

## **In vivo Kultur von IVP-Embryonen im Rindereileiter: Einfluss von Morphologie und Entwicklungsstadium auf den Transfererfolg**

Besenfelder U.<sup>1</sup>, Wetscher F.<sup>2</sup>, Havlicek V.<sup>1</sup>, Huber T.<sup>2</sup>, Müller M.<sup>1,2</sup>, Brem G.<sup>3,1</sup>, Gilles M.<sup>4</sup>, Tesfaye D.<sup>4</sup>, Griese J.<sup>4</sup>, F. Rings<sup>4</sup>, H. Müller<sup>4</sup>, Schellander K.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institut für Tierzucht und Genetik, Klinisches Department für Tierzucht und Reproduktion der Veterinärmedizinischen Universität Wien; <sup>2</sup>Department Interuniversitäres Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie Tulln der Universität für Bodenkultur Wien, Abteilung Biotechnologie in der Tierproduktion, <sup>3</sup>Fa. Agrobiogen GmbH Biotechnologie, Hilgertshausen- Larezhhausen, <sup>4</sup>Institut für Tierzuchtwissenschaft der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Die *in vitro* Produktion von Rinderembryonen blickt mittlerweile auf eine lange Zeit der Entwicklung und Erfahrung zurück. Obwohl die Follikelpunktion in den verschiedenen Alters- und Leistungsstufen der Rinder den Zugriff auf eine große Zahl von Eizellen ermöglicht, sind nach wie vor deutliche qualitative Unterschiede der Embryonen, die sich im Tier bzw. extrakorporal entwickeln, zu verzeichnen. Schon zu Beginn der Entwicklung der *In-vitro* Produktion von Embryonen (IVP: IVM/IVF/IVC) wurden Teilschritte einzeln oder in Kombination im Tier vollzogen, um erstmalig erfolgreich Embryonen produzieren zu können. Aktuelle Arbeiten der letzten Jahre belegen die erfolgreiche Produktion qualitativ hochwertiger Rinderembryonen, die im Schafeileiter zwischenkultiviert wurden und rechtfertigen den benötigten technischen und finanziellen Mehraufwand (Galli et al., 2003). Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit längerem mit dem endoskopischen Zugang zum Rindereileiter. In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur *in vivo*-Kultur unterschiedlich *in vitro* vorbereiteter Gameten und Embryonen durchgeführt. Hierbei wurden morphologische sowie vom Entwicklungsstadium abhängige Einflüsse auf den Transfererfolg bzw. die Rückgewinnung und den Anteil transfertauglicher Embryonen evaluiert.

Insgesamt wurden 100 Rinder (Fleckvieh) im Alter zwischen 16 und 25 Monaten verwendet. Zur IVP wurden ausschließlich Eizellen von Schlachthofeierstöcken herangezogen und über Standardverfahren den einzelnen Arbeitsschritten IVM/IVF/IVC bzw. *In vivo*-Kultur zugeführt.

Insgesamt beinhalteten die Untersuchungen die Gewinnung und Erzeugung von 5793 Eizellen und Embryonen. Diese Objekte wurden entweder aus den verschiedenen Versuchsgruppen auf homologe Zwischenempfänger übertragen (Versuchsgruppe + *In-vivo* Kultur) oder als IVP-Kontrollgruppen (IVM/IVF/IVK) eingesetzt. Für die Zwischenkultur wurden die Eizellen bzw. Embryonen transvaginal endoskopisch gestützt orthograd in den Eileiter zyklussynchronisierter Tiere übertragen. Alle *in vivo* kultivierten Objekte wurden abschließend am Tag 7 des Zyklus mittels einer kombinierten Eileiter/Uterusspülung zurückgewonnen. Hierbei wurden, um eine möglichst hohe Rückgewinnungsrate an Embryonen zu gewährleisten, die Embryonen, wiederum endoskopisch gestützt, orthograd vom Eileiter in die Gebärmutter gespült. Die sich daran anschließende Spülung der Gebärmutter erfolgte konventionell mittels herkömmlicher Technik (Embryospülkatheter) und Mediengewinnung über einen Embryonenfilter.

