

**Effekt der Laserpunktion der equinen  
Glykoproteinkapsel auf die  
Sensitivität des Pferdeembryos  
gegenüber Ethylenglykol und auf die  
Vitalität des Pferdeembryos in vitro**

**Sophia Henriette Wiebe**

**München 2009**

Aus der Klinik für Pferde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Klinikvorstand: Prof. Dr. Hartmut Gerhards  
Angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. Johannes Handler

# Effekt der Laserpunktion der equinen Glykoproteinkapsel auf die Sensitivität des Pferdeembryos gegenüber Ethylenglykol und auf die Vitalität des Pferdeembryos in vitro

Inaugural–Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Sophia Henriette Wiebe  
aus Freiburg im Breisgau

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun  
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Handler  
Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Dr. Sinowatz  
Univ.-Prof. Dr. Gabius  
Univ.-Prof. Dr. Pfister  
Prof. Dr. Knospe

Tag der Promotion: 17.Juli 2009

*Meinen Eltern und Großeltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>10</b>
<b>2. Literaturübersicht</b>	<b>12</b>
2.1. Reproduktionsphysiologie der Stute . . . . .	12
2.2. Zyklussteuerung . . . . .	13
2.2.1. Zyklussynchronisation . . . . .	13
2.2.2. Ovulationsinduktion . . . . .	14
2.2.3. Induktion der Superovulation . . . . .	16
2.3. Embryonalentwicklung . . . . .	19
2.3.1. Entwicklung im Eileiter . . . . .	19
2.3.2. Entwicklung im Uterus . . . . .	22
2.3.2.1. Vor der Fixierung . . . . .	22
2.3.2.2. Nach der Fixierung . . . . .	28
2.3.3. Veränderungen in der frühembryonalen Phase . . . . .	29
2.3.3.1. Zusammensetzung und Produkte von Embryo und Uterus . . . . .	29
2.3.3.2. Osmotisch bedingte Veränderungen . . . . .	32
2.3.4. Entstehung der plazentaren Hüllen . . . . .	35
2.3.4.1. Dottersackplazentarstadium (Tag 8 – 21) . . . . .	35
2.3.4.2. Allantoisplazentarstadium (Tag 21 – 40) . . . . .	36
2.4. Morphologische Beurteilung des Embryos . . . . .	40
2.5. Die Kapsel . . . . .	42
2.5.1. Zusammensetzung der Kapsel . . . . .	42
2.5.2. Funktion der Kapsel . . . . .	44
2.5.3. Bedeutung der Kapsel für die Biotechnik . . . . .	46
2.5.4. Abbau der Kapsel . . . . .	47
2.6. Biotechnologien in der equinen Reproduktion . . . . .	47
2.6.1. Embryonensplitting . . . . .	47
2.6.2. Biopsie . . . . .	49
2.6.3. Embryotransfer (ET) . . . . .	50
2.6.3.1. Methoden der Embryogewinnung . . . . .	50
2.6.3.2. Spülmedien . . . . .	53
2.6.3.3. Methoden der Übertragung . . . . .	53

2.6.3.4.	Einflussfaktoren auf die Trächtigkeit . . . . .	55
2.6.4.	Gamete intrafallopian tube transfer (GIFT) . . . . .	56
2.6.5.	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) . . . . .	57
2.6.6.	Intrafollikuläre Insemination (IFI) . . . . .	58
2.6.7.	In-vitro-Produktion (IVP) . . . . .	58
2.6.7.1.	In-vitro-Reifung (IVM) . . . . .	58
2.6.7.2.	In-vitro-Fertilisation (IVF) . . . . .	59
2.6.7.3.	In-vitro-Kultivierung (IVC) . . . . .	60
2.6.8.	Klonen . . . . .	60
2.6.9.	Manipulation der Zona pellucida . . . . .	62
2.6.9.1.	Partial Zona Removal (PZR), Partial Zona Dissection (PZD)	62
2.6.9.2.	Zona Drilling, Zona Splitting, Zona Thinning . . . . .	63
2.6.9.3.	Laserbehandlung der Zona pellucida . . . . .	63
2.6.9.4.	Piezo–Technologie . . . . .	64
2.7.	Manipulationen am Embryo . . . . .	65
2.7.1.	Färbungen . . . . .	65
2.7.2.	Kühlen von Embryonen . . . . .	66
2.7.3.	Tiefgefriermethoden . . . . .	67
2.7.3.1.	Konventionell . . . . .	69
2.7.3.2.	Vitrifikation . . . . .	73
2.7.4.	Kultur von Embryonen . . . . .	75
2.7.4.1.	Co-Kultivierung . . . . .	76
2.7.4.2.	Kulturmedien . . . . .	76
2.7.5.	Kapselmanipulation . . . . .	77
2.7.6.	Laserdissektion . . . . .	77
2.7.6.1.	Laser capture microdissection . . . . .	78
2.7.6.2.	Laser cutting microdissection . . . . .	78
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>80</b>
3.1.	Versuchsübersicht . . . . .	81
3.2.	Versuchstiere . . . . .	81
3.3.	Zyklusmanagement . . . . .	83
3.4.	Besamung und Ovulationsdetektion . . . . .	83
3.5.	Embryogewinnung . . . . .	83
3.6.	Laserverfahren . . . . .	85
3.6.1.	Lasertechnik . . . . .	85
3.6.2.	Laserbehandlung . . . . .	86
3.7.	Behandlung mit EG . . . . .	87
3.8.	Kulturverfahren . . . . .	88
3.9.	DAPI . . . . .	89
3.10.	Statistische Auswertung . . . . .	89

<b>4. Ergebnisse</b>	<b>90</b>
4.1. Embryogewinnung . . . . .	90
4.2. Durchführbarkeit der Laserpunktion . . . . .	93
4.3. Reaktionen der Embryonen auf die Manipulationen . . . . .	94
4.3.1. Laserpunktion . . . . .	94
4.3.2. Behandlung der Embryonen mit Ethylenglykol . . . . .	96
4.4. Embryokultur . . . . .	97
4.4.1. Wachstum . . . . .	99
4.4.2. Blastozoelekollaps . . . . .	106
4.4.3. Kapselruptur . . . . .	106
4.4.4. Zellausstülpungen . . . . .	107
4.5. DAPI . . . . .	108
<b>5. Diskussion</b>	<b>111</b>
5.1. Embryogewinnung . . . . .	111
5.2. Laserpunktion . . . . .	113
5.3. Reaktion der Embryonen auf die Manipulationen . . . . .	115
5.3.1. Laserpunktion . . . . .	115
5.3.2. Behandlung der Embryonen mit Ethylenglykol . . . . .	116
5.4. Embryokultur . . . . .	118
5.5. DAPI . . . . .	122
5.6. Ausblick . . . . .	123
5.7. Schlussfolgerung . . . . .	123
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>124</b>
<b>7. Summary</b>	<b>127</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>129</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>152</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>156</b>

# Abkürzungsverzeichnis

<b>AQP</b>	Aquaporine
<b>AVP</b>	Arginin Vasopressin
<b>(<math>\beta</math>2M)</b>	$\beta$ 2-Mikroglobulin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Chlorid
<b>Cyto-B</b>	Cytochalasin-B
<b>DAPI</b>	Dapi- 4',6'-diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinsäure
<b>EG</b>	Ethylenglykol
<b>EPE</b>	equines Hypophysenextrakt
<b>ET</b>	Embryotransfer
<b>FDA</b>	Fluoreszin Diazetat
<b>FCS</b>	fetales Kälberserum
<b>FES</b>	fetales equines Serum
<b>FSH</b>	follikelstimulierendes Hormon
<b>GIFT</b>	Gametentransfer
<b>GM2-AP</b>	GM2-Aktivator Protein
<b>GnRH</b>	Gonadotropin Releasing Hormon
<b>GPI</b>	Glucosephosphat Isomerase
<b>hCG</b>	humanes Choriongonadotropin
<b>HMG</b>	humanes menopausales Gonadotropin
<b>ICM</b>	Embryoblast
<b>ICSI</b>	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
<b>IFI</b>	intrafollikuläre Besamung
<b>IGF</b>	Insulin-artiger Wachstumsfaktor
<b>IGF-BP3</b>	Insulin-artiger Wachstumsfaktor bindendes Protein-3
<b>i.m.</b>	intra muskulär
<b>IVP</b>	In-vitro-Produktion
<b>IVC</b>	In-vitro-Kultur
<b>IVF</b>	In-vitro-Befruchtung
<b>IVM</b>	In-vitro-Reifung
<b>IU</b>	Internationale Einheit
<b>i.v.</b>	intra venös

<b>K<sup>+</sup></b>	Kalium
<b>KG I</b>	Kontrollgruppe I
<b>KG II</b>	Kontrollgruppe II
<b>LH</b>	luteinisierendes Hormon
<b>μm</b>	Micrometer
<b>mm</b>	Millimeter
<b>μJ</b>	Microjoule
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natrium
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase</b>	Natrium-Kalium-ATPase
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PGF<sub>2α</sub></b>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
<b>sPLA2</b>	Phospholipase A2
<b>PZD</b>	Teilweise Zerlegung der Zona pellucida
<b>PZR</b>	Teilweise Entfernung der Zona pellucida
<b>s.c.</b>	subkutan
<b>TCM-199</b>	Tissue Culture Medium 199
<b>TNF-α</b>	Tumornekrosefaktor-α
<b>TUNEL</b>	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
<b>TGK</b>	Tiefgefrierkonservierung
<b>TGV</b>	Tiefgefrierverfahren
<b>VG I</b>	Versuchsgruppe I
<b>VG II</b>	Versuchsgruppe II

# 1. Einleitung

Obwohl die erste erfolgreiche Übertragung eines Pferdeembryos mehr als 30 Jahre zurückliegt (1972), spielt der Embryotransfer in der Pferdezucht Europas noch immer eine untergeordnete Rolle. Diese Tatsache liegt in einigen Besonderheiten der Reproduktionsbiologie der Stute begründet, die den erzielten Erfolg in Relation zum eingesetzten Aufwand erheblich schmälern. Ein limitierender Faktor ist die mangelnde Verfügbarkeit von geeigneten, zyklussynchronen Empfängerstuten am Tag der Embryogewinnung aus der Spenderstute.

Anders als das Rind lässt sich die Stute nur bedingt in ihrem Zyklusablauf auf den Tag genau steuern. Ineffiziente Protokolle zur Superovulation der Spenderstuten führen dazu, dass pro Spülvorgang höchstens ein Embryo gewonnen wird. Darüber hinaus reagieren Einzelstuten sehr unterschiedlich auf Synchronisationsbehandlungen, sodass sich eine genaue Zyklus-synchronisation von Empfänger- und Spenderstuten als sehr schwierig herausgestellt hat. Dies ist aber eine wesentliche Voraussetzung für das Gelingen eines Transfers.

Es gibt zwei Möglichkeiten, diese Situation zu verbessern: 1. den Aufbau einer Empfängertierherde und 2. die Etablierung eines geeigneten Tiefgefrierverfahrens für Pferdeembryonen. Die Zugriffsmöglichkeit auf große Empfängertierherden ermöglicht in amerikanischen Ländern (USA, Argentinien, Brasilien) gute Embryotransfererfolge, da die extensive und kostengünstige Haltung von Empfängertierherden in einer Größenordnung von 50 – 200 Stuten die Wahrscheinlichkeit deutlich erhöht, dass an einem bestimmten Tag zumindest eine geeignete Empfängerstute zur Verfügung steht. In Europa ist der Aufbau solch großer Herden mit hohen Kosten verbunden, sodass nach geeigneten Alternativen gesucht werden muss. Eine andere Möglichkeit ist die Tiefgefrierkonservierung (TGK) der Embryonen im Anschluss an ihre Gewinnung. Der konservierte Embryo kann so bei optimalen Voraussetzungen aufgetaut und in eine geeignete Empfängerstute übertragen werden. Die Bereitstellung einer zyklussynchronen Empfängerstute am Tag der Embryospülung ist auf diese Weise nicht mehr die Voraussetzung für das Gelingen des Transfers.

Der Einsatz der TGK von Pferdeembryonen im Rahmen des kommerziellen Embryotransfers ist beim Pferd allerdings nach wie vor limitiert. Dafür sind die schlechten Erfolgsraten der TGK bei über 300  $\mu\text{m}$  großen Blastozysten (Tag 7 bzw. 8) sowie der späte Abstieg der Embryonen in den Uterus (etwa an Tag 6) verantwortlich.

Als mögliche Ursache wird die für den Pferdeembryo charakteristische Glykoproteinkapsel zwischen dem Trophektoderm und der Zona pellucida in Betracht gezogen, die die Diffusion der Kryoprotektiva (Gefrierschutzmittel) in den Embryo und damit deren Schutzwirkung reduziert.

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung einer punktuellen, laserinduzierten Öffnung der embryonalen Kapsel auf die Vitalität acht Tage alter Pferdeembryonen zu untersuchen.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Reproduktionsphysiologie der Stute

Die Stute gehört zu den saisonal polyöstrischen Tieren. Das bedeutet, dass der Zyklus im Winter für einige Wochen bis Monate (November – Februar) aussetzt. Diese Phase reduzierter Ovaraktivität wird als Anöstrus bezeichnet. Die Ursache dieses Phänomens ist jahreszeitbedingt. Mit abnehmender Tageslichtlänge (Herbst / Winter) nimmt die zyklische Ovarfunktion ab, mit zunehmender Tageslichtlänge (Frühjahr / Sommer) nimmt sie zu. Folglich liegt die Hauptzuchtsaison zwischen Februar und August. Auf diese Weise wird vor allem in der freien Wildnis gewährleistet, dass nach einer Trächtigkeit von 320 – 360 Tagen (ca. 11 – 12 Monaten) die Fohlen zu einer Jahreszeit geboren werden, die günstige Umweltbedingungen für das Überleben des Neugeborenen gewährt. In der Zucht, insbesondere beim englischen Vollblut, haben früh im Jahr geborene Fohlen den später im Jahr geborenen gegenüber durch ihren altersbedingten Entwicklungsvorsprung einen deutlichen Vorteil. Dieser wird vor allem im Rahmen von Pferderennen ausgenutzt.

Mit der ersten ovulatorischen Rosse im Alter von etwa 18 Monaten erlangt die Stute die Geschlechtsreife. Der Sexualzyklus der Stute dauert durchschnittlich 21 – 22 Tage und kann in zwei klinisch manifeste Abschnitte unterteilt werden: die Rosse (Östrus) mit durchschnittlich sieben Tagen und die Zwischenrosse (Diöstrus) mit 14 – 16 Tagen. Während der Rosse kommt es durch hormonelle Veränderungen (u.a. Östrogenproduktion durch den Rossefollikel) zur typischen Rossesymptomatik. Dazu gehören neben den äußeren Rossesymptomen (Schleimabsatz [„Blitzen“], Dulden des Hengstes) auch die inneren Rossesymptome (Schleimhautveränderungen der Vagina und der Gebärmutter). Die Schleimhautveränderung der Gebärmutter (Ödematisierung) lässt sich sonographisch als „radspeichenartige Struktur“ darstellen. Ca. 24 – 48 Stunden vor dem Ende der Rosse erfolgt die Ovulation. Diese wird als Tag 0 des Zyklus bezeichnet. Der dabei gesprungene Follikel bildet sich zum Gelbkörper (Corpus luteum) um, der das Hormon Progesteron sezerniert. Dieses ist im Rahmen der Trächtigkeit für deren Aufrechterhaltung verantwortlich. Mit der Ovulation bzw. der Gelbkörperbildung beginnt der Diöstrus (DAY, 1939; HANDLER u. AURICH, 2005).

## 2.2. Zyklussteuerung

### 2.2.1. Zyklussynchronisation

Zur Minimierung des Arbeitsaufwandes bei großen Herden und zur Optimierung der Embryotransferbedingungen ist es möglich, den Zyklus von Stuten zu synchronisieren. Dadurch befinden sich mehrere Stuten in der gleichen Zyklusphase. Zur Synchronisation des Östrus können Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) und dessen synthetische Analoga, die Steroidhormone Progesteron und Östradiol sowie Gestagene (Allyltrenbolon = Altrenogest) verwendet werden.

**Prostaglandin  $F_{2\alpha}$**  Durch Gabe des luteolytisch wirkenden Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) wird die vorzeitige Regression des Gelbkörpers ausgelöst. Auf diese Weise kann der Diöstrus um bis zu 4 Tage verkürzt werden (DOUGLAS u. GINTHER, 1972; BROCKSCHMIDT et al., 1985). Voraussetzung für eine erfolgreiche Luteolyse ist das Vorhandensein eines ansprechbaren Gelbkörpers (BRISTOL, 1987). Dies ist frühestens 4 – 6 Tage nach der Ovulation der Fall. Spricht der Gelbkörper auf das verabreichte  $PGF_{2\alpha}$  an, so folgt ca. 2 – 4 Tage später der Beginn des Östrus bzw. 7 – 12 Tage später die Ovulation (GINTHER, 1992).

**Progesteron** Das normalerweise vom Corpus luteum im Diöstrus sezernierte Progesteron bewirkt durch sein negatives Feedback auf den Hypothalamus eine Reduktion der Freisetzung des Gonadotropin Releasing Hormons (GnRH). Die dadurch bedingte Hemmung der Freisetzung des luteinisierenden Hormons (LH) aus der Hypophyse verhindert die Ovulation. Durch exogene Verabreichung von Progesteron wird der Plasmaprogesteronspiegel künstlich erhöht und dadurch der Diöstrus so lange aufrecht erhalten, bis sich alle zu Behandlungsbeginn vorhandenen Gelbkörper der behandelten Tiere zurückgebildet haben und kein endogenes Progesteron mehr vorhanden sein kann (LOY et al., 1981; AURICH, 2005). Die Kombination von Progesteron und Östradiol- $17\beta$  führt zur effektivsten Rossesynchronisation, da durch ihre synergistische Wirkung sowohl das Follikelwachstum als auch die Ovulation unterdrückt werden. Wird am letzten Tag der Progesteronbehandlung  $PGF_{2\alpha}$  und in der dann ausgelösten Rosse bei Vorhandensein eines 35 mm-Follikels hCG verabreicht, so ovulieren über 70 % der Stuten innerhalb von 10 – 12 Tagen nach der letzten Progesteroninjektion (PERKINS, 1999).

Eine weitere sehr effektive Synchronisationsmethode ist die 12tägige Verabreichung von Progesteron in Form einer Vaginalspange (CIDR-B) in Kombination mit 10 mg  $E_2$  (Östradiol) am Tag des Einsetzens sowie der Gabe von  $PGF_{2\alpha}$  am Tag der Entfernung der Vaginalspange. Hat der größte Follikel nach der Entfernung der Vaginalspange eine Größe von 40 mm im Durchmesser erreicht, so kann ein Deslorelinimplantat eingesetzt werden. Das Deslorelinimplantat (Ovuplant<sup>®</sup>) ist ein GnRH-Analogon, welches zur Auslösung der Ovulation eingesetzt wird. Durch die andauernde Freisetzung von LH und FSH kommt es in der Regel innerhalb von 48 Stunden zur Ovulation (KLUG u. JOECHLE, 2001).

**Allyltrenbolon** Die Verabreichung des synthetisch hergestellten Gestagens Allyltrenbolon führt durch ein negatives Feedback auf den Hypothalamus zur Zyklusblockade (IMEL et al., 1981b). Die Rosse wird 5 – 7 Tage nach Behandlungsende erwartet, bis zur Ovulation sind es 10 – 13 Tage. Kombiniert man Allyltrenbolon am letzten Behandlungstag mit PGF<sub>2α</sub>, so setzt die Rosse bereits nach 2 – 5 Tagen ein (MEYERS, 1997). Die Anwendung von Vaginalschwämmen mit Allyltrenbolon wurde getestet (DRIANCOURT u. PALMER, 1982; PALMER, 1985), hat sich aber aufgrund des Risikos von Vaginitiden als Nebeneffekt nicht durchgesetzt (NEELY, 1988).

### 2.2.2. Ovulationsinduktion

Die Induktion der Ovulation ist eine weitere Methode der Zyklussynchronisation. Die Möglichkeit der Vorhersage des Ovulationszeitpunktes hat viele Vorteile. Einerseits kann dadurch die Zahl der Besamungen und damit das Entzündungsrisiko durch die Besamung minimiert werden sowie ein relativ genauer Besamungszeitpunkt für die Verwendung von gekühltem bzw. tiefgefrorenem Samen festgelegt werden; andererseits kann der Transport der Stute zum Hengst zeitlich optimiert bzw. Spender- und Empfängerstute im Rahmen eines Embryotransferprogrammes bestmöglich synchronisiert werden (SAMPER, 2008). Zu diesem Zweck können verschiedene Medikamente wie z.B. humanes Choriongonadotropin (hCG) und GnRH bzw. dessen stärker wirksame, synthetische Analoga Buserelin und Deslorelin verwendet werden. Die Verabreichung sollte jedoch erst erfolgen, wenn Anzeichen der Rosse wie z.B. ein ödematisiertes Endometrium, eine relaxierte Zervix sowie ein Follikel  $\geq 35$  mm im Durchschnitt vorhanden sind (SAMPER, 2008).

**Humanes Choriongonadotropin** Das humane Choriongonadotropin (hCG) ist ein placentales Peptidhormon, welches aus dem Urin schwangerer Frauen extrahiert wird und durch seine luteale Funktion für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft verantwortlich ist. Die Wirkung ist ähnlich der des luteinisierenden Hormons (LH), welches die Follikelreifung und die Ovulation hervorruft. Wenn bei einer rossigen Stute ein Follikel von 30 – 35 mm im Durchmesser auf dem Ovar vorhanden ist, kann hCG (intravenös [i.v.], intramuskulär [i.m.], subcutan [s.c.]) verabreicht werden. Dies führt zur Verkürzung des Östrus und löst in der Regel innerhalb der nächsten 36 – 48 Stunden die Ovulation aus (BARBACINI et al., 2000; EVANS et al., 2006). Die Größe des Follikels ist jedoch nur als grober Richtwert anzusehen, da die Reaktion auf hCG unter anderem von der Rasse abhängig ist. So zeigen zum Beispiel Shire-Horse-Stuten bei einem Follikeldurchmesser von 30 – 35 mm keine Reaktion auf die Verabreichung von hCG, da ein Follikel dieser Größe für Shirehorsestuten noch nicht die entsprechende Reife erreicht hat (SAMPER, 2001). Anhand jüngster Studien (MOREL u. NEWCOMBE, 2007) ist die Verabreichung von 750 IU hCG genauso effektiv wie bisher verwendete Dosen von 1500 – 3000 IU hCG. Die Reduzierung der Dosis trotz gleicher Effektivität (Ovulation innerhalb von 48 Stunden) ist wirtschaftlich von Vorteil, da dadurch die Kosten gesenkt werden können.

Obwohl hCG in der Lage ist, die Ovulation auszulösen, hat es weder einen Effekt auf die totale bzw. multiple Ovulationsrate noch auf die allgemeine bzw. multiple Trächtigkeitsrate. Allerdings steigert es die Synchronität multipler Ovulationen, sodass diese innerhalb von 48 Stunden erfolgen. Einfachovulationen erfolgen nach Gabe von hCG ebenfalls innerhalb der nächsten 48 Stunden, wohingegen dieser Zeitraum ohne vorherige hCG-Behandlung 1 – 7 Tage betragen kann (MOREL u. NEWCOMBE, 2007). Durch die Wirkung von hCG und dem damit eingrenzbaeren Ovulationszeitpunkt können nicht nur die Zahl der Besamungen pro Rosse sowie das Entzündungsrisiko reduziert werden, sondern auch die Kosten gesenkt und die Konzeptionsrate erhöht werden (VANDERVALL et al., 2001). Nachteil der hCG-Verabreichung ist die mögliche Antikörperbildung gegen das Glykoprotein-Hormon bei mehrfacher Anwendung von hCG innerhalb einer Saison. Ob die Wirksamkeit von exogen zugeführtem hCG bezogen auf die Ovulationsinduktion dadurch vermindert wird, ist umstritten (ROSER et al., 1979; WILSON et al., 1990; MCCUE et al., 2004). Anscheinend wird bei wiederholter Verabreichung von hCG innerhalb einer Zuchtsaison die Effektivität vermindert und damit die Ovulation verzögert. Hinzu kommt, dass mit zunehmendem Alter der Stute die Zahl der Ovulationen innerhalb von 24 – 48 Stunden nach hCG-Verabreichung sinkt (MCCUE et al., 2004). Möglicherweise kann die Antikörperbildung durch Reduzierung der Dosis auf 750 IU hCG verringert werden (MOREL u. NEWCOMBE, 2007). Es ist jedoch empfehlenswert, hCG aufgrund seiner immunogenen Eigenschaften in maximal zwei aufeinanderfolgenden Zyklen pro Saison zur Ovulationsinduktion zu verwenden (PERKINS, 1999).

**Gonadotropin Releasing Hormon und seine Analoga** Das vom Hypothalamus sezernierte Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) führt in der Hypophyse zur Freisetzung des gonadotropen Hormons LH sowie des gonadotropen follikelstimulierenden Hormons (FSH). Zur Auslösung von Ovulationen reicht eine einfache Gabe von GnRH allerdings nicht aus (HEINZE u. KLUG, 1975; MICHEL et al., 1986; VIDAMENT et al., 1992). Durch stündliche, pulsatile Verabreichung von 20 µg GnRH ab Tag 16 des Zyklus wird ein präovulatorischer LH-Schub initiiert. Dieser beschleunigt die Ovulation, sodass diese ca. 3 Tage später erfolgt. Obwohl nach GnRH-Applikation die Serum-LH-Basalwerte innerhalb von 24 Stunden steigen, sind nach einzelnen GnRH-Gaben keine messbaren Steigerungen von LH zu verzeichnen. Während die Konzentration des LH-Peaks unverändert ist, erfolgt der Peak jedoch früher als ohne Behandlung mit GnRH, d.h. bereits etwa 5 Tage nach Beginn der Behandlung. Die nachfolgende Lutealphase sowie das Interovulationsintervall sind durch die Behandlung nicht beeinträchtigt (JOHNSON, 1986).

Als GnRH-Analogen kann Buserelin verwendet werden. Seine Effektivität ist jedoch umstritten. Laut einer Studie von BARRIER-BATTUT et al. (2001) beschleunigt Buserelin das Follikelwachstum, steigert die LH-Sekretion und löst bei zweimal täglicher Verabreichung (alle 12 Stunden) die Ovulation innerhalb von 24 – 48 Stunden nach Beginn der Behandlung aus. Damit gleicht die Effektivität von Buserelin der von hCG. Die Fruchtbarkeit wird durch die Behandlung nicht beeinträchtigt (BARRIER-BATTUT et al., 2001).

Im Gegensatz dazu behaupten CAMILLO et al. (2004), die Effektivität von Buserelin läge deutlich unter der von hCG und die Ovulation erfolge bei zweimal täglicher Verabreichung erst nach  $74,9 \pm 41,9$  Stunden (CAMILLO et al., 2004). In jedem Fall hat Buserelin gegenüber hCG den Vorteil der fehlenden immunogenen Wirkung.

Als weiteres GnRH-Analogen kann Deslorelin in Form eines kurzwirksamen, subkutanen Implantates (Ovuplant®) eingesetzt werden, sobald ein Rossefollikel mit einem Durchmesser von mehr als 30 mm vorhanden ist. Das Implantat wirkt über eine andauernde hypophysäre LH- und FSH-Freisetzung. Die Ovulation erfolgt in 80 % der Fälle innerhalb der nächsten 48 Stunden. Auf diese Weise kann die Zahl der Belegungen bzw. der künstlichen Besamungen minimiert und die Steuerung des Hengsteinsatzes optimiert werden. Bis auf eine geringgradige, implantatbedingte lokale Irritation sind keine weiteren Nebenwirkungen bekannt. Eine Toleranzentwicklung konnte nicht festgestellt werden. Selbst die mehrmalige Gabe von Deslorelin hat keinerlei negativen Einfluss auf Ansprechbarkeit und Fertilität (JOECHLE, 1995). Nach Verabreichung einer zu hohen Dosis kann es jedoch zur Reduzierung der Hypophysenaktivität kommen. Die daraus resultierende reduzierte FSH-Sekretion führt zu einem verzögerten Follikelwachstum, einem später einsetzenden Östrus sowie einer verlängerten interovulatorischen Zeitspanne (JOECHLE, 1995; MCCUE et al., 2000a; FARQUHAR et al., 2001). Die zusätzliche Gabe von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  zur Einleitung der Luteolyse verstärkt diesen Effekt, sodass der Verdacht besteht, dass die hypophysären Rezeptoren ihre Ansprechbarkeit auf GnRH nach längerer bzw. hoch dosierter Gabe von Deslorelin verlieren. Dies würde eine verminderte Sekretion von Gonadotropinen (FSH) erklären. Das Deslorelinimplantat (Ovuplant®) verkürzt zwar die Zeit bis zur Ovulation um 2 Tage, verlängert aber das Interovulationsintervall um 4,4 Tage. Die zusätzliche Verabreichung von GnRH nach Einsetzen des Implantates zeigt, dass aufgrund einer Unempfindlichkeit der Hypophyse keine LH- und FSH-Sekretion erfolgt. Folglich werden Follikelwachstum- und Reifung verzögert und das Interovulationsintervall verlängert (JOHNSON et al., 2002).

### 2.2.3. Induktion der Superovulation

Bei der Stute ovuliert in der Regel nur ein einziger Follikel innerhalb eines Zyklus. Die Ovulation des dominanten Rossefollikels findet etwa 24 Stunden vor dem Ende der Rosse statt. Doppelovulationen kommen vor (4 – 44 %), sind jedoch von Rasse, Jahreszeit, Reproduktionszustand und genetischer Prädisposition abhängig (HUGHES et al., 1972; STABENFELDT et al., 1972; GINTHER et al., 1982; GINTHER, 1992). Durch medikamentöse Induktion der Superovulation könnte eine gesteigerte Embryogewinnungs- und Trächtigkeitsrate erreicht und dadurch die Effizienz des Embryotransfers gesteigert sowie die Kosten des Verfahrens gesenkt werden (MCCUE, 1996; LOSINNO et al., 2000).

**Equines Hypophysenextrakt** Eine der bis heute erfolgreichsten Substanzen ist das equine pituitary extract (EPE). EPE stimuliert auch solche Follikel zur Reifung und Ovulation, die sich sonst nicht zum Ovulationsfollikel entwickelt, sondern sich im Laufe des Zyklus zurückgebildet hätten. 1974 und 1977 wurden erste erfolgreiche Versuche der Superovulationsinduktion mittels EPE veröffentlicht (DOUGLAS et al., 1974; LAPIN u. GINTHER, 1977), die 1986 bestätigt werden konnten (SQUIRES et al., 1986). Es wurde festgestellt, dass die zweimal täglich hochdosierte Gabe von EPE die Superovulationsrate sowie die Embryonenausbeute im Gegensatz zur einmal täglichen Verabreichung deutlich steigert. So konnten durch zweimal tägliche Verabreichung von 25 mg EPE 7,1 Ovulationen und 3,5 Embryonen pro Zyklus erreicht werden. Mit steigender Anzahl an Ovulationen sank jedoch die Anzahl an Embryonen pro Spülvorgang. Als Ursache werden unbefruchtete Eizellen oder früher Embryontod in Folge schlechter Eizellqualität vermutet (ALVARENGA et al., 2001). Eine weitere Studie verzeichnete 3,2 Ovulationen und 1,96 Embryonen pro Zyklus gegenüber 1,2 Ovulationen und 0,65 Embryonen ohne vorherige Behandlung. Dabei ist die Reaktion abhängig von der Follikelpopulation zu Beginn der Behandlung. Idealerweise sollte die Behandlung mit EPE zu Beginn einer Follikelwelle, also noch vor Auftreten eines dominanten Follikels, erfolgen (SQUIRES et al., 2004).

**Follikelstimulierendes Hormon** Auch das follikelstimulierende Hormon (FSH) erhöht die Doppelovulationsrate von 20 % auf 80 % (SIROIS u. KIMMICH, 1992; FORTUNE u. KIMMICH, 1993). Während die Effektivität zunächst deutlich unter der von EPE lag (SQUIRES et al., 1986), konnte durch zweimal tägliche Verabreichung von gereinigtem equinen FSH eine bessere Follikel- und Eizellreifung und eine höhere Embryonenrate pro Stute bzw. eine höhere Embryonenrate guter Qualität pro Ovulation erreicht werden (MACHADO et al., 2004). Mittlerweile ist ein equines FSH-Präparat im Handel erhältlich (eFSH, Bioniche Animal Health Inc., Athens, GA, USA) (MCCUE et al., 2007).

Nach einem langen Entwicklungsprozess existiert heute ein sehr effektives Protokoll zur Superovulationsinduktion bei Stuten sowie zur Gewinnung einer großen Embryonenzahl mittels equinem FSH. Nach Feststellung der Ovulation erfolgt die ultrasonographische Zykluskontrolle solange, bis ein oder mehrere Follikel mit einer Größe von 22 – 25 mm Durchmesser vorhanden sind. Dann beginnt die eFSH-Therapie mit 12,5 mg i.m. zweimal täglich für die Dauer von 3 – 5 Tagen. Am zweiten Behandlungstag wird zusätzlich Cloprostenol (250 µm, i.m.) injiziert. Bei einer Follikelgröße von 32 – 35 mm wird die eFSH-Therapie beendet und es folgt eine Ruhepause von ca. 36 Stunden bzw. bis ein Follikel einen Durchmesser von 35 mm erreicht hat. Anschließend erfolgt die hCG-Applikation (2500 IU, i.v.) und, je nach individuellem Standardprogramm, die Besamung und anschließende Spülung (WELCH et al., 2006; MCCUE et al., 2007). Bei zweimal täglicher Gabe von 12,5 mg eFSH ist die Zahl präovulatorischer Follikel sowie die Anzahl an Ovulationen deutlich höher als nach Gabe von 6,25 mg.

Die Zahl der Embryonen pro Spülung weist jedoch keinen Unterschied auf, sodass die Prozentzahl an Embryonen pro Ovulation bei Stuten, die eine kleinere Dosis erhalten haben, höher ist. Zur Ovulationsinduktion nach eFSH-Therapie mit zweimal täglicher Gabe von 12,5 mg eFSH ist hCG besser geeignet als Deslorelin. Bei zweimal täglicher Gabe von 6,25 mg eFSH ist die Effektivität von hCG und Deslorelin jedoch gleich. Der Nachteil von hCG ist allerdings seine immunogene Wirkung bei mehrmaliger Gabe innerhalb einer Saison. Die zusätzliche Vorbehandlung mit Progesteron/Östradiol vor einer eFSH-Therapie ist nicht effektiv (LOGAN et al., 2007).

**Immunisierung gegen Inhibin** Eine weitere Möglichkeit der Superovulationsauslösung ist die aktive und passive Immunisierung gegen das vom dominanten Follikel produzierten Glykoprotein Inhibin, welches die FSH-Ausschüttung unterdrückt. Die Immunisierung neutralisiert die endogene Inhibin-Wirkung, sodass die FSH-Ausschüttung nicht mehr unterdrückt und das Follikelwachstum stimuliert wird. Nach Versuchen der Immunisierung von Schafen konnten 2 – 3 Ovulationen festgestellt werden (FORAGE et al., 1987; MIZUMACHI et al., 1990; WRATHALL et al., 1990). Nachteil dieser Methode ist, dass die Wirkungsdauer der aktiven Immunisierung schlecht steuerbar ist und die passive Immunisierung zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führt.

**Humanes menopausales Gonadotropin und Gonadotropin Releasing Hormon** Versuche mit dem humanen menopausalen Gonadotrophin (HMG) zeigten keinen Effekt. Zwar führte die Verabreichung von HMG zu durchschnittlich 2,6 Ovulationen im Vergleich zu 1,7 in der Kontrollgruppe, die Embryonenausbeute war jedoch bei beiden gleich (50 %). Letztendlich ist also die prozentuale Embryonenausbeute bezogen auf die Ovulationsrate bei der Kontrolle höher (KOENE et al., 1991).

Auch das Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) ist, vor allem während der anovulatorischen Jahreszeit, in der Lage, Ovulationen bzw. Mehrfachovulationen auszulösen (GINTHER u. BERGFELT, 1990).

Der zunächst bestehende Verdacht, die Lebensfähigkeit von Embryonen aus Superovulationen sei gegenüber Einzelovulationen niedriger, bestätigte sich nicht (WOODS u. GINTHER, 1984; SQUIRES et al., 1987). Obwohl die Induktion von Superovulationen zu einer veränderten Oozytenreifung und in der Folge auch zu reduzierter Befruchtung und Embryonenzahl führen kann, weicht die Ultrastruktur und Viabilität der Embryonen, die aus Superovulationen entstehen, nicht von denen aus Einzelovulationen ab (LANDIM-ALVARENGA et al., 2004).

## 2.3. Embryonalentwicklung

### 2.3.1. Entwicklung im Eileiter

**Befruchtung** Nach der Ovulation des dominanten Rossefollikels etwa 24 Stunden vor dem Ende der Rosse hat die nun freigesetzte, runde, ca. 100 – 160  $\mu\text{m}$  große Eizelle in der Regel das Entwicklungsstadium der sekundären Oozyte erreicht. Die erste meiotische Teilung ist bereits erfolgt und ein Polkörper sichtbar. Bis zur Befruchtung bleibt die Oozyte im Entwicklungsstadium der Metaphase II. Vom Cumulus oophorus umgeben wandert die Eizelle mit ihrem haploiden Kern (weiblicher Pronucleus) zum Ort der Befruchtung – der Eileiterampulle. Bei diesem Transport ist die Follikelflüssigkeit zwar hilfreich, aber nicht notwendig. Der Cumulus oophorus erleichtert aufgrund seiner klebrigen, viskösen Oberfläche das Anheften der Eizelle an die Mikrovilli der Fimbrien und damit den Transport in den Eileiter. Es ist ebenso möglich, dass der Cumulus-Komplex eine chemotaktische Attraktion für Spermien ist und die für die Kapazitation (Fähigkeit der Spermien, die Zona pellucida zu durchdringen und die Befruchtung hervorzurufen) notwendigen Substanzen liefert. Ist die Eizelle an der Ampulla angekommen, erfolgt die Befruchtung durch das haploide Spermium (männlicher Pronucleus). Der Gelmantel geht im Zuge der Befruchtung verloren und ein zweites Polkörper entsteht. Die beiden Pronuclei fusionieren und die erste Zellteilung der nun diploiden, befruchteten Eizelle (Zygote) wird ausgelöst. Um zu verhindern, dass weitere Spermien in die Eizelle eindringen, erfolgt der Polyspermieblock: durch Anheften des Spermiums kommt es am Oolemma zu einer Depolarisationswelle, die zu Veränderungen an der Membranoberfläche führt. Aufgrund der Depolarisationswelle entlassen die kleinen Vesikel auf der Innenseite der Eizellmembran ihren Inhalt in den Perivitellinspalt. Dadurch wird die Zona pellucida verhärtet und schützt auf diese Weise den Embryo und verhindert das Eindringen weiterer Spermien ([www.embryology.ch](http://www.embryology.ch)).

**Zellteilungen** Die erste Zellteilung erfolgt etwa 24 Stunden nach der Ovulation (MCKINNON u. SQUIRES, 1988a; BETTERIDGE, 1989; GINTHER, 1992; PALMER et al., 1997). Jede weitere Zellteilung benötigt ungefähr 12 Stunden, sodass  $48 \pm 12$  Stunden nach der Ovulation der Embryo das Vier- bis Achtzellstadium erreicht hat (BEZARD et al., 1989). Dieses erkennt man an der meist ellipsoidalen (ovalen) Form sowie der breiten Zona pellucida, die durch einen dicken, gelartigen Überzug (aus dem Eileiter stammend) eine rauhe Erscheinung aufweist. Zwischen der Zona pellucida und dem Oolemma der Eizelle befindet sich der Perivitellinspalt. Im Perivitellinspalt sind Ablagerungen vorhanden, die auch als „extrazelluläre Matrix“ bezeichnet werden (BETTERIDGE et al., 1982; MCKINNON u. SQUIRES, 1986, 1988a; GINTHER, 1992). In diesem Stadium beginnen die aus den Zellteilungen entstandenen Zellen, die als Blastomeren bezeichnet werden, sich zu verdichten. Dabei scheint es, als würden diese Zellen der polarisierten Zygote aus „dunklen“ und „hellen“ Blastomeren bestehen (GINTHER, 1992; BETTERIDGE, 2007). Zu diesem Zeitpunkt hat der Embryo eine Größe von etwa 120 – 180  $\mu\text{m}$  erreicht.

Die weitere Entwicklung zum 16- bis 32-Zellstadium ist weniger durch Wachstum im Durchmesser, als vielmehr durch eine weitere Verdichtung der Zellen gekennzeichnet. Mit dem 32-Zellstadium erreicht der Embryo das Stadium der Morula, dem letzten im Eileiter auffindbaren Entwicklungsstadium (MCKINNON u. SQUIRES, 1988a).

**Embryonale Produkte** Etwa ab dem dritten Tag der Trächtigkeit produziert der Embryo das Hormon PGE<sub>2</sub>, welches die Funktion glatter Muskelzellen einiger Körpersysteme relaxatorisch beeinflussen kann. Die Produktion sowie die Ansprechbarkeit des Eileiters auf PGE<sub>2</sub> sind auf den Zeitraum des selektiven Eileitertransportes begrenzt. Daher wird vermutet, dass PGE<sub>2</sub> den normalerweise geschlossenen, ringförmigen, glatten Muskel (Sphinkter) zwischen Ampulla und Isthmus relaxiert. Dies ermöglicht dem Embryo den Durchtritt in den Uterus. An Tag 6 erreicht die Produktion von PGE<sub>2</sub> einen deutlichen Anstieg, der mit dem Abstieg des Embryos in den Uterus am gleichen Tag in Zusammenhang gebracht werden kann (OGURI u. TSUTSUMI, 1972; BETTERIDGE, 1989; WEBER et al., 1991a,b; WEBER u. WOODS, 1993).

**Ereignisse im Eileiter** Bereits im Eileiter beginnt die wichtige embryomaternale Kommunikation, die zur Erkennung und Aufrechterhaltung der Trächtigkeit führt. Histochemische Charakteristika des Eileiterepithels variieren je nach Reproduktionsstatus und Region des Eileiters, während die reichhaltigen sekretorischen Produkte davon unabhängig sind (BALL et al., 1997; McDOWELL et al., 1993). Obwohl das Eileiterepithel einen positiven Einfluss auf die embryonale Entwicklung hat, ist es für eine normale Entwicklung nicht unentbehrlich (FEHILLY u. WILLADSEN, 1986; BALL u. MILLER, 1992). Auch die Aktivierung des embryonalen Genoms erfolgt bereits im Eileiter. Dieser Prozess verläuft stufenweise im Vier- bis Achtzellstadium (BALL et al., 1993b; BRINSKO et al., 1995).

Die Entwicklung im Eileiter ist unter Umständen bei älteren Stuten beeinträchtigt. So ist nicht nur die Anzahl der Eizellen pro Ovation bei älteren Stuten deutlich geringer als bei jüngeren Stuten, sondern auch die Prozentzahl sich teilender Eizellen. Embryonen älterer Stuten haben meist weniger Zellen, vermehrt morphologische Abnormalitäten und liegen in ihrem Entwicklungsstadium ca. einen Tag hinter dem von Embryonen jüngerer Stuten. Die Trächtigkeitsrate ist vermindert und die Vesikel sind oft kleiner. Dies hat einen negativen Einfluss auf die Viabilität zur Folge, sodass die Wahrscheinlichkeit des Embryoverlustes steigt. Der Grund für die altersabhängige Fruchtbarkeitsminderung ist die fehlerhafte Interaktion zwischen Eizelle und Eileiter bzw. eine gestörte Entwicklung innerhalb des Eileiters. Die Embryonen sind demzufolge bereits negativ beeinträchtigt, wenn sie den Uterus erreichen (CARNEVALE et al., 1993).

**Abstieg in den Uterus** Unbefruchtete Eizellen erreichen den Uterus in der Regel nicht, sondern werden im Eileiter zurückgehalten (selektiver Eileitertransport), wo sie über Monate verweilen bis sie langsam degenerieren (BETTERIDGE u. MITCHELL, 1974).

In seltenen Fällen kommt es jedoch vor, dass, wie in Abb. 2.1 zu sehen ist, im Rahmen eines Embryotransferprogrammes im Spülmedium unbefruchtete Eizellen gefunden werden. Diese stammen meist aus vorhergehenden Zyklen und sind zusammen mit dem Embryo in den Uterus gelangt (STEFFENHAGEN et al., 1972).

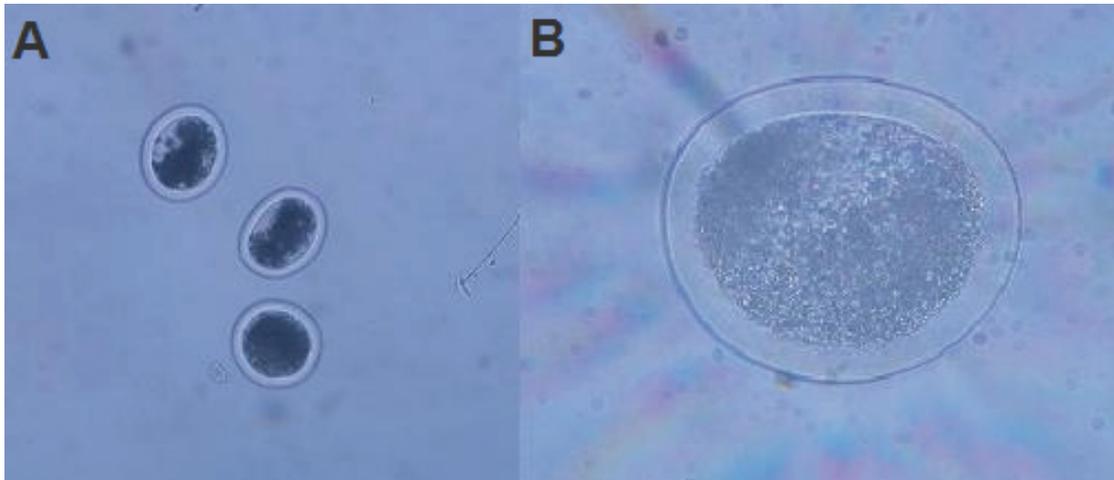


Abb. 2.1.: Diese unbefruchteten Eizellen wurden gemeinsam mit einem Embryo im Zuge einer Uterusspülung aufgefunden.

Der Abstieg in den Uterus ist abhängig vom Entwicklungsstadium der befruchteten Eizelle. Diese muss mindestens das Zwei- bis Vierzellstadium erreicht haben, bevor sie in den Uterus absteigen kann (BETTERIDGE et al., 1979). Die Mehrheit der Embryonen entwickelt sich im Eileiter allerdings bis zum Stadium der Morula (dicht gepackte Masse  $\geq 32$  Blastomeren) und steigt dann in den Uterus ab (Abb. 2.2) (GINTHER, 1992). Es ist schwierig, das Morulastadium von dem der frühen Blastozyste zu unterscheiden, da die Inner Cell Mass (ICM – späterer Embryo) im Gegensatz zu derjenigen des Wiederkäuers oder Schweines relativ verteilt ist (BETTERIDGE, 2007).

Die Eileiterpassage bzw. der Abstieg in den Uterus kann durch exogene Verabreichung von  $\text{PGE}_2$  um durchschnittlich 2 Tage beschleunigt bzw. verkürzt werden. Nachteil dieser Behandlung ist der nicht-selektive Eileitertransport, sodass neben Embryonen auch unbefruchtete Eizellen und Detritus in die Spülflüssigkeit gelangen (WEBER et al., 1991a).

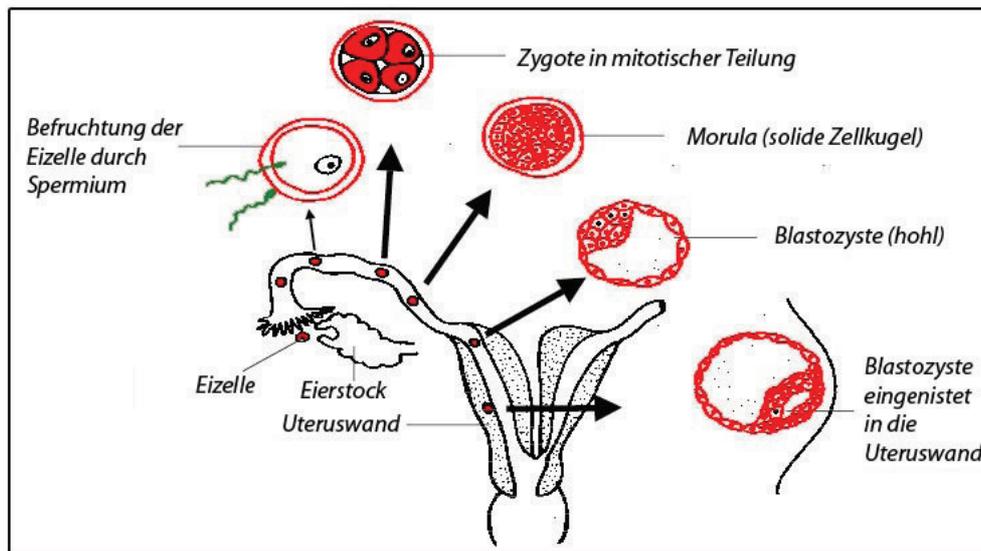


Abb. 2.2.: Entwicklung des Embryos von der Eizelle bis zur Blastozyste (modifiziert nach [www.wikimedia.org](http://www.wikimedia.org)).

## 2.3.2. Entwicklung im Uterus

### 2.3.2.1. Vor der Fixierung

**Zellteilungen und Verdichtung der Blastomeren** Zwischen 130 und 142 Stunden bzw. zwischen 144 und 156 Stunden nach der Ovulation erreicht der Embryo den Uterus. Der equine Embryo verweilt im Gegensatz zu Embryonen anderer Tierarten länger im Eileiter und erreicht ein späteres Entwicklungsstadium, bevor er in den Uterus gelangt. Seine Größe verändert sich jedoch nicht (FREEMAN et al., 1991b; BATTUT et al., 1998). Zu diesem Zeitpunkt (156 – 168 Stunden) dauert ein Zellteilungszyklus nur noch etwa 6 Stunden (COLCHEN et al., 2000). Das Entwicklungsstadium des Embryos entspricht zu diesem Zeitpunkt dem der Morula bzw. dem frühen Blastozystenstadium und er ist noch von der Zona pellucida umgeben (BETTERIDGE et al., 1982; MCKINNON u. SQUIRES, 1988a). Noch bevor es zur Bildung der Blastozyste kommt, erfolgt ein wichtiges morphogenetisches Ereignis – die Verdichtung der Blastomeren. Diese entsteht aufgrund des vermehrten Kontaktes zwischen den einzelnen Blastomeren. Dadurch werden die Konturen der einzelnen Blastomeren gegebenenfalls verdeckt, bis der Embryo als eine einheitliche Zellmasse erscheint. Diese wird als Morula bezeichnet. Mit der Verdichtung beginnt die Zelldifferenzierung. Gleichzeitig werden neue Genprodukte exprimiert, die die Zellpolarität der äußeren Blastomeren hervorrufen. Die Verdichtung der Blastomeren ist entscheidend für die präimplantatorische Entwicklung des Embryos, da sie sowohl am Beginn als auch am Fortschritt der Blastozoenbildung beteiligt ist (WATSON, 1992).

**Entstehung des Blastozoels und der Blastozyste** Während der mobilen Phase des Embryos bzw. bis zu seiner Einnistung werden grundlegende Entwicklungsprozesse durchlaufen. Diese Prozesse beinhalten die Entstehung des Blastozystenstadiums durch Bildung einer flüssigkeitsgefüllten Höhle (Blastozoel) (MCKINNON u. SQUIRES, 1988a) und die Expression neuer Genprodukte. Dazu gehören neben den Tight-junctions zwischen den Trophoblastzellen, der Natrium-Kalium-ATPase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase) und dem Adhäsionsmolekül Uvomorulin auch die Gap-junctions zwischen den Zellen der ICM sowie die Wachstumsfaktoren  $\text{TGF}\alpha$  und EGF. Neben ihrer Rolle bei der Blastozystenformation tragen diese Genprodukte zum Erreichen der Zellpolarität der Trophoblasten bei (WATSON, 1992).

Zur Bildung des Blastozoels muss der Embryo in der Lage sein, Stoffe aufzunehmen. Hierfür ist die Etablierung eines trans-trophektodermalen Ionengradienten notwendig. Da die Zellen in der Regel eine geringe intrazelluläre  $\text{Na}^+$ - bzw. eine hohe  $\text{K}^+$ -Konzentration besitzen, ist ein Mechanismus gefragt, der diesen Gradienten aufrecht erhält. Diese Aufgabe wird von der sogenannten  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase übernommen. Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ist ein Transmembranprotein mit einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, welches unter Hydrolyse von ATP den Transport von  $\text{Na}^+$  aus der Zelle hinaus und von  $\text{K}^+$  in die Zelle hinein katalysiert. Die  $\alpha$ -Untereinheit übernimmt vor allem funktionelle Aufgaben, während die  $\beta$ -Untereinheit für die Verankerung in der Membran zuständig ist. Mithilfe von RT-PCR (Realtime-Polymerase Chain Reaction) und immunhistochemischen Untersuchungen wurden Transkripte für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sowie Genprodukte für Aquaporine ( $\text{AQP}_3$  und  $\text{AQP}_5$ ) in allen Embryonen gefunden. Die  $\alpha$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ist basolateral im Trophektoderm und im Endoderm lokalisiert (BUDIK et al., 2005). Mithilfe der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase erfolgt ein aktiver Transport von  $\text{Na}^+$  aus der Zelle hinaus ins Blastozoel und im Gegenzug von  $\text{K}^+$  in die Zelle hinein. Dieser Transport erfolgt gegen den osmotischen Gradienten. Die dadurch resultierende erhöhte  $\text{Na}^+$ -Konzentration im Blastozoel führt zum Wassereinstrom und damit zum Blastozystenwachstum. Die Wachstumsfaktoren  $\text{TGF}\alpha$  und EGF, welche ebenfalls als Genprodukte während der Blastozystenbildung exprimiert werden, steigern die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaseaktivität und damit auch das Wachstum des Blastozoels bzw. der Blastozyste.

Ein weiteres Genprodukt ist Uvomorulin. Dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zelladhäsionsmolekül ist für die Erhaltung der Tight-junction-Dichte sowie für die polarisierte Verteilung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (basolateral) verantwortlich. Die Tight-junctions bilden am apikalen Pol der Zelle eine semipermeable Dichtung zwischen den Trophoblastzellen, regulieren den parazellulären Transport zwischen den Zellen hindurch (z.B. Chlorid-Transport) und separieren die epitheliale Plasmamembran in einen dichten apikalen und einen basolateralen Bereich. Außerdem tragen sie zur Erhaltung der polarisierten Verteilung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase bei und regulieren durch ihre Dichte den Abfluss der Blastozoelflüssigkeit. Da erst nach vollständiger Ausbildung der Tight-junctions die Expansion des Embryos möglich ist, sind sie für die Blastozoelbildung unerlässlich.

Während für die Kavitation der Transport von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  aus dem Medium in das Blastozoeel notwendig ist, ist der Transport von  $\text{K}^+$  unbedeutend.  $\text{Na}^+$ -Moleküle durchqueren die apikale Membran durch Natriumkanäle, Natrium-Wasserstoffaustauscher oder Natrium-Glucose-Cotransporter. Auf diesem Wege gelangt  $\text{Na}^+$  in die Zelle, von wo aus es mit Hilfe der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase auf aktivem Wege aus der Zelle hinaus durch die basolaterale Membran hindurch ins Blastozoeel gelangt (WATSON, 1992).

Weitere Transmembranproteine sind die Aquaporine. Diese bilden in der Zellmembran Kanäle, um den Durchtritt von Wasser und anderen Molekülen zu erleichtern (Membrantransport). Das Aquaporin  $\text{AQP}_5$ , das für den Wassertransport verantwortlich ist, befindet sich zunächst diffus verteilt im Cytoplasma (Tag 8), ab Tag 12 der Trächtigkeit ist es basolateral in den Trophoblastzellen lokalisiert. Die Expression von  $\text{AQP}_5$  erfolgt erst ab Tag 8 und damit zeitgleich mit der Blastozystenexpansion. Da die Geschwindigkeit der Blastozystenexpansion von der Veränderung des Wasserflusses durch die apikale Membran reguliert wird, führt das an der apikalen Seite der Trophoblastzelle vorhandene  $\text{AQP}_5$  je nach Vorhandensein zu Veränderungen der Wasserpermeabilität im Trophektoderm (BUDIK et al., 2005).

Auch mit der Bildung des Endoderms aus der ICM erfolgen funktionelle Veränderungen, die ein schnelles Wachstum der Blastozyste zur Folge haben. Das Endoderm entsteht beim equinen Embryo an Tag 7 oder 8, also 8 – 9 Tage vor der Fixierung des Embryos in der Gebärmutter (Tag 16). Dies steht im Gegensatz zur Endodermbildung bei Maus oder Kaninchen, bei denen diese zum Zeitpunkt der Einnistung, also um einiges später, erfolgt. Zunächst bilden sich einzelne Kolonien, die sporadisch an der inneren Seite des Trophektooderms verteilt sind. Später wachsen und fusionieren diese Kolonien und bilden schließlich das durchgängige Endoderm, welches das Blastozoeel an Tag 11 vollständig umgibt. Mit Entstehung des Endoderms wird der Embryo von einer zweischichtigen, bilaminaren Membran umgeben - dem Trophektoderm und dem Endoderm. Endodermale Zellen haben eine gefurchte Oberfläche, die an die Mikroplicae der Sammeltubuli in den Nieren erinnert, mit welchen der Ionentransport assoziiert ist. Obwohl das Endoderm durch seine Projektionen in das Trophektoderm eine wichtige Rolle bei der Erhaltung des osmotischen Gradienten zu spielen scheint, ist es nicht unbedingt notwendig für die Expansion der Blastozyste. Mit Vollendung des Endoderms kommt es zu einigen funktionellen Veränderungen im Konzeptus, die ein schnelles Wachstum und einen auffallenden Auftrieb zur Folge haben (ENDERS et al., 1993). Da die Zellen des Endoderms und die des Trophektooderms in vitro ein unterschiedliches steroidgenetisches Profil aufweisen, ist ihr Zusammenspiel möglicherweise für die Trächtigkeitserhaltung notwendig (MARSAN et al., 1987).

**Zelldifferenzierung** Durch die Zelldifferenzierung entstehen die ICM und der Trophoblast. Die innen liegende ICM bildet später den Embryo sowie einige mit ihm assoziierte Membranen. Sie wird von einer Trophoblastzellschicht, der „Raubers Layer“ überzogen, die zwischen Tag 10 und 14 wieder verschwindet. Die Zellen der ICM sind durch ein Netzwerk langer Mikrovilli (Gap-junctions) miteinander verknüpft, durch welche sie sich wiedervereinigen können, sofern sie geteilt oder mit Zellen anderer Embryonen vermischt werden (MCKINNON u. SQUIRES, 1988a). Die außen gelegene, das Blastozoele umgebende einschichtige Ektodermzellschicht, der Trophoblast, bildet später große Teile der fetalen Plazenta und ist für die Nährstoffabsorption sowie Veränderungen am Uterus zum Implantationszeitpunkt verantwortlich (VAN NIEKERK u. ALLEN, 1975; MCKINNON u. SQUIRES, 1988a; GINTHER, 1992). Die Trophoblastzellen bilden interzelluläre Tight-junctions aus, die die Permeabilität für Flüssigkeiten reduzieren (MCKINNON u. SQUIRES, 1988a).

