

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. R. Stolla

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. J. Braun

**Fortpflanzungsphysiologie und assistierte Reproduktion beim Haushund
(*Canis familiaris*) – eine Literaturstudie**

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

von
Ellen Kathrin Keller
aus
München-Thalkirchen

München 2003

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Braun
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Fortpflanzungsphysiologie beim Haushund (<i>Canis familiaris</i>)	2
2.1	Reproduktionsphysiologie bei der Hündin	2
2.1.1	Der Sexualzyklus	2
2.1.2	Die Ovarien	4
2.1.2.1	Makroskopische Anatomie	4
2.1.2.2	Histologischer Aufbau des caninen Ovars	4
2.1.3	Oogenese	5
2.1.4	Follikulogenese	6
2.1.5	Ultrastrukturelle Eigenschaften caniner Eizellen	10
2.1.6	Hormonelles zyklisches Geschehen	12
2.1.6.1	Gonadotropine	12
2.1.6.1.1	Follikelstimulierendes Hormon und Luteinisierungshormon	12
2.1.6.1.2	Prolaktin	14
2.1.6.2	Gonadale und plazentare Sexualhormone	18
2.1.6.2.1	Progesteron und Östrogen	18
2.1.6.2.2	Relaxin	20
2.2	Grundzüge der Reproduktionsphysiologie beim Rüden	21
2.3	Befruchtung, Fertilisation und frühe Embryonalentwicklung	22
2.3.1	Die Paarung beim Haushund	22
2.3.2	Kapazitation, Akrosomenreaktion und Spermien-Eizell-Bindung	23
2.3.3	Spermium-Eizell-Fusion	26
2.3.4	Frühe Embryonalentwicklung von Hundeembryonen	28
3	Assistierte Reproduktionstechnologien beim Haushund	34
3.1	Geschichte der assistierten Reproduktion bei Hunden	34
3.2	Artifizielle Insemination (AI) bei Haushunden	35
3.2.1	Spermagewinnung	36
3.2.2	Spermauntersuchung	38
3.2.2.1	Spermienmorphologie	39

3.2.2.2	Spermienmotilität	43
3.2.2.3	Spermienkonzentration	45
3.2.2.4	Zytologie des Hundeejakulates	45
3.2.2.5	Plasmamembranintegrität und akrosomaler Status	46
3.2.2.6	Thermoresistenz	49
3.2.2.7	Beurteilung der Fertilität	49
3.2.2.8	Funktionstests für Hundespermien	50
3.2.2.8.1	Zona pellucida- und Hemizona-Bindungs-Test (ZPT und HZT)	50
3.2.2.8.2	Oozyten-Penetrations-Test (OPT)	51
3.2.2.8.3	In-vitro-Fertilisation (IVF)	52
3.2.2.8.4	Bereitstellung homologer Oozyten	53
3.2.3	Spermakonservierung	53
3.2.3.1	Kurzzeitlagerung von Hundesperma	54
3.2.3.2	Kryokonservierung von Hundesperma	57
3.2.3.2.1	Spermaverdünner für die Kryokonservierung caniner Spermien	58
3.2.3.2.2	Einfriertechnologie	68
3.2.3.3	Einsatz von konserviertem Hundesperma in der Zucht	74
3.2.4	Bestimmung des Besamungszeitpunktes	76
3.2.4.1	Verhalten der Hündin	78
3.2.4.2	Vulvaturgor bei der Hündin	78
3.2.4.3	Erfassung hormoneller Veränderungen	78
3.2.4.4	Vaginalzytologie	80
3.2.4.5	Vaginoskopie	81
3.2.4.6	Ultrasonographische Untersuchung der Hundeovarien	83
3.2.4.7	Untersuchung des zerviko-vaginalen Sekretes	84
3.2.5	Inseminationstechnik	86
3.2.5.1	Intravaginale Insemination (IVI)	87
3.2.5.2	Transzervikale intrauterine Insemination (TCI)	88
3.2.5.2.1	“Norwegische“ Methode der TCI	88
3.2.5.2.2	Endoskopische TCI	89
3.2.5.3	Intrauterine Insemination (IUI) mittels Laparotomie	91
3.2.5.4	Laparoskopische intrauterine Insemination	91
3.2.5.5	Wahl der Inseminationstechniken	92
3.2.6	Inseminationsdosis, -volumen und -frequenz	95

3.3	Hormonelle Zyklusbeeinflussung bei der Hündin	97
3.3.1	Zyklusinduktion	97
3.3.1.1	Gonadotropin-Behandlung	97
3.3.1.2	Behandlung mit Gonadotropin Releasing Hormon	100
3.3.1.3	Behandlung mit Ergotaminderivaten	101
3.3.2	Induktion der Superovulation	103
3.4	In-vitro-Produktion von Hundeembryonen	104
3.4.1	Gewinnung von Hundeoocyten für die In-vitro-Kultivierung	105
3.4.2	Untersuchung des Zellkerns von Hundeoocyten	108
3.4.3	In-vitro-Reifung (IVM) von Hundeoocyten	114
3.4.3.1	In-vitro-Reifungsdauer	115
3.4.3.2	Einfluss von Oozytendurchmesser und Zyklusstadium	116
3.4.3.3	Supplementation von Serum oder Hormonen	119
3.4.3.4	Kultivierung mit Eileiterflüssigkeit oder Eileiter-Epithelzellen	121
3.4.3.5	In-vitro-Reifung in caninen Follikeln	123
3.4.4	In-vitro-Fertilisation (IVF) von Hundeoocyten	124
3.4.4.1	Präparation von Hundeoocyten für die IVF	124
3.4.4.2	Präparation der Hundespermien für die IVF	125
3.4.4.3	Fertilisation und Pronukleusformation in vitro	128
3.4.5	In-vitro-Kultivierung (IVC) befruchteter Hundeeizellen	132
3.4.6	Intrazytoplasmatische Spermien-Injektion (ICSI)	133
3.4.7	Entwicklungsblock in vitro	134
3.5	Embryonentransfer (ET)	134
3.5.1	Embryonengewinnung aus Eileiter oder Uterus	135
3.5.2	Transfer der Embryonen	137
3.5.3	Transfer in vitro produzierter Embryonen	140
3.6	Klonierung von Haushunden	141
3.7	Xenotransplantation von ovariellen caninen Gewebe	144
4	Zusammenfassung	145
5	Summary	147
6	Literaturverzeichnis	149
7	Anhang	177

Abkürzungsverzeichnis

AI	Artifizielle Insemination
ATP	Adenosintriphosphat
bCG	bovines Choriongonadotropin
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
C-FDA	Carboxyfluorescindiaceat
COC	Kumulus-Oozyten-Komplex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eCG	equines Choriongonadotropin
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ET	Embryonentransfer
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
G	Gauge
GAG	Glycosaminglycan
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GTP	Guanosintriphosphat
GV	Germinalvesikel
GVBD	Germinalvesikel Breakdown
hCG	humanes Choriongonadotropin
HOS-Test	hyposmotischer Schwelltest
HVL	Hypophysenvorderlappen
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermien-Injektion
IUI	intrauterine Insemination
IVC	In-vitro-Kultivierung
IVF	In-vitro-Fertilisation
IVI	intravaginale Insemination
IVM	In-vitro-Reifung (Maturation)
kD	Kilo-Dalton

V

LH	Luteinisierungshormon
mRNA	messenger RNA
PBS	Phosphatgepufferte isotonische Kochsalzlösung
PGF	Prostaglandin F
PI	Propidiumjodid
PMSG	Pregnant Mare's Serum Gonadotropin
p. ov.	post ovulationem
p. p.	post partum
PRL	Prolaktin
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodezylsulfat
SOF	Synthetic oviductal fluid
TCI	Transzervikale intrauterine Insemination
ZP	Zona pellucida
ZP1-3	ZP (Haupt)-Glykoproteinen 1 bis 3

1 Einleitung

Techniken zur assistierten Reproduktion von Säugetieren gewinnen immer mehr an Bedeutung. Obwohl die erste erfolgreiche künstliche Besamung einer Hündin bereits im 18. Jahrhundert durchgeführt wurde, sind die Kenntnisse über die Physiologie der Reproduktion und die assistierte Reproduktion bei den Caniden im Vergleich zur Situation bei anderen Haustieren und beim Menschen begrenzt. Es ist bekannt, dass die Vorgänge der Eizellreifung und Fertilisation bei der Hündin sich wesentlich von denen bei anderen Spezies unterscheiden. Die In-vitro-Reifung und -Fertilisation von Oozyten, die Embryo-Kultur und alle damit zusammenhängenden Biotechniken sind ebenso wie die hormonelle Zyklussteuerung bisher nicht zuverlässig etabliert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die kritische Sichtung und Auswertung der vorhandenen Literatur über die physiologische Fortpflanzung, die assistierte Reproduktion und damit assoziierte Biotechniken beim Haushund (*Canis familiaris*).

2 Fortpflanzungsphysiologie beim Haushund (*Canis familiaris*)

2.1 Reproduktionsphysiologie bei der Hündin

2.1.1 Der Sexualzyklus

Die Hündin ist monoestrisch mit geringer oder keiner saisonalen Assoziation (Mahi-Brown, 1991; Paradis, 1991). Die einzelnen Zyklen werden durch einen Anoestrus mit einer variablen Dauer von zwei bis 10 Monaten getrennt. Das Läufigkeitsintervall unterliegt somit erheblichen Schwankungen sowohl zwischen als auch innerhalb den verschiedenen Rassen. Das Brunstintervall bei Einzeltieren ist jedoch relativ konstant (Berchtold, 1997a; Bouchard et al., 1991; Concannon, 1986b; Paradis, 1991). Weder die genauen Faktoren, die die Dauer des Anoestrus regulieren, noch die endokrinen Veränderungen, die zu einer neuen folliculären Phase bei der Hündin führen, sind bekannt. Diese Veränderungen stehen allerdings in Beziehung zu der im fortschreitenden Anoestrus ansteigenden pulsierenden Sekretion von Follikelstimulierendem Hormon (FSH) und Luteinisierungshormon (LH) sowie der nachlassenden Sekretion von Prolaktin (PRL) (Jöchle; 1995; Kooistra et al., 1999) (siehe 2.1.6 Hormonelles Geschehen).

Aus dem Anoestrus heraus tritt die Hündin in einen drei bis 21 Tage andauernden Prooestrus ein. Dieser ist durch Follikelwachstum, Schwellung der Vulva und blutigen Vaginalausfluss gekennzeichnet (Berchtold, 1997a; Concannon et al., 1989). Der sich anschließende Oestrus mit einer Dauer von zwei bis 12 Tagen ist charakterisiert durch die Bereitschaft der Hündin, das Aufspringen des Rüden zu dulden. Zwischen der Duldung des Rüden und dem endokrinen Geschehen besteht keine enge Korrelation. Der vaginale Ausfluss wird während des Oestrus bernsteinfarben, die Schleimhaut der immer noch ödematisierten Vulva erscheint hellrosa. Prooestrus und Oestrus zusammen werden als "Läufigkeit" bezeichnet (Berchtold, 1997a; Mahi-Brown, 1991).

Die sich an die Läufigkeit anschließende Phase wird in der Literatur als Dioestrus oder Metoestrus bezeichnet und unterschiedlich definiert. Bereits 1900 versuchte Heape die einzelnen Zyklusstadien verschiedener Säugetiere zu klassifizieren. Die

Bezeichnung "Dioestrus" wurde hier für die kurze, meist nicht mehr als 12 bis 14 Tagen dauernde Periode reserviert, auf die bei polyoestrischen Spezies sofort ein neuer Prooestrus folgt. Für die Periode nach dem Oestrus, in der "die Aktivität der generativen Organe graduell zurückgeht" und auf die sich eine lange Ruhepause anschließt, verwendete Heape (1900) die Bezeichnung "Metoestrus". Diese Phase ist durch die Progesteronsekretion der Ovarien und die dadurch bedingten Veränderungen am Uterus gekennzeichnet (Olson et al., 1989). Mehrere Autoren ersetzten in der Folgezeit die Bezeichnung "Metoestrus" durch "Dioestrus" und definierten diesen als die für 18 bis 20 Wochen anhaltende Periode nach dem Oestrus, in der die Progesteronkonzentration im Blut der Hündin erhöht ist (Berchtold, 1997a; Holst und Phemister, 1974; Olson et al., 1984, 1989; Reimers et al., 1978). Andere Autoren sehen den Dioestrus oder Metoestrus als die Zyklusperiode an, die von der Aktivität des Corpus luteum bestimmt wird (Berchtold, 1997a; Cupps et al., 1969). Diese Phase hat eine Dauer von neun bis 12 Wochen (Berchtold, 1997a; Concannon et al., 1975; Concannon et al., 1989). Die Verwendung der Bezeichnungen "Metoestrus" oder "Dioestrus" zur Beschreibung der lutealen Phase bei der Hündin ist jedoch nicht unproblematisch, da diese bereits zu Beginn des Oestrus mit der präovulatorischen Luteinisierung der Follikel beginnt.

Bei nichtträchtigen Hündinnen kommt es nach der Läufigkeit physiologisch zur Pseudogravidität. Aus dieser Eigentümlichkeit des Sexualzyklus bei den Caniden resultiert die Fähigkeit in der Saison nicht tragender Tiere, sich im Rudel an der Brutpflege bzw. der Ernährung der Welpen der Leithündin zu beteiligen. Die Beibehaltung dieses Zyklusmodells bei der Haushündin stellt einen Atavismus dar (Jöchle, 1995). Bei der Scheinträchtigkeit der Haushündin werden die klinisch unauffällige d.h. "verdeckte" (engl.: "covert") und die klinisch erfassbare "offene" (engl.: "overt") Form unterschieden. Die klinisch auffällige Pseudogravidität ist ein Syndrom, das durch Verhaltensstörungen am Ende der Lutealphase wie das Auftreten von Nestbauverhalten, Gewichtszunahme, Gesäugeanbildung mit nachfolgender Sekretion von Milch oder milchähnlicher bis serumartiger Flüssigkeit gekennzeichnet ist (Feldman und Nelson, 1996c; Jöchle, 1995; Johnston, 1980). Sie kann bereits 20 bis 30 Tage nach der Läufigkeit, 60 bis 80 Tage danach oder erst nach 100 Tagen auftreten und zwei bis drei Wochen oder länger andauern (Berchtold, 1997a; Jöchle, 1999). Das klinische Bild ist in seiner Ausprägung sehr

unterschiedlich (Jöchle, 1995). Die Angaben über die Inzidenz bei nicht ovariektomierten Hündinnen variieren zwischen 15 und 75 % (Berchtold, 1997a; Johnston, 1980). Einzelne Rassen wie z.B. Dackel und Boxer scheinen zur klinisch auffälligen Scheinträchtigkeit prädestiniert zu sein. Es ist nach wie vor unklar, warum sich bei einzelnen Rassen und Individuen das Syndrom der Pseudogravidität schon nach der ersten Läufigkeit zeigt und welche Faktoren für die unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbilder verantwortlich sind (Jöchle, 1999) (siehe 2.1.6.1.2 Prolaktin).

2.1.2 Die Ovarien

2.1.2.1 Makroskopische Anatomie

Die abdominal gelegenen Ovarien der Hündin sind etwa in Höhe des dritten bis vierten Lendenwirbels kaudal der Nieren, in enger Assoziation zur seitlichen Bauchwand, an einem oft sehr kurzen Mesovarium aufgehängt. Sie sind vollständig von der Bursa ovarica umhüllt (Inaba et al., 1984; Schummer und Vollmerhaus, 1987). Das kraniale Keimdrüsenband zieht an der Niere vorbei und verbindet den Eierstock mit dem Zwerchfell, nach kaudal zieht das sehr kurze Ligamentum ovarii proprium zur Uterushornspitze. Der Hauptanteil der Bursa ovarica wird von der Mesosalpinx gebildet, die bei der Hündin zu einem Fettkörper ausgezogen ist, der die Eileiter enthält. Die Ausmaße der Ovarien sind bei Hündinnen verschiedener Rassen und Größe sehr variabel, sie haben eine durchschnittliche Länge von ca. 20 mm und eine Dicke von ca. 15 mm. Sie haben länglich-ovale, leicht abgeplattete, gelegentlich kugelige Gestalt und je nach Zykluszustand eine glatte oder feinhöckerige Oberfläche (Frewein et al., 1994, Schummer und Vollmerhaus, 1987).

2.1.2.2 Histologischer Aufbau des caninen Ovars

Die Ovarien sind vom Keimdrüsenepithel überzogen. Darunter liegt die bei der Hündin dünne Tunica albuginea, die eine Art Organkapsel aus kollagenen Fasern darstellt. Morphologisch werden innerhalb dieser Kapsel die periphere Zona parenchymatosa (Cortex ovarii) und die zentrale Zona vasculosa (Medulla ovarii)

unterschieden. Die kortikale Region wird von Follikeln in verschiedenen Entwicklungsstadien oder Corpora lutea eingenommen. Diese sind von lockerem Bindegewebsstroma umgeben. Die Medulla enthält als Grundstruktur ein Netzwerk lockeren Bindegewebes mit vielen elastischen Fasern und Strängen glatter Muskulatur. Darin eingebettete plexusbildende Blutgefäße, Lymphgefäße, vorwiegend marklose Nerven und das bei den Carnivoren prominente Rete ovarii prägen das Bild (Preidkalns and Leiser, 1998; Tesoriero, 1981).

2.1.3 Oogenese

Während der frühen Embryonalentwicklung wandern primordiale Keimzellen aus dem Entoderm des Dottersacks und des Allantoisstiels in die Keimdrüsenanlagen. Sie vermehren sich durch mitotische Teilung im Kortex der fetalen Ovarien. Bei vielen Spezies ist diese Vermehrungsphase der Keimzellen auf einen kurzen pränatalen Zeitabschnitt begrenzt, bei der Hündin hält diese Proliferation hingegen noch Tage nach der Geburt an (Andersen und Simpson, 1973).

Die Zahl der Oogonien nimmt in der Vermehrungsphase schnell zu. Bei der Hündin wird kurz nach der Geburt eine Höchstzahl von ca. 700.000 erreicht. In der Folgezeit ist ein Großteil der Keimzellen vom Zelluntergang betroffen, so dass sich ihre Zahl bis zum Erreichen der Pubertät auf ca. 350.000 reduziert (Schotterer, 1928).

Die Vermehrungsphase der Keimzellen endet mit deren Eintritt in die Meiose. Die Oogonien entwickeln sich zu Oozyten. Erste Meiosen sind bei der Hündin am ersten Tag nach der Geburt, Oogonien bis zum zweiten Lebensmonat zu beobachten. Haben die Eizellen die Prophase der ersten meiotischen Reifeteilung (Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän) durchlaufen, werden sie im Diplotän arretiert und teilweise über die gesamte fertile Lebenszeit als primäre Oozyten in den Primordialfollikeln gespeichert (Andersen und Simpson, 1973; Jonckhere, 1930; Schotterer, 1928; Valtonen, 1992). Die Oogenese ist eng mit der Follikulogenese gekoppelt.

2.1.4 Follikulogenese

Primordialfollikel sind die am frühesten erkennbare, kleinste und am zahlreichsten vorkommende Follikelform. Sie stellen ein Ruhestadium dar. In Hundeovarien sind Primordialfollikel erstmals ca. drei Wochen nach der Geburt zu Klustern formiert im oberflächlichen Kortex anzutreffen (Andersen und Simpson, 1973). Die Eizellen der Primordialfollikel sind von einem einschichtigen, aus flachen Zellen bestehenden Epithel umgeben. Es ist gegen die benachbarten Stromazellen durch eine Basalmembran abgegrenzt. Im Grenzbereich zwischen Eizelle und Follikelepithelzellen sind neben fokalen Arealen mit Mikrovilli, Bereichen, in denen die Zellmembranen glatt und parallel aneinander liegen. Innerhalb dieser Regionen treten unreife desmosomenartige Verdickungen auf (Tesoriero, 1981). In jedem Zyklus der Hündin kommt es zur Aktivierung mehrerer Primordialfollikel. In Relation zu ihrer Gesamtzahl sind dies während des gesamten Lebens nur wenige. Die genauen Kriterien und Mechanismen, die zur Auswahl der Follikel und deren Aktivierung führen, sind bisher unklar (Andersen und Simpson, 1973).

Aus den aktivierten Primordialfollikeln entwickeln sich die Primärfollikeln. Primärfollikeln von Hündinnen haben Durchmesser von ca. 30 bis 100 μm . Das Wachstum der Eizelle schreitet durch Nährstoffeinlagerung fort (Tesoriero, 1981). Das die Eizelle umgebende Follikelepithel ist in diesem Entwicklungsstadium einschichtig, kubisch bis hochprismatisch (Preidkalns und Leiser, 1998). In Primärfollikeln beginnt sich in diskontinuierlichen interzellulären Spalten zwischen der Eizelle und dem Follikelepithel die Zona pellucida (ZP) zu formieren. Der Kontakt zwischen Oozyte und Follikelzellen bleibt hierbei erhalten. Am apikalen Pol der Epithelzellen entstehen lange Fortsätze, die sich durch die gesamte ZP erstrecken und mit bulbus- und scheibenartigen Dilatationen Kontakt zur Oozytenoberfläche haben. Die kurzen Mikrovilli der Eizelle scheinen die Follikelzellfortsätze zu umgreifen (Tesoriero, 1981). Wie bei den meisten Spezies, setzt sich auch die ZP von Hundeoocyten aus drei Hauptglykoproteinen (ZP1-3) zusammen, die erstmals von primären Oocyten exprimiert werden (Wassarman, 1990).

Das Follikelepithel wird im Verlauf der Entwicklung durch mitotische Teilung mehrschichtig und wegen seines Aussehens nun auch als Stratum granulosum

bezeichnet. Der Follikeldurchmesser nimmt deutlich zu, die Follikel reifen zu Sekundärfollikeln (präantralen Follikeln). Die Eizelle liegt zu dieser Zeit noch zentral im Follikel. Die Sekundärfollikel verlagern sich in tiefere Rindenareale des caninen Ovars. Die die Hundeeizelle umgebende ZP hat sich zu einer kontinuierlichen Schicht koaleszenten Materials mit einer Dicke von 1 bis 2 μm entwickelt. Sie bildet zwischen der Eizelle und den Follikelzellen eine Barriere für hochmolekulare Stoffen. Die Fortsätze der Follikelzellen und die Mikrovilli auf der Oberfläche der Eizelle reichen in die ZP hinein (Andersen und Simpson, 1973; Preidkalns and Leiser, 1998; Tesoriero, 1981).

Zwischen den Follikelzellen entstehen mit Liquor folliculi gefüllte Spalträume, die sich erweitern und schließlich zu einem einheitlichen Hohlraum (Antrum folliculi) konfluieren. Die Follikel werden zu Tertiärfollikeln (antralen Follikeln). Die Eizelle wird an den Rand der Follikelhöhle in den Eihügel, den Cumulus oophorus, verlagert. Im Tertiärfollikel sind Follikelepithel (Stratum granulosum) und angrenzendes Bindegewebe deutlich differenziert. Das Bindegewebe außerhalb der Basalmembran bildet die Follikelhülle (Theca folliculi) mit der zell- und gefäßreichen Theca folliculi interna und der faserreichen Theca folliculi externa. Während der Antrumbildung verlagern sich die Follikel weiter markwärts. Im Prooestrus nimmt der Umfang der Follikel stark zu, sie ragen aber zu diesem Zeitpunkt noch nicht über die Oberfläche des Ovars hinaus. Sonographisch konnten bei Hündinnen Follikel erstmals zwischen dem ersten bis vierten Tag des Prooestrus als echofreie spherische Strukturen identifiziert werden (England und Yeager, 1993). Im späten Prooestrus bzw. zu Beginn des Oestrus steigt der Druck in den folliculären Blutkapillaren, ihre Permeabilität steigt, wodurch die Menge des gebildeten Liquor folliculi zunimmt und der Follikels anschwillt (Andersen und Simpson, 1973; Preidkalns and Leiser, 1998).

Die Formation des Corpus luteum beginnt bei der Hündin bereits vor der Ovulation. Zu Beginn des Oestrus kommt es mit dem Anstieg der LH-Ausschüttung zu morphologischen und biochemischen Veränderungen der Theca interna und der Granulosazellen des Follikels (Olson et al., 1989). Es können drei Stadien der präovulatorischen Follikelentwicklung und Luteinisierung unterschieden werden. Im initialen Stadium, zwei bis drei Tage vor der Ovulation, sind die Follikel von einer dünnen, leicht gefalteten Lage teilweise luteinierter Granulosazellen ausgekleidet.

Die von einem kompakten Cumulus oophorus umgebene Eizelle haftet an der Follikelwand. Im zweiten oder Intermediärstadium sind die gut luteinisierten Granulosazelllagen stärker gefaltet. Die Eizelle flotierte in diesem Stadium nahezu frei im Follikelantrum. Die Ovulation steht bei diesen Follikeln ein bis zwei Tage bevor (Olson et al., 1989; Phemister et al., 1973). Die sprungreifen Follikel werden als Graaf'sche Follikel bezeichnet. Sie verlagern sich an die Ovaroberfläche direkt unter die Tunika albuginea. 24 Stunden vor der Ovulation ragen die Follikel ca. 1 mm, 12 Stunden vor der Ovulation ca. 2 mm über die Ovaroberfläche hinaus (Tsutsui, 1989). Im letzten Entwicklungsstadium werden fokale Areale auf der Oberfläche der sprungreifen Follikel dünner. Die Granulosazellen sind deutlich luteinisiert und in losen Falten angeordnet, die Zellen des Cumulus oophorus sind weit um die frei flotierende Eizelle herum verteilt. Die Ovulation steht nun unmittelbar bevor (Olson et al., 1989; Phemister et al., 1973). Die Follikelwand wird am Stigma dünner und transparenter. Es kommt bei mehreren Follikeln zur spontanen Ovulation. Ihre Anzahl ist vom Alter und von der Rasse der Hündin abhängig und schwankt in der Regel zwischen zwei und acht (Andersen und Simpson, 1973; Bischoff, 1945; England und Allen, 1989b; Preidkalns und Leiser, 1998). Der Cumulus oophorus caniner Oozyten ist nach der Ovulation kaum expandiert und bleibt im Anschluss als kompakte Lage für mehrere Tage bestehen (Andersen und Simpson, 1973).

Die Angaben über den Zeitpunkt der Ovulation bei der Hündin variieren. So wurde von mehreren Autoren vermutet, dass die initialen Verhaltensveränderungen vor der Duldung mit der Ovulation in Verbindung stehen. Nach Angaben von Bischoff (1845), Ancel und Bouin (1908), Evans und Cole (1931) und Holst und Phemister (1971) erfolgt die Ovulation ein bis zwei Tage nach der ersten Duldung des Rüden. Andere Autoren vertraten die Auffassung, es käme erst im späten Oestrus zur Ovulation (Gier, 1950, 1960; Griffiths und Amoroso, 1939; Newberry und Gier, 1952; Whitney, 1940), wobei sich ihre Angaben ausschließlich auf indirekte Beobachtungen stützten. Widt et al. (1978) berichteten, dass es zwischen zwei Tagen vor und sieben Tagen nach dem Einsetzen des oestrischen Verhaltens zur Ovulation kommen kann. In den Untersuchungen von Tsutsui (1975, 1989), in denen der Zeitpunkt der Ovulation mittels Laparotomie bestimmt wurde, lag dieser bei den meisten Hündinnen zwischen 48 und 72 Stunden nach dem Einsetzen der Duldung. Jüngere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine sehr enge zeitliche Korrelation zwischen

dem präovulatorischen LH-Gipfel und der Ovulation sowie der sich anschließenden Embryonalentwicklung bestehen (Bysted et al., 2001; Concannon et al., 1989, 2001; Renton et al., 1991). Demnach erfolgt die Ovulation ca. zwei Tage (36 bis 58 Stunden) nach dem LH-Gipfel (Concannon et al., 1977a, 1989, 2001; England und Yeager, 1993; Phemister et al., 1973; Renton et al., 1991). Über die Dauer der Ovulation reichen die Angaben von nur einigen Stunden bis zu einigen Tagen (Berchtold, 1997a; Concannon et al., 1989; Gräf, 1978; Wildt et al., 1978). Die Duldung des Rüden kann zwei Tage vor bis fünf Tage nach dem präovulatorischen LH-Gipfel einsetzen (Concannon et al., 1989).

Nach der Ovulation füllt sich das Antrum des rupturierten Follikels mit Blut und es kommt zur Bildung des Corpus hemorrhagicum. Das Stratum granulosum wird durch Kapillaren der Theca interna stark vaskularisiert. Im Anschluss kommt es durch Hyperplasie und Hypertrophie der Granulosazellen in Verbindung mit Lipidakkumulation (gelbes Pigment) zur Formation des Corpus luteum (Preidkalns und Leiser, 1998). Das Corpus luteum ist am Ende des Oestrus voll aktiv (Concannon, 1986a). Es bleibt bei graviden und nichtgraviden Hündinnen für etwa die gleiche Zeitspanne erhalten. Nach der lutealen Regression entsteht durch Fibrose und Resorption das Corpus albicans (Preidkalns und Leiser, 1998).

