierten, synchronisierten Rindereileiter und stellt somit auch methodische Voraussetzungen zur Verbesserung von *In vivo*-Kulturbedingungen dar. Die extrazelluläre Cumulusmatrix stellt in der ersten Zeit nach der Ovulation bekannter Weise die Verbindung zum Eileiterepithel dar und trägt eine wesentliche Funktion im Rahmen der Aufnahme der Eizelle/des Embryos in den Eileiter (Lam et al., 2000). Zygoten, die transferiert werden, aber sich nicht mehr im Cumulus befinden, haben nicht den initialen Adhäsionskontakt zum Eileiterepithel und sind vermehrt dem Flüssigkeitsstrom ausgesetzt, der retrograd in Richtung Bauchhöhle gerichtet ist (Stone und Hamner, 1975).

Die Einbettung der Embryonen in Alginat hat, gegenüber den hohen Findungsraten, allerdings deren Weiterentwicklung negativ beeinflusst. Diese Beobachtung steht im Widerspruch mit anderen Arbeiten, die zeigen konnten, dass während der *In vitro*-Kultur die Embryoentwicklung nicht beeinträchtigt war (Elsheikh et al., 1997; Yaniz et al., 2002; Cosby und Dukelow, 1990). Gegenüber der Einbettung der Embryonen in Agarchips kann bei der Verwendung von Alginat die negative Beeinflussung der sensitiven Zygoten durch zu hohe Temperaturen ausgeschlossen werden.

Die weitere Entwicklung der Embryonen war relativ unabhängig von einer vorhandenen Cumulusbeschichtung, wohingegen andere Untersuchungen auch einen Vorteil darin sehen, wenn zumindest *in vitro* die Cumuluszellen über den Befruchtungsvorgang hinaus um den Embryo bleiben (Khurana und Niemann, 2000; Zhang et al., 1995). Nach der Ovulation werden beim Rind die Cumuluszellen innerhalb weniger Stunden von der Zygote abgelöst (Greve und Callesen, 2001). Die Fragmente, die für eine bestimmte Zeit in der Eileiterflüssigkeit bestehen bleiben, werden als nützliche parakrine Zellverbände diskutiert, die das frühe embryonale Wachstum des Embryos beeinflussen können (Hunter, 2003).

Die geringste Rückgewinnungsrate an Embryonen war in der Gruppe zu verzeichnen, die mit 6 mg/ml Hyaluronsäure im Transfermedium zur Steigerung der Viskosität supplementiert war. Es wurde ein unphysiologisch hoher Gehalt an Hyaluronsäure zugesetzt, um eine „Fixation“ der transferierten Embryonen im Eileiter

und damit einen Schutz vor Verlust zu erreichen. Hyaluronsäure wurde z.B. im expandierten Cumuluszellapparat nachgewiesen, jedoch nur in Größenordnungen von 0,5 bis 1 mg/ml (Zhuo und Kimata, 2001). Darüber hinaus haben weitere Untersuchungen gezeigt, dass die *In vitro*-Kultur mit 6 mg/ml Hyaluronsäure deutlich die Viskosität des Mediums steigerte und die Embryoentwicklung verbesserte (Stojkovic et al., 2002). Die deutlich erhöhte Konzentration an Hyaluronsäure verhindert jedoch auch die koordinierte Bewegung und die Frequenz des Zilienbesatzes der Eileiterepithelzellen (Huang et al., 1997), was ein wichtiger Grund für die verminderte Findungsrate in der Hyaluronsäuregruppe im vorliegenden Versuch sein könnte.

Um graduelle Unterschiede in der Cumulusbeschichtung bzw. Interaktionen von Eizellen/Spermien und Eileiterepithel zu untersuchen, wurden in diesem Versuch COC mit Samenzellen und Zygoten mit Rest-Cumuluszellen übertragen. Die Findungsrate war für die „GIFT“-Gruppe tendenziell höher als für die übertragenen Zygoten mit Cumulus (63,1% vs. 56,1%,  $p = 0,067$ ). Derzeit wäre eine exakte Erklärung aufgrund der Versuchsergebnisse noch zu früh, dennoch sind Hinweise auch im Bereich der Cumulusbeschichtung zu sehen, die bei der „GIFT“-Gruppe unmittelbar nach die Zugabe von kapazitierten Samenzellen noch während der Befüllung der Transferkapillare deutlich reduziert wurden. Dieses Phänomen ist ebenfalls in der *In vitro*-Kultur zu beobachten (Van Soom et al., 2002).

Diese weiterführenden Versuchen haben deutlich gezeigt, dass obligate Strukturen am adäquaten Eizell/Embryotransport im Eileiter beteiligt sind. Es ist anzunehmen, dass die Weiterentwicklungsrate primär unabhängig von der Findungsrate, aber maßgeblich von den initialen Voraussetzungen zur Eizellgewinnung und der IVP abhängig ist. Als weiterer kritischer Punkt ist die Überführung der zu transferierenden Komplexe vom Inkubator über die Befüllung der Transferkapillare bis zum Transfer selbst zu sehen (Mediumwechsel, Temperaturschwankungen, Strömungsdynamik in der Kapillare beim Transfer etc.). Für das letzte Projektjahr war daher vorgesehen, die genannten Bereiche so zu kombinieren, dass bei entsprechender Findungs- und Weiterentwicklungsrate qualitativ gute Embryonen für den Transfer zur Verfügung stehen.

#### 2.4.3.5 Literatur

Adaniya GK, Rawlins RG, Quigg JM, Roblero L, Miller IF, Zaneveld LJD (1993): First pregnancies and livebirths from transfer of sodium alginate encapsulated embryos in a rodent model. *Fertility and Sterility* 59,652-656.

Besenfelder U, Brem G (1998): Tubal transfer of bovine embryos: a simple endoscopic method reducing long term exposure of *in vitro* produced embryos. *Theriogenology* 50,739-745.

Besenfelder U, Havlicek V, Mösslacher G, Brem G (2001): Collection of tubal stage bovine embryos by means of endoscopy. A technique report. *Theriogenology* 55,837-845.

Bourdage RJ, Halbert SA (1988) Distribution of embryos and 500-microM microspheres in the rabbit oviduct: controls for acute motion analysis during transport. *Biol Reprod* 38,282-291.

Cosby NC, Dukelow WR (1990): Microencapsulation of single multiple and zona pellucida-free mouse preimplantation embryos in sodium alginate and their development *in vitro*. J Reprod Fert 90,19-24.

Crisman RO, McDonald LE (1980): Effects of progesterone or estrogen on uterine tubal transport of ova in the cow. Theriogenology 13,141-154.

Crisman RO, McDonald LE, Wallace CE (1980): Oviduct (uterine tube) transport of ova in the cow. Am J Vet Res 41,645-647.

Eaton NL, Niemeyer GP, Doody MC (1990): The use of an alginic acid matrix to support *in vitro* development of isolated murine blastomeres. J In Vitro Fert Embryo Transf;7,28-32.

El-Banna AA, Hafez ESE (1970): Egg transport in beef cattle. J Anim Sci 30 430-432.

Elsheikh AS, Takahashi Y, Hishinuma M, Nour MS, Kanagawa H (1997): Effect of encapsulation on development of mouse pronuclear stage embryos *in vitro*. Anim Reprod Sci 48,317-324.

Galli C, Crotti G, Turini P, Duchi R, Lazzari G (2001): Embryo production by ovum pick-up from live donors. Theriogenology 55,1341-1357.

Greve T, Callesen H (2001): Rendez-vous in the oviduct: Implications for superovulation and embryo transfer. Reprod Nutr Dev 41,451-459.

Havlicek V, Besenfelder U, Reibenwein H, Brem G (1999): Transvaginal endoscopy for the collection of tubal stage bovine embryos. Theriogenology 51,262.

Huang S, Driessen N, Knoll M, Talbot P (1997): *In vitro* analysis of oocyte cumulus complex pickup rate in the hamster *Mesocricetus auratus*. Mol Reprod Dev 47,312-322.

Hunter RHF (2003): Post-ovulatory fate of follicle and oocyte: contributions of somatic cells and follicular fluid. Physiology of the Graafian follicle and ovulation. In Hunter RHF. (ed.): Physiology of the Graafian follicle and ovulation. Cambridge, University Press, United Kingdom 295-324.

Khurana NK, Niemann H (2000): Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. Theriogenology 54,741-756.

Killian GJ, Chapman DA, Kavanaugh J, Deaver DR (1987): Changes in the composition of oviductal fluid during the cow estrous cycle. Biol Reprod 36 Suppl. 1, 84.

Killian GJ, Chapman DA, Kavanaugh J, Deaver DR, Wiggin HB (1989): Changes in phospholipids cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrous cycle. J Reprod Fert 86,419-426.



Lam X, Gieseke C, Knoll M, Talbot P (2000): Assay and importance of adhesive interaction between hamster (*Mesocricetus auratus*) oocyte-cumulus complexes and the oviductal epithelium. *Biol of Reprod* 62,579-588.

Reichenbach HD, Wiebke NH, Wenigerkind H, Mödl J, Brem G (1994): Bovine follicular oocytes collected by laparoscopic guided transvaginal aspiration. *Theriogenology* 41,283.

Roberts GP, Parker JM, Symonds HW (1975): Proteins in the luminal fluid from the bovine oviduct. *J Reprod Fert* 45,301-313.

Schmidt M, Greve T, Avery B (1997): Culture of 1 – 2 cell bovine embryos in oviducts of heifers. *Theriogenology* 47,337.

Stanke DF, Sikes DJ, Deyoung DW, Tumbleson ME (1974): Proteins and amino acids in bovine oviductal fluid. *J Reprod Fert* 38,493-496.

Stojkovic M, Kölle S, Peinl S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Thompson JG, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Sinowatz F, Wolf E (2002): Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen-thawed bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction* 124,141–153.

Stone SL, Hamner CD (1975): Biochemistry and physiology of oviductal secretions. *Gynecol Invest* 6,234-252.

Van Soom A, Tanghe S, De Pauw I, Maes D, de Kruif A (2002): Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod Dom Anim* 37,144-151.

Yániz JL, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Mullins KJ (2000). Study of the functional Anatomy of bovine oviductal Mucosa. *Anat Rec* 260,268-278.

Yaniz JL, Santolaria P, Lopez-Gatius F (2002): *In vitro* development of bovine embryos encapsulated in sodium alginate. *J Vet Med A* 49,393-395.

Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA (1995): Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 40,338-344.

Zhuo L, Kimata K (2001): Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell Struct Funct* 26,189-196.

## 2.4.4 Optimierung der *In vivo*-Kulturdauer zur effizienten Embryoproduktion

### 2.4.4.1 Einleitung

Obwohl gerade die *In vitro*-Kulturbedingungen für Embryonen über die letzten Jahrzehnte deutlich verbessert wurden, ist die Qualität von IVP-Embryonen deutlich unter dem physiologischen erreichbaren Niveau geblieben und stellt damit nach wie vor eine begrenzte Einsetzbarkeit *in praxi* dar (Hasler et al., 1995). Wie bereits über die Embryoüberlebensraten nach Kryokonservierung gezeigt wurde, konnte durch die temporäre *In vivo*-Kultur von IVP-Embryonen eine markante Verbesserung erreicht werden (Rizos et al., 2002). Angaben von Leibo et al. (1995) zufolge führt die *In vitro*-Kultur zu einer starken intrazytoplasmatischen Anreicherung von Lipidtropfen, die einen Verlust der Zellelastizität mit sich bringt und die morphologische Anpassung der Embryonen an unterschiedliche physikalisch-chemische Zustände erheblich einschränkt. Darüber hinaus weisen IVP-Blastozysten einen größeren Anteil an apoptotischen Zellen der Inner Cell Mass (ICM) auf (Gjorret et al., 2003). Strukturen wie „Gap Junction“ sind ideale Indikatoren für die interzelluläre Kommunikation und lassen eine ungenügende Ausbildung in IVP-Embryonen erkennen (Boni et al., 1999). Viele der ultrastrukturell zu erkennenden Mängel, die IVP-Embryonen kennzeichnen, sind auf der mRNA-Ebene wiederzufinden (Wrenzycki et al., 1996; Lonergan et al., 2003a; Lonergan et al., 2003b; Rizos et al., 2003). Eine essentielle Beeinflussung der Blastozystenqualität ist schon unmittelbar nach der Befruchtungsphase zu erwarten, da sich Abweichungen der Transkription schon 10 Stunden nach Beginn der Kulturphase abzeichnen und über die gesamte Kulturzeit zu beobachten sind (Lonergan et al., 2003a). In zahlreichen Untersuchungen wird versucht, den inadäquaten *In vitro*-Voraussetzungen auszuweichen, indem der Eileiter als temporärer Inkubator eingesetzt wird. Ältere Arbeiten beschreiben meist die Verwendung von heterologen Eileitern wie vom Kaninchen und vom Schaf (Sreenan und Scanlon, 1968; Boland, 1984; Sirard und Lambert, 1986; Eyestone et al., 1987). Unter der Berücksichtigung, dass der Einsatz von „synthetic oviduct fluid – SOF“ als Kulturmedium mittlerweile Standard wurde (Merton et al., 2003), obgleich keine wesentlichen Verbesserungen zu beobachten waren, ist es umso mehr verständlich, dass seit 10 Jahren Embryonen wiederum bevorzugt im Schafeileiter kultiviert werden. Dieses Verfahren ist damit die bislang effektivste Methode zur Produktion von qualitativ hochwertigen Embryonen (Enright et al., 2000; Galli und Lazzari, 1996).

Galli et al., (2003) setzen routinemäßig Schafe ein, um über deren Eileiter eine Vielzahl von Embryonen zu erhalten. Es wird jedoch beschrieben, dass diese Technik nur von Personen mit besonderer Fachkenntnis, Erfahrung und entsprechender labortechnischer Ausstattung bewerkstelligt werden kann (Galli et al., 2003). Ausgenommen von einigen, zum Teil sehr aufwändigen experimentellen Studien (Jillella et al., 1977; Xu et al., 1987; Schmidt et al., 1997) hat der Rindereileiter bislang in der *In vivo*-Kultur keine Anwendung gefunden. Mangels technischer Voraussetzungen hat sich keine dieser Methoden *in praxi* behaupten können. Im Gegensatz zu diesen Versuchen hat sich das endoskopische Verfahren, sowohl zur Übertragung als auch Gewinnung von Eizellen und/oder Embryonen bewährt. Dieses Verfahren berücksichtigt den transvaginalen Zugang zum Eileiter, um Embryonen frühzeitig in ihre physiologische Umgebung zurückzubringen (Besenfelder und Brem, 1998).

Das Ziel dieser Arbeit war es, im Rahmen der gezielten Fortführung des Projektes Eizellen und Embryonen so vorzubereiten und gezielt zu transferieren, um nach *In vivo*-Kultur Embryonen in effizientem Umfang (qualitativ und quantitativ) bereitstellen zu können. Dabei wurden folgende Aspekte berücksichtigt:

- I. maximale Ausdehnung der *In vivo*-Kultur zur Minimierung des labortechnischen Aufwandes: Übertragung *in vitro*-maturierter COC mit anschließender *In vivo*-Fertilisierung
  - a. *In vivo*-Fertilisierung durch Besamung der temporären Empfängertiere
  - b. *In vivo*-Fertilisierung durch Übertragung von IVM-COC mit *in vitro*-vorbereitetem Samen → GIFT

#### 2.4.4.2 Material und Methoden

##### Empfängervorbereitung

31 Fleckviehkalbinnen im Alter zwischen 18 und 23 Monaten (410 bis 460 kg Körpergewicht) wurden als Zwischenempfänger vorbereitet. Die Tiere wurden im Boxenlaufstall gehalten und erhielten neben freiem Zugang zu Wasser, Heu, Rübenschnitzel- und Grassilage, Mineralstoff-, Vitamin E/Selen- sowie  $\beta$ -Carotinzufütterung. Diese Tiere wurden nach dem bekannten Ovsynch-Protokoll vorbereitet (Mialot et al., 2003). Die Vorsynchronisation erfolgte über die Verabreichung von 500  $\mu$ g Cloprostenol (Estrumate<sup>®</sup>, Mallinckrodt Veterinary, Burgwedel, Germany). Nach weiteren 48 Stunden wurden 0,02 mg GnRH (Receptal<sup>®</sup>, Intervet, Oberschleissheim, Germany) appliziert. 6 Tage später wurde mit der Ovsynch-Behandlung begonnen, indem wiederum 0,02 mg GnRH und nach einer Woche mit Cloprostenol (500  $\mu$ g) behandelt wurde. Die Synchronisation wurde mit GnRH-Behandlung (0,02 mg) 48 Stunden später beendet. Die Ovulation wurde in den darauffolgenden 26 bis 40 Stunden erwartet. Der Synchronisationserfolg, die Ovulationsseite, das morphologische Erscheinungsbild des Gelbkörpers sowie sein Alter wurden während des endoskopischen Einsatzes bestimmt.

##### Eizellgewinnung und *In vitro*-Maturation

Alle Chemikalien stammen von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), sofern deren Bezugsquelle nicht anderweitig angegeben wird.

Es wurden Eierstöcke nahe gelegener Schlachthöfe gesammelt und ins Labor transportiert. Dort wurden 2 bis 8 mm große Follikel punktiert und deren Inhalt aspiriert. Die in 50 ml Falconröhrchen aufgefangene Follikelflüssigkeit wurde in Petrischalen ( $\varnothing$  100 mm) überführt. Cumulus-Oozyten-Komplexe (COC) mit kompaktem, geschlossenem Cumulus und homogen, fein granuliertem Zytoplasma der Eizelle wurden für den Versuch in modifiziertem Parker Medium (MPM, 10% Hitze-inaktiviertes Serum östrischer Kalbinnen - OCS, 10  $\mu$ g/ml Äquivalente pFSH) bei 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> und maximaler Luftfeuchtigkeit für 22 bis 24 Stunden maturiert. Die COC wurden auf 4 Versuchsgruppen aufgeteilt. Davon wurden 2 Gruppen für den Transfer von COC (COC-Gruppe) und für die GIFT-Gruppe (Gamete Intra-Fallopian Transfer) verwendet. Die verbleibenden COC wurden *in vitro*-fertilisiert und -kurzzeitkultiviert, um als 4- bis 8-Zellstadien transferiert zu werden (progressive Stadien) bzw. über 7 bis 8 Tage *in vitro*-kultiviert.

### In vitro-Fertilisierung und Spermiovorbereitung für die GIFT-Gruppe

Die Vorbereitung der Spermien erfolgte über ein modifiziertes Swim up-Verfahren. In Pailletten tiefgefrorene Samenportionen wurden 10 Sekunden an der Luft (Raumtemperatur) und anschließend im 39 °C warmen Wasserbad aufgetaut. 1,7 ml Kapazitationsmedium (Serum-TALP, 6 mg/ml BSA) wurden in 15 ml Falconröhrchen mit Aliquots von je 250 µl Samen aus dem Pailletteninhalt unterschichtet und bei 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> für 50 Minuten inkubiert. Der klare Überstand des Kapazitationsmediums wurde abpipettiert und in einem 15 ml Falconröhrchen gesammelt. Nach Zentrifugation bei 200 g für 15 Minuten wurde der klare Überstand bis auf wenige Milliliter abgenommen und das entstandene Pellet mit dem verbliebenen Überstand resuspendiert. Daraufhin wurde die Spermienkonzentration dieser Suspension bestimmt und die Menge an Volumen bestimmt, die für die Einstellung einer bestimmten Samenendkonzentration in den Gruppen II, III und IV notwendig war.

Die maturierten COC wurden in das Fertilisierungsmedium überführt (Fert-TALP, 6 mg/ml BSA, 0,02 mg/ml Heparin) und Samen aus dem Swim up-Verfahren in dem Volumen dazugegeben, dass eine Endkonzentration von 1 Mio Samen pro ml vorhanden war. Die Koinkubation erfolgte für 18 bis 20 Stunden bei 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> und maximaler Luftfeuchtigkeit.

Für die GIFT-Gruppe (Gruppe II) wurden 2 Mio Spermien vorbereitet, die mit den COC in die Transferkapillare aufgenommen wurden.

### In vitro-Kultur - IVC

Für die *In vitro*-Kultur wurde das Standardmedium „CR1aa“ verwendet, dem 10% OCS zugesetzt wurden. Nach der *In vitro*-Fertilisation wurden die Cumulus-tragenden Zellen denudiert, in Kulturmedium umgesetzt und bei 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 5% O<sub>2</sub> kultiviert. Nach 60 Stunden wurde die Teilungsrate bestimmt. Für die Gruppe 3 (ET von progressive Stadien) wurden 4- bis 8-Zellstadien aus der Kultur entfernt und für den Transfer vorbereitet. Die Kulturstadien der Gruppe IV (IVP-Gruppe) wurden am 7. und 8. Tag erneut bestimmt.

### Eileitertransfer und Embryogewinnung

Der Eileitertransfer wurde analog dem zuvor beschriebenen Transfer für die *In vivo*-Kultur durchgeführt. Alle COC bzw. Embryonen wurden unilateral in den Eileiter transferiert, auf dessen Seite die Ovulationsstelle zu finden war.

### Bildung der Versuchsgruppen

Die Bildung der Versuchsgruppe ist in Abbildung 47 dargestellt.

Gruppe I: (COC-Gruppe): *In vitro*-maturierte COC wurden in MPM in die Transferkapillare überführt und auf Rezipienten übertragen, deren Ovulationsstelle nicht älter als 12 Stunden (0,5 bis max. 1 Tag) waren. Die Empfängertiere wurden 12 und 6 Stunden vor den Transfers mit je zwei Pailletten (0,25 ml) von 2 Bullen (1:1 verdünnt, nativ) besamt. Die Embryonen wurden 7 Tage später zurückgewonnen.

Gruppe II: (GIFT-Gruppe): *In vitro*-maturierte COC wurden in MPM und mit  $2 \times 10^6$  Spermien in die Transferkapillare überführt. Die Transfers wurden ebenfalls bei Empfängern durchgeführt, deren Ovulationsstelle nicht älter als 12 Stunden (0,5 bis max. 1 Tag) war.

Gruppe III: (progressive Stadien): Nach IVM/IVF wurden die Zygoten für 60 Stunden *in vitro*-kultiviert. Embryonen im 4- bis 8-Zellstadium wurden dann im Kulturmedium in die Eileiter von Rindern am Zyklustag 2,5 bis 3 übertragen.

Gruppe IV: (IVP-Gruppe): Zum Vergleich für alle Transfergruppen (Gruppen I – III) wurde eine Gruppe an COC bis zur Blastozystenentwicklung an Tag 7 und Tag 8 *in vitro*-entwickelt (IVM/IVF/IVC). 60 Stunden nach Befruchtungsbeginn wurden ebenfalls die Teilungsstadien bestimmt.

Bei allen Transfergruppen (Gruppen I bis III) wurden die Weiterentwicklung zur Blastozyste unmittelbar nach der Gewinnung (Tag 7) sowie nach einer weiteren 24-stündigen *In vitro*-Kultur bestimmt.

#### Statistische Analyse

Die Anzahl der Blastozysten, die nach *In vivo*-Kultur gewonnen wurden, wurde abzüglich der möglichen Blastozysten aus der Ovulation der Empfängertiere bei den Gruppen I und II (COC und GIFT) berechnet. Die Gewinnungsraten wurden prozentual aus dem Quotienten von gewonnenen und übertragenen Komplexen kalkuliert. Die Anzahl der Blastozysten aus IVP wurden auf die Anzahl der für die *In vitro*-Maturation eingesetzten COC bezogen. Bei der Gruppe III, denen 4- bis 8-Zellstadien transferiert wurden, wurde als Bezugsgröße zur Anzahl der Blastozysten jene Anzahl an COC berechnet, die sich aus der Anzahl übertragener 4- bis 8-Zellstadien, korrigiert um den Faktor der Teilungsrate, ergab.