Wie in Abb. 2.3 zu sehen ist, sind die Trophoblasten polarisiert und besitzen an ihrem apikalen bzw. basolateralen Pol unterschiedliche Funktionsmechanismen. Während am apikalen Pol der Zellen zwischen den Zellen die Tight-junctions zu finden sind, können in der Zellmembran Natrium-Kanäle, Natrium-Wasserstoff-Austauscher bzw. Natrium-Glucose-Cotransporter gefunden werden. Am basolateralen Pol der Trophoblastzellen hingegen sammeln sich im Zytoplasma Mitochondrien und Lipide, während in der Zellmembran  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen vorhanden sind (WATSON, 1992). Die Polarität wird vermutlich bereits im Eileiter von Follikelzellen beeinflusst, die transzonal mit der Eizelle kommunizieren. Die Unterbrechung dieser Interaktion, z.B. im Zuge der In-vitro-Reifung, kann einen negativen Einfluss auf die Eizellqualität und die embryonale Entwicklung haben (ALBERTINI u. BARRETT, 2004; PLANCH et al., 2005).

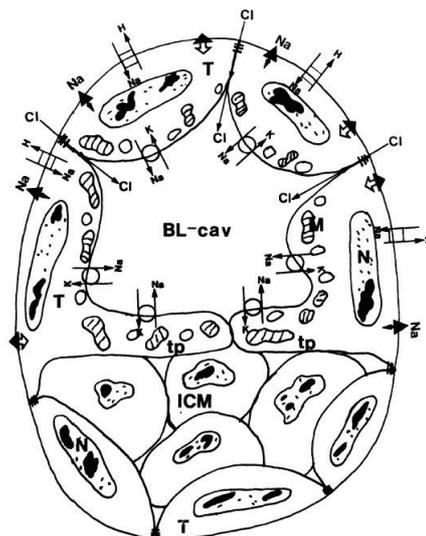


Abb. 2.3.: Darstellung eines polarisierten Trophoblasten. H = Wasserstoff, Na = Natrium, Cl = Chlorid, ICM = Inner Cell Mass, T = Trophoblastzellen, K = Kalium, tp = Trophoblastzellausläufer, M = Mitochondrien, N = Nucleus (WATSON, 1992)

**Schlupf aus der Zona pellucida** Nach vollendeter Entwicklung des Blastozoels folgt ein enormes Größenwachstum des Konzeptus (SQUIRES et al., 1985b). Der zwischen den Trophoblastzellen und der Zona pellucida vorhandene Perivitellinspalt verschwindet, sobald die sich teilenden Zellen des Embryos (Blastomeren) mit der Zona pellucida in Kontakt kommen. Während der Embryo kontinuierlich weiterwächst, wird die Zona pellucida mit zunehmendem Alter des Embryos immer dünner. Ab etwa Tag 6 nach der Ovulation bildet sich an der Innenseite der Zona pellucida zwischen dieser und dem Trophoblasten eine dünne, azelluläre Schicht aus Glykoproteinen, die als Kapsel bezeichnet wird. Innerhalb der nächsten 24 Stunden verliert die Zona pellucida weiter an Dichte, sodass sie von ca. 17  $\mu\text{m}$  auf 3  $\mu\text{m}$  reduziert wird. Durch das Expandieren des Embryos und der Kapsel zerreißt sie schließlich und der Embryo kann schlüpfen (FLOOD et al., 1982; BETTERIDGE et al., 1982; BETTERIDGE, 1989; STOUT et al., 2005). Es wird vermutet, dass die Auflösung der Zona pellucida durch proteolytische Enzyme, die vom Endometrium produziert werden, induziert wird (O’SULLIVAN et al., 2002). Solch ein proteolytisches, Trypsin-ähnliches Enzym („Strypsin“) existiert bei der Maus und wird von den wandständigen Trophektodermzellen kurz vor dem Schlupf aus der Zona pellucida sezerniert. Wenn ein solches Enzym beim Pferd existiert und für den Abbau der Zona pellucida verantwortlich ist, so könnte diese Enzymaktivität und der damit verbundene Schlupf aus der Zona pellucida durch abweichende Bedingungen in vitro (Medium / Serum) negativ beeinträchtigt werden. Auch die quantitativen Unterschiede der Kapsel der frühen Blastozyste spielen dabei eine Rolle, da das Enzym zunächst die Kapsel passieren müsste, um die Zona pellucida erreichen zu können (HOCHI et al., 1993, 1994a).

In vitro erfolgt der Schlupf nicht expandierter Blastozysten aus der Zona pellucida nicht nur später (Tag 10,5) als in vivo, sondern auch die Art des Schlupfes unterscheidet sich. Während sich die Embryonen in einer In-vitro-Kultur oft über einen längeren Zeitraum förmlich aus der Zona pellucida hinausdrücken („Squeezing“), wird diese in vivo relativ abrupt abgeworfen („sudden escape“). Das Squeezing dauert länger und geht meist mit dem gleichzeitigen Verlust der Kapsel einher, die im folgenden innerhalb der Zona pellucida zu sehen ist.

Die Quelle der Serumzusätze im Kulturmedium hat Einfluss auf die Art des Schlupfes und die In-vitro-Entwicklung. Fetale Seren unterstützen im Allgemeinen die In-vitro-Entwicklung besser als Stutenserum. Allerdings erhöht der Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS) bzw. Serum einer trächtigen Stute von Tag 8 die Zahl an Embryonen, die sich durch Squeezing bzw. Rissbildung (Tearing open) von der Zona pellucida befreien. Im Gegenzug dazu fördert der Zusatz von fetalem equinen Serum (FES) bzw. von Stutenserum des Ovulationstages eher den plötzlichen Abwurf der Zona pellucida (HOCHI et al., 1993, 1994a). Punktiert man die Zona pellucida in vitro, so folgt ein explosionsartiger Abwurf der Zona pellucida und die Kapsel erscheint (BETTERIDGE, 2007).

In vivo erfolgt der Schlupf der Zona pellucida so schnell, dass es schwierig ist, diesen Moment festzuhalten (BETTERIDGE et al., 1982; WILSON et al., 1986; MCKINNON et al., 1989).

**Wachstum des Embryos** Nach dem Schlupf beginnt ein schnelles Wachstum der Blastozyste. Dies betrifft nicht nur die Größe, sondern auch das Trockengewicht der Kapsel (BETTERIDGE et al., 1982; ORIOL et al., 1993a). Während 7 Tage alte Embryonen nicht immer das Entwicklungsstadium einer expandierten Blastozyste erreicht haben, haben 8 oder 9 Tage alte Embryonen dieses Stadium in der Regel immer erreicht. Mit 9 Tagen hat der Embryo eine Größe von etwa 2 mm im Durchmesser (VAN NIEKERK u. ALLEN, 1975; MCKINNON u. SQUIRES, 1988a). Trotz dieser altersabhängigen Größentendenz ist es selbst nach stündlicher Ovulationskontrolle und genau bekanntem Ovulationszeitpunkt nicht möglich, eine homogene, gleichaltrige Embryonengruppe zu gewinnen. Ursache dafür ist das individuell unterschiedliche Intervall zwischen Ovulation und Befruchtung sowie die individuell unterschiedliche Entwicklungsgeschwindigkeit der Embryonen. Um relativ sicher von einem bereits erfolgten Abstieg des Embryos in den Uterus ausgehen zu können, ist es bei täglich ein- bis zweimaliger Ovulationskontrolle sinnvoll, nach Entdecken des Corpus luteum mindestens 156 Stunden (6,5 Tage) bis zum Spülvorgang zu warten (COLCHEN et al., 2000; BATTUT et al., 2001).

**Mobile Phase** Nach seinem Abstieg in den Uterus (Tag 6,5) beginnt der sphärische Embryo bis zu seiner Immobilisierung und Fixierung im Uterus von einem Horn zum anderen zu wandern, um die maternale Trächtigkeitserkennung zu gewährleisten. Würde man die Uteruspassage chirurgisch auf ein Drittel reduzieren, so käme es zur Luteolyse des Gelbkörpers und dadurch zur Rückkehr zum normalen Zyklus (MCDOWELL et al., 1985). Während zwischen Tag 9 und 10 die Mobilität des Embryos begrenzt ist und er ca. 60 % der Zeit im Uteruskörper verbringt, erreicht er zwischen Tag 11 und 14 seine maximale Beweglichkeit und hält sich die meiste Zeit in den Uterushörnern auf (GINTHER, 1985). Für die Trächtigkeitserkennung ist es von Bedeutung, dass der Embryo durch den gesamten Uterus wandern kann.

Auch nach seinem Abstieg in den Uterus sezerniert der Embryo weiterhin die Hormone  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGE}_2$ , welche die Fähigkeit haben, die Funktion der glatten Muskulatur in einigen Körpersystemen zu stimulieren. Durch Stimulation des Myometriums entstehen Uteruskontraktionen, die für die Fortbewegung des Embryos verantwortlich sind. Die Vermutung, die Mobilität des Embryos werde durch die Wirkung dieser beiden Hormone hervorgerufen, konnte bestätigt werden (WATSON u. SERTICH, 1989; STOUT u. ALLEN, 2001, 2002). Wahrscheinlich sind  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGE}_2$  nicht nur für die Fortbewegung des Embryos, sondern auch für weitere wichtige lokale Funktionen bei der Entwicklung und Ernährung des Konzeptus von Bedeutung (STOUT u. ALLEN, 2002). Die Verabreichung eines  $\beta$ -Sympathomimetikums (Clenbuterol), welches die Uteruskontraktilität unterdrückt, löste die Herabsetzung der Embryomobilität aus (GINTHER, 1985).

Die maternale Trächtigkeitserkennung wird aber nicht nur durch die embryonale Wanderung, sondern auch durch die vom Embryo induzierte Herabsetzung der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Sekretion des Endometriums beeinflusst (McDOWELL et al., 1985; STOUT u. ALLEN, 2002).

Während der Wanderung, die ihren Höhepunkt zwischen Tag 10 und 14 hat, gibt der Embryo sein anti-luteolytisches Signal an das gesamte Endometrium ab und erreicht somit den Zustand der Luteostase, der für die Erhaltung der Trächtigkeit unabdingbar ist (McDOWELL et al., 1985; STOUT u. ALLEN, 2001). Produziert der Embryo zuviel  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , kann dies über den peripheren Kreislauf in das Ovar gelangen, wo es die Luteolyse auslöst und zum Trächtigkeitsverlust führt (MORRIS u. ALLEN, 2002). Die eigentliche  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Sekretion während des Zyklus erfolgt bei der Stute durch das Endometrium und wird durch das bei der Stute ebenfalls vom Endometrium sezernierte Oxytocin ausgelöst (HANDLER u. AURICH, 2005). Durch eine vom Embryo hervorgerufene Reduktion der Oxytocinrezeptor-Konzentration im Endometrium zwischen Tag 10 und 16 der Trächtigkeit wird die  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Ausschüttung und damit die Luteolyse verhindert, sodass die Trächtigkeit aufrechterhalten werden kann (STARBUCK et al., 1998).

Für das Phänomen der Uteruswanderung gibt es bis zu dem Zeitpunkt, an dem der Embryo erstmalig sonographisch erfasst und so seine Lageveränderung dokumentiert werden kann, keinen Beweis. Die erste sonographische Darstellung des Embryos kann gelegentlich an Tag 9, zuverlässig aber erst an Tag 11 erfolgen (BETTERIDGE, 2007). Das Phänomen der embryo-maternalen Kommunikation bleibt beim Pferd jedoch bis heute ungeklärt.

### 2.3.2.2. Nach der Fixierung

Etwa an Tag 17 erfolgt durch einen plötzlich ansteigenden Uteruston sowie ein enormes Größenwachstum des Embryos seine Immobilisation und Fixierung an der Basis eines der Uterushörner (ALLEN u. STEWART, 2001; STOUT u. ALLEN, 2001). Die mobile Phase ist damit beendet. Durch die Fixierung, die in der Regel in ventraler Lage gegenüber der mesometrialen Anheftung erfolgt, verändert der Embryo seine Form. Diese wird aufgrund der Anpassung an das geschwollene Uterushorn unregelmäßig im Querschnitt (GINTHER, 1992). Während die Fruchtblase zwischen Tag 11 und 16 noch eine sphärische Form hat, ist diese an Tag 17 eher länglich, zwischen Tag 18 und 21 dreieckig und zwischen Tag 24 und 48 unregelmäßig (GINTHER, 1983a).

Eine weitere Hypothese ist, dass der Konzeptus seine Form aufgrund von äußerem Druck auf die Gebärmutterwand, wie z.B. durch Bewegungen der abdominalen Organe, verändert. Vermutlich liegt es jedoch an den myometrischen Kontraktionen, die einen Massage-ähnlichen Effekt auf den fixierten Vesikel ausüben sollen und den dicksten Teil der Embryowand, den Embryopol, in eine ventrale Position drücken. Gleichzeitig verändert sich zwischen Tag 16 und 21 die Wanddicke des Uterus insofern, als dass die dorsale Wand an Dicke zunimmt während die ventrale Wand immer dünner und glatter wird.

Die Ausrichtung des Embryos in ventraler Lage zwischen dem Zeitpunkt der Fixierung und Tag 19 hat seine Ursache folglich zum einen in den Myometriumskontraktionen, zum anderen in der stark ausgeprägten dorsalen Uteruswand sowie in der vermehrten Wanddicke des Konzeptus am embryonalen Pol, welche durch die Mesodermschicht und die Anwesenheit des Embryos und des Amnions entsteht.

Durch die embryonale Rotation in ventrale Lage ist der Zusammenstoß zwischen der verdickten Wand am Embryopol und der dünneren, ventralen Uteruswand geringer als er es an der dorsalen Uteruswand wäre. Die Fixierung des Embryos am kaudalen Pol des Uterushorns liegt vermutlich an der zu diesem Zeitpunkt herrschenden Wölbung des Hornes (GINTHER, 1985, 1983a).

Mit der Fixierung des Embryos in der Gebärmutterschleimhaut verändern sich die physikalischen Eigenschaften der Kapsel. Diese wird durch den Sialinsäureverlust schlaff (BETTERIDGE, 2007; QUINN et al., 2007). Um Tag 18 beendet die Kapsel ihr Wachstum und wird wieder dünner, bis sie an Tag 23 ganz verschwunden ist. Damit ist der Trophoblast der Umgebung ausgesetzt (ORIOLE et al., 1993a).

Auch das Profil der Proteine, die sich an die Kapsel heften bzw. diese durchqueren, um in die Dottersackflüssigkeit zu gelangen, verändert sich. Während Uterocalin (p19) weiterhin vorhanden ist, wird  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2M) abgebaut und das Protein Phospholipase A2 (p17) zeigt vorübergehend Präsenz (BETTERIDGE, 2007; QUINN et al., 2007). Die Osmolarität der Dottersackflüssigkeit sowie ihre Konzentration an Proteinen, Fructose, Oxytocin und Arginin-Vasopressin (AGP) beginnt zu steigen (BETTERIDGE, 2000) und das Wachstum des Embryos, das vor der Fixierung noch 3 – 4 mm/Tag betrug, erreicht zwischen Tag 17 und 24 ein Plateau. Danach beträgt das Wachstum nur noch 2 – 3 mm pro Tag (GINTHER, 1983a).

### 2.3.3. Veränderungen in der frühembryonalen Phase

#### 2.3.3.1. Zusammensetzung und Produkte von Embryo und Uterus

**Uterus** Während der Etablierung der Trächtigkeit steigen die Aktivitäten von Glucose, Fructose, Ascorbinsäure sowie des Enzyms Glucosephosphat-Isomerase (GPI) in der Uterusflüssigkeit an. Dies spiegelt eventuell einen vermehrten Kohlenhydratstoffwechsel wider, der für die Entwicklung des Konzeptus von großem Nutzen ist. Die Produktion dieser den Embryo ernährenden Substanzen wird durch chemische Signale der Blastozyste reguliert. Zu diesen gehören unter anderem die Östrogene, die in Hinblick auf den Kohlenhydrattransport und -metabolismus im Uterus der tragenden Stute wichtig sind (ZAVY et al., 1982).

Des Weiteren können in der Spülflüssigkeit des Uterus zwei Formen von Uteroglobulin detektiert werden, deren immunreaktive Form auf die Verabreichung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  mit einem starken Anstieg reagiert.

Uteroglobulin ist ein progesteronabhängiges Protein, welches vom Uterus sezerniert wird und eine Rolle bei der Abgabe von Lipidliganden durch die Kapsel spielt (QUINN et al., 2007; HAYES et al., 2008).

Auch das aus den uterinen Epithel- und Drüsenzellen in das Uteruslumen sezernierte maternale Uterocalin, welches auch als p19 bezeichnet wird, ist ein Carrierprotein, dessen Sezernierung progesteronabhängig ist. Seine Anwesenheit in der uterinen Spülflüssigkeit koinzidiert mit dem peripheren Serumprogesteronspiegel während des Zyklus und seine Sezernierung kann durch synthetische Progestagengabe induziert werden. Uterocalin wird von Tag 14 – 25 im Uterussekret gefunden. Nach Tag 20 sinkt die Konzentration trotz weiter bestehender Progesteronsekretion wieder auf Basalwerte ab. Diese Tatsache weist darauf hin, dass die Expression von p19 nicht nur progesteronabhängig ist, sondern weitere Mechanismen die Synthese und Sekretion kontrollieren. Die Sezernierung von p19 erfolgt, solange der Embryo mobil und die Kapsel vorhanden ist. Infolge Absorption durch die Kapsel und den Trophoblasten ist es auch in der Dottersackflüssigkeit zu finden. Durch seine ligandbindenden Eigenschaften bindet es nicht nur die für den Energiestoffwechsel und für die Membranstruktur wichtigen gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren, sondern auch mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Die Primärfunktion von Uterocalin ist also seine Wirkung als Carrierprotein für Lipide. Diese werden für das Wachstum, den Stoffwechsel und die Morphogenese des Embryos benötigt. Das Außergewöhnliche an p19 ist seine Zusammensetzung. Während der Embryo in der Regel essentielle Aminosäuren nur von der Mutter erhält, stellt Uterocalin diesbezüglich die Ausnahme dar. Aufgrund seiner Reichhaltigkeit an den meisten essentiellen Aminosäuren fungiert es als Quelle essentieller Aminosäuren für die Proteinsynthese. Eine weitere Besonderheit von p19 ist die Lokalisierung von Tryptophan in seiner Seitenkette. Dies ermöglicht die Interaktion mit anderen Proteinen und Membranen, sodass p19 mit der Membranoberfläche der Trophoblastzellen oder mit Rezeptoren auf diesen interagieren kann. Eine solche Interaktion ermöglicht eine schnelle Aufnahme des Proteins und verhindert gegebenenfalls die Reabsorption, sofern das maternale Epithel keinen adäquaten Rezeptor besitzt. Die molekularen und biochemischen Charakteristika von Uterocalin eignen sich demnach für den Transport essentieller Nährstoffe, Hormone und anderer Wachstumsfaktoren durch die Kapsel und den Trophoblasten zum Embryo (CROSSETT et al., 1996, 1998; KENNEDY, 2004; QUINN et al., 2005; ELLENBERGER et al., 2008).

**Konzeptus** Zwischen Tag 7 und 14 der frühen Trächtigkeit produziert der Embryo neben Östradiol vor allem das Steroid  $17\alpha$ -hydroxyprogesteron, das vom Endometrium zu einem undefinierbaren Steroid verstoffwechselt wird. Vermutlich spielen auch diese vom Embryo produzierten Steroide eine Rolle bei der Entwicklung des Embryos und/oder der Hemmung der Luteolyse bzw. der Trächtigkeitserkennung (GOFF et al., 1993).

Der überwiegende Blutzucker des Embryos ist Fructose. Die Fructosekonzentration der Dottersackflüssigkeit steigt nach Tag 16 parallel zum Anstieg der Osmolalität deutlich an. Daher ist es möglich, dass Fructose zwischen der 2. und 4. Trächtigswoche bis zu 25 % an der Osmolalität beteiligt ist. Dies und die Tatsache, dass Fructose bei vorliegendem Glucosemangel als Ersatznahrungsquelle dient, führt zu der Annahme, dass Fructose sowohl auf das Tiefgefrieren als auch auf die Kultivierung equiner Blastozysten Einfluss hat (RUDDOCK et al., 2000).

Auch die Konzentrationen von Oxytocin und Arginin Vasopressin (AVP) steigen nach der Fixierung in der Dottersackflüssigkeit, sodass ihnen eine Rolle bei der Vermeidung der Luteolyse eingeräumt wird. Gegebenenfalls gibt es einen Zusammenhang zwischen AVP und der Osmolalität der Dottersackflüssigkeit. Die Fixierung an Tag 16 ist also mit wichtigen metabolischen Veränderungen zur Erhaltung der Trächtigkeit verknüpft (WÄELCHLI et al., 2000b). Die vom Embryo produzierten Stoffwechselprodukte können in der Spülflüssigkeit nachgewiesen werden (ZAVY et al., 1982, 1984).

**Trophoblast** Hauptprotein des Trophoblasten ist das GM<sub>2</sub>-Activator Protein (GM<sub>2</sub>-AP). Dieses sekretorische und lysosomale Enzym ist zusammen mit dem Enzym  $\beta$ -Hexosaminidase A für die Hydrolyse des Lipids GM<sub>2</sub> verantwortlich. GM<sub>2</sub> ist ein an die Membran des Lysosoms gebundenes Gangliosid (Sphingolipid), das von GM<sub>2</sub>-AP an eine hydrophobe Tasche gebunden und mit Hilfe der  $\alpha$ -Untereinheit der  $\beta$ -Hexosaminidase A zu GM<sub>3</sub> hydrolysiert wird. Bei Fehlen oder Defekt dieses Enzymes kann die Hydrolyse von GM<sub>2</sub> zu GM<sub>3</sub> nicht stattfinden und es kommt zur Speicherung des Lipids GM<sub>2</sub> im Lysosom (Gangliosidose). Das reichhaltige Vorkommen von GM<sub>2</sub>-AP während der Kapselphase weist auf eine zeitlich begrenzte Rolle hin, die nach der Desialysierung der Kapsel beendet ist. GM<sub>2</sub>-AP kann in den extrazellulären Raum sezerniert und durch einen kohlenhydratunabhängigen Mechanismus mit oder ohne gebundenes Lipid von der extrazellulären Flüssigkeit wieder aufgenommen werden. Vermutlich hat GM<sub>2</sub>-AP eine lysosomale, katabolische Rolle im Trophoblasten bzw. die eines Lipidcarriers. Es bindet, löst und transportiert ein breites Spektrum an Lipidmolekülen wie z.B. Glycolipide, Ganglioside sowie Phosphoacylglycerol zwischen Liposomen hin und her. Seine maximale Aktivität erreicht GM<sub>2</sub>-AP bei pH 5. GM<sub>2</sub>-AP fungiert demzufolge als intra- und/oder interzelluläres Lipidtransportprotein (MAHURAN, 1998; QUINN et al., 2006). Vor der Einnistung des Embryos ist das GM<sub>2</sub>-AP in der Dottersackwand vorhanden (QUINN et al., 2007; HAYES et al., 2008).

Auch Uterocalin (p19) konnte während der frühen Trächtigsphase im Trophoblasten gefunden werden. Es gelangt durch die Kapsel und die Trophoblastzellen in die Dottersackflüssigkeit (CROSSETT et al., 1998).

**Kapsel** Bis Tag 14 befindet sich vor allem die intakte Form von  $\beta_2M$  (p10) in der Kapsel. Dieses wird im Rahmen der Fixierung des Embryos (Tag 16) proteolytisch zu p8 umgewandelt, dem neun Aminosäuren am N-terminalen Ende fehlen. Schließlich wird es soweit abgebaut, dass es an Tag 19 nicht mehr zu finden ist. Zwischen Tag 13,5 und 17,5 ist das  $\beta_2M$  auch in der Dottersackwand und im Uterusgewebe vorhanden.

Neben Uterocalin (p19), das sich vor der Fixierung sowohl in der Kapsel als auch in der Dottersackflüssigkeit befindet, ist auch das kationische Protein p17 ( $\alpha$ -Lactalbumin) in der Kapsel vorhanden. Die Konzentration dieses Proteins, das auch als sekretorische Phospholipase A2 (sPLA2) Typ II bekannt ist, steigt nach Behandlung mit  $PGF_{2\alpha}$  stark an. Durch einen  $PGF_{2\alpha}$ -induzierten Trächtigkeitsabbruch und die dadurch ausbleibende Fixierung des Embryos erfolgt eine vermehrte Sekretion von sPLA2 in der Kapsel sowie eine Veränderung der Genexpression von Uteroglobin. Diese Reaktionen könnten eine Rolle beim Untergang des Konzeptus spielen (QUINN et al., 2007; HAYES et al., 2008).

Während der Fixierung sind p4 (Tag 15 – 18) sowie p8 (Tag 17 – 18) mit der Kapsel assoziiert, nach der Fixierung sind es p5 (ab Tag 18), p13 ( $\alpha$ -Subunit von equinem Hämoglobin) und p14 ( $\beta$ -Subunit von equinem Hämoglobin, ab Tag 17). Die kapsuläre Proteinzusammensetzung durchläuft während der Fixierung einen schnellen Wechsel (QUINN et al., 2005).

**Dottersackflüssigkeit** In der Dottersackflüssigkeit können zwischen Tag 15 und 16 p4 und p19 sowie nach Tag 20 auch p13 und p14 gemessen werden. Die p13 und p14 werden als unspezifische Kontaminanten bezeichnet (QUINN et al., 2005).

Das Hauptprotein der Dottersackflüssigkeit während der Zeit der Fixierung ist Uterocalin p19, welches durch die Kapsel und die Trophoblastzellen in den Dottersack gelangt. Da es nach der Fixierung nicht mehr messbar ist, wird vermutet, dass es eine Rolle im endometrial-embryonalen Transport spielt (CROSSETT et al., 1998; SUIRE et al., 2001; QUINN et al., 2005).

### 2.3.3.2. Osmotisch bedingte Veränderungen

Nach einem starken Wachstumsschub des Embryos zwischen Tag 11 und 16 folgt ein Plateau. Der Flüssigkeitseinstrom steigt exponentiell, bis er an Tag 16 drei ml pro Tag erreicht. Das Besondere dabei ist die Hypoosmolalität der Flüssigkeit während dieser Zeit. Der osmotische Gradient kann also nicht als Ursache für den Flüssigkeitseinstrom und somit für die Expansion des Dottersacks verantwortlich gemacht werden (WÄELCHLI u. BETTERIDGE, 1996; WATSON et al., 2004). Die Hypoosmolalität der Dottersackflüssigkeit führt nach der Uterusspülung zum Auftrieb des Konzeptus in dem als Spülflüssigkeit verwendeten Phosphat-Puffer (PBS) mit einer Osmolalität von  $280 \text{ mOsm kg}^{-1}$ . Der Auftrieb beginnt mit einer Größe von 4 – 5 mm (Tag 10 – 11) und bleibt bis Tag 18 – 20 erhalten.

Zu diesem Zeitpunkt beginnt der Verlust der Kapsel und der sphärischen Form des Embryos. Bis etwa Tag 9 sinken Embryonen in isotonem Medium ab, danach schweben sie darin, während sie in hypotonem Medium sinken. Grund hierfür ist die Hypoosmolalität der Blastozystenflüssigkeit. In Abhängigkeit vom Alter des Embryos steigt die Osmolalität (Elektrolytkonzentration) nach Tag 16 deutlich an, sodass sie an Tag 22 etwa 250 mOsm/kg erreicht (WÄLCHLI u. BETTERIDGE, 1996; WÄLCHLI et al., 1997). Gleichzeitig steigt die Konzentration von Fructose, Arginin-Vasopressin sowie Oxytocin in der Dottersackflüssigkeit an (RUDDOCK et al., 2000; BETTERIDGE, 2000). Die Ursache für den Osmolalitätsanstieg ist unklar. Möglicherweise spielen Veränderungen im Flüssigkeits- und Stoffaustausch zwischen Konzeptus und Gebärmutter durch die Fixierung des Embryos dabei eine Rolle.

Setzt man Embryonen über einen längeren Zeitraum einem hypertonen Medium mit einer Osmolalität von über 300 mOsm kg<sup>-1</sup> aus, so steigt die Osmolalität der Blastozystenflüssigkeit (Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) an. Die Embryonen schweben. Gleichzeitig ist der Perivitellinspalt zwischen Kapsel und Trophoblastzellen deutlich vergrößert. Diese Veränderung ist besonders bei Osmolalitäten von 1500 mOsm Kg<sup>-1</sup> im Medium der Fall. Ursache hierfür ist vermutlich, dass Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> sowie K<sup>+</sup> frei durch die Kapsel, nicht aber durch den Trophoblasten diffundieren können. Die dadurch verursachte erhöhte Elektrolytkonzentration im Perivitellinspalt zieht den Wassereinstrom nach sich (WÄLCHLI u. BETTERIDGE, 1996).

Die Blastozystenflüssigkeit hat eine niedrigere Na<sup>+</sup>-Konzentration und Osmolalität, aber eine höhere K<sup>+</sup>-Konzentration als Blutserum. Die Hypothese, die Na<sup>+</sup>-Konzentration und Osmolalität der Uterinflüssigkeit sei niedriger als die der Blastozystenflüssigkeit, konnte nicht bestätigt werden. Die Na<sup>+</sup>-Konzentration der Uterinflüssigkeit ist zwar niedriger als im Serum, aber höher als die der Blastozystenflüssigkeit. Die Entstehung der hypotonen Blastozystenflüssigkeit bleibt also weiterhin unklar (WÄLCHLI et al., 2000b). Große Proteinmoleküle und Proteinaggregate tragen zum osmotischen Potential der Follikelflüssigkeit bei und rekrutieren Flüssigkeit in die Follikelhöhle (CLARKE et al., 2006). Für die Verhältnisse im Konzeptus wird ein ähnlicher Mechanismus diskutiert wie in der Follikelflüssigkeit.

Zwischen Tag 10 und 25 ist die Blastozystenflüssigkeit hypoton. Um Tag 7 – 8 der Trächtigkeit bildet sich um den Embryo zusätzlich zum Trophektoderm das Endoderm. Seine basolateralen Fortsätze bilden das subtrophektodermale Kompartiment, welches zwischen dem Endoderm und dem Trophektoderm lokalisiert ist. Während die Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Konzentration kleinerer Embryonen in der Blastozystenflüssigkeit höher ist als im subtrophektodermalen Kompartiment, verhält sich dies bei größeren Embryonen umgekehrt. Je größer der Embryo ist, desto weniger Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> befindet sich in der Blastozystenflüssigkeit und desto mehr befindet sich im subtrophektodermalen Kompartiment. Dieser Vorgang liegt in der Aktivität der im Endoderm lokalisierten Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase begründet. Diese pumpt Na<sup>+</sup> aktiv aus dem Blastozoel in das subtrophektodermale Kompartiment, dessen Osmolalität im Vergleich zum Blastozoel daraufhin steigt.

Dieser Anstieg der Osmolalität hat zur Folge, dass Wasser aus dem extrazellulären Raum durch den osmotischen Gradienten in das nun hypertone subtrophektodermale Kompartiment hineingezogen wird. Wie das Wasser allerdings in die hypotone Blastozoeiflüssigkeit gelangt, ist noch unklar. Die steigende Osmolalität des subtrophektodermalen Kompartiments erfolgt, sobald der Konzeptus eine Größe von ungefähr sechs mm erreicht. Dies ist etwa an Tag 11 der Trächtigkeit der Fall – zeitgleich mit dem Beginn der stärksten Wachstumsphase (Tag 11 – 16) des Embryos sowie kurz nachdem dieser beginnt, Auftrieb im Medium zu haben. Wenngleich das Endoderm beim Prozess des Wassereinstromes behilflich ist und somit die Expansion des Embryos ermöglicht, kann der Embryo jedoch auch in Abwesenheit dieser Epithelschicht expandieren (ENDERS et al., 1993; WAELCHLI et al., 1997; CREWS et al., 2002, 2007).

Die Vermutung, dass ein Konzentrationsgradient zwischen peripherer und zentraler Region der Dottersackflüssigkeit für den Wassereinstrom verantwortlich ist, konnte nicht bestätigt werden. Der Wassereinstrom aus dem subtrophektodermalen Kompartiment in das Blastozoeil erfolgt wahrscheinlich mit Hilfe eines aktiven Wassertransportes gegen das Konzentrationsgefälle durch die bilaminare (Trophektoderm und Endoderm), den Embryo umgebende Epithelschicht hindurch. Ebenfalls möglich ist die Beteiligung von Aquaporinen. Außerdem ist es möglich, dass der Flüssigkeitseinstrom nicht der Grund, sondern vielmehr das Resultat des embryonalen Wachstums ist (CREWS et al., 2007). Die Tatsache, dass der Embryo während der größten Wachstumsphase konstant seine eigene Hülle produziert, könnte zu seinem Volumenwachstum sowie zu einem negativen hydrostatischen Druck beitragen. Während um Tag 18 die Kapselakkumulation stoppt und die Expansion langsamer wird, beginnt die Osmolalität der Dottersackflüssigkeit zu steigen (GINTHER, 1992; ORIOL et al., 1993a; WAELCHLI u. BETTERIDGE, 1996). Vielleicht trägt das subtrophektodermale Kompartiment nicht nur zum Wassereinstrom bei, sondern verhilft dem Konzeptus auch zu einer Toleranz gegenüber hypertoner Umgebung. Setzt man Embryonen hypertonen Medien wie z.B. Kryoprotektiva aus, so antworten kleinere Blastozysten (300  $\mu\text{m}$ ) mit schneller Schrumpfung aufgrund des Wasserausstromes und anschließender Reexpansion aufgrund des Einstromes des hypertonen Kryoprotektivums und des damit verbundenen Wassereinstromes. Größere Embryonen (500 – 1000  $\mu\text{m}$ ) schrumpfen jedoch nur langsam und reexpandieren kaum (HOCHI et al., 1994d, 1995b). Die Ursache dieses Verhaltens ist vermutlich das Vorhandensein der Kapsel. Zu diesem Zeitpunkt ist aber auch das Endoderm bereits ausgebildet. Da die Kapsel bei frühen Entwicklungsstadien selbst für größere Moleküle permeabel ist, könnte die bilaminare Omphalopleura (Endoderm und Trophektoderm) für die steigende Wasserresistenz innerhalb einer hypertonen Umgebung verantwortlich sein. Dies würde das Verhalten der größeren Embryonen erklären (GUILLOMOT u. BETTERIDGE, 1984; CREWS et al., 2007). Setzt man größere (12 mm) bzw. ältere (13 oder 14 Tage) Embryonen hyperosmolaren Lösungen aus, so behalten sie neben ihrer Form auch ihre Hypoosmolalität – unabhängig von der Permeabilität der Kapsel (WAELCHLI u. BETTERIDGE, 1996).

Die entwicklungsbedingten Veränderungen der Elektrolytverteilung in der Dottersackwand und damit verbundene morphologische Veränderungen des Embryos sollten weiter untersucht werden, da das Vorhandensein der bilaminären embryonalen Dottersackwand Einfluss auf den Wassertransport durch die Epithelien und somit nicht nur auf das Wachstum des Embryos, sondern auch auf dessen Tiefgefrierfähigkeit haben könnte (CREWS et al., 2007).

### **2.3.4. Entstehung der plazentaren Hüllen**

Die Ernährung des equinen Embryos erfolgt über eine Verbindung zum Gebärmutterepithel.

#### **2.3.4.1. Dottersackplazentarstadium (Tag 8 – 21)**

Ab Tag 8 beginnt die Entwicklung des Dottersacks. Aus der ICM entsteht an Tag 8 das Endoderm, welches an Tag 11 das Blastozoele vollständig umschließt und zusammen mit dem Trophoblast (Ektoderm) die bilaminäre Dottersackwand bildet (ENDERS et al., 1993). Während das Wachstum zwischen Tag 11 und 16 besonders progressiv ist, erreicht es danach ein Plateau. Der Flüssigkeitseinstrom steigt exponentiell und erreicht an Tag 16 mit 3 ml/Tag seinen Höhepunkt. Das Besondere dabei ist, dass die Flüssigkeit während des schnellen Wachstums hypoton ist. Der osmotische Gradient kann also nicht als Ursache für den Flüssigkeitseinstrom und somit für die Expansion des Dottersacks verantwortlich gemacht werden (WÄELCHLI u. BETTERIDGE, 1996; WATSON et al., 2004). Durch die Hypoosmolalität der Dottersackflüssigkeit erfährt der Embryo Auftrieb in dem als Spülflüssigkeit verwendeten PBS mit einer Osmolalität von 280 mOsm kg<sup>-1</sup>. Dieser Auftrieb beginnt bei einer Größe von 4 – 5 mm (Tag 10 – 11) und bleibt bis Tag 18 – 20 erhalten. Zu diesem Zeitpunkt beginnt der Verlust der Kapsel und der sphärischen Form des Embryos. Da das Dottersacklumen direkt in den primitiven Darm übergeht, ist alles, was über den Dottersack absorbiert wird, direkt für den Embryo zugänglich.

Während die „Raubers Layer“ (Trophoblastzellen über der ICM) um Tag 14 verschwindet, ist die flache, birnenförmige Keimscheibe klar zu erkennen. Sie enthält einen Primitivstreifen (Zellwulst, der sich durch Zellvermehrung und Zellwanderung zum hinteren Teil der Keimschicht vorübergehend bildet und für die Entwicklungssteuerung des Embryos verantwortlich ist) von ca. 1 mm Länge. Aus der Keimscheibe wächst das Mesoderm zwischen Endo- und Ektoderm heraus und umgibt schließlich über die Hälfte des Dottersackes. Die Zellen des Mesoderms sind in somatische und splanchnische Zelllagen unterteilt, die durch das Exocoelom voneinander getrennt sind. Das Mesoderm bildet Blutinseln, die durch Wachstum und Fusion ein durchgehendes Gefäßnetz in der Dottersackwand bilden. Durch Verbindung dieses Netzes mit dem Embryo entsteht ein Kreislaufsystem, mit Hilfe dessen der Embryo ernährt wird. Am Ende des durchbluteten Mesoderms befindet sich eine Sammelvene, der Sinus terminalis. An dieser Stelle ist die Dottersackwand dreischichtig, bestehend aus Endo- Meso- und Ektoderm.

Diese Schicht hat eine absorbierende Funktion und steht in Kontakt mit der Uterinmilch (Fette, Kohlenhydrate, Proteine, etc.), die für die Ernährung des Embryos wichtig ist. Die restliche, distal gelegene Wand ist zweischichtig, bestehend aus Endo- und Ektoderm (VAN NIEKERK u. ALLEN, 1975; GINTHER, 1992). Die Dottersackwand fungiert sozusagen als Austauschplattform für verschiedene Substanzen, die für den Embryo bzw. das Endometrium notwendig sind.

Neben der Expression von GM<sub>2</sub>-AP vor der Fixierung des Embryos, das für den Transport und den Abbau von Glykolipiden notwendig ist, produziert die Dottersackwand Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGF-BP3) zur Bindung des Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), welcher für die embryonale Entwicklung gebraucht wird. Außerdem synthetisiert und metabolisiert die Dottersackwand Steroide und produziert PGF<sub>2α</sub> sowie PGE<sub>2</sub>. Der Steroidmetabolismus in der bilaminaren bzw. trilaminaren Dottersackwand ist unterschiedlich (GOFF et al., 1993; HERRLER et al., 2000a; RAESIDE et al., 2004; QUINN et al., 2006).

An Tag 16 erlangt der Embryo eine zylindrische Form und besitzt ein gut entwickeltes Neuralrohr, welches im primitiven Darm endet. Die mesodermale Platte an beiden Seiten des Neuralrohres enthält zu diesem Zeitpunkt 14 Paar Somiten (vorübergehende Ursegmente beidseits des Neuralrohres). Auch die Entwicklung des Amnions (dünne, gefäßlose, innerste Eihaut; Teil der Fruchtblase des Embryos) beginnt an Tag 16, sodass der Embryo an Tag 20 vollständig vom Amnion umgeben ist (VAN NIEKERK u. ALLEN, 1975). Die Dottersackflüssigkeit des schnell expandierenden Embryos beinhaltet zwischen Tag 8 und 17 eine niedrige Proteinkonzentration. Allerdings sind beachtliche Mengen der progesteronabhängigen Proteine Uterocalin p19 und Uteroglobulin messbar (QUINN et al., 2007). Während die Östrogen- sowie die hohe Fructosekonzentration parallel mit der Größe steigen, ist die Glucosekonzentration zu diesem Zeitpunkt sehr niedrig (RUDDOCK et al., 2000). Die Osmolalität der hypotonen Dottersackflüssigkeit steigt zwischen Tag 11 und 16 exponentiell an (BETTERIDGE, 2007). Die Ursache für die Hypoosmolalität ist noch unklar.

An Tag 18 sind sowohl die Vitellinararterien als auch der Sinus terminalis deutlich um den Embryo herum sichtbar. Dieser nimmt durch Einbiegen seiner beiden Enden mehr und mehr die Form eines „C“ an. Seine Größe umfasst bereits 6 cm. Die Neuralfalten beginnen sich zu schließen und weisen mittlerweile 16 Paar Somiten auf (VAN NIEKERK u. ALLEN, 1975).

#### **2.3.4.2. Allantoisplazentarstadium (Tag 21 – 40)**

Zwischen dem 18. und 21. Tag erfolgt kein intensives Größenwachstum, sodass der Embryo an Tag 21 nur um ca. 0,5 cm größer ist als an Tag 18. An Tag 21 entsteht als Ausstülpung aus dem embryonalen Enddarm die Allantois – die embryonale Harnblase.

Die Allantois, die eine Hauptrolle im physiologischen Austausch übernehmen wird, bildet sich zu einer flüssigkeitsgefüllten Höhle (Exocoelom), welche zwischen der äußeren Somatopleura (Mesoderm und Trophoblast) und der inneren Splanchnopleura (Meso- und Endoderm) liegt (GINTHER, 1992). Währenddessen breitet sich das Mesoderm weiter aus und umgibt bereits 2/3 des Dottersacks, sodass nur noch ein kleiner Bereich der bilaminaren Omphalopleure an dem dem Embryo gegenüberliegenden Pol übrig ist. Der Embryo misst an Tag 25 ca. 6,8 cm (VAN NIEKERK u. ALLEN, 1975). Um Tag 24 bzw. 25 ist die Allantois vaskularisiert und im Verhältnis zum Embryo relativ groß. Zu diesem Zeitpunkt schlägt bereits das Herz des Embryos und pumpt Blut in das Kreislaufsystem. Die Allantois wird zunehmend größer und bildet einen Kelch unter dem Embryo, der von Amnion umgeben ist. Die Einheit von Allantois und Somatopleura (Chorion) bildet die Allantochorion-Plazenta (GINTHER, 1992). Da die Fusion dieser beiden Membranen mit Hilfe des vom Mesoderm sezernierten Mitogens (Protein, das die Zellteilung anregt) erfolgt, erscheint das Wachstum des Allantochorions als simpler Ausdehnungsprozess (STEWART et al., 1995a).

Nun entwickelt sich der beim Pferdeembryo typische, ca. 1 mm breite Choriongürtel zwischen Allantois und Dottersack und umgibt den Embryo ringförmig (GINTHER, 1992). Dieser Gürtel entsteht aus zunächst flachen Wellen im Chorion, die sich stark vergrößern und zu ausgedehnten, zottigen Erhöhungen entwickeln (ALLEN u. STEWART, 2001). Die dazwischen liegenden Vertiefungen differenzieren sich zu drüsenähnlichen Gebilden und produzieren ein exokrines Sekret, welches die Anheftung der Gürteloberfläche an das darüberliegende Endometrium auslöst (ALLEN et al., 1973). Am stärksten ausgeprägt ist der Gürtel in der Nähe des Allantochorions, während er Richtung Dottersack schwächer wird (STEWART et al., 1995a). Das Mesoderm ist an der Stelle des sich ausbildenden Choriongürtels nicht vaskularisiert und die Trophoblastzellen beginnen zu hypertrophieren und zu proliferieren. Der Gürtel entwickelt sich nach Tag 25 schnell und ist an Tag 30 bereits fünf mm breit. An Tag 36 ist er deutlich als helles, nicht durchblutetes acht mm breites, ringförmiges Band ungefähr am Übergang vom unteren zum mittleren Drittel des Konzeptus zu sehen und besteht aus einer Reihe dicht gepackter, verzweigter und zottiger Auswüchse, die dem darunter liegenden Endometrium eng anliegen. Zwischen Tag 36 und 38 löst sich der Gürtel von den fetalen Membranen (VAN NIEKERK u. ALLEN, 1975). Die von den fetalen Membranen gelösten Trophoblastzellen des Choriongürtels dringen ins Endometrium ein und formen die decidua-ähnlichen Zellen der Endometrial Cups (Schleimhauttrichter), die das equine Choriongonadotropin (eCG) produzieren (ALLEN et al., 1973). Bevor sie in das Endometrium eindringen, exprimieren die invasiven Gürtelzellen ein hohes Level an väterlich und mütterlich vererbten major histokompatibilitäts Komplex (MHC) Klasse I Antigene. Die Immunogenität der invasiven Zellen bestätigt die Hypothese, dass die Invasion in das Endometrium die Bildung anti-paternaler Alloantikörper stimuliert, die normalerweise während der frühen Trächtigkeit vorhanden sind.

Die kodominante Expression maternaler sowie paternaler Antigene durch die invasiven Gürtelzellen hat wichtige Auswirkungen auf den Mechanismus der Erkennung fetaler Alloantigene durch das maternale Immunsystem (DONALDSON et al., 1994). Das eCG fördert durch seine FSH- und LH-artige Wirkung die sekundäre Lutealentwicklung, sodass sich an den Ovarien sekundäre Gelbkörper bilden, sobald das eCG im Blut erscheint. Trotz geringer Bindungsaffinität zu Gonadotropinrezeptoren an den Gonaden kommt es in der Folge zu einem Anstieg des maternalen Serumprogesterons (DAELS et al., 1991).

Die Entstehung der Endometrial Cups kann in 5 Phasen aufgeteilt werden: 1. Anhaftung, 2. Eindringen, 3. Phagozytose, 4. Migration und 5. Differenzierung. Die Anhaftung beginnt an Tag 25 mit der verstärkten Faltenbildung der Gürtelzellen und der anschließenden Ausdehnung der zottigen Strukturen an Tag 33. Die Gürtelzellenspitzen sind Mikrovilli, von denen viele Pseudopodien ausbilden. Durch Ausdehnung der Gürtelzellen in die Einbuchtungen des Endometriumepithels entstehen an Tag 37 Verzahnungen der beiden Oberflächen. An Tag 38 beginnt die Invasion durch Eindringen der Pseudopodien in die Plasmamembran der Epithelzellen bis ins Zytoplasma. Der Prozess des Eindringens erfolgt sowohl zwischen einzelnen Epithelzellen als auch direkt durch die Zelle hindurch. Diejenigen Gürtelzellen, die nicht an der Bildung der Endometrial Cups beteiligt sind, nekrotisieren. Die beteiligten Gürtelzellen dringen weiter ein und verschlingen die defekten Epithelzellen (Phagozytose). Durch Penetration der Basalmembran des Uterusepithels erreichen die Trophoblastzellen mitsamt den von ihnen aufgenommen Epithelresten das endometriale Stroma. Sie wandern an den Drüsen entlang abwärts, schädigen diese jedoch nicht. Im Stroma angelangt sammeln sich die eingedrungenen Zellen, hypertrophieren und differenzieren zu reifen Cup-Zellen. Nach Beendigung der Differenzierung verlieren die Gürtelzellen ihre Eigenschaften. Die Endometrial Cups sind als helle, erhabene, hufeisenförmige- bzw. kreisförmige Plaques auf der Endometriumsoberfläche zu sehen (ALLEN u. MOOR, 1972; ALLEN et al., 1973; ALLEN, 1975; GINTHER, 1992). Sie erreichen ihre maximale Größe und Produktivität um Tag 70 (ALLEN u. STEWART, 2001).

Die Größe des Choriongürtels sowie die Fähigkeit der Endometrial Cups Hormone zu sezernieren, kann sowohl vom embryonalen Genotyp als auch vom Milieu der Gebärmutter, welches den Embryo umgibt, beeinflusst werden. Embryonen aus der Kreuzung mit einem equinen Hengst (E. caballus x E. caballus bzw. E. caballus x E. asinus) entwickeln einen besser ausgeprägten, dickeren Choriongürtel sowie größere, aktivere Endometrial Cups. Diese sezernieren größere Mengen eCG als Embryonen aus der Kreuzung mit einem Eselhengst (E. asinus x E. asinus bzw. E. asinus x E. caballus). Grund hierfür ist der Einfluss des fetalen Genotyps. Vergleicht man die Ausbildung des Choriongürtels bei bisectionierten Embryonen aus der Kreuzung mit einem Eselhengst und implantiert man diese in eine Eselstute bzw. in eine Pferdestute, so zeigt sich, dass der Choriongürtel beim Embryo der Eselstute besser ausgebildet ist. Der Einfluss des Gebärmuttermilieus ist also in der Lage, den des Genotyps außer Kraft zu setzen (ALLEN et al., 1993).

Die invasiven Trophoblastzellen des Choriongürtels exprimieren kurz bevor und kurz nachdem sie in das Endometrium eindringen hohe Konzentrationen an väterlich vererbten MHC-I Antigenen auf ihrer Oberfläche, während die nicht-invasiven Trophoblastzellen keine Antigene produzieren (DONALDSON et al., 1990). Durch die Expression paternaler MHC-Komplexe wird eine starke humorale Immunantwort der Stute hervorgerufen, sodass tragende Stuten hohe Titer spezifischer, anti-paternaler, lymphozytotoxischer Antikörper innerhalb von 10 – 14 Tagen nach Invasion der Choriongürtelzellen im Serum bilden. Diese Antikörper persistieren in der Stute, sodass es bei einer späteren Belegung mit einem MHC-I inkompatiblen Hengst aufgrund der Gedächtniszellen zu einer schnelleren und intensiveren Reaktion kommt (ANTCZAK et al., 1982).

Zusätzlich zur humoralen Immunantwort erfolgt eine starke zellvermittelte Reaktion gegen die eindringenden Gürtelzellen in Form eines schnellen Auftretens von Lymphozyten im Stroma, deren Anzahl sich zwischen Tag 60 – 70 rasant vermehrt. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich noch weitere Immunzellen wie z.B. Plasmazellen, Makrophagen und eosinophile Granulozyten im Stroma. Durch die entstehende Barriere werden fetale und maternale Gewebe voneinander getrennt. Während die Leukozyten zunächst fremde fetale Zellen abschotten, dringen sie nach Tag 70, wenn die zentralen Cup-Zellen zu degenerieren beginnen, aktiv in das Gewebe ein und greifen diese Zellen an. Dadurch wird der Niedergang und gegebenenfalls die Desquamation des ganzen nekrotischen Cups um Tag 100 – 120 beschleunigt (ALLEN, 1975).

Durch die stetig wachsende Allantoishöhle wird der Embryo zum gegenüberliegenden Pol bewegt und der Dottersack verliert durch die expandierende Allantoishöhle immer mehr an Größe, bis der Embryo an Tag 40 mitsamt seinem Amnion am gegenüberliegenden Pol angelangt ist und die Dottersackplazenta funktional ersetzt wird. Durch die immer größer werdende Allantois treffen die Membranen, die die Dottersackplazenta von der Allantoisplazenta trennen, am dorsalen Pol aufeinander und bilden die Nabelschnur, die sich folglich am dorsalen Teil des Uterus anheftet (GINTHER, 1992). Die Form des Fetus entspricht zu diesem Zeitpunkt bereits der eines Pferdes mit gut entwickelten Hinterbeinen, einem Schwanz sowie einem deutlich sichtbaren Nabel. Am einst abembryonalen Pol, an dem sich nun der Embryo befindet, sind vom vollständig abgelösten Choriongürtel nur noch Reste in Form einer einschichtigen Trophoblastzellschicht sowie einiger kleiner Gewebstücke übrig. Der Dottersack wird nun vollständig von der Allantois ersetzt (VAN NIEKERK u. ALLEN, 1975). Etwa 2 – 3 Tage später, ungefähr an Tag 40, haftet der nicht-invasive Trophoblast an die Epithelzellen des gegenüberliegenden Endometriums an und es kommt in den darauffolgenden 20 Tagen zu einer Verzahnung zwischen den stumpfen, fingerartigen Allantoichorionvilli und der Endometriumsoberfläche (SAMUEL et al., 1974).

Die Anheftung einer gesunden fetalen Plazenta an ein gesundes, voll funktionstüchtiges Endometrium ist die Grundvoraussetzung einer erfolgreichen Trächtigkeit. Störungen hinsichtlich dieser Funktionen (beschädigtes Endometrium, nicht genügend Platz bei Zwillingsträchtigkeiten, etc.) haben eine unvollständige Entwicklung und Reifung oder gar den Verlust des Fetus zur Folge.

## 2.4. Morphologische Beurteilung des Embryos

Um optimale Ergebnisse innerhalb eines Embryotransferprogrammes zu gewährleisten, ist die qualitative Beurteilung des Embryos von großer Bedeutung. Färbungen (z.B. Vitalfärbungen) oder Bewertungen der Enzymaktivität bzw. Glucoseaufnahme sind zwar ebenfalls mögliche Beurteilungsmethoden, sie erfordern jedoch eine entsprechende Ausstattung sowie gegebenenfalls längere Kulturperioden.

Da die Übertragung eines Embryos von einer Spenderstute auf die Empfängerstute möglichst schnell erfolgen soll (maximal 2 Stunden), ist die morphologische Beurteilung die Methode der Wahl. Die morphologische Beurteilung des Embryos ist eine schnelle, nicht-invasive Methode, die zwar wenig Ausrüstung benötigt, aber eine gewisse Erfahrung in der Beurteilung von Embryonen voraussetzt. Die Beurteilung ist sehr subjektiv, sodass große Unterschiede zwischen verschiedenen Labors bzw. einzelnen Personen möglich sind. Normalerweise wird ein Stereomikroskop mit 15- bis 50facher Vergrößerung verwendet. Dennoch gibt die morphologische Beurteilung nicht immer Aufschluss über die Lebensfähigkeit des Embryos (VANDERWALL, 1996). Ein Schema zur morphologischen Klassifizierung von equinen Embryonen wurde 1988 von McKinnon und Squires erstellt. Dieses ist in Tabelle 2.1 dargestellt. Als Parameter wurden Form und Farbe des Embryos, Zahl und Dichte der Blastomeren, die Größe des perivitellinen Raumes, Schäden der Zona pellucida bzw. der Kapsel, die Zahl herausgepresster und degenerierter Blastomeren sowie das Entwicklungsstadium verglichen mit dem Alter des Embryos in die Beurteilung mit einbezogen. Die Embryonen wurden je nach Erscheinungsbild den Graden I (exzellent) bis V (degeneriert/tot) zugeordnet (MCKINNON u. SQUIRES, 1988a). Dieses Schema wurde so verändert, dass die Embryonen nur noch in 4 Kategorien eingeteilt werden. Unbefruchtete Eizellen (einst Kategorie 5) werden nicht mehr in dieses Schema aufgenommen und stark degenerierte bzw. tote Embryonen werden in Kategorie 4 verschoben (CARNEY et al., 1991; BALL et al., 1993a). Anhand der Einteilung in die entsprechenden Kategorien kann natürlich nicht sicher die Lebensfähigkeit des Embryos vorhergesagt werden. Es ist jedoch möglich, Tendenzen aufzuzeigen. So liegt die Trächtigkeitsrate nach Transfer von Embryonen der Qualität I oder II bei 70 %, wohingegen Embryonen mit einer Qualität von III oder IV nur in 17 % der Fälle zu einer Trächtigkeit führen (MCKINNON u. SQUIRES, 1988b).

Anhand des äußeren Umfanges des Embryos (inklusive der Zona pellucida bzw. der Kapsel) kann seine Größe gemessen werden. Im Falle ovaler Embryonen wird der Durchschnitt gemessen. Die Größe der Embryonen nach Spülungen an Tag 6,5 variiert zwischen 155 – 493  $\mu\text{m}$  (SIROIS et al., 1987b).

Ebenso wie beim Rind ist auch beim Pferd die Zellzahl des Embryos entscheidend für die Überlebensfähigkeit nach dem Transfer. Je weniger Zellen vorhanden sind, desto geringer ist die Chance zur Etablierung einer Trächtigkeit bzw. desto höher ist die Wahrscheinlichkeit eines frühen Trächtigkeitsverlustes (BETTERIDGE u. LOSKUTOFF, 1993).

Die Übertragung unbefruchteter Eizellen oder abnormaler Embryonen verhindert die erfolgreiche Entwicklung einer Trächtigkeit und führt zu einer negativen Transferbilanz. Um unbefruchtete Eizellen von frühen Embryonalstadien unterscheiden zu können, ist nicht nur Erfahrung in der Beurteilung, sondern auch die Kenntnis der morphologischen Unterschiede erforderlich. Auch die Unterscheidung zwischen Morula und früher Blastozyste ist sehr schwierig, da beim equinen Konzeptus im Gegensatz zum Konzeptus des Wiederkäuers oder Schweines die ICM ziemlich verstreut verteilt ist.

Tab. 2.1.: Klassifikationssystem zur morphologischen Qualitätsbeurteilung von Pferdeembryonen nach MCKINNON u. SQUIRES 1988

Grad I	Exzellent: ein idealer Embryo; sphärische Form, Zellen gleichmäßiger Größe, Farbe und Struktur
Grad II	Gut: minimale Fehler: wenige herausgedrückte Blastomeren, unregelmäßige Form oder separierte Trophoblasten
Grad III	Ausreichend: deutliche aber nicht schwerwiegende Probleme: einige herausgedrückte Blastomeren, degenerierte Zellen oder ein kollabiertes Blastozoele
Grad IV	Mangelhaft: ernste Probleme: kollabiertes Blastozoele, viele herausgedrückte Blastomeren, degenerierte Zellen mit lebensfähig erscheinender ICM
Grad V	Unbefruchtet oder tot: unbefruchtete Eizellen oder total degenerierte Embryonen

In der Regel haben gespülte Embryonen einen Qualitätsscore von Grad I oder Grad II. Zu den am häufigsten vorkommenden Abnormalitäten zählen ein im Verhältnis zur Zona pellucida bzw. der Kapsel geschrumpfter Trophoblast, dunkle oder herausgedrückte Blastomeren sowie Blastomeren mit unregelmäßiger Form, unregelmäßig geformte Embryonen oder Embryonen mit einer dunklen ICM (MCKINNON u. SQUIRES, 1988a).