Bei der Hündin sind Follikel mit mehreren Eizellen (polyovulare Follikel) eine regelmäßige Erscheinung. Bei Tieren im Alter von ein bis zwei Jahren liegt die Inzidenz polyovularer Follikel bei 14 %, im Alter zwischen sieben und 11 Jahren bei nur 5 %. In den Ovarien älterer Hündinnen sind, wenn überhaupt, nur einige wenige polyovulare Follikel vorhanden. Die Ovarien dieser Tiere sind außerdem durch einen hohen Anteil degenerierter Follikel und einen wesentlich kleineren Anteil an primordialen Follikeln gekennzeichnet. Die Anzahl der Eizellen in polyovularen präantralen Follikeln variiert sehr stark. Die Wahrscheinlichkeit, Follikel mit mehr als fünf Eizellen zu finden ist gering. Polyovulare Follikel sind größer als uniovulare in vergleichbaren Entwicklungsstadien, bei denen die Größe durch die Zahl der Granulosazelllagen bestimmt wird. Die Oozyten polyovularer Follikel sind kleiner, aber ihre gesamte Ooplasmamasse ist größer als die uniovularer Follikel. Gleichzeitig zeichnen sich polyovulare Follikel durch einen Anstieg der Granulosazellmassen aus (Telfter und Gosden, 1987). Ein deutlich ausgebildetes

Antrum fehlt ihnen in der Regel (McDougall et al., 1997). Einen Hinweis darauf, dass es zur Ovulation von Oozyten polyovularer Follikel kommen kann, ergab eine Untersuchung von Bysted et al. (2001). Hier korrespondierte zwar in der Mehrzahl der Fälle die Anzahl der durch Uterusspülungen gewonnenen Oozyten und Embryonen mit der auf den Ovarien vorhandenen Corpora lutea, bei einer Hündin war die Zahl der gewonnenen Eizellen allerdings höher.

2.1.5 Ultrastrukturelle Eigenschaften caniner Eizellen

Die im Diplotän arretierten Oozyten der Primordialfollikel haben bei der Hündin Durchmesser zwischen 20 und 30 μm (Andersen und Simpson, 1973). Sie besitzen einen großen zentral gelegenen Nukleus mit einem großen Nukleolus. In ihrem Ooplasma sind viele, relativ große runde Mitochondrien, vesikuläre Elemente, ein ausgeprägtes glattes endoplasmatisches Retikulum und kleine Golgikörperchen enthalten (Tesoriero, 1981).

In Primärfollikeln steigt die Syntheseaktivität der Hundeeizellen, es kommt zur Dilatation und Knospung der äußeren Lamellen der Kernmembran, die Anzahl der Mitochondrien und Golgikörperchen steigt, das endoplasmatische Retikulum nimmt an Umfang zu und in der Peripherie der Eizelle sind kortikale Granula enthalten. Im Zytoplasma dieser Oozyten treten erstmals osmophile, lipidhaltige Dotterkörper in Erscheinung (Tesoriero, 1981). Ein hoher Gehalt an Lipid-Dotter-Körpern ist charakteristisch für die caninen Eizellen. Die Bezeichnung Dotter ist hier sehr weit gefasst. Sie schließt eine Vielfalt unterschiedlicher Strukturen und Substanzen ein (Szollosi, 1972). Diese Lipid-Dotter-Körper sind denen der Eizellen niederer Vertebraten- und Invertebratenspezies sehr ähnlich. Bei höheren Säugetieren (Eutheria) ist ihr Auftreten relativ selten (Tesoriero, 1982). Lediglich die Oozyten von Carnivoren, einigen Ungulaten und wenigen anderen Spezies entwickeln derartige "megalezithale" Oozyten (Blandau, 1961; Enders, 1971). Es ist nicht ganz klar, wozu die Eizellen dieser Spezies, die wie andere Säuger zur fetalen Ernährung eine Plazenta ausbilden, zusätzlich megalezithale Dotterspeicher anlegen. Die unfertilisierten Oozyten von Hündinnen und Stuten besitzen eine ungewöhnlich lange postovulatorische Überlebensfähigkeit (bis zu vier Tagen), möglicherweise kommt dem Dotter-Material hierbei eine nutritive Funktion zu (Blandau, 1961). Die Lipid-

Dotter-Produktion beginnt in der Peripherie der Eizelle, in fortgeschritteneren Entwicklungsphasen ist sie in allen Bereichen der Zelle anzutreffen. Die Lipid-Dotter-Körper organisieren sich zu Klustern und erscheinen als separate globuläre Körper mit Durchmessern zwischen 1,0 und 2,0 μm . Ihre Menge nimmt während der gesamten Oogenese zu (Anderson, 1974; Szollosi, 1972; Tesoriero, 1982).

Die Hundeeizellen nehmen weiter an Umfang zu. In Sekundärfollikeln erreichen sie eine Größe von 70 bis 80 μm (Andersen und Simpson, 1973). Die caninen Eizellen in Tertiärfollikeln haben einen umfangreichen Golgiapparat und zahlreiche große, runde Mitochondrien. Ihr Zytoplasma enthält in den Kontaktbereichen zu den Follikelzellen dichte kortikale Granula, die mit dem Golgiapparat in Verbindung zu stehen scheinen. Durch die zunehmende Lipidakkumulation in den Eizellen geht ihre Koaleszenz allmählich verloren (Tesoriero, 1981). In Graaf'schen Follikeln erreichen die caninen Oozyten Durchmesser von 127 bis 135 μm , ihre Zona pellucida eine Stärke von sechs bis 13 μm (Andersen und Simpson, 1973; Dunbar et al., 1991).

Ovulierte canine Oozyten sind von Kumuluszellen umgeben (Andersen und Simpson, 1973). Die Oozyten der Hündin befinden sich zum Zeitpunkt ihrer Ovulation nicht wie die der meisten Säuger in der Metaphase der zweiten Reifeteilung, sondern sie werden in einem relativ unreifen Zustand, im Diplotän der Prophase I arretiert, ovuliert und besitzen intakte Germinalvesikel (GV) (Anderson und Simpson, 1973; Evans und Cole, 1931; Tsutsui, 1975, 1989; Van der Strich, 1923). Eizellen im GV-Stadium haben einen vesikulären Nukleus mit ausgeprägtem Nukleolus umgeben von feinen Chromatinfilamenten (Hewitt und England, 1998a).

Die meiotische Teilung setzen bei den Oozyten der Hündin erst kurz nach der Ovulation wieder ein, ihre Reifung erfolgt im Ovidukt. Zum Abschluss der meiotischen Reifung benötigen sie nach der Ovulation zwei bis fünf Tage. Die zweite Reifeteilung wird nur im Falle einer Befruchtung der Eizelle abgeschlossen (Hewitt und England, 1998a; Holst und Phemister, 1971; Tsutsui, 1975, 1989).

2.1.6 Hormonelles zyklisches Geschehen

Im Unterschied zu den meisten anderen Haustieren, bei denen aus wirtschaftlichen Erwägungen schon sehr früh intensive und vielseitige Studien über die Endokrinologie der Fortpflanzung durchgeführt wurden, ist die Datenbasis bei der Hündin recht klein. Dazu kommt, dass die meisten Untersuchungen mit Beagel-Hündinnen, die als Labortiere gehalten werden, durchgeführt wurden. Nur sehr wenige hormonanalytische Studien erfolgten bei anderen Haushundrassen. Es ist allerdings davon auszugehen, dass die beobachteten Trends für die meisten Rassen gelten. Als Bestätigung hierfür werden die relativ einheitlichen Reaktionen vieler Hunderassen auf therapeutische Anwendungen bestimmter Pharmaka angesehen (Jöchle, 1995).

Die hormonelle Steuerung der Sexualfunktionen und des Fortpflanzungsgeschehens wird von den Sexualzentren des Hypothalamus kontrolliert. Von diesen Zentren wird in einem pulsartigen Muster das Dekapeptid Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) freigesetzt. GnRH gelangt auf dem Blutweg durch die Kapillaren des portalen Systems an der Eminentia mediana des Hypophysenstiels in den Hypophysenvorderlappen (HVL). Dort veranlasst es die Abgabe der im HVL gebildeten Gonadotropine Follikelstimulierendes Hormon (FSH), Luteinisierungshormon (LH) und Prolaktin (PRL) in die Blutbahn (Moyle und Campbell, 1995; Zerobin, 1987). Gonadotropine sind geschlechtsunspezifisch. Sie bewirken an den Gonaden die Bildung der sogenannten untergeordneten Sexualhormone (Zerobin, 1987).

2.1.6.1 Gonadotropine

2.1.6.1.1 Follikelstimulierendes Hormon und Luteinisierungshormon

Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierungshormon (LH) sind Heterodimere, die sich aus zwei nichtkovalent gebundenen Untereinheiten – einer beiden gemeinsamen α -Untereinheit und der hormonspezifischen β -Untereinheit – zusammensetzen. Die Gonadotropin-Ausschüttung wird durch die Frequenz und die Amplituden der GnRH-Pulse kontrolliert (Kooistra et al., 1999). Neben der GnRH-

Wirkung werden die LH- und die FSH-Sekretion durch die gonadale Rückkopplung moduliert. Durch die Wirkung von Östrogen wird aus der Hypophyse der Hündin vermehrt LH ausgeschüttet (Concannon, 1986a; Concannon et al., 2001). Durch Östrogen und Inhibin erfolgt die spezifische Suppression der FSH-Synthese und -Sekretion (Mann et al., 1992; Shupnik, 1996).

Unter Gonadotropinwirkung kommt es an den Ovarien zur Hormonsekretion. Typ und Menge der abgegebenen Hormone variieren in Abhängigkeit vom morphologischen Status der Follikel und des Corpus luteum. Während der Follikelphase kommt es bei der Hündin zu einem kurzandauernden frequenten Anstieg der LH-Sekretion. Die basale Plasmakonzentration von FSH ist relativ gering, wohingegen sich die basale LH-Konzentration im Plasma im Vergleich zu den anderen Zyklusphasen erhöht (Kooistra et al., 1999). In dieser Phase synthetisieren die Thekazellen unter LH-Einfluss Androgene, unter deren Einfluss die Follikelzellen Rezeptoren für FSH ausbilden. Unter FSH-Wirkung erfolgt die Proliferation der Follikelzellen, sie entwickeln Östrogenrezeptoren und werden in die Lage versetzt, das von den Zellen der Theca interna gebildete Androgen in Östrogen (Follikelhormon) umzuwandeln (Concannon, 1986a). Östrogen unterstützt die FSH-Wirkung, zum Abschluss der Follikelreifung fördert es die Ausbildung von LH-Rezeptoren auf den Follikelzellen. LH führt zum letzten Wachstumsschub der Follikel (Concannon, 1986a; Preidkalns und Leiser, 1998). Ein bis drei Tage vor der Ovulation steigt die LH-Serumkonzentration der Hündin von einem Basiswert von ca. 1,5 ng/ml auf einen Gipfel von ca. 7,5 ng/ml. Der Tag des LH-Gipfels wurde als Tag 0 des caninen Zyklus festgelegt (Concannon et al., 1975). Die Luteinisierung des Follikels erfolgt bei der Hündin somit bereits vor der Ovulation (Concannon, 1986a). Der Mechanismus, der zur präovulatorischen Luteinisierung führt, ist nicht bekannt (Olson et al., 1989). Nach der Ovulation, in der Endphase des Oestrus, bewirkt LH die Umwandlung des kollabierten Follikels zum Corpus luteum (Preidkalns and Leiser, 1998). Während des späten Dioestrus ist ein Anstieg der LH-Konzentration im Serum trächtiger und nichtgravider Hündinnen möglich (Chakraborty, 1987; Chakraborty et al., 1978; Olson et al., 1989).

Die LH- und FSH-Sekretion erfolgt während der lutealen Phase und in allen Stadien des caninen Anoestrus in Pulsen. Die FSH-Pulse stimmen zeitlich mit den LH-Pulsen

überein, wobei die Durchschnittsdauer der FSH-Pulse (115 Minuten) signifikant länger ist als die der LH-Pulse (72 Minuten). Die basale LH-Konzentration im Plasma ist im Vergleich zu den maximal erreichten LH-Amplituden gering, die FSH-Pulse haben im Vergleich zu ihren Basalwerten relativ kleine Höchstwerte. In der lutealen Phase steigt bei der Hündin die Frequenz der LH-Pulse an, die LH-Gipfel haben eine kurze Dauer und im Vergleich zum Anoestrus ist eine Tendenz zu geringeren Amplituden der LH- und der FSH-Gipfelwerte auffällig. Mit der Progression des Anoestrus erfolgt ein Anstieg der basalen Plasmakonzentration von FSH. Der Anstieg des zirkulierenden FSH könnte ein kritisches Ereignis bei der Initiation der ovariellen Follikulogenese und somit für die Beendigung des Anoestrus sein. Als weitere mögliche endokrine Faktoren, die zu einer neuen Follikelphase führen, werden die gesteigerte Sensitivität der Ovarien gegenüber Gonadotropinen, der Anstieg der Basiswerte des zirkulierenden LH's und eine kurze Periode des Anstiegs der LH-Pulse diskutiert (Kooistra et al., 1999).

Im Anoestrus sind die caninen Ovarien relativ inaktiv, er ist mit geringen Plasmakonzentrationen von Progesteron und Östrogen assoziiert (Jeffcoate, 1992). Als mögliche Ursache dafür, dass während des Anoestrus die folliculäre Antwort auf das vorhandene Gonadotropin unterbunden wird, wurde die alternative Transkription der FSH-Rezeptor-(R)-DNA angesehen. Um dieser Hypothese auf den Grund zu gehen, wurde mittels in situ Hybridisierung und RT-PCR die FSH-R-Genexpression untersucht. Die RT-PCR-Amplifikation der cDNA der extrazellulären Domäne (Exon 1 bis 10) des Rezeptors war bei Gewebeproben aus allen Zyklusphasen gleichermaßen erfolgreich. Die FSH-R-Genexpression (> 90 %) scheint während des gesamten Zyklus hindurch auf gleichem Niveau zu erfolgen. Für eine verminderte Expressionsrate der FSH-R-DNA während des Anoestrus existieren keinerlei Anhaltspunkte. Es wurden zwei Isoformen des FSH-R bei der Hündin sequenziert, einen Hinweis auf ein abweichendes Expressionsmuster dieser Isoformen während des Anoestrus gab es jedoch ebenfalls nicht (McBride et al., 2001).

2.1.6.1.2 Prolaktin

Prolaktin (PRL) ist ein hypophysäres Polypeptidhormon. Ob ein spezifisches physiologisches PRL-Freisetzungshormon bei der Hündin existiert ist nicht bekannt,

man weiß jedoch, dass das Tripeptid Thyreolibertin sowie Serotonin und eine Reihe von Pharmaka wie Phenothiazin und Reserpin mit zentralnervösem Angriffspunkt eine erhöhte PRL-Produktion und -Freisetzung verursachen (Jöchle, 1995). Unter Östrogeneinfluss wird aus der Hypophyse der Hündin vermehrt Prolaktin ausgeschüttet (Concannon, 1986a; Concannon et al., 2001). Ein spezifischer PRL-Hemmfaktor hypothalamischen Ursprungs ist das Dopamin (Jöchle, 1995).

Sowohl bei graviden als auch bei physiologisch pseudograviden Hündinnen beginnt die PRL-Konzentration im Serum ab der Mitte der Gravidität bzw. der Pseudogravidität (28. bis 35. Tag nach dem LH-Gipfel) zu steigen. Während der letzten Trächtigkeitswoche kommt es zu starken Schwankungen der Serum-Prolaktinwerte (50 bis 33 ng/ml). Auch zwischen einzelnen Hündinnen wurden in diesem Zeitraum große Unterschiede der PRL-Konzentrationen (25 bis 80 ng/ml) beobachtet. 16 bis 56 Stunden vor der Geburt steigt der PRL-Wert stark an und erreicht ein peripartales Maximum über 100 ng/ml. 36 Stunden postpartal sinken die Prolaktin-Konzentrationen. Durch das Säugen der Welpen kommt es reflektorisch erneut zur Prolaktinausschüttung. Dieser erneute PRL-Anstieg erfolgt hauptsächlich während der ersten Laktationswoche, ein Konzentrationsgipfel wird nach ca. 1,5 Laktationswochen mit einem Durchschnittswert von 86 ng/ml erreicht, um dann langsam bzw. nach der Entwöhnung der Welpen abrupt auf eine Konzentration von ca. 13 ng/ml abzufallen (Concannon et al., 1978). Bei nichtträchtigen Hündinnen kann die Serumkonzentration des Prolaktins früher zum Basalwert zurückkehren (Jöchle et al., 1989).

Wegen der gegenläufigen Bewegung der Serumkonzentrationen von PRL und Progesteron in der zweiten Trächtigkeitshälfte der Hündin wurde ursprünglich angenommen, dass PRL antiluteotrop wirkt und dass sein Anstieg für den Abfall der Plasmaprogesteronwerte zum Geburtstermin hin verantwortlich sei (Gräf und El Etreby, 1979). Die Unterdrückung der PRL-Sekretion durch Applikation von Dopaminagonisten wie Bromocriptin und Cabergolin für mehr als fünf Tage führt bei graviden Hündinnen ab der Graviditätsmitte zu einem steilen Progesteronabfall, in dessen Folge es zum Abort und zur Rückbildung des sich auf die Laktation vorbereitenden Gesäuges kommt. Dies belegt, dass PRL ein für die zweite Trächtigkeitshälfte essentielles luteotropes Hormon ist (Concannon et al., 1987;

Conley et al., 1984; Onclin et al., 1993; Post et al., 1988). Vor Tag 28 bis 30 der Trächtigkeit haben selbst Behandlungen mit sehr hohen Dosen von PRL-Hemmern keinerlei Einfluss auf die Gelbkörperfunktion (Post et al., 1988). Neben seinem luteotropen Effekt wirkt PRL in der zweiten Trächtigkeitshälfte in Zusammenarbeit mit den Sexualhormonen, den Kortikoiden, mit Somatotropin und Insulin galaktogen und nach der Geburt laktogen. Offensichtlich ist PRL auch für die Auslösung der Verhaltensmuster für die Geburtsvorbereitung und die Brutpflege verantwortlich. Es ist nicht geklärt, inwieweit bei der Hündin Oxytocin an diesem Mechanismus beteiligt ist (Jöchle et al., 1989; McCarthy et al., 1992).

Das Syndrom der klinisch auffälligen Pseudogravidität ist mit Hyperprolaktinämie vergesellschaftet. Es wird vermutet, dass PRL bei der Pathologie dieses Syndroms die Hauptrolle spielt, da zwischen der PRL-Konzentration und dem Grad der klinischen Ausprägung der Pseudogravidität eine positive Korrelation beobachtet wurde (Gobello et al., 2001a). Prolaktinwerte über 3 ng/ml korrelierten in 75 % der Fälle mit starker Gesäugeanbildung und Laktation, bei PRL-Werten unter 3 ng/ml waren die Gesäugeanbildung und die Sekretion hingegen geringer (Jöchle, 1995). Bei Hündinnen, die keine Symptome der Scheinträchtigkeit erkennen lassen, ist der ca. 30 Tage nach der Ovulation einsetzende Anstieg der PRL-Konzentration im Serum gering (Grünau, 1994). Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass abrupte Änderungen der Serumkonzentration des PRL's die Ausprägung des klinischen Bildes stärker beeinflussen als die totale PRL-Konzentration (Gobello et al., 2001a).

Das komplexe endokrine Geschehen und die individuellen Unterschiede erschweren die Schematisierung der Hormon- und der Symptomkonstellation beim Syndrom der caninen Pseudogravidität. Klinische Befunde erlauben den Schluss, dass Östradiol und Progesteron modifizierende Wirkung auf die Symptomatik der klinischen Pseudogravidität der Hündin haben. Niedrige Progesteronkonzentrationen scheinen die Ausprägung der Symptomatik der Milchdrüsen zu fördern. Bei Progesteronwerten über 5,8 ng/ml sind Verhaltensstörungen nur gering ausgebildet oder fehlen. Ein abrupte Abfall der Progesteronkonzentration im Serum führt aber nicht unweigerlich zur klinischen Pseudogravidität (Gobello et al., 2001b). Hohe Östradiolwerte scheinen Verhaltensstörungen und die Zunahme des Gesäugeumfangs zu begünstigen (Jöchle, 1995).

Die Inhibition der PRL-Ausschüttung durch dopaminerg wirkende Ergotaminderivate erwies sich, unabhängig vom Zeitpunkt des Auftretens und der Ausprägung der Symptomatik, als eine geeignete kausale Therapie des Syndroms der caninen Pseudogravidität (Gobello et al., 2001c; Jöchle, 1999) (Tabelle 1). Da die kausale Therapie möglich ist, ist der Einsatz von unspezifisch wirkenden Sexualhormonen, die in Deutschland zur Behandlung der Scheinrächtigkeit bei der Hündin zugelassen sind, abzulehnen (Jöchle, 1999).

Tab. 1: Ergotaminderivate zur Therapie der klinischen Pseudogravidität bei der Hündin (nach Jöchle, 1999)

Ergotaminderivat	Dosierung [$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$] (Applikationsform)	Nebenwirkungen	
		Erbrechen	Verhalten
Bromocriptin ¹ (Pravidel®)	2 x 10-15 (Tabletten)	Häufig	Selten gestört
Cabergolin ² (Galastop®)	5 (Tabletten)	Sehr selten	Keine Störung
Metergolin ² (Contralac®)	2 x 100-200 (ölige Lösung)	Selten	Häufig gestört

¹ Bromocriptin ist in Deutschland zur Anwendung beim Hund nicht zugelassen

² Cabergolin und Metergolin sind in Deutschland beim Hund zur Behandlung der Scheinrächtigkeit in folgenden Dosierungen zugelassen: Cabergolin 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KM 1x täglich; Metergolin 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KM 2 x täglich

Über die PRL-Werte im späten Metoestrus und im Anoestrus ist bei der Hündin wenig bekannt. Die Anwendung von PRL-Hemmern wie Bromocriptin (40-100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$, Okkens et al., 1985; Concannon, 1993), Metergolin (12,5 mg/Tier/Tag, Kusuma und Tainturier, 1993) und Cabergolin (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$, Jöchle et al., 1989; Verstegen et al., 1994) führte häufig zur Verkürzung der Zyklusdauer. Bei Fällen von abnorm verlängertem Anoestrus führte Cabergolin sicher zur Prooestrus- und Oestrus-Induktion mit normaler Fertilität und normalen Wurfgrößen (Arbeiter und Barsch, 1988; Jöchle et al., 1989). Dies bedeutet, dass dem PRL im Zyklusgeschehen der Hündin eine entscheidende, allerdings noch nicht genau geklärte Bedeutung zukommt: PRL-Überproduktion führt zu einem verlängerten Oestrusintervall, vorzeitige PRL-Ausschaltung verkürzt es. Möglicherweise hat PRL im späten Oestrus und im Anoestrus antigonadotrope Wirkung, die im Verlauf des Anoestrus langsam schwächer wird. Dies würde die mit fortschreitendem Anoestrus zunehmende Empfindlichkeit der Hypophyse für GnRH-Signale erklären (Jöchle,

1995; Van Hafften et al., 1994).

2.1.6.2 Gonadale und plazentare Sexualhormone

2.1.6.2.1 Progesteron und Östrogen

Es wird angenommen, dass bei der Hündin das gesamte zirkulierende Östrogen und Progesteron – auch während der Trächtigkeit – ovariellen Ursprungs ist (Concannon und Verstegen, 1999; Steinetz et al., 1989). Das in den Follikeln synthetisierte Progesteron und Östrogen wird in die Follikelflüssigkeit transportiert oder gelangt über das Kapillarnetz der Theca interna ins periphere Blut (Preidkalns und Leiser, 1998).

Die Plasmakonzentration von Östrogen beginnt während des Prooestrus von einem Basalwert von ca. 5 bis 10 pg/ml aus anzusteigen, um ein bis zwei Tage vor dem LH-Gipfel Höchstwerte zwischen 50 und 100 pg/ml zu erreichen. Während oder unmittelbar nach dem LH-Gipfel sinkt der Östrogenspiegel sehr schnell wieder ab und bleibt bei nichtgraviden Hündinnen im Metroestrus relativ konstant (9 bis 10 pg/ml) (Concannon, 1986a; Concannon et al., 1975).

Während des Prooestrus, vor dem präovulatorischen LH-Gipfel, ist die Serumkonzentration des Progesterons gering, wobei es zu sporadischen Fluktuationen zwischen 0,3 und 1,0 ng/ml kommt, die wahrscheinlich das Ergebnis der in dieser Zyklusphase auftretenden LH-Pulse sind (Concannon et al., 1977a, 1989). Während oder kurz nach dem LH-Gipfel steigt die Serumkonzentration des Progesterons schnell auf Werte über 1,0 ng/ml an. Als Ergebnis der präovulatorischen Luteinisierung der Follikel kommt es bei der Hündin somit bereits vor der Ovulation zum Anstieg der Progesteronkonzentration, wodurch die caninen Eizellen bereits zu diesem Zeitpunkt einem erhöhten Progesteroneinfluss ausgesetzt sind. Im Oestrus steigt die Progesteronkonzentration sehr schnell weiter an und erreicht 15 bis 30 Tage nach dem LH-Gipfel Höchstwerte von 15 bis 90 ng/ml (Concannon, 1993).

Der Verlauf der Serumkonzentrationen von Progesteron und Östrogen ist bei

trächtigen und nicht trächtigen Hündinnen ähnlich (Austad et al., 1976; Concannon et al., 2001; Edqvist et al., 1975; Gräf, 1978; Hadley, 1975; Jones et al., 1973a; Nett et al., 1975; Reimers et al., 1978). Trotzdem gibt es gewisse Unterschiede (Anderson und Simpson, 1973; Concannon et al., 1977b, 1989; Smith und McDonald, 1974; Steinetz et al., 1989). So fanden Andersen und Simpson (1973) histologische Hinweise dafür, dass es bei Hündinnen im Metoestrus früher zur Regression der Corpora lutea kommt als bei trächtigen Tieren. Smith und McDonald (1974) berichteten, dass die Serumwerte des Progesterons bei trächtigen Tieren nach der Implantation, ca. 25 Tage nach dem LH-Gipfel, stärker anstiegen und Maxima erreichten, die durchschnittlich doppelt so hoch waren wie die bei nichtträchtigen Hündinnen. Ähnlich war das Ergebnis von Steinetz et al. (1989), bei denen die Serumwerte von Progesteron bei pseudogaviden Hündinnen vier Wochen nach der Paarung nur durchschnittlich 56 % der Konzentrationen von trächtigen Tieren erreichten. Bei den Untersuchungen von Concannon et al. (1975; 1977b) waren die Konzentrationen von Progesteron (11 bis 53 ng/ml) und Östradiol (20 bis 30 pg/ml) bei trächtigen Hündinnen vom 30. bis 60. Tag nach dem LH-Gipfel geringgradig höher als bei nichtträchtigen Tieren. Wurden die nach der Implantation der Embryonen durch eine Anämie bedingten niedrigen Hämatokrit-Werte von trächtigen Hündinnen (vom 30. Trächtigkeitstag nach dem LH-Gipfel bis ein bis zwei Monate nach der Geburt) berücksichtigt, so waren die Unterschiede signifikant (Concannon et al., 1977b, 1989). Vergleichbare signifikant höhere Östronkonzentration während der zweiten Trächtigkeitshälfte wurde von Chakraborty (1987) beobachtet. Die Veränderungen der Östronkonzentrationen während des ovariellen Zyklus verlaufen in etwa parallel zu denen des Östradiols (Chakraborty, 1987; Wildt et al., 1979).

Im letzten Trächtigkeitsdrittel sinken die Progesteronkonzentrationen langsam auf ein Plateau (zwischen 4 und 16 ng/ml), das für ein bis zwei Wochen anhält. Bei trächtigen Hündinnen kommt es kurz vor der Geburt, durch die Ausschüttung luteolytischer Mengen von Prostaglandin F (PGF), zu einem scharfen Abfall der Progesteron- (auf 1 bis 2 ng/ml) und Östrogenkonzentration (auf 5 bis 10 pg/ml) (Concannon et al., 1975, 1977b; 2001). Die PGF-Sekretion wiederum wird wahrscheinlich durch die fetale adrenale Hypothalamus-Hypophysen-Aktivität bewirkt. Es ist bisher nicht bekannt, ob Glukokortikoide die PGF-Ausschüttung der caninen Plazenta oder des Uterus steigern können wie dies bei den Primaten der

Fall ist (Challis et al., 1999; Patel et al., 1999).

Die Konzentration von Progesteron und Östradiol im Kot ist bei Hündinnen zwischen dem 30. und 60. Tag der Trächtigkeit signifikant höher als bei nichtgraviden Tieren (Gudermuth et al., 1998). Dies liegt vermutlich in der erhöhten Produktion und Verfügbarkeit beider Hormone einerseits und der gesteigerten hepatischen Clearance und Exkretion während der Trächtigkeit andererseits begründet. Die erhöhte Exkretionsrate in Zusammenhang mit einer gesteigerten metabolischen Aktivität von Uterus und Milchdrüsen könnte die Ursache dafür sein, dass ein deutlicher Anstieg der Steroidhormone – trotz gesteigerter Synthese der Corpora lutea nach dem 30. Tag der Trächtigkeit – fehlt (Concannon et al., 2001).

Bei nichtgraviden Tieren sinkt die Konzentration des Progesterons im Plasma zwischen dem 51. und dem 82. Tag nach dem LH-Gipfel nur allmählich auf den Basalwert ab, weswegen das Ende der lutealen Phase hier klinisch schwer zu bestimmen ist (Concannon et al., 1975, 1978; Gräf, 1978; Masken, 1972; Olson et al., 1984; Smith und McDonald, 1974). Über die Östrogenkonzentrationen im späten post-Laktations-Anoestrus existieren keine Berichte. Für den späten Anoestrus nach einem Zyklus ohne Trächtigkeit wurde über variable Östrogenkonzentration berichtet (Concannon et al., 1989).

2.1.6.2.2 Relaxin

Relaxin ist eine 6-kD Polypeptidhomologe von Insulin. Es wird bei der Hündin während der Trächtigkeit vorwiegend in der Plazenta aber auch in den Ovarien produziert. Als die primäre Produktionsstätte wird der Synzytiotrophoblast angesehen (Klonisch et al., 1999; Steinetz et al., 1989; Stewart, 1992). Er dringt während der Plazentation zusammen mit dem Zytotrophoblasten zwischen das Oberflächenepithel des Uterus, zerstört die unter dem Epithel gelegene Basalmembran und dringt durch die Zerstörung von Bindegewebszellen bis an die maternalen Kapillaren vor (Rüsse, 1991).