Die Gewinnungsraten und die Anzahl der Blastozysten wurden mittels  $\chi^2$ -Test verglichen.

$$\text{Blastozystenrate} = \frac{\text{Anzahl Blastozysten}}{\text{Anzahl gewonnener Komplexe}} \times 100$$

(COC- und GIFT-Gruppe)

$$\text{Blastozystenrate} = \frac{\text{Anzahl Blastozysten}}{\text{Anzahl kultivierter COC}} \times 100$$

(IVP-Gruppe)

$$\text{Blastozystenrate} = \frac{\text{Anzahl Blastozysten}}{\text{Anzahl gewonnener Komplexe}} \times 100 \times \text{Teilungsfaktor}$$

(Progressive Stadien)

$$\text{Teilungsfaktor} = \frac{\text{Anzahl kultivierter COC}_{\text{IVP der Gruppe III}}}{\text{Anzahl selektierter 4-8 Zeller für den ET der Gruppe III}}$$

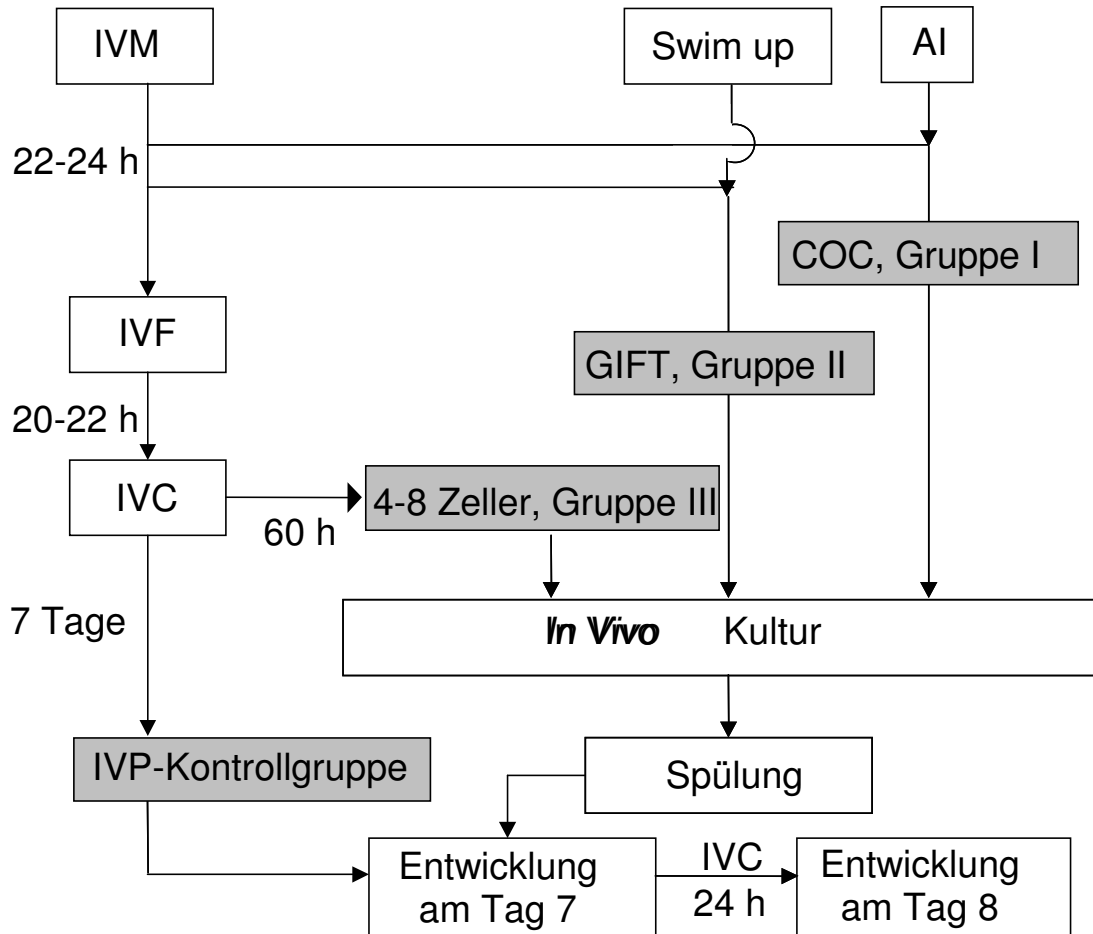


Abbildung 47: Bildung der Versuchsgruppen zur *In vivo*-Kultur von Rinderembryonen und Eizellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien

#### 2.4.4.3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 1652 *in vitro*-murierte bovine Oozyten bzw. frühe Teilungsstadien aus IVP ipsilateral in die Eileiter von 31 Empfängertieren für eine *In vivo*-Kultur übertragen. Am Tag 7 wurden insgesamt 1244 (75,3%, von 16 bis 100%) wiedergewonnen. Die Gewinnungsraten der einzelnen Gruppen unterschieden sich signifikant (76,3% Gruppe I – COC; 68,3% Gruppe II – GIFT, 79,9% Gruppe III – progressive Stadien,  $p < 0,01$ ,  $\chi^2$ -Test, Tabelle 32). In der IVP-Gruppe teilten sich bis zur 60. Stunden *post inseminationem* 81,1%. In der *In vitro*-Kulturphase der

Gruppe III hatten sich 60 Stunden nach Fertilisierungsbeginn 77,6% bis zum 4- bis 8-Zellstadium entwickelt, die anschließend *in vivo*-weiterkultiviert wurden.

Ergebnisse aus dem Transfer von Eizellen (COC, GIFT) und Embryonen zur *In vivo*-Kultur im Rindereileiter im Vergleich zur *In vitro*-Produktion.

Die Anzahl der Blastozysten, die sich aus der Spülung am Tag 7 und nach weiterer 24-stündiger *In vitro*-Kultur (Tag 8) ergab, war für die jeweiligen Gruppen signifikant unterschiedlich. So konnten am Tag 7 deutlich mehr Blastozysten nach Transfer von 4- bis 8-Zellstadien zurückgewonnen werden wie in den beiden Vergleichsgruppen I und II ( $p < 0,001$ ,  $\chi^2$ -Test). 41,9% der gewonnenen Komplexe war am Tag 7 im Blastozystenstadium, 10 weitere Blastozysten entwickelten sich nach einer 24-stündigen *In vitro*-Kultur (43,3%). Der Transfer von COC mit  $2 \times 10^6$  Spermien resultierte hingegen in einer Blastozystenrate von nur 15,1% am Tag 7, die aber am 8.Tag 19,9% erreichte. Nahezu ohne Entwicklungserfolg blieben die Transfers von IVM-COC, welche durch künstliche Besamung der temporären Empfänger begleitet wurden. Nur 0,9% der am Tag 7 und 8 gewonnenen Komplexe erwiesen sich als Blastozysten.

Im Rahmen der 24-stündigen Zwischenkultur von Entwicklungstag 7 auf Tag 8 konnten nur in den Gruppe II und III (GIFT und progressive Stadien) weitere Blastozysten gewonnen werden. Dieser Erfolg war jedoch nicht signifikant ( $p > 0,1$ ;  $\chi^2$ -Test).

In der reinen „*In vitro*-Kultur“ (Gruppe IV, IVP) wurden am Tag 7 20,9% zu Blastozysten entwickelte Embryonen gefunden, deren Zahl am Tag 8 deutlich anstieg ( $p < 0,001$ ,  $\chi^2$ -Test) und einen Wert von insgesamt 37,7% erreichte.

Die Entwicklungsraten, die sich aus der IVP (Gruppe IV) und der Kombination IVP/*In vivo*-Kultur ergaben, wichen deutlich voneinander ab. Die *In vivo*-Kultur von 4- bis 8-Zellstadien (Gruppe III) lieferte markant mehr Blastozysten als die *In vitro*-Kultur (Gruppe IV), sowohl am Tag 7 als auch am Tag 8 (Tag 7: 41,9% vs. 20,9%,  $p < 0,001$ ; Tag 8: 43,3% vs. 37,7%,  $p = 0,016$ ,  $\chi^2$ -Test). Die IVP-Gruppe war hingegen besser als jene Gruppen, in denen COC (Gruppe I und II) übertragen wurden (IVP-Gruppe vs. COC-Gruppe: Tag 7: 20,9% vs. 0,9%, Tag 8: 37,7% vs. 0,9%,  $p < 0,001$ ; IVP-Gruppe vs. GIFT-Gruppe: Tag 7: 20,9% vs. 15,1%,  $p = 0,015$ ; Tag 8: 37,7% vs. 19,9%,  $p < 0,001$ ;  $\chi^2$ -Test).

Tabelle 32: Ergebnisse aus der *In vivo*-Kultur verschiedener Transferstadien

Parameter	E m b r y o k u l t u r					
	<i>In vivo</i>					<i>In vitro</i>
	COC	GIFT		Progressive Stadien		IVP
Transfers, n	10	10		11		-
<b>Kultivierte Stadien</b>						
<i>In vitro</i> , n	-	-		879	(702)*	1325
<b>Geteilte Stadien, n</b>						
(%)	-	-		682	(77,6)	1074 (81,1)
<b>Kultivierte Stadien</b>						
<i>In vivo</i> , n	456	514		682		-
<b>Gewonnene</b>						
Embryonen, n (%)	348 (76,3) <sup>a</sup>	351 (68,3) <sup>b</sup>	545 (79,9) <sup>a</sup>			-
<b>Tag 7 Blastozysten,</b>						
n (%)	3 (0,9) <sup>a</sup>	53 (15,1) <sup>b</sup>	294 (41,9) <sup>c</sup>			277 (20,9) <sup>d</sup>
<b>Tag 8 Blastozysten,</b>						
n (%)	3 (0,9) <sup>a</sup>	70 (19,9) <sup>b</sup>	304 (43,3) <sup>c</sup>			499 (37,7) <sup>d</sup>

COC: Transfer von *in vitro*-maturierten COC kombiniert mit Künstlicher Besamung (AI).

GIFT: Transfer von *in vitro*-maturierten COC zusammen mit *in vitro*-kapazitierten Spermien.

Progressive Stadien: Transfer von Embryonen im 4- bis 8-Zellstadium.

\* Werte wurde unter Berücksichtigung der Teilungsrate verglichen.

Gewonnene Embryonen: <sup>a,b</sup> Werte der jeweiligen Parameter unterschieden sich signifikant ( $p < 0,01$ ).

Tag 7 Blastozysten: <sup>a-d</sup> Werte der jeweiligen Parameter unterschieden sich signifikant ( $p < 0,001$ ), ausgenommen <sup>b,d</sup>:  $p = 0,016$ .

Tag 8 Blastozysten: <sup>a-d</sup> Werte der jeweiligen Parameter unterschieden sich signifikant ( $p < 0,001$ ), ausgenommen <sup>c,d</sup>:  $p = 0,015$ .



#### 2.4.4.4 Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung wurden *In vivo*-Kulturtechniken im Rindereileiter durchgeführt, um mittels Transfer von bereits geteilten Embryonalstadien (Gruppe III), GIFT (Gruppe II) und der Übertragung von *in vitro*-maturierten COC mit mehrfach künstlicher Besamung wichtige Schritte zu erkennen, die in der *In vitro*-Produktion wesentlich den Erfolg beeinträchtigen.

Die wichtigsten Erkenntnisse aus diesem Versuch sind (1) die Wiedergewinnungsrate nach *In vivo*-Kultur im nicht ligierten Rindereileiter hängt maßgeblich von morphologischen/physiologischen Merkmalen der übertragenen Komplexe ab, (2) die physiologische Umgebung im Rindereileiter verbessert deutlich die Entwicklungskompetenz von bereits geteilten IVM/IVF-Embryonen, (3) die Durchführung des GIFT-Verfahrens als verbindendes Element zwischen der IVP und der Embryonalentwicklung im Tier stellt eine alternative Möglichkeit dar, um labortechnische Aufwendungen für die IVP zu minimieren, (4) die intratubale Befruchtung von IVM-transferierten COC ist nicht kompatibel.

Die in dieser Studie erreichte Gesamtfindungsrate von 75% stellt insgesamt einen deutlichen Erfolg dar, der entscheidende Erkenntnisse zu physiologischen Mechanismen tubaler Migration von transferierten Komplexen in verschiedenen Stadien widerspiegelt.

Dieses Problem wurde bereits von der Arbeitsgruppe von Ellington (Ellington, 1991) dargestellt, die die physiologischen Eigenheiten des Eileiters mit all seinen komplexen Interaktionen von Gametentransport und den muskulären, Zilien-abhängigen und sekretorischen Aktivitäten sowie den Faktoren, die das Anheften an das Eileiterepithel für den Weitertransport bewirken, herausgestellt haben. Die Ergebnisse dieses „offenen“ Systems der *In vivo*-Kultur lassen sich mit den in der Literatur dokumentierten Arbeiten am ligierten Schafeileiter vergleichen, die durch mehrfach chirurgisches Vorgehen einem Verlust vorzubeugen versuchten und Wiedergewinnungsraten zwischen 64% und 74% erreicht haben (Rizos et al., 2002; Sreenan und Scanlon, 1968; Boland, 1984; Enright et al., 2000).

Die Gewinnungsraten der übertragenen COC-Stadien und der von Cumulus befreiten 4- bis 8-Zellstadien unterschieden sich nicht. Eine Erklärung dieses Phänomens kann in Faktoren gefunden werden, die die Eileitermigration beeinflussen; es ist seit längerem bekannt, dass der Eizelltransport entgegen des Eileiterflüssigkeitsstromes erfolgt, der retrograd zur Bauchhöhle hin gerichtet ist (Stone und Hamner, 1975). Die größten Mengen an Eileiterflüssigkeit werden zum Zeitpunkt der Östrogendominanz sezerniert, während vom 2. bis 5. Zyklustag deutlich weniger Flüssigkeit im Eileiter zu finden ist (Killian et al., 1989). Die Cumulus-Oozyten-Komplexe wurden unmittelbar nach der Ovulation bis maximal Tag 1 des Zyklus transferiert, während die Embryonen im 4- bis 8-Zellstadium am Zyklustag 2,5 bis 3 in den Eileiter übertragen wurden. Daher ist es offensichtlich, dass zu einem Zeitpunkt, in dem eine geringere Flüssigkeitsmenge im Eileiter nur kleinste Strömungen verursacht, auch von Cumulus befreite Embryonalstadien trotz ihrer mangelnden Haftfähigkeit am Epithel nicht verloren gingen.

Eine Erklärung der Unterschiede zwischen den Gewinnungsraten der Gruppen I (COC + Künstliche Besamung) und II (GIFT) ( $p > 0,01$ ) ist möglicherweise auf Seite der Spermien zu suchen, die den COC der GIFT-Gruppe vor dem Transfer beigemischt wurden. So konnte beobachtet werden, dass unmittelbar nach Zugabe der Spermien zu den COC in der Transferkapillare die äußersten Cumulusschichten

von der Eizelle abgelöst wurden. Da in hoher Konzentration eine große Zahl an Spermien in direkten Kontakt mit dem COC treten, sind beginnende Reaktionen freiwerdender Spermienenzyme, v.a. der akrosomale Hyaluronidase, für eine sehr schnelle Auflockerung der äußeren Cumuluszelllagen verantwortlich zu machen (Hunter, 2003). Da die Verweildauer von COC und Spermien in der Transferkapillare auf einige Minuten beschränkt war, sind die Faktoren „Zeit“ und „Spermienkonzentration“ als Hauptgrund für eine mögliche, negative Beeinflussung von Eizelladaptation und Migration im Eileiter in Betracht zu ziehen. Wie über eine videoaufgezeichnete Mikroskopiestudie an Hamstereizellen gezeigt wurde, ist die Aufnahme von COC an die epitheliale Anhaftung gebunden (Talbot et al., 2003).

Lam et al. (2000) konnten nachweisen, dass sich die extrazelluläre Matrix an die Zilienspitze bindet. In den maturierten, d.h. expandierten Cumuluszellen ist granulär und filamentär gebundene Hyaluronsäure die entscheidende Komponente (Zhuo und Kimata, 2001). Dabei treten die Granula und Filamente in Kontakt mit den Zilienkronen, deren Interaktion dann wichtig für Anhaftung und Weitertransport im Eileiter ist (Lam et al., 2000). Bei Verlust der Cumuluszelllage zu Beginn der Eileitermigration ist eine veränderte Anheftungseigenschaft für die schlechtere Findungsrate denkbar, wie es bei der Gruppe II (GIFT) zu beobachten war.

Die höchste Entwicklungsrate nach *In vivo*-Kultur wurde in der Gruppe III (progressive Stadien) am Tag 7 mit 41,9% und am darauffolgenden Tag (Tag 8) mit 43,3% erreicht. In diesem Zusammenhang muss jedoch erwähnt werden, dass die tatsächliche Kulturphase eine kombinierte Anwendung der *In vitro*-Kultur und der *In vivo*-Kultur war. Umso mehr ist es bemerkenswert, dass die Blastozystenrate in dieser Gruppe (III) deutlich höher war ( $p < 0,05$ ) als die Blastozystenrate aus der reinen *In vitro*-Kulturphase (Gruppe IV, IVP). Dieser Vergleich lässt die *In vivo*-Kultur gegenüber der IVP als die bessere Entwicklungsmethode erscheinen, selbst wenn es sich nur um die zweite Kulturphase handelt. Arbeiten, die sich mit der *In vivo*-Kultur am ligierten Schafeileiter befassen, stellen den qualitativen Entwicklungsgewinn in den Vordergrund, ein quantitativer Vorteil wird jedoch verneint (Rizos et al., 2002; Enright et al., 2000). Lonergan et al. (Lonergan et al., 2003b) kultivierten Embryonen zuerst im sog. SOF-Medium (Synthetic oviduct fluid) für 2 bis 4 Tage, um sie anschließend für weitere 2 bis 4 Tage im Schafeileiter zu belassen. Sie beobachteten eine signifikant niedrigere Blastozystenrate (0 bis 8,2%). Dieses Phänomen wurde durch die hohe Empfindlichkeit der Embryonen während des Wechsels von der *In vitro*-Kultur (SOF-Medium) in eine andere Umwelt erklärt. Die in diesem Versuch durchgeführte Kombination von *In vitro*-Kultur in CR1-Medium mit der *In vivo*-Kultur im Rindereileiter ließ diesen Schluss jedoch nicht zu.

Die Anwendung des sog. GIFT (Gruppe II) resultierte in der Gewinnung von nahezu 20% Blastozysten am Tag 7. Nach unserem Wissen gibt es bislang keine vergleichbare Beschreibung, die über die Durchführbarkeit des GIFT in Zusammenhang mit der Realisierung der erfolgreichen Gewinnung von Blastozysten beim Rind berichtet. Diese Techniken des GIFT wurden schon beim Menschen (Asch et al., 1984), Schwein (Rath et al., 1994) und Pferd (Carnevale et al., 1999) eingesetzt. Versuche beim Rind scheiterten jedoch am geringen Erfolg (Trounson et al., 1977; Newcomb et al., 1978; Fayer-Hosken et al., 1989). Neuere Untersuchungen im Rahmen des GIFT berichten über eine sehr geringen Fertilisierungsrate, wobei die Entwicklung zu Blastozysten gänzlich ausblieb (Rizos et al., 2002). Unter anderem wurden technische Gründe für den ausgebliebenen Erfolg angegeben. Auch bei der Durchführung des GIFT muss erwähnt werden, dass diese Technik, was die Fertilisation betrifft, eine Mischform aus *in vitro* und *in vivo* darstellt. Definitionsgemäß stellt der GIFT einen Gametentransfer dar, dessen Kontakt (Beginn

der Fertilisation) erst im Eileiter zustande kommt. Da bei dieser Studie die Gameten aus technischen Gründen bereits vor dem Transfer in der Transferkapillare gemeinsam aufgezogen wurden, ist daher ein erster extrakorporaler Befruchtungsbeginn einzuräumen. Unabhängig von der physiologisch beanspruchten Dauer des Befruchtungsvorganges war es Ziel des hier beschriebenen GIFT, exakt zu diesem Zeitpunkt die *In vitro*-Phase durch die *In vivo*-Phase zu ersetzen.

Der Transfer von IVM-COC in den Rindereileiter zuvor mehrfach mit Nativsamen (von mehreren Bullen mit bekannt guter Befruchtungsrate) besamter Trägartiere führte zu einer sehr geringen Blastozystenanzahl. Diese Beobachtungen decken sich jedoch mit denen anderer Autoren (Rizos et al., 2002; Newcomb et al., 1978). Cox und Mitarbeiter (Cox et al., 2002) transferierten partiell denudierte, maturierte Rinderoozyten in die Eileiter von zuvor besamte Ziegen und erreichten eine Fertilisationsrate von 42,5%. In dem vorliegenden Experiment war es jedoch nicht möglich, die Fertilisationsrate zu bestimmen, da über die Dauer der *In vivo*-Kultur unbefruchtete und befruchtete, aber nicht weiterentwickelte, Eizellen in unterschiedlichem Maß degeneriert waren.

Während in der IVF Spermien in der Konzentration von  $0,5 \times 10^6/\text{ml}$  bis  $2 \times 10^6/\text{ml}$  routinemäßig eingesetzt werden, wird das Verhältnis von Eizelle zu Spermien im Eileiter als nahezu 1:1 beschrieben (Hunter, 1996). Eine Eizell/Spermienrelation von 1:100 wirkt sich offensichtlich bereits schon negativ (- 6%) auf die Blastozystenrate aus, die sich weitere (25%) reduziert, wenn das Verhältnis auf 1:10000 angehoben wird (Ward et al., 2002).

Aufgrund dieser Ergebnisse liegt der Schluss nahe, dass das *In vitro*-Maturationsystem mit der *In vivo*-Befruchtung nicht kompatibel ist.

Mit dieser Studie konnte in wesentlichen Bereichen für die *In vitro*-Produktion gezeigt werden, dass die transvaginale Endoskopie zur effizienten Gewinnung und Nutzung von Embryonen eingesetzt werden kann. Mit dem Transfer von bereits geteilten IVP-Embryonen zur *In vivo*-Kultur konnte sogar die Anzahl der Blastozysten gegenüber der IVP-Kontrolle gesteigert werden. Zum ersten Mal wurde mit dieser Studie ein Beitrag geleistet, der eine beachtliche Entwicklung von Embryonen zu Blastozysten durch GIFT im Rindereileiter beschreibt. Die Gegenüberstellung der *In vitro*-Entwicklung von Embryonen mit physiologischen Voraussetzungen im Rindereileiter lässt die in diesem Versuch beschriebene Vorgehensweise als optimal erscheinen, um zukünftig weitere Entwicklungsanalogien in diesen Bereichen zu schaffen.

#### 2.4.4.5 Literatur

Asch RN, Ellsworth LR, Balmaceda JP, Wong PC (1984): Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer. *Lancet* 2,1034-1035.

Besenfelder U, Brem G (1998): Tubal transfer of bovine embryos: a simple endoscopic method reducing long term exposure of in vitro produced embryos. *Theriogenology* 50,739-745.

Besenfelder U, Havlicek V, Mösslacher G, Brem G (2001): Collection of tubal stage bovine embryos by means of endoscopy. A technique report. *Theriogenology* 55,837-845.

Boland MP (1984): Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology* 21,126-137.

Boni R, Tosti E, Roviello S, Dale B (1999): Intercellular communication in *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine embryos. *Biol Reprod* 61,1050-1055.

Carnevale EM, Alvarenga MA, Squires EL, Choi YH (1999): Use of noncycling mares as recipients for oocyte transfer and GIFT. In: Proc. Ann. Conf. Soc. of Theriogenology Nashville, TN. p 44 (abstr.).

Cox JF, Zavala A, Saravia F, Rivas C, Alfaro V (2002): Fertilization efficiency of *in vitro* matured oocytes transferred to oviducts of inseminated goats: a model to assess *in vivo* fertilization performance of goat spermatozoa. *Theriogenology* 58,1-8.

Ellington JE (1991): The bovine oviduct and its role in reproduction: A review of the literature. *Cornell Vet* 81,313-328.

Enright BP, Lonergan P, Dinneyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP (2000): Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs. *in vivo*: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology* 54,659-673.

Eyestone WH, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Gilligan BG, First NL (1987): Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology* 28,1-7.

Fayrer-Hosken RA, Younis AI, Brackett BG, Mc Bride CE, Harper KM, Keefer CL, Cabaniss DC (1989): Laparoscopic oviductal transfer of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 32,413-420.

Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G (2003): Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59,599-616.

Galli C, Lazzari G (1996): Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Anim Reprod Sci* 42,371-379.

Gjorret JO, Knijn HM, Dieleman SJ, Avery B, Larsson LI, Maddox-Hyttel P (2003): Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Biol Reprod* 69,1193-1200.

Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Nelly B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA (1995): Production freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43,141-152.

Hunter RHF (1996): Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilisation to avoid polyspermy. *Mol Reprod Dev* 44,417-422.

Hunter RHF (2003): Post-ovulatory fate of follicle and oocyte: contributions of somatic cells and follicular fluid. *Physiology of the Graafian follicle and ovulation*. In Hunter RHF. (ed.): *Physiology of the Graafian follicle and ovulation*. Cambridge, University Press, United Kingdom 295-324.

Jillella D, Eaton RJ, Baker AA (1977): Successful transfer of a bovine embryo through a cannulated Fallopian tube. *Vet Rec* 100,385-386.

Killian GJ, Chapman DA, Kavanaugh JF, Deaver DR, Wiggan HB (1989): Changes in phospholipids, cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 86,419-26.