## 2.5. Die Kapsel

### 2.5.1. Zusammensetzung der Kapsel

Als Kapsel wird diejenige Membran bezeichnet, die die Zona pellucida ersetzt und den Embryo in der zweiten und dritten Woche der Trächtigkeit umgibt. Diese Zeit ist bekannt dafür, besonders risikoreich in Bezug auf Embryoverluste zu sein – sowohl unter natürlichen Umständen als auch bei einem Embryotransferprogramm (BETTERIDGE, 1989). Dass es sich bei der Kapsel nicht um eine verdickte Zona pellucida, sondern um eine eigenständige Struktur handelt, konnte mit Hilfe der Transmissionsmikroskopie, der *Scanning-electron-microscopy* sowie mittels physiochemischen und immunologischen Vergleichen sichergestellt werden (FLOOD et al., 1982; BETTERIDGE u. GUILLOMOT, 1982; BOUSQUET et al., 1987). Die Bildung der Kapsel erfolgt unabhängig von der Zona pellucida. Auch in ihrer Zusammensetzung unterscheidet sie sich von dieser (WILLADSEN et al., 1980; ALLEN u. PASHEN, 1984; BOUSQUET et al., 1987).

Die Kapsel ist eine azelluläre, transparente Schicht aus elastischem Material, die sich als dünne Schicht um die Blastozyste bildet bzw. sich der Zona pellucida von innen anschmiegt und bis Tag 21 eine Dicke von 34  $\mu\text{m}$  erreicht. Sie besteht aus zwei Hauptkomponenten: einer extrazellulären Matrix mit Kollagenstruktur und einer PAS-positiven, muzinartigen Glykoproteinschicht, die von Trophoblastzellen produziert wird. Eine Interaktion zwischen Endometrium und Trophoblasten spielt dabei keine Rolle (BETTERIDGE et al., 1982; BOUSQUET et al., 1987; BETTERIDGE, 1989; ORIOL et al., 1993a; ALBIHN et al., 2000). Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen die Kapsel konnte der Ursprung der Glykoproteine herausgefunden werden. Die Konzentration eines OC-1-reaktiven Antigens, welches im Trophoblasten präsent ist, steigt rapide bis Tag 17,5 und sinkt ab Tag 22,5 wieder ab. An Tag 24,5 ist die Antigenkonzentration nicht mehr messbar. Aufgrund der Tatsache, dass dieses Antigen weder im tragenden noch im nicht-tragenden Endometrium gefunden werden konnte, steht fest, dass die Kapsel-Glykoproteine hauptsächlich vom Trophoblasten sezerniert werden. Dies erfolgt abhängig von der Entwicklung der Blastozyste. Zusätzlich scheint das gleichzeitige Auftreten von Veränderungen in der Glykosylierung der Proteine und wichtiger Ereignisse der frühen Trächtigkeit eventuell entscheidend für das Überleben des Embryos zu sein (ORIOL et al., 1992). Aufgrund der Anwesenheit von mRNA des muzinen Gens MUC1 im Trophoblasten sowie im Endometrium sollte eine endometriale Beteiligung an der Kapselbildung jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden (GILLIES et al., 1999).

Muzine sind große, kohlenhydratreiche Glykoproteine, die eine Vielzahl an kurzkettigen Oligosacchariden enthalten. Die Glykoproteine sind vermutlich durch Vernetzung sehr formstabil, sodass sie der Kapsel eine enorme mechanische Stärke verleihen, welche einen Kollaps des Konzeptus verhindert. Die Produktion der kapsulären Glykoproteine ist vom Entwicklungszustand des Embryos abhängig. Sie steigt etwa ab Tag 11, erreicht ihren Höhepunkt an Tag 18 und sinkt dann bis Tag 22 wieder ab.

Zu diesem Zeitpunkt hat sich die Kapsel wieder zurückgebildet (ORIOLE et al., 1993a; ORIOLE, 1994). In den einzelnen Glykoproteinen ist eine hohe Konzentration an Sialinsäureresten enthalten. Diese erleichtern durch ihre negative Ladung die Migration des Embryos, indem sie die Adhäsion an das Endometrium durch die ladungsbedingte Abstoßung verhindern. Die Konzentration an Sialinsäure ist zunächst niedrig, sodass sie erst ab etwa Tag 13,5 messbar ist. Nach der Embryofixierung an Tag 16,5 sinkt die Konzentration deutlich ab. Daraus geht hervor, dass die kapsulären Glykoproteine zum Zeitpunkt der Embryofixierung ihren Bestandteil an Sialinsäure verlieren bzw. minimieren. Dies führt zu der Annahme, dass hohe Mengen an Sialinsäure eventuell einen Anti-Adhäsionseffekt haben, der mit der sinkenden Konzentration verloren geht und es so dem Embryo ermöglicht sich zu binden.

Mit Hilfe eines Vergleichs der kapsulären Expression von Kohlenhydraten vor und nach Fixierung kann die Glycanstruktur der Kapsel analysiert werden. Vor der Fixierung enthält die Kapsel ein sialisiertes Core Typ 1 O-linked Glycan, welches nach der Fixierung desialysiert ist – die Sialinsäure Neu5Ac ist nicht mehr vorhanden. Die funktionelle Rolle des Sialinsäureverlustes könnte darin bestehen, dass freigesetzte Saccharide mit dem Endometrium interagieren oder die Permeabilität der Kapsel gegenüber endometrial bzw. embryonal produzierten Substanzen verändert. Bei Embryonen, deren Trächtigkeit durch die Gabe von PGF<sub>2α</sub> abgebrochen wurde, blieb die Sialinsäurekonzentration konstant.

Daraus geht hervor, dass die Zusammensetzung der Kapsel und die Erhaltung der Trächtigkeit zusammenhängen und ein Fehler in der embryo-maternalen Kommunikation zum Embryonaltod führen kann (ORIOLE et al., 1992, 1993a,c; ORIOLE, 1994; QUINN et al., 2005; ARAR et al., 2007). Die Kapsel kann jedoch auch nach dem Embryonaltod noch ca. sieben Tage weiterbestehen (HINRICHS u. WATSON, 1988).

Einen großen Teil der kapsulären Kohlenhydrate machen Zucker, Sialinsäure, Galactose und N-Acetylgalactosamine aus, während N-Acetylglucosamine, Glucose und Mannose nur in kleinen Mengen vorkommen (ORIOLE et al., 1993b). Außerdem ist es möglich, dass die Kapsel, wie die Zona pellucida einiger anderer Spezies, während ihrer Wanderung uterine Proteine aufnimmt (ORIOLE et al., 1993a; STOUT et al., 2005).

Bei einem Vergleich der Kapsel des Pferdes (*E. caballus*) und der des Esels (*E. asinus*) konnten klare biochemische und entwicklungstechnische Gemeinsamkeiten festgestellt werden. Veränderungen der Kapselzusammensetzung im Laufe der Entwicklung stehen stets in Zusammenhang mit Veränderungen im Rahmen der Trächtigkeit (ORIOLE et al., 1993c).

Die Bildung der Kapsel ist nur zu einem ganz bestimmten Entwicklungszeitpunkt möglich. Nach manipulativer Entfernung der Kapsel zeigte sich, dass diese weder nachgebildet werden noch der Embryo ohne sie im Uterus überleben kann (STOUT et al., 2005).

Zwar konnte einst die Bildung der Kapsel bei *in vitro* kultivierten Morulae festgestellt werden (Skidmore et al 1989), diese Beobachtungen waren jedoch einzigartig und konnten nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, die *In-vitro*-Kultivierung von Morulastadien verdeutlicht, dass die Bildung der Kapsel trotz ansonsten normaler embryonaler Entwicklung und trotz des Schlupfes aus der Zona pellucida nicht möglich ist. Blastozysten, die bereits eine Kapsel haben, behalten diese jedoch auch *in vitro*. Bisektionierte Embryonen, die ihre Kapsel durch die Mikromanipulation verloren haben, sind nach dem Transfer in eine Empfängerstute anscheinend in der Lage, diese nachzubilden (SKIDMORE et al., 1989; MCKINNON et al., 1989; HOCHI et al., 1995a). Die Trophoblasten produzieren zwar *in vitro* kapsuläres Material, dieses wird jedoch nicht zur Kapsel zusammengesetzt (TREMOLÉDA et al., 2003). Vermutlich müssen die von den Trophoblastzellen produzierten Materialien nach ihrer Sezernierung erst durch Querverbindungen modifiziert werden, um zur Entstehung der Kapsel beizutragen. Diese Vorgänge scheinen *in vitro* jedoch bisher nicht möglich zu sein (ORIOLE et al., 1993a).

Die Kapsel wird oft im Vergleich mit der Neozona des Kaninchens betrachtet. Neben der Erscheinung sind auch die physikalischen Eigenschaften ähnlich. Zwar ist die Kapsel des Pferdeembryos dicker, beide sind jedoch in der Lage, ihre Form trotz der Schrumpfung der Blastozyste im Innern zu erhalten. Die Antigene auf der equinen Kapsel unterscheiden sich jedoch von denjenigen auf der Neozona des Kaninchens, sodass keine immunologischen Kreuzreaktionen zwischen Anti-Kapsel-Serum und Kaninchenmaterial gefunden werden konnten (BOUSQUET et al., 1987).

Die Kapsel durchläuft während der Fixierung einen schnellen Wechsel in der Proteinzusammensetzung. Es ist wichtig zu erfahren, inwiefern sich die Fähigkeit der Kapsel in Bezug auf die Bindung, Produktion oder Veränderung dieser Proteine ändert und inwieweit diese Veränderungen die Einnistung beeinflussen (QUINN et al., 2005).

### **2.5.2. Funktion der Kapsel**

Es gibt bis zum heutigen Tag viele unterschiedliche Spekulationen über die Funktion der Kapsel. Sie erhält die kugelige Form des Embryos und bietet ihm physische Stabilität während der Uteruspassage, die mit dem Abstieg in den Uterus an Tag 6 beginnt und bis zur Fixierung an Tag 17 andauert. Sinn und Zweck dieser Wanderung ist die embryo-maternale Trächtigkeitserkennung. Die Kapsel sorgt währenddessen für die Ernährung des Embryos, indem sie an ihrer durch negative elektrische Ladung klebrigen Oberfläche Proteine und andere von den Uterindrüsen sezernierte Bestandteile, die sogenannte Uterinmilch, sammelt (AMOROSO, 1952; ORIOLE et al., 1993b; ALLEN u. STEWART, 2001). Die embryonalen Zellen sind selbst im fortgeschrittenen Entwicklungsstadium noch durch die Kapsel von den Zellen des Endometriums getrennt. Daher muss ein erheblicher Stoffwechsel durch die Kapsel hindurch möglich sein, um dem Embryo die nötigen Nährstoffe zukommen zu lassen (BETTERIDGE, 1989).

Die Kapsel ist frei permeabel für Meerrettich-Peroxidase mit einem Molekulargewicht von 45 kDa bzw. Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes Immunglobulin (IgG) mit einem Molekulargewicht von 200 kDa. Die Diffusion von Ferritin (450 kDa) und kationischem Ferritin ist aber nicht möglich. Die Durchlässigkeit ist also von der Molekülgröße sowie der chemischen Natur der Moleküle abhängig (GUILLOMOT u. BETTERIDGE, 1984). Das Gewicht der Kapsel steigt etwa ab Tag 11 an und erreicht sein Maximum an Tag 18 (ORIOLE et al., 1993a).

Eine der wichtigsten Aufgaben der Kapsel ist ihre Schutzfunktion. So schützt sie den Embryo während der mobilen Phase zwischen Tag 10 – 16 vor dem bei Uteruskontraktionen herrschenden Druck. Die Uteruskontraktionen sind für seine Mobilität verantwortlich und daher wichtig für die Trächtigkeitserkennung (GINTHER, 1984). Durch ihre außerordentliche mechanische Stärke und Widerstandsfähigkeit gegenüber chemischen und enzymatischen Lösungen konnte sie bisher nur durch Trypsin und Na-Borohydrid aufgelöst werden. Kollagenase Typ II macht die Kapsel zwar weicher, klebriger und flexibler, kann sie jedoch nicht auflösen (BOUSQUET et al., 1987). Aufgrund ihrer Resistenz gegenüber Rupturen kann sie auf die Hälfte ihrer Größe reduziert werden ohne zu reißen. Dies ist gerade beim Spülvorgang im Rahmen eines Embryotransferprogrammes von großer Bedeutung, da der Embryo infolge der Kapsel elastizität nicht so einfach beschädigt werden kann. Bei Vorhandensein eines kleinen Defektes reißt sie jedoch schnell und neigt dazu, sich an den Enden einzurollen (BOUSQUET et al., 1987). Eine weitere Funktion der Kapsel ist die Infektabwehr (BETTERIDGE, 1989; GRIFFIN u. GINTHER, 1993; ORIOLE et al., 1993a; ORIOLE, 1994). Einerseits schützt sie den Trophoblasten vor dem Eindringen von Bakterien, andererseits besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass sie als Reservoir für Bakterien im Uterus fungiert, welche sich an ihre klebrige Oberfläche heften (ORIOLE, 1994).

Aufgrund einer hohen Konzentration an negativ geladenen Sialinsäureresten in den einzelnen Glykoproteinen hat die Kapsel einen Anti-Adhäsionseffekt, durch den die Migration des Embryos erleichtert wird. Ab Tag 16 verringert sich diese Sialinsäurekonzentration jedoch, die Kapsel wird „klebrig“ und der Anti-Adhäsionseffekt verschwindet. Der Embryo wird fixiert. Dieser Vorgang weist auf einen entwicklungsabhängigen Regulationsmechanismus hin (ORIOLE et al., 1993a; STOUT et al., 2005). Der Verlust der Sialinsäure in der Kapsel scheint in direkter Beziehung zu einer erfolgreichen Fixierung des Embryos zu stehen und somit entscheidend zur Aufrechterhaltung der Trächtigkeit beizutragen (ARAR et al., 2007). Eine Prostaglandin-induzierte Luteolyse reduziert die Desialysierung der Kapsel und verhindert die Fixierung (CHU et al., 1997).

Aufgrund der selektiven Bindung einiger Proteine an die Kapsel wird sie auch als „Mailbox“ bezeichnet, die verschiedene für den Embryo bzw. das Endometrium notwendige Substanzen abgibt. Sie fungiert also als Austauschplattform (HERRLER et al., 1998, 2000b; QUINN et al., 2007). So zum Beispiel bindet sie das vom Endometrium produzierte Uterocalin p19 an die Kapsel und gewährleistet die Abgabe von Lipiden an den Konzeptus.

Das embryonale IGF-BP3, welches vom Embryo ab Tag 10 sezerniert wird, sammelt sich ebenfalls in der Kapsel an und bindet IGF-3, der für die embryonale Entwicklung wichtig ist. Beide Proteine spielen also eine wichtige Rolle im feto-maternalen Dialog und tragen zur frühembryonalen Entwicklung bei (STEWART et al., 1995a; CROSSETT et al., 1996, 1998; STEWART et al., 2000; HERRLER et al., 2000a; SUIRE et al., 2001).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Kapsel für das Überleben und die Entwicklung equiner Embryonen während der frühen Gravidität unabdingbar ist und dass sie während der ersten drei Trächtigkeitswochen an der embryomaternalen Grenzfläche präsent ist (MCKINNON et al., 1989; HEAP, 1991). Aufgrund der Tatsache, dass in vitro kultivierte Embryonen auch nach dem Schlupf aus der Zona pellucida bzw. aus der Kapsel dennoch sphärisch weiterwachsen, ist ihre mechanische Schutzfunktion fraglich. Dennoch fungiert sie möglicherweise als Schutzbarriere gegen schädliche Umwelteinflüsse (HOCHI et al., 1994a). Außerdem hat sie die Aufgabe einer regulierenden Grenzfläche zwischen Trophoblast und Epithel und reguliert den Transfer sezernierter uteriner Substanzen zum Embryo, wie z.B. Uterocalin. Die Entstehung der Kapsel trägt außerdem eventuell aktiv zum Flüssigkeitseinstrom und damit zur Blastozystenexpansion bei (BETTERIDGE, 2007).

### 2.5.3. Bedeutung der Kapsel für die Biotechnik

Bis heute ist unklar, inwiefern die Qualität der Kapsel eine Rolle bei der Erhaltung der Trächtigkeit bzw. deren Verlust spielt (BETTERIDGE, 1989).

Die Entstehung der Kapsel wird aufgrund der ausbleibenden Perfusion der Kryoprotektiva als Ursache für die schlechten Ergebnisse der Kryokonservierung von über 300  $\mu\text{m}$  großen Embryonen diskutiert. Hinzu kommt, dass durch die Kapsel auch Mikromanipulationen am Embryo erschwert werden (HUHTINEN et al., 1997b; HOCHI, 1998). Setzt man Embryonen hypertonen Medien wie z.B. Kryoprotektiva aus, so reagieren kleinere Blastozysten (300  $\mu\text{m}$ ) mit einer schnellen Schrumpfung aufgrund des Wasserausstromes entlang des Konzentrationsgradienten. Anschließend reexpandiert der Embryo infolge des einströmenden hypertonen Kryoprotektivums, welches wiederum Wasser nach sich zieht. Größere Embryonen (500 – 1000  $\mu\text{m}$ ) schrumpfen nur langsam und reexpandieren nicht (HOCHI et al., 1994d, 1995b). Die alters- bzw. größenabhängige Verhaltensänderung und Intoleranz gegenüber Kryoprotektiva wurde lange Zeit dem Vorhandensein der Kapsel zugeschrieben. Gegen diese Vermutung jedoch spricht die Tatsache, dass die Kapsel selbst für größere, neutrale Moleküle durchlässig ist. Gleichzeitig ist es vielleicht von entscheidender Bedeutung, dass diese Verhaltensänderung zu einem Zeitpunkt erfolgt, zu dem die Bildung des Endoderms abgeschlossen ist. Daher liegt der Verdacht nahe, dass vielmehr das Endoderm für den erhöhten Widerstand gegen den Wasserausstrom verantwortlich ist (GUILLOMOT u. BETTERIDGE, 1984; WAELCHLI u. BETTERIDGE, 1996; BETTERIDGE, 2007; CREWS et al., 2007).

#### 2.5.4. Abbau der Kapsel

Weder der genaue Zeitpunkt noch die Art und Weise, wie es zum Verlust der Kapsel kommt, konnte bisher genau ermittelt werden. Bei Spülungen an Tag 18 und 20 ist sie intakt, einige Tage später findet man nur noch Fragmente. Während der Bildung von Blutinseln im Dottersack ist sie noch vorhanden, doch nachdem die Choriovitellindurchblutung begonnen hat, sind nur noch Reste der Kapsel zu finden. Vermutlich geht sie um Tag 21 verloren (ENDERS u. LIU, 1991; BETTERIDGE, 2007). Etwa ab Tag 21 der Trächtigkeit beginnt die Kapsel, die mittlerweile eine Wandstärke von ca. 34  $\mu\text{m}$  erreicht hat, sich aufzulösen. Ausgelöst wird dies vermutlich durch von Trophoblastzellen bzw. Epithelzellen des Endometriums produzierten proteolytischen Enzymen (BETTERIDGE et al., 1982; DENKER et al., 1987; ORIOL et al., 1993b). Dieser Prozess ist jedoch unklar (DENKER, 2000).

Die Desialysierung des in der Kapsel enthaltenen Glycans trägt ebenfalls zum Abbau der Kapsel bei. Die Desialysierung von Typ 1 O-glycan in der embryonalen Kapsel ist nicht nur der erste Schritt des Kapselabbaus, sondern überschneidet sich mit der Immobilisation des Konzeptus im Uterus. Der Verlust der Sialinsäure in der Kapsel scheint in direkter Beziehung zu einer erfolgreichen Fixierung des Embryos zu stehen und somit entscheidend zur Aufrechterhaltung der Trächtigkeit beizutragen (ARAR et al., 2007). Durch eine Prostaglandin-induzierte Luteolyse wird die Desialysierung der Kapsel reduziert (CHU et al., 1997).

## 2.6. Biotechnologien in der equinen Reproduktion

### 2.6.1. Embryonensplitting

Immer mehr Krankheiten basieren auf einer genetischen Disposition. Da die Erforschung genetisch bedingter Krankheiten aufgrund der hohen Anzahl benötigter Versuchstiere sehr teuer ist, ist die Verwendung genetisch identischer eineiiger Zwillinge von großem Nutzen für die Wissenschaft. Ein Tier kann als Kontrolle, das andere als Versuchstier dienen (MCKINNON et al., 1989). Des Weiteren stellt dieses Verfahren eine Möglichkeit dar, die Embryogewinnungsrate bei der Stute zu verdoppeln (ALLEN, 2005). Eine Möglichkeit zur Herstellung monozygotischer Zwillinge ist das Embryonensplitting (Bisection) von Embryonen im Morula- bzw. frühen Blastozystenstadium. Die manuelle Halbierung von Embryonen ist hierbei schneller und einfacher durchzuführen als das Embryonensplitting mit Hilfe eines Mikromanipulators. Nach Halbierung der Embryonen unterscheiden sich die halbierten Embryonen bezogen auf Wachstum und Entwicklung nicht von unbehandelten Embryonen. Die Trächtigkeitsrate ist aber deutlich geringer. Die Lebensfähigkeit bisektionierter Embryonen liegt also deutlich unter der von ungeteilten Embryonen. Ursache dafür könnte die mangelhafte Fähigkeit zur Bildung des Trächtigkeitssignals bzw. zur Unterdrückung der Prostaglandinsynthese sein, die für die Erkennung der Trächtigkeit von entscheidender Bedeutung ist (MCKINNON et al., 1989).

Die Zweiteilung von Embryonen sollte möglichst im Morulastadium noch vor Entwicklung der ICM sowie der Kapsel erfolgen, da die Wahrscheinlichkeit, Schäden zu verursachen, mit steigender Größe zunimmt (ALLEN, 2005).

Aufgrund der Kapsel弹astizität ist das Embryonensplitting von Blastozysten schwierig. Dies manifestiert sich auch in den Trächtigkeitsraten. Während nach Transfer bisektionierter Morulae Trächtigkeitsraten von 67 % erreicht wurden, blieben Trächtigkeiten nach Transfer bisektionierter Blastozysten aus. Das liegt daran, dass die bereits differenzierte ICM im Blastozystenstadium empfindlicher gegenüber physikalischen Beeinträchtigungen ist als die undifferenzierte Zellmasse des Morulastadiums. Hinzu kommt, dass durch das Ausbleiben der Kapselerneuerung der equinen, bisektionierten Blastozyste der Schutz vor weiteren Beeinträchtigungen im Uterus fehlt (SKIDMORE et al., 1989; MÜLLER u. CIKRYT, 1989).

Durch Zweiteilung entstandene monozygotische Embryonen können ebenfalls übertragen werden. Die etwa 1 – 3 Tage nach der Ovulation chirurgisch aus dem Eileiter der Stute gewonnenen Embryonen werden in einzelne Blastomeren zerlegt und anschließend paarweise in die leere Zona pellucida von Oozyten geschlachteter Sauen übertragen. In Agar eingebettet werden diese „Embryonen“ in ligierten Eileitern von Schafen in vivo kultiviert. Der Agar dient hierbei zum Abdichten der Defekte in der Zona pellucida und somit zum Schutz des Embryos vor Uterussekreten bzw. Leukozyten. Dies ist solange nötig, bis der Embryo ohne die Zona pellucida im Uterus überleben kann. Nach etwa 3,5 – 5 Tagen haben sie das späte Morula- bzw. frühe Blastozystenstadium erreicht und können nach Entfernung des Agars in eine Empfängerstute übertragen werden (Abb. 2.4). Dabei ist die Trächtigkeitsrate (42 %) höher, wenn Spender- und Empfängerstute nicht identisch sind und die Empfängerstute 24 Stunden nach der Spenderstute ovuliert hat (ALLEN u. PASHEN, 1984; ALLEN, 2005).

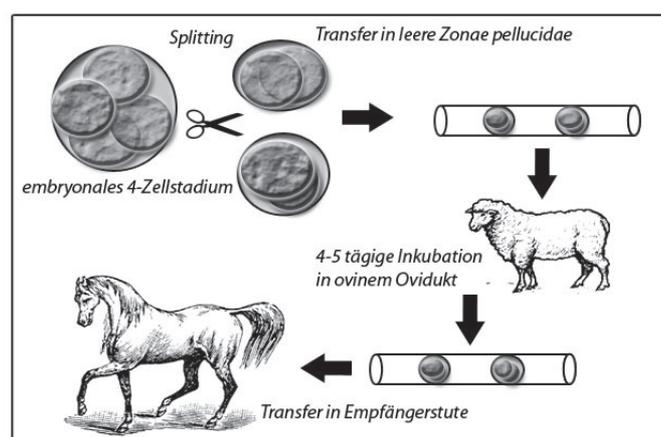


Abb. 2.4.: Verfahren der Zweiteilung. Nach manueller Zweiteilung eines equinen Embryos werden die Embryohälften in porcine Zonae pellucidae verbracht und in den Eileiter eines Schafes eingesetzt. Nach einigen Tagen werden die entstandenen Blastozysten in eine Empfängerstute übertragen (modifiziert nach ALLEN 2005).

### 2.6.2. Biopsie

Durch Entnahme einer embryonalen Biopsie ist es möglich, genetisch vererbare Funktionsstörungen aufzudecken sowie phänotypische Eigenschaften durch Analyse von Verbindungen zwischen Genloci und erwünschten Eigenschaften zu verändern. Ein weiterer Vorteil ist neben der Präimplantationsdiagnostik equiner Embryonen die Geschlechtsdifferenzierung sowie die Selektion von Embryonen vor dem Transfer. Mit Hilfe der *Polymerase-Chain-Reaction* (PCR), durch welche die Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen möglich ist, können Gene embryonalen Materials und somit Träger von defekten Genen bzw. Krankheiten identifiziert werden. Die Eliminierung solcher Embryonen wäre finanziell von Vorteil und die Menge gesunder Nachkommen wertvoller Stuten könnte auf diese Weise erhöht werden.

Bei Entnahme der Biopsie sollte auf die Verwendung einer Nadel zur Aspiration embryonalen Materials verzichtet werden, da einerseits die Kapsel das Loch der Nadel blockiert und auf diese Weise die Aspiration verhindert und andererseits die Dichte der Blastomeren die Aspiration einzelner Zellen verhindert. Auf diese Weise durchgeführte Versuche führen zur Schädigung des Embryos. Stattdessen sollte eine Mikroklinge verwendet werden. Mit dieser ist es möglich, durch leichten Druck auf den Embryo und schneidende Bewegungen einen kleinen Teil des Embryos abzusondern. Hierbei wird nur ein Teil des Trophekto-derms abgesondert, die ICM bleibt unversehrt. Bevor anhand der gewonnenen Biopsie eine Geschlechtsdifferenzierung mittels PCR durchgeführt wird, wird diese zunächst bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die mittels PCR durchgeführte Geschlechtsdifferenzierung ist eine einfache, schnelle und kostengünstige Methode, die zuverlässige Resultate liefert. Nach Extraktion der DNA wird diese mittels PCR vervielfältigt und auf die An- bzw. Abwesenheit bestimmter, Y-chromosomspezifischer Sequenzen untersucht. Die An- bzw. Abwesenheit einer bestimmten Region auf dem SRY-Gen (Sex determining Region Y) bestimmt das Geschlecht.

Die Trächtigkeitsrate nach dem Transfer biopsierter Embryonen ist gering. Ein Grund hierfür ist vermutlich die Größe der Öffnung in der Zona pellucida bzw. in der Kapsel. Aufgrund der Tatsache, dass alle 6 – 7 Tage alten Embryonen von einer solchen umgeben sind, müsste zunächst eine teilweise Zerlegung der Zona pellucida (*Partial Zona Dissection – PZD*) erfolgen. Durch Ausübung von leichtem Druck von oben und darauf folgendem Squeezing könnten die durch das Loch quellenden Blastomeren mit Hilfe der Mikroklinge abgetrennt und zur Diagnostik verwendet werden (POMP et al., 1995; PEIPPO et al., 1995; HUHTINEN et al., 1997b).

Die Anwendung solcher Biotechnologien ermöglicht den vermehrten Nachwuchs selektierter Eltern zur Erhaltung der genetischen Vielfalt sowie zur Verminderung des Generationsintervalles (POMP et al., 1995; ANDRABI u. MAXWELL, 2007). Allerdings erfordert diese Methode große Geschicklichkeit des Operateurs und es besteht die Gefahr, dass durch diese invasive Technik die Integrität der Zona pellucida bzw. der Kapsel gestört und die Lebensfähigkeit des Embryos verringert wird.

Bislang wird diese Technik nur in kleinem Umfang angewendet, während die Geschlechtsbestimmung von Spermien bereits eine verbreitete Methode ist. Vermutlich wird sich dieser Sachverhalt in Zukunft zugunsten der pränatalen Embryodiagnostik ändern (MAPLETOFT u. HASLER, 2005).

### 2.6.3. Embryotransfer (ET)

Unter Embryotransfer versteht man die Gewinnung eines Embryos von einer Spenderstute und die anschließende Übertragung des gewonnenen Embryos in eine Empfängerstute (MCCUE et al., 2001). Obwohl das Pferd unter den ersten Arten war, die der künstlichen Besamung unterzogen wurden, so war es eines der letzten, bei dem der Embryotransfer eingeführt wurde (ALLEN, 2005). Der erste erfolgreiche Embryotransfer fand beim Pferd zwar schon 1972 statt, doch erst seit den 1980ern wird diese Methode in der Pferdezucht anerkannt (ALLEN u. ROWSON, 1972).

Die Methode des Embryotransfers ist die am weitesten verbreitete assistierte Reproduktionstechnik bei der Stute. Sie wird verwendet, um Fohlen von Turnierpferden, zweijährigen, zu alten oder (gynäkologisch) erkrankten Stuten zu erhalten, als auch um mehrere Fohlen pro Jahr von genetisch wertvollen Stuten zu gewinnen (SQUIRES u. SEIDEL, 1995). Dabei sollte aufgrund der geringeren Überlebensrate der Embryonen auf die Verwendung alter oder infertiler Stuten verzichtet werden (BALL et al., 1989).

Die Mehrheit der Zuchtverbände gestattet die Registrierung solcher Fohlen, die aus einem Embryotransfer hervorgegangen sind. Dennoch ist es empfehlenswert, sich vorher bezüglich der Bedingungen und Einschränkungen zu erkundigen. Oftmals wird ein Bluttest des Vaters, der Spender- und Empfängerstute sowie des Fohlens vorausgesetzt, um die Abstammung zu beweisen. Ebenso ist es möglich, dass die Anzahl registrierter Fohlen pro Jahr und Stute begrenzt ist (MCCUE et al., 2001).

#### 2.6.3.1. Methoden der Embryogewinnung

**Nicht-chirurgische Gewinnung** Bei dieser in der Regel verwendeten Embryogewinnungsmethode wird der Uterus der Spenderstute gespült. Besonders wichtig ist die gründliche Reinigung und Desinfizierung des Genital- und Afterbereiches der Stute zu Beginn, um eine Verunreinigung und damit das Eindringen von Keimen zu vermeiden. Mit sterilen Handschuhen sowie der Verwendung von sterilem Gleitgel führt der Untersucher den sterilen Spülkatheter transzervikal in die Gebärmutter ein. Dank der geraden und leicht dehnbaren Zervix selbst im Diöstrus sind manipulative Prozesse dieser Art einfach (ALLEN, 2005). Anschließend werden je nach Art des Katheters zwischen 50 und 100 ml Luft in den Ballon, der sich vor dem inneren Muttermund befindet, verbracht. Der Ballon wird soweit zurückgezogen, bis er gut am Muttermund fixiert ist, sodass keine Spülflüssigkeit verloren gehen kann.

Daraufhin wird die Spülflüssigkeit durch einen Trichter am Schlauchsystem, welches mit dem Spülkatheter verbunden ist, in den Uterus imbibiert. Die Menge (1 – 2 Liter) und Art der Spülflüssigkeit ist je nach Spülprotokoll unterschiedlich. In Abb. 2.5 ist die Methode der nicht-chirurgischen Embryogewinnung dargestellt.

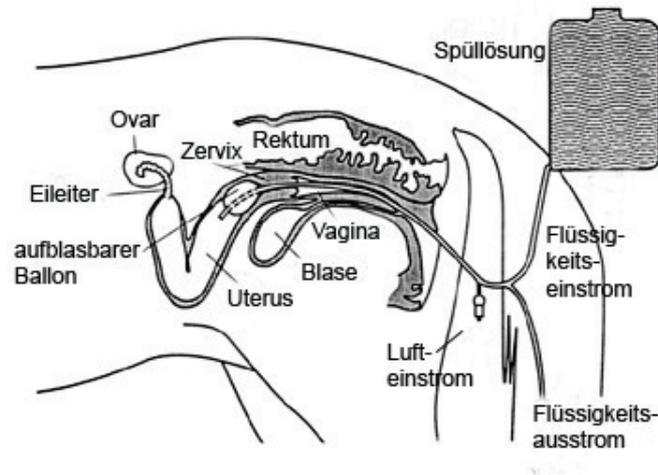


Abb. 2.5.: Technik der nicht-chirurgischen Embryogewinnung (modifiziert nach AGUILAR and WOODS 1997).

Der Embryo, der sich zu diesem Zeitpunkt auf seiner Wanderung durch den Uterus befindet (Tag 6 – 16), soll auf diese Weise von der Spülflüssigkeit erfasst werden. Wenn man die Spülflüssigkeit für 3 Minuten im Uterus belässt, steigt die Embryogewinnungsrate deutlich an (z.T. >100 %). Dies liegt daran, dass der Embryo aufgrund seiner Motilität durch den gesamten Uterus wandert und dadurch während einer Zeitspanne von 3 Minuten mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Flüssigkeit stößt und von dieser mitgerissen wird (HINRICHS, 1990). Durch Zusatz eines Proteins wie z.B. fetales Kälberserum oder bovines Serumalbumin zum Spülmedium wird die Anhaftung des Embryos an das Silikon oder Plastik des Spülsystems verhindert. Dadurch kann nicht nur die Spülrate erhöht, sondern auch die Gefahr einer Schädigung durch das Haftenbleiben des Embryos im Spülsystem reduziert werden (STOUT, 2006). Auch eine Massage der Gebärmutter von rektal, durch welche sowohl der Uteruskörper als auch die Uterushörner gespült werden, ist möglich (ALLEN, 2005). Anschließend wird die Flüssigkeit der Schwerkraft folgend abgelassen. Dieser Spülprozess wird in der Regel dreimal wiederholt. Vor dem letzten Ablassen der Flüssigkeit kann Oxytocin (i.v.) verabreicht werden. Die dadurch hervorgerufene Uteruskontraktion soll die vollständige Entfernung der Flüssigkeit aus der Gebärmutter unterstützen und die Embryogewinnungsrate erhöhen (JASKO, 2002; ALLEN, 2005). Nach der letzten Spülung wird die Luft aus dem Ballon und der Katheter aus der Gebärmutter entfernt. Abschließend wird der Ano-Genitalbereich der Stute gesäubert. Je nach Alter und Größe des Embryos ist dieser mit bloßem Auge in der Spülflüssigkeit zu erkennen.

Die Flüssigkeit wird gefiltert und der Embryo wird mit Hilfe eines Mikroskopes in der gefilterten Flüssigkeit aufgesucht und morphologisch beurteilt.

Der Zeitpunkt der Gewinnung hängt davon ab, für welche Zwecke die Embryonen gewonnen werden. Aufgrund des geringen Einfriererfolges größerer Embryonen sollten zum Einfrieren kleinere Embryonen (Tag 6, <300  $\mu\text{m}$ ) verwendet werden. Da jedoch die Wahrscheinlichkeit, dass die Embryonen bereits in den Uterus abgestiegen sind, zu einem späteren Zeitpunkt höher ist (BATTUT et al., 1998) und sie daher leichter zu finden sind, werden die meisten Spülungen an Tag 7 oder 8 nach der Ovulation (Tag 0) durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt hat der Embryo das expandierte Blastozystenstadium erreicht und misst in der Regel >300  $\mu\text{m}$  im Durchmesser (ALLEN, 2005). Mit steigendem Alter der Embryonen steigt folglich die Wahrscheinlichkeit einer guten Spülrate an (LAGNEAUX u. PALMER, 1991). Allerdings sind Embryonen, die  $\geq 9$  Tage alt sind, anfälliger für manipulationsbedingte Schäden (MCKINNON u. SQUIRES, 1988b; CARNEVALE et al., 2000b; STOUT, 2006). Bei der Gewinnung kleinerer Embryonen (Tag 6) zum Zweck des Einfrierens oder der Bisection ist die Spülrate geringer, da der Embryo oftmals noch nicht den Uterus erreicht hat (MCKINNON et al., 1989; SKIDMORE et al., 1989; CARNEVALE et al., 2004a; ALLEN, 2005). Die Embryogewinnungsrate bei Spülungen an Tag 7 oder später liegt zwischen 55 – 80 %. Da die Trächtigkeitsrate an Tag 14 deutlich höher liegt, verbleiben offensichtlich einige Embryonen beim Spülvorgang ungewollt im Uterus (HINRICHS, 1990).

Eine gute Spülrate ist von vielen Faktoren wie z.B. dem Alter und der Fruchtbarkeit der Stute, der Samenqualität, dem Tag der Gewinnung oder der Zahl der Ovulationen abhängig. Mit zunehmendem Alter der Spenderstute sinkt der Erfolg der Embryogewinnung (MCCUE et al., 2001). Weitere Einflussfaktoren auf die Spülrate sind neben dem reproduktionsphysiologischen Zustand der Stute auch der Zustand des Samens (frisch/gekühlt/tiefgefroren). Jüngere Stuten weisen bei Verwendung von Frischsamen eine deutlich höhere Embryonenausbeute auf, als nach Verwendung von gekühltem oder tiefgefrorenem Samen. Die Kombination einer alten Stute mit tiefgefrorenem Sperma erzielt dementsprechend keine gute Spülrate (MEADOWS et al., 1999). Auch die Spülfrequenz kann Einfluss auf die Spülrate haben. Das Risiko einer Endometritis steigt mit zunehmender Spülfrequenz und die Bildung chronisch entzündlicher Veränderungen ohne infektiöse Komponente ist möglich (CARNEVALE, 2008). Die am besten geeigneten Spenderstuten sind reife und gynäkologisch gesunde Stuten. Die Embryogewinnungsrate alter oder unreifer Stuten (<3 Jahre), sowie diejenige subfertiler Stuten oder Stuten mit einem entzündeten/infizierten/fibrotischen Uterus ist deutlich geringer (15 – 20 %) als die Embryogewinnungsrate gesunder und fertiler Stuten (75 %) (MCCUE et al., 2001). Sogar die Verwendung zweijähriger Stuten weist gute Ergebnisse auf und hat keinen negativen Effekt auf die spätere Reproduktionseffizienz (CAMILLO et al., 2000).

**Chirurgische Gewinnung** Ein bis sechs Tage nach Ovulation wird die Donorstute unter Vollnarkose auf dem Rücken mit leicht schräg abwärts gerichtetem Kopf auf dem OP-Tisch positioniert. Nach einem Schnitt zwischen Bauchnabel und Milchdrüse wird das Ovar mit dem Corpus luteum mitsamt dem dazugehörigen Uterushorn vorverlagert. Ein Schlauchsystem wird in das Uterushorn Richtung Ovar eingeführt und es wird eine Ligatur am Uterushorn gesetzt, sodass keine Flüssigkeit neben dem Schlauch vorbeilaufen kann. Mit Hilfe einer Spritze werden dann ca. 30 – 50 ml TCM-199 vom Ovar aus in den Eileiter Richtung Uterushorn injiziert. Durch das im Uterushorn platzierte Schlauchsystem wird die gespülte Flüssigkeit aufgefangen. Mit einem Stereomikroskop wird nun der Embryo in dieser Flüssigkeit aufgesucht. Anhand dieser Methode konnten von 30 Stuten 23 befruchtete Eizellen gewonnen werden (77 %) (ALLEN u. ROWSON, 1975). Diese Methode wird heute nicht mehr angewendet, da sie nicht nur mit einem höheren Aufwand sowie höheren Kosten, sondern auch mit einem erhöhten Risiko für die Stute verbunden ist.

### 2.6.3.2. Spülmedien

Die Wahl des Spülmediums und seiner Zusätze ist von Protokoll zu Protokoll unterschiedlich. Im Laufe der letzten Jahrzehnte sind die unterschiedlichsten Medien ausprobiert und eine große Breite an Spülraten erreicht worden. Bei einem Vergleich zwischen Ringerlaktat und Phosphate Buffered Saline (PBS) zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Spül- bzw. Trächtigkeitsraten.

Um ein Haften des Embryos am Silikon- oder Plastikschauch zu verhindern, wird dem PBS fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt. Dies hat keinen Einfluss auf die Spülrate. Diese steigt jedoch von 55 % auf 75 %, nachdem das Spülmedium für 3 Minuten im Uterus belassen wird (HINRICHS, 1990; ALVARENGA et al., 1993; STOUT, 2006).

### 2.6.3.3. Methoden der Übertragung

Zum Transfer des gewonnenen Embryos von der Spenderstute in die Empfängerstute gibt es folgende Möglichkeiten: 1. den Direkttransfer, bei dem die Übertragung des Embryos innerhalb der nächsten beiden Stunden nach der Gewinnung erfolgen sollte, 2. die Kühlung des Embryos mit anschließendem Transport zur Empfängerstute und 3. das Einfrieren des Embryos, sofern keine zyklussynchrone Empfängerstute zur Verfügung steht. Unabhängig davon, ob Embryonen sofort nach der Gewinnung übertragen werden oder zunächst gekühlt und/oder zum Ort der Übertragung transportiert werden müssen, kann der Transfer chirurgisch oder nicht-chirurgisch erfolgen. Die Trächtigkeitsraten weisen hierbei keine großen Unterschiede auf.

Obwohl der Embryotransfer eine wertvolle Technik darstellt, bleibt seine Effizienz aufgrund der begrenzten Möglichkeit der Superovulationsinduktion limitiert (VANDERWALL, 2000). Der Erfolg des Transfers ist unter anderem von der Bereitstellung einer geeigneten Empfängerstute abhängig, die einen Tag vor bis maximal drei Tage nach der Spenderstute ovuliert haben sollte, um dem Embryo ein geeignetes Gebärmuttermilieu bieten zu können. Idealerweise hat sie 1 – 2 Tage nach der Spenderstute ovuliert (McCUE et al., 2001).

**Nicht-chirurgische Übertragung** Die nicht-chirurgische Übertragung ist schneller, kostengünstiger und besser für das Wohlergehen der Stute (STOUT, 2006). Sie findet im Untersuchungsstand statt. Die Stute wird gegebenenfalls sediert und der Genitalbereich gründlich gereinigt und desinfiziert. Der Operateur verwendet einen sterilen Handschuh und steriles Gleitgel. Der Embryo befindet sich, eingebettet in ein entsprechendes Medium, in einer 0,25- oder 0,5 ml-Paillette. Die Wahl der Paillettengröße ist vom Operateur sowie von der Embryogröße abhängig. Mit Hilfe eines sterilen Transferinstruments wird der Embryo transzervikal übertragen. Als Transferinstrument kann eine sterile Standard-Besamungspipette, eine wegwerfbare Plastik-Besamungspipette oder eine wiederverwendbare, rostfreie Besamungspipette aus Stahl verwendet werden. Es gibt auch spezielle Embryotransferpipetten (Firma Minitüb). Unabhängig davon, für welches Instrument man sich entscheidet, wird eine Schutzhülle über das Transferinstrument gezogen. Dies gewährleistet, dass das Transferinstrument steril in den Uterus gelangt und somit das Verunreinigungsrisiko minimiert wird. Die Spitze des Transferinstruments bzw. der Schutzhülle liegt in der Handfläche und wird vom Daumen bedeckt. Auf diese Weise können Verletzungen verhindert werden. Das Instrument samt seiner Schutzhülle wird durch die Scheide bis etwa 0,5 cm durch den äußeren Muttermund geschoben. Dann wird das Transferinstrument vorsichtig durch die Spitze der Schutzhülle hindurchgestoßen und weiter in die Gebärmutter geschoben. Die Positionierung des Embryos kann sowohl in den Uteruskörper, als auch in eines der Hörner erfolgen. Für eine Platzierung im Uterushorn ist es notwendig, das Instrument via rektaler Kontrolle zu lenken. Befindet sich das Instrument in gewünschter Position, so kann der Embryo unter Zurückziehen des Instrumentes übertragen werden.

Unabhängig von der Technik ist es das Wichtigste, dass der Embryo in den Uterus gelangt, ohne dass Verunreinigungen von Vulva, Vagina oder der Umgebung mit hineingelangen. Das Risiko eines zervikalen oder endometrialen Traumas muss so gering wie möglich gehalten werden (VANDERWALL, 2000; STOUT, 2006). Diese Prozedur kann auch mit Hilfe eines Spekulum erfolgen, sodass die Pipette mehr oder weniger unter Sichtkontrolle in den Uterus geschoben werden kann (WILSHER u. ALLEN, 2004a,b).

Obwohl 4 – 5 Tage nach dem Transfer die erste Trächtigkeitsuntersuchung erfolgt, kann ein definitiver Trächtigkeitsstatus erst nach 7 – 9 Tagen (Tag 15 – 17 nach Ovulation der Spenderstute) erfolgen. Weitere Kontrolluntersuchungen erfolgen an Tag 25, 35 sowie an Tag 50 (McCUE et al., 2001).

**Chirurgische Übertragung** Die chirurgische Methode ermöglicht eine behutsamere und kontrolliertere Übertragung des Embryos (STOUT et al., 2005). Diese Transfervariante kann sowohl am stehenden Tier durch Laparotomie der Flanke, also auch unter Vollnarkose durch eine Laparotomie an der Linea alba durchgeführt werden. Die Stute wird sediert und lokal anästhesiert. Das Uterushorn wird durch die Inzision an der Flanke hervorgelagert und mit einer scharfen Nadel punktiert. Das entstandene Punktionsloch wird mit einer Pinzette vergrößert. Der Embryo befindet sich zu diesem Zeitpunkt eingebettet in  $<250 \mu\text{l}$  eines Mediums in einem sterilen Übertragungsinstrument. Er wird mit Hilfe einer Pipette im Eileiter oder bei Erreichen des 16-Zellstadiums bzw. frühen Blastozystenstadiums, im Uterushorn deponiert. Dies sollte innerhalb von 20 – 55 Minuten nach der Gewinnung erfolgen. Anschließend wird das Uterushorn mit unvernähter Punktionsöffnung wieder in das Abdomen zurückgelagert und die Flankeninzision vernäht. Aufgrund der Mobilität des Embryos ist es unerheblich, in welches Horn der Embryo eingesetzt wird. Mit dieser Methode können eine Woche nach dem Transfer Trächtigkeitsraten von 70 – 75 % erreicht werden (ALLEN u. ROWSON, 1975; SQUIRES et al., 1999; VANDERWALL, 2000; ALLEN, 2005).

#### 2.6.3.4. Einflussfaktoren auf die Trächtigkeit

Aufgrund der vielen unterschiedlichen Entwicklungsphasen des Embryos von der Eizelle bis zum Fohlen gibt es sehr viele Faktoren, die auf eine erfolgreiche Trächtigkeit Einfluss nehmen können. Dazu zählen neben der Befruchtung, dem Uterusabstieg, der Uteruswanderung und der Fixierung auch die Bildung der plazentalen Hüllen und der Organe sowie die Entwicklung und das Wachstum des Embryos bzw. Fetus. Eine erfolgreiche Befruchtung hängt von einem guten Zyklusmanagement, dem richtigen Zeitpunkt der Besamung bzw. einer guten Samenqualität so wie einer reifen Eizelle ab. Der Zustand des Spermias beeinflusst die Trächtigkeitsrate insofern, als dass bei der Verwendung von gekühltem oder tiefgefrorenem Samen eine geringere Trächtigkeitsrate erreicht wird als bei der Verwendung von Frischsamen. Auch das Alter der Stute ist von Bedeutung. Während jüngere Stuten in der Regel besser aufnehmen, dauert bei älteren Stuten der Eileitertransport länger, die Entwicklung des Embryos ist langsamer und die Trächtigkeitsverluste sind mit 9 % höher als bei jüngeren Stuten mit  $<1 \%$  (MEADOWS et al., 1999). Je größer das Intervall zwischen Ovulation und Transfer und folglich je älter der Embryo ist, desto höher ist auch die Trächtigkeitsrate. Während sechs von acht übertragenen Embryonen, die zwischen Tag 4 und 6 nach der Ovulation gespült werden, zu einer Trächtigkeit führen, ist es nur einer von acht Embryonen zwischen Tag 1 und 3 (ALLEN u. ROWSON, 1975).

Einen weiteren Einfluss auf die Trächtigkeitsrate hat die Qualität des Embryos. So können morphologische Abnormalitäten unter Umständen zu verminderten Trächtigkeitsraten führen. Vermehrt morphologische Veränderungen treten zum Beispiel im Zusammenhang mit der Kühlung von Embryonen auf.

Darunter fallen neben dem Blastozoelekollaps mit zellulärer Separierung von der Zona pelucida bzw. der Kapsel auch die Vertiefung isolierter Trophoblastzellgebiete, vermehrt ausgestülpte Blastomeren, dunkle Zellen sowie die Separierung von Zellen und eine vermehrt granulär erscheinende Oberflächenstruktur. Während ein Blastozoelekollaps eher bei kleineren Embryonen (<300  $\mu\text{m}$ ) auftritt, sind Vertiefungen isolierter Trophoblastzellabschnitte eher bei größeren Embryonen (>600  $\mu\text{m}$ ) vorhanden (MCKINNON u. SQUIRES, 1988a).

Bezogen auf den Transfer sind neben Management, Qualität und Ursprung des Embryos auch die Qualität und der physiologische Zustand (allgemeiner sowie speziell reproduktiver Gesundheitsstatus) der Empfängerstute, ein entsprechend gutes Management sowie die optimale Synchronität mit der Donorstute von großer Bedeutung. Optimalerweise ovuliert die Empfängerstute gleichzeitig mit oder aber nach der Spenderstute (0 – 3 Tage) (CAMILLO, 2008).

Ein weiterer Einflussfaktor ist der Gebärmuttertonus der Empfängerstute. So sind die Trächtigkeitsraten bei Stuten mit einem guten Tonus deutlich höher als bei solchen mit einem schlechten Tonus. Auch die Größe des Embryos spielt eine Rolle. So haben retardierte Embryonen eine geringere Lebensfähigkeit nach dem Transfer als nicht-retardierte Embryonen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass retardierte Embryonen einen höheren Anteil apoptotischer Zellen besitzen. Bei Erreichen eines bestimmten Grenzwertes apoptotischer Zellen wirkt sich dies auf die weitere Entwicklung des Embryos aus und führt gegebenenfalls zu einer Eliminierung dieses nicht-lebensfähigen Embryos (CARNEVALE et al., 2000b; MOUSSA et al., 2004b). Retardierte Embryonen gehen oftmals verloren. Je mehr sie zurückgeblieben sind, desto früher erfolgt dieser Verlust. Sind sie an Tag 14 noch nicht sonographisch erfassbar, so ist ihr Verlust vorprogrammiert. Bei Zwillingsträchtigkeiten geht auf diese Weise oft der kleinere Embryo verloren (NEWCOMBE, 2004).

#### **2.6.4. Gamete intrafallopian tube transfer (GIFT)**

Der Transfer der Eizelle in den Eileiter wird im Falle subfertiler Hengste verwendet bzw. um die Schwierigkeiten der In-vitro-Befruchtung (IVF) zu umgehen. Dabei wird via ultraschallgeleiteter transvaginaler Follikelpunktion (Ovum-pickup) von einer Donorstute eine reife Eizelle gewonnen. Diese Eizelle wird dann in die Fimbrien des Eileiters einer Empfängerstute injiziert, deren ipsilaterales Ovar einen reifen Follikel aufweist. Diese Stute sollte kurz vor diesem Prozess gedeckt oder besamt worden sein. Bei dieser Methode werden vor allem genetisch wertvolle Stuten als Spenderstuten verwendet, die unter physischen Abnormalitäten leiden. Hierunter fallen z.B. eine Obstruktion des Eileiters oder eine negative Beeinträchtigung des Uterus. Eine normale Befruchtung und Trächtigkeit der Donorstute ist unter diesen Umständen nicht möglich (ALLEN, 2005).

### 2.6.5. Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)

Die intrazytoplasmatische Injektion von Spermien wird vor allem in der Humanmedizin zur Behandlung männlicher Unfruchtbarkeit verwendet und setzt keine Kapazitation und Akrosomenreaktion der Spermien bzw. Beweglichkeit der injizierten Spermien voraus (HOCHI, 1998). Beim Pferd wird ICSI im Falle eines Hengstes mit einer verhältnismäßig geringen Spermienzahl bzw. bei limitierter Tiefgefriersamenmenge eines bereits toten Tieres angewendet. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die Gewinnung von Embryonen aus Stuten, die die Fähigkeit zur Embryonenproduktion ganz oder teilweise verloren haben (BARBACINI et al., 2008).

Grund für den vermehrten Nutzen von ICSI ist der bisher relativ limitierte Erfolg der In-vitro-Fertilisation (IVF) beim Pferd. Bei der Anwendung von ICSI wird die Spermienbindung an die Eizelle, deren Penetration sowie die Auslösung der Befruchtung umgangen. Stattdessen werden die Spermien, wie in Abb. 2.6 zu sehen ist, mittels eines Mikromanipulators direkt in das Cytoplasma der Metaphase-II-Eizelle (M-II) injiziert. Durch diesen Vorgang wird die Befruchtung ausgelöst. Bevor die produzierte Zygote in eine Empfängerstute übertragen wird, durchläuft sie in vitro einige Teilungsstadien bis hin zum Morula- oder frühen Blastozystenstadium. ICSI ist die effizienteste Methode der niedrig-dosierten Besamung, da nur ein einziges Spermium in die Eizelle injiziert wird. Außerdem wird ICSI zur Beurteilung von In-vitro-Reifungssystemen (IVM) von Eizellen, zur Erforschung der Befruchtung sowie zur Bereitstellung in vitro produzierter Embryonen für nachfolgende Studien verwendet (SQUIRES, 2005; ALLEN, 2005). Vorteil dieser Methode ist, dass das verwendete Spermatozoon in tiefgefrorenem oder aufgetautem Zustand vorliegen kann, ein bestimmtes Geschlecht haben oder sogar unbeweglich und schwanzlos sein kann (ALLEN, 2005).

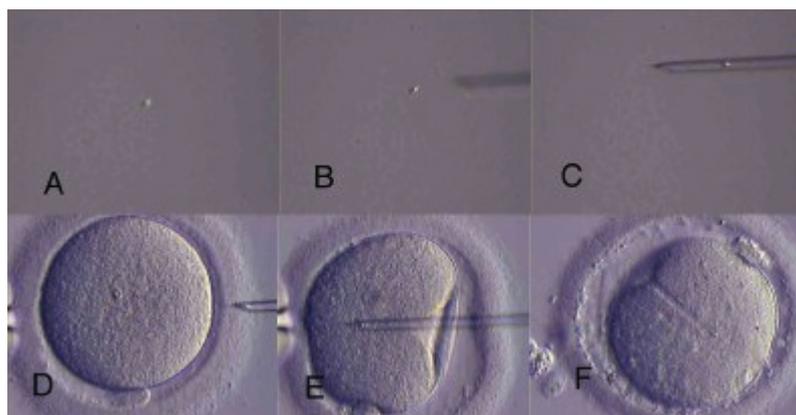


Abb. 2.6.: Intrazytoplasmatische Spermieninjektion. A. Spermienidentifikation, B. Trennung des Spermischwanzes, C. Aspiration des Spermiums in die Pipette, D. Fixierung der Eizelle von einer Seite mit Hilfe einer Pipette und Annäherung der Injektionspipette von der anderen Seite, E. Einführung der Injektionspipette und Durchstechung der Membran, F. Injektion des Spermiums und Zurückziehen der Pipette ([www.chuv.ch](http://www.chuv.ch))

### **2.6.6. Intrafollikuläre Insemination (IFI)**

Die Intrafollikuläre Insemination wird in der Humanmedizin erfolgreich angewendet. Diese Methode ermöglicht beim Pferd zum einen die Umgehung uteriner Entzündungen wie z.B. besamungsbedingte, persistierende Endometritiden, zum anderen ermöglicht sie die Verwendung einer geringen Spermienzahl. Unter transvaginaler Ultraschallkontrolle wird mit Hilfe einer Nadel ca. 9 – 13 Stunden vor der Ovulation das Sperma in den Follikel appliziert. Bislang konnten keine Trächtigkeiten erreicht werden. Grund dafür ist entweder eine zu geringe Spermienzahl, die Unfähigkeit der Spermien innerhalb der Follikelflüssigkeit an die Eizelle zu binden oder aber die nicht ausreichende Überlebensdauer der Spermien in diesem Milieu (MEINJTES et al., 2000).

### **2.6.7. In-vitro-Produktion (IVP)**

Aufgrund des noch immer geringen Erfolges der Superovulationsinduktion beim Pferd wird der Wunsch nach alternativen Methoden zur Embryoproduktion größer. Eine mögliche Alternative ist die IVP von Pferdeembryonen. Eine erfolgreiche IVP ist allerdings von einigen Faktoren, wie z.B. dem Vorhandensein gesunder Eizellen, effizienter und wiederholbarer Reifungsmethoden, physiologischer Kapazitationsmethoden der Spermien sowie optimaler Kulturbedingungen abhängig (GRONDAHL et al., 1995b). Bislang sind in vitro produzierte Pferdeembryonen qualitativ nicht zu vergleichen mit in vivo produzierten Embryonen. Sie sind klein und kompakt, weisen weniger Zellen auf, haben kaum Blastozoele und eine undeutliche ICM. Außerdem haben sie eine geringere morphologische Qualität sowie ein gehäuftes Auftreten von apoptotischen Zellen. Die Entwicklung ist abnormal und retardiert und es kommt aufgrund fehlender Glykoproteinaggregation nicht zur Kapselbildung, sodass der Embryo in vivo nicht überlebensfähig wäre (TREMOLERA et al., 2003).

Bisher können keine Trächtigkeiten von IVP-Embryonen, die aufgrund ihres fortgeschrittenen Entwicklungsstadiums direkt in den Uterus anstatt in den Eileiter übertragen wurden, verzeichnet werden (HOCHI, 1998).

#### **2.6.7.1. In-vitro-Reifung (IVM)**

Die IVP gestaltet sich schwierig, da die Gewinnung von Eizellen, Zygoten und frühen Teilstadien nur operativ bzw. aus Schlachthofpräparaten möglich ist (BETTERIDGE, 2007).

Die Gewinnung von Eizellen erfolgt operativ mittels transabdominaler Follikelpunktion (Ovum-Pickup) des präovulatorischen, dominanten Follikels oder aber per transvaginaler Follikelpunktion präovulatorischer bzw. unreifer Follikel unter Ultraschallkontrolle. Während die transabdominale Gewinnung nach hCG-induzierter Ovulation und Punktion präovulatorischer Follikel gute Eizellraten erzielt, ist die Punktion unreifer Follikel bzw. ohne hCG-Stimulation weniger ergiebig.