Zusammen mit Progesteron und Östrogen induziert Relaxin umfangreiche Veränderungen des Bindegewebes des Reproduktionstraktes – Veränderungen, die

für die Erhaltung der Trächtigkeit notwendig sind und auf die Geburt vorbereiten (Steinetz et al., 1989). Relaxin stellt das bei der Hündin derzeit einzige nachweisbare trächtigkeitsspezifische Hormon dar (Concannon et al., 2001).

Mit einem neuerdings verfügbaren kommerziellen Relaxin-Test – ReproCHECK™RELAXIN (Fa. Synbiotics) – ist es möglich, Relaxin im peripheren Blutplasma zu detektieren. Zu einem eindeutig nachweisbaren Anstieg der Relaxinkonzentration kommt es 24 Tage post ovulationem (p. ov.) (Bunck et al., 2002). Zu diesem Zeitpunkt ist der Trophoblast maximal in das Endometrium vorgedrungen. In der Plazentarzone ist das Synzytium ausgebildet und umgibt das maternale Gefäß (Rüsse, 1991). In einigen Fällen wurde die Relaxinproduktion bereits 20 Tage p. ov. detektiert, es ist aber unklar, ob bereits zu diesem Zeitpunkt die zweifelsfreie Aussage über die Etablierung einer Trächtigkeit möglich ist (Einspanier et al., 2002). Die mittleren Relaxinwerte der untersuchten Hündinnen nahmen mit fortschreitendem Gestationsalter zu und sanken in den letzten drei Wochen vor der Geburt geringfügig ab. Da der Test keine Aussage über die Anzahl der Fruchtanlagen oder einzelne Fruchtresorptionen erlaubt, kann er die sonographische Untersuchung im Rahmen der Trächtigkeitsdiagnostik nicht ersetzen (Bunck et al., 2002; Einspanier et al., 2002).

2.2 Grundzüge der Reproduktionsphysiologie beim Rüden

Beim Rüden ist im Unterschied zu anderen männlichen Caniden kein streng saisonales Zuchtgeschehen zu beobachten, es wurde lediglich von einem Rückgang der Spermaproduktion in den Sommermonaten berichtet (Kuroda und Hiroe, 1972). Die einzige akzessorische Geschlechtsdrüse des Rüden ist die Prostata, somit enthält das Ejakulat nur Prostataflüssigkeit, weswegen es geringe Viskosität besitzt und nicht koaguliert (Huggins, 1947). Der normale pH-Wert von Hundesperma liegt zwischen 6,3 und 6,7. Er ist vom Anteil an prostatischer Flüssigkeit im Ejakulat abhängig, deren pH-Wert normalerweise im Bereich zwischen 6,0 bis 7,4, durchschnittlich bei 6,8 liegt (Nett und Olson, 1983). Es wird angenommen, dass die prostatische Flüssigkeit die Spermienmotilität erhöht und dabei hilft, die saure Umgebung im vaginalen Gewölbe während der Kopulation zu neutralisieren (Jones und Joshua, 1982).

Das Volumen des Ejakulates schwankt von 1 bis ca. 40 ml, es wird von Alter und Größe des Hundes, der Frequenz der Ejakulationen und der Menge der enthaltenen prostatistischen Flüssigkeit beeinflusst. Eine gewisse Korrelation von Ejakulationsvolumen und Körpergewicht wurde beobachtet (Boucher et al. 1958, Feldman und Nelson, 1996a; Seager und Fletcher, 1972).

Das Hundeejakulat ist in Abhängigkeit von der Spermienkonzentration weiß bis opaleszierend und undurchsichtig. Es umfasst drei Fraktionen (Feldman und Nelson, 1996a; Hancock und Rowlands, 1949; Harrop, 1960). Die erste Fraktion hat ein Volumen von 0,25 bis 2,8 ml, die spermienreiche zweite Fraktion umfasst 0,5 bis 12 ml und ist wolkig, das Volumen der dritte Fraktion, im allgemeinen prostatistische Flüssigkeit, kann von 1,1 bis 25,0 ml reichen, sie ist lichtdurchlässig und klar. Das Ejakulat von Caniden enthält nur einen geringen Anteil an Detritus und Epithelzellen (Feldman und Nelson, 1996a; Mahi-Brown, 1991).

Die Spermien des Hundes stimmen in ihren morphologischen Eigenschaften weitgehend mit denen anderer Säuger überein. Ihre totale Länge beträgt $61,4 \pm 0,244 \mu\text{m}$, die Länge des Spermienkopfes $6,1 \pm 0,037 \mu\text{m}$, seine Breite $3,8 \pm 0,023 \mu\text{m}$, das Spermienmittelstück ist $10,1 \pm 0,074 \mu\text{m}$ lang, das Hauptstück $45,2 \pm 0,214 \mu\text{m}$ (Woodall und Johnstone, 1988). Der Spermienkopf ist flach, stumpfelliptisch, mit einem relativ großen Akrosom, so dass seine An- oder Abwesenheit bei motilen Samenzellen direkt mit dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt werden kann (Mahi-Brown, 1991).

2.3 Befruchtung, Fertilisation und frühe Embryonalentwicklung

2.3.1 Die Paarung beim Haushund

Das Verhalten der Haushunde bei der Paarung ist durch eine erhebliche Variabilität gekennzeichnet. In Anwesenheit von Rüden zeigt die Hündin ihre Deckbereitschaft normalerweise an (ruhiges Stehenbleiben, keine Abwehr des schnuppernden Rüden, Rute zur Seite haltend). Nach dem Einführen des Penis in die Vagina, setzt nach einigen Friktionsbewegungen die Ejakulation ein (Berchtold, 1997a). Während der Ejakulation der zweiten und dritten Spermafraktion kommt es für fünf bis 30 Minuten

zum "Hängen" des Rüden, ein Resultat des Anschwellens des Bulbus glandis des Penis in der Vagina der Hündin. Der Rüde steigt dabei von der Hündin und dreht sich ab, so dass Rüde und Hündin während dieser Zeit mit voneinander abgewandten Köpfen verharren. Durch das "Hängen" wird das Sperma durch die Zervix hindurch in den Uterus verbracht (Mahi-Brown, 1991). Der primäre Mechanismus, der für den raschen Transport der Spermien in den Uterus verantwortlich ist, scheint dabei die abdominale Entspannung der Hündin während der natürlichen Paarung zu sein, weil dadurch die zervikale Barriere inaktiv ist. Der Penis schützt während des "Hängens" vor dem Verlust von Spermien durch die Vagina nach kaudal (Evans, 1933). Haben die Spermatozoen das Uterushorn erreicht, werden sie in enger Assoziation zum Epithel des Eileiters gelagert, wodurch während des gesamten Oestrus der Hündin eine fertile Population von Spermien erhalten bleibt (Kawakami et al., 2000, 2001). Die Überlebensfähigkeit von Hundespermien im weiblichen Reproduktionstrakt beträgt bis zu 200 Stunden (Concannon et al., 1983; Doak et al., 1967; Griffiths und Amoroso, 1939; Guérin et al., 1999; Wales und White, 1958).

2.3.2 Kapazitation, Akrosomenreaktion und Spermien-Eizell-Bindung

Während ihrer Wanderung durch den weiblichen Reproduktionstrakt durchlaufen die Hundespermien die Kapazitation, wobei sie durch eine Reihe biochemischer Modifikationen in die Lage versetzt werden, die Eizelle zu befruchten (Yanagimachi, 1994). Die Spermienkapazitation beruht auf der Entfernung von im Samenplasma vorhandenen Dekapazitationsfaktoren. Dieser Vorgang ist reversibel. Die Spermien werden hierdurch auf die Gameteninteraktion vorbereitet, es kommt zur Destabilisierung der Plasmamembran und zu einem Wechsel der exprimierten Oberflächenantigene (Moore, 1995). Glykosaminglykane aus Uterus- und Eileitersekret der Hündin können die Kapazitation von Hundespermien induzieren (Kawakami et al., 2000). Der genaue Zeitverlauf der Kapazitation ist speziesspezifisch (Fraser, 1982). Die Kinetik der Kapazitation und der akrosomalen Exozytose von Hundespermien wurde bisher noch nicht genau bestimmt. Nach Schnorr (1996) beträgt die Dauer der Kapazitation bei Hundespermien ca. sechs Stunden.

Die kapazitierten Spermien vieler Spezies, auch die des Hundes, zeigen eine stark

ausgeprägte hyperaktive Motilität mit starken Stoßbewegungen (Yanagimachi, 1994). Diese Motilität steht in Zusammenhang mit der Kontaktaufnahme der Spermatozoen mit dem Epithel des Ovidukts (Pacy et al., 1995). Sie ist möglicherweise für den koordinierten Transport der Spermien durch Uterus und Eileiter und für die Penetration der Zona pellucida der Eizelle notwendig und könnte somit sicherstellen, dass am Ort der Befruchtung nur voll kapazitierte, funktionell intakte Spermien anwesend sind (Moore, 2001).

Bei den meisten Säugetieren, auch bei den Caniden, müssen die Spermien vor der Befruchtung den Cumulus oophorus der Eizelle penetrieren (Yanagimachi, 1994). Es ist schwer zu sagen, ob diese Passage ausschließlich durch die Motilität der Spermien bewerkstelligt wird, oder ob sie durch enzymatische Digestion unterstützt wird. Aufgrund der Präsenz akrosomenintakter Spermien auf der Oberfläche der ZP von Labortieroozyten, die vom Cumulus oophorus umgeben waren, wird allerdings vermutet, dass das Mitwirken von Enzymen nicht zwingend notwendig ist (Bedford, 1998).

Die Spezifität der Spermium-Eizell-Bindung wird, zumindest zum Teil, durch die sekundäre Modifikation der Zona-Moleküle durch Glykosylierung und Sulfatierung bestimmt (Moore, 2001). So sind humane Spermien nicht in der Lage, an Eizellen von transgenen Mäusen zu binden, die das humane ZP3 exprimieren. Spermien von Mäusen sind hingegen zur Bindung als auch zur Fertilisation dieser Oozyten fähig. Durch posttranslationale Modifikation von ZP3 scheint bei diesen Mausoozyten die exprimierte humane Form des Proteins so verändert zu werden, dass es dem murinen ZP3 ähnlich ist (Castle und Dean, 1999). Bei Feliden kommt es in vitro regelmäßig zu heterologer Spermien-Eizell-Interaktion, so penetrieren Puma-, Geparden- und Leopardspermien intakte Oozyten anderer Feliden (Wildt, 1991). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Rezeptor-Moleküle bei den Gameten dieser Arten zu einem hohen Grad konserviert sind (Moore, 2001). Glykohistochemische Studien zeigten, dass zwischen den Glykoproteinen caniner und feliner Oozyten speziesspezifische Unterschiede in der Art der Zuckerreste und ihrer räumlichen Verteilung bestehen (Parillo und Verini-Supplizi, 1999).

Bedford et al. (1999) vertreten die Meinung, dass möglicherweise stachelartige

Strukturen auf der inneren akrosomalen Membran der Spermatozoen von Maulwürfen, Spitzmäusen, vielleicht auch von Hunden und Wölfen die Spermienbindung vermitteln. Interessanterweise sind bei all diesen Spezies die Oozyten zum Zeitpunkt der Ovulation von einem relativ dichten Kumulus-Komplex umgeben (Moore, 2001).

Ihre volle Fertilität erlangen die Spermien durch die Aktivierung ihrer akrosomalen Enzyme. Für gewöhnlich gelangen nur "akrosomenreagierte" Spermien in den Perivitellinraum intakter Oozyten, um mit dem Oolemma zu interagieren. Um mit zonafreien Eizellen fusionieren zu können, müssen Spermatozoen die Akrosomenreaktion durchlaufen haben (Yanagimachi, 1994). Bei der Akrosomenreaktion kommt es zu multiplen Punktfusionen der äußeren Akrosomenmembran mit der darüber liegenden Plasmamembran. Die so verschmolzenen Membranabschnitte lösen sich, an ihrer Stelle entstehen Poren, durch die es zur Freisetzung der akrosomalen Enzyme kommt. Die resistere innere Akrosomenmembran wird freigesetzt und geht im Äquatorialbereich ins Plasmalemm über (Brucker und Lipford, 1995). Über die vermittelnden molekularen Signalmechanismen bei der Akrosomenreaktion ist bislang selbst bei Labornagern wenig bekannt. Als Kandidaten gelten der Guanosin triphosphat-(GTP)-Proteinpathway, der Phosphatidylinositidpathway und die Tyrosinkinase-Rezeptoren (Moore, 2001).

Bei der frühen zonainduzierten Akrosomenreaktion von Säugerspermien ist Kalzium-Influx aus dem extrazellulären Kompartiment in das Spermienzytosol ein obligatorisches Ereignis (Florman, 1994). Bleil und Wassarman erkannten schon vor mehr als 20 Jahren, dass bei der Maus das eizellspezifische Glykoprotein ZP3 sowohl als primärer Ligand für die Spermienbindung als auch als Trigger der Akrosomenreaktion fungiert (Bleil und Wassarman, 1980a, b). Das primär an ZP3 gebundene Spermium durchläuft die Akrosomenreaktion, wodurch die sekundäre Spermium-Zona-Bindung und die Penetration der ZP zustandekommen (Wassarman, 1990).

Bei Hundespermien ist es durch in Lösung gebrachte canine ZP und durch Progesteron möglich, in vitro den Kalzium-Influx und die Akrosomenreaktion effektiv

zu induzieren. So war der Anteil der Spermien, bei denen es in Anwesenheit von ZP-Proteinen oder Progesteron zur akrosomalen Exozytose kam signifikant höher als in den Kontrollgruppen. Der auslösende Mechanismus der Akrosomenreaktion unterscheidet sich bei Hundespermien möglicherweise von anderen Spezies. Das Muster des Kalzium-Influges differierte bei beiden Behandlungen von dem bei anderen Spezies bekannten Bild. Außerdem war der Anteil der Spermien, bei denen es durch Progesteroneinwirkung zur Induktion der akrosomalen Exozytose kam, im Vergleich zu anderen Spezies sehr hoch (Brewis et al., 1999, 2001). Da bei der Hündin die Progesteronkonzentration im peripheren Blut während der Fertilitätsperiode im Vergleich zu anderen Spezies sehr hoch ist, ist dies möglicherweise auch im Reproduktionstrakt der Fall (Brewis et al., 2001; Sirivaidyapong et al., 1999). Es existieren Hinweise dafür, dass bei Hundespermien die durch Progesteron induzierte Akrosomenreaktion durch einen membrangebundenen Progesteron-Rezeptor vermittelt wird (Sirivaidyapong et al., 1999). Das von den Kumuluszellen abgegebene Progesteron scheint bei Hundespermien somit eine physiologische Rolle bei der Induktion der Akrosomenreaktion zu spielen. Es ist möglich, dass die Mehrheit der Hundespermien in vivo die Akrosomenreaktion bereits durchlaufen hat, wenn sie die ZP der Eizelle erreichen (Brewis et al., 1999, 2001; Sirivaidyapong et al., 1999). Da die Akrosomenreaktion bei der Abwesenheit von Zona-Proteinen und Progesteron auch spontan ablaufen kann, ist anzunehmen, dass bei einigen Spezies, inklusive den Caniden, eine alternative Ereigniskette existiert (Moore, 2001).

2.3.3 Spermium-Eizell-Fusion

Die speziesspezifische Gametenerkennung wird einerseits durch die Zonaoberfläche, andererseits durch das Oolemma vermittelt. Hundespermien scheinen diesbezüglich sehr selektiv zu sein, da sie weder an zonafreien Hamsteroozyten binden noch mit ihnen fusionieren. Die Spermatozoen vieler anderer Spezies reagieren mit derartig präparierten Oozyten. Hundespermien fusionieren nur mit zonafreien caninen Oozyten, was beweist, dass ihr Unvermögen bezüglich der Hamstereizellen nicht an einer fehlenden Fusionskapazität dieser Spermien liegt (Mahi-Brown, 1991).

Die morphologischen Details der initialen Spermien-Oolemma-Interaktion sind nur schwer zu beobachten, da die Fusion sehr schnell vonstatten geht. Es hat jedoch den Anschein, dass zwischen Oolemma und Spermien-Plasmalemma am apikalen Rand des Äquatorialssegmentes Kontakt hergestellt werden muss, denn diese Region des Spermienkopfes ist bei allen bisher untersuchten Eutheria (= Placentalia, Höhere Säugetiere) auch nach der Akrosomenreaktion erhalten (Moore und Bedford, 1993; Yanagimachi, 1994).

Über die Kinetik der ZP-Penetration und die Spermium-Eizell-Fusion beim Hund ist wenig bekannt (Mahi und Yanagimachi, 1978). Die Fusion von Spermium und Eizelle scheint die Zonareaktion zu induzieren (Mahi und Yanagimachi, 1976, 1978). Durch die Depolarisation des Oolemmas kommt es zur Exozytose der kortikalen Granula, die zum Polyspermie-Block führt. Durch die Proteasen, die aus den Granula entlassen werden, kommt es zur Modifikation der Zona-Glykoproteine und der Spermienrezeptoren am Oolemma, so dass weitere Spermien nicht an die Eizelle binden können und auch keine weitere Penetration möglich ist (Moore, 2001).

Beim Großteil der Säugetiere nehmen die Eizellen noch vor der Ovulation die Meiose wieder auf, wodurch im Ovidukt dieser Tieren Oozyten anzutreffen sind, die sich bereits bis zur Metaphase II entwickelt haben. Diese Eizellen stehen zu keinem früheren Zeitpunkt zur Fertilisation zur Verfügung. Bei ihrer Befruchtung werden sie aktiviert, vollenden die zweite meiotische Reifeteilung, das zweite Polkörperchen wird ausgeschleust und es kommt zur Formation des weiblichen und parallel dazu des männlichen Pronukleus (Rüsse und Sinowatz, 1991).

Der Zeitpunkt, zu dem es bei Hundeeizellen zur Spermienpenetration kommt, ist wegen der Asynchronität von Ovulation, Insemination und Befruchtung nicht genau klar. Aufgrund der Verhältnisse bei anderen Spezies könnte man davon ausgehen, dass es auch bei caninen Eizellen erst nach Vollendung der Metaphase II zu einer erfolgreichen Befruchtung kommen kann (Mahi-Brown, 1991). Im Gegensatz hierzu zeigten Untersuchungen von Mahi und Yanagimachi (1976), dass bei Hundeeizellen in vitro weder der Zustand ihres Vitellus, noch ihre Kernreifung Einfluss auf die Penetration kapazitierter Spermien mit abgeschlossener Akrosomenreaktion durch die ZP haben. Natürlich spiegelt die In-vitro-Situation nicht unweigerlich die Abläufe

in vivo wieder. Möglicherweise sind canine Eizellen im Ovidukt während ihrer Reifung resistent gegen Spermienpenetration oder es kommt erst nach der Reifung der Eizellen zum Spermientransport an den Ort der Befruchtung (Mahi-Brown, 1991). Allerdings beobachtete Van der Stricht (1923) nach der natürlichen Paarung von Hündinnen die Spermienpenetration bei Eizellen in verschiedenen Reifungsstadien, auch bei solchen, die noch im Diplotän arretiert waren. Evans (1933) berichtete, dass die caninen Spermien innerhalb von Sekunden zum tubalen Ende des Uterushorns transportiert werden. Doak et al. (1967) gewannen wenige Minuten nach der Anpaarung von Hündinnen Spermien aus deren Ovidukt. Zu einem späteren Zeitpunkt als 70 Stunden nach der Kopulation waren nur noch selten Spermien im Ovidukt nachzuweisen. Es ist möglich, dass Spermien zum Zeitpunkt der Ovulation im Eileiter anwesend sind und dass es zur Spermienpenetration kommt, sobald die Eizellen im Eileiter verfügbar sind (Mahi-Brown, 1991). Kommt es in vivo zur Fertilisation unreifer Hundeoocyten, werden die Dekondensation des Spermienkopfes und die Formation des männlichen Pronukleus wahrscheinlich gehemmt, bis die Eizellen die Entwicklung bis zur Metaphase II durchlaufen haben (Yanagimachi, 1994). Die Möglichkeit der Spermienpenetration während der Eizellreifung würde somit zur Verlängerung der Fertilitätsperiode bei der Hündin beitragen (Bysted et al., 2001; Hay et al., 1994).

2.3.4 Frühe Embryonalentwicklung von Hundeembryonen

Aufgrund der Asynchronität von Ovulation, Insemination und Befruchtung kann das Entwicklungsstadium der im Eileiter anzutreffenden Hundeembryonen recht variabel sein. So wurde einerseits bereits drei Tage nach der Ovulation eine Furchungsteilung beobachtet, andererseits waren auch ca. sechs Tage danach noch Zygoten im Ein-Zell-Stadium anzutreffen (Bysted et al., 2001; Noden und DeLahunta, 1985; Renton et al., 1991; Tsutsui, 1989) (Tabelle 2). Acht bis zehn Tage nach der Ovulation konnten Embryonen im Morula-Stadium, 12 Tage danach Embryonen im Blastozysten-Stadien sowohl aus den Eileitern als auch aus dem Uterus isoliert werden (Renton et al., 1991; Tsutsui, 1975). Die caninen Embryonen scheinen ca. neun bis 10 Tage nach der Ovulation im Stadium der Morula oder frühen Blastozyste den Uterus zu erreichen (Andersen, 1927; Holst und Phemister, 1971; Renton et al., 1991; Van der Stricht, 1923). Die Aufenthaltsdauer der Oozyten im Eileiter ist somit

bei der Hündin im Vergleich zu anderen Spezies, bei denen die Eileiterpassage nur drei bis vier Tage dauert, außergewöhnlich lang (Holst und Phemister, 1971).

Tab. 2: Entwicklungsstadien von im Eileiter anzutreffenden Hundeembryonen

Tage nach der Ovulation	Entwicklungsstadium der Hundeembryonen	Quelle
3 4 5 6 8	Frühester Zeitpunkt, zu dem Furchungsteilung beobachtet wurde Ein- oder Zwei-Zell-Stadium Drei- bis Sechs-Zell-Stadium Acht-Zell-Stadium Morula (16-Zell-Stadium)	Tsutsui, 1989
4	Zwei-, Vier-, Acht-Zell-Stadium	Noden und DeLahunta, 1985
5 6 8 10 12	Ein- bis Acht-Zell-Stadium Vier- bis Sechs-Zell-Stadium Acht-Zell-Stadium Morula Frühe Blastozyste	Renton et al., 1991
6 10	Ein-Zell-Stadium Morula	Bysted et al., 2001

Die kritische Phase der initialen Embryonalentwicklung ist die Aktivierung des embryonalen Genoms. Sie erfolgt bei Hundeembryonen im Acht-Zell-Stadium. In dieser Entwicklungsphase kommt es zu einem starken Anstieg der transkriptionellen Aktivität, zur qualitativen Veränderung der Proteinsynthese und zur Formation eines aktiven fibrillär-granulären Nukleolus. Dieser Nukleolus ist der Ort der ribosomalen RNA-Transkription und der Ribosomenformation. Die adäquate Formation dieser Organellen ist für die weitere Entwicklung entscheidend (Bysted und Greve, 2000).

Die caninen Oozyten und frühen Embryonen sind von einer starken Zona pellucida umgeben (Renton et al., 1991). Embryonen im Morula-Stadium (16-32-Zell-Stadium) haben Außendurchmesser (mit Perivitellinraum und ZP) von 191 bis 197 µm, die

innerhalb gelegenen Morulae Durchmesser von 135 bis 172 μm (Holst und Phemister, 1971). Die Entwicklung von frühen zu späten Blastozysten-Stadien ist mit einem deutlichen Anstieg der Größe verbunden, dabei wird die ZP dünner (Renton et al., 1991). Die Durchmesser früher Blastozysten reichen von 275 bis 544 μm . Zwischen dem 10. und 14. Tag nach der Paarung wurde die Entwicklung schildförmiger Embryonen beobachtet (Tietz und Seliger, 1967). Ihre Größe variierte von 500 bis 715 μm am 11. Tag und von 215 bis 1144 μm am 13. Tag nach der Paarung (Holst und Phemister, 1971).

Vor der Implantation der Embryonen kommt es im Uterus zum frei flotierenden Blastozysten-Stadium (Holst und Phemister, 1971). Nach Holst und Phemister (1971) hat diese Phase beim Hund eine Dauer von ca. sieben Tagen. Von Tag 12 bis Tag 16 bis 17 nach dem LH-Gipfel kommt es zur intrauterinen transcornualen Migration der Hundeembryonen (Shimizu et al., 1990). Zum Wachstum der Blastozysten kommt es vor allem zwischen dem 14. und 20. Tag nach dem LH-Gipfel (Concannon et al., 2001). Bei frei flotierenden Blastozysten wurden Größen von 215 μm bis 2,8 mm gemessen, Blastozysten an den Implantationsstelle hatten 2,1 bis 3,1 mm Länge (Holst und Phemister, 1971). Bis zum 19. Tag nach dem LH-Gipfel können Blastozysten in der ZP eingeschlossen sein. Erst danach erfolgt eine weitere Vergrößerung der Blastozyste (Concannon et al., 2001). Zwischen dem 16. und 20. Tag endet die Migrationsphase der Embryonen (Concannon et al., 2001). Bis zum 21. bzw. 22. Tag nach dem LH-Gipfel haben die Fruchtanlagen noch keine feste Verbindung zum Uterusendometrium (Thatcher et al., 1994). Zu diesem Zeitpunkt, noch vor der Invasion des Embryos in das Endometrium, können uterine Schwellungen beobachtet werden (Concannon et al., 2001). Erstes Anzeichen der Implantation sind lokale Ödeme des Endometriums. Zwischen dem 22. und 23. Tag nach dem LH-Gipfel kommt es zur Invasion des Plazentatrophektoderms ins Endometrium (Thatcher et al., 1994). Sonographisch konnte embryonales Gewebe erstmals zwischen dem 23. und 25., der Herzschlag zwischen 24. und 25. Tag nachgewiesen werden (Concannon et al., 2001; England und Yeager, 1993; Yeager und Concannon, 1995).

Zwischen den Ereignissen der Trächtigkeit und dem präovulatorischen LH-Gipfel besteht bei der Hündin eine enge zeitliche Korrelation (Bysted et al., 2001;

Concannon et al., 1983; Concannon et al., 2001) (Tabellen 3, 4). Die erfolgreiche Anpaarung ist in einem Zeitraum von drei bis fünf Tagen vor und bis zu fünf Tage nach der Ovulation möglich. Die Dauer der Trächtigkeit beträgt jedoch, abgesehen von einigen Ausnahmen, unabhängig vom Zeitpunkt der Insemination, 64 bis 66 Tage ab dem LH-Gipfel (Concannon et al., 1983, 2001). Concannon et al. (2001) vermuten einen Zusammenhang zwischen dem Reifezustand der Hundeeizelle zum Zeitpunkt der Insemination und dem Zeitintervall bis zu den ersten Zellteilungen. Waren zum Zeitpunkt der Insemination die Oozyten in einem unreifen Zustand, betrug die Dauer bis zur Entwicklung von Acht-Zell-Embryonen fünf Tage, war hingegen die Eizellreifung bereits abgelaufen, betrug dieses Intervall nur drei Tage. Unabhängig davon, ob die Insemination zu einem frühen oder späten Zeitpunkt erfolgte, wurden Embryonen im 16-Zell-Stadium am 11. Tag nach dem LH-Gipfel isoliert. Die Entwicklung vom Zwei-Zell- zum 16-Zell-Stadium vollzieht sich demnach schneller, wenn sich die Eizellen zum Zeitpunkt der Insemination bereits zu sekundären Oozyten entwickelt haben. Dies wäre die Erklärung dafür, dass die Trächtigkeit unabhängig vom Zeitpunkt der Paarung etwa die gleiche Dauer hat (Concannon et al., 2001). Die Embryonalentwicklung vor der Implantation steht somit eher in signifikanter zeitlicher Relation zum präovulatorischen LH-Gipfel als zum Zeitpunkt der Fertilisation (Bysted et al., 2001; Concannon et al., 1989, 2001).