Lam X, Gieseke C, Knoll M, Talbot P (2000): Assay and importance of adhesive interaction between hamster (*Mesocricetus auratus*) oocyte-cumulus complexes and the oviductal epithelium. *Biol Reprod* 62,579-588.

Leibo S, Pollard JW, Martino A (1995): Chilling and freezing sensitivity of "reassembled" in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 43,265 (Abstr.).

Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Moreira PM, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP (2003a). Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biol Reprod* 69,1424-31.

Lonergan P, Rizos D, Kanka J, Nemcova L, Mbaye AM, Kingston M, Wade M, Duffy P, Boland MP (2003b). Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction* 126,337-46.

Merton JS, de Roos APW, Mulaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ (2003): Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59,651–674.

Mialot JP, Constant F, Dezaux P, Grimard B, Deletang F and Ponter AA (2003): Estrus synchronization in beef cows: comparison between GnRH+PGF<sub>2</sub>+GnRH and PRID+PGF<sub>2</sub>+eCG. *Theriogenology* 60,319-330.

Newcomb R, Christie WB, Rowson LE (1978): Birth of calves after in vivo fertilisation of oocytes removed from follicles and matured in vitro. *Vet Rec* 102,461-462.

Rath D, Johnson LA, Welch GR, Niemann H (1994): Successful gamete intrafallopian transfer (GIFT) in the porcine. *Theriogenology* 41,1173-1179.

Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P (2003): Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod* 68,236-43.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P (2002): Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61,234-248.

Schmidt M, Greve T, Avery B (1997): Culture of 1 – 2 cell bovine embryos in oviducts of heifers. *Theriogenology* 47,337 (abstr.).

Sirard MA, Lambert RD (1986): Birth of calves after in vitro fertilisation using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Vet Rec* 119,167-169.

Sreenan J, Scanlon P (1968): Continued cleavage of fertilized bovine ova in the rabbit. *Nature* 217,867.

Stone SL, Hamner CD (1975): Biochemistry and physiology of oviductal secretions. *Gynecol Invest* 6,234-252.

Talbot P, Shur BD, Myles DG (2003). Cell adhesion and fertilization: Steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol Reprod* 68,1-9.

Trounson AO, Willadsen SM, Rowson LE (1977): Fertilization and development capability of bovine follicular oocytes matured in vitro and in vivo and transferred to the oviducts of rabbits and cows. *J Reprod Fertil* 51,321-327.

Ward F, Enright BP, Rizos D, Boland M, Lonergan P (2002): Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57,2105-2117.

Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H (1996): Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *J Reprod Fert* 108,17-24.

Xu KP, Greve T, Callesen H, Hyttel P (1987): Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fert* 81,501-504.

Zhuo L, Kimata K (2001): Cumulus Oophorus extracellular: Its construction and regulation. *Cell Structure and Function* 26,189-196.

## 2.4.5 Einfluss der Kurzzeitinkubation von Samen mit Eizellen auf die weitere *In vivo*-Entwicklung

### 2.4.5.1 Einleitung

Zahlreiche Faktoren werden für die Beeinträchtigung der Entwicklungsrate von Säugerembryonen verantwortlich gemacht. *In praxi* gelten Embryonen im Morula- und Blastozystestadium als besonders widerstandsfähig gegenüber Umwelteinflüssen. In diesem Stadium wird auch die Tiefgefrierkonservierung toleriert. Frühere Stadien jedoch reagieren wesentlich empfindlicher auf Veränderung der Umwelt und zeigen als erstes Anzeichen die Einstellung jeglicher Teilungsaktivität.

Beim Rind sind vor allem zu Beginn der *In vitro*-Kultur die meisten Manipulationsschritte zu vollziehen. So beinhalten Standardverfahren bereits in den ersten 48 Stunden folgende Manipulationsschritte an Eizelle bzw. Embryo (Tabelle 33).

Tabelle 33: Manipulationsschritten an der Eizelle/ am Embryo innerhalb der ersten 48 Stunden

Zeitachse [h]	Arbeitsschritt	Wechsel	Problem
0	Follikelpunktion	Follikelflüssigkeit - Punktionsmedium	Temperatur
0,5	COC aus Punktat	Punktionsmedium - Waschmedium	
18 - 24	IVM	Waschmedium - Maturationsmedium	pH-Wert
	IVF	Maturationsmedium - Fertilisierungsmedium	
44 – 48	Denudation	Fertilisierungsmedium - PBS/FCS	Zeit, Mechanik
	IVC	PBS/FCS - Kulturmedium	

Die Folgen einer stetigen Veränderung der Mikroumwelt von Eizellen und Embryonen sind, auch noch nach mehreren Jahrzehnten intensiver *In vitro*-Forschungen, in dem Verlust von bis zu 2/3 aller maturierter Eizellen in der IVP zu finden (Ward et al., 2002). Daher sind die Erfolge der *In vitro*-Produktion schon frühzeitig und maßgeblich durch das *In vitro*-Maturationsstadium der Eizelle, die Vorbereitungsphase der Spermien und die Koinkubation der Gameten bestimmt (Gordon, 2003). Obwohl Follikel einer Follikelwelle mit nahezu gleichem Entwicklungsstadium und Größe punktiert werden und mikroskopisch betrachtet einheitliche Eizellen für die IVP liefern, sind innerhalb dieses Pools deutliche funktionell-metabolische Unterschiede festzustellen. Da den *In vitro*-Standardverfahren zur externen Embryoentwicklung fixe Inkubationsbedingungen für jeweils eine bestimmte Zeit vorgegeben sind, ist es offensichtlich, dass aus diesem Eizellpool nur wenige zeitgerecht die *In vitro*-Bedingungen zur eigenen Entwicklung nutzen können. Ein Merkmal, welches diese Diskrepanz zum Ausdruck bringt, ist in der Aufnahme der Zellteilungsaktivität der Embryonen zu sehen. Embryonen, die sich am schnellsten teilen, erweisen sich als am entwicklungscompetentesten und sind auch qualitativ den anderen überlegen (Lonergan et al., 1999). Diese Phänomen ist auch auf anderen Ebenen der Embryoentwicklung zu finden, wie z.B. in der Polyadenylierung einiger mRNA-Transkripte in den Oozyten (Brevini-Gandolfi et al., 2000).

Eine weitere Variabilität in der Embryonalentwicklung liegt auf Seiten des eingesetzten Bullenspermas. So ist seit längerem bekannt, dass sich Sperma von individuellen Bullen im Fertilisierungsvermögen von Eizellen deutlich unterscheidet (Hillery et al., 1990; Shi et al., 1990), und dass diese Variabilität im weiteren auch noch von den verschiedenen *In vitro*-Maturationsmethoden verstärkt wird (Leibfried-Rutledge et al., 1989, Marquant-Le Guienne et al., 1990; Henault und Killian, 1995). Um diese Unsicherheit in der IVP zu minimieren, wurden verschiedene Methoden zur Beurteilung der Motilität (Correa et al., 1997; Kjaestad et al., 1993), des ATP-Stoffwechsels (Janskauskas und Rodriguez-Martinez, 1995), der Membranintegrität (Harrison und Vickers, 1990; Janskauskas und Rodriguez-Martinez, 1995) und der osmotischen Widerstandsfähigkeit (Correa und Zavos, 1994; Revell und Mrode, 1994; Rota et al., 2000) entwickelt. Diesen Methoden liegt jedoch zugrunde, dass sie zwar Hinweise auf die Überlebensfähigkeit der Spermien, aber keine weiteren funktionellen Informationen geben. Daher wurden weitere Testverfahren entwickelt, die mehr Detailinformation über die Befruchtungskapazität der Spermien beinhalten, wie die Induktion der Akrosomenreaktion (Lenz et al., 1988; Whitfield und Parkinson, 1992; Whitfield und Parkinson, 1995; Janskauskas et al., 2000), das Heparinbindungsvermögen der Spermien (Marks und Ax, 1985), Spermien-Zona pellucida-Bindingstests (Fazeli et al., 1993; Zhang et al., 1998) und Spermienpenetrationstests (Ohgoda et al., 1988; Henault und Killian, 1995). Die Voruntersuchungen sind jedoch alle relativ unpraktisch, da sie trotz allem ein einheitliches Vorgehen in der *In vitro*-Fertilisation nicht erlauben.

Erschwerend für die Entwicklungsdynamik in der *In vitro*-Fertilisationsphase kommt hinzu, dass Spermien von verschiedenen Bullen unterschiedliche Zeitintervalle beanspruchen, in denen sie, mit Oozyten koinkubiert, die maximale Befruchtungs- und damit Weiterentwicklungsrate liefern (Sumantri et al., 1997). Diese biologische Variabilität scheint sich in Abhängigkeit der einzelnen Samementnahmezeitpunkte beim gleichen Bullen und den einzelnen Pailletten auszuwirken (Otoi et al., 1993). Daher liegt es nahe anzunehmen, dass vor allem unter praktischen Gesichtspunkten weder einheitliche Samenproben zur Verfügung stehen, noch vorhandene *In vitro*-Beurteilungsmethoden eine vernünftige Voraussage zum Befruchtungserfolg zulassen.

Die Standardverfahren in der *In vitro*-Fertilisation versuchen daher, diese Diskrepanzen in der Zahl und Qualität der für IVF zur Verfügung stehenden Spermien durch eine „unphysiologisch“ hohe Konzentration an Spermien zu kompensieren: unter *In vivo*-Bedingungen erfolgt die Befruchtung bei einem Oozyten-Spermien-Verhältnis von nahezu 1:1 (Hunter, 1993). In der *In vitro*-Fertilisation hingegen wird mit einem Oozyten-Spermien-Verhältnis von über 10.000:1 bzw. mit einer Konzentration von 1 Mio Spermien pro ml Medium gearbeitet (Gordon, 2003).

Nach der Ovulation hat die Eizelle nur eine sehr begrenzte Lebensdauer, innerhalb der die Initiation der Befruchtung stattfinden muss (Hunter, 1989, Hunter und Greve 1997). Die zeitlichen Abläufe der Befruchtung sind relativ genau festgelegt. Die erste Spermienpenetration in das Ooplasma ist nach 6 Stunden zu verzeichnen. Weitere 1 bis 2 Stunden werden für die Kondensation des Spermienkopfes benötigt und in 4 bis 6 Stunden entwickelt sich das Pronukleusstadium. Die erste Zellteilungsaktivität ist mit ca. 28 Stunden zu erkennen (Xu und Greve, 1988). Viele Studien versuchten dem zeitlichen *In vivo*-Geschehen *in vitro* Rechnung zu tragen, indem sie die Zeit der Spermienkoinkubation mit den Eizellen verkürzten (Rehman et al., 1994, Kochhar et al., 2003, Ward et al., 2002; Pavlok, 2000). Kürzere Koinkubationszeiten bei Standardkonzentrationen (1 Mio Spermien/ml) hatten zur Folge, dass die



Penetrationsraten und damit die Zellteilungsraten reduziert waren (Dode et al., 2002). Andere Arbeiten hingegen intensivierten die *In vitro*-Fertilisation, indem sie die Eizellen für kurze Zeit (6 Stunden) mit einer sehr hohen Spermienkonzentration (10 Mio Spermien/ml) koinkubierten (Nedambale et al., 2004). Eine besondere Rolle bei der Befruchtung kommt den die Eizelle umgebenden Cumuluszellen zu. Für praktische Zwecke werden die Eizellen zum Teil denudiert, um den Fertilisierungsvorgang zu erleichtern bzw. Samen mit geringerer Konzentration bzw. Motilität erfolgreich verwenden zu können (Galli et al., 2003). Auf der anderen Seite scheint die Anwesenheit der Cumuluszellen dennoch für den Befruchtungsvorgang von Vorteil zu sein (Fontes et al., 2002; Pavlok, 2000).

Um die physiologischen Abläufe, die aus der *In vivo*-Entwicklung bekannt sind, und die bislang nicht effektiv in die *In vitro*-Produktion umgesetzt werden konnten, mehr zu berücksichtigen, war es Ziel dieser Untersuchung, Eizellen und Embryonen unter Einbeziehung intensiver *In vitro*-Kurzzeitinkubationen mit Samen in den Rindereileiter zu übertragen.

Dazu wurden in Vorversuchen Eizellen standardmäßig behandelt und mit/ohne Cumuluszellen bzw. in Alginat übertragen, oder aber nur wenige Stunden mit einer überhöhten Konzentration von Samen *in vitro* koinkubiert und dann übertragen.

Im Hauptversuch wurden dann Cumulus-Oozyten-Komplexe mit 5 Mio Spermien für wenige Stunden koinkubiert und anschließend bzw. am nächsten Tag übertragen. Als Fortführung der Routine-*In vivo*-Kultur und als Kontrolle wurden Embryonen im 4- bis 8-Zellstadium übertragen. Parallel wurde die *In vitro*-Produktion durchgeführt.

#### 2.4.5.2 Material und Methoden

##### Vorbereitung der Empfängertiere

Insgesamt wurden aus dem Gesamtbestand 79 Tiere mit regelmäßigem Zyklus und unauffälligem Genitaltrakt ausgewählt. Das Alter der Tiere lag zwischen 18 und 30 Monaten. Diese Tiere wurden nach dem bekannten Ovsynch-Protokoll vorbereitet (Abbildung 48).

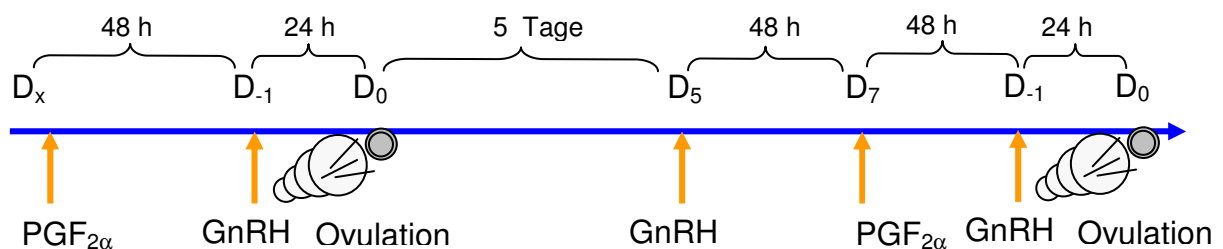


Abbildung 48: Ovsynch-Protokoll nach Mialot et al., (2003, modifiziert)

Der Synchronisationserfolg, die Ovulationsseite, das morphologische Erscheinungsbild des Gelbkörpers sowie dessen Alter wurden während des endoskopischen Einsatzes bestimmt.

##### Tiervorbereitung zur *In vivo*-Kultur und Gewinnung

Die Tiere wurden analog zur vorherigen Untersuchung (siehe Punkt 2.4.4.2) vorbereitet, die Embryonen und Eizellen endoskopisch übertragen und wiedergewonnen.

Die Aufteilung der Tiere auf die einzelnen Versuchsgruppen war wie folgt (Tabelle 34):

Tabelle 34: Bildung der Versuchsgruppen für die *In vivo*-Kultur

<b>Versuchseinteilung</b>	<b>Tierzahlen</b>
<b>Vorversuch</b>	
Samenkurzzeitinkubation	20
Embryonen nach IVF	25
<b>Hauptversuch</b>	
Gametentransfer nach 3-4 h IVF	11
Zygotentransfer aus Kurzzeit-IVF	13
Transfer von 4- bis 8-Zellstadien	10
<b>Summe:</b>	<b>79</b>

Vorbereitung der Eizellen und Embryonen im Labor (siehe Punkt 2.4.4.2)

Als Quelle der Eizellen dienten Eierstöcke nahe gelegener Schlachthöfe.

**IVM**

Die Cumulus-Oozyten-Komplexe (COC) wurden in modifiziertem Parker Medium (MPM, 10% Hitze-inaktiviertes Serum östrischer Kalbinnen - OCS, 10 µg/ml Äquivalente pFSH) bei 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> und maximaler Luftfeuchtigkeit für 22 bis 24 Stunden maturiert.

**IVF**

Nach dem Auftauen und Trennen (Swim up-Verfahren) der Spermien erfolgte die *In vitro*-Fertilisation (Fert-TALP, 6 mg/ml BSA, 0,02 mg/ml Heparin).

Für die Versuchsgruppen wurden unterschiedliche Samenkoinkubationszeiten und Samenkonzentrationen/-mengen gewählt (Tabelle 35):

Tabelle 35: Eizell/Spermieninkubation vor dem Transfer

<b>Tiergruppe</b>	<b>Samenkonzentration (Spermien/ml)</b>	<b>Koinkubationszeit</b>
<b><u>Vorversuch</u></b>		
<b>COC + Samen</b>	1,5-2 Mio	Direkttransfer, ohne Vorinkubation
<b>COC D<sub>0</sub></b>	5 Mio	1 Stunden Vorinkubation vor dem Transfer
<b>Zygoten<sup>c</sup> D<sub>1</sub></b>	5 Mio	1-2 Stunden Vorinkubation vor dem Transfer
<b><i>In vivo</i>-Kultur nach IVF</b>	1 Mio	22 Stunden
<b><u>Hauptversuch</u></b>		
<b>Gametentransfer</b>	5 Mio	3 – 4 Stunden
<b>Zygotentransfer</b>	5 Mio	3 – 4 Stunden
<b>ET von 4-8 Zeller</b>	1 Mio	22 Stunden
<b>IVP</b>	1 Mio	22 Stunden

Die Koinkubation erfolgte, entsprechend der angegebenen Zeit, bei 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> und maximaler Luftfeuchtigkeit.

Die Embryonen, die über die Gesamtdauer bzw. 1 bis 3 Tage vor dem Embryotransfer *in vitro* gehalten wurden, wurden in CR1aa-Medium kultiviert (10% OCS, 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 5% O<sub>2</sub>). Nach 60 Stunden wurde die Teilungsrate bzw. am 7. und 8. Tag die Blastozystenrate bestimmt.

Für den Transfer wurden Embryonen aus dem Vorversuch zum Teil in Alginat eingebettet (siehe Punkt 2.4.4.2). Die Befüllung der Transferkapillare entspricht der Darstellung aus Abbildung 42. Die statistische Beschreibung und Auswertung wurden in Anlehnung an die Beschreibung aus Punkt 2.4.4.2 ausgeführt.

Für die Vergleichsgruppe, in der die Embryonen die *In vitro*-Produktion vollständig durchliefen, wurden 10 Versuchsansätze á ca. 50 COC vorbereitet.

### 2.4.5.3 Ergebnisse

In den Vorversuchen wurden insgesamt 45 *In vivo*-Kulturaktionen durchgeführt, in denen 1357 Cumulus-Oozyten-Komplexe und Embryonen unterschiedlicher Stadien übertragen wurden. Davon konnten 733 Komplexe am Kulturtag 7 gespült werden

(54%). 78 (10,6%) Blastozysten waren am Tag 7 zu erkennen, während sich über einen weiteren Tag *In vitro*-Kultur die Zahl der Blastozysten auf 104 (14,2%) erhöhte. Die Ergebnisse aus der *In vivo*-Kultur in den Vorversuchen zeigen zum einen ein sehr heterogenes Bild. Auf der anderen Seite ist deutlich zu erkennen, dass über sämtliche Versuchsgruppen erfolgreich Cumulus-Oozyten-Komplexe und Embryonen *in vitro*-kultiviert werden konnten.

Die besten Ergebnisse werden durch die Tiergruppe vertreten, denen Embryonen im 4- bis 8-Zellstadium übertragen wurden. Bei 3 Tieren konnten von den transferierten Embryonen 71% wiedergewonnen werden, von denen sich am Tag 8 44% zu Blastozysten entwickelt hatten.

Bei 11 Tieren wurden Cumulus-Oozyten-Komplexe gemeinsam mit Spermien ohne Vorinkubation übertragen. Etwas mehr als die Hälfte konnte am Tag 7 gespült werden, von denen sich am Tag 8 21% zu Blastozysten entwickelt hatten.

Die schlechtesten Werte wurden in der Gruppe beobachtet, in der Zygoten im verbleibenden Cumulus und zusätzlich in Alginat verpackt auf 6 Empfängertiere transferiert wurden. Es konnten schließlich nur 2 Blastozysten gewonnen werden (siehe Tabelle 36).

Tabelle 36: Ergebnisse aus unterschiedlichen *In vitro*-Fertilisationsansätzen und nachfolgender Zeit bis zum Transfer

Tiergruppe	Zwischen- inkubation	Tiere n	Transferierte Embryonen n	Gewonnene Komplexe n (%)	Blastozyten	
					Tag 7 n (%)	Tag 8 n (%)
<b>Samenkurzeitinkubation</b>						
<b>COC + Samen</b>	ohne, 1,5-2 Mio	11	408	216 (53%)	36 (17%)	46 (21%)
<b>COC D<sub>0</sub></b>	1 h, 5 Mio	2	75	49 (65%)	0	0
<b>Zygoten<sup>c</sup> D<sub>1</sub></b>	1-2 h, 5 Mio	7	389	168 (43%)	9 (5%)	17 (10%)
<b>Summe</b>		20	862	433	45	64
<b>Embryonen nach IVF</b>						
<b>Zygoten<sup>c</sup> D<sub>1</sub></b>	nach IVF	7	165	96 (58%)	9 (9%)	13 (14%)
<b>Zygoten<sup>c,a</sup> D<sub>1</sub></b>	nach IVF	6	107	68 (64%)	1 (1.5%)	2 (3%)
<b>Embryonen<sup>a</sup> D<sub>2</sub></b>	nach IVF	4	101	70 (69%)	9 (13%)	11 (16%)
<b>Embryonen D<sub>2</sub></b>	nach IVF	5	45	28 (62%)	1 (4%)	1 (4%)
<b>Embryonen D<sub>3</sub></b>	nach IVF	3	45	32 (71%)	13 (41%)	14 (44%)
<b>Summe</b>		25				
<b>Gesamt:</b>		45	1357	733	78	104

Zygoten<sup>a</sup>: Zygoten in AlginatZygoten<sup>c</sup>: Zygoten in CumulusD<sub>0,1,2</sub>: Tage nach Befruchtung

Der eigentliche Hauptversuch wurde von 3 Empfängergruppen gebildet, denen entweder Cumulus-Oozyten-Komplexe, Zygoten oder Embryonen im 4- bis 8-Zellstadium übertragen wurden.

In der ersten Versuchsgruppe wurden Gameten nach 3 bis 4-stündiger *In vitro*-Vorinkubation auf 11 temporäre Empfänger übertragen. Von 575 Cumulus-Oozyten-Komplexen wurden 420 Komplexe (Gewinnungsrate: 73%) am Tag 7 gewonnen, von denen 276 geteilte Stadien (Teilungsrate: 65,7%) zu beobachten waren. Direkt nach der Spülung am Tag 7 waren 97 Blastozysten (Blastozystenrate: 23,1%) gefunden worden, während sich nach einer weiteren *In vitro*-Kultur für 24 Stunden die Blastozystenrate auf 24,8% (104 Blastozysten) einstellte. Besonders auffällig in dieser Gruppe war die Aufspaltung im Bezug auf die Blastozystenrate. Bei 5 Tieren konnten trotz durchschnittlich guter Gewinnungsrate nur 1 bis 3 entwickelte Blastozysten befunden werden. Bei weiteren 5 Empfängertieren waren zweistellige Blastozystenanzahlen (von 13 bis 25 Blastozysten) zu verzeichnen (siehe Tabelle 37).

Tabelle 37: Ergebnisse aus der *In vivo*-Kultur vom Gametentransfer - GIFT

Kuh-Nr.	Transferierte	Gewonnene	Geteilte	Blastozysten	Blastozysten
	Embryonen	Komplexe	Stadien	D7	D 8
	n	n	n	n	n
1	50	28	11	1	1
2	50	9	4	1	1
3	49	12	6	1	1
4	50	27	11	2	2
5	48	53	40	2	3
6	49	48	32	7	8
7	50	31	21	12	13
8	76	76	43	12	13
9	50	37	27	14	15
10	53	53	44	21	22
11	50	46	37	24	25
<b>Summe</b>	575	420	276	97	104

In der zweiten Empfängergruppe wurden 489 Cumulus-Oozyten-Komplexe, die 3 bis 4 Stunden mit 5 Mio Spermien/ml inkubiert wurden, am folgenden Tag als Zygoten im Rest-Cumulus übertragen. Von diesen COC konnten am 7. Kulturtag 175 Komplexe (Gewinnungsrate: 35,8%) gewonnen werden. Nur 44% waren als geteilte Embryonalstadien zu erkennen ( $n = 77$ ), von denen 26 Blastozysten waren (Blastozystenrate: 14,9%). Am Tag 8 war ein weiterer Embryo im Blastozystestadium zu beobachten. 4 der 13 Transfers waren ohne jeden Entwicklungserfolg. Bei den anderen Tieren wurde schließlich nur 1 bis 6 Blastozysten gewonnen (siehe Tabelle 38).