Die Ausbeute des transvaginalen *Ovum-Pickups* unreifer Follikel ist ebenfalls gering (VOGELSANG et al., 1983; PALMER et al., 1987; HINRICHS et al., 1990; BRÜCK et al., 1992; COOK et al., 1993; DUCHAMP et al., 1995; HINRICHS, 1998; CARNEVALE, 2008). Da die Gewinnung von Eizellen aus präovulatorischen Follikeln außerdem einfacher ist als aus unreifen Follikeln, wird die Eizelle ca. 20 Stunden nach Verabreichung von hCG, GnRH-Analagon oder equinem LH durch die Flanke oder transvaginal entnommen. Anschließend wird sie für weitere 12 bis 16 Stunden kultiviert, bevor sie in eine Empfängerstute übertragen wird (CARNEVALE, 2008b). Unreife Eizellen können erfolgreich bis zum Erreichen der M II kultiviert werden. Die nukleäre Reifung benötigt ca. 32 bis 36 Stunden (CHOI et al., 1993). Die geringe Eizellausbeute aus unreifen Follikeln liegt vermutlich an der engen Anheftung der Eizellen an die Follikelwand (HAWLEY et al., 1995), während die geringe Eizellzahl aus präovulatorischen Follikeln vermutlich in der Größe des Follikels begründet ist (BRÜCK et al., 1999).

Gewisse Vorkommnisse, die im Ovar für die Trächtigkeit notwendig sind, sind in vitro nicht reproduzierbar. Hierzu zählen neben der Polarität der Eizelle und des frühen Embryos auch die den Embryo umgebenden Hüllen, die sich abtrennende ICM sowie der Transport der befruchteten Eizelle durch den Eileiter in die Gebärmutter (BETTERIDGE, 2007). Die Übertragung in vivo gereifter Eizellen in den Eileiter einer Empfängerstute ist eine erfolgreiche Methode, während die Übertragung in-vitro gereifter Eizellen noch wenig erforscht ist (HINRICHS, 1998).

#### **2.6.7.2. In-vitro-Fertilisation (IVF)**

Bislang ist der Erfolg der In-vitro-Fertilisation limitiert. Dies liegt vermutlich daran, dass bisher kein effizientes Kapazitationssystem für Hengstsperma existiert und die Spermien Probleme haben, sich in vitro der Kapazitation zu unterziehen sowie die Zona pellucida der Eizelle zu durchdringen und diese zu befruchten. Ca-Ionophor A23187 hat noch den besten Effekt zur Auslösung der Kapazitation, gefolgt von Koffein, Hypotaurin und Heparin. Grundlegend für eine erfolgreiche IVF ist die Qualität von gereiften Eizellen. Die teilweise Entfernung der Zona pellucida (Partial Zona Removal – PZR) erhöht die Befruchtungsrate fast so wie die Verwendung von Eizellen, deren Zona pellucida vollständig entfernt ist (CHOI et al., 1994; HOCHI, 1998; ALLEN, 2005).

Eine weitere Ursache für den limitierten Erfolg ist die mangelhafte Gewinnung in vivo gereifter Eizellen durch *Ovum-pickup*. Grund hierfür ist die Größe des präovulatorischen Follikels bzw. die Anheftung der Eizelle an die Follikelwand. Die reduzierte In-vitro-Reifung von Eizellen aus Schlachthofpräparaten zum M-II-Stadium verhindert eine erfolgreiche IVF. Um diese Problematik zu umgehen, können sowohl ICSI als auch GIFT angewendet werden (ALLEN, 2005).

### 2.6.7.3. In-vitro-Kultivierung (IVC)

Aufgrund der schlechten IVF-Ergebnisse werden zur IVC meist bereits befruchtete Eizellen nach Gewinnung aus dem Ovar verwendet. Nach Kultur im Menezo's B2-Medium mit 15 % fetalem bovinem Serum konnten Teilungen vom Einzell- bis zum 14-Zellstadium erreicht werden (BEZARD et al., 1989). Die frühen Teilungsstadien werden von mütterlich vererbten Komponenten reguliert, die innerhalb der Eizelle abgespeichert sind. Die Aktivierung des väterlichen Genoms hingegen erfolgt erst etwa zum Zeitpunkt des Achtzellstadiums – gleichzeitig mit der Entwicklungsblockade des Embryos in vitro, mit der auch der Übergang von maternaler zu embryonaler Genomkontrolle erfolgt. Dieser Übergang entsteht durch den Verlust bzw. das Abklingen der mRNA-Moleküle maternalen Ursprungs, die Aktivierung der Transkription des embryonalen Genoms, den Entwicklungseinhalt durch Transkriptominhibitoren sowie durch qualitative Veränderungen des Proteinsynthesemusters (TELFORD et al., 1990; BALL et al., 1993a,b).

Durch Co-Kultivierung mit Eileiterepithel und 5 % CO<sub>2</sub> ist es möglich, Ein- oder Zweizellstadien bis hin zur Blastozyste zu kultivieren. Diese Form der Co-Kultivierung ermöglicht die Überwindung der Entwicklungsblockade und das Erreichen des Blastozystenstadiums (BALL et al., 1993a; HOCHI, 1998). Bei IVF- Embryonen beträgt die Teilungsrate der Eizellen nach 24 – 48 Stunden 25 %. Durch Anreicherung der modifizierten synthetischen Eileiterflüssigkeit (mSOF, modified synthetic oviduct fluid samt 0,1 % Polyvinylalkohol [PVA]) mit Glucose kann mit steigender Glucosekonzentration eine gesteigerte Embryonalentwicklung in vitro beobachtet werden. Morulastadien können sich jedoch nicht zur Blastozyste weiterentwickeln (ZHANG et al., 1990; AZUMA et al., 1995; GRONDAHL et al., 1995a; HOCHI, 1998).

### 2.6.8. Klonen

Unter Klonen versteht man heutzutage die künstliche Herstellung eines vollständigen Organismus oder wesentlicher Teile anhand der genetischen Information (DNA, Desoxyribonucleinsäure), die einem bereits existierenden Organismus entnommen wird. Ziel dieses Verfahrens ist vor allem die Erhaltung genetischen Materials individueller Tiere, die nicht auf eine andere Weise reproduziert werden können. Dazu gehören z.B. Wallache. Auch der emotionale Aspekt gewinnt mehr und mehr an Bedeutung. So entsteht bei immer mehr Tierbesitzern der Wunsch, das von ihnen liebgewonnene Haustier nach dessen Tod durch einen Klon zu ersetzen (VANDERWALL et al., 2006).

Für das reproduktive Klonen verwendet man heute vor allem die Methode des Nukleustransfers (siehe Abb. 2.7). Dabei wird eine Körperzelle von dem zu klonenden Spender tier entnommen und der Zellkern mit dem genetischen Material aus dieser Zelle isoliert. Anschließend wird dieser Zellkern in eine zuvor entkernte, in vitro befruchtete Eizelle des Empfängertieres eingesetzt.

Mit Hilfe eines Stromstoßes oder eines chemischen Stimulus wird die weitere Entwicklung angeregt. Da in der Eizelle des Empfängertieres Mitochondrien vorhanden sind, die eigene Erbinformationen enthalten, entsteht durch diese Methode kein genetisch vollkommen identischer Klon. Diesen erhält man nur, wenn die Spenderzelle und die Empfänger-Eizelle von ein und demselben Tier stammen (www.wikipedia.de).

Wie auch bei anderen Tierarten liegt der Erfolg des Klonens bei Equiden unter 3 % (lebende Fohlen). Dies liegt vermutlich am klonierungsbedingten Nachwuchssyndrom (cloned offspring syndrome), welches mit Embryontod, Abort und Totgeburt sowie verminderter neonataler Gesundheit einhergeht und vor allem bei Rindern und Schafen auftritt. Diese embryonalen, fetalen und plazentaren Entwicklungsabnormalitäten reflektieren die unvollständige bzw. abnormale genetische Reprogrammierung des Donorzellkerns. Von dieser fehlerhaften Reprogrammierung sind besonders die prägenden Gene betroffen. Nach Oozytenreifung bzw. Kultivierung von Embryonen *in vitro* können vermehrt Trächtigkeitsabnormalitäten beobachtet werden (VANDERWALL et al., 2004b, 2006). Während die Folgen dieser fehlerhaften genetischen Reprogrammierung bei Rindern und Schafen während der ganzen Trächtigkeit auftreten, ist dies beim Pferd nur während der frühen Trächtigkeit der Fall (<60 bis 80 Tage). Als Spenderzellen können neben fetalen Fibroblastzellen auch Cumuluszellen verwendet werden. Die embryonale Überlebensrate unterscheidet sich nicht. Allerdings übt der Zelldonor selbst einen Einfluss auf den Trächtigkeitserfolg aus (VANDERWALL et al., 2004a, 2006).

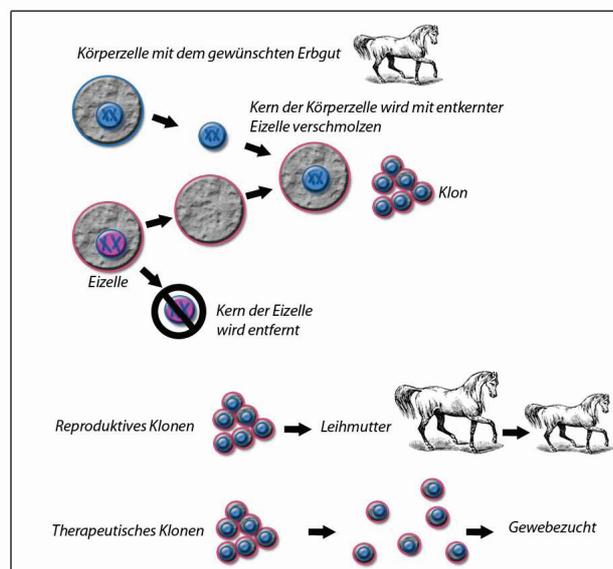


Abb. 2.7.: Übertragung des isolierten Zellkerns des Donortieres in die entkernte Eizelle des Empfängertieres.

### **2.6.9. Manipulation der Zona pellucida**

Bis heute ist der Erfolg von In-vitro-Fertilisationsversuchen gering. Dies liegt vermutlich an der mangelnden Fähigkeit der in vitro kapazitierten Spermien, die Cumuluszellen bzw. die Zona pellucida der Eizellen zu durchdringen (CHOI et al., 1994). Die Zona pellucida, die die Eizelle umgibt, agiert als Spezies-spezifische Spermienbarriere und ist in die Spermienbindung involviert. Darüberhinaus verhindert sie nach der Befruchtung der Eizelle die Polyspermie, schützt den Embryo während der frühembryonalen Phase und ist am Eileitertransport beteiligt. Nach der Befruchtung wird sie zunächst dicker, um ihren Aufgaben gerecht zu werden. Durch embryonal sezernierte Lysine wird sie schließlich abgebaut, sodass der Embryo schlüpfen kann (VOS u. STEIRTEGHEM, 2000).

Durch Mikromanipulation der Zona pellucida kann nicht nur das Eindringen des Spermiums in die Vitellinmembran, sondern auch der Schlupf des Embryos aus der Zona pellucida erleichtert werden. Dies ist besonders dann sinnvoll, wenn die Zona pellucida durch ovarielle Stimulation oder Kultivierung des Embryos verhärtet ist (CHOI et al., 1994; VOS u. STEIRTEGHEM, 2000; ANDRABI u. MAXWELL, 2007).

In der Humanmedizin beschäftigt man sich bereits seit Jahren mit verschiedenen Methoden, um die Zona pellucida zu öffnen und somit nicht nur subfertilen Spermien das Eindringen in die Eizelle zu erleichtern bzw. zu gewährleisten, sondern auch um den Schlupf aus der Zona pellucida zu erleichtern (COHEN et al., 1994; PAYNE et al., 1994).

#### **2.6.9.1. Partial Zona Removal (PZR), Partial Zona Dissection (PZD)**

Bei der teilweisen Entfernung der Zona pellucida wird die Eizelle in proteinfreies PBS übertragen, um sie auf dem Grund der Petrischale fixieren zu können. Anschließend wird ein Teil der Zona pellucida entfernt. Die Befruchtungsrate nach PZR (54 %) steigt gegenüber der Befruchtungsrate von Eizellen mit intakter Zona (4 %) bzw. von Eizellen, deren Zona pellucida nur teilweise zerlegt wurde, deutlich an (12 %), ist aber geringer als die Rate von Eizellen, die keine Zona mehr besitzen (86 %). Dies liegt vermutlich daran, dass die Spermien nach PZR die Zona pellucida leichter überwinden können als nach PZD. Die Polyspermie-Rate liegt mit 42 % unter der von Zona-freien Eizellen (66 %). Dies bedeutet, dass die Mehrzahl der Spermatozoen zum Perivitellinspalt vordringen konnte. Die PZR ist folglich eine wertvolle Methode um eine In-vitro-Befruchtung beim Pferd zu erreichen (CHOI et al., 1994).

Bei der teilweisen Zerlegung der Zona pellucida wird die Eizelle – wie auch bei der PZR – in PBS übertragen und so am Boden der Petrischale fixiert. Mittels einer Mikronadel aus Metall wird die Zona pellucida unter 100facher Vergrößerung zweifach durchstoßen und der zwischen den Einstichlöchern liegende Teil der Zona durch Reiben an einer Pinzette eröffnet, sodass ein kleiner Einschnitt zurückbleibt. Durch unterschiedliche Schnittgrößen bzw. Spermakonzentrationen können diese Ergebnisse jedoch verbessert werden (CHOI et al., 1994; VOS u. STEIRTEGHEM, 2000).

### 2.6.9.2. Zona Drilling, Zona Splitting, Zona Thinning

Das Aufbohren der Zona pellucida (Zona Drilling) ist ein chemischer Prozess. Dabei entsteht mit Hilfe einer mit saurem (pH 2,35) Tyrodes's Medium gefüllten Mikronadel eine Öffnung in der Zona pellucida. Das Medium verteilt sich behutsam über eine Fläche von 30  $\mu\text{m}$ , während die Nadel nah an die Zona gehalten wird, bis eine Öffnung entsteht. Dabei sollte nicht zuviel Medium an eine Stelle gelangen. Anschließend muss der Embryo gewaschen werden, da das Tyrode's Medium embryotoxisch ist und die Lebensfähigkeit des Embryos beeinträchtigen kann. Wird diese Methode während der Teilungsphase in Kombination mit anschließender Kultur angewendet, so steigert dies den Schlupfprozess.

Beim Aufschlitzen der Zona (Zona splitting) wird ähnlich wie bei der PZD ein kleiner Schnitt an der Zona pellucida durchgeführt. Bei der Ausdünnung der Zona pellucida (Zona Thinning) wird ebenfalls Tyrode's Medium verwendet. Allerdings wird weniger Lösung benötigt und sie wird in biaxialer Richtung angewendet, um eine kreuzförmige Ausdünnung zu erreichen – ohne jedoch ein Loch zu verursachen. Da das Medium den Perivitellinspalt nicht erreicht, besteht keine Gefahr für die Lebensfähigkeit der Embryonen und die Schutzfunktion der Zona pellucida bleibt erhalten. Diese Methode ist sicher und effektiv und steigert die Effizienz des normalen Schlupfes (VOS u. STEIRTEGHEM, 2000).

### 2.6.9.3. Laserbehandlung der Zona pellucida

Zweck dieses Vorgehens ist unter anderem die Entnahme des Polkörperchens zur genetischen Analyse (Präferilisationsdiagnostik). Mit dieser Methode können genetische oder chromosomale Funktionsstörungen wie z.B. Mutationen noch vor der Befruchtung in Eizellen entdeckt werden. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Laserquellen ausprobiert. Dazu gehören:

1. Die „Kontaktmethode“, bei dem der Laserstrahl durch eine optische Faser geleitet wird. Hierbei wurden unterschiedliche Laser mit verschiedenen Wellenlängen ausprobiert. Neben dem Argon Fluorid Laser mit 193 nm Wellenlänge wurden auch der Nd:YAG Laser mit 1,064 nm und der Er:YAG-Laser mit 2,940 nm Wellenlänge getestet. Letzterer ist ein effektives Gerät um reproduzierbare und präzise Öffnungen in der Zona zu erzielen. Nachteil dieser Methoden ist die Notwendigkeit einer Glaspipette sowie einer optischen Faser. Die Anfertigung und Sterilisation von Pipetten und Fasern bedeutet einen großen Arbeitsaufwand. Außerdem können die Laserstrahlen aufgrund ihrer Wellenlänge nicht durch Glas geleitet und folglich nicht an ein konventionelles Mikroskop angeschlossen werden, sodass spezielle Kapillaren für den Lichttransport benötigt werden.

2. Die „Nicht-Kontaktmethode“, bei welcher der Laserstrahl durch eine optische Linse auf die Probe fokussiert wird. Hierbei sind keine Hilfsmittel für das Halten oder Schneiden notwendig, es muss kein Druck auf die Probe ausgeübt werden und es entsteht kein Gewebeschaden. Die Laserstrahlbreite ist mit  $<1 \mu\text{m}$  sehr präzise.

Auch bei dieser Methode wurden verschiedene Laser ausprobiert. Darunter fallen zum einen der Xenon-Chlorid-Kaltlichtlaser mit 308 nm, der Krypton-Fluorid-Laser mit 248 nm, sowie der PALM UV-A-Nitrogen-Laser mit 337 nm.

Infrarotstrahlen sind dann besser geeignet, wenn mutagene Risiken einkalkuliert werden müssen. Die Anwendung des 2,48- $\mu\text{m}$ -Diodenlasers (Krypton Fluorid Laser) ermöglicht eine schnelle, präzise und leicht zu kontrollierende Auflösung der Zona pellucida, indem diese dem Laserlicht ausgesetzt wird. Durch Variation der Bestrahlungszeit kann die Größe des entstehenden Loches ausgewählt werden. In der Regel wird innerhalb von 12 – 30 ms ein Loch mit einer Größe von 20  $\mu\text{m}$  produziert. Da Laserstrahlen mit Wellenlängen im UV-C- und Infrarotbereich von der Probe absorbiert werden, ist sowohl eine DNA-Fraktionierung als auch eine Überhitzung möglich. Dies könnte einen negativen Einfluss auf die weitere Entwicklung des Embryos haben. Auch Laserbehandlungen in einem Wellenlängenbereich von UV-B führen zu einer Störung der Embryonalentwicklung. Dagegen haben Laserstrahlen im UV-A-Bereich keine Auswirkung auf die Probe und können daher ohne Bedenken als Schlupfhilfe verwendet werden. Zu dieser Laserkategorie gehört unter anderem der PALM-UV-A-Nitrogen Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm, einem Focus  $<1 \mu\text{m}$  im Durchmesser sowie einer hohen Strahlenqualität (VOS u. STEIRTEGHEM, 2000; CLEMENT-SENNEWALD et al., 2002).

#### **2.6.9.4. Piezo-Technologie**

Mit Hilfe von elektrischen Impulsen entsteht eine Vibration, durch welche ein präziser und kontrollierbarer Defekt in der Zona pellucida entsteht. Der Vorteil dieser Methode ist, dass keine embryotoxischen Chemikalien benötigt werden. Die Zona wird in einem begrenzten Gebiet in einem Durchmesser von ca. 30  $\mu\text{m}$  konisch eingeschnitten. Etwa 5 – 8 dieser Anwendungen sind notwendig um ein Drittel der Zona pellucida zu erfassen. Resultierend ist ein Loch mit 20  $\mu\text{m}$  im Durchmesser.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch die Mikromanipulation der Zona pellucida der Schlupfprozess begünstigt wird und die darunter liegenden Strukturen nicht beeinträchtigt werden (VOS u. STEIRTEGHEM, 2000).

## 2.7. Manipulationen am Embryo

### 2.7.1. Färbungen

Für die histologische Analyse von Embryonen werden je nach Labor verschiedene Farbstoffe verwendet.

**Toluidin-blau** Toluidin-blau färbt alle basophilen Zellen (Zellkerne) blau an (WEYRAUCH u. SMOLLICH, 1998). Bei der Verwendung von Toluidin-blau können zwar bei allen Embryonen (6 – 6,25 Tage) Fragmente einer Kapsel sichtbar gemacht werden, eine kontinuierliche, sehr dünne Kapsel ist jedoch nur bei Embryonen ab einem Alter von 150 Stunden (6,25 Tagen) sichtbar (BATTUT et al., 2001).

**Akridin-Orange** Akridin-orange ist ein Akridin-Fluoreszenz-Farbstoff mit einem konzentrationsabhängigen rot-grün-Metachroismus, der zum Nachweis der Nukleinsäuren DNA (grün) und RNA (rot) verwendet wird (OLTMANN, 1996).

**Hoechst 33342** Dieser Farbstoff ist ein vitaler Nukleinsäure-Farbstoff, mit dem eine blau fluoreszierende DNA-Färbung zur Ermittlung der Zellzahl bzw. der Zahl fragmentierter Kerne durchgeführt wird. Mittels einem Epifluoreszenzmikroskop und einem Filter von 350 nm wird der 3 Minuten lang gefärbte und vom Farbüberschuss befreite sowie getrocknete Embryo untersucht und beurteilt. Dabei wird die totale Zellzahl, die Zahl der Zellen in Mitose und die Zahl der Zellen mit dicht angefärbten pyknotischen oder fragmentierten Kernen gezählt. Als mitotischer Index wird dabei die Prozentzahl der Zellen in Mitose bezeichnet (BALL et al., 1991; POMAR et al., 2005).

**Propidiumiodid** Propidiumiodid ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der in der Lage ist, sich in die DNA und RNA einzulagern und dabei eine rote Fluoreszenz verursacht. Von lebenden Zellen wird dieser Farbstoff nicht aufgenommen. Die Membran toter Zellen ist jedoch löchrig, so dass der Farbstoff eintreten kann und die Nukleinsäuren in der Zelle rot färbt ([www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de)).

**TUNEL** Mit der TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) können Zellkerne apoptotischer Zellen bzw. die Proportion von Zellen mit fragmentierter DNA dargestellt werden. Unter einem Epifluoreszenzmikroskop mit einem Filter von 488 nm erscheinen die apoptotischen Zellen grün, die lebenden rot (POMAR et al., 2005; MOUSSA et al., 2004b). Da alle toten Zellen in einem frischen Embryo TUNEL-angefärbt sind, scheint der Prozess der Apoptose als physiologischer Prozess in präimplantatorischen Embryonen aufzutreten (MOUSSA et al., 2004b).

**Fluoreszin Diazetat (FDA)** Fluoreszin Diazetat ist eine apolare Verbindung und daher in der Lage, durch die Plasmamembran zu dringen. In der Zelle wird FDA durch Esterasen hydrolysiert, um Fluoreszin freizusetzen. Da Fluoreszin polar ist, kann es nicht durch die Plasmamembran dringen und akkumuliert in der Zelle. Bei Anwesenheit von ultraviolettem Licht fluoresziert Fluoreszin. FDA ist eine Vitalfärbung und fungiert als Indikator für Membranintegrität und Esteraseaktivität. Diese Färbung wurde bereits zur Messung der Lebensfähigkeit equiner Embryonen verwendet und ist für den Embryo nicht schädlich. Anhand dieser Methode konnte sichtbar gemacht werden, dass der Einfrier- und Auftauprozess schädlicher für die ICM als für die Trophoblastzellen ist. Die FDA ist also zur objektiven und akkuraten Beurteilung der embryonalen Lebensfähigkeit geeignet (PRUITT et al., 1988; BARRY et al., 1989; PRUITT et al., 1991; VANDERWALL, 1996; LAGNEAUX et al., 1997). Da die Esteraseaktivität jedoch auch in biochemisch oder morphologisch beeinträchtigten Embryonen vorhanden ist, kann diese Färbung nur basale Funktionen, nicht aber das Entwicklungspotential messen (HUHTINEN et al., 1997a).

**4',6'-diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)** DAPI ist eine membranundurchlässige Fluoreszenzfärbung und wird verwendet, um tote Zellen sichtbar zu machen. Dabei wird die Lebensfähigkeit des Embryos nicht beeinflusst. Fraglich ist allerdings, ob bei Färbungen dieser Art nützliche Informationen entstehen, da die Zahl apoptotischer oder toter Zellen in Embryonen mit einem Qualitätsscore von 1 oder 2 extrem gering ist (<1 %) (HUHTINEN et al., 1995, 1997a; STOUT, 2006). Die blau fluoreszierenden Zellen werden als tote Zellen bezeichnet und der Fluoreszenzgrad wird definiert als Quotient aus fluoreszierenden Zellen und totaler Zellzahl (HUHTINEN et al., 1997a). Nach Lagerung von Embryonen bei 5 °C und Färbung mit DAPI zur Beurteilung der Viabilität (Prozentzahl toter Zellen) zeigt sich, dass diese Methode schnell und zuverlässig funktioniert (MOUSSA et al., 2004b).

### 2.7.2. Kühlen von Embryonen

Aufgrund der Möglichkeit, Embryonen bei 4 – 5 °C mehrere Tage (84 Stunden) mit nur minimalem Verlust der Lebensfähigkeit zu kühlen, können Embryonen vom Ort der Gewinnung zum Ort des Transfers transportiert werden. Dadurch fällt der Transport der Donor- bzw. Empfängerstuten weg und ein Tiefgefrierverfahren ist nicht nötig (PASHEN, 1987; CARNEVALE et al., 1987; STOUT, 2006). Eine niedrige Lagertemperatur unterdrückt den Embryometabolismus und sein Wachstum, während sie die Lebensfähigkeit aufrecht erhält (CARNEVALE, 2008c). Die Trächtigkeitsrate nach Kühlung über 24 Stunden in Ham's F10 in einem Equitainer unterscheidet sich nicht von der ungekühlter frischer Embryonen (CARNEY et al., 1991; STOUT, 2006). Die Trächtigkeitsrate nach Kühllagerung in Ham's F10 bei 15 – 18 °C ist unabhängig von der Dauer (1 – 18 Stunden) oder der Embryogröße (FLEURY et al., 2002). Trotz der Schwierigkeit, eine Mischung von 5 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub> sowie 90 % N<sub>2</sub> innerhalb des Mediums herzustellen, um einen korrekten pH-Wert zu erhalten, war Ham's F10 lange das Medium der Wahl für den gekühlten Transport von Embryonen (CARNEVALE et al., 1987).

Einfacher ist es allerdings ein Medium zu verwenden, bei dem keine vorherige Begasung notwendig ist. Ein solches Medium ist das Zwitterion-buffered Emcare Holding Medium, dessen Verwendung die gleichen Trächtigkeitsraten erzielt wie bei Verwendung von Ham's F10 (MCCUE et al., 2000b; STOUT, 2006). Zwischen den Medien Emcare Holding Medium (Firma ICP, Auckland, Neuseeland), Ham's F10 (Firma Sigma, St. Louis, Missouri, USA) und Vigro Holding Plus Medium (Firma AG Technology, Pullman, Washington, USA) gibt es keine Unterschiede hinsichtlich der Embryoviabilität während der Kühlung bei 5 °C für 24 Stunden, sodass das Emcare Holding Medium sowie das Vigro Holding Plus Medium eine gute Alternative zu Ham's F10 sind. Allerdings tritt bei allen drei Medien eine steigende Zahl toter, DAPI-angefärbter Zellen auf. Da diese aber nicht TUNEL-angefärbt sind, scheint es sich hierbei um eine Nekrose ohne Apoptose zu handeln.

Kleinere Embryonen (<400  $\mu\text{m}$ ) haben eine höhere Prozentzahl früher apoptotischer (TUNEL-angefärbter) Zellen als größere, gleichaltrige Embryonen und haben daher möglicherweise ein reduziertes Entwicklungspotential. Hat die Apoptose einen bestimmten Grenzwert erreicht, kann sie schädlich für die weitere Entwicklung sein und in der Folge potentiell nicht-lebensfähigen Nachwuchs eliminieren. Vielleicht ist dies die Ursache der geringeren Lebensfähigkeit kleiner Embryonen nach einem Transfer. Fest steht, dass größere Embryonen eine bessere Lebensfähigkeit nach 24 Stunden Kühlung haben als kleinere (CARNEVALE et al., 2000b; MOUSSA et al., 2002a, 2003, 2004b).

### 2.7.3. Tiefgefriermethoden

Bis heute existiert kein geeignetes Tiefgefrierverfahren (TGV) für expandierte, equine Blastozysten. Angewandte Tiefgefrierverfahren wie das konventionelle TGV oder die Vitrifikation konnten bei  $\geq 300 \mu\text{m}$  großen Embryonen bis heute noch nicht zu überzeugenden Resultaten hinsichtlich der Vitalität des Embryos bzw. der Trächtigkeitsrate nach dem Auftauen und Übertragen führen. Grund hierfür ist vermutlich die Glykoproteinkapsel, welche das Eindringen der Kryoprotektiva behindert.

Ein erfolgreiches TGV für equine Embryonen würde den Im- und Export genetischen Materials in andere Länder kostengünstiger machen und das genetische Material besonderer Tiere könnte durch ein solches Verfahren bewahrt sowie die Zahl der benötigten Empfängerstuten bzw. deren aufwendiges Synchronisationsmanagement vermindert werden (SQUIRES, 2006b). Da das Spülen und Übertragen zu unterschiedlichen Zeiten und an unterschiedlichen Orten möglich wäre, könnte die Embryotransfertechnik nicht nur erleichtert, sondern auch für mehr Tierärzte zugänglich gemacht und damit verbreitet werden. Ebenfalls möglich wäre dann die internationale Verbreitung bestimmter Blutlinien durch internationalen Handel mit Tiefgefrierembryonen (STOUT, 2006).

Der erste erfolgreiche Versuch, Pferdeembryonen einzufrieren, wurde zwar schon 1982 publiziert; die Geburtenrate nach einem TGV in Glycerin und anschließender Übertragung von 6 Tage alten Embryonen lag jedoch nur bei 9 % (YAMAMOTO et al., 1982). Mit Hilfe eines Zwei-Stufen-Verfahrens konnte die Trächtigkeitsrate auf 53 % erhöht werden. Dabei wurde festgestellt, dass frühe, nicht expandierte Blastozysten (Tag 6, <300  $\mu\text{m}$ ) das Einfrieren besser vertragen als expandierte Blastozysten (Tag 7, >300  $\mu\text{m}$ ) (SLADE et al., 1985). Diese größenabhängige embryonale Empfindlichkeit gegenüber Gefrierschäden wurde auf die unterschiedliche Permeabilität für Glycerin zurückgeführt (HOCHI et al., 1994d). Als mögliche Ursache wurde die Entstehung der Glykoproteinkapsel in Betracht gezogen.

Wenngleich es mittlerweile möglich ist, equine Embryonen einzufrieren, so können bis heute keine vergleichbaren Trächtigkeitsraten wie nach dem Transfer frischer Embryonen erreicht werden (MCCUE et al., 2001). Akzeptable Trächtigkeitsraten (50 – 60 %) können bis heute nur mit Hilfe von Slow-freezing-Methoden von Morula oder frühen Blastozystenstadien mit einer Größe <250  $\mu\text{m}$  erreicht werden. Diese Größe haben Embryonen allerdings nur kurz nach ihrem Abstieg in den Uterus (144 – 168 Stunden nach der Ovulation). Trotz des Wissens um den genauen Ovulationszeitpunkt ist es nicht möglich, sicher vorherzusagen, ob die Embryonen diese für das Einfrieren notwendige Größe haben (STOUT, 2006; BATTUT et al., 1998).

Eine weit weniger aufwendige Methode, um tiefgefriertaugliche Embryonen mit der entsprechenden Größe (Tag 6) zu erhalten, ist, die Spülung 8 Tage nach Verabreichung von hCG durchzuführen (LAGNEAUX u. PALMER, 1991; ELDRIDGE-PANUSKA et al., 2005). Auch die Verabreichung von PGE<sub>2</sub> vier Tage nach der Ovulation in Form eines auf den Eileiter applizierten Gels wurde getestet. Dadurch wurde der Abstieg in den Uterus beschleunigt und man konnte bereits an Tag 5 frühe Embryonalstadien gewinnen. Diese Methode ist jedoch unpraktisch (ROBINSON et al., 2000).

Ursache für die Problematik der verminderten Lebensfähigkeit größerer Embryonen nach dem Auftauen ist vermutlich der vermehrte Zelltod und die Zerstörung von Zellorganellen nach dem Auftauprozess. Aufgrund einer negativen Korrelation zwischen Kapseldicke und Einfriertauglichkeit besteht der Verdacht, dass die Kapsel den Eintritt von Kryoprotektiva in den Embryo verhindert (LEGRAND et al., 1999; BRUYAS et al., 2000b; STOUT, 2006). Die Entfernung der Kapsel 7 Tage alter Blastozysten führte auch nicht zu dem erhofften Trächtigkeitserfolg (STOUT et al., 2005; THARASANIT et al., 2005). Ob die Kapsel also wirklich der Grund für die reduzierte Einfriertauglichkeit expandierter Blastozysten ist und wie eine adäquate Penetration von Kryoprotektiva erreicht werden kann, ohne diese für den Embryo wichtige Struktur zu zerstören, muss noch weiter untersucht werden (STOUT, 2006).

### 2.7.3.1. Konventionell

Zu den konventionellen TG-Verfahren zählen sowohl das Einfrieren mit nicht-permeablen, extrazellulär wirkenden Kryoprotektiva wie z.B. Zuckermolekülen (Saccharose/Sucrose) oder Proteinen (Serumalbumin) als auch die Verwendung intrazellulär wirkender, permeabler Kryoprotektiva wie DMSO, Glycerin, Propylenglykol oder Ethylenglykol (EG). Meistens wird eine Kombination von beiden verwendet. Die permeablen Kryoprotektiva besitzen jedoch die größte Bedeutung.

Beim konventionellen Tiefgefrierverfahren wird der Embryo steigenden Konzentrationen eindringender Kryoprotektiva ausgesetzt. Zunächst muss das Wasser aus den Zellen des Embryos, der sich meist in einer 0,5 ml Plastikpaillette befindet, durch langsame Abkühlung mit einer Abkühlrate von 0,5 ° C pro Minute entfernt werden. Dieser Vorgang ist nötig, um eine intrazelluläre Eiskristallbildung zu verhindern, welche durch mechanische Schäden und Zelltod den Embryo schädigen würde. Zunächst kommt es zur Bildung extrazellulärer Eiskristalle, die in der Regel nur aus purem Wasser bestehen. Das übrige, noch nicht gefrorene, extrazelluläre Wasser besitzt folglich eine hohe Konzentration gelöster Teilchen (Na, Cl), sodass das intrazelluläre Wasser der embryonalen Zellen aufgrund der hyperosmotischen Flüssigkeit im extrazellulären Raum aus den Zellen herausgezogen wird. Erfolgt das Herabkühlen langsam genug, so kann das Wasser nach und nach aus den Zellen herausgezogen werden. Erfolgt das Abkühlen jedoch zu schnell, so kommt es zur intrazellulären Eiskristallbildung, noch bevor das Wasser auf osmotischem Weg aus den Zellen hinausgelangen kann. Es entstehen Zellschäden. Durch Zugabe permeabler Kryoprotektiva kommt es zunächst zum Schrumpfen der Zellen, da die in der Regel verwendete Konzentration der Kryoprotektiva fünf mal höher ist als die des Mediums und des Zellzytoplasmas. Kryoprotektiva sind folglich hyperton. Zur Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts wird das Wasser aus den Zellen in Richtung des höher konzentrierten Kryoprotektivums herausgezogen. Doch sobald das Kryoprotektivum die Zellmembran durchquert hat, wird Wasser wieder hineingezogen und die Zellen reexpandieren. Das osmotische Gleichgewicht ist wieder hergestellt. Dieser Vorgang kann durch eine schrittweise Zugabe der Gefrierschutzmittel minimiert werden (SEIDEL, 1996).

Während kleinere Blastozysten (300  $\mu\text{m}$ ) aufgrund des Wasserausstromes in Richtung der höheren Konzentration (osmotisches Gleichgewicht) mit einem schnellen Schrumpfen reagieren, reexpandieren sie, sobald das hypertone Kryoprotektivum in die Zellen eingedrungen ist und das Wasser nach sich gezogen hat. Größere Embryonen (500 – 1000  $\mu\text{m}$ ) hingegen schrumpfen nur langsam und reexpandieren nicht. Dies liegt vermutlich an der unterschiedlichen Permeabilität für verschiedene Kryoprotektiva (PFAFF et al., 1993; HOCHI et al., 1994d, 1995b).

Bei Erreichen von  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$  wird die Eiskristallbildung induziert. Auf Induktion der Eiskristallbildung folgt die weitere Abkühlung mit einer Rate von  $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro Minute bis  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder  $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wird die den Embryo enthaltende Paillette in flüssigen Stickstoff ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) verbracht und dort bis zum Auftauvorgang gelagert (SQUIRES et al., 2005; CARNEVALE, 2006, 2008c).

Der Auftauprozess erfolgt ebenfalls schrittweise. Das ist wichtig, damit der Embryo nach und nach sinkenden Kryoprotektivkonzentrationen ausgesetzt wird. Erfolgt dieser Schritt plötzlich, so kann es durch die hohe intrazelluläre Konzentration permeabler Kryoprotektiva z.B. im Rahmen des Transfers durch die den Embryo nun umgebende Körperflüssigkeit zu einem Wassereinstrom in die Zelle kommen, bevor das Gefrierschutzmittel hinaus kann. Insofern ist es wichtig, die Kryoprotektiva gründlich zu entfernen, da es sonst durch den Wassereinstrom zur Lysis der Zellen und so zur Schädigung des Embryos kommen kann (CARNEVALE, 2006; SEIDEL, 1996; SQUIRES et al., 2005).

Besonders mit Erreichen eines bestimmten Entwicklungsstadiums erleiden die Embryonen während des Einfrierprozesses Schäden. Kleinere, 6 Tage alte Embryonen sind resistenter gegenüber diesen Einfrierschäden als größere, 7 Tage alte, expandierende Blastozysten. Um dieses Problem zu lösen, wurden bereits einige Kryoprotektiva getestet (TAKEDA et al., 1984; SEIDEL et al., 1989; HOCHI et al., 1994d, 1995b; HUHTINEN et al., 2000). Als Kryoprotektiva werden vor allem Ethylenglykol (EG) und Glycerin verwendet.

Bisher lagen die Trächtigkeitsraten bei Anwendung der konventionellen Methoden zwischen  $10 - 63\%$  (SQUIRES et al., 2005). Diese Form des Einfrierens ist allerdings nicht nur zeitaufwendig (ca 1,5 Stunden), sondern benötigt auch eine teure Ausrüstung (CARNEVALE, 2006, 2008c).

**Ethylenglykol (EG)** Aufgrund des schnelleren Eindringens von EG als Glycerin in nicht-expandierte Blastozysten (PFAFF et al., 1993) wurde sein kryoprotektiver Effekt mittels nicht-chirurgischem Embryotransfer getestet. Die Trächtigkeitsrate war mit  $25\%$  nahezu vergleichbar mit der von Glycerin ( $38\%$ ). Die häufig beobachteten Bruchschäden an den Hüllen (Zona pellucida bzw. Kapsel) durch das Tiefgefrieren mittels EG konnten durch Zugabe von Sucrose verhindert werden und die Embryonen entwickelten sich *in vitro* weiter. Des Weiteren hat Sucrose die Aufgabe, Zellschäden zu verringern und so die Lebensfähigkeit gefrorener Embryonen zu verbessern.

Die direkte Übertragung dieser Embryonen führte zu einer Trächtigkeitsrate von  $64\%$ . Die Trächtigkeitsraten nach Einfrieren und Transfer später Morulae bzw. früher Blastozystenstadien ( $<300\text{ }\mu\text{m}$ , 6,5 Tage) sind somit vergleichbar mit denen frischer Embryonen ( $63,6$  vs.  $70\%$ ). Auch beim Tiefgefrieren unreifer Cumulus-Oozyten-Komplexe ist EG besser als Tiefgefrierschutzmittel geeignet als Glycerin (HOCHI et al., 1994c, 1996; HUHTINEN et al., 1997a; HOCHI, 1998, 2003).

Bei Rindern ermöglichte die Verwendung von EG als einziges Tiefgefrierschutzmittel sogar den direkten Transfer tiefgefrorener Embryonen (VOELKEL u. HU, 1992) und bei Schafen erreichte es eine höhere Permeabilität sowie bessere kryoprotektive Ergebnisse als die Verwendung von Glycerin (SONGSASEN et al., 1995).

Im Gegensatz dazu konnten im Rahmen einer anderen Studie bei Tiefgefrierversuchen 6 Tage alter Embryonen mittels EG keine lebenden Zellen verzeichnet werden – unabhängig davon, ob Sucrose hinzugegeben wurde oder nicht (BRUYAS et al., 1995, 2000b). Des Weiteren fielen auch die Trächtigkeitsraten nach dem Tiefgefrieren und anschließendem Transfer expandierter Blastozysten (300 – 1100  $\mu\text{m}$ , 8 Tage alt) gering aus (MOUSSA et al., 2005). Die Wirkung von EG ist folglich umstritten.

**Glycerin** Bei der Verwendung von Glycerin bei Embryonen  $>160 \mu\text{m}$  konnte keine Trächtigkeit erreicht werden (0 von 22), während 8 von 26 Embryonen  $<160 \mu\text{m}$  zu Trächtigkeiten führten. Nach Auftauen und Entfernen des Kryoprotektivums war der Zellschaden jedoch groß, sodass eine Toxizität des Kryoprotektivums nicht ausgeschlossen werden kann (LAGNEAUX u. PALMER, 1991). Während diese schädliche Wirkung von Glycerin bezogen auf pyknotische Zellen und Schäden der ICM lange bestätigt wurde (BRUYAS et al., 1993, 1995; FERREIRA et al., 1997), konnte im Jahr 2000 das Gegenteil bewiesen werden. Bei Verwendung von Glycerin zum Einfrieren 6 Tage alter Embryonen konnten keinerlei lysierte Zellen sowie kaum pyknotische Kerne gefunden werden. Daraus wurde abgeleitet, dass sich Glycerin hervorragend für das Einfrieren von Embryonen mit intakter Zona pellucida sowie keiner oder nur einer sehr dünnen Kapsel eignet (BRUYAS et al., 2000b).

Der Zusatz von L-Glutamin zu Glycerin beim Einfrieren von 6,5 Tage alten Embryonen resultiert in gesteigerten Trächtigkeitsraten und laut Anfärbung mit DAPI zu einer geringeren Zahl fluoreszierender (toter) Zellen (LAGNEAUX et al., 2000).

Glycerin führt je nach Kapseldicke zu unterschiedlichen Zellschäden. Embryonen mit einer dünnen Kapsel erleiden durch den Wasserausstrom sowie den Glycerineinstrom einen geringen osmotischen Schaden, während Embryonen mit einer dickeren Kapsel einen größeren Schaden erleiden. Dies liegt vermutlich daran, dass der Wasserausstrom aufgrund der größeren Kapseldicke nicht durch einen entsprechenden Glycerineinstrom kompensiert werden kann. Embryonen mit einer sehr dicken Kapsel weisen hingegen morphologisch kaum Unterschiede zu frischen Embryonen sowie kaum tote Zellen auf. Letzteres ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass durch eine sehr dicke Kapsel (0,8  $\mu\text{m}$ ) keinerlei Flüssigkeitsbewegung – weder von Wasser hinaus noch von Glycerin hinein – stattfindet, sodass kein osmotischer Schaden entsteht. Dies ändert sich jedoch nach dem Einfrier- bzw. Auftauprozess. Dieser führt mit steigender Kapseldicke zu einem proportional erhöhten Anteil degenerierter Zellen. Dieses Verhalten ist darauf zurückzuführen, dass die Kapsel das Eindringen von Glycerin in die Embryonalzellen verhindert.

Eine Vorbehandlung der Embryonen mit Trypsin zur Ausdünnung der Kapsel steigert die Permeabilität der Kapsel und somit den Einfriererfolg selbst von 8 Tage alten Embryonen und führt zu erfolgreichen Trächtigkeiten. Nachteil der Trypsinbehandlung ist die resultierende Klebrigkeit der Kapsel, die das Handling erschwert. Diese Tatsache wird als mögliche Ursache für die geringe Trächtigkeitsrate nach dem Transfer in Betracht gezogen, da es aufgrund der klebrigen Kapsel und dem damit verbundenen erschwerten Handling während des Transfers zum Verlust des Embryos kommen kann (LEGRAND et al., 2000, 2002; STOUT et al., 2003; THARASANIT et al., 2005).

Die Vorbehandlung >300  $\mu\text{m}$  großer Embryonen mit dem Zytoskelett stabilisierenden Mikrofilament-Inhibitor Cytochalasin-B (Cyto-B), das die Geschmeidigkeit steigern und somit die Zerbrechlichkeit der Zellmembranen reduzieren soll, führte immerhin zu 4 von 7 Trächtigkeiten. Obwohl Trypsin und Cyto-B den Zelltod großer Embryonen während des Tiefgefrierens reduzieren können, induzieren sie andere Veränderungen, die vermutlich für das Überleben des Embryos von Nachteil sind. Die Kombination von Cyto-B mit Trypsin hat keinerlei Erfolg (MACLELLAN et al., 2002; STOUT et al., 2003; THARASANIT et al., 2005).

Der Auftauvorgang erfolgt, indem die 0,25 ml bzw. 0,5 ml-Pailletten zunächst für 20 Sekunden in ein 37 °C warmes Wasserbad eingetaucht werden. Anschließend wird das Glycerin durch Eintauchen in immer niedriger konzentrierte Glycerinlösungen (83, 67, 50, 33, 16 und 0 %) entfernt (SIROIS et al., 1987b). Eine interessante Beobachtung ist das Schrumpfen der Embryonen während der Behandlung mit Glycerin. Diejenigen Embryonen, die bei einer steigenden Glycerinkonzentration am wenigsten schrumpfen, haben eine größere Überlebenschance nach dem Transfer. Diese Glycerinabhängige Größenveränderung ist am stärksten beim Entwicklungsstadium der Blastozyste ausgeprägt und ist eventuell ein Zeichen für das Kollabieren des Blastozoels (HUHTINEN et al., 1997a).

Sowohl die Verwendung von EG als auch von Glycerin liefert dem Embryo ausreichend Schutz und es können Trächtigkeiten erzielt werden. Eine vielversprechende Technik zur Beurteilung des durch das TGV hervorgerufenen Zellschadens ist die Anwendung der Konfokalmikroskopie (HUHTINEN et al., 2000).

**1,2-Propanediol und Dimethylsulfoxid** Weitere Kryoprotektiva sind 1,2-Propanediol oder Dimethylsulfoxid (DMSO). Während die Behandlung von Embryonen mit 1,2-Propanediol nur einen minimalen toxischen Effekt hat, ist seine Verwendung als Kryoprotektivum nicht geeignet. Die Unfähigkeit von 1,2-Propanediol, den Embryo während des Einfrier- und Auftauprozesses zu schützen, spiegelt sich in den Trächtigkeitsraten nach Einfrierversuchen wieder. Es konnten keine Trächtigkeiten erreicht werden (MEIRA et al., 1993; BRUYAS et al., 1997a). Einfrierversuche mit DMSO bestätigten die Resultate von YAMAMOTO et al. (1982), dass dieses Medium zwar nur eine geringe Toxizität gegenüber frischen Embryonen hat, zum Einfrieren früher Blastozysten aber vollkommen ungeeignet ist.

Während bei DMSO-behandelten, nicht tiefgefrorenen Embryonen nur wenige Trophoblastzellen geschädigt werden, enthält die ICM viele pyknotische und degenerierte Zellen. Bei Verwendung von DMSO als Tiefgefrierschutzmittel befindet sich nach dem Auftauen innerhalb der Kapsel eine große, zentrale, kompakte Zellmasse aus Trophoblastzellen und Zellen der ICM, deren Differenzierung nicht möglich ist. Im Zwischenraum zwischen dieser Zellmasse und der Kapsel befinden sich degenerierte Zellen (YAMAMOTO et al., 1982; BRUYAS et al., 1995, 1997b).

Während des Tiefgefrierens gibt es eine Menge Faktoren, die in der Lage sind, den Embryo zu schädigen und damit den Transfererfolg zu beeinträchtigen. Neben den Kryoprotektiva sowie ihren unterschiedlichen Konzentrationen und Permeabilitäten gehören dazu auch die Abkühlraten und die nicht-physiologischen Temperaturen, denen die Embryonen ausgesetzt werden (LEIBO, 2000).

### **2.7.3.2. Vitrifikation**

Die Vitrifikation ist ein ultraschnelles Einfrierverfahren, bei dem der Embryo direkt in flüssigen Stickstoff getaucht wird. Der größte Vorteil dieser Methode ist die ausbleibende Eiskristallbildung. Dafür ist es jedoch wichtig, dass das Kryoprotektivum in die Zellen eindringt (HOCHI et al., 1995b). Nachteil dieser Methode ist die dafür benötigte hohe Konzentration des Kryoprotektivums. Da diese toxisch ist, muss die Kontaktzeit zwischen Kryoprotektivum und Embryo sehr kurz gehalten werden. In der Regel wird eine Kombination aus penetrierenden und nicht penetrierenden Kryoprotektiva angewendet. Die Trächtigkeitsraten lagen bisher bei 40 %. Beim Auftauprozess erfolgt die Entfernung des Kryoprotektivums meistens mit Hilfe von Sucrose.

Beim Vitrifizieren kommt es durch die extreme Erhöhung der Viskosität zum Erstarren der Lösung, sodass diese von einer Sekunde auf die andere eine glasähnliche Konsistenz erhält. Der Zeitaufwand (<4 Minuten) ist im Vergleich zum konventionellen Tiefgefrieren gering und es werden keine teuren Geräte benötigt. Dieses Verfahren ist einfacher, schneller und kostenkünstiger als konventionelle Tiefgefrierverfahren.

Bevor der Embryo in flüssigen Stickstoff (-196 °C) verbracht wird, wird er zunächst für 1 Minute dem Stickstoffdampf ausgesetzt. Vitrifizierte Embryonen können innerhalb der Pailletten schnell aufgewärmt und direkt übertragen werden. Beim Aufwärmen wird die Paillette 10 Sekunden bei Raumtemperatur in die Luft gehalten und anschließend für weitere 10 Sekunden in ein 20 – 22 °C warmes Wasserbad verbracht. Sechs bis acht Minuten später kann der Embryo übertragen werden (CARNEVALE et al., 2004a; STOUT, 2006; CARNEVALE, 2006; SQUIRES, 2006b).

Die Vitrifikation von Pferdeembryonen ist aufgrund der geringeren Permeabilität gegenüber Kryoprotektiva schwieriger als bei Rinderembryonen. Für eine erfolgreiche Vitrifikation ist neben der Vitrifikationslösung auch das embryonale Entwicklungsstadium sowie das Vitrifikationsprotokoll für den Zusatz und die Verdünnung der Kryoprotektiva von entscheidender Bedeutung (HOCHI, 1998). Setzt man nicht expandierte Blastozysten zum Beispiel direkt einer EG-basierten Vitrifikationslösung aus, so ist die embryonale Überlebensrate gleich null. Erfolgt das Aussetzen jedoch schrittweise, so ändert sich dieses Verhalten deutlich. Das erste Fohlen nach Vitrifikation wurde 1994 geboren (HOCHI et al., 1994b). Während Blastozysten  $<200 \mu\text{m}$  bzw. zwischen  $200$  und  $300 \mu\text{m}$  problemlos vitrifiziert werden können, ist die Vitrifikation sowie auch das konventionelle Tiefgefrierverfahren bei Blastozysten  $>300 \mu\text{m}$  noch nicht sehr erfolgreich. Dies liegt vermutlich an der Bildung der Glykoproteinkapsel, deren Struktur sich deutlich von der der Zona pellucida unterscheidet und durch deren „unterdrückenden“ Effekt intrazellulär wirkende Kryoprotektiva nicht in die Zellen eindringen können (HOCHI et al., 1994d, 1995b). So bleiben Trächtigkeiten nach Transfer vitrifizierter Blastozysten  $>300 \mu\text{m}$  aus, während der Transfer kleiner vitrifizierter Embryonen  $<300 \mu\text{m}$  nach dem Auftauen hohe Trächtigkeitsraten ( $>60\%$ ) erzielt (DI BRIENZA et al., 2004; CARNEVALE et al., 2004b; ELDRIDGE-PANUSKA et al., 2005; SQUIRES, 2006b).

Anhand eines In-vitro-Vergleiches zwischen konventionellem TGV und Vitrifikation von 6,5 bzw. 6,75 Tage alten Embryonen konnten nach dem Auftauen keine Unterschiede zwischen den beiden Methoden festgestellt werden (MOUSSA et al., 2005). Allerdings konnte die morphologische Qualität und die Prozentzahl lebender Zellen nach Zusatz von Ficoll und Sucrose bzw. Trehalose beim Vitrifizieren von 6,5 Tage alten Embryonen zwischen  $170$  und  $235 \mu\text{m}$  verbessert werden (CASTANHEIRA et al., 2004).

Eine weitere Vitrifikationsmethode ist die „Step-Down-Äquilibrierungsmethode“, bei der man größere Embryonen ( $>300 \mu\text{m}$ ) schrittweise wechselnden Glycerinkonzentrationen aussetzt ( $2\text{ M} - 4\text{ M} - 2\text{ M}$ ), um eine möglichst hohe intrazelluläre Konzentration zu erreichen. Vor dem Einfrieren wird die Konzentration wieder gesenkt, um die Toxizität zu minimieren. Wichtig dabei ist, dass auch das Entfernen des Glycerins schrittweise erfolgt ( $1,5\text{ M} - 0,8\text{ M} - 0,3\text{ M} - 0\text{ M}$ ). Diese Methode scheint vielversprechend zur Vitrifikation großer Embryonen zu sein (YOUNG et al., 1997b).

Im Gegensatz zur konventionellen Methode ist die Konzentration der Tiefgefrierschutzmittel bei der Vitrifikation sehr hoch, die Inkubationszeit ist jedoch sehr kurz. Durch die schnelle Abkühlrate von  $25.000 \text{ }^\circ\text{C}$  pro Minute geht die Lösung direkt in einen glasähnlichen Zustand über, sodass Strukturschäden durch intrazelluläre Eiskristalle vermieden werden. Die schädliche Eiskristallbildung ist proportional zum Volumen und umgekehrt proportional zur Viskosität und Kühlrate. Das heißt je mehr Volumen vorhanden ist, desto größer ist auch die Eiskristallbildung und somit der Schaden bzw. je größer die Viskosität und die Abkühlrate, desto kleiner die Eiskristallbildung und damit der entstehende Schaden (VANDERZWALMEN et al., 2002; SCHERZER et al., 2008).

Durch Aspiration der Blastozoelflüssigkeit, kombiniert mit der Mikroinfusion von Gefrierschutzmitteln vor dem Vitrifizierungsprozess sowie einer sehr schnellen Abkühlrate ist eine Methode entstanden, mit der es in Zukunft möglich sein könnte, expandierte Blastozysten erfolgreich zu vitrifizieren und zu übertragen (SCHERZER et al., 2008). Es wird angenommen, dass die Vitrifikationsmethode in Zukunft das konventionelle Kryokonservierungsverfahren ersetzen wird (VATJA u. KUWAYAMA, 2006).

#### 2.7.4. Kultur von Embryonen

Das Kultivieren von Pferdeembryonen wird im Allgemeinen verwendet, um ihre Lebensfähigkeit anhand morphologischer Kriterien zu beurteilen. Kriterien für eine erfolgreiche Kultivierung sind neben der Weiterentwicklung auch das Größenwachstum des Embryos. Wichtig ist die Beobachtung und Beurteilung weiterer morphologischer Kriterien vor, während und nach der Kultur. In einem kommerziellen Embryotransferprogramm ist es von Bedeutung, dass der Zeitraum zwischen Gewinnung und Übertragung möglichst kurz gehalten wird. Daher sollte von einer längeren Kulturdauer abgesehen werden. Selbst ein außerordentlich gutes Kultursystem kann die natürlichen Bedingungen der Gebärmutter nicht ersetzen. So steigt die Wahrscheinlichkeit, dass der Embryo Schaden nimmt, mit anhaltender Kulturdauer an.

Das Kultivieren von Pferdeembryonen ist besonders sinnvoll zur Beurteilung der Lebensfähigkeit des Embryos nach Manipulationen (Splitting, Einfrieren) bzw. zur Beurteilung der Qualität des Kulturmediums an sich. Von weiterem Interesse ist die Beobachtung der verschiedenen entwicklungstechnischen Aspekte des Embryos in einem etablierten In-vitro-Kultursystem. Die unterschiedlichen Kulturbedingungen manifestieren sich bei unterschiedlichen Temperaturen (5, 24 bzw. 37 °C) oder in verschiedenen Kulturmedien.

Die Lebensfähigkeit des Embryos kann nach kurzzeitiger Aufbewahrung unterhalb der Körpertemperatur (5 °C, 24 °C) erhalten werden. Diese Methode wird im Rahmen eines Embryotransferprogrammes zwischen Gewinnung und Übertragung angewendet. Erfolgt die Lagerung des Embryos bei höheren Temperaturen (37 °C), so entwickelt sich der Embryo während dieser Zeit weiter. Diese Form der Kultivierung ist als einzige geeignet, um die Lebensfähigkeit des Embryos zu beurteilen (VANDERWALL, 1996). Trotz günstiger Kulturbedingungen ist es bis heute nicht gelungen, die Erhaltung der Kapsel bzw. deren Entwicklung unter Kulturbedingungen zu gewährleisten (HOCHI et al., 1995a).

Ein entscheidendes Kriterium einer erfolgreichen Kultur ist die ausreichende Versorgung mit Glucose. Während die Glucosekonzentration gegenüber Pyruvat und Laktat während der ersten Teilungsstadien gering dosiert sein sollte, benötigt der Embryo während der Blastozystenentstehung und -expansion verhältnismäßig große Mengen an Glucose (RIEGER, 2001). Der Zusatz von Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) hingegen senkt die Blastozystenentwicklung und beeinträchtigt die embryonale Morphologie (HINRICHS et al., 2007).

#### 2.7.4.1. Co-Kultivierung

Die Co-Kultivierung ist eine Methode, die in vitro gute Erfolge erzielt. Das Prinzip der Co-Kultivierung ist der Zusatz nicht-embryonaler Zellen oder Gewebe zum Kulturmedium. So entwickeln sich Ein- bis Zweizellstadien deutlich besser in Anwesenheit von tubalen Epithelzellen als ohne diese. Allerdings liegt ihre Entwicklungsrate um 1 Tag hinter der von co-kultivierten Vier- bis Achtzellstadien, von denen mehr Embryonen das Blastozystenstadium erreichen. Auffallend ist aber, dass Ein- bis Zweizellstadien eine bessere Qualität bzw. einen besseren mitotischen Index als Vier- bis Achtzellstadien haben. Dadurch stellt sich die Frage, ob Ein- bis Zweizellstadien eine bessere Lebensfähigkeit als Vier- bis Achtzellstadien haben. Diese liegen in ihrer Entwicklung zwar einen Tag hinter der von in vivo gereiften Embryonen, die Trächtigkeitsraten sind jedoch vergleichbar (BALL et al., 1993a; VANDERWALL, 1996).

Obwohl die Entwicklung und das Überleben durch Co-Kultur mit Eileitergewebe besser ist als ohne diese, erfolgt auch hier der Schlupf aus der Zona pellucida via Squeezing bzw. Ausdünnen und nachfolgendem Abwurf (FREEMAN et al., 1991a). Letztendlich sind co-kultivierte Embryonen zwar kleiner und in ihrer Entwicklung etwas hinter der von nicht-kultivierten Embryonen, sie sind jedoch in der Lage, sich nach dem Transfer normal weiterzuentwickeln, sodass an Tag 30 keinerlei Unterschiede bemerkbar sind (BALL u. MILLER, 1992).