Tab. 3: Endokrine Ereignisse und Entwicklung der Hundeeizellen während der Läufigkeit bis zur Fertilisation in zeitlichem Bezug zum präovulatorischen LH-Gipfel (nach Concannon et al., 2001)

Tage vor/nach LH-Gipfel	Ereignis
-25 bis -3	Einsetzen des Prooestrus (Läufigkeit): im Durchschnitt an Tag -9;
-3 bis +6	Einsetzen des Oestrusverhaltens: im Durchschnitt zwischen Tag 0 und Tag 1;
-3 bis +8	1. Akzeptanz und Paarung: im Durchschnitt an Tag 1;
-3	1. Tag zu dem eine einzelne Paarung signifikant zur Fertilität führen kann;
-1	Östrogenkonzentrations-Gipfel zwischen Tag -3 und Tag -1, dann Abfall;
0	Hauptanstieg der LH-Serumkonzentration, LH-Gipfel an Tag 0 bis 1; Anstieg des Progesterons von 0,3 bis 0,8 ng ml ⁻¹ auf 0,9 bis 3,0 ng ml ⁻¹ ; Einsetzen des Fertilitäts-Gipfel für Einzelpaarung in "Hochfertilitäts-Zucht";
+2	Ovulation 38 bis 58 Stunden nach dem LH-Gipfel;
+3	Primäre Oozyten im Ovidukt; potentielle Spermienpenetration;
+4	Oozyten vermutlich noch ohne Polarkörperchen und ohne weiblichen Pronukleus;
+5	Reifung der Oozyten im distalen Ovidukt; Fertilisation (wenn gepaart);
+6	Ungepaart: gereifte Eizelle noch fertil;
+7	Ungepaart: Lebensfähigkeit der Eizelle verringert oder verloren;
+8	Fertile Paarung noch möglich, geringere Wurfgrößen oder keine Würfe;

Tab. 4: Entwicklung von Hundeembryonen bis zur Implantation im Uterus in zeitlicher Relation zum präovulatorischen LH-Gipfel (nach Concannon et al., 2001)

Tage vor/nach LH-Gipfel	Ereignis
+7 bis +8	Embryonen Zwei- bis Vier-Zell-Stadium im Ovidukt;
+9	Embryonen im Vier- bis Acht-Zell-Stadium im Ovidukt;
+10	Embryonen im Acht- bis 16-Zell-Stadium im Ovidukt;
+12	Morulae (16- bis 32-Zell-Stadien) innerhalb der Zona pellucida im Uterushorn;
+13	Intrauterine Migration der Blastozysten zwischen den Uterushörnern;
+16	Verlängerung des Embryos, Zona pellucida verdünnt sich;
+17	Blastozystenvergrößerung beendet; Migrationsstop;
+18	Blastozyste innerhalb der Zona pellucida in Uterusvesikel mit Durchmesser ≥ 1 mm;
+20	Embryoexpansion auf ≥ 2 mm x 3 bis 6 mm in Uterusvesikel, keine Zona pellucida;
+21	Blastozystenkontakt mit Endometrium, noch keine Haftung;
+22	Starke Uterusschwellung, Embryohaftung, Invasionsbeginn;
+23	Invasion des plazentaren Trophektoderms ins Endometrium beendet;
+24	Erste Detektion der verschiedenen Embryonen ultrasonographisch möglich; Serum-Relaxin mittels ELISA detektierbar;
+26	Sonographische Detektion des embryonalen Herzschlages möglich; initialer Anstieg des Serum-Relaxin mittels Radioimmunoassay (RIA) detektierbar;

3 Assistierte Reproduktionstechnologien beim Haushund

3.1 Geschichte der assistierten Reproduktion bei Hunden

Die erste Beschreibung von Hundesperma wurde 1679, 109 Jahre nach der Entwicklung des zusammengesetzten Mikroskops von Leeuwenhoek veröffentlicht (nach Singer, 1959). Der erste Bericht über eine Säugereizelle stammt von Karl Ernst von Baer aus dem Jahr 1827, es handelte sich um eine Hundeeizelle. Die assistierte Reproduktion beim Haushund hat ihre Wurzeln im frühen 18. Jahrhundert in Italien. Im Jahr 1776 beobachtete Abbé Lazzaro Spallanzani, dass es bei Spermien durch Temperaturreduktion zur reversiblen Reduktion ihrer Motilität kommt. Die erste wissenschaftliche Aufzeichnung über eine erfolgreiche künstliche Befruchtung einer Hündin, die zur Geburt von drei Welpen führte, stammt ebenfalls von Spallanzani (Heape, 1897). Die weitere Entwicklung von Geräten zur Durchführung der artifiziellen Insemination und von Methoden zur Konservierung von Sperma bei Hunden ging aber nur sehr langsam voran. Über die erste erfolgreiche künstliche Besamung einer Hündin mit gekühltem Sperma wurde 1954 von Harrop berichtet. Die erste Publikation über das erfolgreiche Einfrieren von Hundespermien stammt ebenfalls aus dem Jahr 1954 (Rowson, 1954). Im Jahre 1960 erschien die erste umfassende Publikation mit der Beschreibung der caninen Reproduktionsphysiologie, der Kühlung von Hundespermien zur Kurzzeitkonservierung und der Technik der artifiziellen Insemination bei der Hündin (Harrop, 1960). Erheblichen Einfluss auf die Methodik der Kryokonservierung von Spermien hatte die Entdeckung der kryoprotektiven Wirkung von Glycerin (Polge et al., 1949). Seitdem wurde die Methodik der Gefrierkonservierung weiterentwickelt und verfeinert. Der weltweit erste Wurf von Hundewelpen nach der künstlichen Besamung mit kryokonserviertem Samen wurde 1969 in den USA geboren (Saeger, 1969).

An Universitäten, bei Züchterklubs und bei privaten Zuchtservice-Gesellschaften entstanden mittlerweile Samenbanken, die kryokonserviertes Hundesperma für die Zucht bereitstellen (Farstad, 1996). Derartige Samenbanken ermöglichen die Schaffung von Genpools. So kann einerseits das genetische Material wertvoller Tiere erhalten und für die Zucht bereitgestellt, andererseits können geographisch isolierte Populationen vor zu starker Inzucht bewahrt werden (Morton und Bruce, 1989).

Vorbereitende Studien zu Kryokonservierung von Eizellen und Embryonen beim Hund fehlen bisher (Hewitt und England, 2001).

3.2 Artificielle Insemination (AI) bei Haushunden

Bei der artifiziiellen Insemination (AI) wird das vom männlichen Tier gewonnene Sperma unter Ausschaltung des natürlichen Deckaktes in den weiblichen Reproduktionstrakt übertragen. Die AI ist das älteste biotechnische Verfahren der Fortpflanzung und heute wichtiger Bestandteil bei der Reproduktion fast aller landwirtschaftlichen Nutztiere (Schnorr, 1996). Beim Hund erfolgt die künstliche Besamung in Fällen, bei denen die natürliche Paarung aus "psychischen" (Angst, fremde Umgebung, Verhalten des Besitzers) oder physischen Gründen erforderlich ist, zur besseren Ausnutzung besonders wertvoller Rüden, beim Versand von Sperma und beim Einsatz von Sperma aus Samenbanken. Vor der Samenübertragung sind zuchthygienische Aspekte angemessen zu berücksichtigen. Beim Vorliegen von Paarungsstörungen kann die Insemination unmittelbar im Anschluss an die Samengewinnung mit unverdünntem Sperma durchgeführt werden, bei anderen Indikationen ist außerdem die Verwendung von gekühlt oder gefroren gelagertem Sperma möglich (Berchtold, 1997b).

Die Fertilität der Spezies *Canis familiaris* ist im allgemeinen sehr hoch. Innerhalb der durchschnittlichen Oestrusdauer von neun Tagen kann es durch eine einzige Paarung zur Konzeption kommen (Concannon, 1986a, b; Doak et al. 1967). Die Konzeptionsraten nach gut geplanter natürlicher Anpaarung liegen zwischen 85 und 90 % (Andersen und Wooten, 1959; Daurio et al., 1987; England und Allen, 1989a; Farstad, 1984a; Friedman, 1957). Eine Geburtsrate bis zu 90 % ist bei dieser Spezies demnach als nahezu optimal anzusehen (Farstad, 1984a). Der Erfolg der artifiziiellen Insemination bei der Hündin wird von einer Reihe von Faktoren beeinflusst. So haben die Qualität des verwendeten Spermas, seine Behandlung und seine eventuelle Konservierung, der Besamungszeitpunkt, die Inseminationsdosis und -frequenz, der Ort der Spermadeponierung und nicht zuletzt auch die Fertilität der Hündin Einfluss auf die erzielte Trächtigkeitsrate (Andersen, 1975; Platz und Seager, 1977; Rota et al., 1999; Seager und Fletcher, 1973; Wilson, 1993).

Das gesamte Geschehen von der Spermagewinnung bis zur Trächtigkeit wurde bisher nur in wenigen Studien beleuchtet (Farstad und Andersen Berg, 1989; Lees und Castleberry, 1977; Oettlé, 1982; Olar et al., 1989; Platz und Seager, 1977; Seager et al., 1975; Wilson, 1993). In den meisten Fällen, in denen eine große Anzahl von Besamungen erfasst wurde, handelte es sich um retrospektive Studien. Hierbei stellte sich das Problem, dass das Hundesperma aus unterschiedlichen Quellen stammte. In vielen Fällen war zudem der Inseminationszeitpunkt in genauer Relation zum hormonellen Geschehen (LH-Gipfel, Ovulation) der Hündin unbekannt (Farstad, 1984a; Linde-Forsberg und Forsberg, 1989, 1993). Die Aussagekraft der wenigen, durchgehend kontrollierten Studien wird durch die geringe Anzahl der besamten Hündinnen gemindert (Rota et al., 1999; Silva et al., 1996).

3.2.1 Spermagewinnung

Die Spermagewinnung beim Hunderüden ist mittels manueller Stimulation, mit der künstlichen Vagina oder durch Elektroejakulation möglich. Als Methode der Wahl gilt die fraktionierte Spermagewinnung durch manuelle Stimulation (Massage) bei Fixation des Penis. Diese Methode ist einfach und sicher, erlaubt eine hygienisch einwandfreie Gewinnung des Ejakulates und bietet die Möglichkeit der separaten Gewinnung der spermienreichen Fraktion (Berchtold, 1997b; Günzel-Apel, 1994). Weitere entscheidende Vorteile sind die Stimulierbarkeit der meisten Rüden, insbesondere bei Anwesenheit einer läufigen Hündin und ihre Wiederholbarkeit, da der Ablauf annähernd an die physiologischen Verhältnisse des Paarungsablaufs angepasst ist. Durch die Induktion der Paarungsreflexkette ist es außerdem möglich, die *Potentia coeundi* des Rüden zu beurteilen (Günzel-Apel, 1994).

Wichtige Voraussetzung für das Gelingen der Spermagewinnung beim Rüden sind ein ruhiger Untersuchungsraum und die Begrenzung der Zahl der anwesenden Personen auf ein Minimum. Zum fraktionierten Auffangen von Vorsekret, Hauptfraktion und Prostatasekret werden im Wasserbad (37°C) vorgewärmte tulpenförmige Samenauffanggläser, wie sie bei der Spermagewinnung beim Bullen benutzt werden, oder Reagenzgläser mit Glastrichter bereitgehalten (Berchtold, 1997b). Vor der Spermagewinnung wird die Präputialöffnung des Rüden trocken mit Zellstoff gereinigt. Bei Rüden kleiner und mittelgroßer Rassen kann die

Samengewinnung auf einem Tisch erfolgen, bei großen Rüden erfolgt sie auf dem Fußboden (Brechtold, 1997b; Günzel-Apel, 1994). Der Rüde wird von einer vertrauten Person am Kopf gehalten. Das Anlegen eines Maulkorbes sollte nur in Ausnahmefällen bei aggressiven Tieren erfolgen. Bei der Spermagewinnung ist, zumindest bei unerfahrenen Rüden, die Anwesenheit einer Hündin im späten Prooestrus oder im Oestrus erforderlich. Zur Stimulation können außerdem Vaginalsekret bzw. Abstriche von oestrischen Hündinnen, die gefroren aufbewahrt wurden, verwendet werden. Das Hunde-Pheromon Methyl-*p*-hydroxybenzoat stellt eine Alternative hierzu dar (Allen, 1994).

Die Hündin wird an Kopf oder Hals fixiert, der Rüde darf an der Vulva schnüffeln und sie belecken. Sobald der Rüde Interesse zeigt, wird, noch vor dem Versuch auf die Hündin zu springen, der Penis abgelenkt (Allen, 1994). Die in der Präputialhöhle liegende Eichel wird mit der linken Hand bis zum Eintritt einer Teilerektion mit deutlicher Abgrenzung von Bulbus glandis und Pars longa glandis massiert. In optimalen Fällen wird der Rüde zu diesem Zeitpunkt selbst aktiv, er wölbt den Rücken auf, zeigt ausgeprägte Friktionsbewegungen und gleichzeitig kommt es zur Ausschachtung der Glans penis. Wird der Rüde selbst aktiv, ist die manuelle Stimulation nicht mehr erforderlich. Bei zurückhaltenden oder unerfahrenen Rüden ist es oft nicht möglich, aktive Beckenschübe auszulösen. Die Massage wird in diesen Fällen so lange fortgesetzt, bis anhand des Abtropfens des klaren spermienfreien Vorsekretes erkennbar ist, dass die für den Samenausstoß erforderlichen Kontraktionen der Urethra eingesetzt haben. Bevor der Bulbus glandis maximal geschwollen ist, sollte das Präputium zurückgezogen werden, um die Glans penis freizulegen. Dies erfolgt ohne Druckausübung auf den Penis mit Daumen und Zeigefinger der rechten Hand, die sich an den Fingerspitzen berührend zu einem weiten Ring verbunden werden. Der Handrücken zeigt dabei zum Bauch des Rüden (Günzel-Apel, 1994). Während des gesamten weiteren Ablaufes erfolgt die Fixation der Eichel mit Daumen und Zeigefinger der rechten Hand im Bereich des Peniskörpers unmittelbar proximal des Bulbus glandis. So kann beim Umsteigen die im Bereich des Peniskörpers stattfindende Drehung um 180° nachvollzogen werden. Zur Ejakulation der zweiten, grauweißen bis milchigen, spermienreichen Fraktion kommt es für gewöhnlich nach dem Erreichen der vollständigen Erektion durch vier bis zehn Kontraktionen der Harnröhre. Meist deutet der Rüde während der

Ejakulation der spermienreichen Fraktion das Umsteigen durch Anheben einer Hintergliedmaße an. Daraufhin wird die Glans penis unter leichtem Zug erst seitlich, dann unter der Hintergliedmaße hindurch in kaudale Richtung gelenkt und fast horizontal gehalten, um das Hängen zu imitieren. Die Penisspitze mit der Harnröhrenöffnung bildet hierbei den tiefsten Punkt. Der Penis sollte in dieser Lage festgehalten werden, bis das Prostatasekret vollständig abgegeben ist. Vor der Ejakulation der dritten Fraktion kann es zu mehreren Harnröhrenkontraktionen kommen. Das Ende der Samengewinnung kündigt sich durch plötzliches Erschlaffen des Gliedes an. Zu diesem Zeitpunkt wird die Fixation des Penis gelöst. Die Penisoberfläche wird im Anschluss prophylaktisch mit sulfonamidhaltiger Salbe versorgt und die Glans sorgfältig in die Präputialhöhle zurückverlagert (Allen, 1994; Berchtold, 1997b; Günzel-Apel, 1994).

Bei zu starkem Anschwellen des Bulbus glandis ist es nicht möglich, dass die Glans beim Versuch, das Präputium zurückzuziehen, unter der Haut hervortritt. Der Rüde sollte in diesen Fällen von der Hündin entfernt werden, bis die Erektion zurückgeht. Der Versuch einer Samengewinnung mit dem Penis innerhalb des Präputiums kann unternommen werden, könnte aber für den Rüden unangenehm sein. Neben dem zu frühen Anschwellen des Bulbus, stellt das Freilegen des Penis bei langhaarigen bzw. kleinwüchsigen Rassen, bei denen der Penis schwer zu halten ist, das Hauptproblem dar (Allen, 1994).

3.2.2 Spermauntersuchung

Die Qualität des Ejakulates sollte unmittelbar nach seiner Gewinnung und bei konserviertem Sperma zusätzlich vor der Besamung untersucht werden. Starke Veränderungen der Umgebungstemperatur sind zu vermeiden, am günstigsten ist es, wenn das gesamte Instrumentarium eine Temperatur von etwa 37°C hat. Einleitend erfolgt die makroskopische Untersuchung. Hierbei werden das Volumen, die Farbe, der pH-Wert und die Konsistenz des Ejakulates beurteilt, außerdem wird auf das Vorhandensein von Beimengungen geachtet (Berchtold, 1997b; Feldman und Nelson, 1996a) (siehe 2.2 Grundzüge der Reproduktionsphysiologie beim Rüden). An die makroskopische Beurteilung der Spermprobe schließt sich ihre mikroskopische Untersuchung an. Neben den klassischen Parametern wie

Morphologie, Motilität, Konzentration, Anteil lebender Spermien und Zytologie gewinnen hierbei Charakteristika wie die Plasmamembranintegrität und der akrosomale Status zunehmend an Bedeutung (Riesenbeck et al., 2001).

Trotz großer Fortschritte auf dem Gebiet der Mikroskopie und der Entwicklung der Elektronenmikroskopie existieren kaum vergleichende inner- und zwischenartliche Untersuchungen von Hundespermien. Über die qualitativen Charakteristika des Spermas fertiler Haushunde wurde bislang nur wenig publiziert. Grundlage bei der Erstellung von Spermigrammen von Rüden sind verschiedenste Klassifikationen, bei denen es sich in der Regel um von anderen Spezies adaptierte Richtlinien handelt (Aughey und Renton, 1971; Bane, 1970; Bartlett, 1962; Boucher et al., 1958; Christiansen, 1984; Harrop, 1966; Heywood und Sortwell, 1971; Larsen, 1980; Oettlé, 1993; Seager, 1986).

3.2.2.1 Spermienmorphologie

Für die mikroskopische Untersuchung struktureller Spermienanomalien wird ein kleiner Tropfen des unverdünnten Spermas auf eine Objektträger geben und mit einem Deckglas so bedeckt, dass sich ein dünner Film bildet. Dies erlaubt die Bewertung einzelner Spermien, ohne dass eine Färbung erforderlich ist. Alternativ können bei einem luftgetrockneten Abstrich der Spermprobe die Drei-Schritt-Färbetechnik (Harleco Hemacolor, EM Diagnostic Systems, Gibbstown, NJ), eine Tuschefärbung oder die Eosin-Nigrosin-Supravitalfärbung durchgeführt werden (Dott und Foster, 1972). Bei der Auswertung sollten mindestens 200 Spermien erfasst werden.

Spermienanomalien beim Hund können nach ihrem Ursprung in primäre und sekundäre Defekte sowie nach ihrer Lokalisation im Bereich von Kopf, Mittelstück und Spermenschwanz eingeteilt werden (Johnston et al., 1991; Morton und Bruce, 1989) (Tabelle 5). Von primären Spermiendefekten wird angenommen, dass sie während der Spermatogenese im Hoden entstehen, wohingegen die sekundären Anomalien unspezifische Defekte repräsentieren, zu denen es während des Transportes durch das Ductus-System im Nebenhoden, nach Infektionen, Traumata bzw. Fieber oder bei der Spermabehandlung kommen kann (Johnston et al., 1991).

Tab. 5: Primäre und sekundäre Spermiendefekte beim Hund (nach Feldman und Nelson, 1996a)

Primäre Spermiendefekte	Sekundäre Spermiendefekte
<p>Kopf Alle Abweichungen</p> <p>Mittelstück Abaxiale Anhaftung Doppeltes Mittelstück Ausgefranztes, dünnes Mittelstück Geschwollenes Mittelstück Proximaler Zytoplasmatropfen</p> <p>Schwanz Aufgewickelter Schwanz Multipler Schwanz</p>	<p>Losgelöste normale Köpfe, Schwänze Losgelöste Akrosomen Schiefes Mittelstück Schiefer Schwanz Distale Zytoplasmatropfen</p>

Oettlé (1993) empfiehlt für die Bewertung der Anomalien beim Hundespermien die Anwendung einer Modifikation der Blom's Klassifikation für Bullensperma. Dieses Klassifikationsschema liefert eine systematische Beschreibung der morphologischen Anomalien, basierend auf vergleichenden licht- und elektronenmikroskopischen Beobachtungen. Die Bewertung der Defekte erfolgt hierbei nach Haupt- und Nebendefekten unterschiedlicher Signifikanz (Tabelle 6). Ein Nachteil dieses Systems, den es mit den meisten anderen Klassifikationsschemata gemeinsam hat, ist das Unvermögen, multiple Defekte zu erfassen. Um eine annähernd korrekte Interpretation beim Auftreten mehrerer Anomalien zu gewährleisten, erfolgt die Einordnung entsprechend der wichtigsten Anomalie. Dieses Vorgehen hat die Tendenz, gewisse Anomalien zu maskieren (Oettlé, 1993).

Tab. 6: Morphologische Klassifikation der Haupt- und Nebendefekte von Hundespermien, modifiziert nach Blom (nach Oettlé, 1993)

1. Normale Morphologie
2. Akrosomenanomalien <ul style="list-style-type: none"> - Hauptdefekte: lippenartig, zystisch, abnormale Verteilung - Nebendefekte: akrosomenreagiert, geschwollen, verschiedene Schäden, Verlust
3. Kopfanomalien <ul style="list-style-type: none"> - Hauptdefekte: makrozephal, mikrozephal, pyriform, Kranzdefekte, andere Kernvakuolen, gefurchte Spermien, Doppelformen, verschiedene pleiomorphe oder bizarre Formen - Nebendefekte: schmale Köpfe, Kopf-Basis-Defekte, anhaftende Köpfe, nukleare Kondensation
4. Mittelstückdefekte <ul style="list-style-type: none"> - Hauptdefekte: erhaltengebliebene Zytoplasmatropfen, rupturierte Mittelstücken, Pseudotropfendefekte, geknickte Mittelstücken - Nebendefekte: distale Zytoplasmatropfen
5. Schwanzdefekte <ul style="list-style-type: none"> - Hauptdefekte: "Dag"-Defekt, Doppelschwanz - Nebendefekte: einfach gebogene oder aufgewickelte Schwänze, terminal aufgewickelte Schwänze
6. Spermienagglutination <ul style="list-style-type: none"> - Kopf zu Kopf, Kopf zu Schwanz, Schwanz zu Schwanz oder Haftung an anderen Zellen

Rüden können auch mit einer Reihe von "abnormalen" Spermien im Ejakulat fertil sein (Oettlé, 1993; Morton und Bruce, 1989) (Tabellen 7, 8). Basierend auf den Ergebnissen der artifiziellen Insemination bei 42 Hündinnen untersuchte Oettlé (1993) die Auswirkung von Spermienanomalien auf die Fertilität. Er kam zu dem Ergebnis, dass die Fertilität nachteilig beeinflusst wird, wenn der Anteil morphologisch normaler Spermien unter 60 % liegt (Oettlé, 1993). Im allgemeinen wird davon ausgegangen, dass Sperma normaler Rüden mehr als 70 % morphologisch unauffällige Spermien enthalten sollte. Der Anteil primärer Anomalien

sollte geringer als 10 %, der sekundärer geringer als 20 % sein (Berchtold, 1997b; Feldman und Nelson, 1996a; Morton und Bruce, 1989).

Tab. 7: Spermacharakteristika fertiler Hunderüden (nach Morton und Bruce, 1989)

	Anteil (%) der Spermien die		Anomalien (%) im Bereich			Anzahl der Spermien im Ejakulat
	lebend	normale	Kopf	Mittelstück	Schwanz	
Mittelwert	88	69	6	13	5	860 x 10 ⁶
Medianwert	91	76	3	7	2	677 x 10 ⁶
Anzahl der Rüden	167	167	162	161	161	245

Tab. 8: Spermacharakteristika, Alter und Fertilitätsergebnisse von als normal bzw. subnormal klassifizierten Hunderüden (≥ 60 % bzw. < 60 % morphologisch normale Spermien) (nach Oettlé, 1993)

Charakteristikum	Mittelwerte bei normalen Rüden (n=45)	Mittelwerte bei subnormalen Rüden (n=22)
Progressive Motilität (%)	75,6	57,2
Spermienmorphologie (%):		
Normal	79,3	33,4
Kopfanomalien	4,6	22,2
Akrosomenanomalien	3,2	3,6
Schwanzanomalien	4,1	12,6
Proximale Protoplasmatropfen	3,6	16,2
Abaxiale Haftung	1,6	4,3
Separate Köpfe	2,7	4,9
Mittelstückanomalien	1,2	3,1
Alter (Jahre)	4,7	4,9
Fertilität (%)	60,9 (n=23)	13,3 (n=15)

3.2.2.2 Spermienmotilität

Die mikroskopische Bewertung der Motilität ist bei Hundespermien nach wie vor am gebräuchlichsten (Rota et al., 1997). Hierbei wird ein Tropfen des Spermas auf einen vorgewärmten Objektträger gegeben und bei 200- bis 400-facher Vergrößerung unter Phasenkontrastbeleuchtung untersucht. Bei hoher Spermienkonzentration erleichtert die 1:1 Verdünnung mit 37°C warmer zitrat- oder phosphatgepufferter Salzlösung (0,9 %) die genaue Beurteilung der Probe (Feldman und Nelson, 1996a).

Die Motilität stellt einen wichtigen Parameter bezüglich der Fertilität und der Eignung von Hundespermien für die Konservierung dar (Günzel-Apel et al., 1993). Bei Spermaproben normaler Rüden sollte der Anteil progressiv vorwärtsbeweglicher Spermien nicht unter 70 % liegen. Nach einer längeren Periode sexueller Ruhe ist die Anzahl toter Spermien im ersten Ejakulat möglicherweise erhöht. Spermaproben, die in den Folgetagen gewonnen werden, sollten allerdings normal sein (Berchtold, 1997b; Feldman und Nelson, 1996a).

Mit den Standardmethoden der Mikroskopie können Spermienkonzentration, morphologische Anomalien und der lebend/tot Anteil quantitativ relativ genau bestimmt werden. Die mikroskopische Bewertung der Motilität stellt jedoch eine subjektive Methode dar (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001b). Bei der mehrmaligen mikroskopischen Beurteilung der selben Ejakulate von Menschen und Tieren wurde über Abweichungen von 30 bis 60 % berichtet (Chong et al., 1983; Deibel et al., 1976; Dunphy et al., 1989; Knuth et al. 1989; Mortimer et al., 1986). Aufgrund dieser Subjektivität der Analyse und der dadurch bedingten hohen Fehlerrate, ist ein Vergleich der Ergebnisse einzelner Studien nur schwer möglich (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a, b).

Die genauere Beurteilung verschiedener Spermienmotilitätsparameter wurde durch die Entwicklung der computergestützten Spermienanalyse (CASA) möglich (Boyers et al., 1989; Makler et al., 1980). Die CASA wurde erstmals von Dott und Forster (1979) vorgeschlagen, mittlerweile kommt sie in vielen humanmedizinischen Andrologiezentren routinemäßig zum Einsatz. Auch bei Rind, Pferd und Schwein wird sie erfolgreich angewendet (Aumüller und Willecke, 1987; Jasko et al., 1988;

Mack et al., 1988; Schröppel, 1988).

Günzel-Apel et al. (1993) untersuchten die Eignung des "Cellsoft Computer Videomikrographsystems" und des "Strömberg-Mika Cell Motion Analyzers" für die CASA beim Hund. Die computerkalkulierte Motilität korrelierte hierbei signifikant mit der subjektiv bestimmten Motilität, die mittels CASA bestimmte Spermienkonzentration stimmte mit der durch die Zählkammer ermittelten überein (Günzel-Apel et al., 1993). Iguer-Ouada und Verstegen (2001a) überprüften die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des "Hamilton Thorn Computer-Based Automate System (HTR-IVOS10) Analyzers" bei der Untersuchung caniner Spermien. Der "HTR-IVOS10 Analyzer" wurde für die Bewertung humaner Spermien entwickelt und bereits weltweit für die CASA des Spermas verschiedener Spezies eingesetzt (Abaigar et al., 1999; Douglas-Hamilton, 1995; Farrell et al., 1995). Die Wiederholbarkeit der Messungen bei Hundesperma war mit intra- und inter-Versuchs-Koeffizienten zwischen 10 und 20 % bei den meisten gemessenen Parametern gut (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a). Die CASA gestattet somit die objektive, genaue und zuverlässige Analyse verschiedener, klinisch relevanter Parameter caniner Spermien wie der Gesamtmotilität, dem Anteil vorwärtsbeweglicher motiler Spermien, der Spermengeschwindigkeit und der Linearität der Bewegung (Günzel-Apel et al., 1993; Iguer-Ouada und Verstegen, 2001a). Auch bei der CASA haben allerdings Faktoren wie die Mikroskopiebedingungen, die verwendete Hard- und Software, die selektierenden Computerparameter und die Art der Probenaufbereitung Einfluss auf die Genauigkeit der Ergebnisse (Boyers et al., 1989). Um einen hohen Grad an Reproduzierbarkeit zu erhalten, müssen deshalb vor der Untersuchung für jedes dieser Analysesysteme die Rahmenbedingungen genau festgelegt werden (Smith und England, 2001).

Ein einfacheres Gerät zur Untersuchung der Spermienmotilität ist der "Sperm Quality Analyzer" (SQA, United Medical Systems Inc., Santa Ana, CA, USA). Der SQA detektiert Variationen der optischen Dichte, die durch die Spermienbewegung in einer dünnen Glaskapillare entstehen. Diese Variationen werden von einer Photozelle registriert und die Frequenz der analogen elektrischen Wellenlängensignale wird digital in einen numerischen Index, genannt Spermien-Motilitäts-Index (SMI), konvertiert. Je höher die Pulsfrequenz, je höher ist der SMI

(Bartoov et al., 1991). Ein Vergleich der mittels SQA bzw. "HTR-IVOS 10 Analyzer" gewonnenen Daten von Hundesperma ergab eine gute Wiederholbarkeit, der Variabilitätskoeffizient lag bei allen getesteten Werten unter 10 %. Somit stellt der SQA eine genaue, unkomplizierte und zudem kostengünstige Methode für die Untersuchung von Hundeejakulaten in der tierärztlichen Praxis dar (Iguer-Ouada und Versteegen, 2001b).

3.2.2.3 Spermienkonzentration

Das totale Spermienvolumen beim Rüden ist, wie bereits erwähnt, von dem sehr variablen Volumen der klaren prostatistischen Flüssigkeit (dritte Fraktion) abhängig. Demzufolge wird die Spermienkonzentration stark vom Gesamtvolumen des Ejakulates beeinflusst. Günstiger ist es, die Anzahl der Spermien pro Ejakulat zu ermitteln. Dies kann mittels kalibriertem Spektrophotometer, Partikelzählgerät (Coulter Counter) oder Hämozytometer (Zählkammer) erfolgen. Die totale Spermienzahl im Ejakulat normaler adulter Hunderüden reicht von 200 Millionen bis zu mehr als einer Milliarde. Sie variiert in Abhängigkeit von Alter und sexueller Aktivität des Rüden, vom Gewicht des Hodens und schwankt möglicherweise auch saisonal. Bei größeren Rassen ist die Spermienkonzentrationen im allgemeinen höher als bei Hunden kleinerer Rassen (Amann, 1986).