Tabelle 38: Ergebnisse aus der *In vivo*-Kultur vom Zygotentransfer - ZIFT

Kuh-Nr.	Transferierte	Gewonnene	Geteilte	Blastozysten	Blastozysten
	Embryonen	Komplexe	Stadien	D7	D 8
	n	n	n	n	n
1	38	15	14	0	0
2	38	12	2	0	0
3	38	2	0	0	0
4	36	10	0	0	0
5	30	5	4	1	1
6	39	12	5	1	1
7	40	3	1	1	1
8	40	14	7	2	2
9	40	7	6	3	3
10	40	17	14	4	4
11	40	26	7	4	4
12	30	26	5	5	5
13	40	26	12	5	6
<b>Summe</b>	489	175	77	26	27

3 Tage nach *In vitro*-Kultur wurden 643 Embryonen im 4- bis 8-Zellstadium auf 10 Empfängertiere übertragen. Nach 4 Tagen der *In vivo*-Kultur (Kulturtag 7) konnten 568 Embryonen (Gewinnungsrate: 88,3%) gewonnen werden. Unmittelbar nach der Gewinnung war bei 171 Embryonen das Blastozystestadium (Blastozystenrate: 30,1%) zu erkennen. Nach einem weiteren Tag der *In vitro*-Kultur hatten sich schließlich 244 Embryonen zu Blastozysten (Blastozystenrate: 43%, in Bezug auf die gewonnenen Embryonen) entwickelt. Da aus der *In vitro*-Kultur dieser Embryonen von einem Gesamtpool an Cumulus-Oozyten-Komplexen nur 78% (entspricht der Teilungsrate zum 4- bis 8-Zellstadium) für den Transfer und die *In vivo*-Kultur verwendet wurden, beträgt die korrigierte Blastozystenrate für Tag 7 23,5% und für den 8. Tag 33,5% (siehe Tabelle 39). Besonders auffällig war ein Transferereignis, zu dem 143 Embryonen auf ein Tag 3-synchronisiertes Rind transferiert wurden. Insgesamt konnten bei diesem Tier 137 Embryonen gespült und davon 48 Blastozysten am Tag 7 und 72 Blastozysten am Tag 8 gezählt werden. Bei allen Tieren konnte am Tag 8 eine hohe Blastozystenanzahl (zweistellig) beobachtet werden.

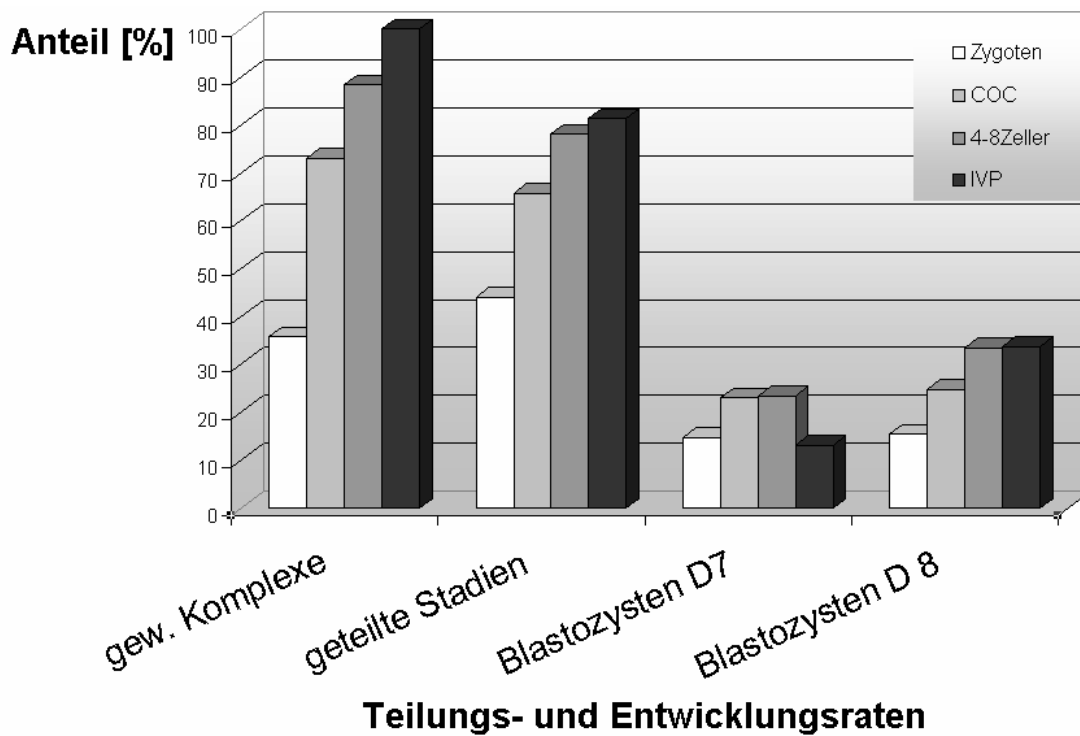
Tabelle 39: Ergebnisse aus der *In vivo*-Kultur von Embryonen im 4- bis 8-Zellstadium

Kuh-Nr.	Transferierte Embryonen	Gewonnene Komplexe	Blastozysten D7	Blastozysten D 8
	n	n	n	n
1	54	46	9	14
2	58	43	10	14
3	49	40	11	15
4	58	46	12	17
5	50	48	16	17
6	50	39	11	19
7	46	46	13	20
8	76	65	21	25
9	59	58	20	31
10	143	137	48	72
<b>Summe</b>	643	568	171	244



In der *In vitro*-Kultur wurden über 10 Ansätze insgesamt 477 Cumulus-Oozyten-Komplexe *in vitro*-maturiert, *in vitro*-fertilisiert und kultiviert. 60 Stunden nach Fertilisierungsbeginn hatten sich 398 Eizellen geteilt (Teilungsrate: 83,4%). Nach 7 Tagen waren 63 Blastozysten (Blastozystenrate: 13,2%) und am Tag 8 161 Blastozysten (Blastozystenrate: 33,75%) in Kultur. In Abbildung 49 sind die Ergebnisse graphisch gegenübergestellt.

Statistisch betrachtet unterscheiden sich alle Gruppe bezüglich der Gewinnungsraten und der Teilungsraten mit  $p < 0,001$  (Anova). Der Gruppenunterschied in dem Merkmal „Blastozystenrate am Tag 7“ war ebenfalls signifikant ( $p < 0,05$ , Anova), diese Unterschiede wurden jedoch mit den Blastozystenraten am Tag 8 ( $p < 0,001$ , Anova) deutlicher.



$p < 0,001$ : Gewonnene Komplexe, geteilte Stadien, Blastozystenrate am Tag 8  
 $p < 0,05$ : Blastozystenrate am Tag 8

Abbildung 49: Einfluss der Embryokultur auf die Entwicklungsrate:  
 Geteilte Stadien aus Gruppe „4-8 Zeller“ = Teilungsrate aus IVP-Kultur für die 4-8 Zellgruppe

#### 2.4.5.4 Diskussion

In der letzten Studie in diesem Projekt wurden in einem Vorversuch bzw. im folgenden Hauptversuch essentielle praktische Ansätze gewählt, die als Summe aus den elementaren Erkenntnissen der Teilversuche aus diesem Projekt diskutiert wurden.

Nachdem in Untersuchungen zu diesem Projekt Faktoren zur Beeinflussung der Findungsrate dargestellt wurden, und der direkte Ko-Transfer von Ei- und Samenzellen nicht vergleichbar zu den Entwicklungsraten aus dem Transfer von 4- bis 8-Zellstadien war, wurden die Behandlungen modifiziert. Demnach sind in den Vorversuchen (i) Cumulus-Oozyten-Komplexe direkt mit Samen, (ii) in unterschiedlicher Samenkonzentration 1 bis 2 Stunden vorinkubiert oder aber (iii) nach *In vitro*-Fertilisation in unterschiedlichen Stadien mit und ohne Rest-Cumulus bzw. in Alginat übertragen worden. Insgesamt zeigen diese verschiedenen Ansätze ein sehr heterogenes Bild der Weiterentwicklung und repräsentieren in Summe alle Einflüsse, die die Aufnahme der Eizellen und Embryonen und deren Weiterentwicklung im Eileiter bestimmen (Abbildung 50).

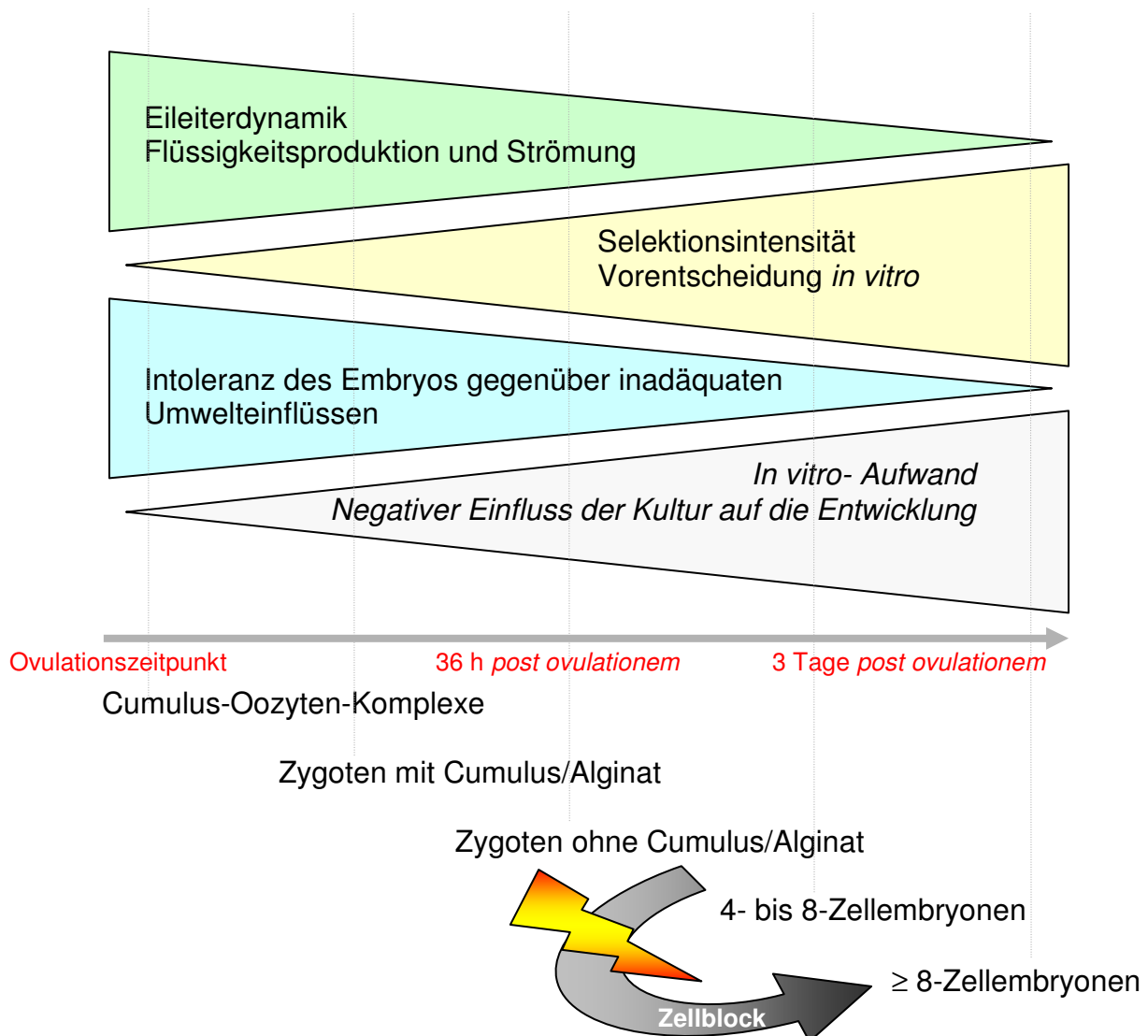


Abbildung 50: Einfluss zum Zeitpunkt des Transfers auf die Findungs- und Weiterentwicklungsrate

Dennoch konnte in den Vorversuchen sehr gut verdeutlicht werden, dass vom *in vitro*-maturierten Cumulus-Oozyten-Komplex bis zum Embryo an verschiedenen Tagen alle Stadien mit Erfolg übertragen werden können. Eine „Schwachstelle“ jedoch bietet der Embryotransfer im Zygoten- bzw. Zweizellstadium. In diesem Stadium und ohne weitere morphologische Anpassung an die Größe und Dynamik in der Ampulle des Eileiters ist mit erheblichen Verlusten der Embryonen zu rechnen. Zudem sind diese Embryonalstadien sehr empfindlich gegen inadäquate Behandlungen.

Aus diesen Vorversuchen heraus wurde der Hauptversuch etabliert: Es wurden Cumulus-Oozyten-Komplexe mit 5 Mio Spermien/ml für 3 bis 4 Stunden vorinkubiert, bevor die COC bzw. Zygoten am folgenden Tag in die Eileiter transferiert wurden. Parallel wurden *in vitro*-maturierte COC im Standardverfahren fertilisiert (1 Mio Spermien/ml, 24 h Inkubation) und entweder als 4- bis 8-Zellembryonen übertragen oder vollständig *in vitro*-kultiviert.

Der Gametentransfer stellt insofern eine Besonderheit dar, da er für die *In vitro*-Produktion von besonderer Bedeutung wäre. Außer der *In vitro*-Maturation wären keine weiteren labortechnischen Aufwendungen für die Befruchtung und 7- bis 8-Tagekultur nötig. Die Idee des sogenannten GIFT war schon seit langem diskutiert worden (Konferenzen, Meetings etc.), dennoch lassen fehlende Publikationen auf die Schwierigkeit der optimalen Gametenkombination mit den bislang aufwändigen Techniken jeden Erfolg missen. Gegenüber den in Punkt 2.4.4 beschriebenen GIFT-Versuchen, in denen ein Direkttransfer der Gameten (Eizellen und Spermien) bewerkstelligt wurde, konnten in diesem Versuch die Blastozystenraten gesteigert werden, indem zwar eine 3- bis 4-stündige Vorinkubation der Eizellen mit dem Spermien durchgeführt wurde, der Transfer aber noch am selben Tag stattfand und damit die Übernachtskultur ebenfalls wegfiel. In diesem Versuch konnten durch die Kurzzeitinkubation der COC mit Spermien folgende Verbesserungen erreicht werden:

- bessere Entwicklungsraten bis Tag 8 bei schlechteren *In vitro*-Kontrollergebnissen (GIFT-Tag 8: **24,8%** Blastozysten; IVP-Tag 7: 13,2% Blastozysten; IVP-Tag 8: 33,7% Blastozysten) gegenüber der Untersuchungsergebnissen aus Punkt 2.4.4.3/Tabelle 32 (GIFT-Tag 8: **19,9%** Blastozysten; IVP-Tag 7: 20,9% Blastozysten; IVP-Tag 8: 37,7% Blastozysten).

- Aufspaltung der GIFT-Gruppe in Tiere mit guten und schlechten Weiterentwicklungsraten: Bei 6 von 11 Tieren wurden 328 COC mit Spermien übertragen, wovon 96 Blastozysten (ca. 30%) gewonnen werden konnten.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse die in Abbildung 49 dargestellten Einflussfaktoren auf die Findungs- und Weiterentwicklungsraten. In der GIFT-Gruppe zeigten die restlichen 5 von 11 Tieren eine Blastozystenanzahl zwischen 1 und 3. Die „Polarisierung“ der Embryoentwicklung in zwei markant getrennte Gruppen verdeutlicht einen möglichen systematischen negativen Einfluss auf den Teil der Cumulus-Oozyten-Komplexe, der deutlich schlechterer Ergebnisse lieferte. Die extreme Empfindlichkeit der Cumulus-Oozyten-Komplexe lässt damit nur das Ausmaß einer derartigen Beeinflussung auf COC vermuten, nicht jedoch die eigentliche Ursache.

Der Transfer von Zygoten (ZIFT) und deren Rückgewinnung zeigt erneut sehr schlechte Gewinnungs- (1/3) und Entwicklungsraten (15% Blastozysten). Daher empfiehlt es sich nicht, Zygoten für die *In vivo*-Kultur zu übertragen, da es von diesen Stadien offensichtlich nicht toleriert wird, wenn sie aus dem Kulturmedium unter definierten Inkubatorbedingungen genommen werden. Zudem scheint dieser

Zeitpunkt des Transfers eine ungünstige Kombination aus Embryo-morphologischen mit Eileiter-dynamischen Faktoren zu sein (Abbildung 51).

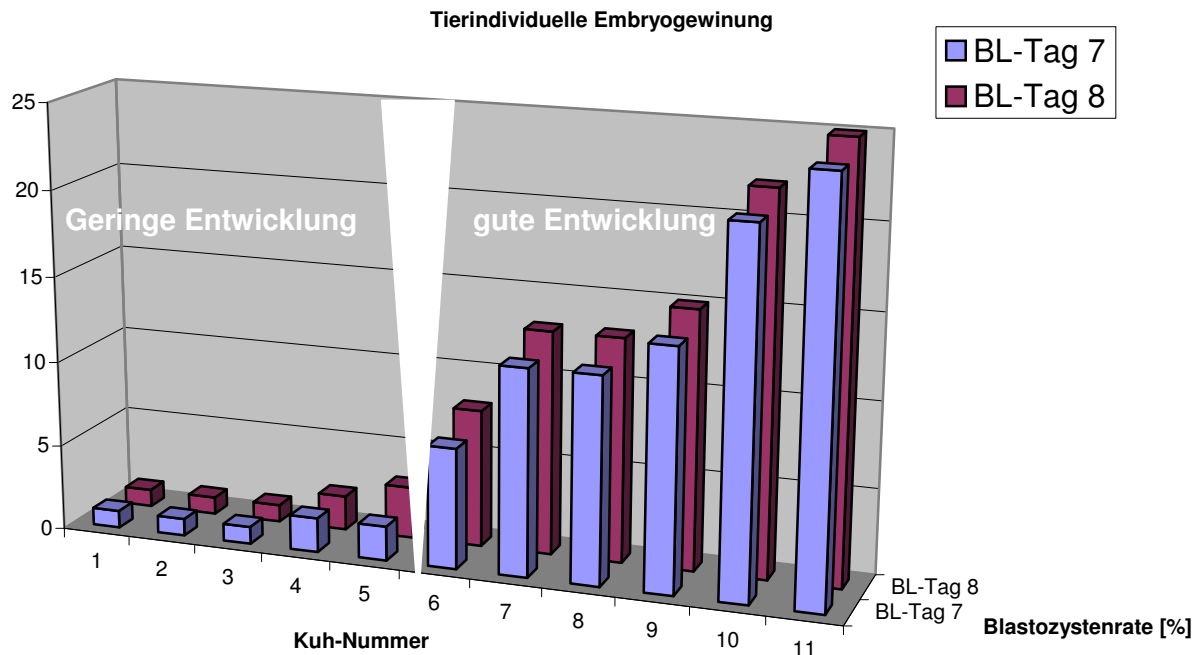


Abbildung 51: Darstellung der unterschiedlichen Entwicklungsraten aus dem Transfer von Gameten (GIFT)

Der Transfer von 4- bis 8-Zellstadien vervollständigt die notwendigen Voraussetzungen seitens des Embryos und des Eileiters, da über 88% der Komplexe wiedergefunden wurden und sich 43% von diesen zu Blastozysten entwickelt hatten.

#### 2.4.5.5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieses Untersuchungsabschnittes verdeutlichen, dass sowohl Cumulus-Oozyten-Komplexe im Rahmen des Gametentransfers (GIFT) wie auch progressivere Stadien (4- bis 8-Zellembryonen) erfolgreich zur *In vivo*-Kultur in den Eileiter übertragen werden können. Alle hier aufgezeigten Transferstadien aus dem Vorversuch und dem eigentlichen Versuch verdeutlichen in Summe essentielle Einflussfaktoren, die erheblich den Erfolg des Verfahrens beeinflussen können. Im weiteren geben auch die hohen Findungsraten im Zusammenhang mit den Entwicklungsraten einen entscheidenden Hinweis auf den möglichen Erfolg des Embryo-Einzeltransfers wieder, welcher im Bereich guter Trächtigkeitsraten anzustreben wäre.

#### 2.4.5.6 Literatur

Brevini-Gandolfi T, Favetta LA, Lonergan P, Gandolfi F. (2000): The mechanism regulating maternal mRNA stability and translation is affected in bovine embryos with low developmental competence. *Theriogenology* 53,268.

Correa JR, Pace MM, Zavos PM (1997): Relationships among frozen-thawed sperm

characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and the fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology* 48,721-731.

Correa JR, Zavos PM (1994): The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 42,351-360.

Dode MAN, Rodovalho NC, Ueno VG, Fernandes CE (2002): The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *bos indicus* oocytes. *Anim Reprod Sci* 69,15-23.

Fazeli AR, Steenweg W, Bevers MM, de Loos FAM, van den Broek J, Colenbrander B (1993): Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. *Vet Rec* 132,14-16.

Fontes RS, Matos LF, Reichenbach HD (2002): Effect of different denudation procedures on in vitro fertilization of bovine oocytes and embryo development. *Theriogenology* 57,665(abstr.).

Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G (2003): Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59,599-616.

Gordon IR (2003): Laboratory Production of Cattle Embryos. In: *Biotechnology in Agriculture Series, No.27* (Ed.: Ian Gordon, 2 nd Edition), CAB International, Wallingford, Oxon, United Kingdom.

Harrison RAP, Vickers SE (1990): Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 88,343-352.

Henault MA, Killian GJ (1995): Effects of sperm preparation and bull fertility on in vitro penetration of zona-free bovine oocytes. *Theriogenology* 43,739-749.

Hillery FL, Parrish JJ, First NL (1990): Bull specific effect on fertilization and embryo development in vitro. *Theriogenology* 33,249.

Hunter RHF (1989): Aging of the unfertilised cow egg in vivo: how soon is fertility compromised. *Vet Rec* 124,489-490.

Hunter RHF (1993): Sperm:egg ratios and putative molecular signals to modulate gamete interactions in polytocous mammals. *Mol Reprod Dev* 35,324-327.

Hunter RHF, Greve T (1997): Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. *Reprod Dom Anim* 32,137-141.

Janskauskas A, Johannisson A, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H (2000): Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology* 53,859-875.

Janskauskas A, Rodriguez-Martinez H (1995) : Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. *Acta Vet Scand* 36,571-574.

Kjaestad H, Ropstad E, Anderson-Berg K (1993): Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet Scand* 34,299-303.

Kochhar HS, Kochhar KP, Basrur PK, King WA (2003): Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of in vitro produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 77, 33-49.

Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Parrish JJ, First NL (1989): In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 31,61-74.

Lenz RW, Martin JL, Bellin ME, Ax RL (1988): Predicting fertility of dairy bulls by inducing acrosome reactions in sperm with chondroitin sulfates. *J Dairy Sci* 71,1073-1077.

Lonergan P, Khatir H, piumi F, Rieger D, Humblot P, Boland MP (1999): Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex and pregnancy rates following transfer of bovine preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 117,159-167.

Marks JL, Ax RL (1985): Relationship of nonreturn rates of dairy bulls to binding affinity of heparin to sperm. *J Dairy Sci* 68,2078-2082.

Marquant-Le Guienne B, Humblot P, Thibier M, Thibault C (1990) : Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fertilization tests. *Reprod Nutr Dev* 30,259-266.

Nedambale TL, Dinnyés A, Groen W, Dobrinsky JR, Tian XC, Yang X (2004): Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, In Press.

Ohgoda O, Niwa K, Yuhara M, Takahashi S, Kanoya K (1988): Variations in penetration rates in vitro of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. *Theriogenology* 29,1375-1381.

Otoi T, Tachikawa S, Kondo S, Suzuki T (1993): Effects of different lots of semen from the same bull on in vitro development of bovine oocytes fertilized in vitro. *Theriogenology* 39,713–718 .

Pavlok A (2000): D-Penicillamine and Granulosa Cells can Effectively Extend the Fertile Life Span of Bovine Frozen-Thawed Spermatozoa In Vitro: Effect on Fertilization and Polyspermy *Theriogenology* 53,1135-1146.

Rehman N, Collins AR, Suh TK, Wright RW Jr (1994): Effect of sperm exposure time on in vitro fertilization and embryo development of bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 41,1447-1452.

Revell SG, Mrode RA (1994): An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci* 36,77-86.

Rota A, Penzo N, Vincenti L, Mantovani R. 2000. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology* 53,1415-1420.

Shi DS, Lu KH, Gordon I. (1990): Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development in vitro. *Theriogenology* 33,324.