#### 2.7.4.2. Kulturmedien

Da selbst das beste Kulturmedium nicht das Gebärmuttermilieu ersetzen kann, sollte die Kulturdauer so gering wie möglich gehalten werden. Das minimale Zubehör eines Kultursystems für Embryonen ist neben einem geeigneten Medium auch ein Inkubator, der eine konstante Temperatur sowie eine angemessene Gasatmosphäre aufrecht erhalten kann. Pferdeembryonen werden normalerweise bei Körpertemperatur, 5 % CO<sub>2</sub> und einer maximalen Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei Verwendung unterschiedlicher Kulturmedien zur In-vitro-Kultivierung von Pferdeembryonen wurden verschiedene Erfolge erzielt (VANDERWALL, 1996).

**B2-Medium** Bei Verwendung von B2-Medium mit 15 % hitzeinaktiviertem FCS bei 5 % CO<sub>2</sub>, maximaler Luftfeuchtigkeit und 38,5 °C konnten bei einer Kulturdauer von <96 Stunden Zellteilungen wie in vivo beobachtet werden (BEZARD et al., 1989). In einem Vergleich zwischen dem B2-Medium und Tissue Culture Medium 199 (TCM-199) stellte sich heraus, dass das B2-Medium bei In-vitro-Kultivierung von Rinderembryonen zur Entwicklung von mehr und weiter entwickelten Rinderblastozysten führt als die Kultur in TCM-199. Daraus wird gefolgert, dass das B2-Medium – in Kombination mit BRL (Buffalo Rat Liver) als Co-Kulturgewebe – für das Kultivieren von Rinderblastozysten besser geeignet ist als TCM-199 (FARIN et al., 1996).

**Tissue Culture Medium 199** Das Kulturmedium TCM-199, welches mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS sowie mit einer antibiotisch-antimykotischen Lösung versetzt ist, ist in Bezug auf das Wachstum von Pferdeembryonen für die In-vitro-Kultivierung genauso gut geeignet wie das Medium Ham's F12. Bei maximaler Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Kultivierung bei 37 °C konnte keine Degeneration der Embryonen festgestellt werden (HOCHI et al., 1993).

**Ham's F10 / Ham's F12** Sowohl bei Kultivierung in Ham's F10 als auch in Ham's F12 entwickelten sich die Embryonen weiter. Allerdings wurde bei dieser Form der In-vitro-Kultivierung das Phänomen des Squeezings nicht-expandierter Blastozysten aus der Zona pellucida beobachtet. Nach Abwurf der Zona pellucida zusammen mit der Kapsel kann diese nicht nachgebildet werden (MCKINNON et al., 1989; HINRICHS et al., 1990).

Durch Kühlung der Embryonen bei 5 °C in Ham's F10, welches mit 90 % N<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub> sowie 5 % CO<sub>2</sub> begast sowie mit 10 % FCS, Penicillin und Streptomycin versetzt wurde, konnte ihre Lebensfähigkeit bis zu 24 Stunden aufrecht erhalten werden. Auf diese Weise können Embryonen im Rahmen eines Transferprogrammes zum Ort der Empfängerstute verschickt werden (CARNEVALE et al., 1987).

### 2.7.5. Kapselmanipulation

Im Jahre 2000 schlugen LEGRAND et al. die Kapselauflösung als Mittel zur Verbesserung des Tiefgefrierfahrens von Blastozysten vor. Ihr Ziel war es, durch die enzymatische Auflösung der Kapsel eine gesteigerte Permeabilität für Kryoprotektiva zu erreichen. Dabei stellten sie fest, dass sich das Enzym Trypsin dafür besser eignet als das Enzym Kollagenase. Während kleine Konzentrationen an Trypsin uneffektiv waren, wirkten große Konzentrationen toxisch auf den Embryo und führten zu einer großen Zahl nekrotischer Zellen. Nach enzymatischer Entfernung der Kapsel mittels einer 2 %igen Trypsinlösung wurden die 8 Tage alten Blastozysten mit Glycerin als Kryoprotektivum tiefgefroren. Nach dem Auftauprozess wurden sie nicht-chirurgisch übertragen. Dabei konnten erstmalig Trächtigkeiten (6 von 8 bzw. 3 von 11) nach Übertragung expandierter Blastozysten erreicht werden (LEGRAND et al., 2000, 2002).

### 2.7.6. Laserdissektion

Die Lasermikrodissektions-Technik ist eine leistungsfähige Technologie, die die morphologische und histochemische mit der fortschrittlichen Molekularanalyse kombiniert. Es gibt zwei Lasermikrodissektionstechniken, die auf unterschiedlichen Prinzipien entwickelt wurden: die „Laser capture microdissection“ und die „Laser cutting microdissection“ (MURRAY, 2007).

### 2.7.6.1. Laser capture microdissection

Dieses System basiert auf einem spiegelverkehrten Breitfeld-Lichtmikroskop. Eine thermoplastische Membran, adaptiert an einen Plastikdeckel, überdeckt die zu untersuchenden Zellen. Nach einer kurzen aber starken Erhitzung mittels eines schmalen Laserstrahls wird ein kleines Plastikgebiet erhitzt. Dabei fokussiert der Infrarotlaser die entsprechenden Zellen, die zuvor mikroskopisch identifiziert wurden. Durch diesen Vorgang verschmelzen diese Zellen mit dem Plastik, sodass nach dem Abkühlen die thermoplastische Membran zusammen mit diesen Zellen vom Plastikdeckel entfernt werden kann. Im Anschluss erfolgt die Isolation und Analyse der Moleküle. In Abb. 2.8 ist die Methode der *Laserassisted Microdissection* dargestellt. In der Regel zeigen weder das Erhitzen noch das Abkühlen Folgeschäden für das Zellmaterial (MURRAY, 2007).

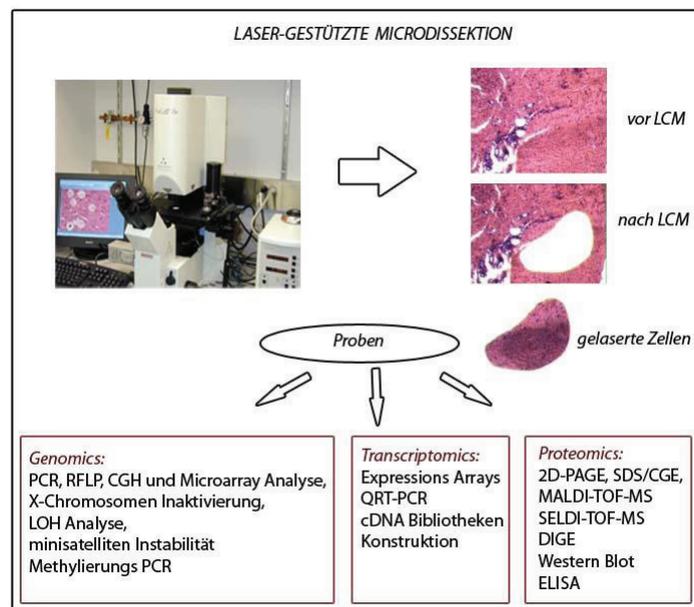


Abb. 2.8.: Die *Laserassisted Microdissection* kann mit einer Vielzahl von Techniken, wie z.B. der Genom- oder Transkriptomanalyse, kombiniert werden (modifiziert nach CHIMGE et al. 2007).

### 2.7.6.2. Laser cutting microdissection

Das Prinzip dieses Lasers beruht auf einem schmalen, ultravioletten Laserstrahl, der die entsprechenden Zellen aus den sie umgebenden Geweben ausschneidet und in Sammelröhrchen verbringt. Bei dieser Methode erfolgt weder Erhitzung noch Kühlung, sodass das Risiko eventueller Schäden durch das Schmelzen und Auflösen des Plastiks nicht besteht. Bei diesem System handelt es sich um ein non-contact-System. Daher ist auch jegliche Kontamination durch anderweitige, zum Beispiel an den Geräten vorhandene Zellen unmöglich.

Der Laserstrahldurchmesser dieses Lasers beträgt  $<1 \mu\text{m}$ , während der kleinste Durchmesser des Infrarotlasers  $7,5 \mu\text{m}$  beträgt. Durch den hier verwendeten kleineren Laserstrahldurchmesser ist ein präziseres Arbeiten möglich (MURRAY, 2007).

Die Laser Microdissections-Methode mittels eines UVA-Lasers ermöglicht die selektierte Auswahl individueller Zellen, ohne die benachbarten Zellen zu beschädigen. Besonders die Gewinnung fetaler Zellen aus maternalen Blutproben ist auf diese Art möglich und gewährleistet eine schnelle, temperaturunabhängige, nicht-invasive Pränataldiagnostik. Bei dieser Laser microdissection and pressure catapulting (LMPC)-Methode handelt es sich um eine Kombination aus der Herauslösung der gewünschten Zelle aus ihrer Umgebung und der anschließenden Verbringung der Probe in ein Sammelgefäß. Auffallend dabei ist, dass beide Schritte mit ein und demselben Laser erfolgen (BURGEMEISTER, 2005). In Abb. 2.9 ist die Methode der LMPC dargestellt.

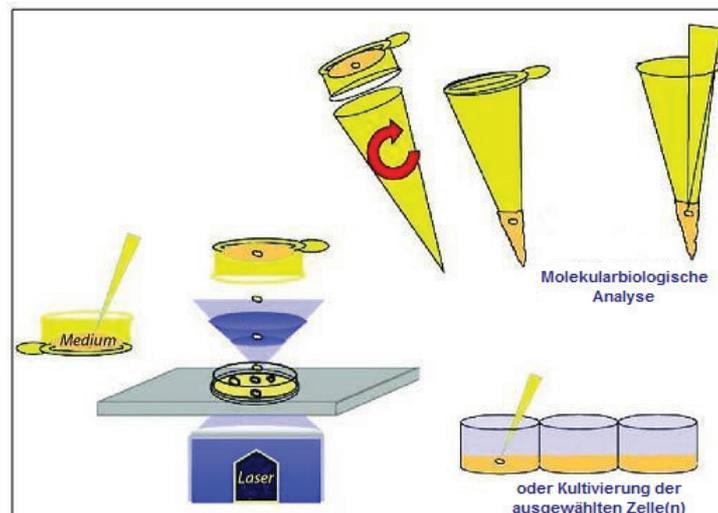


Abb. 2.9.: Laser microdissection and pressure catapulting (LMPC). Nach Herauslösung der gewünschten Zelle aus ihrer Umgebung wird diese in ein Sammelgefäß verbracht (modifiziert nach BURGEMEISTER 2005).

Die Vorteile der Laserbehandlung gegenüber mechanischen oder chemischen Methoden sind neben der einfach zu bedienenden Technik sowie der kontrollierbaren, schnellen und präzisen Durchführbarkeit auch das Ausbleiben jeglicher mechanischer, temperaturbedingter oder chemischer Schäden. Allerdings ist bisher nicht klar, inwiefern die Laserstrahlen eine mutagene Wirkung auf den Embryo haben können. Bisher konnten in der Humanmedizin jedoch keine gesteigerten chromosomalen oder kongenitalen Abnormalitäten festgestellt werden. Bekannte Nachteile der Verwendung von Laserstrahlen sind zum einen die hohen Kosten, zum anderen die Unfähigkeit des Laserstrahls, Fragmente und degenerierte Zellen während der Behandlung zu entfernen (MAKRAKIS et al., 2006). Bisher gibt es jedoch keine Studien über das laserinduzierte Auflösen der Kapsel.

### 3. Material und Methoden



Abb. 3.1.: Das Bayerische Haupt- und Landgestüt Schwaiganger

### 3.1. Versuchsübersicht

In der Studie wurden jeweils zehn 7,5 – 9,5 Tage alte Pferdeembryonen mit einem Durchmesser von  $912,41 \pm 68,22$  (310 – 2600)  $\mu\text{m}$  einer der folgenden Behandlungen unterzogen:

1. Kontrollgruppe I (KGI): In-vitro-Kultivierung bei  $38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  in TCM-199 für 48 Stunden
2. Versuchsgruppe I (VGI): Laserpunktion (2 Punktionen) und anschließende In-vitro-Kultivierung bei  $38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  in TCM-199 für 48 Stunden
3. Kontrollgruppe II (KGII): 10minütiges Verbringen in EG und anschließende In-vitro-Kultivierung in TCM-199 bei  $38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 48 Stunden
4. Versuchsgruppe II (VGII): Laserpunktion (1 Punktion), 10minütiges Verbringen in EG und anschließende Kultivierung in TCM-199 bei  $38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 48 Stunden

### 3.2. Versuchstiere



Abb. 3.2.: Die Versuchsstuten des Haupt- und Landgestüts Schwaiganger

Als Versuchsstuten wurden 17 fertile Warmblutstuten im Alter von 3 – 11 Jahren ( $\bar{x}$  5,7 Jahre) und einem Gewicht von 530 – 630 kg verwendet, die vom Bayerischen Haupt- und Landgestüt Schwaiganger zur Verfügung gestellt wurden. Zu Beginn der Studie wurden die Stuten gynäkologisch und allgemein klinisch untersucht. Die Entnahme von Uterustupfern ergab keine positiven Befunde. Mit Hilfe einer Uterusbiopsie wurde eine Fertilitätsprognose erstellt. Die resultierenden Biopsiescores lagen zwischen Kategorie I und IIB/III (Tabelle 3.1).

Tab. 3.1.: In dieser Tabelle ist der Biopsiescore der einzelnen Stuten dargestellt.

<b>Stute</b>	<b>Alter (Jahre)</b>	<b>Biopsiescore</b>
A1	8	IIA/B
A2	3	I/IIA
A3	7	IIA
A4	6	I/IIA
A5	6	I
D1	3	Ila
D2	5	IIB–III
D3	3	IIB
D4	3	I–IIA
D5	11	IIB
F1	3	IIA
F2	8	IIA
G1	8	IIB
G2	5	I
M1	8	Ila
S1	3	I
S2	7	Ilb–III

Die Jungstuten wurden im Offenstall mit automatischer Transponderfütterung gehalten und wurden nicht geritten. Die restlichen Stuten wurden unter Stallbedingungen mit individueller Rationszuteilung gehalten und dienten als Schul- und Turnierpferde. Alle Stuten bekamen neben Silage auch Hafer bzw. Gerste und Mineralfutter. Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Um den Effekt individueller Variabilitäten auszuschließen, wurden die Stuten nach Möglichkeit für alle vier Gruppen verwendet.

### 3.3. Zyklusmanagement

Die Stuten wurden von März bis August 2008 alle drei Tage auf äußere und innere Rosseanzeichen kontrolliert. Nach Feststellung der Rosse erfolgte täglich die sonographische Untersuchung von Gebärmutter und Eierstöcken. Bei Detektion der typischen, rossebedingten „radspeichenartigen Strukturen“ infolge Ödematisierung der Gebärmutterschleimhaut sowie der Anwesenheit eines dominanten Follikels mit einem Durchmesser von mindestens 35 mm, wurden der Stute 2 ml hCG (Ovogest, Intervet, Unterschleißheim) mit einer Konzentration von 1500 IE i.v. zur Ovulationsinduktion verabreicht.

### 3.4. Besamung und Ovulationsdetektion

Zeitgleich mit der hCG-Verabreichung wurden die Stuten mit frischem Samen nachgewiesenermaßen fertiler Hengste des Haupt- und Landgestüts Schwaiganger künstlich besamt. Dabei wurde eine Besamungsdosis von 600 Millionen vorwärtsbeweglichen Spermien verwendet. Für die künstliche Besamung wurden Universalbesamungspipetten zur tiefen intrauterinen Besamung mit einer Länge von 75 cm verwendet (Firma Minitüb, Abfüll- und Labortechnik GmbH und Co. KG, Tiefenbach). Die Besamung wurde bis zur Feststellung der Ovulation täglich wiederholt. Der Tag der Feststellung eines Corpus luteum wurde als Tag 0,5 festgelegt (SIROIS et al., 1987b).

### 3.5. Embryogewinnung

Aufgrund der Feststellung, dass equine Embryonen zwischen 144 und 156 Stunden nach der Ovulation in den Uterus absteigen (BATTUT et al., 1998) und die Kapselbildung ungefähr an Tag 6 beginnt (FLOOD et al., 1982), wurde die Embryogewinnung in dieser Studie zwischen Tag 7,5 und 9,5 durchgeführt (37x Tag 8,5 / 2x Tag 9,5 und 1x Tag 7,5). Die gewonnenen Embryonen wurden per Zufall einer der vier Behandlungsgruppen zugeteilt. Dadurch wurde gewährleistet, dass in allen 4 Gruppen die gleiche Anzahl an Embryonen und damit eine vergleichbare Größe vorhanden war. Das einzige Ausschlusskriterium in dieser Studie waren Embryonen  $<300 \mu\text{m}$ , da diese bereits in früheren Studien als einfriertauglich klassifiziert worden waren.

Vor der Gebärmuttersspülung wurde die Stute zunächst rektal und sonographisch auf das Vorhandensein des am Ovulationstag festgestellten Gelbkörpers sowie auf weitere Funktionskörper untersucht. Daraufhin wurde der Anogenitalbereich gründlich gereinigt und desinfiziert sowie der Schweif bandagiert, um eine Verunreinigung beim Spülvorgang zu vermeiden. Nach Vorbereitung der benötigten Materialien sowie dem Erwärmen der Spüllösung in einem Heizschrank (Firma Memmert, Schwabach) auf etwa 37 °C begann die eigentliche Embryogewinnung.

Unter Verwendung von sterilen Handschuhen (Supersensitive, Firma Joseph F. Müller, München) und sterilem Gleitgel (Firma Selectavet, Weyarn-Holzolling) führte der Operateur den Katheter des sterilen Schlauchsystems aus Kunststoff (Firma Minitüb, Tiefenbach) mit einer Länge von 1500 mm und einem Durchmesser von 12,5 mm durch die Zervix in den Uterus ein. Sobald der Katheter im Uteruskörper positioniert war, wurde der am Katheter befindliche Ballon vor der Zervix platziert und mit 100 ml Luft gefüllt. Der Ballon wurde soweit zurückgezogen, bis er gut fixiert war, sodass während des Spülvorganges keine Flüssigkeit in die Scheide abfließen konnte.

Im Anschluss daran wurden je nach Vorbericht der Stute (Maidenstute/Unipaar/Multipaar) 1 – 2 Liter einer 37 °C warmen Spüllösung (EquiPro + PVA [Polyvinylalkohol] + Antibiotikum; Firma Minitüb, Tiefenbach) durch das Schlauchsystem in den Uterus der Stute instilliert. Die Flüssigkeit wurde für 3 Minuten im Uterus belassen (Hinrichs, 1990). Nach 3 Minuten wurde die Spülflüssigkeit abgelassen und in einem 1l-Messzylinder aus Glas (Firma Minitüb, Tiefenbach) aufgefangen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Spülflüssigkeit vorsichtig am Rande des Zylinders entlang lief. Die Uterusspülung wurde dreimal wiederholt. Vor dem Ablassen der Spülflüssigkeit im letzten Durchgang wurde der Stute 1ml Oxytocin (Oxytocin, Firma Albrecht, Aulendorf) i.v. verabreicht. Abschließend wurde die Luft aus dem Ballon abgelassen, der Katheter aus der Gebärmutter entfernt und der Anogenitalbereich der Stute erneut gereinigt sowie die Schweifbandage entfernt. Die Stute erhielt nach der Spülung 2 ml PGF<sub>2α</sub> (Dinolytic [Dinoprost], Firma Pfizer, Pharmacia GmbH, Karlsruhe) i.m., um die Luteolyse des bestehenden Gelbkörpers auszulösen und so einen neuen Zyklus einzuleiten (DOUGLAS u. GINTHER, 1972; BROCKSCHMIDT et al., 1985; GINTHER, 1992).

Nach dem letzten Spüldurchlauf wurde die Spülflüssigkeit mit einem embryodichten EMCON-Filter (Firma Minitüb, Tiefenbach) gefiltert. Es wurden 15 ml (etwa ein Flüssigkeitsspiegel von 1 cm) der Spülflüssigkeit im Filter belassen und in eine gerasterte Petrischale (Firma Minitüb, Tiefenbach) mit einem Durchmesser von 94 mm verbracht. Der Filter wurde dann mittels einer mit Spülmedium gefüllten 20 ml-Spritze noch einmal gründlich durchgespült. Anschließend wurde die Spülflüssigkeit unter einem Stereomikroskop (Firma Wild, Völkermarkt, Österreich) mit angeschlossenem Heiztisch (Firma Minitüb, Tiefenbach) mäanderförmig auf das Vorhandensein eines Embryos durchgemustert. Der Spülvorgang ist in Abb. 3.3 dargestellt.

Der gewonnene Embryo wurde wie in Tabelle 2.1 morphologisch beurteilt und anschließend dreimal in Haltemedium (EquiPro Holding Medium: Zwitterion-gepufferte Lösung mit D-Glucose, Na-Pyruvat, 0,4 % BSA, Aminosäuren, Wachstumsfaktoren, Vitaminen sowie Antibiotika [Gentamycin und Kanamycin]; Firma Minitüb, Tiefenbach) gewaschen. Das Umsetzen des Embryos von einer Waschschale zur nächsten erfolgte mittels einer 20 µl-Unopette (Firma Minitüb, Tiefenbach) bzw. im Falle eines verhältnismäßig großen Embryos mit Hilfe einer Pipette (Firma Eppendorf, Hamburg).

Die Waschschalen (Petrischalen mit einem Durchmesser von 34 mm; Firma Minitüb, Tiefenbach) wurden zuvor auf einer an eine Steuereinheit (HT50, Firma Minitüb, Tiefenbach) angeschlossenen Wärmeplatte (180 x 180 x 10 mm, Firma Minitüb, Tiefenbach) auf 37 °C erwärmt. Nach dreifacher Waschung des Embryos wurde dieser in ein mit Holding Medium gefülltes Sammelröhrchen übertragen (4 ml; Firma Greiner, Bio-One, Frickenhausen), welches in ein Transportsystem für Embryonen (Embryo Transport Kit; Firma Minitüb, Tiefenbach) platziert wurde. Der Embryo Transport Kit sorgte für eine konstante Transporttemperatur von 37 °C.



Abb. 3.3.: Embryogewinnung. (A) Aufblasen des Ballons, (B) – (D) Spülvorgang, (E) Filtern der Spülflüssigkeit, (F) Petrischale zum Suchen und Waschen des Embryos, (G) –(H) Aufsuchen des Embryos mit dem Stereomikroskop

## 3.6. Laserverfahren

### 3.6.1. Lasertechnik

Bei dem in dieser Studie verwendeten Gerät handelt es sich um einen PALM MicroBeam Laser der Firma Zeiss (Carl Zeiss AG, Jena). Da dieses Gerät zwei Methoden miteinander kombiniert, wird diese Technik als „non-contact Laser microdissection and pressure catapulting (LMPC)“ bezeichnet (Abb. 3.4). Bei der Laser Microdissectionstechnik werden die gewünschten Zellen mit Hilfe des UV-A-Laserstrahls durch Ausschneiden von den übrigen Zellen separiert. Dies ist ein lokal begrenzter Ablösungsprozess mit einem sehr klaren Schnitt (Lasercutting), bei dem die benachbarten Zellen weder in irgendeiner Form beeinflusst werden noch die Probe verunreinigen können. Die effektive Laserenergie ist bei diesem Vorgang nur auf den ausgewählten Bereich gerichtet.

Im Anschluss daran können die ausgeschnittenen Zellen mit Hilfe der Laser Pressure Catapulting-Technik durch einen Lichtstrahl in die Höhe gehoben und in ein Sammelgefäß transportiert werden. Durch diese Kombinationstechnik kann eine kontaminationsfreie und behutsame Probenentnahme gewährleistet werden.

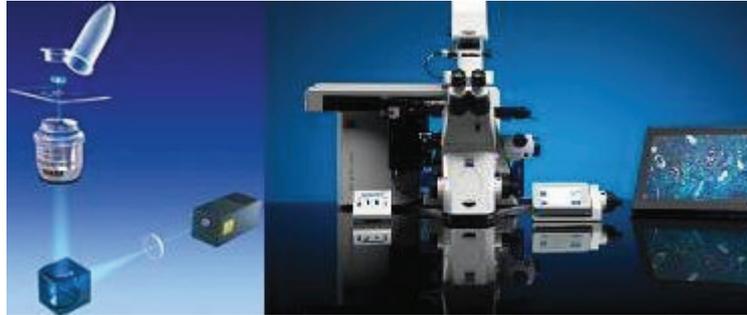


Abb. 3.4.: Das PALM MicroBeam Lasersystem von Zeiss ([www.zeiss.de](http://www.zeiss.de)).

### 3.6.2. Laserbehandlung

Embryonen der VGI und VGII wurden im Embryo Transport Kit (Firma Minitüb, Tiefenbach) vom Bayerischen Haupt- und Landgestüt Schwaiganger zum Helmholtz-Zentrum (Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, München) transportiert. Dort wurde das Sammelröhrchen mit dem Embryo aus dem Transport Kit herausgenommen und der Embryo in der Flüssigkeit in eine Petrischale (Firma Minitüb, Tiefenbach) überführt. Aus dieser wurde der Embryo mit einer Unopette oder einer Pipette (Firma Eppendorf, Hamburg) in eine spezielle, lasertaugliche Schale (Firma Ibidi, Martinsried) umgesetzt, in der sich etwa 1 ml Holding Medium (EquiPro, Firma Minitüb, Tiefenbach) befindet. Diese Laserschale wurde unter dem MicroBeam (Firma Carl Zeiss AG, Jena) platziert und der Embryo zunächst bei 100facher Vergrößerung morphologisch beurteilt, fotografiert und gemessen. Dann wurde die Lasermanipulation des Embryos durchgeführt, indem der Laser in seiner Position fixiert und der Embryo innerhalb der Schale in den Laserstrahl geschoben wurde. Die Kapsel wurde bei 630facher Vergrößerung fokussiert, scharfgestellt und fotografiert. Mit einer Apertur von 1, einem durchschnittlichen Focus von 27 sowie einer durchschnittlichen Energie von 25  $\mu\text{J}$  (18,5 – 49,4), 15 Pulsen pro Sekunde und einer Dauer von 3 Nanosekunden wurden je nach Versuchsgruppe 1 – 2 Löcher in die Kapsel des Embryos gelasert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass weder die unter der Kapsel liegenden Trophoblastzellen, noch die Zellen der ICM beschädigt wurden. Die Laserbehandlung konnte auf einem Monitor verfolgt werden. Sobald ein Defekt in der Kapsel zu sehen war, wurde dieser fotografiert und eine erneute Übersicht des Embryos erstellt.

Der Embryo wurde anschließend je nach Versuchsgruppe entweder zurück in das Sammelröhrchen (Firma Greiner, Bio-One, Frickenhausen) umgesetzt (VGII) und in den Transport Kit verbracht (Firma Minitüb, Tiefenbach), oder er wurde in seiner Position so verschoben, dass eine zweite Kapselöffnung gelasert werden konnte (VGI).

Nach Beendigung des Laserverfahrens wurde der Embryo vom Helmholtz-Zentrum zur LMU München transportiert, wo die Kultivierung erfolgte.

In Abb. 3.5 ist das Schema der Laserbehandlung dargestellt.

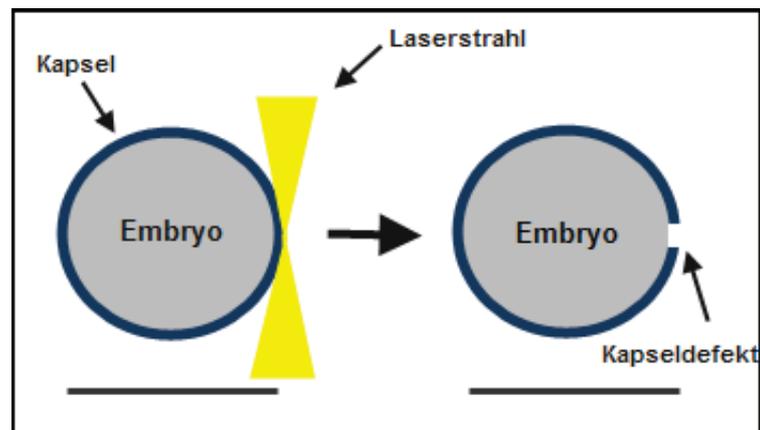


Abb. 3.5.: Schema der Laserbehandlung. Mit Hilfe des Laserstrahls wird eine Öffnung in die Kapsel gelasert.

### 3.7. Behandlung mit EG

Die Embryonen der KG II sowie der VG II werden im Anschluss an den Transport einer 10minütigen Behandlung mit EG (1,5 M EG in einer Zwitterion-gepufferten Lösung mit 0,1 M Sucrose, D-Glucose, Na-Pyruvat, 0,4 % BSA, Aminosäuren, Wachstumsfaktoren, Vitamine und Antibiotika [Kanamycin und Gentamycin], Firma Minitüb, Tiefenbach) ausgesetzt. Nachdem das Sammelröhrchen mit dem Embryo aus dem Transport Kit (Firma Minitüb, Tiefenbach) herausgenommen wurde, wurde der Embryo zusammen mit dem Holding Medium (EquiPro, Firma Minitüb, Tiefenbach) in eine Petrischale überführt. Unter einem Mikroskop (Axiovert, Firma Carl Zeiss AG, Jena) wurde der Embryo morphologisch beurteilt, gemessen und photographiert. Mit einer Unopette (Firma Minitüb, Tiefenbach) bzw. einer Pippette (Firma Eppendorf, Hamburg) wurde der Embryo unter dem Mikroskop (Axiovert, Firma Carl Zeiss AG, Jena) in eine Petrischale (Firma Minitüb, Tiefenbach) mit EG umgesetzt. In diesen zehn Minuten in EG wurde der Embryo unter dem Fluoreszenzmikroskop auf morphologische Veränderungen überprüft und jede Minute gemessen und photographiert. Anschließend erfolgte die Kultivierung.

### 3.8. Kulturverfahren

Die Embryonen aller Behandlungsgruppen wurden im Anschluss an die Gewinnung (KGI), an das Laserverfahren (VGI und VGII) bzw. an die Behandlung mit EG (KG II und VG II) für 48 Stunden kultiviert. Einige Embryonen wurden bis zu 72 bzw. 96 Stunden weiterkultiviert. Nach Entnahme der Embryonen von KGI und VGI aus dem Transport Kit (Firma Minitüb, Tiefenbach), wurden sie in ein Holding Medium (EquiPro; Firma Minitüb, Tiefenbach) in eine Petrischale überführt. Unter einem Mikroskop (Axiovert; Firma Carl Zeiss AG, Jena) wurden die Embryonen morphologisch beurteilt, gemessen und photographiert.

Die Kultivierung aller Embryonen erfolgte jeweils bei 38,5 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und maximaler Luftfeuchtigkeit.

1. KGI: Der Embryo wurde mit einer Unopette unter einem Stereomikroskop (Firma Wild, Völkermarkt, Österreich) zweimal in einer 4-Well-Schale (Nunc, Firma Roskilde, Dänemark) im Kulturmedium TCM-199 (100 ml Wasser, 220 mg NaHCO<sub>3</sub>, 5 mg Gentamycin-Sulfat, 2,2 mg Na-Pyruvat, 1510 mg Medium 199 Hepes Mod., Firma Sigma Steinheim sowie 10 % FCS Superior, Firma Biochrom, Berlin) gewaschen. Das Kulturmedium TCM-199, das in Anlehnung an embryonale Kultivierungsversuche von HOCHI et al. 1993 verwendet wurde, musste nach seiner Anfertigung für mindestens 4 Stunden im Brutschrank (HeraCell, Firma Heraeus, Hanau) bei 38,5 °C und 5 % CO<sub>2</sub> äquilibriert werden, bevor es zur Kultur verwendet werden konnte. Nach dem Waschen des Embryos folgte eine 15 minütige Kultur im Inkubator (HeraCell, Firma Heraeus, Hanau) bei 38,5 °C. Nach den 15 Minuten wurde der Embryo erneut morphologisch beurteilt, vermessen und photographiert und schließlich für weitere 24 bzw. 48 Stunden inkubiert. Nach 24 und 48 Stunden wurden die morphologische Beurteilung, die Messung der Größe sowie das Photographieren wiederholt.
2. VGI: Nach der Laserpunktion von zwei Kapseldefekten wurde der Embryo zunächst wie in KGI im Holding Medium morphologisch beurteilt, gemessen und photographiert. Nach zweimaligem Waschen in TCM-199 wurde er für 15 Minuten in TCM-199 im Inkubator bei 38,5 °C kultiviert. Danach wurde er erneut beurteilt, gemessen und photographiert. Nach weiteren 24 bzw. 48 Stunden Kultur wurde dieser Prozess jeweils wiederholt.
3. KGII: Nachdem der Embryo mit EG behandelt wurde, wurde er zweimal in einer 4-Well-Schale in TCM-199 gewaschen und schließlich für 15 Minuten, 24 und 48 Stunden im Kulturmedium TCM-199 im Inkubator bei 38,5 °C kultiviert. Dabei wurde er zu jedem Zeitpunkt morphologisch beurteilt, gemessen und photographiert.
4. VGII: Nachdem mit Hilfe eines Laserstrahles ein Kapseldefekt induziert wurde, wurde der Embryo einer 10minütigen EG-Behandlung ausgesetzt.

Im Anschluss daran wurde der Embryo wie in den übrigen Behandlungsgruppen zweimal in TCM-199 gewaschen und schließlich für 15 Minuten, 24 und 48 Stunden im Inkubator bei 38,5 °C kultiviert. Dabei wurde er jedes Mal morphologisch beurteilt, gemessen und photographiert.

### 3.9. DAPI

Nach 48 Stunden Kultur in TCM-199 im Inkubator bei 38,5 °C wurden alle Embryonen für 15 Minuten mit DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid; Firma Roche, Mannheim) angefärbt. DAPI ist eine membranundurchlässige Fluoreszenzfärbung, die verwendet wird, um tote Zellen sichtbar zu machen. Diese leuchten unter dem Fluoreszenzlicht blau.

Zur Färbung der Embryonen wurde eine Stammlösung mit 0,1 mg DAPI und 1 ml NaCl angefertigt. Für die Arbeitslösung wurden 50 µl der Stammlösung mit 450 µl Kulturmedium (TCM-199) gemischt.

Nachdem der Embryo nach 48 Stunden Kultur in TCM-199 unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert, Firma Carl Zeiss AG, Jena) morphologisch beurteilt, gemessen und photographiert wurde, wurde der Farbstoff (Stammlösung) dem Kulturmedium hinzugefügt. Nach weiteren 15 Minuten Kultur in dieser Mischung aus TCM-199 und DAPI wurde der angefärbte Embryo unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert, Firma Carl Zeiss AG, Jena) bei 450 nm betrachtet. Anhand photographischer Aufnahmen sowie Videomaterial wurde der prozentuale Anteil fluoreszierender toter Zellen an der Gesamtzellzahl geschätzt.

Einige wenige Embryonen wurden nach 72 bzw. 96 Stunden Kultur erneut mit DAPI angefärbt, um Unterschiede zum Fluoreszenzbild nach 48 Stunden zu untersuchen.

### 3.10. Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms StatView® (Abacus Concepts, Berkley, CA) ausgewertet. Neben der deskriptiven Statistik kamen der t-Test für gepaarte Stichproben (Durchmesser Kapsel und Embryo), die ANOVA zur Faktorenanalyse (Zeit, Behandlung) und der chi-Quadrat-Test (Reaktion der Embryonen in Abhängigkeit von der Behandlung) zur Anwendung. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  gewählt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Embryogewinnung

Nach Verabreichung von hCG erfolgte die Ovulation in den meisten Fällen (69,3 %) innerhalb der nächsten 36 – 48 Stunden. Bei den übrigen Stuten (30,7 %) fand die Ovulation verzögert statt.

Es wurden zwischen zwei und sieben Zyklen pro Stute zur Embryogewinnung genutzt. Insgesamt konnten bei 39 von 79 Spülungen 43 Embryonen (4 Zwillingspaare) gewonnen werden. 40 dieser Embryonen wurden für die Studie verwendet. Die Gesamtpülrate lag somit bei 54,4 %, wobei sie zwischen März und Juli 31,1 % und von Juli bis August 85,2 % betrug. Bei den dreijährigen Stuten lag die Spülrate im Schnitt bei 60 %, während sie bei den Fünf- bis Achtjährigen Stuten durchschnittlich bei 39,5 % lag. Die elfjährige Stute lieferte eine Spülrate von 71,4 %. Bei den Einzelstuten schwankte die Spülrate zwischen 0 und 100 %. Die Ergebnisse der einzelnen Stuten sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Die Qualität der Embryonen wurde anhand des morphologischen Klassifikationssystems von McKinnon und Squires 1988 (Tabelle 2.1) beurteilt und lag im Schnitt bei einem Score von I,I (I – III).

Die Größe der Embryonen lag bei der Gewinnung durchschnittlich bei einem Kapseldurchmesser von  $912,41 \pm 68,22$  (310 – 2600)  $\mu\text{m}$  und einem Embryodurchmesser von  $905,38 \pm 67,43$  (310 – 2600)  $\mu\text{m}$ . In den unterschiedlichen Behandlungsgruppen konnten zum Zeitpunkt der Gewinnung folgende Embryonengrößen gemessen werden:

1. KGI:  $778 \pm 104,66$  (310 – 1220)  $\mu\text{m}$
2. VGI:  $941,25 \pm 114,94$  (522 – 1500)  $\mu\text{m}$
3. KGII:  $1014 \pm 201,91$  (370 – 2600)  $\mu\text{m}$
4. VGII:  $923,22 \pm 84,41$  (607 – 1327)  $\mu\text{m}$

In Abb. 4.1 sind die Kapsel- und Embryodurchmesser zum Zeitpunkt der Gewinnung dargestellt. Die Kapsel- und Embryodurchmesser unterschieden sich zu diesem Zeitpunkt nicht. Des Weiteren konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen festgestellt werden.

Tab. 4.1.: In dieser Tabelle ist die Embryogewinnungsrate der einzelnen Stuten dargestellt (n=Anzahl).

Stute	Alter (Jahre)	Spülungen		Spülrate (%)	Embryonen (n)
		gesamt (n)	positiv (n)		
A1	8	6	3	50,0	4
A2	3	6	2	33,3	2
A3	7	7	2	28,6	2
A4	6	7	3	42,9	3
A5	6	6	2	33,3	2
D1	3	4	2	50,0	2
D2	5	3	1	33,3	1
D3	3	4	2	50,0	2
D4	3	2	2	100,0	2
D5	11	7	5	71,4	5
F1	3	6	5	83,3	5
F2	8	2	0	0,0	0
G1	8	5	2	40,0	3
G2	5	2	0	0,0	0
M1	8	6	5	83,3	6
S1	3	3	2	66,7	3
S2	7	4	1	25,0	1

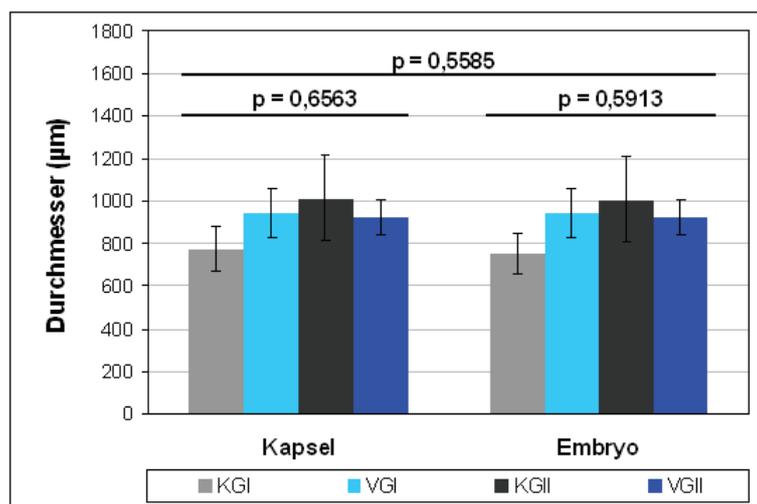


Abb. 4.1.: Kapsel- und Embryodurchmesser der Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt der Gewinnung.

In Tabelle 4.2 ist ein Überblick über die gewonnenen Embryonen dargestellt.

Tab. 4.2.: Überblick über die gewonnenen Embryonen.

Embryo (Nr.)	Gruppe	Qualität	Durchmesser bei Gewinnung ( $\mu\text{m}$ )	Manipulation	Verhalten nach 48 Stunden
1	KGI	I	750	-	Kapselruptur
2	KGI	I	450	-	Kapselruptur
3	KGI	I	850	-	Blastozoelekollaps
4	KGI	II	1200	-	Wachstum
5	KGI	III	310	-	Kapselruptur
6	KGI	I	910	-	Blastozoelekollaps
7	KGI	I	610	-	Kapselruptur
8	KGI	I	400	-	Blastozoelekollaps
9	KGI	I	1220	-	Wachstum
10	KGI	I	1080	-	Wachstum
1	VGI	I	780	Laserpunktion	Blastozoelekollaps
2	VGI	I	522	Laserpunktion	Blastozoelekollaps
3	VGI	I	-	Laserpunktion	Kapselruptur
4	VGI	I	1344	Laserpunktion	Blastozoelekollaps
5	VGI	I	989	Laserpunktion	Kapselruptur
6	VGI	I	789	Laserpunktion	Blastozoelekollaps
7	VGI	I	804	Laserpunktion	Blastozoelekollaps
8	VGI	I	802	Laserpunktion	Blastozoelekollaps
9	VGI	I	1500	Laserpunktion	Blastozoelekollaps
10	VGI	I-II	-	Laserpunktion	Blastozoelekollaps
1	KGII	I	2600	EG	Blastozoelekollaps
2	KGII	I	510	EG	Kapselruptur
3	KGII	I	370	EG	Kapselruptur
4	KGII	I	1300	EG	Wachstum
5	KGII	I	530	EG	Kapselruptur
6	KGII	I	820	EG	Wachstum
7	KGII	I	910	EG	Wachstum
8	KGII	I	1300	EG	Stagnation
9	KGII	I	820	EG	Wachstum
10	KGII	I	980	EG	Kapselruptur
1	VGII	I	-	Laserpunktion + EG	Blastozoelekollaps
2	VGII	I	993	Laserpunktion + EG	Wachstum
3	VGII	I	1187	Laserpunktion + EG	Wachstum
4	VGII	-	805	Laserpunktion + EG	Wachstum
5	VGII	I	820	Laserpunktion + EG	Blastozoelekollaps
6	VGII	I	667	Laserpunktion + EG	Blastozoelekollaps
7	VGII	I	1156	Laserpunktion + EG	Blastozoelekollaps
8	VGII	II	607	Laserpunktion + EG	Blastozoelekollaps
9	VGII	I	1327	Laserpunktion + EG	Blastozoelekollaps
10	VGII	I	747	Laserpunktion + EG	Blastozoelekollaps

## 4.2. Durchführbarkeit der Laserpunktion

Die Dauer der Laserbehandlung lag durchschnittlich bei  $19,4 \pm 2,71$  (5 – 46) Minuten. Während die Dauer bei der VGI mit zwei Laserdefekten im Schnitt bei  $22,7 \pm 3,84$  (5 – 46) Minuten lag, lag sie in der VGII mit einem Laserdefekt bei durchschnittlich  $16,1 \pm 3,71$  (5 – 46) Minuten. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen waren nicht signifikant ( $p=0,2324$ ). Embryonen, deren Laserbehandlung länger dauerte, zeigten im Vergleich zu Embryonen, deren Laserbehandlung kürzer dauerte, keinen Unterschied bezüglich ihres nachfolgenden Verhaltens. Die durchschnittlich verwendete Energie in VGI lag mit 15 Pulsen pro Sekunde, einer Dauer von 3 Nanosekunden und  $25 \mu\text{J}$  etwas höher als die Energie in VGII, die bei 15 Pulsen pro Sekunde, einer Dauer von 3 Nanosekunden und nur  $18,5 \mu\text{J}$  lag. Der Focus schwankte bei beiden Versuchsgruppen zwischen 26 und 38,9.

Mit Hilfe des Laserstrahles wurden ein bzw. zwei punktuelle Öffnungen in die embryonale Kapsel gelasert. Die Punktion der ersten Öffnung gestaltete sich schwieriger bzw. dauerte länger als diejenige der zweiten Öffnung. Die Kapsel wurde mit dem Laser fokussiert und anschließend dem Laserstrahl ausgesetzt. Die Laserbehandlung wurde solange ausgeführt, bis eine durch den entstandenen Kapseldefekt hinausdringende Trophoblastzelle sichtbar wurde. Dies wurde als Zeichen der erfolgreichen Laserpunktion gewertet und konnte bei allen Embryonen festgestellt werden. Der Laserverlauf ist in Abb. 4.2 zu sehen.

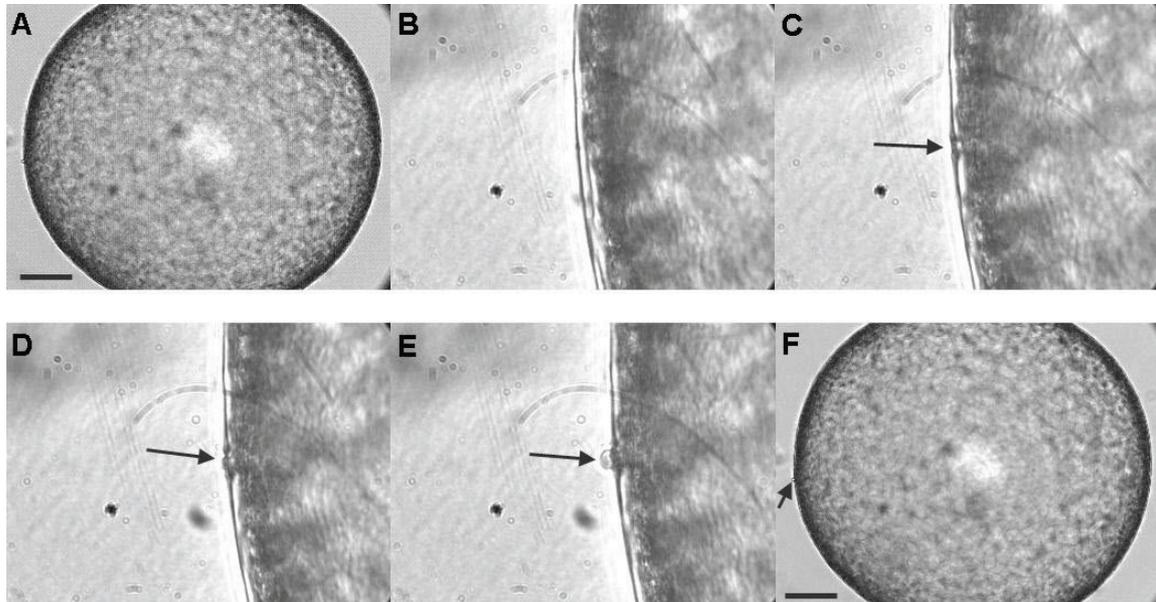


Abb. 4.2.: Verlauf der Laserpunktion: (A) Übersicht des Embryos (Embryodurchmesser:  $1327 \mu\text{m}$ ) vor der Laserpunktion, (B) scharfgestellte Kapsel vor der Laserpunktion, (C) geringgradige, laserinduzierte Einstülpung der Kapsel (Pfeil), (D) Kapseldefekt (Pfeil) (E) eine Trophoblastzelle (Pfeil) drückt sich durch den Kapseldefekt, (F) Übersicht des Embryos nach der Laserpunktion (Pfeil: Kapseldefekt; Embryogröße:  $1327 \mu\text{m}$ ). Balken =  $200 \mu\text{m}$ .

### 4.3. Reaktionen der Embryonen auf die Manipulationen

#### 4.3.1. Laserpunktion

In den Abb. 4.3 und 4.4 sind die Kapsel- und Embryodurchmesser vor und nach der Laserbehandlung dargestellt. Die Kapseldurchmesser weisen signifikante Unterschiede auf.

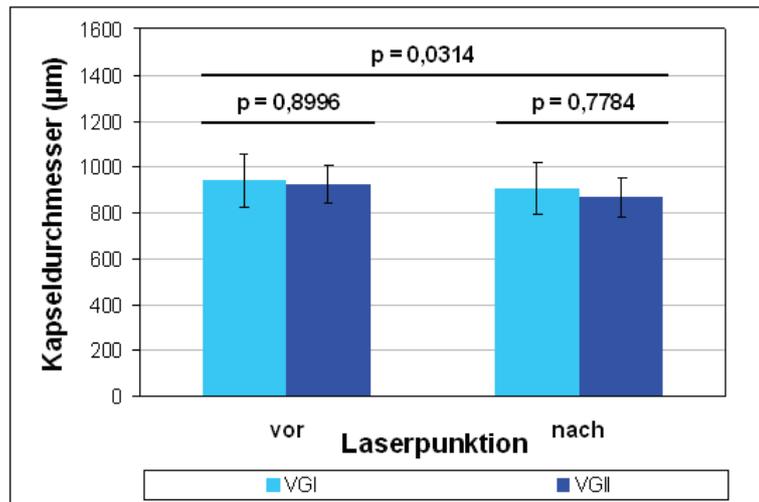


Abb. 4.3.: Kapseldurchmesser vor und nach der Laserpunktion.

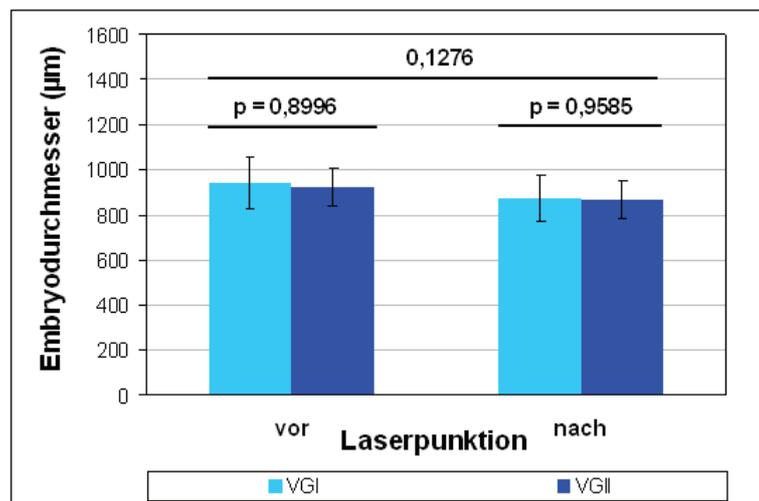


Abb. 4.4.: Embryodurchmesser vor und nach der Laserpunktion.

Ein besonderes Phänomen, welches in direktem Zusammenhang mit der Laserpunktion stand, war das Kollabieren eines Embryos aus VGI. Die Erzeugung des ersten Kapseldefektes dieses Embryos dauerte 12 Minuten. Nach weiteren 10 Minuten wurde die Energie auf  $49,4 \mu\text{J}$  erhöht. Der zweite Defekt entstand. Daraufhin kollabierte der Embryo innerhalb von Sekunden. Auffallend hierbei war die innerhalb der Kapsel sichtbare Zellunregelmäßigkeit der Trophoblasten. Während der folgenden 48 Stunden reexpandierte der Embryo fast vollständig. Nach 24 Stunden Kultur waren sowohl Zellverdichtungen als auch die Kapseldefekte sichtbar. Dennoch wurde der Anteil fluoreszierender Zellen nach 48 Stunden Kultur auf nur 10 % geschätzt. Der Verlauf der Entwicklung dieses Embryos nach der Laserbehandlung ist in Abbildung 4.5 dargestellt.

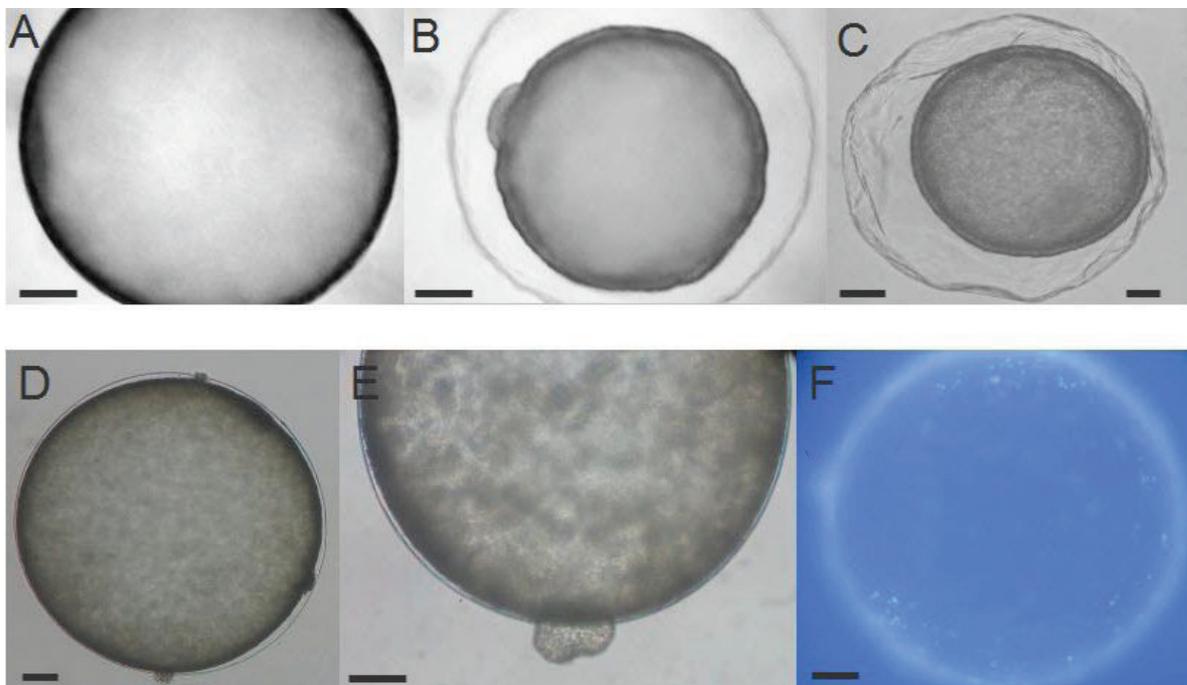


Abb. 4.5.: Kollabieren eines Embryos infolge der Laserpunktion: (A) Übersicht vor dem Kollabieren ( $1344 \mu\text{m}$ ), (B) kollabierter Embryo mit sichtbarer Zellausstülpung innerhalb der Kapsel nach der Laserpunktion ( $1220 \mu\text{m}$  Kapseldurchmesser,  $960 \mu\text{m}$  Embryodurchmesser), (C) nach 15 Minuten Kultur ( $1200 \mu\text{m}$  Kapseldurchmesser,  $900 \mu\text{m}$  Embryodurchmesser), (D) nach 24 Stunden Kultur ( $1520 \mu\text{m}$  Kapseldurchmesser,  $1500 \mu\text{m}$  Embryodurchmesser), (E) nach 48 Stunden Kultur, der Embryo ist nahezu vollständig reexpandiert und weist eine laserinduzierte Zellausstülpung auf ( $1480 \mu\text{m}$  Kapseldurchmesser,  $1460 \mu\text{m}$  Embryodurchmesser), (F) DAPI-angefärbter Embryo nach 48 Stunden Kultur ( $1460 \mu\text{m}$  Embryodurchmesser). Balken =  $200 \mu\text{m}$ .

### 4.3.2. Behandlung der Embryonen mit Ethylenglykol

Die Embryonen der KGII sowie nach Laserpunktion diejenigen der VGII wurden einer 10minütigen EG-Behandlung ausgesetzt. Während dieser Behandlung verringerten sich sowohl der Kapsel- als auch der Embryodurchmesser signifikant. In den Abbildungen 4.6 und 4.7 ist die Reduktion der Konzeptendurchmesser dargestellt.

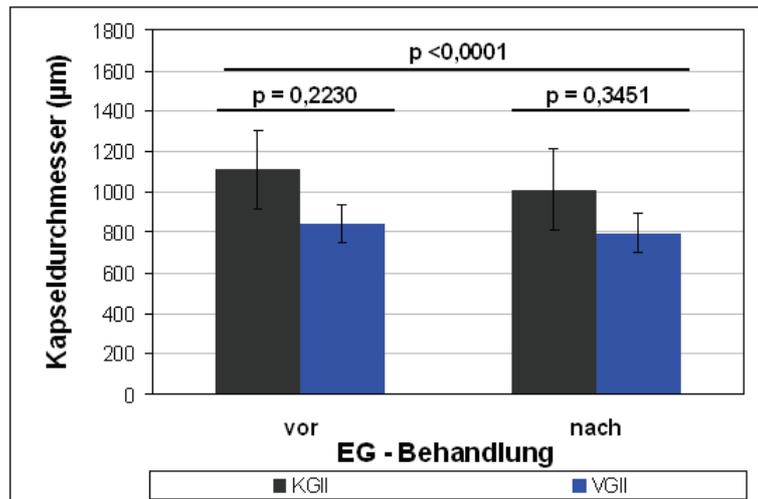


Abb. 4.6.: Kapseldurchmesser vor und nach EG-Behandlung.

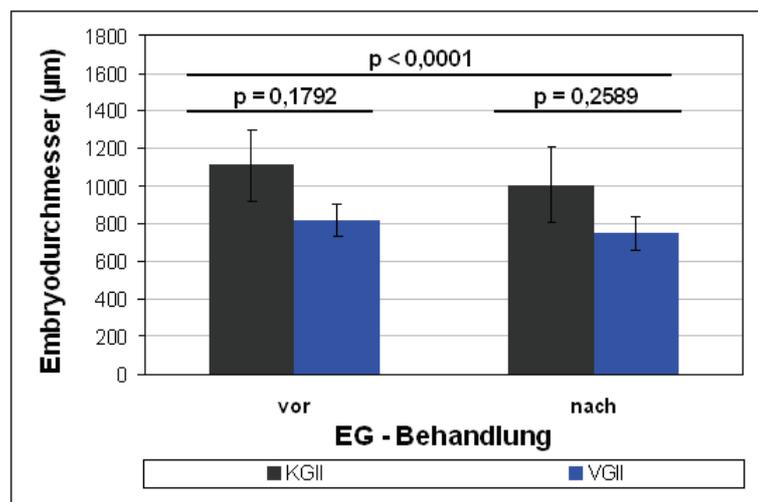


Abb. 4.7.: Embryodurchmesser vor und nach EG-Behandlung.

Nur ein einziger Embryo aus VGII kollabierte während der EG-Behandlung innerhalb der Kapsel. Dieses Verhalten ist in Abb. 4.8 dargestellt.