3.2.2.4 Zytologie des Hundeejakulates

Zur Bewertung der Zytologie erfolgt die mikroskopische Untersuchung eines mit Wright's oder mit Methylenblau gefärbten Abstriches von unverdünntem Sperma. Untersucht wird auf das Vorhandensein von Entzündungszellen und Bakterien. Das gelegentliche Auftreten von Leukozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen, roten Blutkörperchen oder Bakterien im Sperma normaler Rüden ist nicht ungewöhnlich, es handelt sich hierbei in der Regel um urethrale Verunreinigungen. Besonders nach längerer sexueller Pause sind regelmäßig Epithelzellen anzutreffen (Feldman und Nelson, 1996a).

3.2.2.5 Plasmamembranintegrität und akrosomaler Status

Die Integrität der Plasmamembran und die Erhaltung ihrer Funktion sind essentiell für das Überleben von Zellen, da die selektive Permeabilität der Membran die intrazellulären metabolischen Aktivitäten, den pH-Wert und die Ionenzusammensetzung erhält. Um erfolgreich mit der Eizelle fusionieren zu können, ist für Spermien außerdem die akrosomale Integrität von außerordentlicher Bedeutung (Curry und Watson, 1995). Während der Einfrier-Auftau-Prozedur nimmt die Akrosomenintegrität signifikant ab. Die Beurteilung der Plasmamembran und speziell des akrosomalen Status von Spermienzellen stellt daher einen wertvollen Indikator für die Bewertung der Spermaqualität nach dem Auftauen dar, denn auch hochmotile Spermien können infolge von Akrosomenschäden infertil sein (Ferguson et al., 1989; Pursel et al., 1972).

Die Bewertung der Plasmamembranintegrität kann fluoreszenzmikroskopisch nach der Färbung der Samenzellen mit 6-Carboxyfluorescindiacetat (C-FDA) (Grünfärbung) und Propidiumjodid (PI) (Rotfärbung) erfolgen (Harrison und Vickers, 1990; Rota et al., 1995, 1997). Bei reiner Grünfärbung ist die Plasmamembran der Spermien intakt, bei beschädigtem Plasmalemma färben sich die Zellen rot.

Der Einsatz des fluoreszierenden Antibiotikums Chlortetracyclin (CTC) erlaubt die Beurteilung des Akrosomenstatus und die Abgrenzung nicht kapazitierter von kapazitierten Hundespermien (Fraser et al., 1995). CTC bindet an membranassoziierte Kationen, speziell an Kalziumionen (Ca^{2+}) (Caswell und Hutchison, 1971). Beim Eintritt in die Spermienzelle bindet CTC freies Kalzium, wodurch es zur Zunahme der Fluoreszenz kommt (Ericsson, 1967). Diese CTC-Kalzium-Komplexe binden bevorzugt an die Zellmembran. Nach der Kapazitation und der Akrosomenreaktion kommt es an der Oberfläche des Spermienkopfes durch CTC-Verlust zur Veränderung des Fluoreszenzmusters (Fraser, 1982; Guérin et al., 1999). Die drei hierbei zu beobachtenden Färbemuster (F = unkapazitiert und akrosomenintakt; B = kapazitiert und akrosomenintakt; AR = kapazitiert und akrosomenreagiert) wurden erstmals von Ward und Storey (1984) bei murinen Spermien beschrieben. Um die Bewertung toter als akrosomenreagierte Spermien zu vermeiden, ist die Co-Färbung mit dem Supravitalfluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258

möglich (Hewitt und England, 1998c; Kay et al., 1994). Diese duale Fluoreszenz-Färbetechnik, die Fraser et al. (1995) bei Bullen einsetzten, wurde von Hewitt und England (1998c) für den Gebrauch beim Hund adaptiert und erwies sich für die Einschätzung der Vitalität und des funktionellen Status der Hundespermien als sehr geeignet.

Eine sehr viel genauere Methode als die herkömmliche Mikroskopie zur Bewertung von Spermien ist die Flow-Zytometrie. Diese Technik macht es möglich, Subpopulationen von Zellen entsprechend ihres spezifischen Färbemusters zu analysieren und zu separieren (Garner et al., 1986; Graham et al., 1990; Peña et al., 1998c, 2001). Die Flow-Zytometrie gewinnt bei der Bewertung der Morphologie und der funktionellen Parameter von Hundespermien zunehmend an Bedeutung, denn sie erlaubt in kurzer Zeit mit der Untersuchung von nur einer Probe die objektive und genaue Bestimmung der Daten von Tausenden Zellen (Peña et al., 1998c, 2001). Zur simultanen Analyse der Spermiovitalität und der Akrosomenintegrität mittels Flow-Zytometrie ist die Färbung mit PI (Identifikation toter Zellen) in Kombination mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-konjugiertem *Pisum sativum* Agglutinat (PSA) (bindet an den akrosomalen Anteil von Spermien mit beschädigter Plasmamembran oder beschädigter äußerer akrosomaler Membran) gebräuchlich. Lebende Spermien mit intakter akrosomaler Membran werden mit dieser Methode nicht detektiert (Harrison und Miller, 1998). Ein Problem bei dieser Technik stellen allerdings eingefroren-aufgetaute Samenproben dar, denn hier kommt es durch die Detektion von gefärbten Eiweißpartikeln und Zelldetritus zur Verfälschung der Ergebnisse (Peña et al., 2001). Da Hundespermien schmaler sind als die der meisten Säugetiere und nach dem Auftauen in hypertonem Medium weiter an Größe verlieren, wird ihre Abgrenzung von gefärbten Trümmerpartikeln bei der Flow-Zytometrie erschwert (Cummins und Woodall, 1985; Peña et al., 1999). Um die Plasmamembranintegrität und den Akrosomenstatus speziell von eingefroren-aufgetauten Hundespermien mittels Flow-Zytometrie bewerten zu können, wurde eine neue simultan Dreifach-Fluoreszenz-Färbetechnik getestet. Hierbei handelt es sich um die Kombination der Fluoreszenzfarbstoffen PI, FITC-PSA (siehe oben) und Carboxy-SNARF-1, einem zellpermeierenden intrazellulären pH-Indikator zur Identifikation lebender Spermien. Diese Färbetechnik erwies sich als eine geeignete und effektive Methode zur Bewertung der Kryokonservierungsprotokolle für Hundesperma (Peña et al., 2001).

Eine einfache und kostengünstige Alternative stellt die Beurteilung des akrosomalen Status mit der Spermac[®]-Färbung (Fa. Stefan Gück, Hamburg) oder mit der Formolzitrat-Flüssigfixierung in Kombination mit der Untersuchung der Plasmamembranintegrität mittels hypoosmotischem Schwelltest (HOS-Test) dar (Riesenbeck et al., 2001). Die Spermac[®]-Färbung und die Formolzitrat-Flüssigfixierung erlauben die Erfassung pathomorphologischer Veränderungen von Spermien. Mit der Spermac[®]-Färbung können durch die selektive Färbung der einzelnen Spermienanteile (Akrosom grün, Kern rot, äquatoriales Band blassgrün, Mittelstück und Schwanz grün) die akrosomale Integrität und morphologische Veränderungen beurteilt werden. Bei der Formolzitrat-Flüssigfixierung werden alle pathomorphologischen Veränderungen beurteilt, hierbei kommen Formabweichungen des Akrosoms und des apikalen Randes besondere Bedeutung zu (Anhang 7.5.1). Der Anteil akrosomengeschädigter und pathomorphologisch veränderter Spermien sollte bei normospermen Hunden 5 bzw. 20 % nicht überschreiten (Riesenbeck et al., 2001). Beim HOS-Test (Anhang 7.5.2) wird die Schwanzform der Spermien nach 30 Minuten Inkubation in hypoosmolarer Lösung (150 mOsm) bei 37°C beurteilt. Bei intakter Plasmamembran rollt sich die Samenzelle im Bereich des Schwanzes ein. Im Ejakulat fertiler Rüden sollten mindestens 80 % der Spermien einen derartig aufgerollten Schwanz haben (Riesenbeck et al., 2001) (Tabelle 9).

Tab. 9: Plasmamembranintegrität und Akrosomenstatus bei frischen Samenproben fertiler Hunderüden (n=11) (nach Rota et al., 1995)

Charakteristikum	Mittelwerte
Motilität (%)	78,6
Intakte Plasmamembran (%) bestimmt mit:	
hypoosmotischem Schwelltest (HOS)	93,6
Fluoreszenzmikroskopie (Färbung mit C-FDA/PI)	76,8
Akrosomenstatus (%):	
verloren, vesikuliert, geschwollen	10,7
andere Anomalien	2,7

3.2.2.6 Thermoresistenz

Ein Kriterium, speziell bei der Beurteilung der Qualität von gefrierkonserviertem Hundesperma nach dem Auftauen, ist die Thermoresistenz. Hierbei erfolgt in bestimmten Zeitintervallen nach der In-vitro-Inkubation der Spermien bei Körpertemperatur oder bei 22°C die Bestimmung unterschiedlicher Spermiencharakteristika wie der Motilität, des lebend/tot Verhältnisses und der Akrosomenintegrität, bis die Motilität Werte von weniger als 10 % erreicht (Larsson et al., 1976; Peña et al., 1998b; Rota et al., 1997; Thomas et al., 1992). Es wird angenommen, dass die Thermoresistenz ein besserer Indikator für die Fertilität von Hundesperma ist, als die Motilität unmittelbar nach dem Auftauen (Larsson et al., 1976; Peña et al., 1998b; Thomas et al., 1992). In einer Untersuchung von Rota et al. (1999) wurde allerdings eine derartige Relation nicht festgestellt, was aber möglicherweise durch die hohe Spermiendosis, die in dieser Studie bei der artifiziellen Insemination eingesetzt wurde, bedingt war.

3.2.2.7 Beurteilung der Fertilität

Die Aussagekraft der Spermauntersuchung liegt weniger im Nachweis einer ungestörten *Potentia generandi*, sondern hauptsächlich darin, infertile oder subfertile Tiere zu identifizieren. Es existiert kein Einzelcharakteristikum, mit dessen Hilfe eine korrekte Aussage über die Fertilität von Rüden möglich ist. Grundsätzlich gilt, dass sich aus einer Spermauntersuchung lediglich Hinweise auf eine gestörte oder nicht mehr vorhandene Fertilität ableiten lassen (Riesenbeck et al., 2001).

Die Bestätigung der Fertilität kann derzeit nur durch den Nachweis der Konzeption bzw. des eingetretenen Zuchterfolges erbracht werden (Riesenbeck et al., 2001). Die Durchführung von Fertilitätstest, bei denen die Anzahl der Würfe und die Wurfgrößen untersucht werden, ist aber mit einigen Problemen verbunden: einerseits würde eine beträchtliche Zahl von Tieren benötigt werden, andererseits hat eine Reihe weiterer Faktoren (Inseminationsdosis und -volumen, Zahl der Inseminationen, Ort der Spermiendeponierung, Besamungszeitpunkt, Fertilität des weiblichen Tieres) Einfluss auf den Konzeptionserfolg (Farstad, 1996).

3.2.2.8 Funktionstests für Hundespermien

Durch das Kühlen, Einfrieren und Auftauen von Hundespermien kann es zu Veränderungen an ihrer Plasma- und Akrosomenmembran kommen, die ihre Fähigkeit beeinträchtigen, an die Eizelle zu binden und adäquat mit ihr zu interagieren (Bedford und Kim, 1993; Rota et al., 1995; Ström et al., 1997; Ström Holst et al., 1998; Rota et al., 1997; Yanagimachi, 1988a, b). Eine derartige Beeinträchtigung der Spermienfunktion ist mit den mikroskopischen Routinetests allein nicht zu detektieren (Bedford und Kim, 1993; Quinn, 1989). Wenn erfolgreiche In-vitro-Systeme wie der Zona pellucida- bzw. der Hemizona-Bindung-Test, der Oozyten-Penetrations-Test oder die In-vitro-Fertilisation zur routinemäßigen Untersuchung von Hundesperma etabliert werden könnten, wäre die Bewertung der Spermienfunktion besser möglich (Farstad et al., 1993). In Kombination mit den Daten der konventionellen Spermaanlyse würden In-vitro-Funktionstests eine gute Möglichkeit darstellen, das Fertilisationsvermögen zu untersuchen (Hewitt und England, 1997).

3.2.2.8.1 Zona pellucida- und Hemizona-Bindungs-Test (ZPT und HZT)

Ein frühes kritisches Ereignis der Gameteninteraktion ist die enge Bindung der Spermien an die ZP. Diese Bindung wird durch Rezeptoren auf der Plasmamembran der Spermien und ein oder mehrere Zona-Glykoproteine vermittelt (Yanagimachi, 1994). Das Vermögen von Spermien, in vitro an die ZP homologer Oozyten zu binden, kann mit dem Zona pellucida-Bindungs-Test (ZPT) bzw. mit dem Hemizona-Bindungs-Test (HZT) untersucht werden (Fazeli et al., 1995; Oehninger et al., 1992; Sigman, 1993).

ZPA und HZA wurden bereits bei Rind (Fazeli et al., 1993a), Pferd (Fazeli et al., 1993b) und Schwein (Fazeli et al., 1995) etabliert. Bei Rinderspermien wurde eine Korrelation zwischen der ZP-Bindungsfähigkeit und der Fertilität festgestellt (Fazeli et al., 1997; Zhang et al., 1998), bei Eber- und kryokonserviertem Schafbockesperma war hingegen keine derartige Korrelation zu beobachten (Berger et al., 1996; Codde und Berger, 1995).

Für die Bewertung von Hundesperma hat sich der ZPT als ein geeigneter und praktisch durchzuführender Test erwiesen (Ström Holst et al., 2000a, 2001). Er bietet zum einen die Möglichkeit, konservierungsbedingte Schäden zu detektieren, zum anderen kann er als Test auf verminderte Fertilität eingesetzt werden (Hay et al., 1997b; Mayenco-Aguirre und Pérez Cortéz, 1998; Ström Holst et al., 2000a). Wegen der Variabilität der Spermienbindungskapazität der einzelnen Eizellen ist es allerdings erforderlich, eine große Anzahl von Spermien-Oozyten-Komplexen zu bewerten. Weitere Probleme, die sich beim ZPT ergeben, sind die Bereitstellung und die Lagerung homologer Oozyten und die Fixierung und Lagerung der Spermien-Eizell-Komplexe bis zur Bewertung (Ström Holst et al., 2001).

Auch der HZT ist als diagnostischer Test zur Untersuchung des Fertilitätsstatus und zur Bewertung kryokonservierten Hundespermas nach dem Auftauen geeignet (Ivanova et al., 1999; Mayenco-Aguirre und Pérez Cortéz, 1998). Dieser Test ermöglicht den Vergleich der Bindungskapazität von zwei unterschiedlichen Spermaproben. Beim HZA werden die von der ZP umgebenen Eizellen geteilt, eine der Hemizonae wird mit Sperma eines in der Regel fertilen Kontrolltieres, die andere mit Sperma eines Testtieres inkubiert. Im Anschluss wird jeweils die Anzahl der fest an die Hemizona gebundenen Spermien ermittelt und der Hemizona-Index bestimmt ($HZI = \text{Testtier/Kontrolltier} \times 100$) (Burkman et al., 1988; Mayenco-Aguirre und Pérez Cortéz, 1998; Schoysman und Van-der-Zwallmen, 1992; Sigman, 1993). Der Einsatz des HZT in der Humanmedizin wird derzeit diskutiert, da es Hinweise dafür gibt, dass die Spermienbindungskapazität ungleich auf der Eizelloberfläche verteilt ist (Magerkurth et al., 1999). Diese Tatsache steht dem eigentlichen Grundgedanke des Tests entgegen (Ström Holst et al., 2000a).

3.2.2.8.2 Oozyten-Penetrations-Test (OPT)

Die Information über die Fähigkeit von Spermien, homologe Eizellen zu penetrieren, ist bezüglich ihres Fertilisationspotentials aussagekräftiger als die bloße Beurteilung der ZP-Bindung. Um diese Fähigkeit in vitro untersuchen zu können, wurde der Oozyten-Penetrations-Test (OPT) entwickelt. Bei diesem Test erfolgt nach der Co-Inkubation von Spermien mit homologen Oozyten die Untersuchung auf Anwesenheit von dekondensierten Spermienköpfen in den Eizellen (Hewitt et al., 2001).

Hundespermien sind im Gegensatz zu den Spermien der meisten anderen Säugerspezies in der Lage, den Vitellus unreifer Eizellen zu penetrieren. Aus diesem Grund ist es möglich, für den OPT unreife, nicht vorkultivierte Hundeeizellen zu verwenden (Barros und Munoz, 1974; Iwamatsu und Chang, 1972; Mahi und Yanagimachi, 1976; Niwa und Chang, 1975; Overstreet and Bedford, 1974; Overstreet und Hembree, 1976). Dies erlaubt die schnelle und einfache Durchführung dieses Tests (Hewitt et al., 2001). Der OPT wird bereits bei vielen Säugerspezies erfolgreich als Spermienfunktionstest eingesetzt (Andrews et al., 1992; Bedford und Kim, 1993; Codde und Berger, 1995; Fazeli et al., 1993a, b, 1995; Howard und Wildt, 1990; Ivannova und Mollova, 1993; Martinez et al., 1993; Wheeler und Seidel, 1987). Die bisherigen Fertilisationserfolge beim OPT mit Hundespermien waren allerdings nicht mit denen bei anderen Spezies zu vergleichen. Für den Hund gibt es derzeit noch keine Angaben über die Beziehung von Spermaqualität und Penetrationsvermögen in vitro (Hay, 1996; Hay et al., 1997b; Hewitt und England, 1997; Hewitt et al., 2001).

Bei einigen Säugetieren werden zur Beurteilung des Penetrationsvermögens der Spermien zonafreie Hamsteroozyten verwendet. Canine Spermatozoen sind jedoch nicht in der Lage, die Eizellen von Hamstern zu penetrieren (Yanagimachi, 1988b). Es wird vermutet, dass die Ursache hierfür ein differierendes Rezeptorsystem bei caninen Gameten ist (Hewitt und England, 1997).

3.2.2.8.3 In-vitro-Fertilisation (IVF)

Der beste Spermienfunktionstest wäre die Untersuchung ihrer Fähigkeit, homologe Eizellen zu fertilisieren, denn die Formation des männlichen Pronukleus setzt Zonabindung, Oozytenpenetration sowie die Dekondensation des Spermienkopfes voraus. Die In-vitro-Fertilisations-Technik wurde bei einer Reihe von Spezies erfolgreich etabliert (Biggers, 1971; Edwards, 1962, 1965, 1966; Eppig und Schroeder, 1986; Foote und Onuma, 1970). Initiale Studien beim Hund haben zwar gezeigt, dass die In-vitro-Reifung (in vitro maturation = IVM) und die IVF caniner Oozyten möglich ist, der Prozentsatz von Eizellen mit einer Pronukleus-Formation war allerdings gering (Hewitt und England, 1997; Mahi und Yanagimachi, 1976; Shimazu et al., 1992; Yamada et al., 1992, 1993).

3.2.2.8.4 Bereitstellung homologer Oozyten

Um Spermienfunktionstests basierend auf Spermien-Oozyten-Interaktion als Routineverfahren zur Untersuchung von Hundesperma praktikabel zu machen, müssen homologe Eizellen zur Verfügung stehen. Eine mögliche Quelle für Hundeeozyten sind Ovarien, die im Rahmen routinemäßig durchgeführter Ovariohysterektomien (OH) anfallen (Ström Holst et al., 2000b).

Sind Hundeovarien nur unregelmäßig verfügbar, ist ihre Lagerung erforderlich. Eine Kurzzeitlagerung von Ovarien durch Kühlung ist möglich. Die Spermienhaftungs- und die Oozyten-Penetrations-Kapazität bei Kumulus-Oozyten-Komplexen (COC), die von frischen oder für kurze Zeit gekühlt gelagerten Ovarien isoliert wurden, differiert kaum (Hay et al., 1997b). Die Kryokonservierung von Ovarien oder die Aufbewahrung von COC's in Salzlösung stellen weitere mögliche Quellen für canine Oozyten dar (Hay et al., 1997a, b; Ström Holst et al., 2000b). Bei solchen Oozyten war allerdings die Gesamtzahl der Eizellen, an die Spermien gebunden wurden, sowie die Anzahl der pro Eizelle gebundenen Spermien signifikant geringer. Dennoch ist der Einsatz langzeitgelagerter Oozyten beim ZPA und beim HZA möglich (Ström Holst et al., 2000b). Hundeovarien können außerdem in einer Salzlösung gelagert werden, das Tiefgefrieren der Ovarien stellt im Vergleich dazu allerdings die bessere Lagerungsmöglichkeit dar (Mayenco-Aguirre und Pérez Cortéz, 1998; Ström Holst et al., 2000b).

3.2.3 Spermakonservierung

Das Interesse am internationalen Austausch von Hundesperma ist in den vergangenen Jahren stark gestiegen. Die Konservierung von Hundesperma ermöglicht seinen Versand, macht Tiertransporte überflüssig, vermindert das Krankheitsrisiko und senkt die Kosten (England und Ponzio, 1996; Farstad, 1996). Besonders für Züchter in Ländern mit strengen Quarantänenvorschriften eröffnet sich hiermit die Möglichkeit, neues genetisches Material in die Zucht einzubringen (Linde-Forsberg und Forsberg, 1989). Es stehen prinzipiell zwei Methoden der Konservierung von Hundesperma zur Verfügung: die gekühlte Kurzzeitlagerung und die Kryokonservierung, welche die Langzeitlagerung des Spermias ermöglicht.

3.2.3.1 Kurzzeitlagerung von Hundesperma

Die Kurzzeitlagerung von Hundesperma ist bei einer Temperatur von 4 bis 5°C möglich. Das Sperma wird hierbei unmittelbar nach seiner Gewinnung in einem Verdünner mit einer Temperatur von 37 bis 38°C suspendiert (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001c; Province et al., 1984). Die Aufgaben des Verdünners sind der Schutz der Spermien, speziell deren Membranen, vor temperatur- oder transportbedingten Schädigungen, er liefert Nährstoffe, stabilisiert den pH-Wert und gewährleistet während der Lagerung geeignete osmotische Bedingungen (Farstad, 1996; Linde-Forsberg, 1991). Die metabolische Aktivität der Spermien bedingt ein Absinken des pH-Wertes und damit eine verminderte Überlebensrate und Fertilität der Spermien. Deshalb werden in Spermaverdünnern Puffersysteme eingesetzt (England, 1993). Der optimale pH-Wert für die Spermien der meisten Säugetiere liegt nahe dem Neutralwert (Watson, 1990). Der durchschnittliche pH-Wert der zweiten Fraktion des Ejakulates beim Rüden beträgt ca. 6,3, die maximale Motilität von Hundespermien bleibt im pH-Bereich von 7,0 bis 8,5 erhalten (Wales und White, 1958). Zum Schutz vor Bakterienwachstum werden den Verdünner Antibiotika zugesetzt (Feldman und Nelson, 1996b).

Gebräuchliche Verdünner bei der Kühlung Lagerung von caninem Sperma sind TRIS-gepufferter Eidotter-Verdünner (Gill et al., 1970), Zitrat-Bikarbonat-Eidotter-, Caprogen-Eidotter- und Magermilchverdünner (Province et al., 1984), sterilisierte homogenisierte Milch, Zitrat-Eidotter- (Christiansen, 1984), TRIS-Fruktose-, TRIS-Glukose-, TRIS-BES- oder EDTA-Verdünner (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001c). Darüber hinaus sind für Hundespermien einige kommerzielle Verdünner wie z.B. EYC (Fresh Plus Extender, Edwards Agri Sales Inc., Baraboo, WI), Green-Extender (IMV, International Corp., L'Aigle Cedex, France), Fresh-phos (IMV, International Corp., L'Aigle Cedex, France) und Biladyl (Minitube GmbH, Tiefenbach, Germany) erhältlich (Bouchard et al., 1990; Iguer-Ouada und Verstegen, 2001c). TRIS-Zitrat-Puffer eignen sich für die gekühlte Lagerung von Hundespermien sehr gut (Rota et al., 1995). Verdünner, die Eidotter enthalten, sind für die Erhaltung der Motilität am besten geeignet. Beim Vergleich verschiedener Eidotter-Verdünner (TRIS, Rahm, Milch) erwies sich Eidotter-TRIS-Verdünner bezüglich der Erhaltung der Spermienmotilität als am geeignetsten. Der Anteil motiler Spermien lag nach

viertägiger Lagerung noch über 50 %, während er bei anderen Verdünnern unter 30 bzw. unter 10 % abfiel (Bouchard et al., 1990; Rota et al., 1995). Auch bei kommerziellen Verdünnern bewirkte die Zugabe von 20 % (v/v) Eidotter die Verbesserung der Erhaltung der Spermienmotilität (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001c). Bezüglich der Plasmamembranintegrität (untersucht mit C-FDA/PI und HOS) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Verdünnern festgestellt, sie lag auch nach vier Tagen Lagerung noch zwischen 70 und 90 % (Rota et al., 1995).

Im Anschluss an die Verdünnung des Spermas erfolgt die langsame Abkühlung auf 4 bis 5°C über eine Dauer von 30 bis 60 Minuten. Dabei muss eine zu schnelle Temperaturveränderung vermieden werden (Feldman und Nelson, 1996b). Dies ist möglich, indem ein verschlossenes Gefäß, welches das verdünnte Sperma enthält, in einem mit Wasser gefüllten Glaszylinder in einen Kühlraum (4 bis 5°C) gestellt wird. Das Wasser im Glaszylinder schützt vor einem zu schnellen Temperaturabfall (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001c; Linde-Forsberg und Forsberg, 1993). Beim Vergleich der Auswirkung unterschiedlicher Abkühlraten auf verschiedene Parameter von Hundespermien während einer Lagerungsdauer von 120 Stunden bei 4°C, waren die Gesamtmotilität und die progressive Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien bei einer Abkühlrate von -1,0 oder -0,3°C pro Minute besser als bei der langsameren Kühlrate von -0,1°C pro Minute (Bouchard et al., 1990).

In den meisten Untersuchungen erfolgte die Beurteilung der Parameter von kurzzeitkonservierten Hundespermien nach einer Lagerungsdauer von vier bis fünf Tagen (Bouchard et al., 1990; Province et al., 1984; Rota et al., 1995). Iguer-Ouada und Verstegen (2001c) beurteilten den Effekt von unterschiedlichen Verdünnern (Biladyl, Green-Extender, Fresh-phos mit und ohne Zugabe von 20 % Eidotter; TRIS-Glukose; TRIS-Fruktose; EDTA; TRIS-BES) auf verschiedene Parameter gekühlter Samenproben für eine längere Zeitdauer. Bei der Verwendung von TRIS-Glukose-Eidotter-Verdünner war selbst nach 13 Tagen noch ein Anteil von 50 % progressiv motiler Spermien zu beobachten. Bezüglich der Akrosomenintegrität erwies sich dieser Verdünner ebenfalls als am geeignetsten (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001c) (Tabelle 10). Im Anhang (7.1) ist die Zusammensetzung gebräuchlicher Verdünnern für die gekühlte Lagerung von Hundesperma zusammengefasst.

Tab. 10: Dauer der Erhaltung eines Anteils von mindestens 50 % progressiv motiler Hundespermien bei gekühlter Lagerung (nach Iguer-Ouada und Verstegen, 2001c)

Verdüner	Erhaltung einer progressiven Motilität von mindestens 50 % (Tage)	
	Ohne Eidotterzugabe	20% Eidotterzugabe
Biladyl	3,2	8,5
Green-Extender	2,9	5,4
Fresh-phos	2,3	5,2
TRIS-Glukose	-	13,0
TRIS-Fruktose	-	9,7
EDTA	-	4,0
TRIS-BES	-	3,6

Von einigen Firmen werden kommerzielle Verdüner und Transportsysteme speziell für canines Sperma angeboten (Douglas-Hamilton et al., 1984; Katila et al., 1997; McKinnon und Walker, 1998; Pinto et al., 1999). Goodman und Cain (1993) untersuchten retrospektiv die Konzeptionsrate und die Wurfgrößen, nach der artifiziellen Insemination mit gekühltem Sperma, das mit dem kommerziellen "Kit Fresh Express, International Canine Genetics" versandt wurde. Pinto et al. (1999) testeten das für Hengstsperma entwickelte System "Lane STS" auf seine Eignung für Hundesperma. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschied der Trächtigkeitsrate im Vergleich zur Besamung mit frischem Sperma (Goodman und Cain, 1993; Pinto et al., 1999) (Tabelle 11).

Tab. 11: Trächtigkeitsraten und Wurfgröße nach intravaginaler Insemination mit gekühltem (kommerzielle Kühl- und Transportsysteme) bzw. frischem Hundesperma

Spermaart	Anzahl besamter Hündinnen	Trächtigkeitsrate (%)	Durchschnittliche Wurfgröße	Quelle
Gekühltes Sperma	67	78	5,8	Goodman und Cain, 1993
Gekühltes Sperma	20	95	7,1	Pinto et al., 1999
Frisches Sperma	18	94	7,2	

3.2.3.2 Kryokonservierung von Hundesperma

Durch die Entwicklung geeigneter Kryokonservierungsmethoden für Sperma wurde dessen Langzeitkonservierung möglich. Die Resistenz caniner Spermien gegenüber dem Einfrieren scheint im Vergleich zu anderen Spezies relativ gering zu sein (Tsutsui et al., 2000a). Charakteristisch für kryokonservierte Hundespermien ist ihre kurze Lebensspanne nach dem Auftauen, die maximal 24 Stunden beträgt (Badinand et al., 1993).