Sumantri C, Boediono A, Ooe M, Murakami M, Saha S, Suzuki T (1997): The effect of sperm-oocyte incubation time on in vitro development using sperm from a tetraparental chimeric bull. *Anim Reprod Sci* 48,187–195.

Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P (2002): Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57,2105-2117.

Whitfield CH, Parkinson TJ (1992): Relationship between fertility of bovine semen and in vitro induction of acrosome reactions by heparin. *Theriogenology* 38,11-20.

Whitfield CH, Parkinson TJ (1995): Assessment of the fertilizing potential of bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). *Theriogenology* 44,413-422.

Xu KP, Greve T (1988): A detailed analysis of early events during in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *J Reprod Fertil* 82,127–134.

Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H (1998): Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. *Int J Androl* 21,207-216.

### **3 Zusammenarbeit, Besuche, sonstige Kontakte im Rahmen des Projekts, Ausbildungs- und Fortbildungsmaßnahmen**

Das Projekt konnte für verschiedenste interdisziplinäre Aufgaben in Anspruch genommen werden. Diese Aufgaben gliedern sich in folgende Bereiche:

#### 3.1 Kooperationen

#### 3.2 Besuche und Einsicht in die Arbeiten anderer Labors

#### 3.3 Wissenschaftliche Aktivitäten

- Teilnahme an Konferenzen
- Vorträge
- Publikationen
- Posters
- Eingereichte Manuskripte

#### 3.4 Ausbildungs- und Weiterbildungsmaßnahmen

#### 3.5 Projektbezogene Kontakte

### **3.1 Projektbezogene Kontakte und Kooperationen**

Im 1. Projektjahr konnten zahlreiche Kontakte auf nationaler Ebene stattfinden, die sich vor allem im Besuch landwirtschaftlicher Betriebe widerspiegeln. Im 2. und 3. Projektjahr konzentrierten sich die Aktivitäten auf Zucht- bzw. Bundesländerebene. Das Kooperationsinteresse bestand aus den Schritten

- (i) Aufbau eines Programmablaufes analog des Projektinhaltes,
- (ii) Besuch, Durchführung und Hilfestellung bei den Programmen,
- (iii) Austausch von wissenschaftlichem Personal.

1. Frau Dr. Nikica Prvanovic, Laboratory for Assisted Reproduction of the Clinic for Obstetrics and Reproduction, University of Zagreb, Kroatien, Faculty of Veterinary Medicine, Dekan und Vorstand: Prof. D. Zdenko Makek.
2. Prof. Dr. Ongun Uysal, Veterinärmedizinische Fakultät in Ankara, Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara, Türkei.
3. Kooperation mit Tschechien:
  - Prof. Dr. Jan Motlik, Institute of Animal Physiology and Genetics, The Academy of Sciences of the Czech Republic, Libechev, Tschechien; Univ.
  - Doz. Radovan Dolezel, Clinic for Obstetrics, Andrology and Reproduction, University of Veterinary Medicine and Pharmacology, Brno, Tschechien.
4. Institut für Tierzuchtwissenschaften der Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Versuchsgut Frankenforst Geschäftsführender Direktor und Vorstand: Prof. Dr. K. Schellander.
5. Frau Univ. Prof. Dr. med.vet. Monika Egerbacher und Frau Prof. Dr. rer.nat. Ingrid Walter, Department für Pathobiologie Institut für Histologie und Embryologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, A-1210 Wien,



Veterinärplatz 1, Durchführung der histologischen Arbeiten

6. Dr. Iva Getz, Laboratory for Assisted Reproduction of the Clinic for Obstetrics and Reproduction, University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine, Dekan und Vorstand: Prof. D. Zdenko Makek.
7. Prof. Dr. DVM. Jozef Laurincik, PhD. DSc., Konstantin the Philosopher University, Faculty of Natural Sciences, Institute of Experimental Biology Tr. A. Hlinku 1, SK-949 74 Nitra, Slovak Republic.
8. P. Maddox-Hyttel, Department of Anatomy and Physiology, Royal Veterinary and Agricultural University, Groennegaardsvej 7, DK-1870 Frederiksberg C, Denmark.
9. Dr. Brad Stroud, 6601 Granbury Hwy, Weatherford, TX 76087, Phone (817) 599-7721, Fax (817) 596-5548, E-mail: [bstroud@biotechproductions.com](mailto:bstroud@biotechproductions.com)
10. Priv.Doz. Dr. Christine Wrenzycki, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierzucht, Forschungsbereich Biotechnologie, Höltystraße 10, D31535 Neustadt, Deutschland.
11. PD Dr. med. vet. Andreas Herrler, Department of Anatomy Reproductive Biology, Medical School RWTH Aachen, Wendlingweg 2, D - 52074 Aachen, Deutschland.
12. Univ.Prof.Dr.Heinz Strohmer, Kinderwunschzentrum, im Goldenen Kreuz, Lazarettgasse 16-18, A-1090 Wien.
13. Dr. Josef Zech, Zentrum für Sterilitätsbetreuung, Franz Fischer Strasse 7b, 6020 Innsbruck.

### 3.2 **Besuche und Einsicht in die Arbeiten anderer Labors - Besuche von Instituten, Mitwirken an Arbeitskreisen**

Von unserer Seite erfolgten Besuche in anderen Labors, um deren Vorgehensweise auf dem Gebiet der Follikelpunktion und der *In vitro*-Produktion kennen zu lernen. Die Besuche erstreckten sich auf folgende Labors:

1. Bayerisches Forschungszentrum für Fortpflanzungsbiologie in Oberschleißheim bei München, Vorstand: Prof. Dr. E. Wolf.
2. Institute of Animal Physiology and Genetics, The Academy of Sciences of the Czech Republic, Libechov, Czech Republic, bei Prof. Pavlok.
3. BETAK: Besamungs- und Embryotransfer Arbeitskreis in der Steiermark, IFA-Tulln mit der Abteilung Biotechnologie in der Tierproduktion hat sich bereit erklärt, im Rahmen des Projektes am diesem Arbeitskreis zur „Höher- und Weiterbildung von Landwirten und Tierärzten“ mitzuwirken; wurde ebenfalls für 3 Jahre genehmigt.

### 3.3 **Wissenschaftliche Aktivitäten**

#### 3.3.1 **Teilnahme an Konferenzen**

Konferenzbesuche, die thematisch dem Projekt zugeordnet werden konnten bzw. die Schwerpunkte zum Inhalt hatten, die in Übereinstimmung mit dem Projekt waren:

1. ESDAR-Meeting: European Society of Domestic Animal Reproduction, 14.- 16 September 2001, Wien.
2. 13<sup>th</sup> Meeting of the European A.I. VETS, 24 – 26 October 2001, Gmunden, Austria.
3. 28. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder (AET-d), Leipzig, Deutschland, 21. – 22. Juni 2001.
4. IETS-Meeting: International Embryo Transfer Society in Foz do Iguassou, Brasilien, 12 – 15 Januar 2002.
6. Arbeitskreis Besamung und Embryotransfer, Bundesanstalt für Landwirtschaft (BAL), 11.10.2002, Gumpenstein, Stmk.
8. 29. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder (AET-d) Bad Waldsee, Deutschland, 20./21. Juni 2002.
9. 1. Hohenzeller Fruchtbarkeitstage, veranstaltet von der Oberösterreichischen Besamungsstation, 9. November 2002, Geinberg, Österreich.
10. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e.V. und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaft, 18.-19 September 2002, Halle (Saale), Deutschland.
11. Gemeinschaftstagung der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaften (GfT) und der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde (DGfZ), 17.-18 September 2003, Göttingen, Deutschland.
12. IETS-Meeting: International Embryo Transfer Society New Zealand, 12 – 15 January 2003.
13. IV Central European Buiatric Congress, 23. – 27. April 2003, Lovran, Croatia.
14. 30. Jahrestagung der deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer (AET-d) am 26./27. Juni 2003 in Mariensee.
15. ESDAR-Meeting: European Society of Domestic Animal Reproduction, 12.-13. September 2003, Dublin.
16. 19<sup>th</sup> Annual Conference of the “Association Europeenne de Transfert Embryonnaire“ A E T E, Rostock, Deutschland, 12-13 September 2003.

17. 31. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder (AET-d) Georgsheil, Deutschland, 17./18. Juni 2004.

Folgende Aktivitäten und Konferenzen, die thematisch dem Projekt zugeordnet werden können bzw. deren Schwerpunkte unter anderem dem des Projektes entsprechend waren:

### 3.3.2 Vorträge

1. Havlicek V, Wetscher F, Huber T, Möblacher G, Walter I, Egerbacher M, Müller M, Brem G, Besenfelder U (2004): In vivo Kultur von IVP-Rinderembryonen im Rindereileiter. 31. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder (AET-d) Georgsheil, Deutschland, 17./18. Juni 2004.
2. Besenfelder U, Wetscher F, Havlicek V, Huber T, Müller M, Brem G, Gilles M, Tesfaye D, Griese J, Rings F, Müller H, Schellander K (2004): In vivo Kultur von IVP-Embryonen im Rindereileiter: Einfluss von Morphologie und Entwicklungsstadium auf den Transfererfolg. 31. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder (AET-d) Georgsheil, Deutschland, 17./18. Juni 2004.
3. G. Möblacher G., Besenfelder U., Gilles M., Rings F., Schneider H., Köster M., Brem G., Müller M., Schellander K. (2003): "Endoscopic collection of bovine embryos at different tubal stages with respect to FSH and eCG treatment", IETS-Meeting: International Embryo Transfer Society in Auckland, Neuseeland, 11. – 15. January 2003.
5. Besenfelder U. (2003). Moderation of the Workshop II entitled: "Oocyte and Embryo collection." Annual Conference of the "Association Europeenne de Transfert Embryonnaire", Rostock, Deutschland, 12-13 September.
6. Wetscher F., Möblacher G., Havlicek V., Huber T., Besenfelder U., Brem G. (2003): "Modulation of follicular dynamic". 19<sup>th</sup> Annual Conference of the "Association Europeenne de Transfert Embryonnaire", Rostock, Deutschland, 12-13 September.
7. Besenfelder U.(2003): "Embryo collection in Cattle", 19<sup>th</sup> Annual Conference of the "Association Europeenne de Transfert Embryonnaire", Rostock, Deutschland, 12-13 September.
8. Besenfelder U. (2003): „Alte Haustierrassen – Neue Chance für die Landwirtschaft: Reproduktionstechniken zur Erhaltung alter Nutzierrassen“, Vortragsveranstaltung der Akademikerguppe VET.Med und des niederösterreichischen Bauernbundes, 08. Mai 2003, Wien.
9. Möblacher G (2003): Anwendung von FSH – Aktueller Stand in Österreich. Workshop der 30. Jahrestagung der deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer (AET-d) am 26./27.Juni 2003 in Mariensee.

10. Besenfelder U. (2003): Assisted reproduction for access to the bovine oviduct. (invited lecture) IV central european buiatric congress, 23. – 27. April 2003, Lovran, Croatia.
11. Wetscher F., Mößbacher G., Havlicek V., Huber T., Besenfelder U., Brem G. (2003): Einflussfaktoren auf die *in vivo*-Kultur *in vitro*-produzierter Rinderembryonen. Gemeinschaftstagung der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaften (GfT) und der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde (DGfZ), 17.-18 September 2003, Göttingen, Deutschland.
12. Besenfelder U. (2002): "Der Embryotransfer und seine Möglichkeiten". BETAK - Besamung und Embryotransfer Arbeitskreis, 29. Mai 2002, Leoben, Stmk.
13. Mößbacher G. (2002): „Erfolgreiches Einfrieren und Auftauen von Embryonen“, BETAK - Besamung und Embryotransfer Arbeitskreis, Bundesanstalt für Landwirtschaft (BAL), 11.10.2002, Gumpenstein, Stmk.
15. Wetscher F., Havlicek V., Huber T., Mößbacher G., Besenfelder U., Brem G. (2002): Untersuchungen zur *in vivo*-Kultur *in vitro*-produzierter Embryonen im Eileiter beim Rind. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e.V. und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaft, 18.-19 September 2002, Halle (Saale), Deutschland.
16. Besenfelder U. (2002): *In vitro* Produktion von Rinderembryonen in Österreich: zwischen Wissenschaft und Praxis. 1. Hohenzeller Fruchtbarkeitstage, veranstaltet von der Oberösterreichischen Besamungsstation, 9. November 2002, Geinberg, Österreich.
17. Mößbacher G, 29. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder (AET-d) Bad Waldsee, Deutschland, 20./21. Juni 2002: "Einfluss der Superovulationsbehandlung auf die embryonale Entwicklungschronologie im Rindereileiter".
18. Besenfelder U. (2001): Endoscopic techniques in animal breeding. 13<sup>th</sup> Meeting of the European A.I. VETS, 24 – 26 October 2001, Gmunden, Austria.

### 3.3.3 Publikationen bzw. Abstracts

1. Mosslacher G., Besenfelder U., Gilles M., Rings F., Schneider H., Köster M., Brem G., Müller M., Schellander K. (2003): Endoscopic collection of bovine embryos at different tubal stages with respect to FSH and eCG treatment. *Theriogenology*, 59 (1), 372.
2. Laurincik J., Schmoll F., Mahabir E., Schneider H., Stojkovic M., Zakhartchenko V., Prella K., Hendrixen PJM., Voss PLAM., Mosslacher G., Avery B., Dieleman SJ., Besenfelder U., Müller M., Ochs RI., Wolf E., Schellander K., Maddox-Hyttel P. (2003): Nucleolar Proteins and Ultrastructure

in Bovine *In vivo* Developed, *In vitro* Produced, and Parthenogenetic Cleavage-Stage Embryos. *Mol Reprod Dev* 65:73–85.

3. Besenfelder U. (2003): Assisted reproduction for access to the bovine oviduct. Proceedings of the IV Central European Buiatric Congress, 21-29.
4. Wetscher F., Havlicek V., Huber T., Mößlacher G., Besenfelder U., Brem G. (2003). Einflussfaktoren auf die *in vivo* Kultur *in vitro* produzierter Rinderembryonen. Kurzfassungen der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde (DGfZ) und der Gesellschaft für Tierzucht (GfT), C01.
5. Wetscher, F., Mosslacher, G., Havlicek, V., Huber, T., Besenfelder, U., Brem, G. (2003): Effect of hCG and Progesterone Administration on Bovine Follicular Development during a Period of three Oestrus Cycles. *Reprod Dom Anim* 38,346.
6. Huber, T., Besenfelder, U., Havlicek, V., Mosslacher, G., Wetscher, F., Brem, G. (2003): Use of Horizontal Swim up Techniques for Bovine *in Vitro* Fertilization. *Reprod Dom Anim* 38,337(P15).
7. Besenfelder U, Wetscher F, Havlicek V, Huber T, De Rover R. (2003) Oocyte and embryo recovery in cattle. A.E.T.E. Newsletter of the Association Europeenne de Transfert Embryonnaire, 20 (December),5-7.
8. Wetscher F., Havlicek V., Huber T., Mosslacher G., Besenfelder U., Brem G. (2002): Untersuchungen zur *in vivo*-Kultur *in vitro*-produzierter Embryonen im Eileiter beim Rind, Kurzfassungen zur Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e.V. und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaft C 05, pp 1-4.
9. Laurincik J., Besenfelder U., Müller M., Schellander K., Maddox-Hyttel P. (2002): Nukleogenesis and rRNA transcription in pre-implantation *in vivo* produced bovine embryos after superovulation. *J Farm Anim Sci* 35,43-47.

#### 3.3.4 Poster

1. Wetscher, F., Mosslacher, G., Havlicek, V., Huber, T., Besenfelder, U., Brem, G. (2003): Effect of hCG and Progesterone Administration on Bovine Follicular Development during a Period of three Oestrus Cycles. ESDAR-Meeting: European Society of Domestic Animal Reproduction, 12.-13. September 2003, Dublin.
2. Huber, T., Besenfelder, U., Havlicek, V., Mosslacher, G., Wetscher, F., Brem, G. (2003): Use of Horizontal Swim up Techniques for Bovine *in Vitro* Fertilization. ESDAR-Meeting: European Society of Domestic Animal Reproduction, 12.-13. September 2003, Dublin.
3. G. Mosslacher G., Besenfelder U., Gilles M., Rings F., Schneider H., Köster M., Brem G., Müller M., Schellander K. (2003): Endoscopic collection of bovine embryos at different tubal stages with respect to FSH and eCG treatment.

IETS-Meeting: International Embryo Transfer Society New Zealand, 12 – 15 January 2003.

### 3.3.5 Eingereichte Manuskripte

1. F. Wetscher, V. Havlicek, T. Huber, M. Müller, G. Brem, U. Besenfelder (2004): Effect of morphological-structural properties of transferred embryonic stages on tubal migration: implications for in vivo culture in the bovine oviduct.
2. F. Wetscher, V. Havlicek, T. Huber, M. Gilles, D. Tesfaye, J. Griese, K. Wimmers, K. Schellander, M. Müller, G. Brem, U. Besenfelder (2004): Intrafallopian transfer of gametes and early stage embryos for in vivo culture in cattle.
3. V. Havlicek, F. Wetscher, T. Huber, G. Brem, M. Mueller, U. Besenfelder (2004): In vivo culture of IVM/IVF derived bovine embryos in oviducts of the homologous species by means of endoscopy.

### 3.4 Ausbildungs- und Weiterbildungsmaßnahmen

Das Projekt wurde weiterhin für Ausbildungs- und Weiterbildungsmaßnahmen genutzt. Folgende Aktivitäten sind innerhalb des ersten Projektjahres durchgeführt worden:

1. Ausbildung im Rahmen der „European College of Animal Reproduction“, 2 tägige Ausbildung für Assistenten europäischer veterinärmedizinischer Universitäts-/Fakultätseinrichtungen, 12. –13. September 2001, Satellitenveranstaltung zur ESDAR-Conference, Ausbildung dient unter anderem als Teilschritt zum Erwerb des „European Diplomate of Reproduction“.
2. Conference of the European AI-Vets in Gmunden, Vortragsveranstaltung 24. – 26 Oktober 2001, Vortragsbeteiligung und sowie Führung/Demonstration am IFA-Tulln.
3. 28. März 2002: Ganztägige Ausbildung von Tierärzten (Dr. Peter Paulitsch, Dr. Hans Hofer TGD-Steiermark).
4. Beitrag zum BETAK: Besamung und Embryotransfer Arbeitskreis in Leoben, 29. Mai 2002.
5. Beitrag zum BETAK: Besamung und Embryotransfer Arbeitskreis an der Bundesanstalt für Landwirtschaft (BAL) in Gumpenstein, 11.10.2002.

Das Projekt wurde weiterhin für Ausbildungs- und Weiterbildungsmaßnahmen genutzt. Folgende Aktivitäten sind innerhalb des zweiten Projektjahres durchgeführt worden:

Intensivausbildung von Frau Dr. Nikica Prvanovic, University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine, Kroatien Laboratory for Assisted Reproduction of the Clinic for Obstetrics and Reproduction, **14-tägiger Besuch** am IFA-Tulln, Abteilung Biotechnologie in der Tierproduktion, Intensivprogramm und Vorstellung der Methoden im Rahmen des geförderten Projekts.

Prof. Dr. Ongun Uysal, Veterinärmedizinischen Fakultät in Ankara, Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Türkei - **3 Monatiger Besuch** an unserem Institut, Einweisung in die Techniken der *In vitro*-Produktion, ganzheitliche Vorstellung aller im Projekt beschriebenen Verfahren.

Im weiteren wurden zur praktischen Ausbildung die jeweiligen Termine für Studenten der Veterinärmedizinischen Universität ausgeschrieben und als Übungsteil absolviert. Für Studenten der Veterinärmedizinischen Universität und der Universität Wien (Biologie) werden weitere Übungen/Seminare abgehalten (Präimplantative Genetik), die dem Rahmen des Projektes entsprechen:

- Präimplantative Genetik (Stud. Vet., Stud. Biol.)
- Übungen aus Tierzucht und Genetik (Stud. Vet.)
- Schwerpunkt Biotechnologie der Tiere (Stud. Vet.)
- Grundlagen der Biotechnologie (Stud. Biotech.)
- Erstellung von 2 Doktorarbeiten (Vet.-UNI)
- Integration von Studenten, Tierärzten und Landwirten bei kooperativen Arbeiten in
  - Deutschland (München, Bonn)
  - Tschechien (Brno)
  - Italien (Perugia)
- Weiterbildung im Rahmen der Aktivitäten des European College of Animal Reproduction – ECAR  
Bsp.: Dipl- Tz. Jacob Scherzer, Dipl.-ECAR: OPU beim Rind, vorbereitende Arbeiten für PhD-Studiengang an der „University of Liverpool“
- Workshop in Bonn/Gut Frankenforst, 27.04.2004: theoretische Vorstellung und praktischen Ausführungen zum Projekt, Bildung einer kooperativen Plattform (siehe auch Schreiben von PD. Dr. Herrler).

#### Weitere Aktivitäten

Beteiligung an der Arbeitsgruppe „Tiergesundheit, Reproduktion und Genetik“ unter Leitung von Herrn Dr. Dieber, Ausarbeitung des Tiergesundheitsprogramms **„Fruchtbarkeit und Zuchtmaßnahmen beim Rind zur Verbesserung der Tiergesundheit“** „ und Präsentation vor dem Beirat im Bundesministerium für Frauen und Gesundheit am 30. März 2004.

### 3.5 Projektbezogene Kontakte

Im weiteren sind Kontakte zu nennen, die bislang ausschließlich auf elektronischem Weg stattgefunden haben, die jedoch einen intensiven Austausch auf dem Gebiet des aktuellen Projektes beinhalten:

1. Dr. de Roover Gent, Belgien
2. Dr. Voss und Dr. Knijn, Utrecht, Holland

3. Prof. Dr. Billy N. Day, Missouri, Columbia, USA
4. Dr. Philippe Escouflaire, Embryotransfer "Infonie", INRA
5. Jean-Paul Renard INRA Jouy-en-Josas, INRA
6. Patrick Chesne, INRA, Biologie du Développement et Reproduction, 78352 Jouy-en-Josas, Frankreich

## 4 Kritische Betrachtung des Projekts

### 4.1 1. Projektjahr

Wie aus den Arbeiten im ersten Projektjahr hervorging, konnten die initialen Durchführungen für die Vergleichsstudie *in vitro*- vs *in vivo*-produzierter Rinderembryonen erfolgreich durchgeführt werden. Da das Vorhandensein von Follikeln als Träger von Eizellen für die *In vitro*-Produktion bzw. zur Erzeugung von Embryonen eine Grundvoraussetzung darstellt, wurde auf vielfältige Weise die Entwicklung bzw. Rekrutierung von Follikeln über einen längeren Zeitraum und unter der Einwirkung bestimmter Faktoren getestet. Darüber hinaus wurden bereits Arbeiten zur Erstellung einer chronologischen Entwicklungsstudie von präimplantativen Embryonen aufgezeigt, d.h. Embryonen wurden nach Superovulation aus dem Eileiter gespült und anhand der Gewinnungsraten bzw. Embryonalentwicklung wurde ein *In vivo*-Vergleichsschema aufgestellt. Neben grundlegenden Arbeiten zum Aufbau eines *In vitro*-Produktionssystems (Blastozystenraten von 30 – 50%) wurden weitere Schwerpunkte auf die Untersuchung von Swim-up Methoden sowie *In vivo*-Kulturtechniken zur Bestimmung möglicher Übergangsmedien (Labor: begaste Medien, die für den Embryotransfer ungeeignet sind), der Synchronität der Zwischenempfänger sowie weiteren technischen Adaptierungen an den Eileiter gelegt.

#### Problemstellung

Aus der Dauer der Vorbesprechungen und Verhandlungen zum Vertrag bzw. dem Zeitpunkt der Vertragsunterzeichnung haben sich erhebliche Schwierigkeiten für den Beginn des Projektes ergeben. Das Offert zum Projekt wurde so konzipiert, dass aus den zum Antragszeitpunkt vorhandenen Gegebenheiten am IFA-Tulln einschließlich möglicher/notwendiger Koordinationen ein optimaler Projekteinstieg gegeben war. Dennoch haben folgende Faktoren die Aufnahmen der Arbeiten zum Projekt erheblich verzögert:

1. Datum der Vertragsunterzeichnung (23.Mai 2001):
  - Zu diesem Zeitpunkt war es sehr schwierig, Landwirte unter Vertrag zu nehmen, um die Fütterung der Rinder zu gewähren, da die Felder zu dieser Jahreszeit vollständig verplant waren
  - Eine Großzahl im Herbst und Winter zur Verfügung stehender Jungrinder ist zu diesem Zeitpunkt bereits auf der Dauerweide, d.h. der Bezug von Rindern war sehr schleppend
2. Es mussten Tierpfleger gesucht werden, nachdem die am IFA aus- und speziell weitergebildeten Tierpfleger nach 2 jähriger „Pause“ gekündigt hatten
3. Anfängliche Transportverbot aus Gründen der BSE-Problematik
4. Verbot, vom Schlachthof Organe etc. zu entfernen. Das Projekt hat zur Grundlage, dass laufend Eierstöcke am Schlachthof gewonnen werden,



um über die Routineproduktion ein qualitativ hochwertiges IVP-System zu erhalten. Erste nach dem Erhalt einer Sondergenehmigung inklusive der Organisation auf Länder- und Bezirksebene zur Entnahme von Eierstöcken bestimmter Schlachthöfe konnten erste Ansätze mit Jahresbeginn 2002 durchgeführt werden.