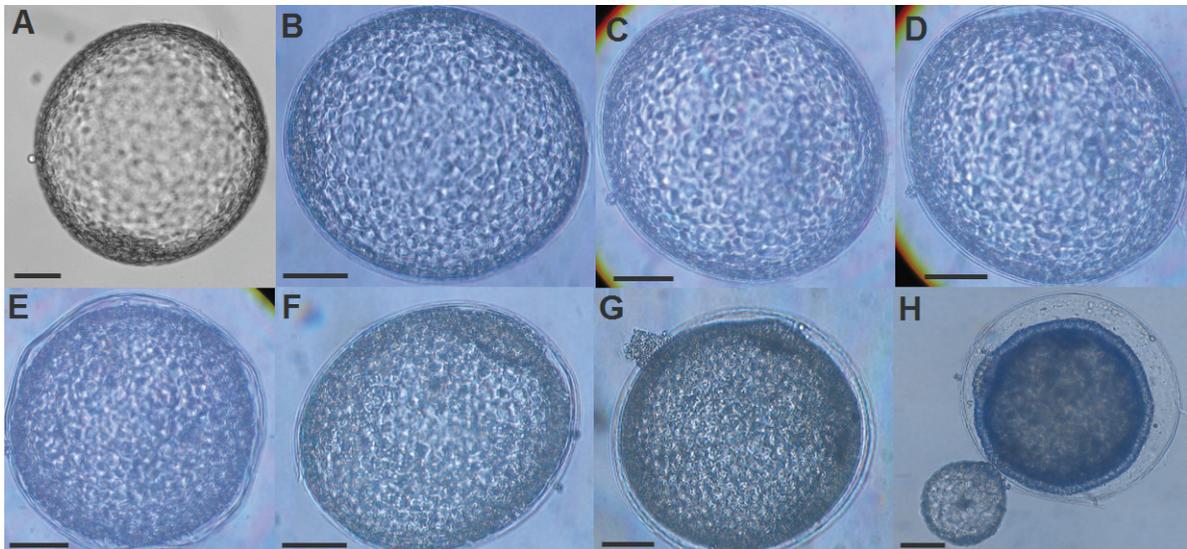


Abb. 4.8.: Reaktion eines Embryos aus Versuchsgruppe II auf die Behandlung mit EG: (A) Übersicht des Embryos nach dem Lasern (Embryodurchmesser:  $487 \mu\text{m}$ ), (B) vor der EG-Behandlung (Embryodurchmesser:  $460 \mu\text{m}$ ), (C) nach 2 Minuten in EG (Embryodurchmesser:  $450 \mu\text{m}$ ), (D) nach 5 Minuten in EG (Embryodurchmesser:  $440 \mu\text{m}$ ), (E) nach 10 Minuten EG (Kapseldurchmesser  $430 \mu\text{m}$ , Embryodurchmesser  $420 \mu\text{m}$ ), (F) nach 15 Minuten Kultur (Embryodurchmesser:  $430 \mu\text{m}$ ), (G) nach 24 Stunden Kultur (Kapseldurchmesser:  $490 \mu\text{m}$ , Embryodurchmesser:  $440 \mu\text{m}$ ), (H) nach 48 Stunden Kultur (Kapseldurchmesser:  $480 \mu\text{m}$ , Embryodurchmesser:  $400 \mu\text{m}$ ). Maßstab =  $100 \mu\text{m}$ .

#### 4.4. Embryokultur

Die Zeit zwischen der Gewinnung der Embryonen und dem Beginn der Kultivierung lag im Schnitt bei  $222,4 \pm 9,39$  ( $98 - 330$ ) Minuten. Diese Zeitspanne war bei Embryonen der KGI mit durchschnittlich  $161,30 \pm 13,46$  ( $98 - 250$ ) Minuten am kürzesten, gefolgt von KGII mit durchschnittlich  $218,10 \pm 16,4$  ( $135 - 289$ ) Minuten. Da das Laserverfahren mehr Zeit in Anspruch nahm, lag die Zeitspanne in der VGI bei durchschnittlich  $238,50 \pm 12,44$  ( $195 - 321$ ) Minuten bzw. in der VGII bei durchschnittlich  $271,70 \pm 14,86$  ( $180 - 330$ ) Minuten. Der Grund für die längere Zeitdauer in KGII und VGII war die 10minütige EG-Behandlung. Die zeitlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren signifikant ( $p < 0,0001$ ).

In Abb. 4.9 sind die verschiedenen Zeitspannen der einzelnen Behandlungsgruppen dargestellt.

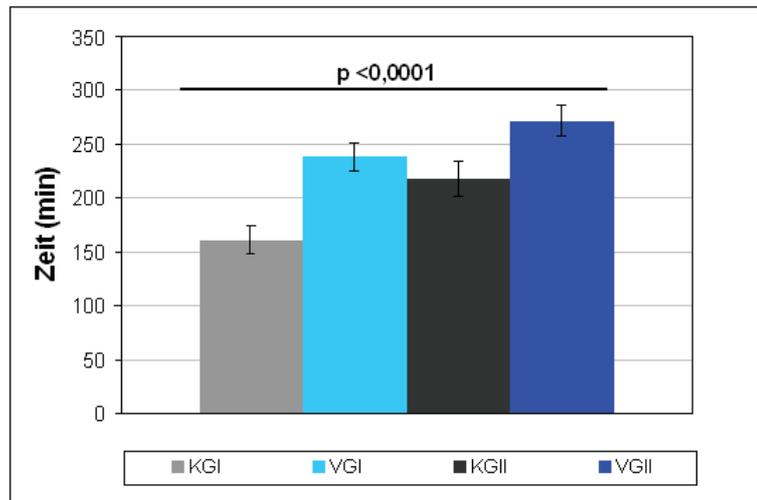


Abb. 4.9.: Zeitspanne zwischen der Embryogewinnung und dem Kulturbeginn

Die Reaktionen der Embryonen während einer Kulturdauer von 48 Stunden waren unterschiedlich. Grundsätzlich konnten vier verschiedene Verhaltensmuster (Wachstum, Stagnation, Blastozoelekollaps, Kapselruptur) beobachtet werden, die in der Tabelle 4.3 dargestellt sind. Während nach 24 Stunden Kultur keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen erkennbar waren ( $p = 0,0823$ ), änderte sich dies nach 48 Stunden deutlich ( $p = 0,0381$ ).

Tab. 4.3.: Reaktion der Embryonen auf die Manipulationen (n=Anzahl).

Reaktion	Behandlungsgruppen				Gesamt (n)
	KGI (n)	VGI (n)	KGII (n)	VGII (n)	
<b>24 Stunden Kultur</b>					
Wachstum	10	7	8	6	31
Stagnation	0	0	0	3	3
Blastozoelekollaps	0	2	2	1	5
Kapselruptur	0	1	0	0	1
	10	10	10	10	40
$p = 0,0823$					
<b>48 Stunden Kultur</b>					
Wachstum	3	0	4	4	11
Stagnation	0	0	1	0	1
Blastozoelekollaps	3	8	1	6	18
Kapselruptur	4	2	4	0	10
	10	10	10	10	40
$p = 0,0381$					

#### 4.4.1. Wachstum

Während innerhalb von 24 Stunden Kultur eine deutliche Wachstumstendenz in allen Behandlungsgruppen zu verzeichnen war ( KGI: 10 von 10, VGI: 7 von 10, KGII: 8 von 10, VGII: 6 von 10), wurde bereits nach 24 Stunden sichtbar, dass die KGI bzw. KGII diesbezüglich den beiden Versuchsgruppen tendenziell überlegen waren. Nach 48 Stunden änderte sich diese Wachstumstendenz allerdings sichtlich, sodass lediglich 3 Embryonen aus der KGI, 4 Embryonen aus KGII sowie 4 Embryonen aus VGII eine weitere Größenzunahme zeigten. In VGI konnte nach 48 Stunden kein gewachsener Embryo verzeichnet werden.

In Abb. 4.10 ist ein Beispiel für den Verlauf eines wachsenden Embryos über eine Kulturdauer von 48 Stunden dargestellt.

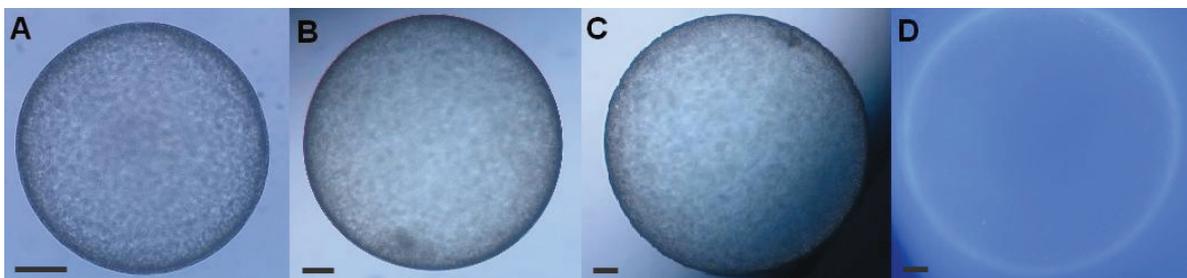


Abb. 4.10.: Wachstum eines Embryos: (A) vor der Kultivierung (Kapsel- und Embryodurchmesser:  $960\ \mu\text{m}$ ), (B) nach 24 Stunden (Kapsel- und Embryodurchmesser:  $1560\ \mu\text{m}$ ), (C) nach 48 Stunden (Kapsel- und Embryodurchmesser:  $2160\ \mu\text{m}$ ), (D) nach Anfärbung mit DAPI. Maßstab =  $200\ \mu\text{m}$ .

In den Abbildungen 4.11 und 4.12 sind die Kapsel- bzw. Embryonendurchmesser der Behandlungsgruppen während der Kulturdauer von 48 Stunden dargestellt.

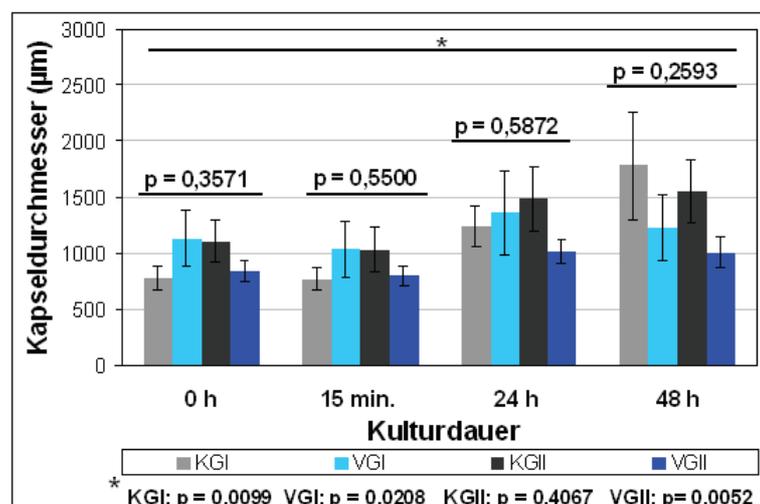


Abb. 4.11.: Kapseldurchmesser der Embryonen während der Kultur.

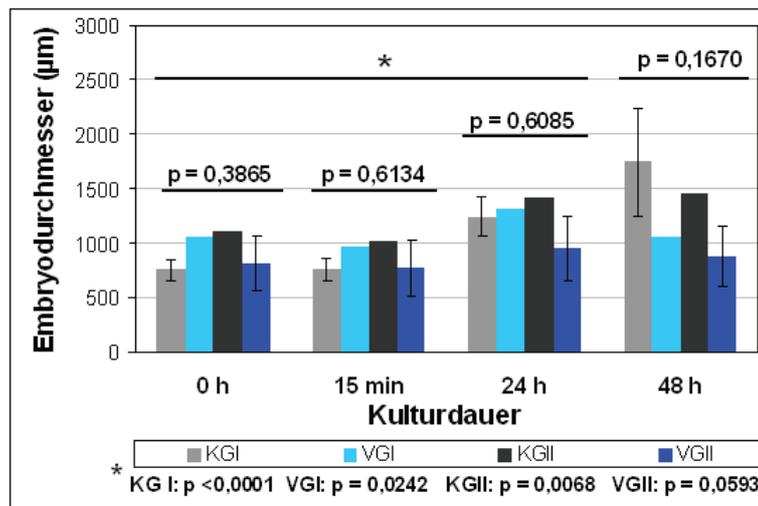


Abb. 4.12.: Embryodurchmesser während der Kultur.

In den Abbildungen 4.13, 4.14, 4.15 und 4.16 sind die Kapsel- und Embryodurchmesser der einzelnen Behandlungsgruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der Kulturdauer von 48 Stunden dargestellt.

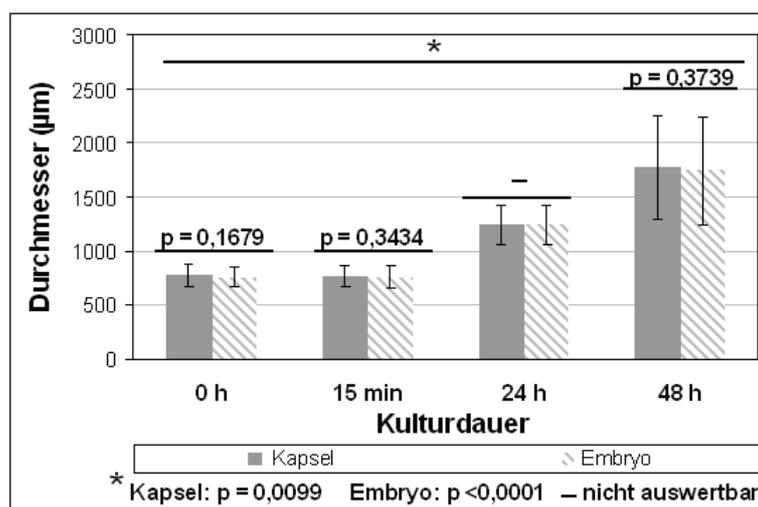


Abb. 4.13.: Kapsel- und Embryodurchmesser der KGI während der 48stündigen Kultur.

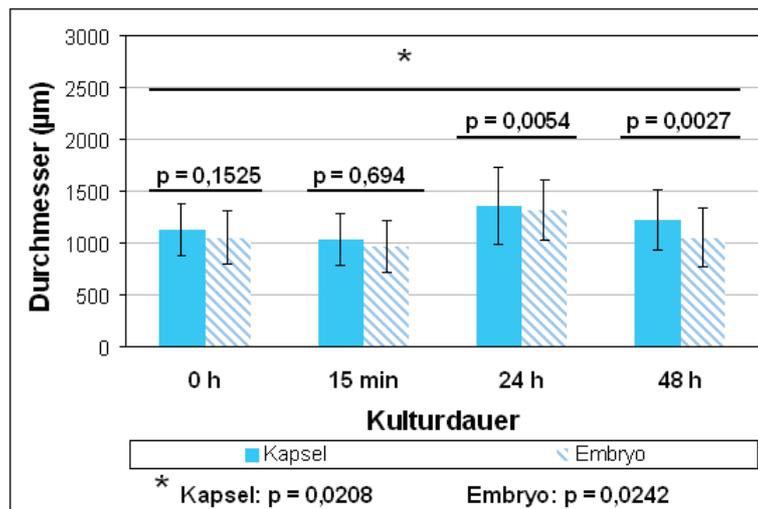


Abb. 4.14.: Kapsel- und Embryodurchmesser der VGI während der 48stündigen Kultur.

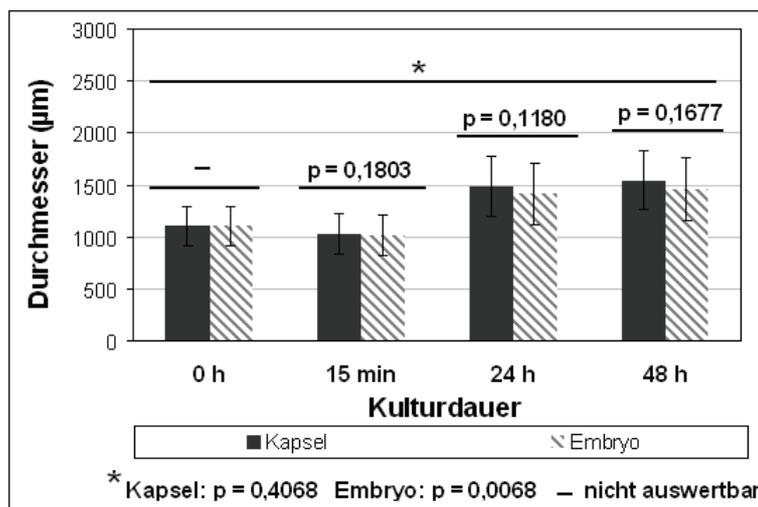


Abb. 4.15.: Kapsel- und Embryodurchmesser der KGII während der 48stündigen Kultur.

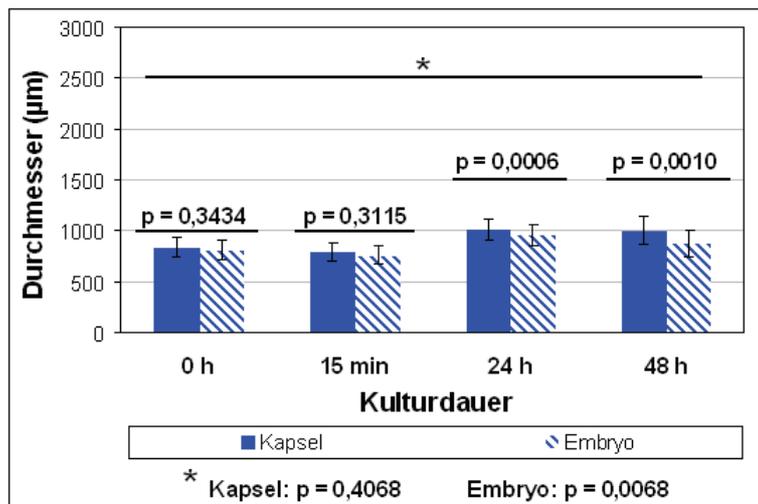


Abb. 4.16.: Kapsel- und Embryodurchmesser der VGII während der 48stündigen Kultur.

Während in den Abbildungen 4.17 und 4.18 das relative Wachstum der Kapseln bzw. Embryonen aller Behandlungsgruppen zwischen dem Zeitpunkt der Gewinnung und einem der späteren Zeitpunkte (15 Minuten, 24 und 48 Stunden) dargestellt ist, sieht man in den Abbildungen 4.19, 4.20, 4.21 und 4.22 das relative Wachstum der einzelnen Behandlungsgruppen. Anhand dieser Abbildungen wird deutlich, dass nach einer Kulturdauer von 48 Stunden signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen bezüglich der Kapsel- und Embryodurchmesser vorhanden waren ( $p = 0,1176$  bzw.  $p = 0,0672$ ).

Während die Kapseln und Embryonen der KGI zu jedem Zeitpunkt eine positive Wachstumsbilanz aufwiesen, wurden die Kapseln und Embryonen der KGII nach 48 Stunden wieder kleiner. Der Kapseldurchmesser der VGI wies nach 24 bzw. 48 Stunden eine minimal positive Wachstumsbilanz auf, der Embryodurchmesser hatte jedoch zu jedem Zeitpunkt eine negative Bilanz und erreichte seine Ausgangsgröße im Laufe der Kulturdauer von 48 Stunden nicht mehr. Das Wachstum der Kapseln bzw. Embryonen von VGII blieb gering und wurde nach 48 Stunden wieder kleiner.

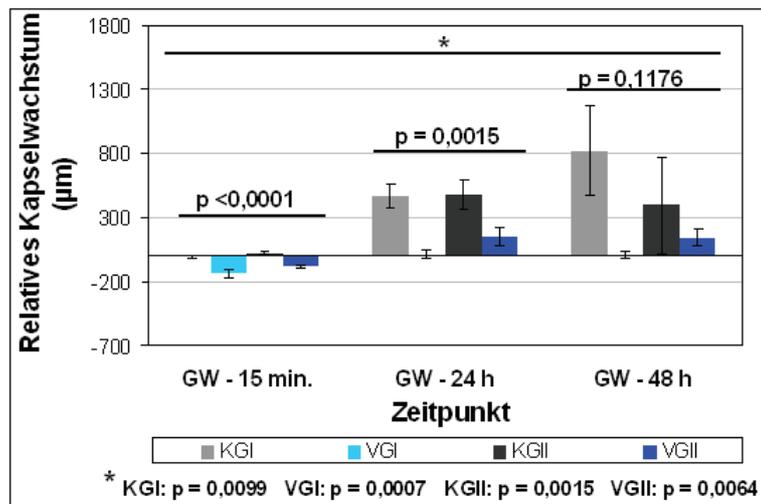


Abb. 4.17.: Relatives Kapselwachstum zwischen dem Zeitpunkt der Gewinnung und 15 Minuten bzw. 24 und 48 Stunden Kultur.

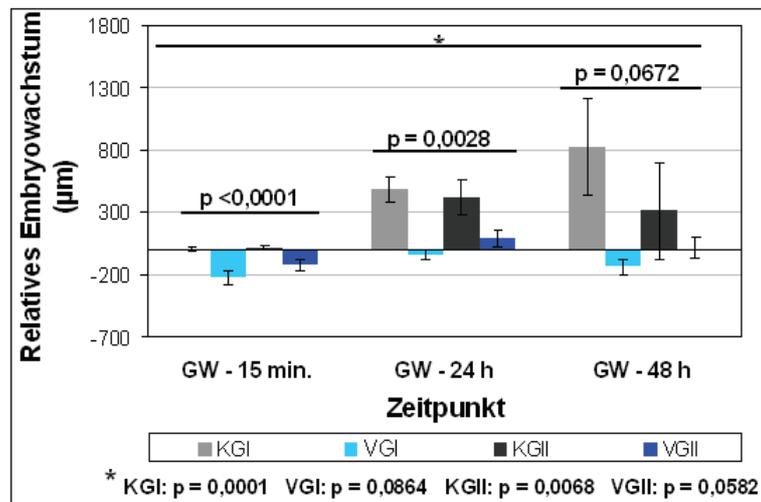


Abb. 4.18.: Relatives Embryowachstum zwischen dem Zeitpunkt der Gewinnung und 15 Minuten bzw. 24 und 48 Stunden Kultur.

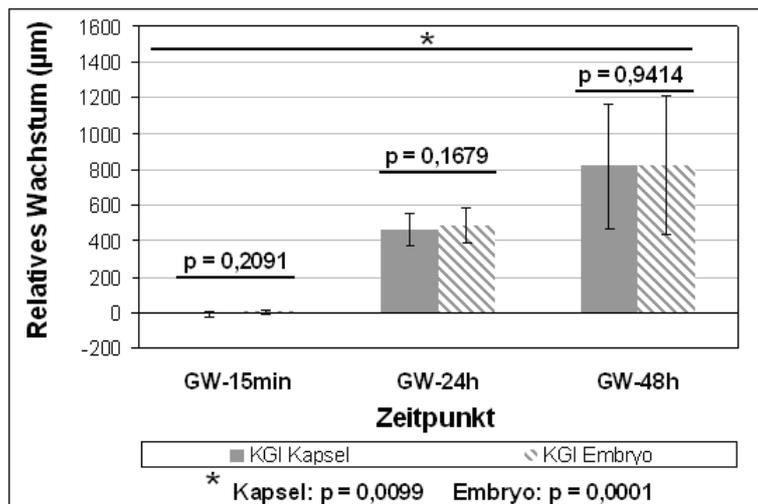


Abb. 4.19.: Relatives Wachstum der KGI

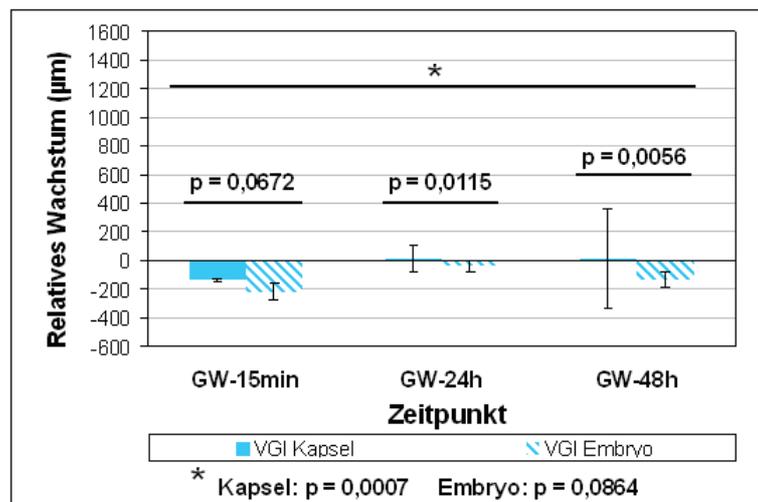


Abb. 4.20.: Relatives Wachstum der VGI

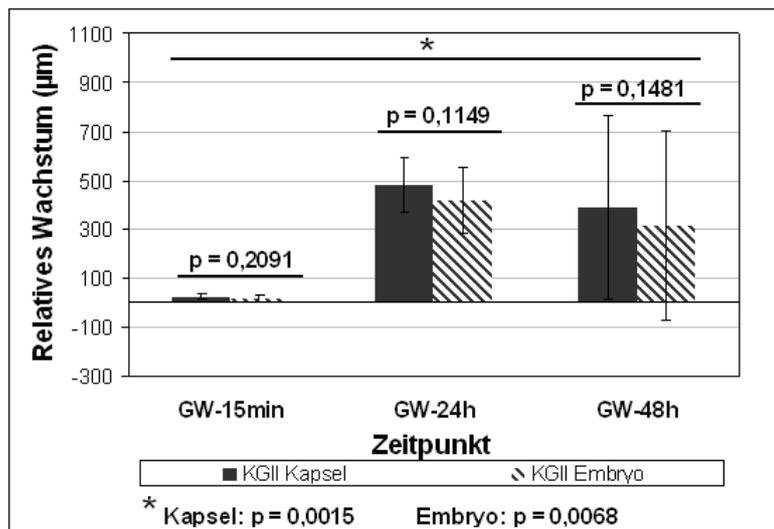


Abb. 4.21.: Relatives Wachstum der KGII

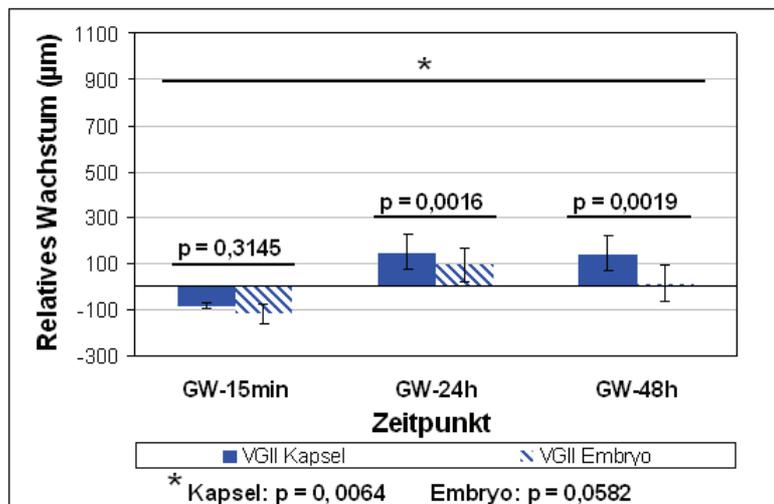


Abb. 4.22.: Relatives Wachstum der VGII

#### 4.4.2. Blastozoelekollaps

Während die Embryonen der VGI und VGII innerhalb der ersten 24 Stunden Kultivierung eine deutliche Wachstumstendenz aufwiesen (7 von 10 bzw. 6 von 10), änderte sich dieses Verhalten im weiteren Verlauf sichtlich. Zwischen 24 und 48 Stunden Kultur konnte eine klare Tendenz zum Blastozoelekollaps (8 von 10 bzw. 6 von 10) verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu war dieses Verhalten nur bei 3 von 10 (KGI) bzw. 1 von 10 (KGII) Embryonen der Kontrollgruppen zu sehen. Die Abbildung 4.23 stellt den zeitlichen Ablauf des Blastozoelekollapses dar.

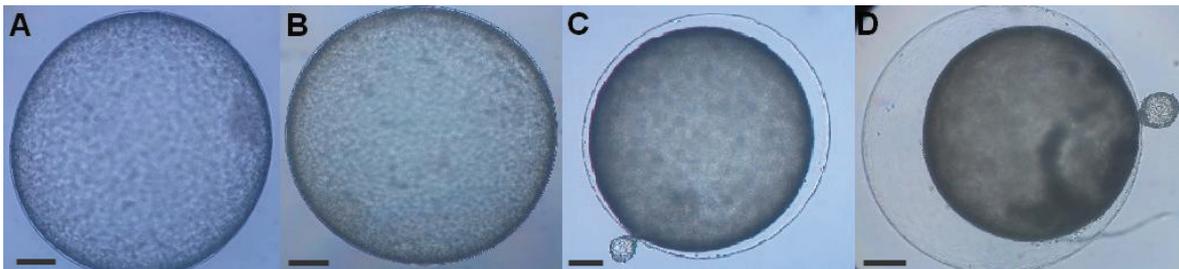


Abb. 4.23.: Blastozoelekollaps während der Kultur: (A) vor der Kultur ( $1300 \mu\text{m}$ ), (B) nach 15 Minuten (Kapsel- und Embryodurchmesser  $1300 \mu\text{m}$ ), (C) nach 24 Stunden (Kapseldurchmesser  $1360 \mu\text{m}$ , Embryodurchmesser  $1260 \mu\text{m}$ ), (D) nach 48 Stunden Kultur (Kapseldurchmesser  $1320 \mu\text{m}$ , Embryodurchmesser  $1020 \mu\text{m}$ ). Maßstab =  $200 \mu\text{m}$ .

#### 4.4.3. Kapselruptur

Ein weiteres Phänomen, welches vor allem die Embryonen der Kontrollgruppen betraf, war das Rupturieren der Kapsel. Während nach 24 Stunden Kultur 1 von 10 Embryonen der VGI eine Kapselruptur aufwies, konnte nach 48 Stunden Kultur bei 4 von 10 Embryonen der KGI, bei 2 von 10 Embryonen der VGI sowie bei 4 von 10 Embryonen der KGII eine Kapselruptur verzeichnet werden. In Abb. 4.24 ist der Verlauf einer Kapselruptur im Laufe der Kultivierung dargestellt.



Abb. 4.24.: Kapselruptur zwischen 24 und 48 Stunden Kultur: (A) vor der Kultur (Kapsel- und Embryodurchmesser  $600 \mu\text{m}$ ), (B) nach 24 Stunden (Kapsel- und Embryodurchmesser  $1080 \mu\text{m}$ ), (C) nach 48 Stunden, die Kapsel ist rupturiert (Breite des Embryos  $450 \mu\text{m}$ , Länge des Embryos  $650 \mu\text{m}$ ), (D) nach Anfärbung mit DAPI. Maßstab =  $200 \mu\text{m}$ .

#### 4.4.4. Zellausstülpungen

Eine weitere Eigenschaft der Versuchsgruppen I und II war das Durchdringen einzelner Trophoblastzellen bzw. ganzer Zellverbände durch den laserinduzierten Kapseldefekt. Dieses Verhalten ist in Abbildung 4.25 zu sehen. Während das Durchdringen ganzer Zellverbände durch den Kapseldefekt in VGI bei 4 von 10 Embryonen beobachtet werden konnte, waren dies in VGII bei 7 von 10 Embryonen der Fall. Das Herausquellen einzelner Trophoblastzellen im Zuge der Laserbehandlung konnte bei fast allen Embryonen der Versuchsgruppen beobachtet werden. Es wurde als Zeichen der erfolgreichen Laserpunktion gewertet.

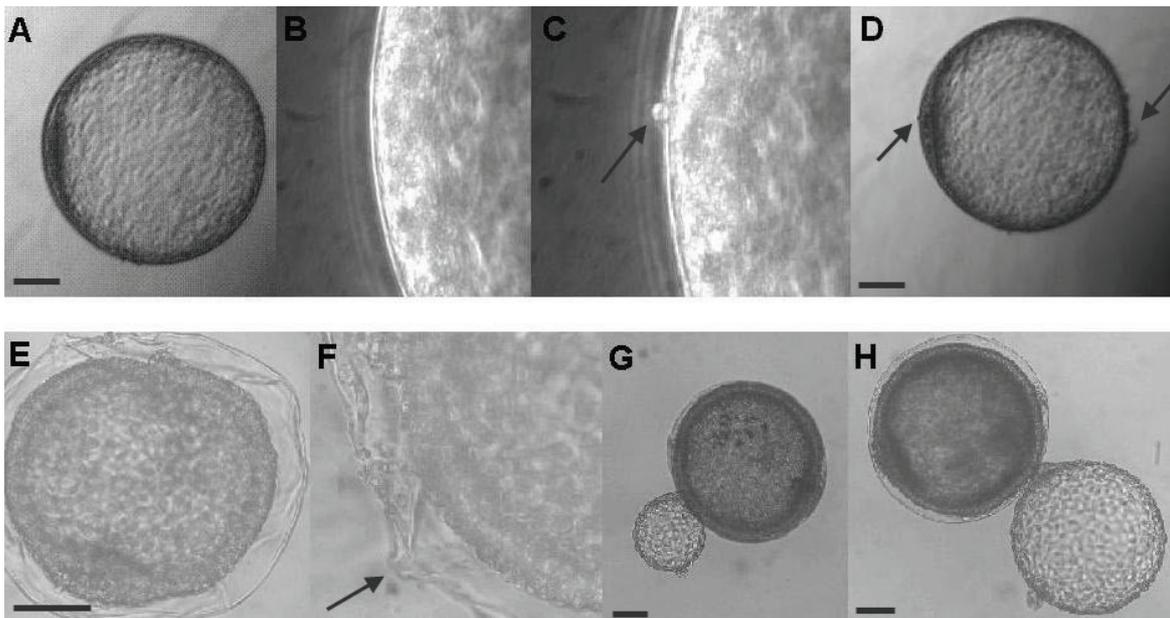


Abb. 4.25.: Teilausstülpung des Trophoblasten eines Embryos als Folge der Laserpunktion: (A) Übersicht des Embryos vor der Laserbehandlung (Kapsel- und Embryodurchmesser  $522 \mu\text{m}$ ), (B) scharfgestellte Kapsel, (C) durch den Kapseldefekt dringende Trophoblastzelle, (D) Übersicht nach dem Lasern (Kapsel- und Embryodurchmesser  $495 \mu\text{m}$ ), (E) Kollabieren von Kapsel und Embryo nach 15 Minuten Kultur (Kapseldurchmesser  $420 \mu\text{m}$ , Embryodurchmesser  $350 \mu\text{m}$ ), (F) kollabierte Kapsel mit sichtbarem Defekt, (G) nach 24 Stunden Kultur (Kapsel- und Embryodurchmesser  $440 \mu\text{m}$ ), (H) nach 48 Stunden Kultur (Kapseldurchmesser  $470 \mu\text{m}$ , Embryodurchmesser  $430 \mu\text{m}$ ), ein Teil der Zellen ist durch den laserinduzierten Kapseldefekt hinausgedrungen. Balken =  $100 \mu\text{m}$ .

## 4.5. DAPI

In Abbildung 4.26 ist der Anteil fluoreszierender Zellen (in %) nach 48 Stunden Kultur dargestellt. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen waren nicht signifikant.

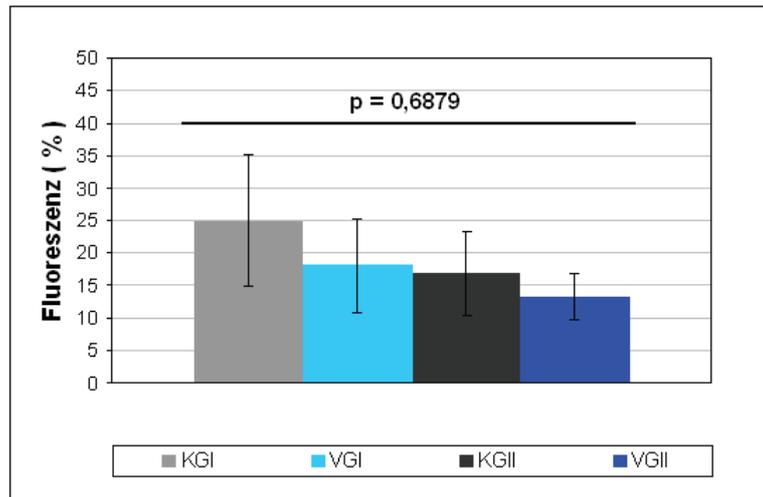


Abb. 4.26.: Anteil fluoreszierender Zellen nach 48 Stunden Kultur.

In Abb. 4.27 ist der Anteil fluoreszierender Zellen entsprechend dem Verhaltensmuster während der Kulturdauer von 48 Stunden dargestellt. Auch hier sind die Unterschiede nicht signifikant. Allerdings ist die Anzahl der Embryonen pro Gruppe sehr unterschiedlich (n=Anzahl).

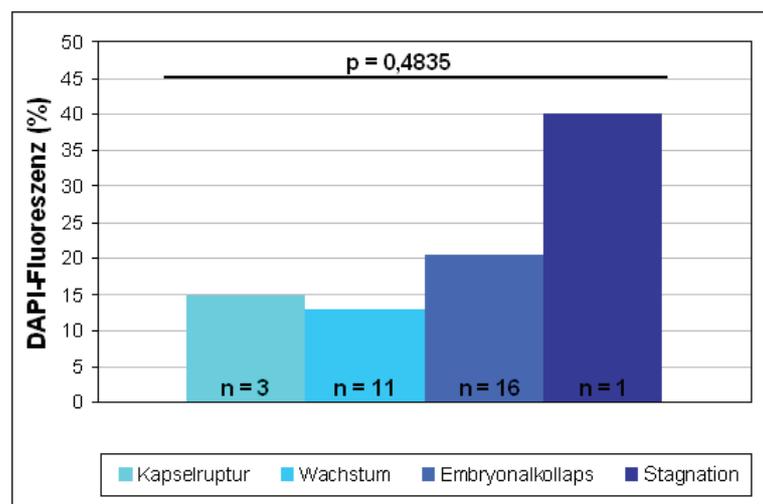


Abb. 4.27.: Anteil fluoreszierender Zellen entsprechend dem Verhalten während der Kulturdauer von 48 Stunden (n=Anzahl).

Je nach morphologischer Qualität der Embryonen nach 48 Stunden Kultur konnten verschiedene Farbmuster nach Anfärbung mit DAPI festgestellt werden. Diese sind in Abbildung 4.28 dargestellt.

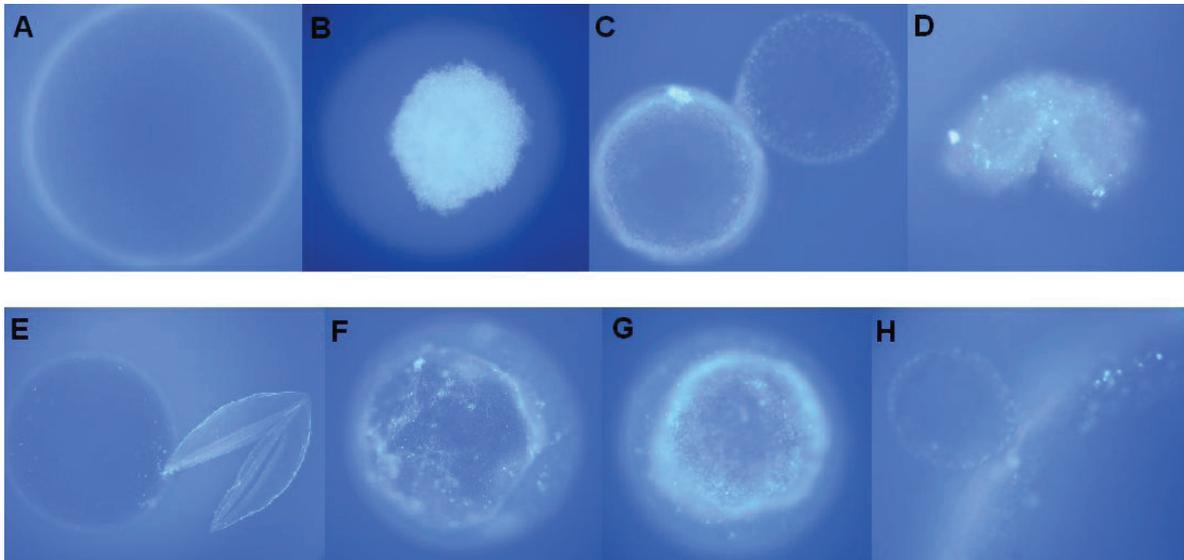


Abb. 4.28.: Unterschiedliche Fluoreszenz bei Embryonen nach Anfärbung mit DAPI: (A) nach 48 bzw. (B) nach 72 Stunden, (C) Zellausstülpungen nach 48 Stunden, (D) Embryo ohne Kapsel nach 48 Stunden, (E) Embryo inklusive rupturierter Kapsel nach 48 Stunden, (F) und (G) kollabierte Embryonen nach 48 Stunden, (H) Zellausstülpungen nach 48 Stunden Kultur.

Es ist auffallend, dass bei den meisten Embryonen, die nach der Anfärbung mit DAPI stark fluoreszierende Zellen aufwiesen, bereits vor der Färbung Zellverdichtungen oder Defekte in der Kapsel sichtbar waren. Dieses Phänomen ist in Abbildung 4.29 dargestellt.

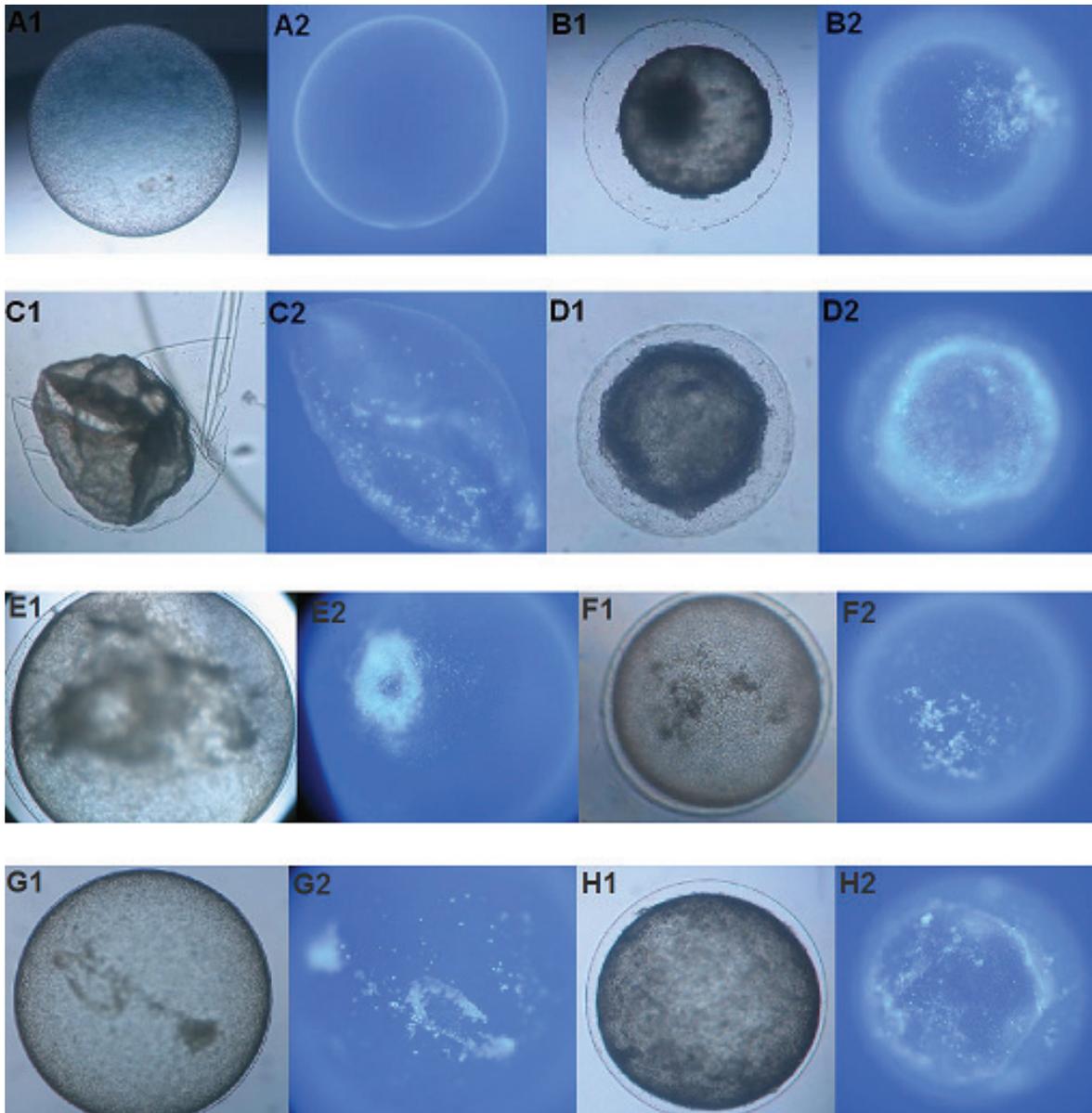


Abb. 4.29.: Embryonen nach 48 Stunden Kultur vor und nach der Anfärbung mit DAPI. (A1,A2) vitaler Embryo, (B1, B2) Embryo mit Zellverdichtungen, (C1, C2) Embryo mit rupturierter Kapsel, (D1, D2) kollabierter Embryo, (E1 – H1) Zellverdichtungen, die nach Anfärbung mit DAPI deutlich fluoreszieren (A2 – H2).

## 5. Diskussion

Die Impermeabilität der Glykoproteinkapsel des equinen Embryos für Kryoprotektiva wird dafür verantwortlich gemacht, dass expandierte equine Blastozysten nicht tiefgefriertauglich sind. Ein Lösungsvorschlag besteht darin, die Kapsel so zu beeinträchtigen, dass Kryoprotektiva in den Embryo eindringen können. Ziel der vorliegenden Arbeit war es demnach, das Verfahren der Laserpunktion als Methode zu etablieren und die Auswirkung der punktuellen, laserinduzierten Öffnung der embryonalen Kapsel auf die Vitalität und Viabilität acht Tage alter Pferdeembryonen *in vitro* zu untersuchen. Des Weiteren sollte geprüft werden, inwiefern sich die Laserpunktion auf das Verhalten des Embryos gegenüber der Exposition mit Ethylenglykol (EG) auswirkt. Das Ergebnis könnte im günstigsten Fall als Grundlage für ein erfolgreiches Tiefgefrierverfahren expandierter Blastozysten dienen. Bislang wurden jedenfalls keine Studien über das laserinduzierte Eröffnen der equinen Glykoproteinkapsel veröffentlicht.

### 5.1. Embryogewinnung

Die Uterusspülungen zur Embryogewinnung erfolgten zwischen März und August. Die Wahl des Zeitpunktes (Tag 8,5) liegt einerseits daran, dass für die Studie Embryonen mit einer vollständig ausgebildeten Kapsel benötigt wurden. Andererseits steigt mit zunehmendem Alter der Embryonen die Wahrscheinlichkeit einer guten Spülrate an (LAGNEAUX u. PALMER, 1991). Da Embryonen jedoch, die  $\geq 9$  Tage alt sind, anfälliger für manipulationsbedingte Schäden sind (MCKINNON u. SQUIRES, 1988b; CARNEVALE et al., 2000b; STOUT, 2006), wurden die Embryonen in dieser Studie an Tag 8,5 gewonnen.

Das dreimalige Wiederholen der Spülung mit jeweils 1 – 2 Litern Spüllösung sowie das 3minütige Belassen der Spüllösung im Uterus erfolgte in Anlehnung an eine Studie von HINRICHS (1990), in der mit Hilfe dieser Methode die Spülrate zwischen Tag 7 und 11 von durchschnittlich 55 – 80 % auf bis zu 105 % erhöht werden konnte. Dies liegt daran, dass der Embryo aufgrund seiner Mobilität bis zu seiner Fixierung an Tag 16 mit großer Wahrscheinlichkeit im Laufe der 3 Minuten auf die Spülflüssigkeit trifft und von dieser aufgenommen wird (HINRICHS, 1990).

In der Literatur sind unterschiedliche Angaben bezüglich der Spülrate zu finden. Diese reichen bei Spülungen an Tag 8 von 43,5 % (HUDSON u. MCCUE, 2004) bis 82 % (IULIANO et al., 1985).

Während in der vorliegenden Studie zwischen März und Juli nur eine Spülrate von 31,1 % erreicht wurde, betrug sie von Juli bis August 85,3 %. Die Gesamtspülrate von 54,4 % lag folglich unter der Erfolgsrate, die unter optimalen Bedingungen hätte erzielt werden können. Als Ursache für die in dieser Studie erzielte Spülrate von insgesamt 54,4 % kommen verschiedene Faktoren wie Jahreszeit, Methode der Uterusspülung, Alter und Fertilität der Stuten sowie die Samenqualität in Frage.

Die niedrige Spülrate zwischen März und Juli könnte jahreszeitlich bedingt gewesen sein. Allerdings haben KOT und TISCHNER (1991) höhere Spülraten im Frühjahr erzielt als im Sommer, sodass saisonale Einflüsse als Ursache unwahrscheinlich sind. Als weitere Möglichkeit kommt die Methode der Uterusspülung in Betracht. Da diese jedoch während des gesamten Gewinnungszeitraums unverändert angewandt wurde, scheidet sie ebenfalls als mögliche Ursache aus.

Für die Studie wurden Stuten im Alter von 3 bis 11 Jahren eingesetzt, die Spülraten zwischen 0 und 100 % erzielten. Entgegen den Angaben im Schrifttum (MCCUE et al., 2001) war jedoch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Spülrate und dem Alter der Stuten zu erkennen. Auch die Fertilitätsprognose anhand der histologischen Beurteilung von Uterusbiopsaten der Stuten ergab keinen Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der histologischen Untersuchung und dem Spülerfolg. Dies zeigte sich vor allem an der auffallend guten Spülrate (71,2 %) einer 11jährigen Stute mit vergleichsweise schlechtem Biopsiescore (IIb).

Eine entscheidende Rolle für die erfolgreiche Befruchtung und somit ein positives Spülergebnis spielt die Qualität des Spermas (SQUIRES et al., 2003a). Aufgrund der Tatsache, dass in dieser Studie frisches Sperma nachgewiesenermaßen fertiler Hengste einer staatlichen Besamungsstation verwendet wurde, gab es zunächst keinen Anlass, dessen Qualität in Frage zu stellen. Aufgrund der niedrigen Spülrate wurde der Samen ab Juni vor Insemination mikroskopisch untersucht und es wurde tatsächlich eine unzureichende Samenqualität festgestellt. Nach Reklamation und begleitender Kontrolle wurde schlagartig eine deutliche Verbesserung sowohl der Spermienqualität als auch der Spülrate verzeichnet, welche auf diese Weise von 31,1 auf 85,2 % erhöht werden konnte.

Zum Zeitpunkt der Gewinnung, die in 37 von 40 Fällen an Tag 8,5 sowie einmal an Tag 7,5 und zweimal an Tag 9,5 erfolgte, gab es keine signifikanten Größenunterschiede zwischen den Embryodurchmessern der einzelnen Behandlungsgruppen. Der 7,5 Tage alte Embryo mit einer Größe von 667  $\mu\text{m}$  sowie einer der 9,5 Tage alten Embryonen mit 1280  $\mu\text{m}$  wichen nicht wesentlich von der Größe der 8,5 Tage alten Embryonen ab. Lediglich ein 9,5 Tage alter Embryo wies mit 3200  $\mu\text{m}$  seinem Alter entsprechend den größten Durchmesser aller Embryonen auf. Die Größendifferenz der Embryonen zum Zeitpunkt der Gewinnung ist vermutlich auch auf das Zeitintervall zwischen den einzelnen Ovulationskontrollen zurückzuführen.

Da der Abstand zwischen den Ovulationskontrollen aus organisatorischen Gründen 24 Stunden betrug, ergab sich daraus ein maximaler Altersunterschied von 24 Stunden zwischen den Embryonen. Da ein Zellteilungszyklus in diesem Entwicklungsstadium etwa 6 Stunden dauert (COLCHEN et al., 2000), ist folglich je nach Ovulationszeitpunkt eine Größendifferenz von vier Zellteilungszyklen zwischen den Embryonen möglich. Die Mehrzahl der Embryonen hat zu diesem Zeitpunkt etwa eine Größe von 400 – 1000  $\mu\text{m}$  (SQUIRES et al., 2003a).

In Studien des Größenwachstums der Embryonen wurde beobachtet, dass sich die Größe der Embryonen in diesem Zeitraum täglich nahezu verdoppelt. So hat ein Embryo, dessen Größe an Tag sechs 200  $\mu\text{m}$  beträgt, an Tag sieben eine Größe von 380  $\mu\text{m}$  sowie an Tag acht eine Größe von 780  $\mu\text{m}$  (GINTHER, 1992). Allerdings gibt es eine erhebliche Größendifferenz zwischen „gleichaltrigen“ Embryonen zum Zeitpunkt der Gewinnung, sodass es selbst bei stündlicher Ovulationskontrolle nicht möglich gewesen wäre, eine auf die Größe bezogen homogene Embryonengruppe zu erhalten. Dies liegt daran, dass das Zeitintervall zwischen Ovulation und Befruchtung sowie die Entwicklungsgeschwindigkeit der Embryonen individuell verschieden ist (COLCHEN et al., 2000). In Anlehnung an SIROIS et al. (1987) wurde aufgrund dieses 24stündigen Zeitintervalls der Tag der Ovulationsdetektion als Tag 0,5 bezeichnet, die acht Tage später erfolgte Gewinnung der Embryonen folglich als Tag 8,5.

Im Rahmen dieser Studie war die Größendifferenz der Embryonen ein gewünschter Aspekt, um die Durchführbarkeit der Laserbehandlung bei unterschiedlich großen Embryonen zu testen. Aufgrund der unterschiedlichen Embryodurchmesser sowie der altersabhängig unterschiedlichen Kapseldicke war es möglich, die Behandlungen unter verschiedenen Bedingungen durchzuführen und die entsprechenden Reaktionen und Verhaltensweisen zu untersuchen. Dadurch konnte die Laserpunktionstechnik für ein breiteres Feld an Embryonengrößen und Kapseldicken etabliert werden. Als einziges Ausschlusskriterium für diese Studie galten Embryonen <300  $\mu\text{m}$  ohne Kapsel, da diese bereits erfolgreich tiefgefroren werden konnten. Dies steht im Gegensatz zu Embryonen mit einer Größe von >300  $\mu\text{m}$ , bei denen bislang - vermutlich aufgrund der Glykoproteinkapsel - keine erfolgreichen Tiefgefrierversuche verzeichnet werden konnten.

## 5.2. Laserpunktion

Um die vermutete Impermeabilität der Kapsel gegenüber Tiefgefrierschutzmitteln aufheben zu können, muss die Kapsel so beeinträchtigt werden, dass das Eindringen von Kryoprotektiva möglich wird. LEGRAND et al. (2000) schlugen die enzymatische Auflösung der Kapsel zur Verbesserung des Tiefgefrierverfahrens von Blastozysten vor. Ihr Ziel war es, durch die enzymatische Auflösung der Kapsel eine gesteigerte Permeabilität für Kryoprotektiva zu erreichen. Dabei stellte sich heraus, dass sich das Enzym Trypsin besser eignet als Kollagenase.

Während kleine Konzentrationen an Trypsin uneffektiv waren, wirkten große Konzentrationen wiederum toxisch auf den Embryo und führten zu einer großen Zahl nekrotischer Zellen. Nach enzymatischer Entfernung der Kapsel mit einer 2 %igen Trypsinlösung wurden die 8 Tage alten Blastozysten mit Glycerin tiefgefroren und nach dem Auftauen übertragen. Dabei konnten erstmalig Trächtigkeiten nach Übertragung expandierter Blastozysten erzielt werden (LEGRAND et al., 2000, 2002). Diese Ergebnisse konnten allerdings im Jahre 2002 nicht bestätigt werden (MACLELLAN et al., 2002). Ursache hierfür ist vermutlich, dass durch die Entfernung der Kapsel deren Schutzfunktion aufgelöst und damit die Überlebensfähigkeit der Embryonen *in vivo* reduziert wurde. Die Kapsel sollte folglich nicht ganz entfernt, sondern lediglich in ihrer Permeabilität verändert werden. Zu diesem Zweck wäre die Anwendung der Laserpunktion theoretisch geeignet, da die Kapsel nicht entfernt, sondern lediglich punktuell eröffnet wird.

Die Vorteile der Laserbehandlung gegenüber mechanischen oder chemischen Methoden sind neben der einfachen Technik sowie der kontrollierbaren, schnellen und präzisen Durchführbarkeit auch das Ausbleiben mechanischer, temperaturbedingter oder chemischer Schäden bei korrekter Anwendung. Allerdings ist bisher nicht klar, inwiefern die Laserstrahlen eine mutagene Wirkung auf den Embryo haben können. Bisher konnten in der Humanmedizin jedoch keine gesteigerten chromosomalen oder kongenitalen Abnormalitäten festgestellt werden (MAKRAKIS et al., 2006).

Das Ziel der Laserpunktion zweier Kapseldefekte in Versuchsgruppe I (VGI) war herauszufinden, inwieweit die Embryonen das Verfahren der Laserpunktion überleben und wie sie sich während einer anschließenden Kulturdauer von 48 Stunden verhalten. Die Wahl zweier Punktionsdefekte beruhte auf der Tatsache, dass in jedem Fall die Erzeugung zumindest eines Defekts sichergestellt werden sollte. Nachdem dies gewährleistet werden konnte und die Embryonen der VGI die Laserpunktion überlebten, sollte in VGII mit nur einem Kapseldefekt herausgefunden werden, inwieweit sich das Verhalten unbehandelter Embryonen in EG vom Verhalten der Embryonen mit einem Kapseldefekt unterscheidet. Außerdem war von Interesse herauszufinden, ob sich die Anzahl an Defekten auf die Reaktion der Embryonen auswirkt.

Die in dieser Studie angewendete Technik der punktuellen, laserinduzierten Kapseleröffnung konnte erfolgreich etabliert werden. Nach Scharfstellung der Kapsel war es möglich, ein bzw. zwei Laserdefekte in der Kapsel zu erzeugen. Die erfolgreiche Durchführung der Laserpunktion wurde anhand extrudierender Trophoblastzellen festgestellt. Die Beobachtung von BOUSQUET et al. (1987), dass die Kapsel bei Vorhandensein eines kleinen Defektes schnell reißt und dazu neigt, sich an den Enden einzurollen, konnte hier nicht bestätigt werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Laserpunktion im Vergleich zu anderen mechanischen Verfahren schonender für die Kapsel ist.

In dieser Studie wurde in der Regel eine Energie zwischen 18,5 – 25  $\mu\text{J}$ , 15 Pulsen pro Sekunde und einer Dauer von 3 Nanosekunden verwendet. Die Embryonen blieben dabei unverletzt. Bei einem Embryo aus VGI jedoch konnte kein Kapseldefekt induziert werden, bis die Energie auf 49,4  $\mu\text{J}$  erhöht wurde. Daraufhin kollabierte der Embryo innerhalb von Sekunden. Dies deutet darauf hin, dass eine zu hohe Energie schädlich für den Embryo ist.

