

Einfluss des assistierten Zonaschlupfs (Assisted Hatching)

auf die ET-Ergebnisse beim Rind

M Rüter, S Meinecke-Tillmann, M Gehring¹, H Hausschulte², B Meinecke.

Institut für Reproduktionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover;

Tierärztliche Praxis, Marsberg¹; Rinder-Union West eG, Soest²

Der Schlupf aus der Zona pellucida ist als essentieller Schritt während der Frühentwicklung zu betrachten, der es dem Wiederkäuereembryo erlaubt, mit dem Uterusepithel in direkten Kontakt zu treten, die spezies-spezifische Elongation der Blastozyste zu einem mehrere Zentimeter langen Gebilde auszuführen und sich dann zu implantieren. Dieser Schlupfvorgang kann beispielsweise bei nicht optimal entwickelten Embryonen oder beim Vorliegen einer verdickten Zona pellucida sowie nach IVP oder Kryokonservierung negativ beeinflusst werden. Ein assistierter Zonaschlupf („Assisted Hatching“), wie er seit Anfang der 90er Jahre routinemäßig beim Menschen eingesetzt wird (Erstbeschreibung: COHEN et al. 1990), wurde bisher nur in sehr begrenztem Umfang beim Nutztier angewendet (VAJTA et al. 1997; LOPATAROVA et al. 2001).

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, die Auswirkungen einer partiellen Zonadisektion auf die erzielten Trächtigkeits- und Abkalbeergebnisse im Rahmen des kommerziellen ET beim Rind unter Berücksichtigung der Embryoqualität und der Zonadicke zu analysieren.

Versuchs- und Kontrollembryonen wurden im Rahmen des kommerziellen ET gewonnen, den Vorschriften der IETS (IETS-Manual, 3rd Edition, 1998) entsprechend klassifiziert und mit einer Sony-P1-Digitalkamera fotografiert, um Messungen an Zona pellucida und Embryo durchführen zu können.

Die Mikromanipulation erfolgte mit Hilfe eines mit einem Leitz-Stereomikroskop ausgerüsteten Leitz-Mikromanipulators bei 100- bis 150-facher Vergrößerung an Embryonen der Klassen 1 - 3. Als Manipulationskammer diente der Deckel eines Nunc-Kulturschälchens (Ø 3,5 cm), das mit OCM[®] (Marsberg) oder emcare[®] (Soest) beschickt worden war. Zum Öffnen der Zona pellucida über eine definierte Strecke (ca. 125 µm) wurden 2 fein ausgezogene Mikronadeln (Clark Electromedical Instr., Reading) verwendet.

Nach dem mikrochirurgischen Eingriff (Dauer < 30 s) wurden die Embryonen in das vorgesehene Empfängertier übertragen. Auftretende Trächtigkeitsraten (6. Wo., n = 295) wurden registriert.

Die digitale Bildanalyse zur Feststellung der Zona-pellucida-Dicke erfolgte mit Hilfe des vom NIH zur Verfügung gestellten Programmes „Image J“. Aus den an 8 definierten

Stellen der Zona der Versuchs- und Kontrollembryonen durchgeführten Messungen wurde für jeden Embryo ein Mittelwert gebildet, der die Grundlage für die weiteren Analysen ist.

Die bisher zum „Assisted Hatching“ (AH) herangezogenen Embryonen (n = 154) wurden ebenso wie die Kontrollembryonen (K; n = 141) im Rahmen des kommerziellen Embryotransfers im Einzugsbereich der ET-Praxis Marsberg (117 AH, 107 K) sowie der Rinder-Union West eG (37 AH, 34 K) am Tag 7/8 des Zyklus (D 0 = Tag der Brunst) gewonnen.

Sie stammten von Spendertieren (n = 48 Kühe, davon 22 SBT, 13 RBT, 6 FL, 5 BV u. 2 CH; n = 21 Färsen, 10 SBT, 6 RBT, 3 FL, 2 BV), bei denen mittels eCG-Applikation (Intergonan®, Intervet, Unterschleißheim; 3000 IE/Kuh i.m. bzw. 2000 IE/Färse i.m.) zwischen D 9 und D 14 des Zyklus und zweimaliger Cloprostenol-Gabe (Estrumate®, Essex, München) 62 h und 74 h nach eCG eine Superovulationsbrunst eingeleitet wurde. 171 der für die Untersuchung verwendeten Embryonen waren vor dem mikroskopischen Eingriff kryokonserviert worden (88 AH, 83 K), die anderen Embryonen wurden frisch übertragen (66 AH, 58 K).

Die Rezipienten (n = 119 Kühe, davon 73 SBT, 24 RBT, 13 FL, 9 BV, n = 176 Färsen, 97 SBT, 50 RBT, 18 FL, 11 BV) wurden mittels Cloprostenol-Gabe (in der Regel zwischen D 8 und D 14 des Zyklus) zyklussynchronisiert (n = 226) oder zeigten eine natürliche Brunst (n = 69). Es wurden nur Tiere zum ET herangezogen, die eine Synchronie der Brunst von ± 24 h zu den entsprechenden Spendern aufwiesen.

Aus den bisherigen Ergebnissen wird bereits deutlich, daß sich der assistierte Zonaschlupf mittels eines mikroskopischen Eingriffs positiv auf die Trächtigkeitsrate auswirkt und somit die Potenz zu einer Steigerung der ET-Ergebnisse beim Rind hat: Insgesamt wurden bis jetzt insgesamt 295 Versuchs- und Kontrollembryonen analysiert. Dabei wurden in der Gesamt-AH-Gruppe nach 154 Transfers 98 Trächtigkeiten erzielt (63,6 %). In der Gesamt-Kontrollgruppe wurden 141 Embryonen erfasst, die in 54,6 % (77/141) der Fälle zu einer Gravidität führten.

Innerhalb dieser beiden Gruppen wurde zusätzlich zwischen frisch übertragenen und kryokonservierten Embryonen unterschieden. Frisch transferierte AH-Embryonen führten in 59,1 % (39/66) und frisch übertragene K-Embryonen in 56,9 % (33/58) der Fälle zu einer Gravidität. Demgegenüber wurde mit kryokonservierten AH-Embryonen eine Trächtigkeitsrate von 67,1 % (59/88), jedoch mit den kryokonservierten K-Embryonen lediglich eine Trächtigkeitsrate von 53,0 % (44/83) erzielt.

Bei einem Vergleich der unterschiedlichen Embryo-Qualitätsklassen wurde bezüglich der Trächtigkeitsrate eine Differenz von 10,9 % zwischen der Gruppe AH und K bei den Klasse-1-Embryonen und von 7,5 % bei den Klasse-2-Embryonen ermittelt.

Die digitale Bildanalyse wurde bisher bei 139 Embryonen durchgeführt, wobei erhebliche Unterschiede in der Zonadicke bei Embryonen desselben Entwicklungsstadiums nachgewiesen werden konnten. Eine Zuordnung der hier

erzielten Ergebnisse zu den erreichten Trächtigkeitsraten kann jedoch erst erfolgen, wenn die Messungen an allen Embryonen abgeschlossen sind.

Der mikrochirurgische Eingriff zum assistierten Zonyschlupf lässt sich problemlos und ohne großen Aufwand in den kommerziellen ET integrieren. Bei einer definierten Zonaöffnung über einen Bereich von ca. 125 μm sind zudem keine Probleme (wie z.B. die Induktion monozygoter Zwillinge etc.) beim tatsächlichen Schlupf der Blastozyste aus ihrer Zona pellucida zu befürchten.