Beispielhaft zur beschriebenen Problematik soll die in Abbildung 52 dargestellte Follikeldynamik erwähnt werden. Nach Inbetriebnahme des Stalles, Einkauf von vorhandenen Tieren inklusive Futter (qualitativ, quantitativ nicht zufriedenstellendes Futter) wurden aus ersten Beobachtungen am Tier Erscheinungsbilder mit deutlich verminderte Follikelaktivität auf den Eierstöcken der Rinder beobachtet. Über die weitere Projektphase hinweg konnte eine deutliche Verbesserung (Insbesondere in der Tierhaltung, Fütterung etc...) erreicht werden.

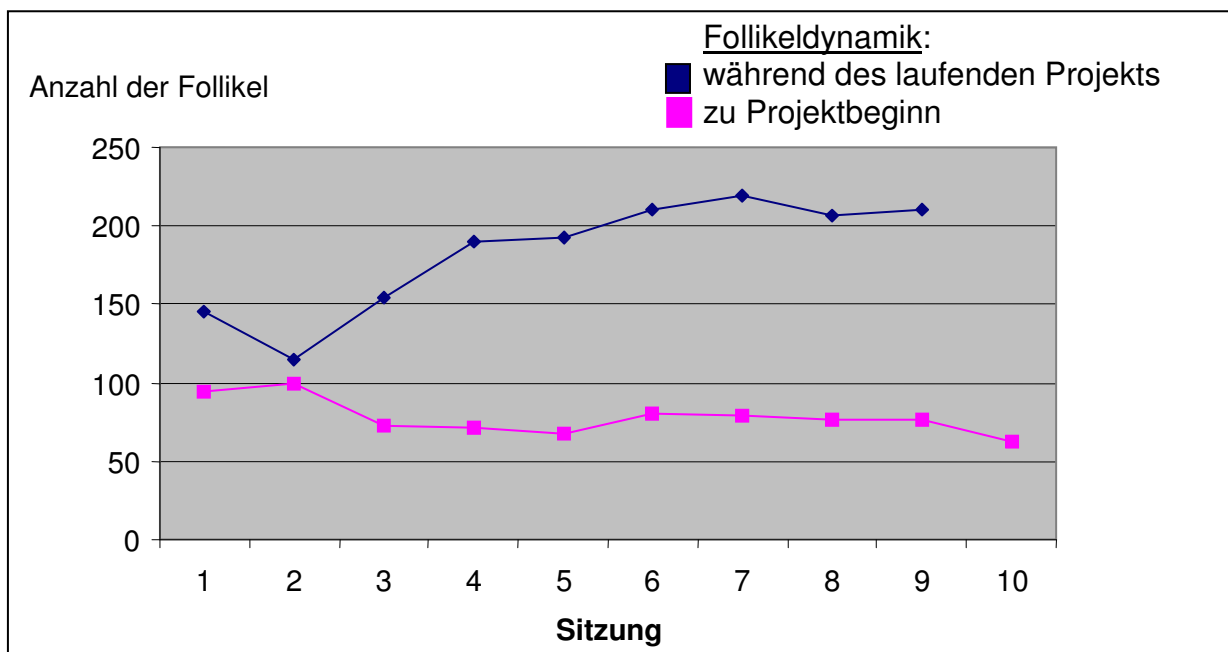


Abbildung 52: Follikelaktivität zu Beginn und nach fortgeschrittener Zeit im ersten Projektjahr. Die Anzahl der Follikel beinhaltet die Summe aller Follikel von jeweils 10 Tieren zu einem Sitzungszeitpunkt. Die Unterschiede belaufen sich auf das zum Teil 3-fache.

## 4.2 2. Projektjahr

Aus dem Projekt, das sich über die dreijährige Dauer in ebenfalls drei Abschnitte gliedern lässt, sind mittlerweile die realisierten und die noch zu bewerkstellenden Inhalte hinsichtlich ihres chronologischen Aufbaues und der erfolgreichen Durchführung ersichtlich:

Im ersten Projektjahr lag der Schwerpunkt auf der Follikelentwicklung und Dynamik als grundlegende Voraussetzung weiterer Vorgehensweisen in der Embryoproduktion. Es konnten weiterhin Chronologiestudien durchgeführt werden, indem im ersten Projektteil Embryonen unterschiedlichen Alters und unterschiedlicher Entwicklungsstufen aus dem Eileiter gewonnen werden konnten, die in ihrer Gesamtheit als Richtlinie für den Bereich der *In vitro*-Produktion bewertet werden konnten und können.

Aufbauend auf dem ersten Projektjahr konnten im zweiten Jahr fortführende Studien im Bereich der *In vitro*-Produktion durchgeführt werden, deren Ergebnisse essentiell für die Embryoproduktion und damit Erzeugung von Kälbern waren. Einerseits wurden sehr hohe Blastozystenraten bis zu 50 bzw. 60% erreicht, andererseits war es notwendig, deren Entwicklung unter den verschiedensten Bedingungen (Reduzierung einer oxygenen Schädigung, Anpassung der *In vitro*-Fertilisation an physiologische Medienzustände, Einfluss der Proteinquelle im Kulturmedium auf Zellkompartimente) zu untersuchen, um optimale Voraussetzungen für eine Trächtigkeit zu schaffen. Im zweiten Jahr konnte zudem ein wichtiger Schritt der *In vivo*-Kultur angegangen werden. Basierend auf einer technischen Anpassung an eine optimale Übertragung von Eizellen bzw. Embryonen in tiefe Eileiterabschnitte wurden Studien zur Übertragung von frühen IVP-Embryonen durchgeführt. Erste Ergebnisse aus diesen *In vivo*-Studien weisen darauf hin, dass gegenüber den bislang bekannten Techniken beim Schaf *In vivo*-Verfahren ebenso beim Rind mit deutlich weniger Aufwand sehr gut möglich sind und zudem der Anschluss an die physiologische Weiterentwicklung und Transport gegeben sind. Zusätzlich wurde begonnen, elektronenmikroskopische Aufnahmen der oben beschriebenen Embryonen anzufertigen, die bereits erste Hinweise auf embryoschädigende Faktoren in weltweit routinemäßig angewendeten IVP-Kulturen liefern, denen die morphologisch unauffälligeren *in vivo*-kultivierten Embryonen gegenüber stehen.

Im dritten Projektjahr wird der Schwerpunkt der Untersuchungen auf die „Minimal *In vitro*-Produktion“ gelegt werden, die die Entwicklung der Eizelle vorwiegend im Tierkörper, die Durchführung der *In vitro*-Fertilisation oder *In vivo*-Fertilisation und der anschließenden *In vivo*-Kultur einschließt. Diese Möglichkeit der Embryoproduktion soll sowohl verschiedenen *In vitro*-Produktionsverfahren gegenübergestellt, weiteren und intensiveren mikroskopischen Untersuchungen unterzogen sowie zur Erzeugung von Trächtigkeiten herangezogen werden.

### Problemstellung

Das vorliegende Projekt hat zum Schwerpunkt, die *In vitro*-Produktion von Rinderembryonen aus wissenschaftlicher Sicht so zu gestalten, dass diese Technik für Routinezwecke im landwirtschaftlichen Betrieb einsetzbar ist. Dazu sind zwei Themenkomplexe zu benennen, die eine der Arbeit entsprechende notwendige Vorgehensweise sehr erschweren:

1. *In vitro*-Medien
2. Einsatz von Tieren aus österreichischen Betrieben

### 1. In vitro-Medien

Die nun im zweiten Projektjahr bereits sehr erfolgreiche "Entlastung" aufwendiger *In vitro*-Arbeiten, vor allem zur Kultur von Embryonen bis zum transferfähigen Blastozystenstadium, hat gezeigt, dass über die Kurzzeitkultur im Rindereileiter qualitativ deutlich bessere Embryonen zu erwarten sind. Weltweit verwendete Standardmedien (SOF-Medien) mit Serumzusätzen (wie z.B. Östrus-Cow-Serum) zeigen Anhäufungen von Stoffwechselprodukten (Lipiden) in den Embryonalzellen mit weiteren morphologischen Erscheinungsbildern, die klare qualitative Minderungen erkennen lassen. Zum einen wurden diese Medien eingeführt, um zusammenfassend dem „Large Calf Syndrome (LCS)“ entgegen zu wirken. Andererseits sind mündlichen Berichten verschiedener Arbeitsgruppen zufolge die Abortraten nicht deutlich zurückgegangen bzw. die Trächtigkeitsraten trotz hoher Embryoentwicklungsraten in Kultur sehr niedrig. Die Verwendung von Kulturmedien, die auf MPM basieren, zeigen zwar bessere Trächtigkeitsraten, dennoch weist z.B. die Untersuchung zum Trächtigkeitszeitpunkt 90 (90 Tage nach ET) hier schon bereits deutliche Größenunterschiede der Föten auf. Aktuelle Diskussionsinhalte (IETS-Meeting 2003, in Auckland, Neuseeland) lassen erkennen, dass die Anteile der *In vitro*-Produktion an der Gesamtembryoproduktion deutlich zurückgehen, wohingegen die *In vivo*-Kultur im Eileiter von Schafen zur Erzeugung qualitativ hochwertiger Embryonen an Bedeutung zunimmt.

### 2. Einsatz von Tieren aus österreichischen Betrieben

Die im zweiten Projektjahr durchgeführten Aktivitäten in österreichischen Betrieben beinhalteten die Follikelpunktion bzw. die Eizellgewinnung bei Spendertieren, die aus einer Vornutzung für Embryotransfer meist ein ungenügendes Ergebnis lieferten. Da ein Transport der Spender für die stationäre Eizellgewinnung am Institut aus Gründen der Laktation und Kurzzeittierbelastung im Rahmen wiederholter Punktion ausgeschlossen wurde, wurden Eizellen auf ambulante Weise gewonnen, d.h. die Tiere wurden am Betrieb punktiert. Generell ist zu bemerken, dass seitens der Abteilung „Biotechnologie in der Tierproduktion“ (BT/IFA-Tulln) Standardverfahren zur Eizellgewinnung, zur labortechnischen Eizell- und Embryobehandlung, zur Kryokonservierung und zum Embryotransfer eingesetzt werden.

Diese Standardmethoden stehen jedoch dem individuellen Reaktionsmuster der Tiere auf der Basis aller betriebsspezifischen Einflussfaktoren gegenüber, deren Follikeldynamik über ein sehr kleines zeitliches Fenster die Eizellgewinnung in entsprechender variablen Art und Weise zulässt. Wie in der Abbildung für die betriebliche Seite beispielhaft dargestellt wurde, stehen die Tiere unter exogenen und endogenen Einflussfaktoren, die zu einem gegebenen Zeitpunkt Eizellen in unterschiedlicher Menge und Qualität liefern und in dieser Form die gesamte Voraussetzung weiterer biotechnischer Behandlung repräsentieren. Die Probleme, die sich in diesem Zusammenhang für das zweite Projektjahr ergeben haben, sind wie folgt zu beschreiben:

- alle Betriebe unterschieden sich deutlich hinsichtlich der Menge und Qualität der gewonnenen Eizellen
- einzelne weiterführende Untersuchungen zum Betriebsmanagement ergaben z.T. erhebliche „Mangelsituationen“ im Betrieb
- sowohl am Institut (BT/IFA-Tulln) wie auch im Rahmen von Kooperationen mit anderen wissenschaftlichen Einrichtung waren immer Adaptationsmaßnahmen zur Behandlung der Spender- und Empfängertiere dringend notwendig, um eine optimierte Vorgehensweise in die weitere Planung zu integrieren. Diese

Adaptationsmöglichkeiten an den Betrieben stehen nicht zur Verfügung, wären aber dringend notwendig

- obwohl innerhalb der letzten 10 Jahre seitens des Institutes (BT/IFA-Tulln) ein erheblicher informativer Aufwand betrieben wurde, ist das tatsächliche Wissen um reproduktive Grundgegebenheiten nur sehr gering
- es wurden meist Spendertiere mit hohen Leistungen in Zusammenhang mit einer „besonderen“ Genetik vorgestellt, die zuvor bereits für die Superovulation eingesetzt wurden. Von dieser Seite aus ist vor allem zu bedauern, dass vom Betrieb bis hin zu organisatorischen Institutionen tierärztliche ET-Teams „getestet“ und geduldet wurden. Eine tatsächliche Betrachtung und Erfassung der gesamtbetrieblichen Strukturen zur Schaffung einer grundlegenden Basis konnten auf dieser Ebenen jedoch nicht verwirklicht werden.

Umso mehr werden Verwirklichungschancen für die Betriebe gesehen und müssen im überbetrieblichen Management von Zucht, Haltung und Biotechniken organisiert werden (siehe Abbildung 53).

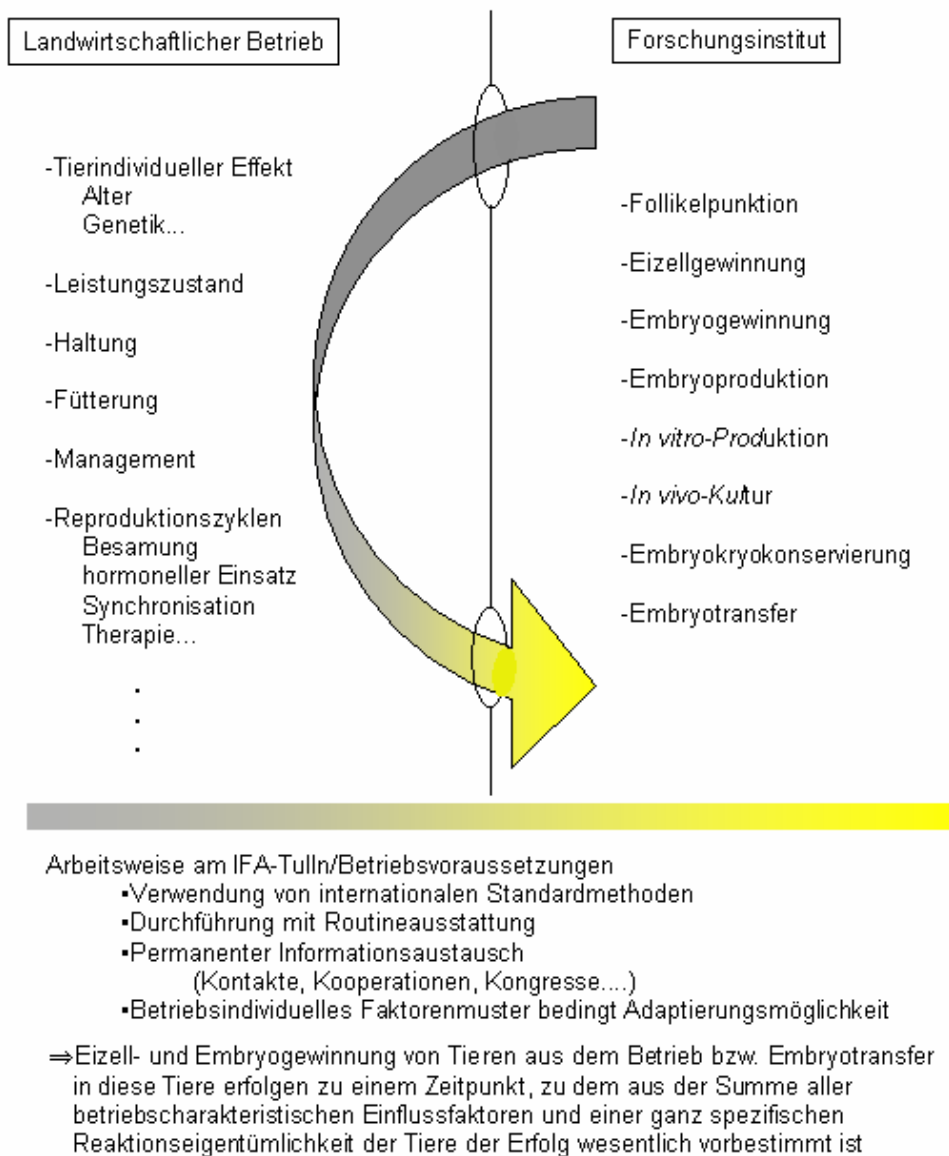


Abbildung 53: Einsatzbereiche in landwirtschaftlichen Betrieben

### 4.3 3. Projektjahr

Im letzten Projektabschnitt wurden elementare Bereiche aus dem ersten und zweiten Projektjahr berücksichtigt, um damit originäre *In vitro*-Embryonen guter Qualität für die Praxis bereitstellen zu können. Insgesamt konnte erfolgreich ein Zusammenhang von wissenschaftlichen Erkenntnissen zum Zeitpunkt früher Embryonalentwicklung mit der Umsetzung für Routinezwecke geschaffen werden. Dabei waren weniger Einzelerfolge von Interesse wie vielmehr Tatsachen von Bedeutung, die eine verlässliche Erzeugung von Embryonen für den züchterischen Einsatz erlauben:

1. Hohe Anzahl von Transfers und Embryonen
2. Wiederholbarkeit, auch unter verschiedenen Bedingungen
3. Trägetiere sind wiederholt einsetzbar → minimal invasiv, schonend
4. Weiterführende Untersuchungen verdeutlichen Embryoqualität:
  - Kryokonservierung
  - Histologische Untersuchungen
5. Kooperationsinteressen, Ausbildungsmaßnahmen, Informationsinteresse

#### Problemstellung

Mit Nachdruck muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Möglichkeit, mit den bäuerlichen Betrieben den zuchttechnisch längst fälligen und notwendigen Bereich der Reproduktionstechnologie für Österreich zu etablieren, den Ausführungen aus den Projektsjahren 1 und 2 entsprechen. Umso mehr wird es im Rahmen der Arbeiten in diesem Projekt als sehr widersprüchlich angesehen, dass Institutionen vor allem in den nachbarlichen Ländern inklusive Texas, USA, ihre Bemühungen in diesem letzten Abschnitt intensivierten, um mit den Informationen der „Vergleichsstudie –Nr.1227“ Rinderembryonen im entsprechenden Umfang und Qualität für eigene züchterische Zwecke zu erhalten.

Arbeiten in Österreich waren bislang weniger von den realen Möglichkeiten und strukturiertem Vorgehen gekennzeichnet, wie vielmehr durch Einzelaktionen geprägt, die Erfolg oder Misserfolg als Reflektion einer betrieblichen Situation bzw. als Handhabung geographischer Distanzen (IFA-Betrieb) erklären lassen. In diesem Zusammenhang ist es als Erfolg zu werten, dass zeitlich diesem Projekt die Ausarbeitung und die Mitarbeit an einem Fruchtbarkeitsprogramm TGD-Österreich und die Nominierung als Mitglied in einem ZAR-Ausschuss („Künstliche Besamung und Biotechnologie“-Ausschuss hat seine Tätigkeit noch nicht aufgenommen!) zugeordnet werden können.

## 5 Zusammenfassung/Summary

### 5.1 Zusammenfassung

Der vorliegende Endbericht zum Projekt (Forschungsprojekt Nr.:1227) „Vergleichsstudie zum frühzeitigen Re-Transfer *in vitro*-produzierter Rinderembryonen für die Erzeugung tiefgefriertauglicher Embryonen und von Nachkommen“ mit dreijähriger Laufzeit umfasst Arbeiten mit folgenden Schwerpunkten:

- (i) Follikeldynamik am Eierstock
- (ii) *In vitro*-Produktion von Embryonen
- (iii) Untersuchungen zur Darstellung der Entwicklungschronologie von Embryonen im Rindereileiter
- (iv) *In vivo*-Kultur *in vitro*-produzierter Embryonen im homologen Rindereileiter

#### (i) Follikeldynamik am Eierstock

Es konnte gezeigt werden, dass mittels wiederholter Punktion des dominanten Follikels dessen negativer Einfluss auf kleineren Follikel gemindert wurde, wodurch sich die Follikeldynamik deutlich steigern ließ. Die Dominanzpunktion hatte zur Folge, dass bis zum Zyklustag 11 ein Anstieg in der Zahl der Follikel zu erkennen war. Die Zunahme der Zahl der Follikel war auf die Kategorie der „kleinen Follikel“ beschränkt. Mittlere und große Follikel spielten zahlenmäßig nur eine untergeordnete Bedeutung. Am 11. bzw. 13. Tag ist eine Stagnation der Follikelanbildung zu sehen, die über den weiteren Verlauf der Punktionsitzungen wieder zurückgeht.

In einer weiteren Untersuchung wurde die Follikeldynamik über einen Zeitraum von 3 Zyklen unter Einfluss und Verfügbarkeit von Progesteron (Progesteronapplikation, Induktion der Ovulation des ersten dominanten Follikels, Kontrollgruppe) während des Diöstrus beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass Progesteron einen wichtigen Einfluss auf die Langzeitentwicklung der Follikel ausübt. Der Einfluss erstreckte sich auf die Anzahl der Follikel, die Zykluslänge, die Anzahl der Follikelwellen pro Zyklus sowie die Dauer der Follikelwellen. Die Ergebnisse unterstreichen die Etablierung von Protokollen für die jeweils praktischen Bedingungen zur Gewinnung von Eizellen.

Zusätzlich wurden transvaginal ultraschallgeleitete Follikelpunktionen sowohl stationär am IFA-Tulln als auch ambulant in Betrieben verschiedener Bundesländer in Österreich durchgeführt. Unter praktikablen Gesichtspunkten wurden Follikel von Kalbinnen und Kühen und bei Gonadotropin-behandelten und nicht stimulierten Tieren unter Berücksichtigung des Punktionsintervalls punktiert. Es konnte gezeigt werden, dass in Anlehnung an die stationäre Gewinnung die ambulante Punktion erfolgreich bei Jungtieren und bei laktierenden Tieren im Betrieb durchgeführt werden kann. Eine moderate hormonelle Stimulation zur Steigerung der Follikel- und Eizellzahl hat sich als vorteilhaft erwiesen. Die Punktionen mit und ohne Gonadotropinvorbehandlungen liefen erfolgreich ab, wobei die in diesem Bericht aufgezeigten verschiedenen Behandlungsschemata in Summe die jeweils an die Betriebe anzupassende Vorgehensweise herausstellen.

#### (ii) *In vitro*-Produktion

In diesem Abschnitt der *In vitro*-Produktion wurden verschiedene Swim-up Techniken untersucht, deren Ziel die Gewinnung von unterschiedlich behandelten und damit biochemisch-physikalisch „fraktionierten“ Spermien analog der Verfahren zur Samentrennung für die weitere *In vitro*-Produktion ist. Dabei wurde unbehandelte

Samen von Kaninchen (Nativsamen) sowie kryokonservierte Samenportionen vom Rind eingesetzt. Mit den verschiedenen Swim-up Techniken konnten bewegliche Spermien aus dem Vertikal-Swim-up (konventionelle Methode) bzw. aus dem Horizontal-Swim-up (Spermselectoren, unterschiedlich starke Beanspruchung der Spermienmotilität) in ausreichender Menge für die *In vitro*-Fertilisation gewonnen werden.

In Versuchen zur *In vitro*-Produktion wurde Glutathion den Medien zugesetzt, um die peroxidische Schädigungen während der Embryonalentwicklung zu reduzieren. Die Ergebnisse zeigen, dass Glutathion ein sehr wertvoller Bestandteil in der Kulturphase ist, in der ein atmosphärischer Sauerstoff (20%) zur Begasung verwendet wird. In der *In vitro*-Kultur, die mit 5% O<sub>2</sub> angesetzt wird, scheint kein zusätzlicher Effekt vorhanden zu sein. In einem weiteren Schritt wurde die Hyaluronsäure-supplementierung in einer Konzentration von 2 mg/ml im Kapazitationsmedium für das Swim-up-Verfahren und im Fertilisierungsmedium getestet, um in diesem Rahmen die physiologische Wirkung von Glykosaminoglykanen während der Befruchtung zu erfassen. Gegenüber der Kontrollgruppe zeigte die Hyaluronsäure-Gruppe mit ca. 40% eine tendenziell bessere Blastozystenentwicklung nach Swim-up und nach IVF. Aus diesem Ergebnis ist zu schließen, dass sowohl die Samen- wie auch Eizellen Hyaluronsäure im Medium uneingeschränkt tolerieren, womit effektivere Samenkonzentrationen in der IVF ohne Erhöhung der Polyspermierate möglich erscheinen. Im letzten *In vitro*-Versuch wurde der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Östrus-Cow-Serum (OCS: 10%, 5%, 1%) und BSA (3 mg/ml, 6 mg/ml) im Kulturmedium erfasst. OCS-Zusatz im Medium führt zu deutlich höheren Blastozystenraten als BSA-Zusatz. Die Embryonalentwicklung vollzieht sich im OCS-Medium schneller als im BSA-Medium. Elektronenmikroskopische Aufnahmen belegen jedoch, dass Embryonen in Abhängigkeit der OCS-Konzentration deutlich erkennbar intrazytoplasmatische und extrazelluläre Schädigungen aufweisen, die in *in vivo*-kultivierten Embryonen nicht zu finden waren.