Das Zeitfenster der Laserbehandlung (5 – 46 Minuten) war relativ breit. Das liegt daran, dass bei sehr großen Embryonen (>1300  $\mu\text{m}$ ) eine exakte Scharfstellung der Kapsel kaum möglich war. Dementsprechend länger dauerte das Fokussieren der Kapsel. Ein weiterer Grund für die lange Dauer der Laserbehandlung ist möglicherweise die Dicke der Kapsel. Obwohl die meisten Embryonen an Tag 8,5 gewonnen wurden, war aufgrund des Zeitintervalles von 24 Stunden zwischen zwei Ovulationskontrollen ein Altersunterschied von 24 Stunden (4 Zellteilungszyklen) möglich. Dementsprechend sind Unterschiede hinsichtlich ihrer Kapseldicke vorstellbar. Sogar zwischen den Versuchsgruppen konnte eine unterschiedliche Dauer der Laserpunktion verzeichnet werden. Während die Induktion zweier Kapseldefekte in VGI durchschnittlich 23 Minuten dauerte, betrug die Zeitspanne in VGII mit nur einem Kapseldefekt lediglich 16 Minuten. Ein weiterer Faktor, der die Laserdauer in VGI beeinflusste, war die Tatsache, dass die Erzeugung des ersten Defektes länger dauerte als die des Zweiten. Die Ursache hierfür ist unklar.

### 5.3. Reaktion der Embryonen auf die Manipulationen

#### 5.3.1. Laserpunktion

In der Humanmedizin und auch bei Rindereizellen wurden Laserverfahren bereits zur Extraktion des Polkörpers für die Präfertilisationsdiagnostik eingesetzt. Dabei kam es zum Kollabieren des Polkörpers bzw. zur Degeneration derjenigen Eizellen, deren Membran vermutlich vom Laserstrahl getroffen wurden (CLEMENT-SENNEWALD et al., 2002). Folglich besteht auch bei der Laserbehandlung equiner Embryonen die Gefahr, dass der Laserstrahl nicht nur die Kapsel, sondern auch die eng darunter liegenden Trophoblastzellen trifft und diese verletzt. Ein wesentlicher Faktor, der dabei beachtet werden sollte, ist die verwendete Energie des Laserstrahls. Nachdem bei einem Embryo der VGI die in dieser Studie in der Regel verwendete Energie von 25  $\mu\text{J}$  nicht ausreichte, wurde sie bis auf 49,4  $\mu\text{J}$  erhöht. Der Embryo kollabierte daraufhin innerhalb von Sekunden. Die Ursache dieses Verhaltens könnte sein, dass die Energie letztlich zu hoch war. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass der Laserstrahl nicht nur die Kapsel, sondern auch die eng darunter liegenden Trophoblastzellen getroffen hat, sodass der Embryo kollabierte. Betrachtet man die Bilder dieses Embryos, so wird diese Vermutung aufgrund von örtlich begrenzten Unregelmäßigkeiten des Trophoblasten bekräftigt. Das Reexpandieren dieses Embryos innerhalb von 24 Stunden Kultur zeigt jedoch, dass er trotz des Laserdefekts vital geblieben war.

Eine weitere Reaktion der Embryonen auf den Laserstrahl war das Extrudieren einzelner Trophoblastzellen durch den Kapseldefekt. Die Ursache für dieses Phänomen ist vermutlich, dass der Embryo unter enormem Druck steht. Folglich werden die Trophoblastzellen durch den laserinduzierten Kapseldefekt förmlich hinausgepresst. Das Extrudieren einzelner Trophoblastzellen direkt im Anschluss an das Laserverfahren konnte bei allen Embryonen im Zuge der Laserpunktion beobachtet werden.

Zwischen der Laserpunktion und dem Beginn der Embryokultur konnte eine signifikante Reduktion der Kapseldurchmesser der Konzepte beobachtet werden. Als Ursachen hierfür kommen das mehrmalige Pipettieren der Embryonen, die Lichtexposition während der Laserbehandlung sowie die Laserbehandlung selbst oder auch Temperaturschwankungen im Verlauf der Manipulation in Frage. Da sich die Embryonen im weiteren Kulturverlauf jedoch erholen, scheinen diese Faktoren keinen unmittelbar schädigenden Einfluss zu besitzen.

### **5.3.2. Behandlung der Embryonen mit Ethylenglykol**

Mit Hilfe der EG-Behandlung sollte untersucht werden, ob das Kryoprotektivum als Folge des laserinduzierten Kapseldefektes das Schrumpfen der Embryonen wie bei kleineren Embryonen ohne Kapsel auslösen kann. Das Schrumpfen der Embryonen erfolgt dadurch, dass das hypertone Kryoprotektivum den Zellen das intrazellulär vorhandene Wasser in Richtung der höheren, extrazellulären Molekülkonzentration entzieht, um ein osmotisches Gleichgewicht zu erhalten. Es sollte auch untersucht werden, ob das hypertone Kryoprotektivum (EG) anschließend durch den Kapseldefekt in den Embryo eindringen kann. Durch das Eindringen von EG und den nachfolgenden Wassereinstrom in die Embryonalzellen reexpandiert der Konzepteus wieder bis auf nahezu seine Ausgangsgröße. Durch diesen Vorgang soll die den Embryo schädigende Bildung intrazellulärer Eiskristalle verhindert werden (HOCHI et al., 1995b).

Die Entscheidung zur Verwendung von EG in dieser Studie wurde in Anlehnung an erfolgreiche Tiefgefrierersuche früher Blastozysten (HOCHI et al., 1996; HOCHI, 1998, 2003) getroffen. HOCHI et al. (1996) zeigten, dass frühe Blastozysten (ohne Kapsel) auf die EG-Behandlung mit Schrumpfen reagieren und anschließend wieder reexpandieren. Daher haben wir ein ähnliches Verhalten bei den Embryonen aus VGII erwartet. Im Gegensatz dazu wurde dieses Verhalten bei Embryonen aus KGII nicht erwartet, da bei diesen das Eindringen des Kryoprotektivums gemäß früherer Studien durch die Glykoproteinkapsel beeinträchtigt ist (HOCHI et al., 1995b). Die Tatsache, dass EG nicht nur schneller in frühe Blastozysten eindringt als Glycerin (PFAFF et al., 1993), sondern es sich auch besser zum Tiefgefrieren unreifer Cumulus-Oozyten-Komplexe eignet als Glycerin (HOCHI et al., 1994c), bekräftigte die Entscheidung für EG als Kryoprotektivum. Auch bei Rindern und Schafen konnten mit EG bereits bessere Ergebnisse als mit Glycerin erzielt werden (SONGSASEN et al., 1995; VOELKEL u. HU, 1992).

Während der zehnmütigen EG-Behandlung konnte bei den Embryonen aus VGII eine langsam erfolgende, signifikante Größenreduktion der Kapsel- und Embryodurchmesser festgestellt werden. Allerdings kam es nicht zu dem von HOCHI et al. (1994) beschriebenen Phänomen des Schrumpfens kleiner Embryonen ohne Kapsel auf 40 – 60 % des Ursprungsvolumens innerhalb der ersten Minute bei Verwendung von Glycerin als Kryoprotektivum. Auch die Reexpansion der Embryonen blieb aus. Dieses Verhalten wurde ebenfalls von HOCHI et al. (1994) für Embryonen mit einer Größe zwischen 498 – 980  $\mu\text{m}$  bei Verwendung von Glycerin beschrieben und auf das Vorhandensein der Kapsel bezogen (HOCHI et al., 1994d). Diese Theorie wurde allerdings immer wieder in Frage gestellt, da die Kapsel selbst für große neutrale Moleküle wie zum Beispiel Wasser durchlässig ist, sodass selbst bei expandierten Blastozyten mit einer Kapsel der Wasserausstrom möglich sein müsste (GUILLOMOT u. BETTERIDGE, 1984). Der erwartete Effekt des laserinduzierten Schrumpfens der Blastozyste mit anschließender Reexpansion konnte jedoch selbst in VGII mit einem laserinduzierten Kapseldefekt nicht beobachtet werden. Hierfür kommen verschiedene Ursachen in Betracht.

Möglicherweise war die EG-Konzentration von 1,5 M zu niedrig, um den Wasserentzug und somit das Schrumpfen des Embryos zu erzeugen. Da in früheren Studien bei humanen, murinen sowie bovinen Embryonen jedoch diese Konzentration erfolgreich verwendet werden konnte, ist dies als Ursache auszuschließen (EMILIANI et al., 2000; CHI et al., 2002; LIM et al., 2008).

Ebenso ist es denkbar, dass eine Inkubationszeit von zehn Minuten in EG zu kurz für das Eindringen des Kryoprotektivums durch den kleinen Kapseldefekt bemessen war, sodass weder das Schrumpfen noch die Reexpansion möglich war. Diese Hypothese müsste in weiteren Versuchen überprüft werden.

Eine weitere mögliche Erklärung für das Ausbleiben des Schrumpfens bzw. der Reexpansion ist die Tatsache, dass die Permeabilität von Pferdeembryonen gegenüber Ethylenglykol im Vergleich zu derjenigen von Rinderembryonen deutlich geringer ist (HOCHI et al., 1994b). Außerdem tritt die Undurchlässigkeit der Embryonen gegenüber Kryoprotektiva zu einem Zeitpunkt auf, an dem auch die Bildung des Endoderms bereits begonnen hat, welches innerhalb des Ektoderms, also der Trophoblastzellen, liegt und das Blastozoeel auskleidet. Aufgrund dieses Umstandes ist es möglich, dass nicht die Kapsel, sondern vielmehr das Endoderm für den erhöhten Widerstand gegen den Wasserausstrom bzw. das Eindringen von EG in den Embryo verantwortlich ist (GUILLOMOT u. BETTERIDGE, 1984; ENDERS et al., 1993; WAELCHLI u. BETTERIDGE, 1996; STOUT, 2006; BETTERIDGE, 2007; CREWS et al., 2007). Das Vorhandensein der bilaminären embryonalen Dottersackwand könnte folglich Einfluss auf den Wassertransport durch die Epithelien und somit sowohl auf das Wachstum des Embryos, als auch auf dessen Tiefgefrierfähigkeit haben (CREWS et al., 2007).

Da die laserinduzierte Öffnung der Kapsel bei Embryonen aus VGII keine nennenswerten Veränderungen nach sich gezogen hat, wäre es denkbar, dass die Ursache für das embryonale Verhalten das Vorhandensein des Endoderms ist. Es ist allerdings auch möglich, dass ein einzelner laserinduzierter Kapseldefekt nicht ausreichend ist, um die Permeabilität der Kapsel gegenüber Ethylenglykol zu verändern, sodass ein sichtbarer Effekt ausbleibt.

Um sicherzugehen, ob das EG in den Embryo gelangt ist oder nicht, müssten die Embryonen in weiteren Versuchen nach der EG-Behandlung auf das intrazelluläre Vorhandensein von EG untersucht werden.

In Kombination mit der Laserpunktion sollte die Untersuchung der Kinetik von EG eine Antwort auf die Frage bringen, ob wirklich die Kapsel für die reduzierte Tiefgefrierfähigkeit expandierter Blastozysten verantwortlich ist. Des Weiteren sollten verschiedene Inkubationszeiten getestet sowie der Effekt einer unterschiedlichen Anzahl an Kapseldefekten auf die Reaktion mit EG überprüft werden.

## 5.4. Embryokultur

Da es bis heute kein geeignetes Kultursystem für Pferdeembryonen gibt, ist das Kultivieren von Pferdeembryonen über einen Zeitraum von 48 Stunden bislang nicht die Methode der Wahl zur Lagerung von Embryonen. Die im Rahmen von Embryotransferprogrammen bevorzugte einfache und unschädliche Lagerung, um die Embryonen möglichst schnell vom Ort der Gewinnung zum Ort der Übertragung zu bringen, ist die Kühlung bei 5 °C. Prinzipiell sollten Embryonen so schnell wie möglich nach der Gewinnung bzw. nach dem Auftauen übertragen werden.

Die Kultivierung von Embryonen kann jedoch als Qualitätsmarker für die Lebensfähigkeit der Embryonen verwendet werden (HOCHI et al., 1994b; VANDERWALL, 1996; HOCHI, 2003).

In der vorliegenden Studie waren die meisten Embryonen nach 24 Stunden Kultur noch vital und es war eine deutliche Wachstumstendenz in allen Gruppen zu erkennen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant. Nach 48 Stunden ergaben sich allerdings signifikante Unterschiede im Verhalten der Embryonen zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen. Embryonen aus VGI und VGII wurden nach 48 Stunden Kultur wieder kleiner und ihre morphologische Qualität nahm ab. Die Vermutung, dass dieses Verhalten an einer unzureichenden Nährstoffversorgung in vitro liegt kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da in diesem Falle auch die Embryonen der Kontrollgruppen ein ähnliches Verhalten zeigen müssten.

Des Weiteren nahmen sowohl die Laser- als auch die EG-Behandlung Einfluss auf das Verhalten und die Vitalität der Embryonen in Kultur. Bei der Kombination von Laser- und Ethylenglykolbehandlung (VGII) reagierten die Embryonen mit einer Wachstums- und Vitalitätsreduktion. Im Vergleich dazu wurde das Wachstum der Embryonen aus VGI weniger beeinträchtigt. Embryonen aus KGII (EG) wiesen zwar eine deutliche Wachstumstendenz auf, Embryonen aus KGI zeigten jedoch das größte Wachstum. Diese unterschiedlichen Verhaltensweisen verdeutlichen, dass sowohl die Laser- als auch die EG-Behandlung einen negativen Einfluss auf das Wachstum der Embryonen hat. Die Kombination beider Behandlungen verstärkt diesen Effekt, sodass die Ergebnisse der Embryonen aus VGII in Bezug auf das Wachstum und die Vitalität vergleichsweise schlecht ausfielen.

Betrachtet man das relative Wachstum, so fällt auf, dass die Kapseln und Embryonen der KGI während der gesamten Kulturdauer stetig wachsen. Während die Embryonen der VGI die bei der Gewinnung vorhandene Größe im Laufe der Kultur nicht mehr erreichen, übersteigen die Kapseln die Ausgangsgröße minimal. Die Embryonen sind durchschnittlich immer etwas kleiner als die Kapseln. Bei den Embryonen der KGII, deren Kapseln und Embryonen zu jedem Zeitpunkt eine positive Wachstumsbilanz aufweisen, werden die Kapseln und Embryonen nach 48 Stunden wieder kleiner. Dies liegt daran, dass gerade die am stärksten wachsenden Embryonen die Kapsel bereits vor diesem Zeitpunkt sprengten und daher nicht mehr vermessen werden konnten. Auch in VGII verhält es sich so, dass die Embryonen stets etwas kleiner sind als die Kapseln. Die Wachstumsbilanz ist hier nach 24 bzw. 48 Stunden positiv, allerdings wird der Embryo nach 48 Stunden wieder kleiner.

Anhand des relativen Wachstums wird deutlich, dass unbehandelte Embryonen (KGI) das beste Wachstum aufweisen. Ein etwas geringeres Wachstum zeigen die Embryonen aus KGII, nachdem sie einer zehnmütigen EG-Behandlung unterzogen worden waren. Während die Embryonen aus VGII immerhin ein geringgradiges Wachstum aufwiesen, war die Wachstumsbilanz der Embryonen aus VGI zu jedem Zeitpunkt negativ.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird deutlich, dass die Laserbehandlung einen nachteiligen Einfluss auf die Wachstumsbilanz der Embryonen hat. Während die Induktion nur eines Laserdefektes eine minimal positive Wachstumsbilanz ermöglicht, ist das Wachstum nach Induktion zweier Kapseldefekte nur geringgradig möglich. Das Blastozoele kollabiert. Insgesamt zeigten drei Embryonen aus VGII nach 24 Stunden eine Stagnation des Wachstums. Zwei dieser Embryonen kollabierten nach 48 Stunden Kultur, während einer dieser Embryonen weiterwuchs. Ein Embryo aus KGII, der bereits nach 24 Stunden kollabiert war, stagnierte nach 48 Stunden. Dies könnte daran liegen, dass dieser Embryo während des Transportes oder der Manipulation einen Schaden erlitten hat. Eine weitere Möglichkeit ist, dass der Embryo bereits zum Zeitpunkt der Gewinnung eine schlechtere Qualität aufgewiesen hat, welche zu diesem Zeitpunkt mikroskopisch jedoch nicht sichtbar war.

Fast die Hälfte der Embryonen aus den Kontrollgruppen zeigten nach 48 Stunden Kultur eine deutliche Tendenz zur Kapselruptur. Das Auftreten dieses Phänomens konnte bereits 1995 von HOCHI et al. beobachtet werden (HOCHI et al., 1995b). Allerdings erfolgte die Kapselruptur in diesem Zusammenhang nach Vitrifikation der Embryonen, sodass ein direkter Vergleich der Beobachtungen mit denjenigen der vorliegenden Studie nicht möglich ist.

Die Kapselruptur während der Kultur von 48 Stunden ist vermutlich auf das enorme Größenwachstum der Embryonen innerhalb kürzester Zeit und dem dadurch entstehenden Überdruck zurückzuführen, dem die Kapsel nicht standhalten kann und rupturiert. Der Grund für dieses Verhalten könnte der in vitro fehlende Gegendruck der Uteruswand auf die Kapsel sein.

Darüber hinaus ist das Fehlen von für das Kapselwachstum wichtigen Nährstoffen in vitro dafür verantwortlich, dass die Kapsel nicht im ausreichenden Maß gebildet wird. In vivo werden die Glykoproteine der Kapsel vor allem von den Trophoblastzellen gebildet, wobei eine Beteiligung des Endometriums nicht ganz auszuschließen ist. Insofern wäre es möglich, dass das Wachstum der Kapsel aufgrund der mangelnden Kulturbedingungen in vitro negativ beeinträchtigt wird, sodass sie dem Druck des Embryos nicht mehr standhalten kann und rupturiert. Da der Embryo innerhalb kürzester Zeit enorm an Größe zunimmt, muss auch die Kapsel in der Lage sein, sich zu dehnen bzw. zu wachsen. Die Tatsache, dass die Kapsel in vivo im Laufe der Zeit nicht nur größer, sondern auch dicker wird, spricht eher für ein Wachstum als für eine Dehnung der Kapsel. In vivo wird die Kapsel bis Tag 22 nach und nach dünner, bis sie schließlich ganz verschwindet. Das Phänomen der Kapselruptur ist also spezifisch für in vitro kultivierte Embryonen. Bei diesem Vorgang bleiben die Embryonen in der Regel nicht intakt, sondern rupturieren ebenfalls und verlieren ihre Blastozystenflüssigkeit. Der dadurch in sich zusammenfallende Embryo erscheint wie eine kompakte Zellmasse.

Ein weiteres Phänomen der in-vitro-Kultur ist das *Schlüpfen* der Embryonen aus der Kapsel, bei der die Form des Embryos sowie die Blastozystenflüssigkeit erhalten bleibt. Während das Extrudieren einzelner Trophoblastzellen bei allen gelaserten Embryonen direkt nach der Laserbehandlung beobachtet werden konnte, waren es nur vier von zehn Embryonen in VGI bzw. sieben von zehn Embryonen in VGII, bei denen es während einer Kulturdauer von 48 Stunden zum Herausdringen ganzer Zellverbände kam. Dieses Verhalten konnte bereits im Jahre 1994 von HOCHI et al. bei der Kultivierung von Embryonen beobachtet werden und wurde als *Squeezing* bezeichnet. Damit wurde der Verlust der Zona pellucida in vitro definiert, bei dem sich die frühe Blastozyste (ohne Kapsel) durch ein kleines Loch in der Zona pellucida hinausdrückt. Dieses Verhalten konnte bislang nur in vitro beobachtet werden (MCKINNON et al., 1989; HINRICHS et al., 1990; HOCHI et al., 1993; STOUT, 2006).

An Human- und Mäuseembryonen konnte bereits vor einigen Jahren gezeigt werden, dass die Methode des „assisted hatching“ (Schlupfhilfe), bei der mit Hilfe eines Laserstrahls ein Defekt in der Zona pellucida hervorgerufen wird, den Schlupf von in vitro gereiften Blastozysten deutlich verbessert (VOS u. STEIRTEGHEM, 2000).

Da es sich bei den Embryonen in der vorliegenden Studie jedoch um expandierte Blastozysten mit einem durchschnittlichen Alter von 8,5 Tagen handelte, besaßen diese Embryonen keine Zona pellucida mehr. Das Phänomen des Squeezings bezog sich hier folglich auf das Herausdrücken der embryonalen Zellen durch den Kapseldefekt. Die Ursache für dieses Verhalten ist vermutlich, dass die Embryonen, die dieses Phänomen zeigten, ein stärkeres Wachstum als die übrigen Embryonen aufwiesen. Der daraus resultierende, entsprechend größere Druck innerhalb der Kapsel führte dazu, dass die Zellen durch den Kapseldefekt extrudierten. Es ist allerdings fragwürdig, ob diese Embryonen nach der Übertragung in eine Empfängerstute eine Überlebenschance in vivo hätten. Der prozentuale Anteil fluoreszierender Zellen nach Anfärbung mit DAPI variierte bei diesen Embryonen (4 von 10 in VGI und 7 von 10 in VGII) zwischen 5 und 30 %, wobei der Durchschnitt in VGI bei 8,3 und in VGII bei 12,5 % lag. Ein weiterer Aspekt, der die Überlebenschance in vivo mindern könnte, ist die Tatsache, dass die außen liegenden, „geschlüpften“ Zellen keinen kapsulären Schutz besitzen und damit äußeren Einflüssen schutzlos ausgeliefert sind. Auch der Zellverband der betroffenen Embryonen ist nicht mehr homogen.

Des Weiteren stehen dem Embryo unter In-vitro-Bedingungen das vom Endometrium produzierte Uterocalin p19, welches die Abgabe von Lipiden an den Konzeptus gewährleistet, sowie das für die embryonale Entwicklung wichtige IGF-3 nicht zur Verfügung. Da beide Proteine eine wichtige Rolle für die frühembryonale Entwicklung spielen, könnte ihr Fehlen die Entwicklung in vitro negativ beeinträchtigen (STEWART et al., 1995a; CROSSETT et al., 1996, 1998; STEWART et al., 2000; HERRLER et al., 2000a; SUIRE et al., 2001).

Nach 48 Stunden Kultur wiesen die meisten Embryonen der Versuchsgruppen die Tendenz zum Kollabieren des Blastozoels auf. Ursache für dieses Verhalten könnte eine negative Beeinträchtigung der Embryonen durch die vorausgegangenen Manipulationen (Laserpunktion und EG-Behandlung) sein. Diese Vermutung wird dadurch untermauert, dass in VGI acht von zehn und in VGII sechs von zehn Embryonen nach 48 Stunden kollabiert waren. Die in dieser Studie auftretenden Verhaltensweisen wie zum Beispiel der Blastozoelkollaps, isolierte Trophoblastzellgebiete, extrudierte Trophoblastzellen sowie verdunkelte Zellen wurden bereits in früheren Studien beobachtet (CARNEVALE et al., 1987).

## 5.5. DAPI

Vom Anteil fluoreszierender Zellen nach Inkubation mit DAPI konnte auf die Vitalität des Embryos geschlossen werden. Je größer der Anteil fluoreszierender und damit toter Zellen war, desto geringer war die Lebensfähigkeit des Embryos. Diese Methode wurde bereits mehrfach zur Beurteilung der Lebensfähigkeit der Embryonen nach Lagerung in unterschiedlichen Medien bzw. nach Tiefgefrieren in Glycerin und Ethylenglykol angewendet (MOUSSA et al., 2002b; HUHTINEN et al., 2000).

Die Anzahl fluoreszierender Zellen war zwischen den einzelnen Embryonen sowie abhängig von der Kulturdauer sehr unterschiedlich. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen verzeichnet werden. In der Literatur wurde beschrieben, dass die Anzahl toter Zellen nach Einfrierversuchen direkt proportional zur Kapseldicke sei (LEGRAND et al., 2000). Da die Kapseldicke in dieser Studie jedoch nicht gemessen wurde, kann diesbezüglich keine Aussage gemacht werden.

In Abb. 4.26 scheint es, als hätten die Embryonen der KGI mit 25 % den größten Anteil fluoreszierender Zellen, während die Embryonen der VGII mit 13,3 % den geringsten Anteil besitzen. Der hohe Durchschnittswert in KGI ist jedoch auf einen einzelnen Embryo mit 80 % toten Zellen zurückzuführen. Ohne diesen Embryo ergab der Anteil fluoreszierender Zellen in KGI einen Durchschnittswert von 15,8 %. Auch in VGI gab es einen Ausreißer mit 60 %, ohne den der durchschnittliche Anteil fluoreszierender Zellen bei 12,1 % gelegen hätte. Die Behandlungsgruppen unterschieden sich weder mit noch ohne diese Werte hinsichtlich des Anteils fluoreszierender, DAPI-positiver Zellen.

Auch Abb. 4.27, bei der die Gruppen nach Verhaltensweisen im Zuge der 48stündigen Kultur aufgelistet sind, erweckt einen falschen Eindruck. In der Gruppe „Stagnation“ war nur ein einziger Embryo zu verzeichnen, der eine Fluoreszenz von 40 % aufwies und damit den dargestellten Wert ausschließlich prägte. Darüber hinaus konnten in der Gruppe „Kapselruptur“ nur drei von zehn Embryonen ausgewertet werden, da der Prozentsatz fluoreszierender Zellen bei den übrigen Embryonen aufgrund ihres Erscheinungsbildes nicht geschätzt werden konnte.

## 5.6. Ausblick

Um sicher sagen zu können, ob EG in den Embryo gelangt und ob die Embryonen dementsprechend tiefgefrieretauglich sind, müsste die Intrazellulärflüssigkeit auf das Vorhandensein von EG untersucht werden. Ebenfalls wäre es sinnvoll, Embryonen in weiteren Versuchen verschiedenen Äquilibrierungszeiten in EG auszusetzen, um den Einfluss der Zeitdauer auf die Reaktion der Embryonen zu überprüfen. Möglicherweise führt eine verlängerte Zeitspanne zum erwünschten Schrumpfen bzw. Reexpandieren der Embryonen.

Anhand von Transferversuchen müsste die (Über-)Lebensfähigkeit der Embryonen in vivo nach der Laserpunktion sowie ihre Fähigkeit zur Etablierung von Trächtigkeiten untersucht werden.

Möglicherweise reicht ein einzelner laserinduzierter Kapseldefekt nicht aus, um die Permeabilität der equinen Glykoproteinkapsel gegenüber Kryoprotektiva zu verändern. Folglich könnte der Effekt einer unterschiedlichen Anzahl punktueller, laserinduzierter Kapseleröffnungen auf das Verhalten in EG untersucht werden.

Das Extrudieren einzelner Trophoblastzellen infolge der Laserbehandlung könnte zum Zweck der Präimplantationsdiagnostik angewendet werden. Durch eine Biopsie der extrudierten Trophoblastzellen wäre es nicht nur möglich, genetisch bedingte Funktionsstörungen sowie das Geschlecht der Embryonen festzustellen, sondern es könnte auch die Embryonenselektion vor der Übertragung durchgeführt werden.

## 5.7. Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Embryonen die Laserbehandlung überleben und nach 24 Stunden durchaus noch vital sind. Nach 48 Stunden Kultur verlieren sie jedoch an Größe und Qualität. Dies führt zu der Annahme, dass Embryonen, die der Laserpunktion unterzogen wurden, möglichst unmittelbar nach der Manipulation transferiert werden sollten. Ob ihre Vitalität allerdings ausreicht, um Trächtigkeiten zu erzielen, müsste in einer weiteren Studie durch Transfer dieser Embryonen untersucht werden. Des Weiteren bleibt unklar, ob das Kryoprotektivum EG durch den laserinduzierten Kapseldefekt in den Embryo eindringen konnte und ob ein dementsprechend manipulierter Embryo tiefgefrieretauglich ist. Diese Unklarheiten müssten in weiteren Versuchen untersucht und aufgeklärt werden.

## 6. Zusammenfassung

Bis heute ist der Erfolg des Embryotransfers beim Pferd dadurch limitiert, dass ein erfolgreiches Tiefgefrieren expandierter Pferdeembryonen nicht möglich ist. Die Ursache hierfür wird dem Vorhandensein der equinen Glykoproteinkapsel zugeschrieben, welche sich ab Tag 6,5 bildet und den Embryo vollständig umgibt. Bislang konnte keine Methode zur Umgehung der Impermeabilität der Kapsel gegenüber Tiefgefrierschutzmitteln erfolgreich eingesetzt werden. Studien, in denen die Kapsel mit verschiedenen Methoden entfernt wurde, konnten keine adäquaten Transfererfolge erzielen. Dies liegt vermutlich daran, dass die Kapsel eine wichtige Schutzfunktion übernimmt, ohne die der Embryo in vivo nicht überlebensfähig ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe eines Laserstrahls eine punktuelle Öffnung in der Kapsel zu erzeugen, um das Eindringen der Kryoprotektiva durch den Kapseldefekt gewährleisten zu können.

Die gewonnenen Embryonen wurden per Zufall einer der folgenden Gruppen zugeteilt:

1. Kontrollgruppe I (KGI): In-vitro-Kultivierung
2. Versuchsgruppe I (VGI): Laserpunktion (2 Punktionen) und anschließende In-vitro-Kultivierung
3. Kontrollgruppe II (KGII): 10minütiges Verbringen in Ethylenglykol (EG) und anschließende In-vitro-Kultivierung
4. Versuchsgruppe II (VGII): Laserpunktion (1 Punktion), 10minütiges Verbringen in EG und anschließende In-vitro-Kultivierung

Die In-vitro-Kultivierung erfolgte für eine Dauer von 48 Stunden bei 38,5 °C ,5 % CO<sub>2</sub> und maximaler Luftfeuchtigkeit. Im Anschluss an die Kultivierung wurden alle Embryonen mit Hilfe des Vitalfarbstoffes DAPI angefärbt. Anhand des geschätzten Anteils fluoreszierender (toter) Zellen konnte auf die Vitalität des Embryos geschlossen werden.

Die Gebärmutterspülungen der Stuten erfolgten zwischen März und August. Dabei konnten im Laufe von 79 Spülungen, von denen 39 erfolgreich waren, 43 Embryonen gewonnen werden. 40 Embryonen wurden für die Studie verwendet. Die Spülrate betrug 54,4 %.

Zum Zeitpunkt der Gewinnung waren die Größenunterschiede der Embryonen nicht signifikant. Im Zuge der Laserpunktion (VGI und VGII) kam es bei allen Embryonen zum Extrudieren einzelner Trophoblastzellen durch den/die induzierten Kapseldefekt(e).

Dies wurde als Zeichen der erfolgreichen Laserpunktion gewertet. Zwischen der Laserbehandlung und dem Beginn der Kultur kam es zu einem signifikanten Größenverlust der Kapseldurchmesser.

Die EG-Behandlung (KGII und VGII) zog einen signifikanten Größenverlust nach sich, dessen Ursache weitgehend ungeklärt ist. Allerdings kam es während der EG-Behandlung nicht, wie bereits bei frühen Blastozysten (ohne Kapsel) beobachtet werden konnte, zum Kollabieren des Embryos innerhalb der Kapsel. Das Verhalten der Embryonen deutet darauf hin, dass das EG wider Erwarten nicht durch den Kapseldefekt in den Embryo einzudringen vermochte.

Im Laufe der anschließenden Kultur konnte innerhalb von 24 Stunden eine deutliche Wachstumstendenz in allen Behandlungsgruppen beobachtet werden. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant. Nach 48 Stunden jedoch zeigten die Embryonen der einzelnen Behandlungsgruppen signifikante Unterschiede bezüglich ihres Verhaltens. Während die Embryonen der Kontrollgruppen die Tendenz zum Weiterwachsen bzw. zur Kapselruptur hatten, tendierten diejenigen der Versuchsgruppen zum Blastozoelkollaps. Die Ursache der Kapselruptur sind vermutlich die der Kapsel in vitro fehlenden Nährstoffe, sodass ihr Wachstum behindert wird. Eine weitere Möglichkeit ist, dass der Kapsel in vitro der in vivo herrschende Druck des sie umgebenden Uterus fehlt. Da die Kapsel so dem Druck des wachsenden Embryos nicht mehr standhalten kann, kommt es zur Ruptur. Der Blastozoelkollaps erfolgte vermutlich als Reaktion auf die Manipulationen.

Ein weiteres Phänomen der In-vitro-Kultur war das sogenannte „Squeezing“, bei dem infolge der Laserpunktion während der Kultur ganze Zellverbände durch den Kapseldefekt extrudierten. Dieses Verhalten wurde bereits bei frühen Blastozysten während der In-vitro-Kultur beobachtet, die sich auf diese Weise von der Zona pellucida befreiten. In dieser Studie handelte es sich jedoch um expandierte Blastozysten, die keine Zona pellucida mehr besaßen. Die Befreiungsversuche bezogen sich insofern auf die Kapsel. Das Phänomen des „Squeezings“ ist typisch für die In-vitro-Kultur von Pferdeembryonen.

Anhand des relativen Wachstums konnte gezeigt werden, dass Embryonen der KGI während der Kulturdauer von 48 Stunden stetig wachsen, während Embryonen der VGI die bei der Gewinnung vorhandene Größe während der Kultur nicht wieder erreichen. Embryonen der KGII weisen innerhalb der ersten 24 Stunden ein starkes Wachstum auf, welches nach 48 Stunden reduziert wird. Dennoch haben sie nach wie vor eine positive Wachstumsbilanz. Embryonen aus VGII, die sowohl der Laserpunktion als auch der EG-Behandlung unterzogen wurden, wachsen nach 24 bzw. 48 Stunden minimal, allerdings werden die Embryonen innerhalb der Kapsel nach 48 Stunden wieder kleiner.

Die nach 48 Stunden erfolgte Anfärbung der Embryonen mit dem Vitalfarbstoff DAPI ermöglichte es, die Vitalität der Embryonen anhand der Anzahl fluoreszierender Zellen zu beurteilen. Zwischen den einzelnen Gruppen konnten diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden.

In dieser Studie konnte festgestellt werden, dass die Laserpunktion das Wachstumsvermögen der Embryonen im Vergleich zu denjenigen Embryonen der Kontrollgruppen nachteilig beeinflusst. Dabei war die Anzahl der Kapseldefekte von Bedeutung. Während nach Induktion eines einzelnen Laserdefektes eine minimal positive Wachstumsbilanz verzeichnet werden konnte, war dies nach Induktion zweier Kapseldefekte kaum möglich und es kam im Laufe der Kultur zum Blastozoelekollaps. Auch die Behandlung mit EG führte nicht zu dem erwarteten Effekt des Embryokollaps. Daher wird angenommen, dass das EG nicht durch den Kapseldefekt in den Embryo eindringen konnte. Allerdings konnte ein signifikanter Größenverlust der Konzepte im Laufe der Behandlung beobachtet werden, dessen Ursache unklar ist.

Um ein Eindringen von EG mit Sicherheit ausschließen zu können, müssten die Embryonen in nachfolgenden Versuchen auf das intrazelluläre Vorhandensein von EG untersucht werden. Des Weiteren sollten Tiefgefrier- und Transferversuche unternommen werden, um herauszufinden, ob die entsprechend behandelten Embryonen tiefgefriertauglich bzw. in vivo überlebensfähig sind. Weiterhin könnte die Methode der Laserpunktion durch Biopsie der extrudierten Trophoblastzellen im Rahmen der Präimplantationsdiagnostik angewendet werden.

## 7. Summary

The success of equine embryo transfer is limited, because freezing of expanded blastocysts is still limited. The cause for this is supposed to be the presence of the equine glycoprotein capsule, which is formed from day 6,5 and encloses the embryo completely. Up to now, no method could be established to increase the permeability of the capsule for cryoprotectants. Removal of the capsule by different methods did not improve embryo transfer results. This is probably due to the fact that the capsule provides important protective function and, therefore, loss of the capsule reduces survival of the embryo *in vivo*.

The aim of the present paper was to investigate the effects of the perforation of the capsule by use of laser technology on the viability of the conceptus and its response to the cryoprotectant.

Forty embryos have been randomly assigned to one of four treatment groups:

1. Control group I (KGI): *in vitro* culture
2. Treatment group I (VGI): laser puncture (two openings) and subsequent *in vitro* culture
3. Control group II (KGII): ten minutes ethylene glycol (EG) and subsequent *in vitro* culture
4. Treatment group II (VGII): laser puncture (one opening), ten minutes EG and subsequent *in vitro* culture

The embryos were cultured for a period of 48 hours at 38,5 °C , 5 % CO<sub>2</sub> and maximum air humidity. Subsequent to the culture all embryos were stained by means of the vital staining DAPI. Embryonic vitality was estimated with the percentage of fluorescent dead cells.

Embryo flushings of the mares were performed from March to August. Thirty nine of 79 embryo flushings were successful, resulting in 43 embryos. The embryo recovery rate was 54,4 %.

At the time of recovery, the size of the embryos did not differ among groups. After laser puncture (VGI and VGII), all embryos extruded single trophoblast cells across the capsule defect. This observation was interpreted as a sign of the successful laser puncture. From laser treatment to the culture, the conceptuses showed a significant loss of capsular diameter.

Treatment with EG (KGII and VGII) resulted in a significant loss of size. The treatment with EG did not cause a collapse of the embryo within the capsule, similar to early blastocysts without a capsule. The reaction of the embryos suggests that – in contrast to our expectations – EG was not able to penetrate the capsule sufficiently via the defect.

During culture, the embryos of all treatment groups grew within 24 hours. After 48 hours, however, the embryos showed significant differences concerning their reaction to treatments. While the embryos of the control groups tended to grow further and rupture the capsule, respectively, the other treatment groups tended to react with the collapse of the blastocoel. The cause for the ruptures is presumably due to the impaired synthesis of the capsule in vitro. Another mechanism could be the lack of the uterine pressure on the capsule during in vitro culture compared with in vivo. Thus the capsule is no longer able to sustain the pressure of the growing embryo and it ruptures. Most likely, the collapse of the blastocoels in VGII may have been caused by the manipulations.

Another phenomenon of the in-vitro-culture was the squeezing of the embryo from the laser-induced opening through the capsule. This reaction has already been noticed on early blastocysts during in-vitro-culture, but the blastocysts revealed themselves from the zona pellucida.

By means of the relative embryonic growth it could be shown that embryos of KGI grew steadily during the 48 hours of culture, while embryos of VGI did not regain the diameters they had at the beginning of the culture. After an increase within the first 24 hours, embryos of KGII exhibited reduced diameters at 48 hours of culture. Diameters of the capsule of VGII increased only minimal, but the embryos within the capsule shrank during culture.

Staining of the embryos with the vital stain DAPI after culture revealed no significant differences among treatment groups.

The present study demonstrates that laser puncture adversely affected the growth of embryos. The treatment with ethylene glycol did not induce the collapse of the embryo, as expected. Thus it is not very likely that ethylene glycol sufficiently penetrated the embryo via the capsule defect. However, a significant loss of embryonic size could be observed during treatment.

Additional studies are needed to demonstrate the kinetics of EG uptake by the embryo. Furthermore, deep freezing and transfer of the embryos after laser puncture should be undertaken in order to test the survival of the embryos in vivo. Additionally, laser puncture could be applied for biopsy of extruded trophoblast cells for preimplantation diagnostic in embryos before transfer.

# Literaturverzeichnis

- ALBERTINI D. u. BARRETT S. (2004) *The developmental origins of mammalian oocyte polarity*. Semin Cell Dev Biol **15**: 599–606.
- ALBIHN A., SAMPER J., ORIOL J., CROY B. u. BETTERIDGE K. (2000) *Production of capsular material by equine Trophoblast transplanted into immunodeficient mice*. Havemeyer Foundation Monograph Series no **3**: 60–61.
- ALLEN W. (1975) *The influence of fetal genotype upon endometrial cup development and PMSG and progesterone production in equids*. J Reprod Fert **23, Suppl.**: 405–413.
- ALLEN W. (2005) *The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding*. Reprod Domest Anim **40**: 310–329.
- ALLEN W., HAMILTON D. u. MOOR R. (1973) *The origin of equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast*. AnatRec **117**: 475–501.
- ALLEN W. u. MOOR R. (1972) *The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells*. J Reprod Fert **29**: 313–316.
- ALLEN W. u. PASHEN R. (1984) *Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo manipulation*. J Reprod Fert **71**: 607–613.
- ALLEN W. u. ROWSON L. (1972) *Transfer of ova between horses and donkeys*. Proc 7th Int Cong Anim Reprod Art Insem 484–487.
- ALLEN W. u. ROWSON L. (1975) *Surgical and non-surgical egg transfer in horses*. J Reprod Fert **23, Suppl.**: 525–530.
- ALLEN W., SKIDMORE J., STEWART F. u. ANTCHAK D. (1993) *Effects of fetal genotype and uterine environment of placental development in equids*. J Reprod Fert **98**: 55–60.
- ALLEN W. u. STEWART F. (2001) *Equine placentation*. Reprod Fert Dev **13**: 623–63.
- ALVARENGA M., LANDIM F. u. MEIRA C. (1993) *Modifications in the technique used to recover equine embryos*. Equine Vet J **15, Suppl.**: 111–112.
- ALVARENGA M., P.McCUE, E.L.SQUIRES u. NETO J. (2001) *Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily*. Theriogenol **56**: 879–87.

- AMOROSO E. (1952) Physiology of Reproduction, chapter Placentation, 127–311. Langmans, Green and Co Ltd:London.
- ANDRABI S. u. MAXWELL W. (2007) *A review on reproduction biotechnologies for conservation of endangered mammalian species*. Anim Reprod Sci **99**: 223–243.
- ANTCZAK D., BRIGHT S., REMICK L. u. BAUMAN B. (1982) *Lymphocyte alloantigen of the horse I Serologie and genetic studies*. Tissue Antigens **20**: 172–187.
- ARAR S., CHANG K., QUINN B., WAELCHLI R., HAYES M., BETTERIDGE K. u. MONTEIRO M. (2007) *Desialylation of core type 1 O-glycan in the equine embryonic capsule coincides with immobilization of the conceptus in the uterus*. Carbohydrate Research **342**: 1110–1115.
- AURICH C. (2005) Reproduktionsmedizin beim Pferd. Parey Verlag.
- AZUMA T., CHOI Y.H., HOCHI S. u. OGURI N. (1995) *Effect of glucose in the culture medium on development of horse oocytes mature and microfertilized in vitro*. Reprod Fert Dev **7**: 1067–1071.
- BALL B., ALTSCHUL M. u. ELLINGTON J. (1991) *In vitro development of day-2 equine embryos co-cultured with oviductal explants or trophoblastic vesicles*. Theriogenol **35**: 669–682.
- BALL B., BRINSKO S., THOMAS P., MILLER P. u. ELLINGTON J. (1993a) *Development to blastocysts of one- to two-cell equine embryos after coculture with uterine tubal epithelial cells*. Am J Vet Res **54**: 1139–1144.
- BALL B., DOBRINSKY I., FAGNAN M. u. THOMAS P. (1997) *Distribution of glycoconjugates in the uterine tube (oviduct) of horses*. Am J Vet Res **58**: 816–822.
- BALL B., IGNOTZ G., BRINSKO S., THOMAS P., MILLER P., ELLINGTON J. u. CURRIE W. (1993b) *The in-vitro block to development and initiation of transcription in early equine embryos*. Equine Vet J **15, Suppl.**: 87–90.
- BALL B. u. MILLER P. (1992) *Survival of equine embryos co-cultured with equine oviductal epithelium from the four-to eight-cell to the blastocyst stage after transfer to synchronous recipient mares*. Theriogenol **37**: 979–991.
- BALL B., T.V.LITTLE, J.A.WEBER u. G.L.WOODS (1989) *Survival of day-4 embryos from young, normal mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares*. J Reprod Fert **85**: 187–194.
- BARBACINI S., COLLEONI S., NECCHI D., DUCHI R., LAZZARI G. u. GALLI C. (2008) *Intracytoplasmatic sperm injection: the practitioner's perspective*. Proceedings of the European Equine Meeting of the Year 2008 - XIV SIVE - FEEVA Congress, Venice, Italy 22–23.

- BARBACINI S., ZAVAGLIA G., GULDEN P., MARCHI V. u. NECCHI D. (2000) *Retrospective study on the efficacy of hcG in equine artificial insemination programme using frozen semen*. Equine Vet Educ **12**: 312–317.
- BARRIER-BATTUT I., POUTRE N.L., E.TROCHERIE, S.HECHT, DES RAUX A., J.L.NICAISE, X.VÉRIN, J.BERTRAND, F.FIÉNI, R.HOIER, A.RENAULT, L.EGRON, D.TAINTURIER u. J.-F.BRUYAS (2001) *Use of buserelin to induce ovulation in the cyclic mare*. Theriogenol **55**: 1679–95.
- BARRY B., THOMPSON D., WHITE K., WOOD T., HEHNKE K., RABB M. u. COLBORN D. (1989) *Viability of inner cell mass versus trophectodermal cells of frozen-thawed horse embryos*. Equine Vet J **8, Suppl.**: 82–83.
- BATTUT I., GRANDCHAMPDESRAUX A., NICAISE J., F.FIENI, D.TANTURIER u. BRUYAS J. (2001) *When do equine embryos enter the uterine cavity ? an attempt to answer*. Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation Monograph Series **no 3**: 66–68.
- BATTUT I., S.COLCHEN, F.FIENI, TAINTURIER D. u. BRUYAS J.F. (1998) *Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156, 168 hours after ovulation*. Equine Vet J **25, Suppl.**: 60–62.
- BETTERIDGE K. (1989) *The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer*. Equine Vet J **8, Suppl.**: 92–100.
- BETTERIDGE K. (2000) *Comparative aspects of equine embryonic development*. Anim Reprod Sci **60-61**: 691–702.
- BETTERIDGE K. (2007) *Equine embryology: an inventory of unanswered questions*. Theriogenol **68, Suppl.1**: 9–21.
- BETTERIDGE K., EAGLESOME M. u. FLOOD P. (1979) *Embryo Transport through the mare's oviduct depends upon cleavage and is independent of the ipsilateral corpus luteum*. J Reprod Fert **27, Suppl.**: 387–394.
- BETTERIDGE K., EAGLESOME M., MICHELL D., FLOOD P. u. BERIAULT R. (1982) *Development of horse embryo up to twenty two days after ovulation: observations of fresh specimen*. J Anat **135**: 191–209.
- BETTERIDGE K. u. GUILLOMOT M. (1982) *Scanning electron microscopy of preattachment horse embryos*. J Reprod Fert **32, Suppl.**: 623.
- BETTERIDGE K. u. LOSKUTOFF N. (1993) *Prospects for improving the survival rate of transferred embryos*. Molecular Reprod Dev **36**: 262–265.
- BETTERIDGE K. u. MITCHELL D. (1974) *Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare*. J Reprod Fert **39**: 145–148.

- BEZARD J., MAGISTRINI M., DUCHAMP G. u. PALMER E. (1989) *Chronology of equine fertilisation and embryonic development in vivo and in vitro*. Equine Vet J **8, Suppl.**: 105–110.
- BOUSQUET D., GUILLOMOT M. u. BETTERIDGE K. (1987) *Equine zona pellucida and capsule: some physiochemical and antigeneic properties*. Gamete Res **16**: 121–132.
- BRÜCK I., GREVE T. u. HYTTEL P. (1999) *Morphology of the oocyte- follicular connection in the mare*. Anatomy and Embryology **199**: 21–28.
- BRÜCK I., RAUN K., SYNNESTVEDT B. u. GREVE T. (1992) *Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique*. Equine Vet J **24**: 58–59.
- DI BRIENZA V.C., SQUIRES E., ZICARELLI L. u. CARNEVALE E. (2004) *Establishment of pregnancies after vitrification of equine embryos*. Reprod Fert Dev **16**: 165.
- BRINSKO S., BALL B., IGNOTZ G., THOMAS P., CURRIE W. u. ELLINGTON J. (1995) *Initiation of transcription and nucleogenesis in equine embryos*. Mol Reprod Dev **42**: 298–302.
- BRISTOL F. (1987) *Control of the mare's reproductive cycle*. Proc Soc Therio **309**.
- BROCKSCHMIDT L., LOCH W. u. SIKES J. (1985) *Effect of non-surgical embryo recovery and a prostaglandin analogue on the oestrous cycle of the pony mare*. Equine Vet J **34, Suppl.**
- BRUYAS J., MARCHAND P., FIÉNI F. u. TAINTURIER D. (1997b) *The inability of DMSO to effectively cryoprotect day 6.5 horse embryos*. Theriogenol **47**: 387.
- BRUYAS J.F., BATTUT I., POL J.M., BOTREL C., FIENI F. u. TAINTURIER D. (1995) *Quantitative analyse of morphological modifications of day 6.5 horse embryos after treatment with four cryoprotectants: differential effects on inner cell mass and trophoblast cells*. Biol Reprod Mono **1**: 329–339.
- BRUYAS J.F., BÉZARD J., LAGNEAUX D. u. PALMER E. (1993) *Quantitative analysis of morphological modifications of day 6.5 horse embryos after cryopreservation: differential effects on inner cell mass and trophoblast cells*. J Reprod Fert **99**: 15–23.
- BRUYAS J.F., MARTINS-FERREIRA C., FIÉNI F. u. TAINTURIER D. (1997a) *The effect of propanediol on the morphology of fresh and frozen equine embryos*. Equine Vet J **25, Suppl.**: 80–84.
- BRUYAS J.F., SANSON J., BATTUT I., FIÉNI F. u. TAINTURIER D. (2000b) *Comparison of the cryoprotectant properties of glycerol and ethylene glycol for early (day6) equine embryos*. J Reprod Fert **56, Suppl.**: 549–560.
- BUDIK S., WALTER I., PITTNER F. u. AURICH C. (2005) *Expression and localisation of blastocoel forming and maintaining proteins in equine blastocysts*. Havemeyer Foundation Monograph Series no **18**: 41.

- BURGEMEISTER R. (2005) *New Aspects of laser microdissection in research and routine*. J of Histochemistry & Cytochemistry **53**: 409–412.
- CAMILLO F. (2008) *Embryo transfer in horses*. Veterinary European Equine Meeting, XIV SIVE/FEEVA CONGRESS Lido di Venezia, Palazzo del Casinò 66–70.
- CAMILLO F., I.VANNOZZI, A.ROTA, S.ROMAGNOLI u. G.ARIA (2000) *Comparison of embryo recovery rates from two years old and mature mares*. Havemeyer Foundation Monograph Series no **3**: 86–88.
- CAMILLO F., PACINI M., PANZANI D., VANNOZZI I., ROTA A. u. ARIA G. (2004) *Clinical use of twice daily injections of buserelin acetate to induce ovulation in the mare*. Vet Res Commun **28 Suppl.1**: 169–72.
- CARNEVALE E. (2006) *Vitrification of equine embryos*. Vet Clin Equine **22**: 831–841.
- CARNEVALE E. (2008) *Effect of aging on reproductive physiology of the mare*. Proceedings of the European Equine Meeting of the Year 2008 - XIV SIVE - FEEVA Congress, Venice, Italy 79–81.
- CARNEVALE E. (2008b) *Use of assisted reproductive procedures for subfertile mares*. Proceedings of the European Equine Meeting of the Year 2008 - XIV SIVE - FEEVA Congress, Venice, Italy 88–90.
- CARNEVALE E. (2008c) *Cooling and cryopreservation of equine embryos*. Proceedings of the European Equine Meeting of the Year 2008 - XIV SIVE - FEEVA Congress, Venice, Italy 85–87.
- CARNEVALE E., ELDRIDGE-PANUSKA W., V.CARACCILODI BRIENZA, JR. G.S. u. SQUIRES E. (2004b) *Embryo development rates after vitrification and transfer of equine embryos*. Havemeyer Foundation Monograph Series no **14**: 45–46.
- CARNEVALE E., R.J.RAMIREZ, E.L.SQUIRES, M.A.ALVARENGA, D.K.VANDERVALL u. P.M.MCCUE (2000b) *Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer*. Theriogenol **54**: 965–979.
- CARNEVALE E., W.D.ELDRIDGE-PANUSKA u. V.CARACCILODI BRIENZA (2004a) *How to collect and vitrify equine embryos for direct transfer*. AAEP Proceedings **50**: 402–405.
- CARNEVALE E.M., GRIFFIN P. u. GINTHER O. (1993) *Age-associated subfertility before entry of embryos into the uterus in mares*. Equine Vet J **15, Suppl**: 31–35.
- CARNEVALE E.M., SQUIRES E.L. u. MCKINNON A.O. (1987) *Comparison of Ham's F10 with CO<sub>2</sub> or Hepes Buffer for storage of equine embryos at 5° C for 24h*. J Anim Sci **65**: 1775–81.

- CARNEY N., SQUIRES E., COOK V., SEIDEL G. u. JASKO D. (1991) *Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos..* Theriogenol **36**: 23–32.
- CASTANHEIRA P., AMARAL D., VASCONCELOS A., ARANTES R., STAHLBERG R. u. LAGARES M. (2004) *Cryopreservation of equine embryos by vitrification.* Havemeyer Foundation Monograph Series no **14**: 50–52.
- CHI H.J., KOO J.J., KIM M.Y., JOO J.Y., CHANG S.S. u. CHUNG K.S. (2002) *Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing.* Hum Reprod **17 no.8**: 2146–2151.
- CHOI Y., HOCHI S., BRAUN J., SATO K. u. OGURI N. (1993) *In vitro maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration an by the slicing ov ovaries.* Theriogenol **40**: 959–966.
- CHOI Y., OKADA Y., HOCHI S., BRAUN J., SATO K. u. OGURI N. (1994) *In vitro fertilization rate of horse oocytes with partially removed zona.* Theriogenol **42**: 795–802.
- CHU J., SHAROM F., ORIOL J., BETTERIDGE K., CLEAVER B. u. D.C. SHARP D. (1997) *Biochemical changes in the equine capsule following prostaglandin-induced pregnancy failure.* Mol Reprod Dev **46**: 286–295.
- CLARKE H., HOPE S., BYERS S. u. RODGERS R. (2006) *Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans.* Reproduction **132**: 119–131.
- CLEMENT-SENCEWALD A., BUCHHOLZ T., SCHÜTZE K. u. BERG U. (2002) *Noncontact, laser-mediated extraction of polar bodies for prefertilization genetic diagnosis.* J Ass Reprod Genet **19**: 183–194.
- COHEN J., SCHATTMAN G., SUZMAN M., ADLER A., ALIKANI M. u. ROSENWAKS Z. (1994) *Micromanipulating human gametes..* Reprod Fert Dev **6**: 69–83.
- COLCHEN S., BATTUT I., FIENI F., TAINTURIER D., SILIART B. u. BRUYAS J. (2000) *Quantitative histological analysis of equine embryos at exactly 156 and 168h after ovulation.* J Reprod Fert **56, Suppl.**: 527–537.
- COOK N.L., SQUIRES E., RAY B. u. JASKO D. (1993) *Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes.* Equine Vet J Suppl **15**: 71–74.
- CREWS L., WAELCHLI R. u. BETTERIDGE K. (2002) *Developmental changes in the distribution of electrolytes within the horse conceptus during the second week of pregnancy.* Therigenol **58**: 745–748.

- CREWS L., WAELCHLI R., HUANG C., CANNY M., MCCULLY M. u. BETTERIDGE K. (2007) *Electrolyte distribution and yolk sac morphology in frozen hydrated equine conceptuses during the second week of pregnancy*. *Reprod Fert Dev* **19**: 804–814.
- CROSSETT B., ALLEN W. u. STEWART F. (1996) *A 19kDa protein secreted by the endometrium of the mare is a novel member of the lipocalin family*. *Biochem J* **320**: 137–143.
- CROSSETT B., SUIRE S., HERRLER A., ALLEN W. u. STEWART F. (1998) *Transfer of a uterine lipocalin from the endometrium of the mare to the developing equine conceptus*. *Biol Reprod* **59**: 483–490.
- DAELS P., DEMORAES J., STABENFELDT G., HUGHES J. u. LASLEY B. (1991) *The corpus luteum: source of oestrogen during early pregnancy in the mare*. *JReprodFert Suppl* **35**: 501–508.
- DAY F. (1939) *Ovulation and the descent of the ovum in the fallopian tube of the mare after treatment with gonadotrophic hormones*. *J Agric Sci Camb* **29**: 459–469.
- DENKER H., K.J.BETTERIDGE u. J.SIROIS (1987) *Shedding of the capsule and proteinase activity in the horse embryo*. *J Reprod Fert Suppl* **35**: 703.
- DENKER H.W. (2000) *Structural dynamics and function of early embryonic coats*. *Cells Tissues Organs* **166**: 180–207.
- DONALDSON W., ORIOL J., PELKAUS C. u. ANTCZAK D. (1994) *Paternal and maternal major histocompatibility complex class I antigens are expressed co-dominantly by equine trophoblast*. *Placenta* **15**: 123–135.
- DONALDSON W., ZHANG C., ORIOL J. u. ANTCZAK D. (1990) *Invasive equine trophoblast expresses conventional class I major histocompatibility complex antigens*. *Development* **110**: 63–71.
- DOUGLAS R. u. GINTHER O. (1972) *Effect of prostaglandin F2a on length of diestrus in mares*. *Res Prostaglandins* **2**: 265.
- DOUGLAS R., NUTI L. u. GINTHER O. (1974) *Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions*. *Theriogenol* **2(6)**: 133–142.
- DRIANCOURT M.A. u. PALMER E. (1982) *Seasonal and individual effects on ovarian and endocrine responses of mares to a synchronization treatment with progestagen-impregnated vaginal sponges*. *J Reprod Fert* **32, Suppl.**: 283–291.
- DUCHAMP G., BEZARD J. u. PALMER E. (1995) *Oocyte yield and consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimeters in mares*. *Biol Reprod Mono* **1**: 233–241.
- ELDRIDGE-PANUSKA W., SEIDEL V.G., SQUIRES E. u. CARNEVALE E. (2005) *Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos*. *Theriogenol* **63**: 1308–1319.

- ELLENBERGER C., WILSHER S., ALLEN W., HOFFMANN C., KÖLLING M., BAZER F., KLUG J., SCHOON D. u. SCHOON H.A. (2008) *Immunolocalisation of the uterine secretory proteins uterocalin, uteroferrin and uteroglobin in the mare's uterus and placenta throughout pregnancy*. Theriogenol **70**: 746–757.
- EMILIANI S., DEN BERGH M.V., VANNIN A.S., BIRAMANE J. u. ENGLERT Y. (2000) *Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts*. Hum Reprod **15 no.4**: 905–910.
- ENDERS A. u. LIU I. (1991) *Lodgement of the equine blastocyst in the uterus from fixation through endometrial cup formation*. J Reprod Fert **44, Suppl**: 427–438.
- ENDERS A., SCHLAFKE S., LANTZ K. u. LIU I. (1993) *Endoderm cells of the equine yolk sac from day 7 until formation of the definitive yolk sac placenta*. Equine Vet J **Suppl 15**: 3–9.
- EVANS M., GASTAL E., SILVA L., GASTAL M., KITSON N., ALEXANDER S. u. IRVINE C. (2006) *Plasma LH concentrations after administration of hcG to oestrous mares*. Anim Reprod Sci **94**: 191–194.
- FARIN C., HASLER J., MARTUS N. u. STOKES J. (1996) *A comparison of Menezos B2 and TCM-199 for in vitro production of bovine blastocysts*. Theriogenol **48**: 699–709.
- FARQUHAR V., MCCUE P., CARNEVALE E. u. SQUIRES E. (2001) *Interovulatory intervals of embryo donor mares administered Deslorelin acetate to induce ovulation*. Theriogenol .
- FEHILLY C. u. WILLADSEN S. (1986) Oxford Reviews of Reproductive Biology, chapter Embryo manipulation in farm animals, 379–413. Clarendon Press, Oxford.
- FERREIRA J., MEIRA C., PAPA F., E ALVARENGA F.L., ALVARENGA M. u. BURATINI J. (1997) *Cryopreservation of equine embryos with glycerol plus sucrose and glycerol plus 1,2-propanediol*. Equine Vet J **25, Suppl.**: 88–93.
- FLEURY J., FLEURY P. u. LANDIN-ALVARENGA F. (2002) *Effect of embryo diameter and storage period on pregnancy rates obtained with equine embryos stored in Ham's F10 with Hepes Buffer at a temperature of 15-18°C - preliminary results*. Theriogenol **58**: 749–750.
- FLOOD P., BETTERIDGE K. u. DIOCEE M. (1982) *Transmission electron microscopy of horse embryos 3-16 days after ovulation*. J Reprod Fert **32, Suppl.**: 319–327.
- FORAGE R., BROWN R., OLIVER K., ATRACHE B. u. DEVINE P. (1987) *Immunization against an inhibin subunit produced by recombinant DNA techniques results in increased ovulation rate in sheep*. J Endocrinol **114**: R1–R4.
- FORTUNE J. u. KIMMICH T. (1993) *Purified pig FSH increases the rate of double ovulation in mares*. Equine Vet J **15, Suppl.**: 95–98.