Das am häufigsten bewertete Kriterium bei kryokonservierten Hundespermien nach dem Auftauen ist die Motilität, wobei ihre eindeutige Relation zur Fertilität bei Haushunden nicht nachgewiesen wurde (Kosiniak et al., 1992; Rota et al., 1997; Thomas et al., 1993). Bei der artifiziellen Insemination sollten nur tiefgefrorene (TG) Samenproben zum Einsatz kommen, bei denen der Anteil progressiv vorwärtsbeweglicher Spermien nach dem Auftauen bei mindestens 50 bis 60% liegt (Farstad und Andersen Berg, 1989; Morton und Bruce, 1989). Die Motilität von gefrierkonservierten Hundespermien fällt 30 bis 60 Minuten nach dem Auftauen stark ab (Battista et al., 1988; Olar, 1984; Peña et al., 1998a). Nach drei bis vier Stunden Inkubation bei 37 bis 39°C ist ihr Anteil an progressiv vorwärtsbeweglichen Spermien häufig geringer als 10 % (Olar, 1984; Peña et al., 1998a; Rota et al., 1997).

Die Minimalanforderung an die Qualität von gefrierkonserviertem Hundesperma nach dem Auftauen ist ein Anteil von 50 % morphologisch normaler Spermien (Dobrinski et al., 1993; Morton und Bruce, 1989). Die Informationen über den Einfluss der einzelnen morphologischen Anomalien auf die Fertilität von Rüden und die Eignung ihres Spermas zur Kryokonservierung sind sehr begrenzt. Eine Aussage bezüglich der Eignung individueller Ejakulate für die Gefrierkonservierung ist somit sehr schwer möglich (Morton und Bruce, 1989). Da morphologisch anomale Spermien generell eine geringere Motilität aufweisen, besteht die Möglichkeit, dass bestimmte morphologische Spermienanomalien zu einem schlechten Einfrierverhalten führen. Da aber in allen Hundeejakulaten Spermien mit unterschiedlichen Anomalien enthalten sind, ist die Prognose schwer (Morton und Bruce, 1989). Morphologische Anomalien sind bei caninen Spermien häufig im Bereich des Mittelstücks zu beobachten, in den meisten Fällen handelt es sich hierbei um proximale

Zytoplasmatrophen (Dobrinski et al., 1993; Morton und Bruce, 1989). Morton und Bruce (1989) berichteten über einen subfertilen Rüden (Konzeptionsrate ca. 52 %) in dessen Ejakulat der Anteil von Spermien mit persistierenden proximalen Zytoplasmatrophen sehr hoch war. Die Spermienmotilität bei Samenproben dieses Tieres lag vor den Einfrieren bei ca. 90 %, nach dem Auftauen nur bei 40 % (Morton und Bruce, 1989). Dies ist ein Hinweis darauf, dass Hundespermien mit proximalen Zytoplasmatrophen verminderte Kryoresistenz besitzen. Der nachteilige Effekt der proximalen Zytoplasmatrophen könnte an ihrem Gehalt an hydrolytischen Enzymen liegen. Kommt es während der Einfrier-Auftau-Prozesse zur Ruptur der Tropfenmembran, werden im Kopf-Hals-Bereich der Spermien hohe Konzentration dieser Enzyme frei und somit kann es in diesem Bereich zur Schädigung kommen. Nach Meinung anderer Autoren wird die geringe Einfrierresistenz von Hundespermien hauptsächlich durch die Schädigung des Akrosoms während des Auftauens verursacht (Tsutsui et al., 2000a).

In der Mehrheit der Berichte über die Gefrierkonservierung von Hundesperma wurden Methoden, die für andere Spezies etabliert wurden, adaptiert (Foote, 1964; Andersen, 1972a; Davies, 1982; Yubi, 1984). Bei vielen Studien erfolgte nach dem Auftauen ausschließlich die Bewertung der Motilität der Samenzellen. Erst bei jüngeren Untersuchungen wurden außerdem die Thermoresistenz und die Akrosomenintegrität der Spermien beurteilt (Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Peña et al., 1998a, b; Rota et al., 1997; Tsutsui et al., 2000a, b). Unterschiedliche Einfrier- und Auftau-Protokolle sowie die Verwendung verschiedener Versuchsparameter (Spermienqualität, Zahl der Inseminationen, Besamungszeitpunkt, Inseminationstechnik) erschweren den Vergleich von Daten einzelner Forschungsgruppen erheblich (Oettlé, 1986; Oettlé und Soley, 1988; Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Rota et al., 1997, 2001; Ström et al., 1997).

3.2.3.2.1 Spermaverdünner für die Kryokonservierung caniner Spermien

Der erste Schritt bei der Kryokonservierung von Sperma ist die Verdünnung. Beim Einfrieren und Auftauen von lebenden Zellen sind die Erhaltung der Osmolarität, des pH-Wertes und der Ionenkräfte von großer Bedeutung, außerdem sollte den Zellen eine Energiequelle geliefert und ein Schutz vor Schaden durch das Einfrieren

gegeben werden (England, 1993). Die verwendeten Verdüner zur Kryokonservierung von Hundespermien sind oft eine Modifikation der bei Rindern eingesetzten Basisverdünner (England, 1993). So kamen modifizierte Magermilch- (Martin, 1963b; Takeishi et al., 1976), Glukose-Phosphat- (Løfstedt, 1956), Zitrat- (Harrop, 1962), Chlorid-Phosphat- (Wales und White, 1963), Laktose- (Seager, 1969), TRIS- (Gill et al., 1970) und TRIS-Fruktose-Zitrat-Verdüner (Andersen, 1972a, b, 1975; Foote, 1964; Morton, 1988) zum Einsatz. Viele der derzeit auf diesem Gebiet arbeitenden Forschungsgruppen verwenden TRIS-Fruktose-Puffer bzw. modifizieren ihn durch die Substitution von Glukose oder die Zugabe nicht-penetrierender Disaccharide wie Sucrose und Laktose, die gute kryoprotektive Eigenschaften besitzen und einen günstigen osmotischen Effekt haben (England, 1992; Farstad, 1984a; Ivanova-Kicheva et al., 1992, 1995; Linde-Forsberg und Forsberg, 1989; Nöthling et al., 1995; Olar, 1984; Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Thomas et al., 1993; Tsutsui et al., 2000a, b; Wilson, 1993).

Der optimale pH-Wert für Verdüner zur Kryokonservierung von Hundespermien wurde bislang nur für Pipes Puffer bestimmt. Hier wurde die beste Motilität nach dem Auftauen bei einem pH-Wert von 7,0 erreicht. Die Puffersysteme im Verdüner sollten den pH-Bereich von 6,9 bis 7,1 abdecken (England, 1993). TRIS-Zitrat-Puffer scheint sich für das Einfrieren von caninem Sperma besser zu eignen als andere Puffersysteme (Thomas et al., 1993). England (1992) bevorzugte eine Mischung aus TRIS und TES, stellte aber fest, dass reiner TRIS-Puffer bei einigen Hunden besser geeignet ist (Farstad, 1996). In einer Untersuchung von Rota et al. (2001) war die Vitalität von gefroren-aufgetauten Hundespermien nach 120-minütiger Inkubation bei 37°C signifikant höher, wenn der TRIS-Glukose-Zitrat-Puffer im Verdüner komplett durch Magermilch ersetzt wurde. Eventuell sind Magermilchproteine dem Puffer-pH-Wert besser angepasst und liefern so der Spermienmembran Schutz vor dem Kälteschock (Rota et al., 2001; Watson, 1990). Viele kommerzielle Gesellschaften haben eigene Puffersysteme wie Biophos W 482 (IMV, L'Aigle, France), Laiciphos 478 (IMV, L'Aigle, France), C.L.O.N.E. (Pennsylvania, USA) ICG, Pennsylvania, USA), Triladyl (Minitube, Tiefenbach, Germany) und TES/TRIS (Sigma) für die Gefrierkonservierung von caninem Sperma entwickelt (Farstad, 1996; Silva und Versteegen, 1995; Silva et al., 1995). Die genaue Zusammensetzung vieler dieser kommerziell erhältlichen Verdüner ist oft nicht bekannt. Triladyl (Minitube,

Tiefenbach, Germany) enthält TRIS als Puffer (Nöthling et al., 1995).

Ein regelmäßiger Bestandteil von Spermaverdünnern ist Eidotter. Es wird angenommen, dass das in ihm enthaltene Phosphatidylcholin (Lezithin) die Zellmembranen schützt, indem es den Phospholipidverlust während der Abkühlung ausgleicht (Blackshaw, 1954; Hammerstedt et al., 1990; Quinn et al., 1980; Watson, 1981; Watson und Plummer, 1985). Die Verdünner für Hundesperma enthalten häufig einen Eidotteranteil von 20 % (Andersen, 1972a; Farstad und Andersen Berg, 1989; Ferguson et al., 1989; Linde-Forsberg und Forsberg, 1989; Morton, 1988; Rota et al., 1998; Silva und Verstegen, 1995). Der Vergleich verschiedener Eidotterkonzentrationen (5, 10 bzw. 20 %) zeigte, dass ein Anteil von 20 % günstiger ist als 5 %, tendenziell war dieser Effekt auch bei 10 % Eidotter zu beobachten (Davies, 1982). Da Eidotter neben seiner Schutzfunktion auch nutritive Eigenschaften hat, ist seine geeignetste Konzentration im Verdünner wahrscheinlich auch von der Pufferkapazität des verwendeten Systems abhängig (Farstad, 1996) (Tabelle 12).

Tab. 12: Eignung verschiedener Verdüner zur Kryokonservierung von Hundesperma

Verdüner	Bewertung	Ergebnis
Eidotter (20 %)-TRIS Eidotter (20 %)-Laktose	Motilität nach dem Auftauen und nach 0,5 Stunden Inkubation bei 37°C (mikroskopische Bestimmung), Fertilität nach intravaginaler AI	Eidotter-(20 %) TRIS- Verdüner war am geeignetsten. (Olar et al., 1989)
Eidotter (20 %)-TRIS-Zitrat (TC) Eidotter (20 %)-BES-Laktose (BL)	Progressive Motilität nach dem Auftauen (mikroskopische Bestimmung)	Die progressive Motilität war nach dem Auftauen bei TC- höher als bei BL-Verdüner. (Thomas et al., 1993)
Triadyl-Eidotter (20 %) Pipes-Eidotter (20 %) IMV-Eidotter (16 %) TRIS-Fruktose-Zitrat-Eidotter (20 %)	Progressive Motilität und Geschwindigkeit nach dem Auftauen (mikroskopische Bestimmung)	Es wurde kein Unterschied der Progressive Motilität nach dem Auftauen bei den vier Verdünnern festgestellt. (Dobrinsky et al., 1993)
Laiciphos-Eidotter (20 %) TRES/TRIS-Eidotter (20 %) Biociphos-Eidotter (20 %)	Motilität, Anteil lebender und morphologisch normaler Spermien nach dem Auftauen (mikroskopische Bestimmung), Fertilität nach artifizierlicher Insemination (AI)	Mit den untersuchte Spermiencharakteristika war Beurteilung der Fertilität im Vergleich zur AI nicht genau. (Silva und Verstegen, 1995)
TRIS-Glukose-Zitrat zu 0, 50 oder 100 % durch Magermilch ersetzt (je mit 20 % Eidotter, 5 % Glyzerin, 0,25 % SDS)	120 Minuten Inkubation bei 37°C, Beurteilung der Motilität (mit "HTR-IVOS10 Analyzer")	Die Vitalität war bei komplettem Ersatz des Puffers durch Magermilch signifikant höher. (Rota et al., 2001)

Zum Schutz der Spermien vor Einfrierschäden werden Kryoprotektiva eingesetzt. Kryoprotektive Substanzen können in zwei Gruppen unterteilt werden:

- Substanzen wie Glycerin, Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Methanol, welche die Zellen penetrieren und über die Bindung von Wasser wirken;
- Substanzen wie Proteine, verschiedene Zucker oder Polyvinylpyrrolidon, die im Extrazellulärraum bleiben und dort durch ihre osmotische Wirkung die Zelle während des Einfrierens vor zu starker Dehydratation schützen (Mazur et al., 1970).

Bei Hundespermien kommt am häufigsten Glycerin als Kryoprotektivum zum Einsatz (Peña et al., 1998a). In einigen Studien wurden Glycerin und DMSO bezüglich ihrer Eignung als kryoprotektive Agenzien für das Einfrieren von Sperma dieser Spezies verglichen. DMSO allein war bezüglich der Spermienmotilität nach dem Auftauen weniger effektiv als Glycerin, im Kombination war die Wirkung nicht besser als die von Glycerin allein (Olar et al., 1989; Rohloff et al., 1978). Die optimale Glycerinkonzentration im Verdünner ist abhängig von der Einfrierrate, denn bei niedrigeren Glycerinkonzentrationen sind schnellere Einfrierraten erforderlich (England, 1993). Die geeignete Konzentration richtet sich außerdem nach der Toxizität der Kryoprotektiva (Peña et al., 1998a). Die optimale Konzentration stellt somit einen Kompromiss zwischen protektiver und toxischer Wirkung dar (Watson, 1979). Die Toxizität von Glycerin variiert bei den unterschiedlichen Spezies beträchtlich. Es ist bisher nicht abschließend geklärt, welche Glycerinkonzentration am günstigsten für die Kryokonservierung von Hundesperma anzusehen ist (Peña et al., 1998a). Die in den verschiedenen Untersuchungen verwendeten Konzentrationen reichen von 2 bis 16 % (Concannon und Battista, 1989). Einige Autoren berichteten über gute Ergebnisse beim Einsatz von 2 bis 5 % Glycerin (Motilität nach dem Auftauen: 30 bis 60 %), andere erzielten bei der Verwendung von 8 bis 11 % ebenfalls gute Ergebnisse (Motilität nach dem Auftauen: 40 bis 70 %) (Foote, 1964; Lees und Castleberry, 1977; Olar, 1984; Olar et al., 1989; Platz und Seager, 1977; Peña et al. 1998a; Province et al., 1984; Rota et al., 1998; Smith, 1984) (Abbildungen 1 und 2). Bei der Mehrzahl der Untersuchungen, bei denen akzeptable Trächtigkeitsraten erzielt wurden, kamen Glycerinkonzentrationen von 4 bis 8 % zum Einsatz (Farstad und Andersen Berg, 1989; Ferguson et al., 1989; Province et al., 1984; Rota et al., 1999; Wilson, 1993).

Abb. 1: Einfluss der Glycerinkonzentration auf die Motilität gefroren-aufgetauter Hundespermien nach ihrer Inkubation bei 39°C (nach Peña et al., 1998a)

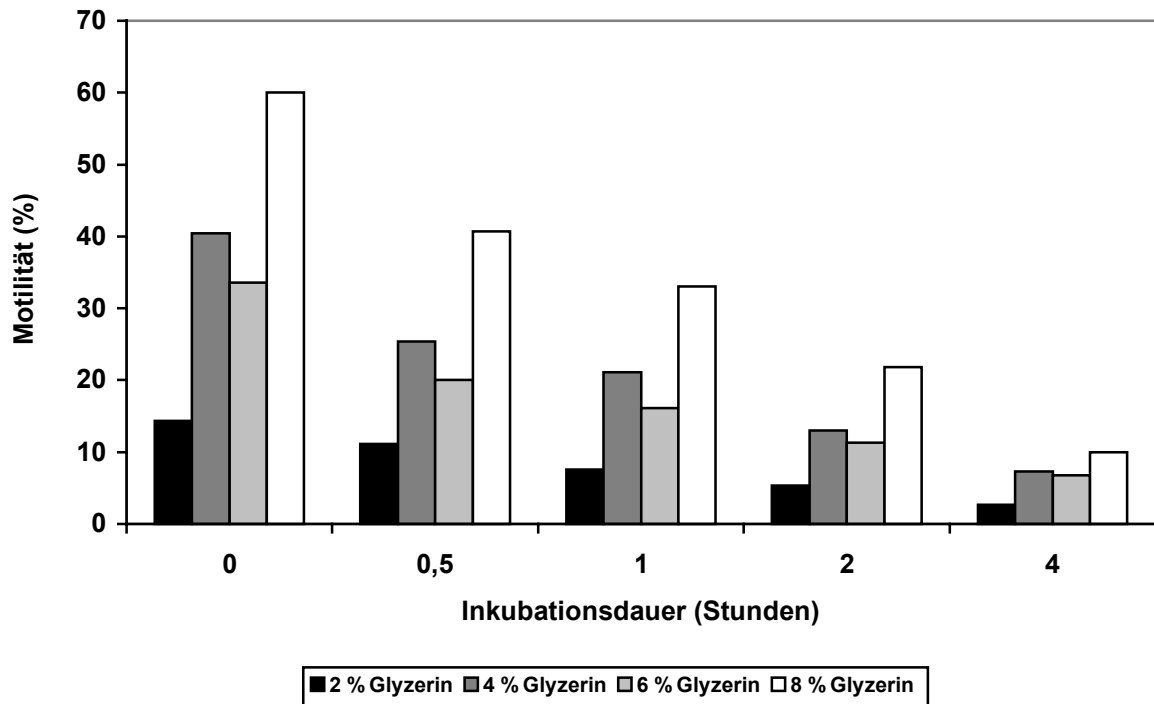
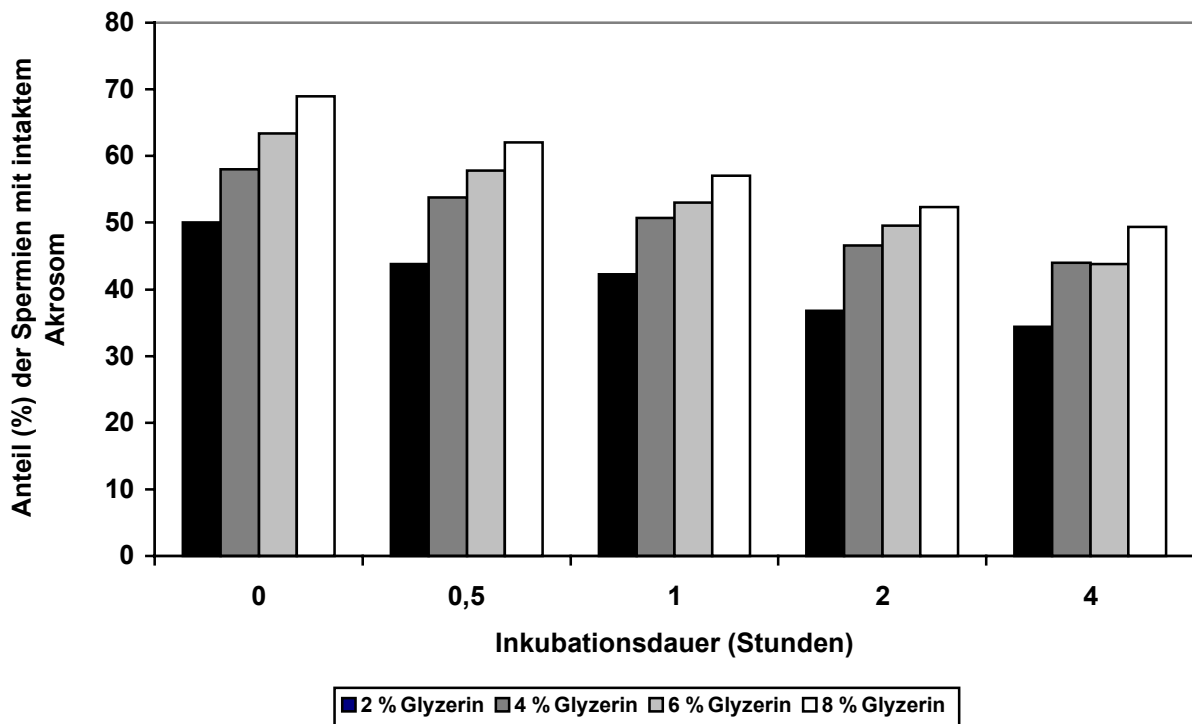


Abb. 2: Einfluss der Glycerinkonzentration auf die Akrosomenintegrität von gefroren-aufgetauter Hundespermien nach Inkubation bei 39°C (nach Peña et al., 1998a)



Peña et al. (1998a) stellten fest, dass die Temperatur (37°C, 4°C) bei der Glycerinzugabe oder der Zeitpunkt der Zugabe nach der Abkühlung des Hundespermas (eine oder zwei Stunden bei 4°C) keine Auswirkung auf die Spermienparameter nach dem Auftauen hatten. Vorteilhaft für das Überleben der Spermien, ihre Motilität, Plasma- und Akrosomenintegrität kann die stufenweise Verdünnung vor dem Einfrieren mit ansteigenden Glycerinkonzentrationen (3 % Glycerin im ersten, 7 % im zweiten Verdünner, 5 % Endkonzentration) sein (Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Rota et al., 2001). Martin (1963b) berichtete von einer besseren Spermienmotilität, wenn das Glycerin nach dem Auftauen entfernt wurde. In späteren Untersuchungen wurde diese Beobachtung allerdings nicht bestätigt (England, 1993) (Tabelle 13).

Tab. 13: Eignung verschiedener Glycerin- und DMSO-Konzentrationen im Verdünner bei der Kryokonservierung von Hundesperma

Verdünner	Bewertung	Ergebnis
0, 2, 4, 6 % (v/v) Glycerin in Kombination mit 0, 2, 4 % (v/v) DMSO	Motilität nach dem Auftauen und nach 0,5 Stunden Inkubation bei 37°C, Fertilität nach intravaginaler Insemination	2 bis 4 % Glycerin erwies sich als am geeignetsten, DMSO hatte werde allein noch mit Glycerin einen positiven Effekt. (Olar et al., 1989)
3 und 5 % Glycerin	Motilität nach dem Auftauen, Membranintegrität während fünfstündiger Inkubation bei 38°C (nach 1, 2, 3, 5 Stunden untersucht)	Die höhere Glycerinkonzentration war bezüglich des Anteils lebender und motiler Spermien sowie ihrer Überlebensrate günstiger. (Rota et al., 1998)
2, 4, 6, 8 % Glycerin, Zugabe bei 37°C oder 4°C	Progressive Motilität nach dem Auftauen, lebend/tot Verhältnis und Akrosomenintegrität während Inkubation bei 39°C (nach 0, 0,5, 1, 2, 4 Stunden untersucht)	8 % Glycerin war für die Spermienparameter am günstigsten. Es zeigte sich kein Unterschied bezüglich des Zeitpunkts der Glycerinzugabe. (Peña et al., 1998a)

Bei der Kryokonservierung von Sperma verschiedener Tierarten hat sich gezeigt, dass die Zugabe von Equex STM Paste oder Orvus ES Paste zum Verdünner einige Spermiencharakteristika nach dem Auftauen verbesserte (Peña und Linde-Forsberg, 2000a). Beim Einfrieren der Spermien von Ebern (Pursel et al., 1978), Bullen (Arriola und Foote, 1987), Hengsten (Martin et al., 1979) und Mäusen (Penfold und Moore, 1993) bewirkten diese Substanzen eine Erhöhung der Spermienmotilität (Arriola und Foote, 1987; Martin et al., 1979) und der Akrosomenintegrität (Arriola und Foote, 1987; Pursel et al., 1978) sowie eine Verbesserung der Fertilität in vivo (Pursel et al., 1978; Martin et al., 1979) und in vitro (Penfold und Moore, 1993).

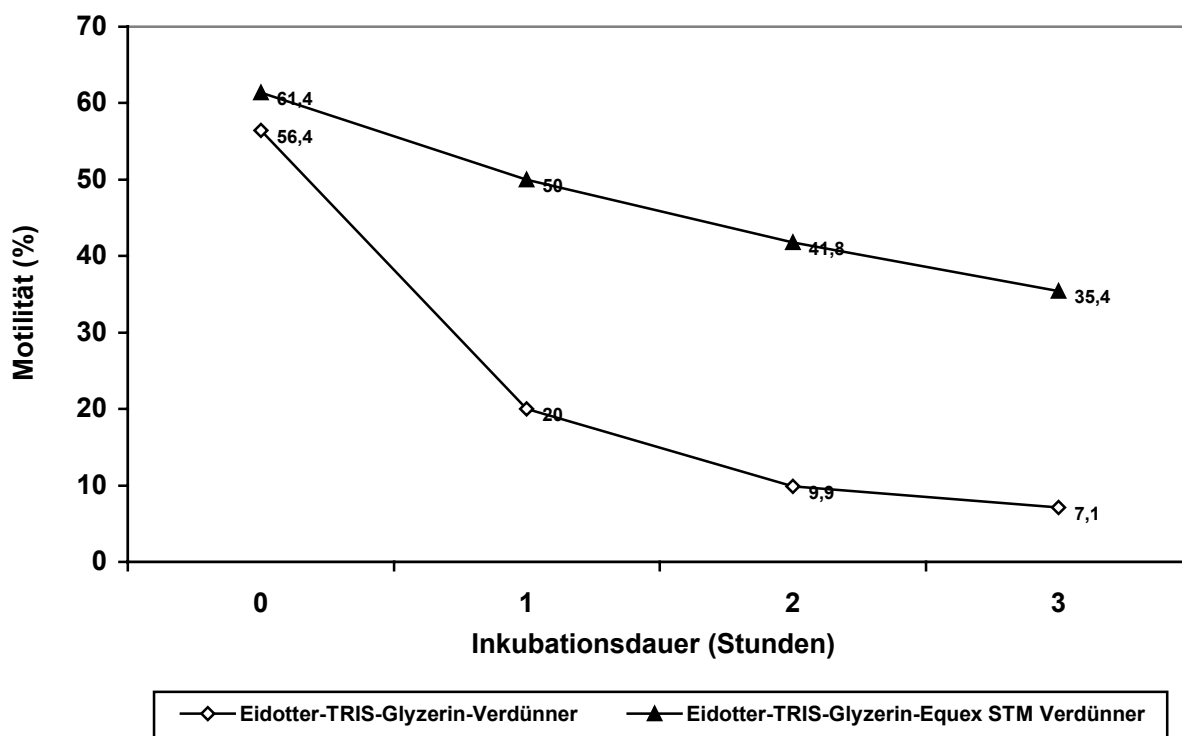
Die aktive Komponente von Equex STM Paste und Orvus ES Paste (OEP) ist Natriumdodecylsulfat (SDS), ein wasserlösliches Anionendetergenz mit grenzflächenaktiven Eigenschaften, das die Oberflächenspannung von Wasser stark herabsetzt, Membranproteine denaturiert und in hohen Konzentrationen biologische Membranen komplett auflöst (Fontbonne und Bandidand, 1993b; Helenius et al., 1979). Der Wirkungsmechanismus von SDS bei der Gefrierkonservierung von Spermien ist nicht ganz klar. Es wird angenommen, dass es indirekt im extrazellulären Medium, möglicherweise durch die Modifikation der Tertiärstruktur der Eidotter-Lipidproteine, wirkt (Battista et al., 1988; Peña et al., 1998a; Pursel et al., 1978). Andere Überlegungen gehen dahin, dass der positive Effekt von SDS durch seinen direkten Einfluss auf die Plasmamembran zustande kommt (Mann, 1964). SDS-Zugabe ohne die Anwesenheit von Eidotter führt allerdings zur Reduktion der Überlebensfähigkeit der Spermien (Pursel et al., 1978).

Auch bei Hundespermien führte die Anwesenheit von Equex STM Paste bzw. OEP im Verdünner zu einer Verbesserung der Ergebnisse der Kryokonservierung (Palacios et al., 1992; Rota et al., 1997; Williams, 1920). Sowohl der Anteil lebender Spermien als auch deren Überlebensrate nach dem Auftauen stiegen bei der Anwesenheit von 0,5 % Equex STM Paste im Verdünner deutlich an (Thomas et al., 1992; Rota et al., 1997) (Tabelle 14; Abbildung 3). Außerdem wurden die Gesamtmotilität, die Motilitätscharakteristika und die Membranintegrität der Spermien nach dem Auftauen positiv beeinflusst (Peña und Linde-Forsberg, 2000a).

Tab. 14: Einfluss der Anwesenheit von Orvus ES Paste (OEP) auf die Parameter gefroren-aufgetauter Hundespermien (nach Tsutsui et al., 2000b)

	Frisches Sperma	Gefroren-aufgetautes Sperma	
		ohne OEP	mit OEP
Motilität (%)	93,0	17,0	27,0
Vitalität (%)	93,0	48,5	59,7
Lebende mit Akrosom (%)	68,0	10,8	42,8

Abb. 3: Einfluss von Equex STM-Paste auf die Motilität von gefroren-aufgetauten Hundespermien nach ihrer Inkubation bei 38°C (nach Rota et al., 1997)



Bei der intravaginalen Deponierung von mit Equex STM Paste kryokonserviertem Hundesperma war die Trächtigkeitsrate höher als ohne Equex-Zusatz (Nöthling et al., 1995). OEP zeigte vorteilhaften Einfluss auf die Spermienmotilität, die Überlebensrate und die Integrität der akrosomalen Membran nach dem Auftauen. Konzentrationen von 0,5 bis 1,0 % Equex STM Paste bzw. OEP scheinen sehr geeignet zu sein (Nizański et al., 2001; Rota et al., 1997, 1999; Thomas et al., 1992; Tsutsui et al., 2000b). Beim Vergleich des Einflusses verschiedener SDS-Konzentrationen (0; 0,1; 0,25; 0,5 %, w/v) in TRIS-Fruktose-Eidotter-Verdünner auf

die Vitalität, die Überlebensdauer und die Akrosomenintegrität von gefroren-aufgetautem Hundesperma, erwies sich eine Konzentration von 0,25 % SDS als am geeignetsten (Peña et al., 1998b) (Tabelle 15). Im Anhang (7.1.2) ist die Zusammensetzung gebräuchlicher Verdünner für die Kryokonservierung von Hundesperma zusammengestellt.

