

In vivo Kultur von IVP-Rinderembryonen im Rindereileiter

Havlicek V.¹, Wetscher F.², Huber T.², Möblacher G.², Walter I.³, Egerbacher M.³, Müller M.^{1,2}, Brem G.^{1,4}, Besenfelder U.^{1,2}

¹Institut für Tierzucht und Genetik, Klinisches Department für Tierzucht und Reproduktion der Veterinärmedizinischen Universität Wien; ²Department Interuniversitäres Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie Tulln der Universität für Bodenkultur Wien, Abteilung Biotechnologie in der Tierproduktion; ³Institut für Histologie und Embryologie, Department für Pathobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien; ⁴Fa. Agrobiogen GmbH Biotechnologie, Hilgertshausen-Larezhhausen

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. Die Unterschiede sind evident sowohl in morphologischen wie physiologischen Parametern, was sich vor allem in der Trächtigkeitsrate und der Kryotoleranz niederschlägt. Im Unterschied zur Blastozystenrate, die durch die Eizellqualität festgelegt ist, wird die Beeinflussung der Blastozystenqualität vornehmlich durch die Kultur gesehen [1]. Aus diesem Grund wurde die in vivo Kultur von IVM/IVF Embryonen schon zu Beginn der IVP-Entwicklung erfolgreich eingesetzt, indem chirurgisch der Zugang zu Rinder-, Schaf- und Kanincheneileiter geschaffen wurde. Die erzielten, guten Resultate und die dazu notwendigen Expertisen haben mittlerweile dieses Verfahren zur Routineanwendung über den Schafeileiter werden lassen. Bislang aufwändig durchgeführte Experimente beim Rind stellten jedoch die Effizienz und deren Einsatzmöglichkeit für die zukünftige Embryoproduktion in Frage.

Daher ergab sich für die vorliegende Arbeit das Ziel, ein Verfahren zur Übertragung und Rückgewinnung von Embryonen beim Rind zu etablieren. Im diesem Versuch wurden 24 zyklussynchronisierte Färsen im Alter zwischen 18 und 20 Monate verwendet. Eizellen, die für die Embryoproduktion von Schlachthofeierstöcken stammten, wurden nach den Standardverfahren in vitro maturiert, befruchtet und 1 bis 4 Tag in vitro kultiviert. Zum Transfer und zur Rückgewinnung der Embryonen wurde der von Besenfelder und Brem [2] beschriebene transvaginal endoskopische Zugang gewählt. Embryonen im Zwei- bis Sechzehnzellstadium wurden in eine gekrümmte 50µl Glaskapillare aufgezogen und via Infundibulum 5 bis 8 cm tief in die Ampulle inseriert. Am Tag 7 wurden die Embryonen aus der Gebärmutter bzw. aus dem Eileiter und der Gebärmutter gespült. In einem zweiteiligen Versuch wurde zuerst die Embryomigration im Eileiter (I. Exp.) und im weiteren dann der Einfluss der Embryonalstadien auf die in vivo-Kulturphase (II. Exp.) untersucht. Im I. Exp. wurde zur Rückgewinnung der Embryonen zuerst die Gebärmutter gespült und die Embryonen separat aufgefangen. Danach wurde der Eileiter endoskopisch und in Folge die Gebärmutter erneut gespült. Im II. Exp. wurden Embryonen in unterschiedlichem

Entwicklungsstatus entweder unmittelbar nach der Ovulation (Tag 1-2) oder zu einem späteren Zeitpunkt (Tag 3) transferiert. Im II. Exp. wurden alle Embryonen über die kombinierte Eileiter-Uterus-Spülung gewonnen.

Im I. Exp. wurden 100 Embryonen auf 4 Empfänger ipsilateral übertragen. Nach Spülung der Uteri konnten 31 Embryonen und nach einer kombinierten Spülung weiteren 34 Embryonen wiedergewonnen werden. Im II. Exp. wurden 162 Embryonen im 2 bis 4-Zellstadium auf 8 Empfänger übertragen. Am Tag 7 konnten 75 Embryonen gespült werden, von denen sich 10 zu Morulae bzw. Blastozysten entwickelt hatten. Weitere 199 Embryonen im 8-Zellstadium wurden in 12 Empfängern in vivo kultiviert, von denen nach Spülung 68 wiedergewonnen wurden. Insgesamt entwickelten sich aus dieser in vivo Kultur 25 Embryonen bis zum Morula- bzw. Blastozystenstadium. Zwei Transfers wurden aus Gründen stark gewundener Eileiter kontralateral bewerkstelligt. Trotz guter Findungsrate (57 %) entwickelten sich aus dieser in vivo Kultur keine Morulae bzw. Blastozysten.

Erste histologische Untersuchungen im Elektronenmikroskop ergaben markante Unterschiede zwischen in vitro und in vivo kultivierten Embryonen bezüglich Fettvakuolen, apoptotischer Zellen, Mikrovilli, Zona pellucida und Zellverbindungen.

Insgesamt konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass die transvaginale Endoskopie geeignet ist, um Embryonen zur erfolgreichen in vivo Kultur im Eileiter zu übertragen. Diese Technik ist relativ einfach anzuwenden und stellt durch die Verwendung von homologen, nicht ligierter Eileitern synchronisierter Tiere eine potentielle Möglichkeit dar, frühe Embryonalstadien aus in vitro Produktion einer qualitativ hochwertigen Weiterentwicklung zuzuführen. In Verbindung mit der kurzzeitigen minimal invasiven Manipulation am stehenden Tier und der in situ Vorgehensweise wird diese Technik als alternatives Routineverfahren zu den bestehenden laparotomischen Eingriffen gesehen.

Literatur

[1] 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.

[2] 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.