Insgesamt wurden auf diese Art und Weise zwei verschiedene *in vivo* Kultivierungsexperimente (inkl. Kontrollgruppe) durchgeführt. Bei diesen wurden der Einfluß verschiedener morphologischer Kriterien auf die Wiedergewinnung (Exp. I) und die Übertragung unterschiedlicher *in vitro*-Stadien (Exp. II) auf die tubale Entwicklungskapazität untersucht.

Exp. I: Hierbei wurden Embryonen (welche) in Hyaluronsäure (6 mg/mL Hyaluronan; Hepes TL), denudierte Zygoten, Zygoten im Cumulus, Zygoten in Alginat (nach Yaniz et al. 2002, Hepes TL) und in vitro maturierte Eizellen übertragen. Letztere wurden unmittelbar vor dem Eileitertransfer mit Swim up-separiertem, in vitro kapazitiertem Samen in die Transferkapillare aufgezogen (Gamete intra fallopian transfer: GIFT,  $2 \times 10^6$  Spermien pro Transfer, Hepes TL).

Exp. II: Im Rahmen dieses Experimentes wurden folgende Transfergruppen gebildet: In der COC-Gruppe wurden IVM-COC`s auf zyklussynchrone Tiere übertragen, die am Abend des Vortages und am Morgen des Transfers mit jeweils von zwei Bullen stammenden verdünnten, nativen Ejakulaten besamt wurden. In der GIFT-Gruppe wurden maturierte COC`s mit 2 Mio Spermien (IVF analoge Vorbereitung) gemeinsam in die Transferkapillare aufgezogen. In der letzten Gruppe wurden IVP-Embryonen im 4-8 Zellstadium übertragen.

Die Ergebnisse von Exp. I zeigen, dass ausgehend von der Viskositätssteigerung des Transfermediums (Hyaluronsäure) über Zygoten ohne bzw. mit Cumulus, über die GIFT-Gruppe bis zum Transfer von Zygoten in Alginat die Gewinnungsraten von 12,9% auf 70,5% anstieg. Insgesamt waren die Entwicklungsraten bis Tag 7 relativ gering und verhielten sich umgekehrt proportional zu den Gewinnungsraten: Die in vivo-Kultur von Zygoten in Alginat resultierte in einer Blastozystenrate von 7,7%, während aus dem Transfer in hyaluronsäurehaltigem Medium 16,3% Blastozysten hervorgingen. Wurden diese gewonnenen Stadien für einen weiteren Tag in Kultur gehalten, so entwickelten sich aus der GIFT-Gruppe 20,5% und bei der Gruppe von Zygoten im Cumulus 18,4% Blastozysten.

Weitere Untersuchungen zur Entwicklungskapazität im Eileiter (Exp. II) ergaben, dass nach Transfer von IVM-COC und Besamung, zwar 76% wiedergewonnen werden konnten; die Entwicklungsrate zur Blastozyste lag jedoch lediglich bei 0,9%. Im Gegensatz dazu führte die in vivo-Kultur von IVM-COC`s mit Spermien (GIFT-Gruppe) im Eileiter zu 20% Blastozysten am Tag 8. Besonders auffällig waren die Ergebnisse aus dem Transfer von 4-8 Zellstadien: Es konnten 80% der übertragenen Komplexe wiedergefunden werden, von denen sich am Tag 7 42% (IVP-Vergleich: 21%) und am Tag 8 43% (IVP-Vergleich: 38%) zu Blastozysten weiterentwickelt hatten.

Insgesamt ist den Daten zu entnehmen, dass in Anbetracht der komplexen Eileiteranatomie und -physiologie sowohl morphologische Voraussetzungen essentiell sind, um über den Transfer Anschluss an die Weiterentwicklung im Eileiter zu bekommen, als auch das Entwicklungsstadium der IVM/IVF-Komplexe erheblichen Einfluss auf die Erfolgsrate ausübt.

Danksagung:

Wir danken .....

Herrn Dr. Ulrich Jannowitz und seinem Team von der RUW – Station Borken für die tatkräftige Unterstützung unserer Versuche und die hervorragende Bereitstellung nativer Bullenejakulate. Weiterhin möchten wir uns bei der Firmen Essex für die Bereitstellung verschiedener Arzneimittel bedanken.

Literatur:

- Lonergan P, Rizos D, Kanka J, Nemcova L, Mbaye AM, Kingston M, Wade M, Duffy P, Boland MP (2003): Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction* 126, 337–346.
- 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.
- Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G (2003): Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59,599-616.