Tab. 15: Effekt von Detergenzien im Verdünner bei der Kryokonservierung von Hundesperma

Verdünner	Bewertung	Ergebnis
Equex STM: 0 oder 0,5 %	Motilität, Plasmamembranintegrität unmittelbar nach dem Auftauen und nach 3 Stunden Inkubation bei 38°C	Bei Equex STM waren der Anteil der Spermien mit intaktem Plasmalemma unmittelbar nach dem Auftauen und die Thermoresistenz höher. (Rota et al., 1997)
SDS: 0; 0,1; 0,25; 0,5 %	Vorwärtsbeweglichkeit, Verhältnis lebend/tot, Akrosomenintegrität 0, 0,5, 1, 2, 4 Stunden nach dem Auftauen	Vitalität der Spermien wurden bei Zugabe von 0,25 % SDS gesteigert. (Peña et al., 1998b)
Orvus ES Paste (OEP): 0; 0,5; 0,75; 1 %	Vitalität und Motilität, Überlebensrate bei 20°C nach 0, 1, 2, 3, 4 Stunden	0,5 bis 1 % OEP verbesserte die Überlebensrate der Spermien nach dem Auftauen. (Tsutsui et al., 2000a)
Orvus ES Paste (OEP): 0; 0,5; 0,75; 1 %	Untersuchung des Akrosomenstatus (Tripel-Färbetechnik)	OEP schützte Akrosom deutlich. (Tsutsui et al., 2000b)
Equex STM: 0; 0,5 %	Motilität während Inkubation bei 37°C über 7 Stunden, Plasmamembranintegrität und Akrosomenstatus nach 1, 3, 6 Stunden	Equex STM verbesserte Überlebensrate und Thermoresistenz der Spermien. (Peña und Linde-Forsberg, 2000a)

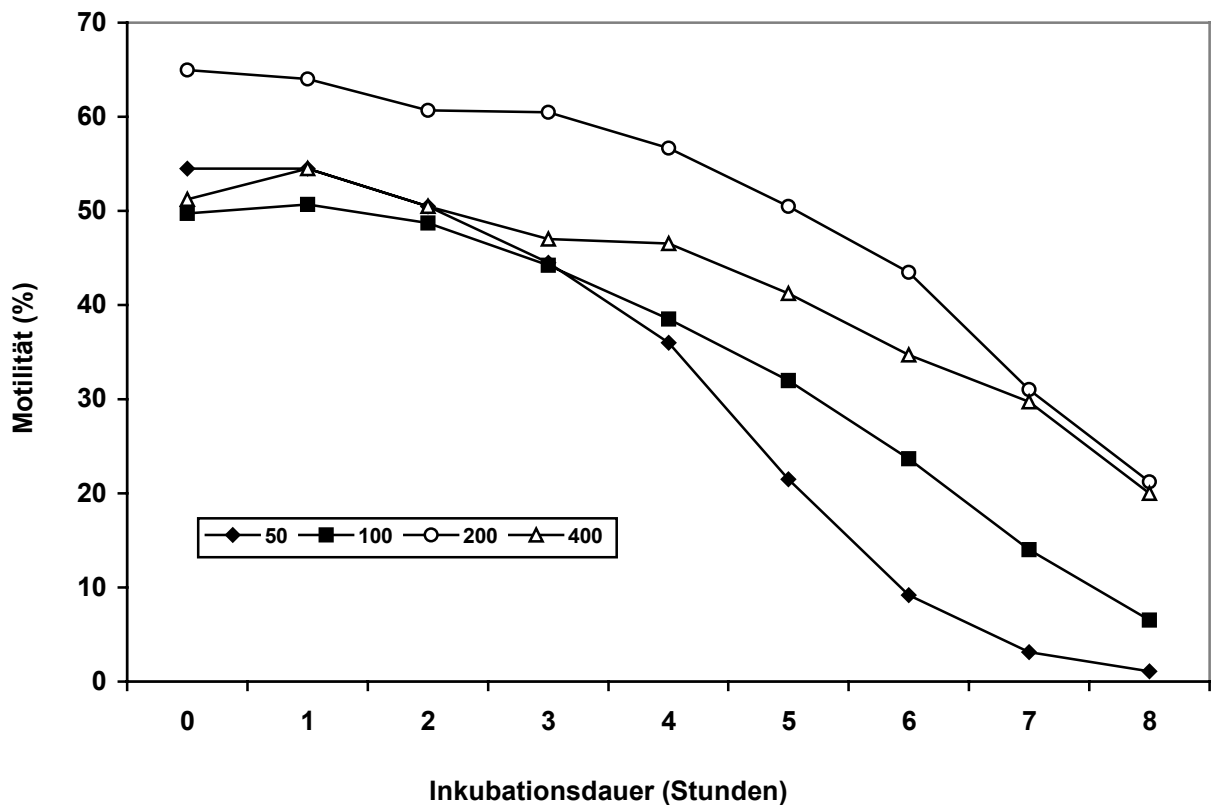
3.2.3.2.2 Einfriertechnologie

Spermaproben von Rüden wurden in Form von Pellets (Battista et al., 1988; Thomas et al., 1993), 0,25, 0,5 und 2,5 ml PVC Straws (Andersen, 1972a, b; Farstad, 1984a; Nöthling et al., 1995; Olar, 1984; Thomas et al., 1993), Ampullen (Martin, 1963a, b; Foote, 1964) oder in 0,25 ml Minitubes (Nizański et al., 2001) eingefroren. Der spezifische Einfluss der Konfektionierung auf die Überlebensfähigkeit und die Fertilität gefroren-aufgetauter Hundespermien ist weitgehend unbekannt (Nizański et al., 2001). Zudem sind die Aussagen der existierenden Studien über das am besten geeignete "Packing-System" teilweise widersprüchlich. Bei vielen früheren Untersuchungen wurde die Pelletmethode angewendet (Seager, 1969; Seager und Fletcher, 1973; Seager und Platz, 1977). Die Verwendung von Straws bietet gegenüber Pellets jedoch einige Vorteile, so sind erstere einfacher zu kennzeichnen, zu lagern und aufzutauen (Olar et al., 1989). Seager und Fletcher (1973) erzielten beim Einfrieren in 0,25 oder 0,5 ml Straws ähnliche Ergebnisse wie mit der Pelletmethode. In einer späteren Studie kamen diese Autoren jedoch zum Ergebnis, dass die Pelletmethode besser geeignet sei (Seager et al., 1975). Davies (1982) konnte keinen Unterschied zwischen beiden Methoden feststellen. Bei einem Vergleich von Pellets, 0,5 ml und 2,5 ml PVC Straws war die progressive Motilität der Spermien beim Einfrieren in Pellets höher (Thomas et al., 1993). Andere Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass bei in 0,5 ml PVC Straws eingefrorenem Hundesperma die Spermienmotilität nach dem Auftauen ähnlich oder besser ist als bei der Pelletmethode (Battista et al., 1988). Der Vergleich von Hundespermien, die in Pellets bzw. 0,25 ml Minitubes eingefroren wurden ergab, dass die Motilität, der Prozentsatz der Spermien mit normalem Akrosom und die Thermoresistenz der Spermien nach dem Auftauen bei der Pelletmethode signifikant höher waren (Nizański et al., 2001). Bei den meisten Arbeitsgruppen ist heute die Verpackung in 0,5 ml Straws am gebräuchlichsten (England und Ponzio, 1996; Hay et al., 1997a, b; Peña et al., 1998a, b; Peña und Linde-Forsberg, 2000a, b; Rota et al., 1997, 1998, 2001; Silva und Verstegen, 1995; Tsutsui et al., 2000a, b).

Das Einfrieren von Hundesperma erfolgt für gewöhnlich in Konzentrationen von 40 bis 200×10^6 Spermien/ml (Dobrinski et al., 1993; Farstad und Andersen Berg, 1989; Fontbonne und Badinand, 1993a, b; Olar et al., 1989; Peña und Linde-Forsberg,

2000a, b; Rota et al., 1997; Silva et al., 1996; Silva und Verstegen, 1995; Ström et al., 1997; Thomas et al., 1993; Wilson, 1993). Umfassende Studien über den Einfluss der Konzentration auf die Fertilität fehlen (Peña und Linde-Forsberg, 2000b). Bei equinen Spermien zeigte sich beim Einfrieren des Spermias in höheren Konzentrationen eine Tendenz zu höheren Trächtigkeitsraten (Leipold et al., 1998). Peña und Linde-Forsberg (2000b) beobachteten die beste Überlebensrate von Hundespermien nach dem Auftauen, wenn sie in einer Konzentration von 200×10^6 Spermien/ml eingefroren worden waren (Abbildung 4).

Abb. 4: Einfluss der Spermienkonzentration (50, 100, 200 bzw. 400×10^6 Spermien/ml) auf die Motilität von gefroren-aufgetauten Hundespermien nach ihrer Inkubation bei 38°C (nach Peña und Linde-Forsberg, 2000b)



Um eine maximale Resistenz gegenüber der Kryokonservierung zu entwickeln, benötigen die Spermien vieler Spezies nach ihrer Verdünnung eine Zeitspanne von mehreren Stunden zur Adaptation. Die Dauer und die Temperatur beim Äquilibrieren haben großen Einfluss auf den Erfolg der Gefrierkonservierung (Osinowo und Salamon, 1976). Ursprünglich wurde vermutet, dass die Adaptationsphase lediglich erforderlich ist, um die Glycerinpenetration in die Samenzellen zu gewährleisten. Bei

Eberspermien wurde jedoch gezeigt, dass diese in einer Zeit von nur 30 Sekunden vorstatten geht (Almlid und Johnson, 1988). Möglicherweise kommt es während des Äquilibrierens zu Veränderungen an der Spermienmembran, die sie widerstandsfähiger gegenüber dem Einfrieren werden lässt (Watson, 1979).

Bei der Kryokonservierung von Hundesperma wurden in der Mehrzahl der Untersuchungen die Kühlungsrate und die Dauer des Äquilibrierens willkürlich gewählt. Olar (1984) konnte bei Proben, die ein, zwei oder drei Stunden äquilibriert waren, keinen Unterschied der Spermienmotilität nach dem Auftauen feststellen. In vielen Labors werden Adaptationszeiten von ein bis vier Stunden bei einer Temperatur zwischen 1°C und 5°C eingehalten (Andersen, 1972a, b; England, 1992; Farstad, 1996; Nizański et al., 2001; Peña und Linde-Forsberg, 2000a, b; Rota et al., 2001; Yubi, 1984).

Nach der Theorie von Mazur (1984, 1985) existiert für alle Zelltypen die optimale Einfrierrate, bei der sie die Kryokonservierung überleben. Fällt die Temperatur unter den Gefrierpunkt des extrazellulären Materials, kommt es zur Eisbildung. Das extrazelluläre Wasser kristallisiert und hinterlässt eine Restlösung mit höherer Konzentration. Die Zellmembran schützt vor der Ausbreitung der Eiskristalle in die Zelle, dadurch kommt es zur Unterkühlung der intrazellulären Flüssigkeit. Im Ergebnis entsteht an der Zellmembran ein osmotischer Gradient, der dazu führt, dass Wasser die Zelle verlässt. Ist die Kühlrate nicht zu schnell und die Zellmembran wasserpermeabel, werden die Zellen progressiv dehydriert und sind nach dem Auftauen lebensfähig. Bei zu schneller Kühlung oder Wasserimpermeabilität der Zellmembran erfolgt die Dehydratation zu langsam, der Grad der intrazellulären Unterkühlung steigt und in der Zelle kann es zur Eisformation und damit zu ihrem Tod kommen (Mazur, 1965). Die Formation von intrazellulärem Eis führt aber nicht unweigerlich zur Zerstörung der Zelle. Sowohl die Menge des gebildeten Eises als auch die Größe der Eiskristalle haben Einfluss auf die Überlebensrate (Farrant et al., 1977). Sind die Eiskristalle klein, können die Zellen nach relativ schnellem Auftauen vital sein. Zu langsames Auftauen würde zum Wachsen der Eiskristalle führen (England, 1993).

Eine schnelle Wasserpermeation durch die Plasmamembran während des Einfrierens und Auftauens kann durch die dabei auftretende starke Reibung zusätzlich zur Schädigung der Zelle führen (Muldrew und McGann, 1994). Durch die thermalen Einflüsse kommt es zur Umorganisation von Lipid und dadurch bedingt zur Veränderung der Membranintegrität (Hammerstedt et al., 1990; Watson, 1995). Durch derartige Störungen kommt es zu einer Verminderung der Fluidität der Membran, einem Anstieg der Membranpermeabilität, zur Akrosomenschädigung, Dehydrierung, Freisetzung von Enzymen und Phospholipiden, zur Reduktion der metabolischen Aktivität sowie zum verminderten ATP-Verbrauch (Hammerstedt et al., 1990).

Bei vielen Spezies, bei denen die routinemäßige Kryokonservierung von Sperma erfolgt, wurden in Abhängigkeit vom eingesetzten Verdünner, der "Packing-Methode" und der Glycerinkonzentration optimale Einfrierraten etabliert (Watson, 1990). Es wird generell angenommen, dass diese Einfrierraten im Bereich von -10 bis -100°C pro Minute liegen, wobei es kaum möglich ist, eine Durchschnittsrate anzugeben, da die Einfrierkurve für gewöhnlich einen sigmoiden Verlauf hat und die Dauer ihrer Plateauphase vom verwendeten Einfrierprotokoll abhängt (Fiser und Fairfull, 1984; Robbins et al., 1976).

Der Einfluss der Einfrierrate bei der Kryokonservierung von Hundesperma wurde noch nicht abschließend geklärt. Auch hier bieten die publizierten Studien teilweise widersprüchliche Ergebnisse (Andersen, 1972a, b; England, 1993; Foote, 1964; Seager, 1969; Seager et al., 1975). In ersten Berichten wurde über gute Ergebnisse bei der Verwendung von hohen Einfrierraten berichtet, in jüngeren Untersuchungen wird hingegen die Auffassung vertreten, dass niedrige Kühlungs- und Einfrierraten bessere Motilitätsresultate liefern (Andersen, 1972a, b; Dobrinski et al., 1993; Farstad, 1984a; Fontbonne und Badinand, 1993b; Foote, 1964; Hay et al., 1997b; Olar, 1984; Wilson, 1993). Rota et al. (1998) konnten keinen Zusammenhang zwischen der gewählten Einfrierrate und der Qualität des Hundespermas nach dem Auftauen feststellen.

Bei der Verwendung von Pellets als Packing-System erfolgt das Einfrieren der Samenproben auf Trockeneisblöcken (Kohlendioxid). Hierbei ist die Einfrierrate nur

schwer zu kontrollieren (England, 1993; Lees und Castleberry, 1977; Platz und Seager, 1977; Seager, 1976, 1969; van Gemert, 1970). Beim Einsatz von Ampullen oder den heute vorwiegend verwendeten Straws, erfolgt das Einfrieren üblicherweise in der Gasphase von Flüssigstickstoff (Andersen, 1972a, b, 1976; Foote, 1964; Gill et al., 1970; Morton, 1988; Nizański et al., 2001; Oettlé, 1986; Peña und Linde-Forsberg, 2000a, b; Rota et al., 2001; Seager et al., 1975; Takeishi et al., 1976). Die Kontrolle der Einfrierrate erfolgt hierbei über die Zeitdauer und die Position der Straws über dem flüssigen Stickstoff (Battista et al., 1988; Christiansen, 1984; Nizański et al., 2001; Oettlé, 1982; Peña und Linde-Forsberg, 2000a, b; Rota et al., 2001; Smith, 1984). Eine Technik, die hierbei häufig zum Einsatz kommt, ist die horizontale Positionierung der Straws in einer Styroporbox für 10 bis 30 Minuten vier bis sechs Zentimeter über dem Flüssigstickstoff (Andersen, 1975; Morton, 1988; Silva und Verstegen, 1995; Ström et al., 1997; Thomas et al., 1993). Eine andere Möglichkeit ist das stufenweise Absenken der Straws vertikal in einen Tank mit Flüssigstickstoff (Tankmethode), was für gewöhnlich in drei Schritten erfolgt (Rota et al., 1997; Ström et al., 1997). Diese Methode ist einfach und schnell und kann unter Feldbedingungen durchgeführt werden (Linde-Forsberg et al., 1999). Bei einem Vergleich beider Methoden waren die Überlebensrate, die Plasmamembran- und die Akrosomenintegrität der Hundespermien nach dem Einfrieren mit der Tankmethode schlechter (Peña und Linde-Forsberg, 2000a). Zur Standardisierung des Einfrierverfahrens von caninem Sperma wäre der routinemäßige Einsatz programmierbarer Einfriergeräte, die eine Kontrolle über die Temperaturabsenkung ermöglichen, von großem Vorteil (Rota et al., 1998).

Es wird angenommen, dass es durch den Auftauprozess, in Verbindung mit dem Wechsel von hypertonen Bedingungen während des Einfrierens zu isoosmotischen Bedingungen beim Auftauen, zur stärkeren Spermenschädigung kommt, als während des Einfrierens (Curry und Watson, 1994; Gao et al., 1992; Holt et al., 1992; Holt und North, 1994; Rota et al., 1998). Die Erwärmungsrate hat wesentlichen Einfluss auf die Motilität der Spermien und die Akrosomenmorphologie. Um eine optimale Überlebensrate der Zellen zu gewährleisten, muss eine der Einfrierrate entsprechende Auftaurate gewählt werden (Hammerstedt et al., 1990; Mazur, 1984; Rota et al., 1998). Es wird angenommen, dass schnelles Einfrieren ein schnelles Auftauen benötigt, um die osmotische Balance zu erhalten und um das Rehydrieren

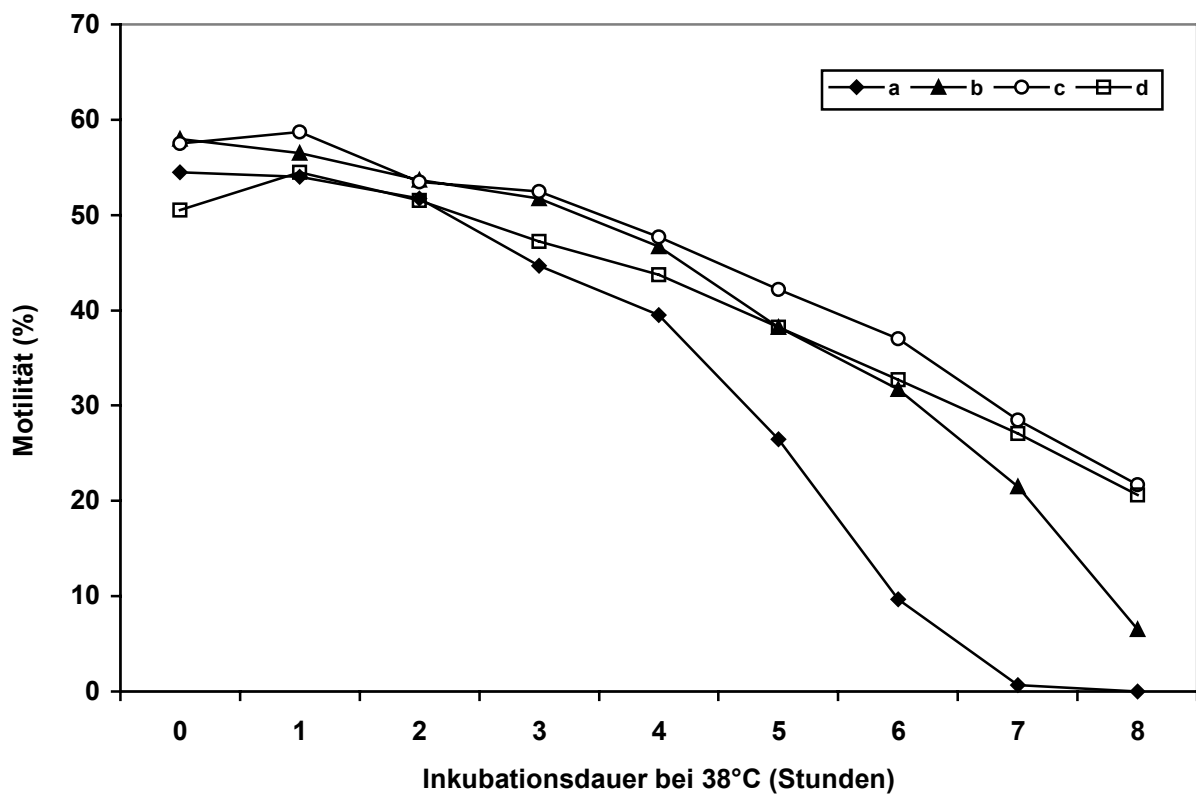
der Zellen sowie die Wiederherstellung der Lipid-Protein-Konfiguration der Plasmamembran zu gewährleisten (Davies, 1982; England, 1992; Olar et al., 1989; Smith, 1984).

Das Auftauen von kryokonserviertem Sperma erfolgt in der Regel durch eine Erwärmung im Wasserbad. Aus praktischen Gründen wird gefrorenes Hundesperma häufig bei einer Temperatur von ca. 37°C aufgetaut, obwohl mehrere Untersuchungen zu dem Ergebnis kamen, dass das Auftauen bei höheren Temperaturen (70° bis 75°C) das Überleben der Spermien und ihre Motilität verbessert (Davies, 1982; England, 1992; Olar, 1984; Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Rota et al., 1998). Durch das Auftauen bei höheren Temperaturen wird möglicherweise der negative Effekt osmotischer Prozesse reduziert. Ebenso könnte ein schnellerer Temperaturanstieg die Zellen vor intrazellulärer Kristallisation schützen und so zur Erhaltung der morphologischen Struktur der Spermien beitragen (Ivanova-Kicheva et al., 1995). Von Bullensperma ist bekannt, dass sich die schnelle Erwärmung vorteilhaft auf die Motilität der Spermien nach dem Auftauen, die Erhaltung des Akrosoms und die Fertilität auswirkt (Almquist et al., 1979; Amdal und Andersen, 1968; Ivanova-Kicheva et al., 1995).

Der Inhalt der aufgetauten Straws kann direkt für die Insemination verwendet werden. Eine andere Möglichkeit ist es, das aufgetaute Hundesperma mit isotonem Medium bei einer Temperatur von 37 bis 38°C zu verdünnen (Linde-Forsberg et al., 1999, Rota et al., 1997, 1998, Ström et al., 1997). Dieses Vorgehen ermöglicht es, das Volumen der Inseminationsdosis zu erhöhen. Das Auftaumedium enthält für gewöhnlich metabolisierbare Substrate und besitzt Pufferkapazität, durch seine Zugabe wird außerdem der toxische Effekt von Glycerin und Equex Paste reduziert (Rota et al., 1997, 1998). Durch die schnelle Reduktion der Glycerinkonzentration im extrazellulären Medium könnte es jedoch zum osmotischen Schock für die Spermien kommen (Hammerstedt et al., 1990). Der Grad des osmotischen Stresses wird somit auch durch die Verdünnungsrate bzw. durch die Geschwindigkeit der Glycerin-Ausverdünnung beeinflusst (Correa et al., 1995, 1996; Nakagata und Takeshima, 1992). Es wird angenommen, dass es auch während des Aufenthalts im weiblichen Reproduktionstrakt nach der künstlichen Besamung mit gefroren-aufgetautem Sperma zu einem derartigen osmotischen Schock kommt (Hammerstedt et al.,

1990). In der Untersuchung von Peña und Linde-Forsberg (2000b) wirkten sich die 1:2 und die 1:4 Verdünnung des Hundespermas nach dem Auftauen vorteilhaft auf die Erhaltung der Motilität der Spermien aus (Abbildung 5).

Abb. 5: Einfluss der Verdünnungsrate von gefroren-aufgetautem Hundesperma in TRIS-Glukose-Eidotter-Verdüner (a=1:0; b=1:1; c=1:2; b=1:4) auf den Anteil progressiv motiler Spermien nach Inkubation bei 38°C (nach Peña und Linde-Forsberg, 2000b)



3.2.3.3 Einsatz von konserviertem Hundesperma in der Zucht

Obwohl die Technologie der Gefrierkonservierung von Sperma und seiner Verwendung bei der künstlichen Besamung etwa 30 Jahre alt ist, hält der Einsatz von kryokonserviertem Sperma in der Hundezucht erst in jüngerer Zeit nach und nach Einzug. Das Hauptproblem beim Einsatz von gefrierkonserviertem Hundesperma ist seine vergleichsweise schlechte Qualität, insbesondere die signifikant reduzierte Überlebensdauer und die reduzierte Motilität der Spermien nach dem Auftauen im Vergleich zu frischem oder gekühlt gelagertem Sperma (England, 1993; England und Ponzio, 1996; Oettlé, 1986; Rota et al., 1999) (Tabelle 16).

Tab. 16: Charakteristika von frischem, gekühlt gelagertem und gefroren-aufgetautem Hundesperma (6 Rüden, je zwei Ejakulate) (nach England und Ponzio, 1996)

	Frisches Sperma	Gefroren-aufgetautes Sperma	Kühlkonserviertes Sperma	
			Tag 0	Tag 10
Konzentration ($\times 10^6/\text{ml}$)	400-900			
Motilität (%)	85-95	45-70	85-90	0-10
Morphologisch normal (%)	80-94	20-32	78-90	0-8
Anteil lebender (%)	82-96	26-52	81-94	18-33
Normales Akrosom (%)	88-95	52-84	84-88	6-18
HOS:				
Geschwollen (%)	89-96	46-73	89-95	24-42
auf 75 % weniger reduziert (Minuten)	140-183	54-76	132-193	0-12
auf 25 % weniger reduziert (Minuten)	410-484	110-156	431-468	0-30

Noch bis vor einigen Jahren waren die Konzeptionsraten bei der artifiziellen Insemination mit gefrierkonserviertem Hundesperma im Vergleich zu anderen Spezies sehr schlecht (England, 1993; Olar, 1984; Ström et al., 1997; Peña et al., 1998a). Die erzielten Trächtigkeitsraten waren wesentlich geringer und die Würfe kleiner als bei der natürlichen Paarung bzw. bei der Verwendung von frischem Sperma (Farstad, 1984a; Lees und Castleberry, 1977; Linde-Forsberg und Forsberg, 1989, 1993; Silva et al., 1996; Wilson, 1993) (Tabelle 17). In jüngeren Studien wurden auch beim Einsatz von kryokonserviertem Sperma akzeptable Konzeptionsraten um die 80 % erreicht, was nah an dem Bereich liegt, der bei natürlicher Paarung möglich ist (Wilson, 1993; Rota et al., 1999). Das liegt vor allem daran, dass Methoden zur genaueren Bestimmung des günstigsten Besamungszeitpunkts und zur intrauterinen Spermadeponierung bei der Hündin entwickelt wurden (Wilson, 2001). Um hohe Trächtigkeitsraten zu erzielen ist es allerdings erforderlich, die Kryokonservierungstechnik für Hundesperma weiter zu verbessern (Rota et al., 1998).

Tab. 17: Trächtigkeitsraten nach Besamung mit frischem bzw. gefrierkonserviertem Hundesperma (retrospektiv ausgewertete Daten des Schwedischen Züchterklubs) (nach Linde-Forsberg und Forsberg, 1989, 1993)

Spermaart	Art der Besamung bzw. Paarung	Anzahl der Hündinnen	Trächtigkeitsrate (%)		Wurfgröße (Durchschnitt)
			Total	korrigiert*	
frisch bzw. gekühlt	Intravaginal	405 ^a	65,7 ^a	83,3 ^a	5,79 ^a
		468 ^b	54,7 ^b	62,3 ^b	
gefrierkonserviert	transzervikal	65 ^a	41,5 ^a	69,3 ^a	4,44 ^a
		59 ^b	39,0 ^b	51,1 ^b	
	Natürliche Paarung	44 ^b	88,6 ^b	90,6 ^b	

* Die Korrektur der Werte unter Berücksichtigung des Zyklusstadium bei der Besamung und der Qualität des Spermas

a: Linde-Forsberg und Forsberg, 1989

b: Linde-Forsberg und Forsberg, 1993

Gekühlt versandtes Sperma wird in der Hundezucht derzeit kryokonserviertem Sperma vorgezogen (Pinto et al., 1999). Die Berichte über die erzielten Trächtigkeitsraten nach der intravaginalen Insemination mit gekühlt gelagertem Hundesperma reichen von 17 bis 95 % (Gill et al., 1970; Goodman und Cain, 1993; Linde-Forsberg, 1995; Pinto et al., 1999; Seager und Fletcher, 1972). Wenn gekühltes Hundesperma nicht vier bis fünf Tage nach seiner Gewinnung verwendet wird, ist kryokonserviertem Sperma der Vorzug zu geben (England und Ponzio, 1996).

3.2.4 Bestimmung des Besamungszeitpunktes

Die natürliche Paarung kann wegen der langen Überlebensfähigkeit der Spermien im Reproduktionstrakt der Hündin auch erfolgreich sein, wenn sie einige Tage vor der Fertilisationsperiode erfolgt (Linde-Forsberg und Forsberg, 1989). Die Bestimmung des optimalen Zeitpunktes für die artifizielle Insemination (AI) bereitet bei der Hündin wegen der variablen Zykluslänge, der geringen zeitlichen Korrelation des Ovulationszeitpunktes, der Duldung des Rüden, des Einsetzens der Vulvaschwellung und des Auftretens seroangiösen Ausflusses einige Probleme (England und

Concannon, 2002; Jeffcoate und Lindsay, 1989; Wilson, 1993).