(iii) Untersuchungen zur Darstellung der Entwicklungschronologie von Embryonen im Rindereileiter

In einer Studie zur Darstellung der Entwicklungschronologie von Embryonen im Rindereileiter wurden Embryonen nach Superovulation (FSH/eCG) zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus dem Eileiter gespült. Das Gesamtbild der gewonnenen Stadien dient als Entwicklungsvergleich für *In vitro*-Produktionssysteme. Bei insgesamt 119 superovulierten Spendertieren wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden bis zu 126 Stunden nach der Befruchtung 1411 ovulierte Komplexe mittels einer endoskopischen Technik aus dem Eileiter gespült und ein Entwicklungsprofil für *In vivo*-Embryonen erstellt. Das Profil gibt einen Einblick über die gesamte Entwicklungsperiode von Embryonen im Eileiter, d.h. wann und wie lange verschiedene Teilungsstadien auftreten und welcher Anteil einer möglichen Entwicklungsretardierung unterliegt. Die angewandte Methode stellt derzeit die einzige beschriebene, minimal invasive Möglichkeit zur Gewinnung von tubalen Embryonalstadien beim Rind dar.

(iv) *In vivo*-Kultur von präimplantiven Embryonen in temporären Empfängern

Als ein wesentlicher Beitrag zur *In vivo*-Kultur von Rinderembryonen konnte die Übertragung früher *in vitro*-gewonnener Eizellen bzw. produzierter Embryonen in die Eileiter geleistet werden. Die Transfers wurden einseitig ipsi- bzw. kontralateral durchgeführt. Die Ergebnisse der ersten Untersuchung zeigten, dass die Spülung der Gebärmutter in einer Gewinnungsrate von 26% resultierte, während die Spülung der

Eileiter zusammen mit der Gebärmutter die gesamte Anzahl gewonnener Komplexe verdoppelte. Obwohl diese Studie deutliche Schwankungen der Findungs- und Entwicklungsraten aufwies, liegt der Schluss nahe, dass dennoch Embryonen in den verschiedenen Entwicklungsstadien erfolgreich auf Zwischenempfänger übertragen werden können.

Die anschließenden Versuche hatten zum Ziel, die Gewinnungs- und Entwicklungsraten aus *In vivo*-Kultur zu steigern. Dazu wurden technisch-methodische Adaptationen vorgenommen, die in Summe die erfolgreichsten Chancen einer hohen Wiederfindungs- und Entwicklungsrate versprechen. Mit dieser strukturellen Modifikation zur morphologischen Nachahmung des maturierten Cumulus-Oozyten-Komplexes wurde der Einfluss der so transferierten Komplexe auf deren Transport in ihrer physiologischen Umgebung im Eileiter untersucht. Es wurden Embryonen in den verschiedenen Entwicklungsstadien transvaginal endoskopisch auf Zwischenempfänger übertragen und am 7. Kulturtag zurückgewonnen. Der Transfer von Embryonen in Hyaluronsäure, Zygoten ohne Cumuluszellen, Zygoten mit Rest-Cumulus, maturierten Cumulus-Oozyten-Komplexe zusammen mit Spermien (GIFT) und in Alginat eingebettete Embryonen führte zu deutliche unterschiedlichen Gewinnungsraten (12,9%, 29,6%, 56,1%, 63,1%, and 70,5%). Mit diesen Daten konnte gezeigt werden, dass die Morphologie der übertragenen Komplexe wesentlich die tubale Migration beeinflusst und maßgebliche Auswirkungen auf die *In vivo*-Kultur hat.

In Anlehnung an diese Ergebnisse wurde das Verfahren weiter optimiert, um die Entwicklungskapazität des Eileiters herauszustellen. In drei Transfergruppen wurden (i) *in vitro*-maturierte Cumulus-Oozyten-Komplexe auf besamte Empfängertiere, (ii) *in vitro*-maturierte Cumulus-Oozyten-Komplexe zusammen mit Samen (GIFT) und (iii) Embryonen im 4- bis 8-Zellstadium übertragen und mit der Entwicklung ausschließlich *in vitro*-produzierter Embryonen verglichen. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass mit dem Transfer von Cumulus-Oozyten-Komplexe/Samen (GIFT) bzw. von Embryonen im 4- bis 8-Zellstadium die besten Rückgewinnungsraten am Tag 7 (GIFT: 73%; Embryonen im 4- bis 8-Zellstadium: 88%) und Entwicklungsraten (GIFT: 23%; Embryonen im 4- bis 8-Zellstadium: 43%) zu erreichen sind.

Schlussfolgerung:

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der Untersuchungen aus diesem Projekt den Schluss zu, dass wichtige Meilensteine sowohl für wissenschaftliche Zwecke als auch für die Routineanwendung geschaffen wurden. Über zahlreiche nationale und internationale Kontakte wurden dem vorliegenden Forschungsprojekt deren Aktualität und Bedeutung bestätigt.



## 5.2 Summary

The present final report describes activities during totally three years of the project (project no. 1227) entitled: "Introduction of reproduction biotechnology in the female cattle for applied animal breeding: „Studies on re-transfer of *in vitro* produced bovine embryos for the production of embryos suitable for cryopreservation and for the production of offspring“. The report focuses on (i) the follicular dynamic, (ii) *in vitro* reproduction of embryos, (iii) the establishment of a development chronology of preimplantation embryos as well as (iv) the *in vivo* culture of preimplantation embryos in temporary recipients.

### (i) Follicular dynamic

It was shown, that permanent ablation of dominant follicles every second day over a period of 20 days compensates negative effects on follicular recruitment. Thus, the number of small follicles increased up to the day 11 of the cycle and declines after day 13. In a following examination, follicular dynamic was recorded within a period of three consecutive cycles based upon the availability of progesterone during the di-oestrus phase (progesterone supplementation, accessory induction of ovulation of the first dominant follicle, control group). It was successfully shown, that progesterone affects the number of tertiary follicles, the length of oestrus cycles, the number of follicular waves per oestrus cycles as well as the length of the follicular waves within on oestrus cycle. It is suggested that this information represents prerequisites for optimal timing of oocyte recovery by ovum pick-up.

Transvaginal ultrasonographic ovum pick-up was performed at the IFA-TULLN and in different farms located in several austrian districts. Follicles have been punctured from heifers and lactating cows using different gonadotropin stimulation protocols and OPU intervals. In comparison to oocyte collection at the IFA-TULLN successful OPU was conducted at the farms in both, heifers and cows. It is concluded that a moderate stimulation of follicular growth increases the number of follicles suitable for puncture and the number of collected oocytes. It was also shown that OPU results in high numbers of oocytes independent from the use of gonadotropins, however, different protocols adapted to the specific situation of each farm have to be developed in order to reach optimal oocyte collections from donor animals.

### (ii) *In vitro* reproduction systems

In a preliminary study we tested different swim-up techniques to obtain a suitable amount of sperm for *in vitro* fertilisation under the scope of biochemical-physical factors affecting spermatozoa activity during the capacitation process. Two "horizontal swim-up" techniques and one "vertical" technique were used leading to satisfying numbers of sperm for IVP.

Glutathione was supplemented to IVP-media for reduction of oxidative stress to the embryos during *in vitro* development. The results demonstrate that glutathione is an essential factor during the culture periods, in which oocytes and embryos are exhibited to atmospheric oxygen. The gas pressure for oxygen during *in vitro* culture is low (5%), therefore now effect is awaited during this culture period. In a further trial hyaluronic acid (HyA-group) was added to the capacitation medium for the swim-up procedure and in the *in vitro* fertilisation (IVF) medium (2 mg/ml) for evaluation of an effect of glycosmine glycans during fertilisation. After swim-up and IVF the blastocyst rates from the HyA-groups (nearly 40%) were slightly higher than the blastocyst rates from the control groups. It is assumed, that the tolerance of HyA by oocytes and spermatozoa may offer the use of a more effective concentration of spermatozoa in

IVF without increasing polyspermic reaction. In the last *in vitro* experiment the influence of different concentrations of oestrus-cow-serum (OCS: 10%, 5%, 1%) and bovine serum albumin (BSA: 3 mg/ml, 6 mg/ml) on embryo development was examined. Generally, OCS-supplementation resulted in a higher number of blastocysts compared to BSA. Significantly more blastocysts already appeared at day 7 in the OCS-group in relation to the total amount of embryos which reached the blastocyst stage at day 8. Additionally it was shown by electron microscopy that there is an OCS-concentration dependent intracellular and extracellular damage of *in vitro* culture embryos compared to embryos derived by *in vivo* culture. These findings have been confirmed by survival rates after cryopreservation.

(iii) Time schedule for early embryo development as a model for IVP-derived bovine embryos

Additional examinations served for the recovery of tubal stage bovine embryos to draw up a chronology of embryonic development for comparative studies in *in vitro* production systems. Superovulation was induced in 119 heifers following embryo collection 24 hrs to 126 hrs post oestrus detection and artificial insemination. In total 1411 oocytes and embryos of different stages were collected using a minimal invasive endoscopic guided technique. These data were successfully drawn up to a complete diagram showing the variety of *in vivo* embryo development during the preimplantation phase. This is the first time where such a technique is introduced for the described purpose. At the present it seems to be the method of choice for collection of embryos.

(iv) *In vivo* culture of preimplantation embryos in temporary recipients

Embryos at various stages have been transferred to the bovine oviduct in order to perform a temporary *in vivo* culture. The transfers were done either ipsilateral or controlateral. In the first study it was shown, that flushing of only uterine horns led to a finding rate of 26% whereas the number of complexes obtained by the combined flushing technique (oviduct plus uterine horns) was twice as high. Although the data reflect great variations in the collection rates and developmental rates, it seems to be obvious that *in vivo* culture can be performed at different embryonic stages.

The following *in vivo* experiments aimed at both, mimicking the technical-methodological situation by adapting the morphological shape of an mature cumulus oocyte complex and increasing the efficiency of embryo development, to fulfil the prerequisites for physiological embryo migration in the bovine oviduct. The effect of structural modifications of the transferred embryos on tubal transport and pre-blastocyst development in the physiological oviduct environment was investigated. Embryos at various developmental stages were transferred by transvaginal endoscopy into the oviducts of temporal recipients and were re-collected on Day 7. The transfer of embryos in hyaluronanous medium ("Hyaluronan"), zygotes rid of cumulus ("Denuded Zygotes"), embryos embedded in cumulus ("Zygotes with Cumulus"), matured oocytes with capacitated spermatozoa ("GIFT") or embryos embedded sodium alginate ("Alginate") led to increasing recovery rates (12.9%, 29.6%, 56.1%, 63.1%, and 70.5%). These data demonstrate that the structural-morphological properties of transferred embryos affect tubal migration and are crucial for subsequent *in vivo* culture.

In addition, further experiments have been designed to include transfer of *in vitro* matured cumulus oocyte complexes into previously inseminated heifers (COC group), simultaneous transfer of *in vitro* matured COCs with capacitated spermatozoa (GIFTs group), transfer of 4- to 8-cell stage embryos developed *in vitro* after IVM/IVF

(Cleaved stages group) and controls of solely *in vitro* produced embryos (IVP group). Our data indicate that *in vivo* culture of transferred gametes (GIFT) and cleaved embryos (4- to 8-cell stage embryos) led to high recovery rates on Day 7 (GIFT: 73%; 4 to 8 cell stages: 88%) and blastocyst rates (GIFT: 23%; 4 to 8 cell stages: 43%).

#### Conclusion

In summary, the results of the project elucidate that essential milestones have been reached for both, research and practical application. National as well as international institutions confirmed the actual topics and research impact represented by the project.

## 6 Ausblick: Bewertung der Ergebnisse

Mit diesem Projekt wurden die drei Bereiche der Reproduktionsbiologie - (i) die Follikelanbildung als Voraussetzung zur Gewinnung entwicklungscompetenter Eizellen (ii) die *In vitro*-Produktion von Rinderembryonen (iii) und die Entwicklungsphysiologie im Rindereileiter in elementaren Studien wissenschaftlich ausgearbeitet und schließlich in praxistauglicher Form kombiniert und optimiert. Somit konnte das Projekt in relativ einheitlicher Weise erfolgreich abgeschlossen werden. Die Ausführung des Endberichtes wurde so gestaltet, dass aus der Summe der einführenden Zusammenstellungen ein Gesamtbild vermittelt werden soll, aus welchem auch die Notwendigkeit der entsprechenden Versuche abgeleitet wurde. Neben den ausführlich beschriebenen Versuchen sind weitere Teilerfolge erreicht worden, die zwar im Rahmen des Projektes durchgeführt wurden, sich aber aufgrund sehr unterschiedlicher Vorgehensweisen von Einzelaktionen nur unbefriedigend in die Projektstrukturen eingliedern lassen. Dazu zählen z.B.:

- Einzelpunkten, *In vitro*-Produktion, *In vivo*-Kultur  
→ ambulante Einzeltransfers mit Trächtigkeiten, mit erfolgreicher Spülung und Gewinnung von Embryonen, Kryokonservierung und erfolgreiche ET's
- Stationäre Behandlung von hochwertigen Zuchttieren/Problemtieren  
Embryoproduktion durch IVP oder *In vivo*-Kultur, mit Trächtigkeitserfolgen
- Follikelpunktion bei Zuchttieren nach mehrfach erfolgloser Besamung:  
Erzeugung von Nachkommen, mit anschließender erfolgreicher Besamung
- Entwicklungen zur technischen Adaptierung eines IVF-Systems: sämtliche bislang bekannten Verfahren setzten ungeachtet der Samenqualität Einheitskonzentrationen bei der IVF ein → Entwicklung eines Kapillarsystems, welches sukzessive die Samenkonzentration im Medium erhöht (Spermiendynamik zur Effizienzsteigerung unter praktischen Bedingungen)
- Bereitstellung von Embryonen aus der *In vivo*-Kultur für langfristige und aufwändige Untersuchungsverfahren
- weitere Untersuchungen  
z.B. Embryonen
  - Molekulargenetik:
    - Geschlechtsverhältnisse → wissenschaftl. Methode
    - landw. Interesse
    - Methylierungsverhältnisse
    - mRNA.... Proteomics
  - Histologie, Kryobiologie
  - Trächtigkeitsuntersuchungen (Plazentome, fötaler Stoffwechsel, Kälbergeburten)
  - Studien zur Embryo-Maternalen Kommunikation

Entsprechend der ausgewiesenen Problemstellungen in den jeweiligen Projektjahren muss ebenso auf die Misserfolge hingewiesen werden. Wie aus dem Endbericht hervorgeht, konnte während des Projektes ein breites Kontakt Netzwerk zu anderen Arbeitsgruppen aufgebaut werden, welches im Rahmen eines hochwertigen Informationsaustausches dafür gesorgt hat, dass die Studien von einem maximalen wissenschaftlich aktuellen Stand als Grundvoraussetzung gestützt wurden. Die Gewinnung von Eizellen, deren Weiterentwicklung zum transfertauglichen Embryo

(sowohl *in vitro* als auch *in vivo*) inklusive der einzelnen Trächtigkeiten subsumieren eine Vielzahl von Faktoren, deren ganzheitliche bewusste Erfassung, Zuordnung und Umgang schließlich Erfolg oder Misserfolg darstellen (siehe Abbildung 54):

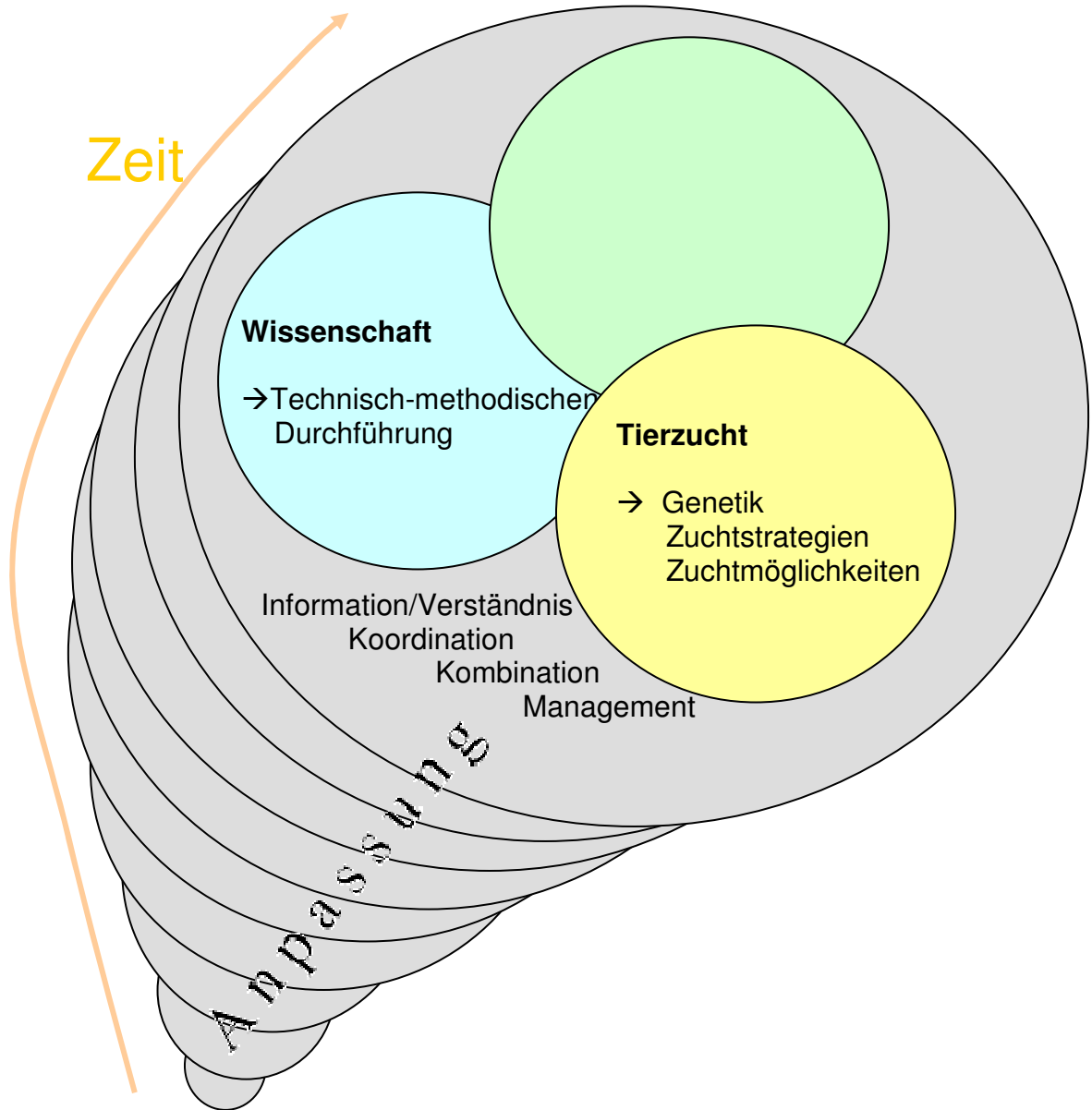


Abbildung 54: Graphische Darstellung zur optimierten Anwendung von Reproduktionstechniken in der Landwirtschaft

Die dreijährigen Arbeiten am IFA-Tulln sowie längerfristige Kooperationsbereitschaften in den Nachbarländern haben auf beeindruckende Weise gezeigt, dass über die Dauer des Projektes initiale und weiterführenden Maßnahmen in der Optimierung der Biotechniken resultierten.

## 7 **Bedeutung des Projekts für internationale Zusammenarbeit bzw. Studien und Anwendungen**

Der Aufbau, die Ziele und der Leitfaden des Projekts waren an das weltweite Ausmaß und die Bedeutung der Embryogewinnung und -übertagung adaptiert. Bei den mittlerweile vorhandenen vielseitigen wissenschaftlichen Expertisen, die sich um das Thema der frühembryonalen Entwicklung etabliert haben, und den tiefen Kenntnissen mit hochwertiger Präzisionsanalytik ist eine interdisziplinäre Vorgehensweise obligat.

Der Umfang des Projektes und die Aktualität des Projektinhaltes haben gezeigt, dass die erworbenen Erfahrungen, die wissenschaftlichen Erkenntnisse und das Einsatzpotential für weiterführende Anwendungen aus praktischer und theoretischer Sicht von Bedeutung waren und sein werden.

Insgesamt konnte mit dem Projekt sowohl ein Interesse über die Landesgrenzen hinaus als auch Spezies-übergreifend erweckt werden. Als Beispiel dafür seien auch die Anfragen von humanmedizinischer Seite aus erwähnt, die vom Erfahrungsaustausch bis zur Teilnahme an Veranstaltungen (Bsp.: Einladung zur Jahrestagung der Österreichischen IVF-Gesellschaft, 30.09.-02.10.2004, Pörschach) ein gegenseitiges Interesse hervorgerufen haben.

Im folgenden werden Beschreibungen von Arbeitsgruppen bzw. Personen zum Projekt angeführt, die während dieser Zeit kooperierten, sich ein Bild von der Durchführbarkeit machen konnten und sich bereits auf einer gemeinsamen Plattform zusammengefunden haben, um zukünftige Wege in der Wissenschaft und Praxis zu planen.

Diese Beschreibungen liegen von folgenden Arbeitsgruppen/Personen vor:

1. Prof. Dr. Karl Schellander, Institut für Tierzuchtwissenschaften der Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Versuchsgut Frankenforst, Deutschland.
2. PD Dr. Christine Wrenzycki, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierzucht, Forschungsbereich Biotechnologie, Neustadt, Deutschland.
3. PD Dr. Andreas Herrler, Department of Anatomy Reproductive Biology, Medical School RWTH Aachen, Deutschland.
4. Dr. Peter Ulrich, derzeit in São Paulo, Brasilien.
5. Prof. Dr. Radovan Dolezal, Institute of Animal Physiology and Genetics, The Academy of Sciences of the Czech Republic, Libechev, Tschechien; Univ. - Doz. Radovan Dolezel, Clinic for Obstetrics, Andrology and Reproduction, University of Veterinary Medicine and Pharmacology, Brno, Tschechien.
6. Dr. Brad Stroud, 6601 Granbury Hwy, Weatherford, Texas, USA.