- FREEMAN D., BUTLER J., WEBER J., GEARY R.T. u. WOODS G.L. (1991a) *Co-culture of day-5 to day-7 equine embryos in medium with oviductal tissue*. Theriogenol **36**: 815–822.
- FREEMAN D., WEBER J., GEARY R. u. WOODS G. (1991b) *Time of embryo transport through the mare oviduct*. Theriogenol **36**: 823–830.
- GILLIES L., WAELCHLI R., RUDDOCK W.J., BETTERIDGE K. u. LAMARRE J. (1999) *Patterns of MUC1 expression in the equine endometrium and trophoblast during early pregnancy*. Theriogenol (Abstract) **51**: 225.
- GINTHER J. (1983a) *Fixation and orientation of the early equine conceptus*. Theriogenol **19**: 613–623.
- GINTHER O. (1984) *Intrauterine movement of the early conceptus in barren and postpartum mares*. Theriogenol **21**: 633–644.
- GINTHER O. (1985) *Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus*. Equine Vet J **3**, **Suppl.**: 41–47.
- GINTHER O. (1992) Reproductive biology of the mare; basic and applied aspects. Equiser-vices.
- GINTHER O. u. BERGFELT D. (1990) *Effect of GnRH treatment during the anovulatory season on multiple ovulation rate and on follicular development during the ensuing pregnancy in mares*. J Reprod Fert **88**: 119–126.
- GINTHER O., DOUGLAS R. u. LAWRENCE J. (1982) *Twinning in mares: a survey of veterinarians and analyses of theriogenology records*. Theriogenol **18**: 333–347.
- GOFF A., LEDUC S., POITRAS P. u. VAILLANCOURT D. (1993) *Steroid synthesis by equine conceptuses between days 7 and 14 and endometrial steroid metabolism*. Domest Anim Endocrinol **10**: 229–236.
- GRIFFIN P. u. GINTHER O. (1993) *Effects of day of estrous cycle, time of day, luteolysis, and embryo on uterine contractility in mares*. Theriogenol **39**: 997–1008.
- GRONDAHL C., HOST T., BRÜCK I., VIUFF D., BEZARD J., FAIR T., GREVE T. u. HYTTEL P. (1995a) *In vitro production of equine embryos*. Biol Reprod Mono **1**: 299–307.
- GRONDAHL C., HYTTEL P., GRONDAHL M., ERIKSEN T., GOTFREDSEN P. u. GREVE T. (1995b) *Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation in vivo*. Mol Reprod Dev **42**: 94–105.
- GUILLOMOT M. u. BETTERIDGE K. (1984) *Permeability of the capsule of the equine embryo*. ProcSocStudy Fert, Winter Meeting **Abstract 58**.

- HANDLER J. u. AURICH J. (2005) Reproduktionsmedizin beim Pferd, chapter Physiologie des Sexualzyklus der Stute, 15–29. C. Aurich.
- HAWLEY L.R., ENDERS A. u. HINRICHS K. (1995) *Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle*. Biol Reprod Mono **1**: 243–252.
- HAYES M., QUINN B., KEIRSTEAD N., KATAVOLOS P., WAELCHLI R. u. BETTERIDGE K. (2008) *Proteins associated with the early intrauterine equine conceptus*. Reprod Dom Anim **43**: 232–237.
- HEAP R. (1991) *Deauville: a summation of the Fifth International Symposium on Equine Reproduction*. J Reprod Fert **44, Suppl.**: 751–753.
- HEINZE H. u. KLUG E. (1975) *The use of GnRH for controlling the oestrus cycle of the mare (preliminary report)*. J Reprod Fert **Suppl.23**: 275–277.
- HERRLER A., PELL J., ALLEN W., BEIER H. u. F.STEWART (2000a) *Horse conceptuses secrete inulin-like growth factor-binding protein 3*. Biol Reprod **62**: 1804–1811.
- HERRLER A., STEWART F., CROSSETT B., PELL J., ELLIS P., BEIER H. u. ALLEN W. (2000b) *Identification of proteins in the embryonic capsule*. J Reprod Fert **56, Suppl.**: 601–606.
- HERRLER A., STEWART F., CROSSETT B., PELL J., ELLIS P., BROWN K., BEIER H. u. ALLEN W. (1998) *Embryonic coats-a mailbox in early embryo-maternal signalling*. J Reprod Fert Abstract Series **21**: 22.
- HINRICHS K. (1990) *A simple technique that may improve the rate of embryo recovery on uterine flushing in mares*. Theriogenol **33**: 937–942.
- HINRICHS K. (1998) *Production of embryos by assisted reproduction in the horse*. Theriogenol **49**: 13–21.
- HINRICHS K., A.L.SCHMIDT, MEMON M., SELGRATH J. u. EBERT K. (1990) *culture of 5-day horse embryos in microdroplets for 10 to 29 days*. Theriogenol **34**: 643–53.
- HINRICHS K., CHOI Y., ALCKENAER B., VARNER D. u. HARTMANN D. (2007) *In vitro-produced equine embryos: production of foals after transfer, assessment by differential staining and effect of medium calcium concentrations during culture*. Theriogenol **68**: 521–529.
- HINRICHS K. u. WATSON E. (1988) *Clinical report: recovery of a degenerating 14-day embryo in the uterine flush of a mare seven days after ovulation*. Theriogenol **30**: 349–353.
- HOCHI S. (1998) *Current status of IVM/IVF/IVC technology and embryo cryopreservation in the equine species*. J Mamm Ova Res **15**: 117–127.
- HOCHI S. (2003) *Cryopreservation of follicular oocytes and preimplantation embryos in cattle and horses*. J Reprod Dev **49**: 13–21.

- HOCHI S., AZUMA T., MIYAUSHIRO K. u. OGURI N. (1995a) *An attempt to produce acellular embryonic capsule in equine blastocysts cultured in vitro*. J Reprod Dev **41**: 367–371.
- HOCHI S., BRAUN J. u. MIYAMOTO A. (1994a) *Influence of sera on in vitro hatching of equine blastocysts*. J Reprod Dev **40**: 13–18.
- HOCHI S., BRAUN J. u. OGURI N. (1993) *The hatching process of equine embryos in vitro*. Equine Vet J **15**, **Suppl.**: 91–94.
- HOCHI S., FUJIMOTO T., BRAUN J. u. OGURI N. (1994b) *Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification*. Theriogenol **42**: 483–88.
- HOCHI S., FUJIMOTO T., CHOI Y., BRAUN J. u. OGURI N. (1994c) *Cryopreservation of equine oocytes by 2-step freezing*. Theriogenol **42**: 1085–1094.
- HOCHI S., FUJIMOTO T. u. OGURI N. (1995b) *Large equine blastocysts are damaged by vitrification procedures*. Reprod Fert Dev **7**: 113–117.
- HOCHI S., MARUYAMA K. u. OGURI N. (1996) *Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose*. Theriogenol **46**: 1217–24.
- HOCHI S., M. OGASAWARA, J. BRAUN u. N. OGURI (1994d) *Influence of relative embryonic volumes during glycerol equilibration on the survival of frozen-thawed equine blastocysts*. J Reprod Dev **40**: 243–249.
- HUDSON J. u. MCCUE P. (2004) *How to increase embryo recovery rates and transfer success*. 50th annual convention of the american association of equine practitioners, Denver
- HUGHES J., STABENFELDT G. u. JW J.E. (1972) *Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare*. Proc Am Assoc Equine Practice **18**: 119–148.
- HUHTINEN M., BREDBACKA P. u. KOTILAINEN T. (1995) *Non-surgical transfer of DAPI-stained equine demi-embryos treated with cytochalasin B and nocodazole*. Biol Reprod Monograph Series **1**: 325–328.
- HUHTINEN M., LAGNEAUX D., KOSKINEN E. u. E. PALMER E. (1997a) *The effect of sucrose in the thawing solution on the morphology and mobility of frozen thawed equine embryos*. Equine Vet J **25**, **Suppl.**: 94–97.
- HUHTINEN M., PEIPPO J. u. BREDBACKA P. (1997b) *Successful transfer of biopsied equine embryos*. Theriogenol **48**: 361–367.
- HUHTINEN M., SJÖHOLM A. u. PARANKO J. (2000) *Comparison of glycerol and ethylene glycol in equine embryo freezing using confocal microscopy, dapi-staining and non-surgical transfer*. 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Saari, Finland, Have-meyer Foundation Monograph Series no **3**: 52–53.

- IMEL K., SQUIRES E. u. SHIDELER R. (1981b) *A comparison of reproductive performance of fertile versus infertile donor mares*. Theriogenol **15**: 107.
- IULIANO M., E.L.SQUIRES u. V.M.COOK (1985) *Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate*. J Anim Sci **60**: 258–263.
- JASKO D. (2002) *Comparison of pregnancy rates following nonsurgical transfer of day 8 equine embryos using various transfer devices..* Theriogenol **58**: 713–715.
- JOECHLE W. (1995) *Ovulationskontrolle bei der Stute mit Ovuplant (Kurzzeit-Freisetzung des GnRH-Analogs Deslorelinazetat)*. Tierärztliche Praxis **23**: 381–393.
- JOHNSON A. (1986) *Pulsatile administration of gonadotrophin releasing hormone advances ovulation in cycling mares*. Biol Reprod **35**: 1123–1130.
- JOHNSON C.A., THOMPSON D.L. u. CARTMILL J.A. (2002) *Pituitary responsiveness to GnRH in mares following deslorelin acetate implantation to hasten ovulation1*. J Anim Sci **80**: 2681–2687.
- KENNEDY M.W. (2004) *Uterocalin- provider of essential lipids and amino acids to the pre-placentation equine conceptus*. Havemeyer Foundation Monograph Series no **16**: 53–56.
- KLUG E. u. JOECHLE W. (2001) *Advances in synchronizing estrus and ovulations in the mare: a mini review*. J Equine Vet Sci **21**: 474–79.
- KOENE M., BADER H. u. HOPPEN H. (1991) *Feasability of using hng as a superovulatory drug in a commercial embryo transfer programme*. J Reprod Fert **44, Suppl.**: 710–711.
- LAGNEAUX D., HUHTINEN M., KOSKINEN E. u. PALMER E. (1997) *Effect of anti-freeze protein (AFP) on the cooling and freezing of equine embryos as measured by DAPI-staining*. Equine Vet J **25, Suppl.**: 85–87.
- LAGNEAUX D. u. PALMER E. (1991) *Non-surgical recovery of morulae in the mare for freezing purposes using induction of ovulation*. Theriogenol **35**: 228.
- LAGNEAUX D., POMARICI A., SATTLER M., BRUNEAU B., DUCHAMP G., CAMILLO F. u. PALMER E. (2000) *Effect of L-glutamine for freezing equine embryos: evaluation by DAPI-staining and transfer of multiple embryos to recipient mares*. J Reprod Fert **56, Suppl.**: 561–568.
- LANDIM-ALVARENGA F., PERES K., FERNANDES C., SIQUIERA-PYLES E., LEO K., ALVARENGA M. u. SQUIRES E. (2004) *Ultrastructural analysis of embryos obtained from superovulated mares*. Havemeyer Foundation Monograph Series no **14**: 80–82.
- LAPIN D. u. GINTHER O. (1977) *Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with an equine pituitary extract*. J Anim Sci **44**: 834–842.

- LEGRAND E., BENCHARIF D., BARRIER-BATTUT I., DELAJARRAUD H., CORNIÈRE P., FIÉNI F., TAINTURIER D. u. BRUYAS J.F. (2002) *Comparison of pregnancy rates for days 7-8 equine embryos frozen in glycerol with or without previous enzymatic treatment of their capsule..* Theriogenol **58**: 721–723.
- LEGRAND E., BENCHARIF D., BATTUT I., TAINTURIER D. u. BRUYAS J. (1999) *Horse embryo freezing: Influence of thickness of the capsule.* Proceedings of the 15th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association, Lyon, France 184–185.
- LEGRAND E., KRAWIECKI J., TAINTURIER D., CORNIÈRE P., DELAJARRAUD H. u. BRUYAS J. (2000) *Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos..* Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation Monograph Series no **3**: 62–65.
- LEIBO S. (2000) *Novel methods of embryo cryopreservation.* Havemeyer Foundation Monograph Series no **3**: 51.
- LIM K., JANG G., KO K., LEE W., , PARK H., KIM J., KANG S. u. LEE B. (2008) *Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium.* Anim Reprod Sci **103**: 239–248.
- LOGAN N., MCCUE P., ALONSO M. u. SQUIRES E. (2007) *Evaluation of three equine FSH superovulation protocols in mares.* Anim Reprod Sci **102**: 48–55.
- LOSINNO L., AGUILAR J. u. LISA H. (2000) *Impact of multiple ovulations in a commercial equine embryo transfer programme.* Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation Monograph Series no **3**: 81–83.
- LOY R., PEMSTEIN R., O'CANNA D. u. DOUGLAS R. (1981) *Control of ovulation in cycling mares with ovarian steroids and prostaglandin.* Theriogenol **15**: 191–200.
- MACHADO M., CARMO M., SQUIRES E., ROSER J. u. ALVARENGA M. (2004) *Follicular dynamic, superovulatory response and embryo recovery rates in mares treated with constant and decreasing doses of equine pituitary extract (EPE) and purified equine FSH.* Havemeyer Foundation Monograph Series no **14**: 75–76.
- MACLELLAN L., CARNEVALE E., DA SILVA M.C., MCCUE P., SEIDEL G. u. SQUIRES E. (2002) *Cryopreservation of small and large equine embryos pre-treated with cytochalasin-B and/or trypsin.* Theriogenol **58**: 717–720.
- MAHURAN D.J. (1998) *The GM2 activator protein, its roles as a co-factor in GM2 hydrolysis and as a general glycol transport protein.* Biochimica et Biophysica Acta **1393**: 1–18.
- MAKRAKIS E., ANGELI I., AGAPITOU K., PAPPAS K., DAFERERAS A. u. PANTOS K. (2006) *Laser versus mechanical assisted hatching: a prospective study of clinical outcomes.* Fertility and Sterility **86**: 1596–1600.

- MAPLETOFT R. u. HASLER J. (2005) *Assisted reproductive technologies in cattle: a review*. Rev sci tech Off int Epiz **24**: 393–403.
- MARSAN C., GOFF A., SIROIS J. u. BETTERIDGE K. (1987) *Steroid secretion by different cell types of the horse conceptus*. J Reprod Fert **35, Suppl.**: 363–369.
- MCCUE P. (1996) *Superovulation*. Vet Clin North Am Equine Pract **12 no.1**: 1–11.
- MCCUE P., FARQUHAR V.J. u. SQUIRES E.L. (2000a) *Effect of the GnRH agonist deslorelin acetate on pituitary function and follicular development in the mare*. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 2000 **46**: 355–356.
- MCCUE P., HUDSON J., BRUEMMER J. u. SQUIRES E. (2004) *Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue*. Proceedings of the 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners 510–513.
- MCCUE P., LEBLANC M. u. SQUIRES E. (2007) *eFSH in clinical equine practice*. Theriogenol **68**: 429–433.
- MCCUE P., SCOGGIN C., MEIRA C. u. SQUIRES E. (2000b) *Pregnancy rates for equine embryos cooled for 24h in Ham's F10 versus Emcare™ embryo holding solution*. Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenol, San Antonio 147.
- MCCUE P., SQUIRES E., BRUEMMER J. u. NISWENDER K. (2001) *Equine Embryo Transfer: Techniques, Trends And Anecdotes*. Annual Conference of the Society for Theriogenology in cooperation with American College of Theriogenologists, Vancouver, British Columbia, Canada .
- MCDOWELL K., ADAMS M. u. WILLIAMS N. (1993) *Characterization of equine oviductal proteins synthesised and released at estrus and at day 4 after ovulation in bred and nonbred mares*. J Exp Zool **267**: 217–224.
- MCDOWELL K., SHARP D., PECK L. u. CHEVES L. (1985) *Effect of restricted conceptus mobility on maternal recognition of pregnancy in mares*. Equine Vet J **Suppl.3**: 23–40.
- MCKINNON A., CARNEVALE E., SQUIRES E., CARNEY N. u. SEIDEL G. (1989) *Bisection of equine embryos*. Equine vet J **Suppl.8**: 129–133.
- MCKINNON A. u. SQUIRES E. (1986) *Monitoring growth and development of the normal fetus*. 4th Annu Shortcourse Equine Ultra .
- MCKINNON A. u. SQUIRES E. (1988a) *Morphologic assessment of the equine embryo*. JAVMA **192**: 401–406.
- MCKINNON A. u. SQUIRES E. (1988b) *Equine Embryo Transfer*. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice **4**: 305–333.

- MEADOWS S., LISA H. u. WELSH C. (1999) *Factors affecting embryo recovery, embryo development and pregnancy rate in a commercial embryo transfer programme*. Havemeyer Foundation Monograph Series no **1**: 61–62.
- MEINJTES M., B.EILTS, COCHRAN R., GRAFF K., DENNISTON R., PACCAMONTI D. u. GODKE R. (2000) *Transvaginal intrafollicular sperm cell injection in the cyclic mare*. Havemeyer Foundation Monograph Series no **3**: 39–40.
- MEIRA C., ALVARENGA M., PAPA F., OBA E. u. E ALVARENGA F.L. (1993) *Cryopreservation of equine embryos using glycerol and 1,2-propanediol as cryoprotectants*. Equine Vet J **15, Suppl.**: 64–66.
- MEYERS P. (1997) Current Therapy in Large Animal Theriogenology, chapter Control and synchronization of the estrous cycle and ovulation., 96–102. R. S. Younquist and W. R. Threlfall.
- MICHEL T., ROSSDALE P. u. CASH R. (1986) *Efficiency of human chorionic gonadotropin and gonadotropin releasing hormone for hastening ovulation in Thoroughbred mares*. Equine Vet J **18**: 438–442.
- MIZUMACHI M., VOGLMAYR J., WASHINGTON D., CHEN C. u. BARDIN C. (1990) *Superovulation of ewes immunized against the human recombinant inhibin  $\alpha$ -subunit associated with increased pre- and postovulatory follicle stimulating hormone levels*. Endocrinology **126**: 1058–1063.
- MÜLLER Z. u. CIKRYT P. (1989) *A simple method for bisecting horse embryos*. Equine Vet J **8, Suppl.**: 123–125.
- MOREL M. u. NEWCOMBE J. (2007) *The efficacy of different hcG dose rates and the effect of hcG treatment on ovarian activity: ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation in the mare*. Anim Reprod Sci **Article in Press**.
- MORRIS L. u. ALLEN W. (2002) *Reproductive efficiency of the intensively managed thoroughbred in Newmarket*. Equine Vet J **34**: 51–60.
- MOUSSA M., BERSINGER I., DOLIGEZ P., GUIGNOT F., DUCHAMP G., VIDAMENT M., MERMILLOD P. u. BRUYAS J.F. (2005) *In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: slow-cooling and open pulled straw (ops) vitrification*. Theriogenol **64**: 1619–32.
- MOUSSA M., DUCHAMP G., MAHLA R., BRUYAS J. u. DAELS P. (2002a) *Comparison of three holding solutions for cooled storage of equine embryos*. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP **46**: 65–67.
- MOUSSA M., DUCHAMP G., MAHLA R., BRUYAS J.F. u. DAELS P. (2002b) *Comparison of pregnancy rates for equine embryos cooled for 24 h in Ham's F10 and EmCare holding solutions*. Therigenol **58**: 755–757.

- MOUSSA M., DUCHAMP G., MAHLA R., BRUYAS J.F. u. DAELS P. (2003) *In vitro and in vivo comparison of Ham's F10, Emcare holding solution and ViGro holding plus for the cooled storage of equine embryos*. Theriogenol **59**: 1615–1625.
- MOUSSA M., TREMOLEDA J., DUCHAMP G., BRUYAS J., COLENBRANDER B., BEVERS M. u. DAELS P. (2004b) *Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5°C*. Theriogenol **61**: 921–932.
- MURRAY G. (2007) *An overview of laser microdissection technologies*. Acta histochemica **109**: 171–176.
- NEELY D. (1988) *Progesterone/ progestin therapy in the broodmare*. 34th Annual Conference of the American Association of Equine Practicioners, San Diego, CA .
- NEWCOMBE J. (2004) *The relationship between the number, diameter and survival of early embryonic vesicles*. Pferdeheilkunde **20**: 214–220.
- VAN NIEKERK C. u. ALLEN W. (1975) *Early embryonic developement in the horse..* J Reprod Fert **Suppl.23**: 295–8.
- OGURI N. u. TSUTSUMI Y. (1972) *non-surgical recovery of equine eggs and an attempt at non-surgical egg transfer in horses*. J Reprod Fert **31**: 187–195.
- OLTMANNS R. (1996) *Fluoreszenzfarbstoffe zur Vitalitätsbestimmung von Mikroorganismen*. Master's thesis, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen (RWTH) Deutschland.
- ORIOU J. (1994) *The equine embryonic capsule: practical implications of recent research.Review article*. Equine Vet J **26**: 184–186.
- ORIOU J., BETTERIDGE K., HARDY J. u. SHAROM F. (1993c) *Structural and developmental relationship between capsular glycoproteins of the horse (Equus caballus) and the donkey (Equus asinus)*. Equine Vet J **15, Suppl.**: 14–18.
- ORIOU J., K.J.BETTERIDGE, A.J.CLARKE u. F.J.SHAROM (1993b) *mucin-like glycoproteins in the equine embryonic capsule*. Molec Reprod Dev **34**: 255–265.
- ORIOU J., SHAROM F. u. BETTERIDGE K. (1993a) *Developmentally regulated changes in the glycoproteins of the equine embryonic capsule*. J Reprod Fert **99**: S.653–664.
- ORIOU J., SHAROM F., G.DIDODATO, CLARKE A. u. BETTERIDGE K. (1992) *Changes in the biosynthesis of mucin-like components of the equine capsule by the trophectoderm*. J Reprod Fert (Abstract Series) **9**: 21.
- O'SULLIVAN C., LIU S., KARPINKA J. u. RANCOURT D. (2002) *Embryonic hatching enzyme strypsin/ISP1 is expressed with ISP2 in endometrial glands during implantation*. Mol Reprod Dev **62**: 328–334.

- PALMER E. (1985) *Recent attempts to improve synchronization of ovulation and to induce superovulation in the mare*. Equine Vet J **3**, **Suppl.**: 11–18.
- PALMER E., DUCHAMP G., BEZARD J., MAGISTRINI M., KING W., BOUSQUET D. u. BETTERIDGE K. (1987) *non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares*. J Reprod Fert Suppl **35**: 689–690.
- PALMER E., DUCHAMP G., CRIBIU E., MAHLA R., BOYAZOGLU S. u. BÉZARD J. (1997) *Follicular fluid is not a compulsory carrier of the oocyte at ovulation in the mare*. Equine Vet J Suppl **25**: 22–24.
- PASHEN R. (1987) *Short term storage and survival of equine embryos after refrigeration at 4° C*. J Reprod Fert **Suppl 35**: 697–698.
- PAYNE D., WARNES G., FLAHERTY S. u. MATTHEWS C. (1994) *Local experience with zona drilling, zona cutting and sperm microinjection..* Reprod Fert Dev **6**: 45–50.
- PEIPPO J., HUHTINEN M. u. KOTILAINEN T. (1995) *Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using PCR*. Therigenol **44**: 619–627.
- PERKINS N. (1999) *Equine reproductive pharmacology*. Vet Clin North Am Equine Pract **15(3)**: 687–704.
- PFAFF R., SEIDEL G., SEIDEL E. u. JASKO D. (1993) *Permeability of equine blastocysts to ethylene glycol and glycerol*. Theriogenol **39**: 248.
- PLANCH C., SANFINS A., RODRIQUES P. u. ALBERTINI D. (2005) *Cell polarity during folliculogenesis and oogenesis*. Reprod Biomed Online **10**: 478–484.
- POMAR F., TEERDS K., KIDSON A., COLENBRANDER B., THARASANIT T., AGUILAR B. u. ROELEN B. (2005) *Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study*. Therigenol **63**: 2254–2268.
- POMP D., GOOD B., GEISERT R., CORBIN C. u. CONLEY A. (1995) *Sex identification in mammals with polymerase chain reaction (PCR) and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or day-11 pig embryos*. J Anim Sci **73**: 1408–1415.
- PRUITT J., FORREST D., BURGHARDT R., EVANS J. u. KRAEMER D. (1991) *Viability and ultrastructure of equine embryos following culture in a static or dynamic system*. J Reprod Fert **44**, **Suppl.**: 405–410.
- PRUITT J.A., WILSON J. u. KRAEMER D. (1988) *Viability of equine embryos following fluorescein diacetate staining*. Therigenol **29**: 291.
- QUINN B., CASWELL D., LILLIE B., WAELCHLI R., BETTERIDGE K. u. HAYES M. (2006) *The GM2-activator protein is a major protein expressed by the encapsulated equine trophoblast*. Animal Reprod Sci **94**: 391–394.

- QUINN B., HAYES M., WAELCHLI R. u. BETTERIDGE K. (2005) *Major proteins in the embryonic capsule, and in yolk-sac and uterine fluids, during the second to fourth weeks of pregnancy in the mare*. Havemeyer Foundation Monograph Series no **16**: 47–49.
- QUINN B., HAYES M., WAELCHLI R., KENNEDY M. u. BETTERIDGE K. (2007) *Changes in major proteins in the embryonic capsule during immobilization (fixation) of the conceptus in the third week of pregnancy in the mare*. *Reproduction* **134**: 161–170.
- RAESIDE J., CHRISTIE H., RENAUD R., WAELCHLI R. u. BETTERIDGE K. (2004) *Estrogen metabolism in the equine conceptus and endometrium during early pregnancy in relation to estrogen concentrations in yolk-sac fluid*. *Biol Reprod* **71**: 1120–1127.
- RIEGER D. (2001) *Embryo metabolism and implications for culture requirements*. Havemeyer Foundation Monograph Series no **6**: 59–61.
- ROBINSON S., NEAL H. u. ALLEN W. (2000) *Modulation of oviductal transport in the mare by local application of prostaglandin E2*. *J Reprod Fert* **56, Suppl.**: 587–592.
- ROSER J., KIEFER B., EVANS J., NEELY D. u. PACHECO C. (1979) *The development of antibodies to human chorionic gonadotrophin following its repeated injection in the cyclic mare*. *J Reprod Fert* **27, Suppl.**: 173–179.
- RUDDOCK W., CREWS L., WAELCHLI R. u. BETTERIDGE K. (2000) *Fructose accumulation by the equine conceptus during the second to fourth weeks of gestation*. *Theriogenol (Abstract)* **53**: 286.
- SAMPER J. (2001) *Management and fertility of mares bred with frozen semen*. *Anim Reprod Sci* **68**: 219–228.
- SAMPER J. (2008) *Induction of estrus and ovulation: why some mares respond and others do not*. *Theriogenol* **70**: 445–447.
- SAMUEL C., ALLEN W. u. STEVEN D. (1974) *Studies on the equine placenta I Development of the micro-cotyledons*. *J Reprod Fert* **41**: 441–445.
- SCHERZER J., FAYRER-HOSKEN R., RAY L., HURLEY D. u. HEUSNER G. (2008) *Advancements in large animal embryo transfer and related biotechnologies*. *Reprod Dom Anim* **43**: 371–376.
- SEIDEL G. (1996) *Cryopreservation of equine embryos*. *Veterinary clinics of north america: equine practice* **12**: 85–99.
- SEIDEL G., SQUIRES E., MCKINNON A. u. LONG P. (1989) *Cryopreservation of equine embryos in 1,2 Propanediol*. *Equine Vet J* **8, Suppl.**: 87–88.
- SIROIS J., BETTERIDGE K. u. BRAULT A. (1987b) *Transcervical embryo transfer in horses: an application in an equestrian teaching center*. *Can Vet J* **28**: 750–753.

- SIROIS J. u. KIMMICH T. (1992) *FSH injections early in the cycle induce double ovulations in mares*. Theriogenol **37**: 300.
- SKIDMORE J., BOYLE M., CRAN D. u. ALLEN W. (1989) *Micromanipulation of equine embryos to produce monozygotic twins*. Equine vet J, Suppl **8**: 126–128.
- SLADE N., TAKEDA T., SQUIRES E., ELSDEN R. u. SEIDEL G. (1985) *A new procedure for the cryopreservation of equine embryos*. Theriogenol **24**: 45–58.
- SONGSASEN N., BUCKRELL B., PLANTE C. u. LEIBO S. (1995) *In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos*. Cryobiology **32**: 78–91.
- SQUIRES E. (2005) *Integration of future biotechnologies into the equine industry*. Anim Reprod Sci **89**: 187–198.
- SQUIRES E. (2006b) *Superovulation of mares and embryo freezing*. Società Italiana Veterinari per Equini - SIVE - XII Congresso Multisala, Bologna, Italy .
- SQUIRES E., A.O.MCKINNON, E.M.CARNEVALE, R.MORRIS u. T.M.NETT (1987) *Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares..* J Reprod Fert **35, Suppl.**: 399–403.
- SQUIRES E., CARNEVALE E. u. MCCUE P. (2005) *Embryo freezing*. Havemeyer Foundation Monograph Series no **18**: 39–40.
- SQUIRES E., COOK V. u. VOSS J. (1985b) *Collection and transfer of equine embryos*. Bulletin No1, Fort Collins, Colorado State University Animal Reproduction Laboratory .
- SQUIRES E., E.M.CARNEVALE, P.M.MCCUE u. J.E.BRUEMMER (2003a) *Embryo technologies in the horse*. Theriogenol **59**: 151–170.
- SQUIRES E., GARCIA R., GINTHER O., VOSS J. u. SEIDEL G. (1986) *Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares*. Theriogenol **26 No.5**: 661–670.
- SQUIRES E., MCCUE P. u. HUDSON J. (2004) *Advances in equine superovulation*. Havemeyer Foundation Monograph Series no **14**: 71–74.
- SQUIRES E., MCCUE P. u. VANDERWALL D. (1999) *The current status of equine embryo transfer*. Theriogenol **51**: 91–104.
- SQUIRES E. u. SEIDEL G. (1995) *Collection and transfer of equine embryos*. Animal Reproduction and Biotechnology Bulletin, Fort Collins CO: Colorado State University **11**: 7–9, 11–15, 27–32.
- STABENFELDT G., HUGHES J. u. EVANS J. (1972) *Ovarian activity during the estrous cycle of the mare*. Endocrinology **90**: 1379–1384.

- STARBUCK G., T.A.E.STOUT, G.E.LAMMING, W.R.ALLEN u. A.P.F.FLINT (1998) *Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrus cycle and early pregnancy.* J Reprod Fert **113**: 173–9.
- STEFFENHAGEN W., PINEDA M. u. GINTHER O. (1972) *Retention of unfertilized ova in uterine tube of mares.* Am J Vet Res **33**: 2391–2398.
- STEWART F., KENNEDY M. u. SUIRE S. (2000) *A novel uterine lipocalin supporting pregnancy in equids.* Cell Mol Life Sci **57**: 1373–1380.
- STEWART F., LENNARD S. u. ALLEN W. (1995a) *Mechanisms controlling formation of the equine chorionic girdle.* Biol Reprod Monogr Ser **1**: 151–159.
- STOUT T. (2006) *Equine embryo transfer: review of developing potential.* Equine Vet J **38**: 467–478.
- STOUT T. u. ALLEN W. (2001) *Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus.* Reproduction **121**: 771–775.
- STOUT T. u. ALLEN W. (2002) *Prostaglandin E2 und F2a production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrus mares.* Reprod **123**: 261–268.
- STOUT T., MEADOWS S. u. ALLEN W. (2005) *Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vitro.* Anim Reprod Sci **87**: 269–281.
- STOUT T., THARASANIT T. u. B.COLENBRANDER (2003) *Effect of freeze-thawing on the cellular integrity of equine embryos.* Havemeyer Foundation Monograph Series no **13**: 51–53.
- SUIRE S., STEWART F., BEAUCHAMP J. u. KENNEDY M. (2001) *Uterocalin, a lipocalin provisioning the preattachment equine conceptus: fatty acid and retinol binding properties, and structural characterization.* Biochem J **356**: 369–376.
- TAKEDA T., ELSDEN R., VITRO E.S.E..I., IN VIVO DEVELOPMENT OF FROZEN-THAWED EQUINE EMBRYOS. 10TH INT CONGR ANIM REPROD u. AI I. URBANA (1984) *In vitro and in vivo development of frozen-thawed equine embryos.* 10th Int Congr Anim Reprod and AI, Urbana, IL .
- TELFORD N., WATSON A. u. SCHULTZ G. (1990) *Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species.* Mol Reprod Dev **26**: 90–100.
- THARASANIT T., COLENBRANDER B. u. STOUT T. (2005) *Effect of cryopreservation on the cellular integrity of equine embryos.* Reproduction **129**: 789–798.

- TREMOLEDA L., STOUT T., LAGUTINA I., LAZZARI G., BEVERS M., COLENBRANDER B. u. GALLI C. (2003) *Effects of in vitro production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation*. Biol Reprod **69**: 1895–1906.
- VANDERVALL D., JUERGENS T. u. WOODS G. (2001) *Reproductive performance of commercial broodmares after induction of ovulation either hcG or ovuplant (Deslorelin)*. J Equine Vet Sci **21**: 539–542.
- VANDERWALL D. (1996) *Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability*. Reproductive Technology **12 no.1**: 61–83.
- VANDERWALL D. (2000) Recent Advances in Equine Theriogenology, chapter Current Equine Embryo Transfer Techniques. International Veterinary Information Service, B.A. Ball.
- VANDERWALL D., WOODS G., ASTON K., BUNCH T., LI G., MEERDO L. u. WHITE K. (2004a) *Cloned horse pregnancies produced using adult cumulus cells*. Reprod Fert Dev **16**: 675–679.
- VANDERWALL D., WOODS G., ROSER J., SCHLAFFER D., SELLON D., TESTER D. u. WHITE K. (2006) *Equine cloning: applications and outcomes*. Reprod Fert Dev **18**: 91–98.
- VANDERWALL D., WOODS G., SELLON D., TESTER D., SCHLAFFER D. u. WHITE K. (2004b) *The present status of equine cloning and clinical characterization of embryonic, fetal and neonatal development of three cloned mules*. JAVMA **225**: 1694–1699.
- VANDERZWALMEN P., BERTIN G., DEBAUCHE C., STANDAERT V., VAN ROOSENDAAL E., VANDERVORST M., BOLLEN N., ZECH H., MUKAIDA T., TAKAHASHI K. u. SCHOYSMANN R. (2002) *Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification*. Hum Reprod **17**: 744–751.
- VATJA G. u. KUWAYAMA M. (2006) *improving cryopreservation systems*. Theriogenol **65**: 236–244.
- VIDAMENT M., ARNAUD G., TRILLAUD-GEYL C., DUCHAMP G. u. PALMER E. (1992) *Analogue of GnRH (buserelin) and of PGF2a do not induce ovulation in mares*. 12th Int Congress on Animal Reproduction, The Hague, Netherlands .
- VOELKEL S. u. HU Y. (1992) *Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females*. Theriogenol **37**: 687–697.
- VOGELANG M., KEIDER J. u. POTTER G. (1983) *Recovery of pre-ovulatory equine oocytes by follicular aspiration*. Proc 8th Equine Nutr Physio Symp 285–288.
- VOS A.D. u. STEIRTEGHEM A. (2000) *Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction*. Cells Tissues Organs **166**: 220–227.

- WÄELCHLI R. u. BETTERIDGE K. (1996) *Osmolality of equine blastocyst fluid from day 11 to day 25 of pregnancy*. *Reprod Fert Dev* **8**: 981–988.
- WÄELCHLI R., MACPHEE D., KIDDER G. u. BETTERIDGE K. (1997) *Evidence for the presence of Na/K-ATPase (alpha 1 and beta 1 subunit isoforms and their probable role in blastocyst expansion in the preattachment horse conceptus)*. *Biol Reprod* **57**: 630–639.
- WÄELCHLI R., SHAND N., ROUD H., ALEXANDER S. u. BETTERIDGE K. (2000b) *Oxytocin and arginine vasopressin accumulation in the equine conceptus during the second to fifth weeks of pregnancy*. *Theriogenol (Abstract)* **53**: 630–639.
- WATSON A. (1992) *The cell biology of blastocyst development*. *Molec Reprod Dev* **33**: 492–504.
- WATSON A., NATALE D. u. BARCROFT L. (2004) *Molecular regulation of blastocyst formation*. *Anim Reprod Sci* **82-83**: 583–592.
- WATSON E. u. SERTICH P. (1989) *Prostaglandin production by horse embryos and the effect of co-culture of embryos with endometrium from pregnant mares*. *J Reprod Fert* **87**: 331–336.
- WEBER J., FREEMAN D., VANDERVALL D. u. WOODS G. (1991b) *PGE<sub>2</sub> secretion by oviductal transport-stage equine embryos*. *Biol Reprod* **45**: 540–543.
- WEBER J., FREEMAN D., VANDERWALL D. u. WOODS S. (1991a) *Prostaglandin E<sub>2</sub> hastens oviductal transport in mares*. *Biol Reprod* **45**: 544–546.
- WEBER J. u. WOODS G. (1993) *Influence of embryonic secretory chemicals on selective oviductal transport in mares*. *Equine Vet J* **15, Suppl.**: 36–38.
- WELCH S., DENNISTON D., HUDSON J., BRUEMMER J., MCCUE P. u. SQUIRES E. (2006) *Exogenous eFSH, follicle coasting and hCG as a novel superovulation regime in mares*. *J Equine Vet Sci* **26**: 262–270.
- WEYRAUCH K. u. SMOLLICH A. (1998) *Histologie-Kurs für Veterinärmediziner*. Enke.
- WILLADSEN S., PASHEN R. u. ALLEN W. (1980) *Micromanipulation of horse embryos*. Annual Conference of the Society for the Study of Fertility .
- WILSHER S. u. ALLEN W. (2004a) *An improved method for nonsurgical embryo transfer in the mare*. *Equine Vet Educ* **16**: 39–44.
- WILSHER S. u. ALLEN W. (2004b) *A novel method for non-surgical embryo transfer in the mare*. Havemeyer Foundation Monograph Series no **14**: 110–112.
- WILSON C., DOWNIE C. u. HUGHES J. (1990) *Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares*. *J Equine Vet Sci* **10**: 301–308.

- WILSON J., CACECI T., KRAEMER D., POTTER G. u. NECK K. (1986) *Hatching of the equine embryo: and electron microscopy study*. BiolReprod Suppl1 **34**: 101.
- WOODS G.L. u. GINTHER O.J. (1984) *Collection and transfer of multiple embryos in the mare*. Theriogenol **21**: 461–469.
- WRATHALL J., MCLEOD B., GLENCROSS R., BEARD A. u. KNIGHT P. (1990) *Inhibin immunoneutralization by antibodies raised against synthetic peptide sequences of inhibin alpha subunit: effects on gonadotropin concentrations and ovulation rate in sheep*. Endocrinology **124**: 167–176.
- YAMAMOTO Y., OGURI N., TSUTSUMI Y. u. HACHINOHE Y. (1982) *Experiments in the freezing and storage of equine embryos*. J Reprod Fert **32, Suppl.**: 399–403.
- YOUNG C., SQUIRES E., SEIDEL G., KATO H. u. MCCUE P. (1997b) *Cryopreservation procedures for day 7-8 equine embryos*. Equine Vet J **Suppl.25**: 98–102.
- ZAVY M., CLARK W., SHARP D., ROBERTS R. u. BAZER F. (1982) *Comparison of glucose, fructose, ascorbic acid and glucosephosphatase isomerase enzymatic activity in uterine flushings from nonpregnant and pregnant gilts and pony mares*. Biol Reprod **27**: 1147–1158.
- ZAVY M., VERNON M., SHARP D. u. BAZER F. (1984) *Endocrine aspects of early pregnancy in pony mares: a comparison of uterine luminal and peripheral plasma levels of steroids during the estrous cycle and early pregnancy*. Endocrinology **115**: 214–219.
- ZHANG J., MUZS L. u. BOYLE M. (1990) *In vitro fertilization of horse follicular oocytes mature in vitro*. Mol Reprod Dev **26**: 361–365.

# Abbildungsverzeichnis

2.1. Diese unbefruchteten Eizellen wurden gemeinsam mit einem Embryo im Zuge einer Uterusspülung aufgefunden. . . . .	21
2.2. Entwicklung des Embryos von der Eizelle bis zur Blastozyste (modifiziert nach <a href="http://www.wikimedia.org">www.wikimedia.org</a> ). . . . .	22
2.3. Darstellung eines polarisierten Trophoblasten. H = Wasserstoff, Na = Natrium, Cl = Chlorid, ICM = Inner Cell Mass, T = Trophoblastzellen, K = Kalium, tp = Trophoblastzellausläufer, M = Mitochondrien, N = Nucleus (WATSON, 1992) .	25
2.4. Verfahren der Zweiteilung. Nach manueller Zweiteilung eines equinen Embryos werden die Embryohälften in porcine <i>Zonae pellucidae</i> verbracht und in den Eileiter eines Schafes eingesetzt. Nach einigen Tagen werden die entstandenen Blastozysten in eine Empfängerstute übertragen (modifiziert nach ALLEN 2005). . . . .	48
2.5. Technik der nicht-chirurgischen Embryogewinnung (modifiziert nach AGUILAR and WOODS 1997). . . . .	51
2.6. Intrazytoplasmatische Spermieninjektion. A. Spermienidentifikation, B. Trennung des Spermenschwanzes, C. Aspiration des Spermiums in die Pipette, D. Fixierung der Eizelle von einer Seite mit Hilfe einer Pipette und Annäherung der Injektionspipette von der anderen Seite, E. Einführung der Injektionspipette und Durchstechung der Membran, F. Injektion des Spermiums und Zurückziehen der Pipette ( <a href="http://www.chuv.ch">www.chuv.ch</a> ) . . . . .	57
2.7. Übertragung des isolierten Zellkerns des Donortieres in die entkernte Eizelle des Empfängertieres. . . . .	61
2.8. Die <i>Laserassisted Microdissection</i> kann mit einer Vielzahl von Techniken, wie z.B. der Genom- oder Transkriptomanalyse, kombiniert werden (modifiziert nach CHIMGE et al. 2007). . . . .	78
2.9. Laser microdissection and pressure catapulting (LMPC). Nach Herauslösung der gewünschten Zelle aus ihrer Umgebung wird diese in ein Sammelgefäß verbracht (modifiziert nach BURGEMEISTER 2005). . . . .	79
3.1. Das Bayerische Haupt- und Landgestüt Schwaiganger . . . . .	80
3.2. Die Versuchsstuten des Haupt- und Landgestüts Schwaiganger . . . . .	81
3.3. Embryogewinnung. (A) Aufblasen des Ballons, (B) – (D) Spülvorgang, (E) Filtern der Spülflüssigkeit, (F) Petrischale zum Suchen und Waschen des Embryos, (G) –(H) Aufsuchen des Embryos mit dem Stereomikroskop . . . . .	85

3.4. Das PALM MicroBeam Lasersystem von Zeiss ( <a href="http://www.zeiss.de">www.zeiss.de</a> ). . . . .	86
3.5. Schema der Laserbehandlung. Mit Hilfe des Laserstrahls wird eine Öffnung in die Kapsel gelasert. . . . .	87
4.1. Kapsel- und Embryodurchmesser der Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt der Gewinnung. . . . .	91
4.2. Verlauf der Laserpunktion: (A) Übersicht des Embryos (Embryodurchmesser: 1327 $\mu\text{m}$ ) vor der Laserpunktion, (B) scharfgestellte Kapsel vor der Laserpunktion, (C) geringgradige, laserinduzierte Einstülpung der Kapsel (Pfeil), (D) Kapseldefekt (Pfeil) (E) eine Trophoblastzelle (Pfeil) drückt sich durch den Kapseldefekt, (F) Übersicht des Embryos nach der Laserpunktion (Pfeil: Kapseldefekt; Embryogröße: 1327 $\mu\text{m}$ ). Balken = 200 $\mu\text{m}$ . . . . .	93
4.3. Kapseldurchmesser vor und nach der Laserpunktion. . . . .	94
4.4. Embryodurchmesser vor und nach der Laserpunktion. . . . .	94
4.5. Kollabieren eines Embryos infolge der Laserpunktion: (A) Übersicht vor dem Kollabieren (1344 $\mu\text{m}$ ), (B) kollabierter Embryo mit sichtbarer Zellausstülpung innerhalb der Kapsel nach der Laserpunktion (1220 $\mu\text{m}$ Kapseldurchmesser, 960 $\mu\text{m}$ Embryodurchmesser), (C) nach 15 Minuten Kultur (1200 $\mu\text{m}$ Kapseldurchmesser, 900 $\mu\text{m}$ Embryodurchmesser), (D) nach 24 Stunden Kultur (1520 $\mu\text{m}$ Kapseldurchmesser, 1500 $\mu\text{m}$ Embryodurchmesser), (E) nach 48 Stunden Kultur, der Embryo ist nahezu vollständig reexpandiert und weist eine laserinduzierte Zellausstülpung auf (1480 $\mu\text{m}$ Kapseldurchmesser, 1460 $\mu\text{m}$ Embryodurchmesser), (F) DAPI-angefärbter Embryo nach 48 Stunden Kultur (1460 $\mu\text{m}$ Embryodurchmesser). Balken = 200 $\mu\text{m}$ . . . . .	95
4.6. Kapseldurchmesser vor und nach EG-Behandlung. . . . .	96
4.7. Embryodurchmesser vor und nach EG-Behandlung. . . . .	96
4.8. Reaktion eines Embryos aus Versuchsgruppe II auf die Behandlung mit EG: (A) Übersicht des Embryos nach dem Lasern (Embryodurchmesser: 487 $\mu\text{m}$ ), (B) vor der EG-Behandlung (Embryodurchmesser: 460 $\mu\text{m}$ ), (C) nach 2 Minuten in EG (Embryodurchmesser: 450 $\mu\text{m}$ ), (D) nach 5 Minuten in EG (Embryodurchmesser: 440 $\mu\text{m}$ ), (E) nach 10 Minuten EG (Kapseldurchmesser 430 $\mu\text{m}$ , Embryodurchmesser 420 $\mu\text{m}$ ), (F) nach 15 Minuten Kultur (Embryodurchmesser: 430 $\mu\text{m}$ ), (G) nach 24 Stunden Kultur (Kapseldurchmesser: 490 $\mu\text{m}$ , Embryodurchmesser: 440 $\mu\text{m}$ ), (H) nach 48 Stunden Kultur (Kapseldurchmesser: 480 $\mu\text{m}$ , Embryodurchmesser: 400 $\mu\text{m}$ ). Maßstab = 100 $\mu\text{m}$ . . . . .	97
4.9. Zeitspanne zwischen der Embryogewinnung und dem Kulturbeginn . . . . .	98
4.10. Wachstum eines Embryos: (A) vor der Kultivierung (Kapsel- und Embryodurchmesser: 960 $\mu\text{m}$ ), (B) nach 24 Stunden (Kapsel- und Embryodurchmesser: 1560 $\mu\text{m}$ ), (C) nach 48 Stunden (Kapsel- und Embryodurchmesser: 2160 $\mu\text{m}$ ), (D) nach Anfärbung mit DAPI. Maßstab = 200 $\mu\text{m}$ . . . . .	99
4.11. Kapseldurchmesser der Embryonen während der Kultur. . . . .	99

4.12. Embryodurchmesser während der Kultur. . . . .	100
4.13. Kapsel- und Embryodurchmesser der KGI während der 48stündigen Kultur. .	100
4.14. Kapsel- und Embryodurchmesser der VGI während der 48stündigen Kultur. .	101
4.15. Kapsel- und Embryodurchmesser der KGII während der 48stündigen Kultur. .	101
4.16. Kapsel- und Embryodurchmesser der VGII während der 48stündigen Kultur. .	102
4.17. Relatives Kapselwachstum zwischen dem Zeitpunkt der Gewinnung und 15 Minuten bzw. 24 und 48 Stunden Kultur. . . . .	103
4.18. Relatives Embryowachstum zwischen dem Zeitpunkt der Gewinnung und 15 Minuten bzw. 24 und 48 Stunden Kultur. . . . .	103
4.19. Relatives Wachstum der KGI . . . . .	104
4.20. Relatives Wachstum der VGI . . . . .	104
4.21. Relatives Wachstum der KGII . . . . .	105
4.22. Relatives Wachstum der VGII . . . . .	105
4.23. Blastozoelekollaps während der Kultur: (A) vor der Kultur (1300 $\mu\text{m}$ ), (B) nach 15 Minuten (Kapsel- und Embryodurchmesser 1300 $\mu\text{m}$ ), (C) nach 24 Stun- den (Kapseldurchmesser 1360 $\mu\text{m}$ , Embryodurchmesser 1260 $\mu\text{m}$ ), (D) nach 48 Stunden Kultur (Kapseldurchmesser 1320 $\mu\text{m}$ , Embryodurchmesser 1020 $\mu\text{m}$ ). Maßstab = 200 $\mu\text{m}$ . . . . .	106
4.24. Kapselruptur zwischen 24 und 48 Stunden Kultur: (A) vor der Kultur (Kapsel- und Embryodurchmesser 600 $\mu\text{m}$ ), (B) nach 24 Stunden (Kapsel- und Em- bryodurchmesser 1080 $\mu\text{m}$ ), (C) nach 48 Stunden, die Kapsel ist rupturiert (Breite des Embryos 450 $\mu\text{m}$ , Länge des Embryos 650 $\mu\text{m}$ ), (D) nach Anfär- bung mit DAPI. Maßstab = 200 $\mu\text{m}$ . . . . .	106
4.25. Teilausstülpung des Trophoblasten eines Embryos als Folge der Laserpunk- tion: (A) Übersicht des Embryos vor der Laserbehandlung (Kapsel- und Em- bryodurchmesser 522 $\mu\text{m}$ ), (B) scharfgestellte Kapsel, (C) durch den Kapsel- defekt dringende Trophoblastzelle, (D) Übersicht nach dem Lasern (Kapsel- und Embryodurchmesser 495 $\mu\text{m}$ ), (E) Kollabieren von Kapsel und Embryo nach 15 Minuten Kultur (Kapseldurchmesser 420 $\mu\text{m}$ , Embryodurchmesser 350 $\mu\text{m}$ ), (F) kollabierte Kapsel mit sichtbarem Defekt, (G) nach 24 Stunden Kultur (Kapsel- und Embryodurchmesser 440 $\mu\text{m}$ ), (H) nach 48 Stunden Kul- tur (Kapseldurchmesser 470 $\mu\text{m}$ , Embryodurchmesser 430 $\mu\text{m}$ ), ein Teil der Zellen ist durch den laserinduzierten Kapseldefekt hinausgedrungen. Balken = 100 $\mu\text{m}$ . . . . .	107
4.26. Anteil fluoreszierender Zellen nach 48 Stunden Kultur. . . . .	108
4.27. Anteil fluoreszierender Zellen entsprechend dem Verhalten während der Kul- turdauer von 48 Stunden ( $n$ =Anzahl). . . . .	108

4.28. Unterschiedliche Fluoreszenz bei Embryonen nach Anfärbung mit DAPI: (A) nach 48 bzw. (B) nach 72 Stunden, (C) Zellausstülpungen nach 48 Stunden, (D) Embryo ohne Kapsel nach 48 Stunden, (E) Embryo inklusive rupturierter Kapsel nach 48 Stunden, (F) und (G) kollabierte Embryonen nach 48 Stunden, (H) Zellausstülpungen nach 48 Stunden Kultur. . . . .	109
4.29. Embryonen nach 48 Stunden Kultur vor und nach der Anfärbung mit DAPI. (A1,A2) vitaler Embryo, (B1, B2) Embryo mit Zellverdichtungen, (C1, C2) Embryo mit rupturierter Kapsel, (D1, D2) kollabierter Embryo, (E1 – H1) Zellverdichtungen, die nach Anfärbung mit DAPI deutlich fluoreszieren (A2 – H2). . .	110

# Tabellenverzeichnis

2.1. Klassifikationssystem zur morphologischen Qualitätsbeurteilung von Pferdeembryonen nach McKINNON u. SQUIRES 1988 . . . . .	41
3.1. In dieser Tabelle ist der Biopsiescore der einzelnen Stuten dargestellt. . . . .	82
4.1. In dieser Tabelle ist die Embryogewinnungsrate der einzelnen Stuten dargestellt (n=Anzahl). . . . .	91
4.2. Überblick über die gewonnenen Embryonen. . . . .	92
4.3. Reaktion der Embryonen auf die Manipulationen (n=Anzahl). . . . .	98

# Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Handler für die Bereitstellung dieses faszinierenden Themas und für die Möglichkeit, meine Dissertation an seinem Lehrstuhl und in seinem Team anfertigen zu dürfen. Außerdem danke ich ihm für seine immerwährende Unterstützung wenn ich Hilfe oder Rat brauchte und seine stets aufmunternden Worte. Ich danke ihm für seine freundschaftliche und humorvolle Art und seine Fähigkeit, mich durch Lob und Zuspruch immer wieder zu motivieren. Danke für die 1000 Antworten auf meine 1000 Fragen! Danke für Deine Hilfe!!!! Ich hätte mir wirklich keinen besseren Doktorvater wünschen können!!!

Großer Dank gilt auch meiner Betreuerin Dr. Christiane Otzdorff für ihre Hilfe bei der praktischen Durchführung meiner Dissertation und für ihre vielen, vielen Wochenenden, die sie dafür geopfert hat. Vielen Dank für Deine Tipps und das Korrigieren meiner Arbeit!! Und Danke für den Doktorhut!!!;-)

Ein weiterer Dank gilt der veterinärmedizinisch-technischen Assistentin Elke Fink, die eine unglaubliche Hilfe beim Spülen war. Danke, dass auch Du Deine Wochenenden geopfert hast! Ihr wart das beste Team ever!!!!

Ich sag nur: Equine Embryo Transfer – Mission (im)possible?

Ich danke dem Haupt- und Landgestüt Schwaiganger für das zur Verfügungstellen der Stuten. Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hans-Peter Remler, der immer ein offenes Ohr für die kleineren und größeren Schwierigkeiten hatte und mir auch fachlich stets zur Seite stand! Danke an das Team aus dem Schulstall – besonders Herrn Wallner und den Auszubildenden für ihre Hilfsbereitschaft! Ein ganz „besonderer“ Dank gilt dem Besamungswart, der mir durch seine „loyale“ Arbeitsweise viel Freude bereitet hat...

Ich danke der Gruppe AG Nanoanalytics unter Dr. Stefan Thalhammer vom Helmholtz-Zentrum München für die Bereitstellung des Lasergerätes und ihren großen Arbeitseinsatz. Ein ganz besonderer Dank gilt insbesondere Thorsten Wachtmeister und Theresa Neumaier für das Lasern meiner Kinder und ihre Wochenendeinsätze!!!

Ein großes Dankeschön geht an die Firma Minitüb, die fast alle Materialien für meine Arbeit gesponsort hat!!! Danke für den Kinderwagen, ohne den meine Embryonen nicht so sanft hätten transportiert werden können.

Ich danke der Firma Ibidi für das Herstellen und Sponsorn der Laserschalen sowie der H. Wilhelm Schaumann Stiftung für das sponsorn des Benzingeldes!!

Vielen Dank den Assistentinnen Dr. Nina Kölle, Dr. Birgit Kolberg und Dr. Sandra Hake-Paulus für ihre fachliche Hilfe und Unterstützung. Danke Nina, dass Du immer ein offenes Ohr für mich hattest und mir immer geholfen hast!!!

Ein Riesendank gilt auch den Herren Dr. Stefan Gesell und Dr. Marcus Schneider für die vielen netten Mittagspausen, Weinabende, Weihnachtsmarktbesuche, die riesige Wiesngaudi und die sonstigen lustigen Stunden!!!

Ausserdem danke ich meiner Mitdotorandin Julia Loibl, die mir sehr mit dem PC-Programm „Latex“ geholfen hat und ohne deren Kenntnisse ich oft verzweifelt wäre. Wir haben es geschafft!!Sekt ahoi!;-)

Der größte Dank gilt meiner Familie für ihre unglaubliche Unterstützung!!! Danke, dass Ihr immer an mich geglaubt habt und für Euren Trost, wenn es mal nicht so gut lief. Meinen Eltern danke ich auch dafür, dass sie mir durch ihre finanzielle Unterstützung diesen Kindheits- und Lebenstraum des Tiermedizinstudiums und der Doktorarbeit ermöglicht haben!!! Ihr seid - so oder so - einfach die besten Eltern der Welt!!!! Ich danke meinen Schwestern Julia und Silia für Ihre telefonische Seelsorge. Silia mit Nils und Ole-Mops danke ich für die strickreichen Feierabende;-) Danke Julia für die Unterkunft und dass Du mich Vin-Rouge-abhängig gemacht hast!;-) Danke für das Korrigieren meiner Arbeit, die JPG's und Deine professionellen Ratschläge!!!Danke, dass Ihr alle zu meiner Verteidigung gekommen seid und diesen Tag so besonders gemacht habt!!!

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Michi, der sich jeden Abend meine detaillierte Tagesbeschreibung anhören musste und dessen Nerven ich damit sehr strapaziert habe;-) Danke für Deinen Fahr-Einsatz während des praktischen Teils, Dein Verständnis und für die schönen Wochenenden mit Dir!Ly

Ausserdem danke ich meinen Freunden (Sophie, Manon, Sarah, Vroni, Caro, u.v.m), die mich immer aufgemuntert und mich das ein oder andere Mal auf andere Gedanken gebracht haben. Danke Uli für Deine (englische) Unterstützung! Danke an Irmis und Thomas mit Paula und Franziska für so manchen schönen Babysitter- und Weinabend und für das Korrekturlesen.

Danke an mein „Baby“, das ich leider nach der Doktorarbeit verschrotten musste...!

Zuguter letzt gilt ein großer Dank meinen Stuten: All my Love, Amerika, Attika, Aurelia, Avec Plaisir, Delta, Donausonne, Dubai, Duchella, Dynastie, Felice Navidad, Grande Amour, Guantanamo, Mallorca, Simona und Sunrise: Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen! Danke für die freundliche Zusammenarbeit und danke für eure Embryonen!!!