**Prof. Dr. Karl Schellander**

Institut für Tierzuchtwissenschaften der  
Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen  
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn,  
Versuchsgut Frankenforst, Deutschland

**PD Dr. Christine Wrenzycki**

Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft,  
Institut für Tierzucht, Forschungsbereich  
Biotechnologie, Neustadt, Deutschland



**PD Dr. Andreas Herrler**

Department of Anatomy Reproductive  
Biology, Medical School RWTH Aachen,  
Deutschland

## **Dr. Peter Ulrich**

derzeit in São Paulo, Brasilien

Aktivitäten auf dem Gebiet des  
Embryotransfers

im Bereich der Ausbildung und Praxis in:

- Österreich
- Brasilien

**Prof. Dr. Radovan Dolezel**

Clinic for Obstetrics, Andrology and  
Reproduction, University of Veterinary  
Medicine and Pharmacology, Brno,  
Tschechien

**Dr. Brad Stroud**

6601 Granbury Hwy,  
Weatherford,  
TEXAS, USA

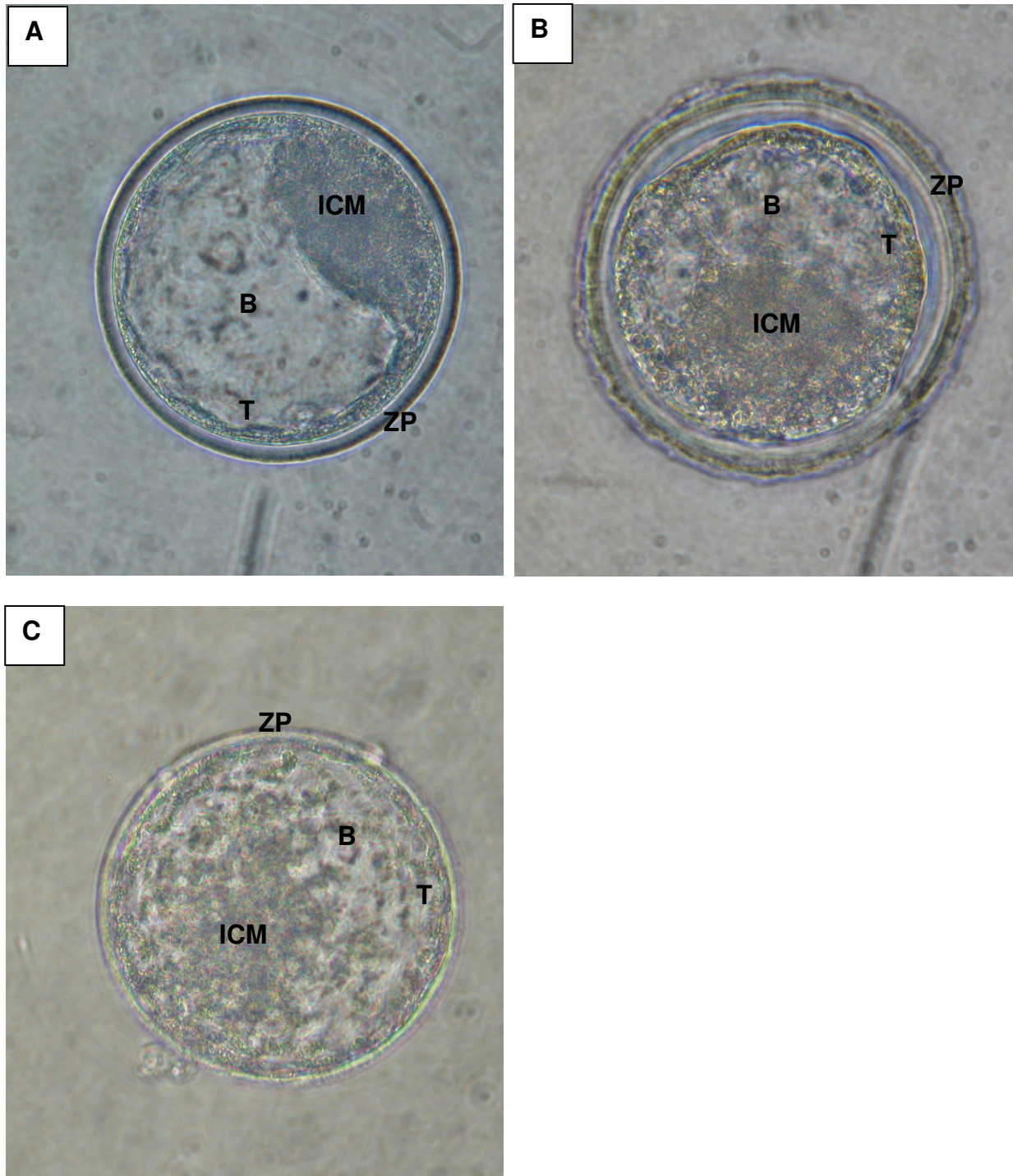


Abbildung 27: Lichtmikroskopische Darstellung im Auflicht **A)** *Ex vivo*-Embryo, **B)** Embryo nach *In vivo*-Fertilisierung und temporärer *In vivo*-Kultivierung und **C)** *in vitro*-produzierter Embryo  
 Legende: ICM – Inner Cell Mass, T - Trophoblast, B - Blastocoel, ZP - Zona pellucida

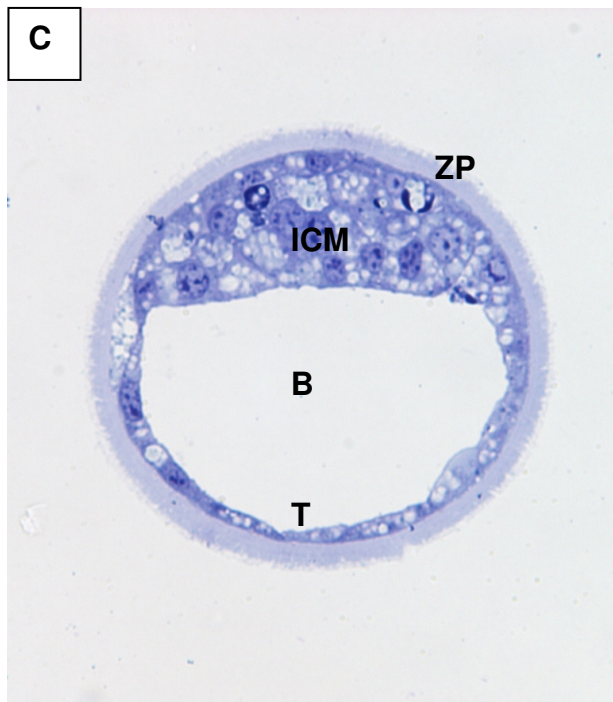
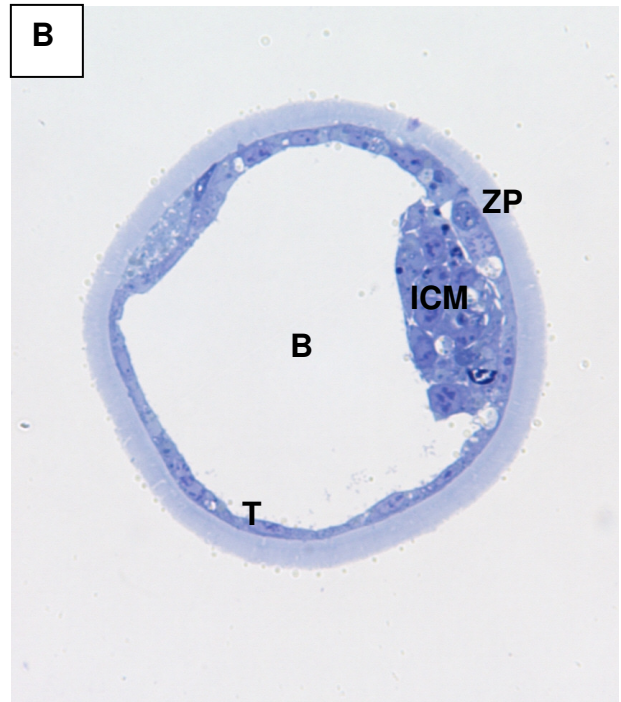
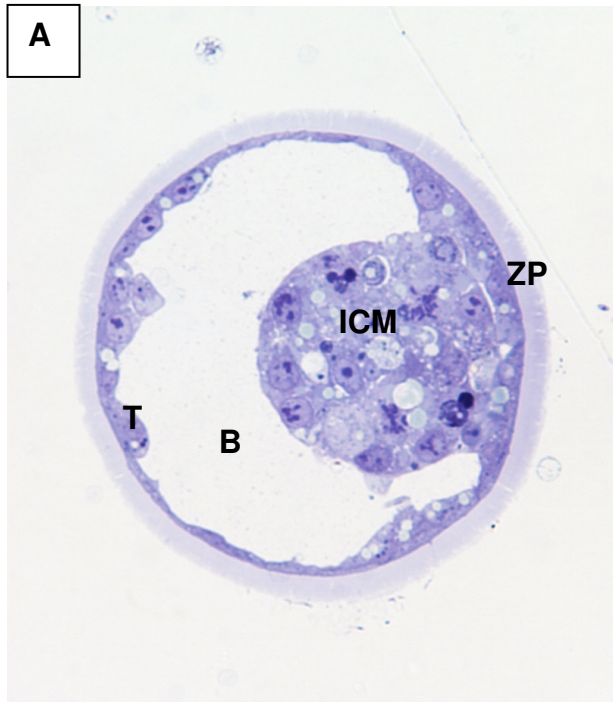


Abbildung 28: Lichtmikroskopische Darstellung im Durchlicht **A)** *Ex vivo*-Embryo, **B)** Embryo nach *In vivo*-Fertilisierung und temporärer *In vivo*-Kultivierung und **C)** *in vitro*-produzierter Embryo  
 Legende: ICM – Inner Cell Mass, T - Trophoblast, B - Blastozoele, ZP - Zona pellucida

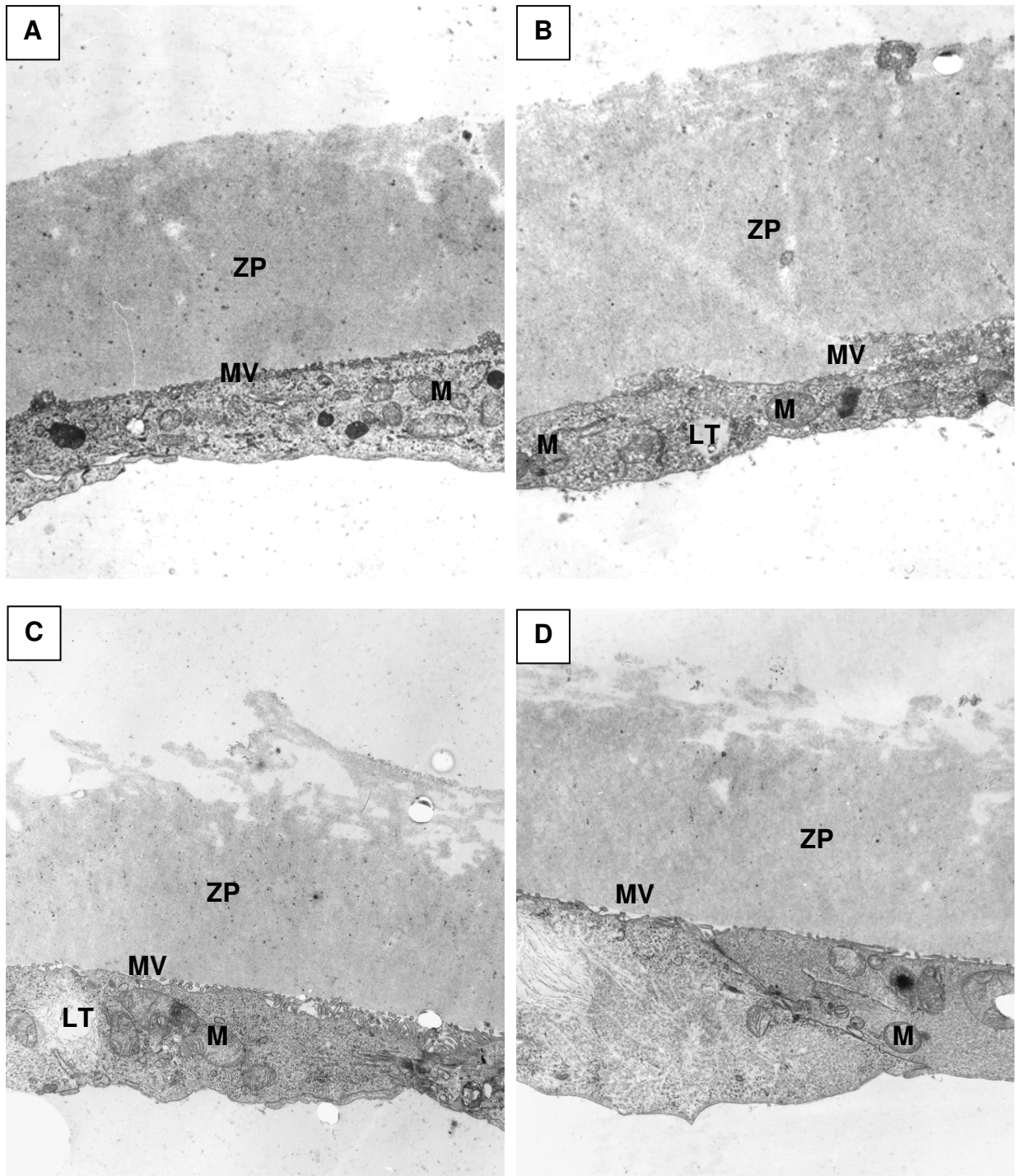


Abbildung 29 a: Trophoblastzellen **A)** *Ex vivo*-Embryo, **B)** GIFT-Embryo und **C)** *In vitro*-Embryo kultiviert mit 3 mg/ml BSA oder **D)** mit 6 mg/ml BSA (Vergrößerung 3000x)

Legende: LT - Lipidtropfen, M - Mitochondrien, MV - Microvilli, ZP - Zona pellucida

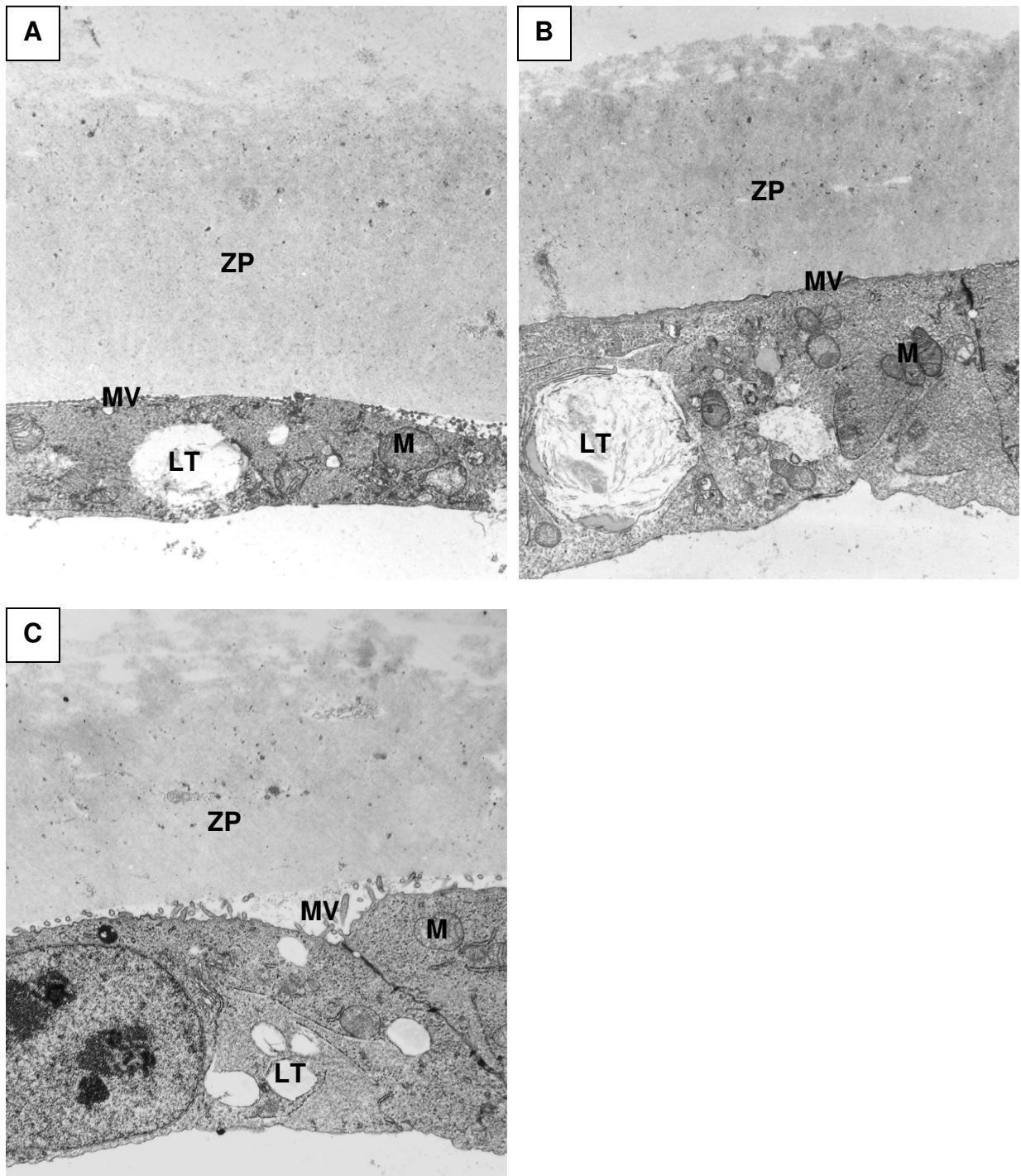


Abbildung 29 b: Trophoblastzellen **A)** *In vitro*-Embryo kultiviert mit 1% OCS, **B)** mit 5% OCS und **C)** mit 10% OCS (Vergrößerung 3000x)

Legende: LT - Lipidtropfen, M - Mitochondrien, MV - Microvilli, ZP - Zona pellucida



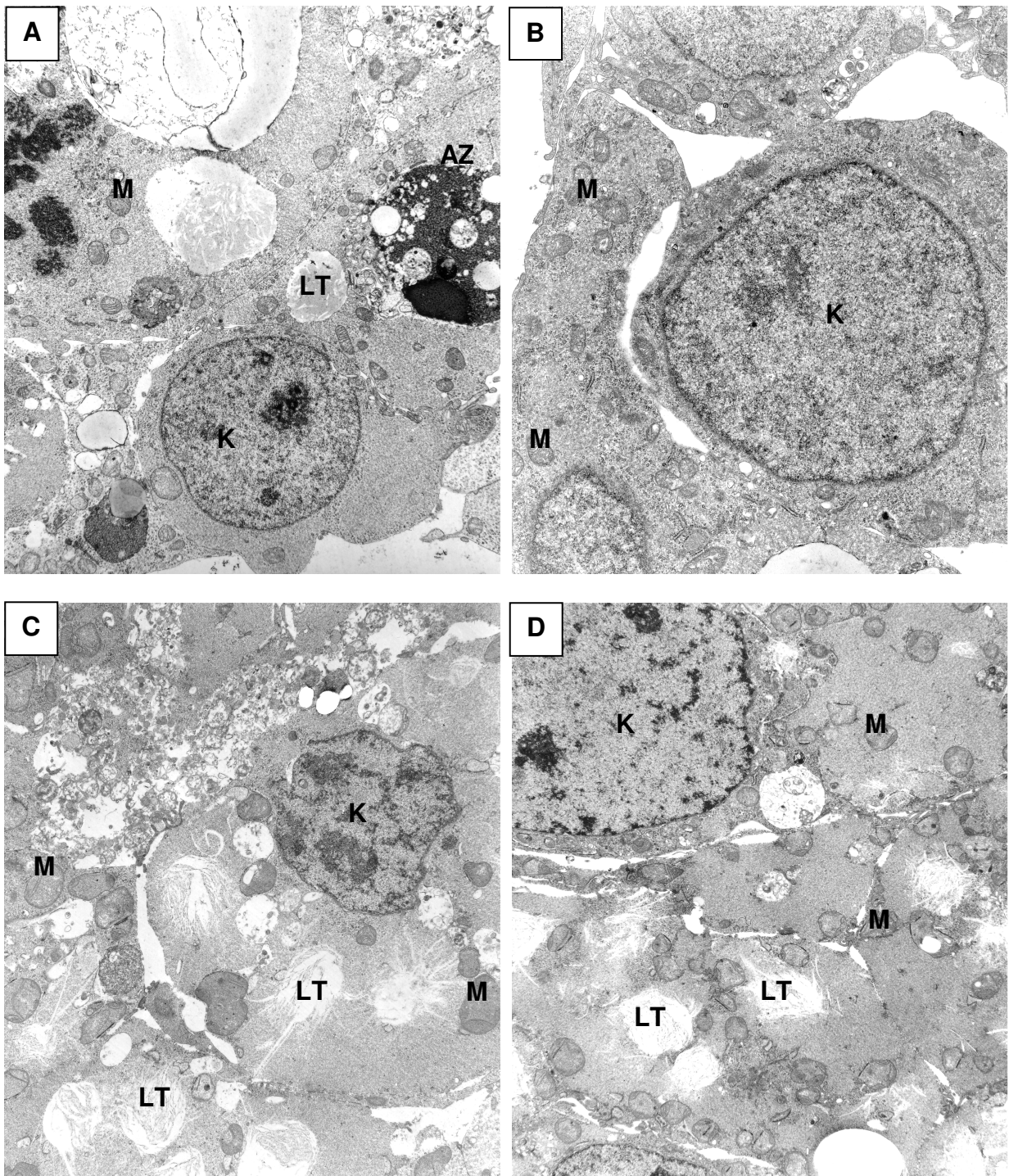


Abbildung 30 a: Inner Cell Mass (ICM) **A)** *Ex vivo*-Embryo, **B)** GIFT-Embryo und **C)** *In vitro*-Embryo kultiviert mit 3 mg/ml BSA oder **D)** mit 6 mg/ml BSA (Abb. A, C und D Vergrößerung 3000x, Abb. B 7000x)

Legende: LT - Lipidtropfen, M - Mitochondrien, K- Kern, AZ - apoptotische Zelle

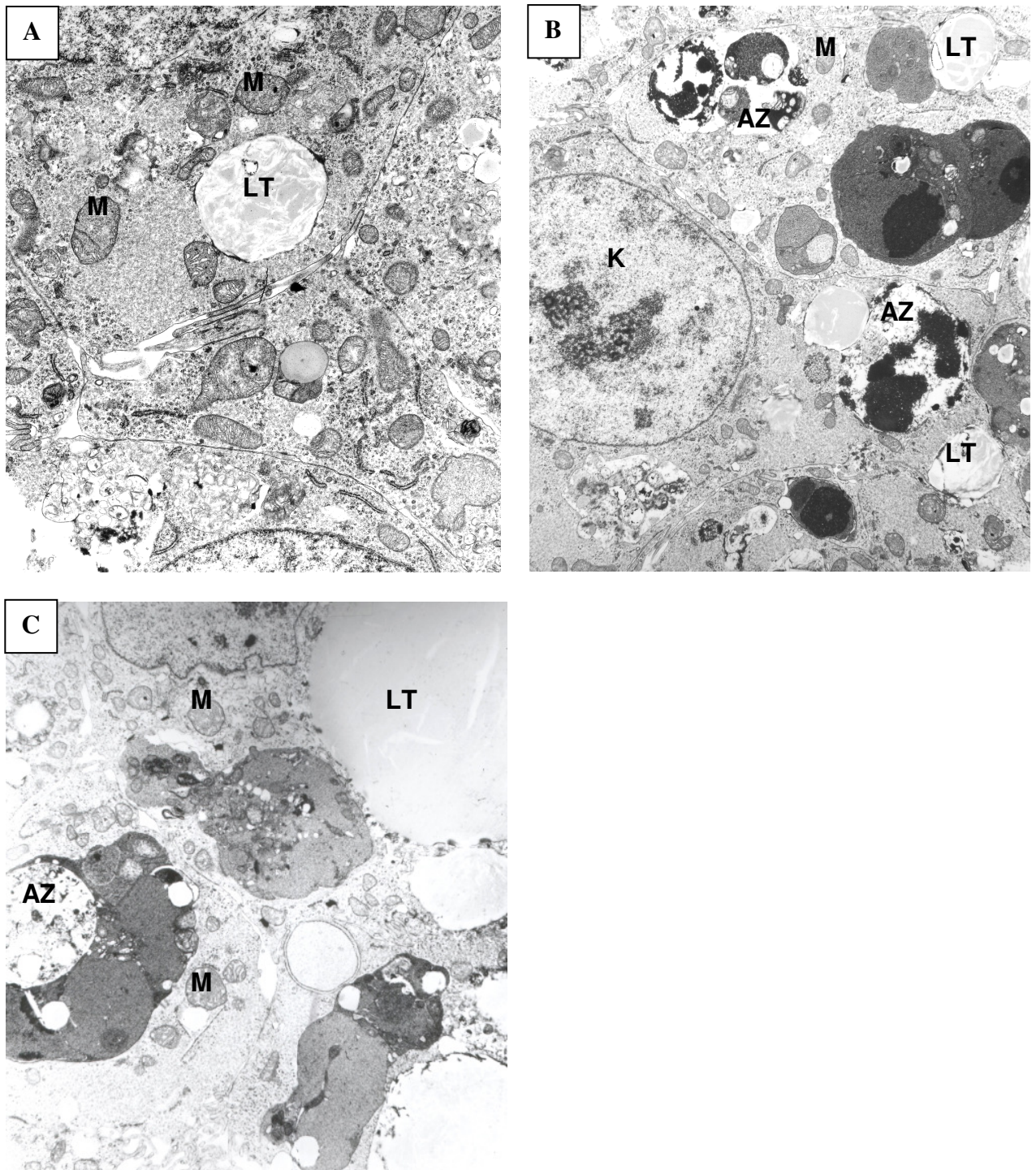


Abbildung 30 b: Inner Cell Mass (ICM) **A)** *In vitro*-Embryo kultiviert mit 1% OCS, **B)** mit 5% OCS und **C)** mit 10% OCS (Vergrößerung 3000x)

Legende: LT - Lipidtropfen, M - Mitochondrien, K-Kern, AZ - apoptotische Zelle