Um den optimalen Besamungszeitpunkt zu bestimmen ist es von Vorteil, die fertile Periode und die Fertilisationsperiode der Hündin zu definieren. Die fertile Periode ist der Zeitraum, in dem es durch Anpaarung oder Insemination zur Trächtigkeit kommen kann (England und Concannon, 2002; Jeffcoate und Lindsay, 1989). Sie erstreckt sich von drei Tagen vor bis zu sieben Tage nach dem präovulatorischen LH-Gipfel, kann jedoch auch länger sein. Die Fertilisationsperiode ist die Zeit, in der bei der Hündin fertilisierbare Eizellen in den Eileitern verfügbar sind. Bei der Mehrheit der Hündinnen ist dies vom vierten bis siebten Tag nach dem LH-Gipfel der Fall (im allgemeinen zwei bis ungefähr fünf Tage nach der Ovulation). Sieben Tage nach dem LH-Gipfel nimmt die Fertilität für gewöhnlich schnell ab, da die Eizellen degenerieren und die Zervix sich schließt (England und Concannon, 2002).

Die AI sollte bei der Hündin während des Fertilitätsgipfels, nach Möglichkeit während der Fertilisationsperiode durchgeführt werden (England und Concannon, 2002). Bei der Besamung mit TG-Sperma ist, wegen der kurzen Überlebenszeit gefrierkonservierter Hundespermien, die korrekte Bestimmung des günstigsten Inseminationszeitpunktes essentiell (Farstad, 2000a; Farstad und Andersen Berg, 1989; Thomassen et al., 2001; Wilson, 1993). Hier sollte die AI prinzipiell nur während der Fertilisationsperiode fünf bis sechs Tage nach dem LH-Gipfel erfolgen (England und Concannon, 2002).

Zur Bestimmung des optimalen Besamungszeitpunktes können das Verhalten der Hündin, die Untersuchung des Vulvaturgors, der Vaginalzytologie und der Vaginalmukosa sowie die Messung der hormonellen Veränderungen während des Prooestrus und Oestrus herangezogen werden (Farstad, 1984b; England und Concannon, 2002; Jeffcoate und Lindsay, 1989; Wilson, 1993). Bei der Besamung mit frischem Sperma werden mit der Bewertung der Vaginalzytologie zufriedenstellende Ergebnisse erzielt (Linde-Forsberg und Forsberg, 1989). Beim Einsatz von TG-Sperma konnten durch das Heranziehen zusätzlicher Methoden (Hormonbestimmung und Vaginoskopie) die Trächtigkeitsraten und Wurfgrößen signifikant verbessert werden (Farstad und Andersen Berg, 1989; Rota et al., 1999; Thomassen et al., 2001; Wilson, 2001).

3.2.4.1 Verhalten der Hündin

Das Verhalten der Hündin während der Läufigkeit wird durch den sequentiellen Wechsel der zirkulierenden Östrogen- und Progesteronkonzentrationen beeinflusst (Concannon et al., 1975; Jeffcoate und Lindsay, 1989). Das prooestrische Verhalten ist assoziiert mit dem Anstieg der Östrogenkonzentration im Plasma. Das Einsetzen der Duldung fällt theoretisch mit dem markanten Anstieg der Progesteronkonzentration im Plasma zusammen (Concannon et al., 1977a). Zur Akzeptanz des Rüden kommt es allerdings oft bereits einige Tage vor oder nach dem LH-Gipfel. Sie hat somit nur geringen zeitlichen Bezug zur Fertilisationsperiode. Auch zwischen dem Ende der Duldung und den Hormonkonzentrationen ist nur eine geringe Korrelation festzustellen (Jeffcoate und Lindsay, 1989). Bei der Hündin kann das Verhalten somit nur bedingt zur Bestimmung des optimalen Besamungszeitpunktes herangezogen werden (England und Concannon, 2002).

3.2.4.2 Vulvaturgor bei der Hündin

Während des Prooestrus kommt es bei der Hündin unter Östrogeneinfluss zur zunehmenden Ödematisierung des Reproduktionstraktes. Dies führt zum Anschwellen von Vulva und Perinealgewebe. Zum Zeitpunkt des LH-Gipfels nimmt die Ödematisierung des Gewebes durch die sinkende Konzentration des zirkulierenden Östrogens ab. Als Konsequenz daraus wird die Vulva weicher. Durch die subjektive palpatorische Untersuchung des Vulvaturgors und des Perineums zweimal täglich kann diese Veränderung erfasst werden. In Fällen, in denen nur die klinische Untersuchung zur Bestimmung des optimalen Besamungszeitpunktes zur Verfügung steht, sollten das Einsetzen der Duldung des Rüden und die Untersuchung des Vulvaturgors herangezogen werden (England und Concannon, 2002).

3.2.4.3 Erfassung hormoneller Veränderungen

Wegen der engen Korrelation des Zeitpunktes des LH-Gipfels im Blutplasma und der Fertilisationsperiode der Hündin ist die Bestimmung der LH-Konzentration eine

zuverlässige Methode zur Detektion des optimalen Besamungszeitpunktes (Tabelle 18). Derzeit ist ein kommerzieller "Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)" (Status-LH, Synbionics) zur Bestimmung der LH-Konzentration im caninen Serum auf dem Markt. In den meisten Ländern ist allerdings noch kein derartiger Test erhältlich, hier muss zur Bestimmung der LH-Serumkonzentration der zeit- und kostenintensivere "Radioimmunoassay (RIA)" durchgeführt werden (England und Concannon, 2002).

Tab. 18: Optimaler Zeitpunkt zur Anpaarung bzw. artifiziiellen Insemination (AI) im Bezug zum LH-Gipfel (nach England und Concannon, 2002)

Typ des Zuchtmanagements	Zeitpunkt der Insemination nach dem LH-Gipfel (nach der Ovulation)
AI mit frischem Sperma oder Natürliche Paarung	3 bis 6 (1 bis 4) Tage
AI mit gekühltem frischen Sperma	4 bis 6 (2 bis 4) Tage
AI mit gefrierkonserviertem Sperma	5 bis 6 (3 bis 4) Tage

Zur Erfassung des LH-Gipfels kann bei der Hündin auch der Anstieg der Progesteronkonzentration im Blut herangezogen werden. Ihre Bestimmung kann mittels quantitativem ELISA, RIA, oder dem "Immuno-Chemilluminesce Assay" durchgeführt werden. Es sind verschiedene semiquantitative Progesteron ELISA kommerziell erhältlich (England und Concannon, 2002).

Der Anstieg der Progesteronkonzentration im Serum über Werte von 6 bis 8 ng/ml wird als Hinweis auf den Beginn der fertilen Periode gewertet (Jeffcoate und Lindsay, 1989). Die Besamung sollte vier bis sechs Tage nach dem Anstieg der Progesteronkonzentration über einen Wert von 2,0 ng/ml (6,5 mmol/l) erfolgen. Es hat sich gezeigt, dass die Ergebnisse der Besamung mit TG-Sperma besser sind, wenn die Progesteronkonzentration zum Zeitpunkt der Insemination über einem Wert von 30 bis 35 mmol/l liegt (Linde Forsberg und Forsberg, 1989; Thomassen et al., 2001).

3.2.4.4 Vaginalzytologie

Die mikroskopische Untersuchung der Vaginalzytologie ist eine einfache Methode zur Zyklusüberwachung (England und Concannon, 2002; Schutte, 1967a, b). Bedingt durch den Anstieg der peripheren Plasmakonzentration von Östrogen während des Prooestrus kommt es zur Verdickung der Vaginalmukosa und zu einem Anstieg der Zahl der Zellen. Die Mukosa wandelt sich von einem flachen kubischen Epithel zu einem mehrschichtigen verhornten Plattenepithel. Während dieser Transition verändern sich Form, Größe und Färbverhalten der oberflächlichen Zellen (England und Concannon, 2002).

Die Gewinnung der Vaginalzellen ist mit einem mit NaCl-Lösung angefeuchteten Baumwoll- oder Wattetupfer oder durch Aspiration der Vaginalhöhle mittels Plastikkatheter möglich (Concannon und DiGregorio, 1986; Ehlers, 2000). Die mikroskopische Untersuchung der fixierten Abstriche kann direkt (Linde-Forsberg und Forsberg, 1989, 1993) oder nach modifizierter Wrights-Gimsa- (Harleco's Diff Quik, EM Science, Gibbstown, NJ, USA; Merck, Darmstadt, Europa), Trichrom- (England und Concannon, 2002), Methylenblau- (Linde-Forsberg und Forsberg, 1989, 1993), PAPANICOLAOU- bzw. TESTSIMPLETS-Färbung (Böhringer) (Ehlers, 2000) erfolgen.

Die Untersuchung der Vaginalzytologie führt nur bei detaillierter Charakterisierung der verschiedenen Zelltypen (Basal-, Parabasal-, Intermediärzellen, basophile, mischfarbene und azidophile Superficialzellen, Schollen, Metoestrus-, Schaumzellen) zu einer für praktische Erfordernisse ausreichenden Reproduzierbarkeit. Hierbei ist das Zusammenfassen mehrerer Zelltypen zu Gruppen (Basal-, Parabasal-, Intermediärzellen = Gruppe der tiefen Zellen, mischfarbene und azidophile Superficialzellen = Gruppe der azidophilen Zellen) möglich. Dies vereinfacht die Zellklassifikation und beeinflusst den diagnostischen Wert der Untersuchung kaum. Durch die Bestimmung des Azidophilenindex ($= \text{azidophile Zellen} \times 100 / \text{Gesamtzellzahl}$) wird die Genauigkeit der Zyklusdiagnose deutlich verbessert. Aus diesem Grund sind bei der Untersuchung der Vaginalzytologie Spezialfärbungen wie PAPANICOLAOU, TESTSIMPLETS (Böhringer), die die Differenzierung basophiler und azidophiler Zellen gestatten, der Vorzug zu geben (Ehlers, 2000)

(Tabelle 19).

Tab. 19: Befund der Vaginalzytologie in den einzelnen Zyklusstadien der Hündin (nach Ehlers, 2000)

Vaginalzytologie	Zyklusstadium
Basophile Zellen, viele Erythrozyten	Prooestrus
> 80 % azidophile Zellen, wenige Erythrozyten	Oestrus
Azidophilenindex > 90 %, Maximum der Schollen, kein Detritus, keine Keime, keine Sekretpuren, keine Zytolyse, Zellen liegen einzeln, kaum Erythrozyten, keine Leukozyten	Optimaler Decktermin
Am ersten Tag Wiederauftreten von Leukozyten charakteristisch, Zellmischbild, später nur noch Basal-, Parabasal- und Intermediärzellen	Metoestrus
Nur vereinzelt Basal-, Parabasal-, Intermediär- und Schaumzellen, deutliche Zytolyse	Anoestrus

Durch die tägliche Untersuchung der Vaginalzytologie vom Beginn des Prooestrus bis zum ersten Tag des Dioestrus kann die ungefähre Bestimmung des geeignetsten Besamungszeitpunktes erfolgen (Pinto et al., 1998; Schutte, 1967a, b). Da ein Vaginalabstrich mit oestrischem Erscheinungsbild bei ca. 50 % der Hündinnen bereits vor dem LH-Gipfel erstmals auftreten kann, ist allerdings keine enge Beziehung zwischen der vaginalen Zytologie und der Fertilisationsperiode gegeben. Die Vaginalzytologie allein erlaubt somit nur eine begrenzte Bestimmung des optimalen Besamungszeitpunktes (Ehlers, 2000; England und Concannon, 2002; Jeffcoate und Lindsay, 1989).

3.2.4.5 Vaginoskopie

Ein wertvolles diagnostisches Mittel zur Bestimmung der Fertilisationsperiode ist die Vaginoskopie (Lindsay et al., 1983). Bei dieser Methode werden die hormonell bedingten zyklischen Veränderungen der Mukosa sowie der Charakter eventuell

anzutreffender Flüssigkeit in der Vagina bewertet (England und Concannon, 2002; Jeffcoate und Lindsay, 1989; Lindsay, 1983). Die Untersuchung der Vaginalmukosa erfolgt für gewöhnlich mit einem starren Endoskop mit Glasfaseroptik (England und Concannon, 2002; Jeffcoate und Lindsay, 1989).

Um die sichere Bewertung des Reproduktionsstatus der Hündin zu ermöglichen, erfolgt die Einteilung der Mukosaveränderungen in vier Perioden, die wiederum in verschiedene Stadien gegliedert werden (Jeffcoate und Lindsay, 1989) (Tabelle 20). In der ersten Periode (Stadium O_1) zu Beginn des Prooestrus sind die unter Östrogeneinfluss stehenden Mukosafalten stark vergrößert, ödematös, pink- oder pink-weißfarben. Da die Mukosaverdickung den Blick auf die unter ihr befindlichen Blutkapillaren verhindert, die während des Anoestrus und des frühen Prooestrus zu sehen sind, wird die Mukosaoberfläche zunehmend heller und bekommt eine typisch cremeweiße Farbe. Auf den Mukosafalten ist aus dem Uterus stammende seroangiöse Flüssigkeit anzutreffen (Jeffcoate und Lindsay, 1989; England und Concannon, 2002). Die zweite Periode überspannt den Zeitraum des präovulatorischen LH-Gipfels (S_1 - S_2) bis drei Tage danach. Während dieser Periode ist das Mukosaprofil abgerundet. Etwa zum Zeitpunkt des LH-Gipfels (S_2) kommt es zur starken Schrumpfung der Mukosa begleitet von zunehmender Blässe. In den folgenden Tagen schreitet die Mukosaschrumpfung fort, die Faltenbildung nimmt zu (S_{a2}) (England und Concannon, 2002). In der dritten Periode, drei bis vier Tage nach dem LH-Gipfel (S_3 - S_4), kommt es zu deutlicher Winkelbildung der Mukosa, sie bleibt creme- bis weißfarbig (Lindsay und Concannon, 1986). Das Profil der Falten wird zunehmend schärfer (S_5) (Jeffcoate und Lindsay, 1989). Die vierte Periode (Stadium D_5 - D_1) wird dominiert vom Progesteron, ihr Einsetzen stellt das Ende der Fertilisationsperiode dar (Jeffcoate und Lindsay, 1989). Die Mukosa flacht ab, wird dünner und fleckig (Lindsay und Concannon, 1986). Anfangs ist das Profil der Mukosa gewinkelt und scharf (D_5), in der Folge kommt es zu seiner zunehmenden Abrundung (D_3 - D_1) (Jeffcoate und Lindsay, 1989). Beim Einsetzen des Metroestrus (D_0) ist die Mukosa fleckig hyperämisch, während einige Stellen noch weiß und dick sind, sind andere Bereiche rötlich und dünn (England und Concannon, 2002; Jeffcoate und Lindsay, 1989). Die Mukosa ist in diesem Zustand leicht zu irritieren, der Kontakt mit dem Endoskop provoziert die Formation pink-weißfarbener Falten (Jeffcoate und Lindsay, 1989). Während des Anoestrus hat die Mukosa ein relativ

flaches, trockenes und rot gefärbtes Erscheinungsbild. Sie ist sehr dünn, fragil und kann durch Manipulation oder durch Instrumente sehr leicht traumatisiert werden (Lindsay und Concannon, 1986).

Tab. 20: Veränderung der Vaginalschleimhaut bei der Hündin in Relation zum LH-Gipfel (nach Jeffcoate und Lindsay, 1989)

Tage vom LH-Gipfel	-12 bis -8.. -5 -4 -3 -2 -1 0 +1 +2 +3 +4 +5 +6 +7 +8 +9 +10 +11 +12																		
	1. Periode O ₁ -----					2. Periode S ₁ ----- S ₂ ---- S _{a2}					3. Periode S ₃ - S ₄ ----- S ₅ ---					4. Periode D ₅ D ₃ D ₁			Metoestrus D ₀
Charakteristika der vaginalen Mukosa	Ödematös					Schrumpfung ohne Winkelbildung					Schrumpfung mit Winkelbildung					Rückgang der Schrumpfung			Beginn des Metroestrus

Der Beginn der fertilen Periode ist durch das Einsetzen der Mukosaschrumpfung detektierbar (England und Concannon, 2002). Die Transition vom Stadium S₁ zu S₂ korreliert im allgemeinen gut mit dem LH-Gipfel. Die Fertilisationsperiode ist in den Stadien S₃ bis S₅ anzusiedeln. In diesem Zeitraum kommt es zur Reifung der ovulierten Eizellen. Die in den Stadien S₄ und S₅ beginnende bzw. maximale Winkelbildung ist ein auffallendes vaginoskopisches Merkmal und daher ein sehr wertvoller Indikator für den Fertilisationsgipfel. Bei der alleinigen vaginoskopischen Untersuchung könnte das im Stadium S₃ auftretende Mukosabild mit dem Abrunden der Mukosa während des Stadiums D₃ verwechselt werden (Jeffcoate und Lindsay, 1989). Die Besamung sollte zwischen den Stadien S₄ und S₅ erfolgen (England und Concannon, 2002; Jeffcoate und Lindsay, 1989).

3.2.4.6 Ultrasonographische Untersuchung der Hundeovarien

Die Ovarien der Hündin können ultrasonographisch mit B-Modus Echtzeitverfahren dargestellt werden. Durch wiederholte, sorgfältige Untersuchung ist es möglich, das Follikelwachstum zu verfolgen (England und Concannon, 2002). Im Ultraschallbild erscheinen antrale Follikel als schwarze, echofreie, runde Gebilde, deren Größe während des Prooestrus zunimmt (Yeager und Concannon, 1996). Im frühen und mittleren Prooestrus haben sie Durchmesser von zwei bis drei Millimetern, im späten

Prooestrus von etwa fünf Millimetern. Ihre maximale Größe von sieben bis 10 Millimetern erreichen sie zwischen dem Tag des LH-Gipfels und dem Tag der Ovulation (England und Concannon, 2002).

Die Ovulation selbst ist bei der Hündin sonographisch nur schwer zu detektieren, da es dabei nicht zum Follikelkollaps kommt. Die entstehenden Corpora lutea besitzen zentral flüssigkeitsgefüllte Kavitäten, die im Ultraschallbild Follikeln ähnlich sind. Ein bis drei Tage nach der Ovulation sinken Anzahl und / oder Größe der echofreien Strukturen am Ovar. Bei frühen Corpora lutea, die für einige Tage bis zu zwei Wochen Flüssigkeit enthalten, kommt es oft wieder zum Rückgang der Echogenität. Im Rahmen von experimentellen Untersuchungen der caninen Reproduktion findet die Ultraschalluntersuchung Anwendung. Klinisch besitzt diese Technik derzeit keine Relevanz (England und Concannon, 2002).

3.2.4.7 Untersuchung des zerviko-vaginalen Sekretes

Bei einer kleinen Anzahl von Hündinnen hat sich gezeigt, dass der elektrische Widerstand des Vaginalsekretes während des Prooestrus und frühen Oestrus steigt und im mittleren und späten Oestrus sinkt. Diese Veränderung könnte ein wertvoller Indikator zur Bestimmung der fertilen Periode sein. Diese Technik ist jedoch bisher für die Hündin noch kaum entwickelt, sie wird allerdings in großem Umfang zur Detektion des optimalen Inseminationszeitpunktes bei Fuchsfähen eingesetzt (England und Concannon, 2002). Tabelle 21 gibt eine Zusammenfassung über Zyklus-Parameter und Reproduktionsstatus fertiler Hündinnen in Relation zum LH-Gipfel.

Tab. 21: Zyklus-Parameter und Reproduktionsstatus normal fertiler Hündinnen in Relation zum LH-Gipfel (nach Ehlers, 2000; England und Concannon, 2002)

Parameter	Tag 7 vor dem LH-Gipfel	Tag des LH-Gipfels	Tag 4 bis 5 nach dem LH-Gipfel (Oozyten gereift)	Tag 8 bis 11 nach dem LH-Gipfel
Verhornungsindex ^b	30 – 100 %	80 – 100 %	80 – 100 %	0 – 80 %
Vaginalzytologie ^a	Basophile Zellen, viele Erythrozyten	Azidophilenindex > 80 % wenige Erythrozyten	Azidophilenindex > 90 % kaum Erythrozyten, Maximum an Schollen	Zellmischbild
Seroangiöser Ausfluss ^b	+	+	+/-	+/-
Leukozyten im Vaginalabstrich ^b	wenige	Keine oder wenige	Keine oder wenige	viele
Vulvaturgor ^b	Progressiver Anstieg	Gipfel oder beginnender Abfall	Deutlicher Abfall	Vulva weich, noch vergrößert
Zustand der vaginalen Mukosa ^b	Weich, rund, weiß, ödematös	Weiß, geschrumpft, faltig	Weiß, stark gefaltet, gewinkelt	Weiß-pink oder rot, gefleckt, fast flach
Serumprogesteron ^b	< 0,5 ng/ml	0,9 – 3,0 ng/ml	3,5 – 12 ng/ml	8 – 25 ng/ml
Reproduktionsstatus ^b	infertil	Einsetzen des Fertilitätsgipfels (zwei Tage vor der Ovulation)	Beginn der Fertilisationsperiode (zwei bis drei Tage nach der Ovulation)	Kaum fertil oder Infertil

a: Ehlers, 2000

b: England und Concannon, 2002

3.2.5 Inseminationstechnik

Die artifizielle Insemination (AI) bei der Hündin kann intravaginal oder intrauterin erfolgen (Silva et al., 1995). Bedingt durch die spezifische Anatomie der Vagina der Hündin, ist ihre Zervix relativ unzugänglich. Um eine Besamungspipette bzw. einen Katheter in die kraniale Vagina oder den Uterus einzuführen zu können, ist es daher unbedingt erforderlich, mit den Besonderheiten des caninen Reproduktionstraktes vertraut zu sein (Wilson, 1993, 2001).

Die Vagina der Hündin ist im Vergleich zu anderen Haustierspezies sehr lang. Bei einer Hündin mit 11 kg Körpergewicht kann die totale Länge von der Vulva bis zur Zervix 10 bis 14 cm betragen (Pineda et al., 1973). Bei großen Rassen wie Bernhardiner und Neufundländer ist die Vagina bis zu 29 cm lang. Dies ist auch von praktischer Relevanz, da hierdurch für die intrauterine Besamung relativ lange Instrumente erforderlich sind (Wilson, 2001). Die kraniale Vagina - die Parazervix - wird von der ausgeprägten dorsomedialen Falte (DMF) dominiert (Lindsay, 1983). Die DMF erstreckt sich kaudal bis zum vaginalen Anteil der Zervix, hat verschiedene Tuberkel und endet mit einem kleineren kaudalen Höcker (Christensen, 1964; Pineda et al., 1973; Lindsay, 1983). Die DMF reduziert das vaginale Lumen beträchtlich. Die Größe dieses Lumens variiert zwischen den einzelnen Hündinnen sehr stark, sie steht aber nicht in direkter Relation zur Größe der Hündin. Tendenziell ist der Lumendurchmesser bei Hündinnen, die noch nicht gedeckt wurden, kleiner. Der kaudale Tuberkel der DMF und das enge halbmondförmige Lumen der Parazervix haben bei der Betrachtung durch ein Spekulum täuschende Ähnlichkeit mit dem externen Ostium der Zervix, das sich ca. 2,5 cm kranial der Parazervix befindet. Den kranialen Abschluss der Vagina bildet die Fornix vaginae, ein schlitzzartiger Raum kranial des vaginalen Anteils der Zervix, der blind endet. Der Zervikalkanal hat diagonalen Verlauf mit kraniodorsaler Orientierung, er verbindet die Vagina mit dem Uterus. Die interne Öffnung des Zervikalkanals ist nach dorsal gerichtet. Die externe Öffnung befindet sich direkt gegenüber des Vaginabodens und liegt bei den meisten Hündinnen im Zentrum einer Rosette aus Falten. Die Passage des Zervikalkanals mittels Katheter ist durch seine Lage und seine Enge problematisch. Das Lumen des Zervikalkanals ist bei Hündinnen, die noch nicht gedeckt wurden, oft enger (Wilson, 2001). Endoskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Position des

Muttermundes durch die zyklisch bedingt wechselnde Ödematisierung des Gewebes im Reproduktionstrakt variiert. Diese Variation trägt ebenfalls dazu bei, dass die Zervix teilweise nur sehr schwer zu passieren ist (Wilson, 1993).

3.2.5.1 Intravaginale Insemination (IVI)

Bei der intravaginalen Insemination (IVI) erfolgt die Deponierung des Spermas in die kraniale Vagina der Hündin. Die IVI kann mit einem Uterus-Einmal-Katheter für Rinder, einem flexiblen Einweg-Harnkatheter für Rüden (Feldman und Nelson, 1996b), dem Norwegischen Katheter (Farstad, 1984a) oder dem Französischen Osiris-Katheter (23 IMV L'Aigle France) durchgeführt werden (Rota et al., 1999). Das Sperma wird in eine Injektionsspritze (ca. 12 ml) aufgenommen, die mit dem Katheter verbunden wird (Berchtold, 1997b; Feldman und Nelson, 1996b). Das Hinterteil der Hündin wird unmittelbar vor der Besamung durch eine Hilfsperson angehoben und der Schwanz zur Seite gehalten (Andersen, 1980). Ein durch einen Handschuh geschützter Finger wird, die Handfläche nach unten haltend, in das Vaginalgewölbe eingeführt. Bei sehr kleinen Hündinnen wird hierbei nichtpermizides Gleitmittel verwendet. Der Katheter wird über die Spitze des Fingers vorsichtig in das Vaginalgewölbe geschoben und dessen dorsaler Krümmung folgend eingeführt, bis ein Widerstand zu spüren ist. Dabei ist darauf zu achten, dass der Katheter nicht in die Urethra oder in die Fossa clitoris eingeführt wird (Feldman und Nelson, 1996b). Die Katheterspitze sollte so weit wie möglich kranial in der Nähe der Zervix positioniert werden (Roszel, 1992). Dies kann durch abdominale Palpation kontrolliert werden (Andersen, 1980). Liegt der Katheter in der gewünschten Position, wird die Spritze mit dem Sperma entleert. Danach wird sie mit etwas Luft gefüllt, die in den Katheter eingespritzt wird, um möglichst alle Spermien aus diesem zu entfernen. Ist dies geschehen, wird der Katheter entfernt. Das Hinterteil der Hündin sollte im Anschluss für ca. 10 bis 20 Minuten erhöht bleiben, danach sollte die Hündin für mindestens eine Stunde ruhig gehalten werden (Andersen, 1980; Feldman und Nelson, 1996b). Durch behutsames Streichen über die Perinealregion der Hündin wird diese stimuliert, ihren Schwanz hochzuhalten, wodurch der Spermientransport durch den Zervixkanal in Richtung Uterus angeregt wird (Andersen, 1980).

An der Spitze des Französischen Osiris-Katheter (23 IMV L'Aigle France) befindet

sich ein Latexballon. Nach dem Einführen dieses Katheters in die kraniale Vagina kann der Ballon abhängig vom vaginalen Widerstand mit 7 bis 40 ml Luft aufgeblasen werden, um den Katheter an seinem Platz zu halten und den Reflux von Sperma zu verhindern. Nach der Insemination wird das Hinterteil der Hündin ebenfalls für ca. 10 bis 15 Minuten erhöht gehalten, bevor die Luft aus dem Ballon abgelassen und der Katheter entfernt wird (Mialto et al., 1985; Rota et al., 1999; Seager und Fletcher, 1973; Seager und Platz, 1977). In einer Untersuchung von Pinto et al. (1998) kam es zu keiner Beeinträchtigung der Trächtigkeitsrate und Wurfgrößen, wenn die Zeit, während der das Hinterteil der Hündinnen erhöht blieb, von 10 auf eine Minute reduziert wurde.

3.2.5.2 Transzervikale intrauterine Insemination (TCI)

Bereits 1959 beschrieb Cobb und später Lagerstedt und Obel (1987) das Einbringen von Kontrastmittel in den Uterus der Hündin mittels zervikaler Katheterisierung ohne Sichtkontrolle. Die transzervikale intrauterine Insemination (TCI) kann mittels Norwegischem Katheter (Andersen, 1975) oder mit Glasfaseroptik-Endoskop und Urethrozystoskop durchgeführt werden (Wilson, 1993).

3.2.5.2.1 "Norwegische" Methode der TCI

Die "Norwegische" Methode der TCI wurde erstmals von Fougner et al. (1973) beschrieben. Diese Technik wurde zur künstlichen Besamung von Blaufüchsen entwickelt und von Andersen (1975) bei der Insemination von Hündinnen angewandt. Bei Füchsen wird die artifizielle Insemination mittlerweile in der kommerziellen Zucht genutzt. Durch die künstliche Besamung von Blaufuchsfähen mit frischem Silberfuchssperma wurde es möglich, die Produktion von Blaufrostpelzen zu etablieren, denn unter natürlichen Bedingungen paaren sich diese beiden Arten nicht. Die kurze Überlappung ihrer Zuchtsaison stellte außerdem einen Anreiz zur Entwicklung geeigneter Kryokonservierungsmethoden für Fuchssperma dar. Die Verfügbarkeit von kryokonserviertem Fuchssperma reduziert zudem den Bedarf an lebenden Zuchttieren (Farstad, 1996, 2000a).

Die Ausrüstung für die "Norwegische" Methode der TCI besteht aus einem Spekulum

und einem speziell entwickelten Metallkatheter (Norske Pelsdyrforlag A/L, Oslo, Norway) (Andersen, 1975; Farstad, 1984a). Diese Katheter werden in drei Größen hergestellt und sind somit für Hündinnen unterschiedlicher Größen verfügbar (Berchtold, 1997b; Wilson, 2001).

Für die Besamung wird die Hündin von einer Hilfsperson in stehender Position auf einem Tisch geeigneter Höhe festgehalten. Das Spekulum wird soweit wie möglich an der dorsalen Wand der Vagina entlang eingeführt. In den meisten Fällen ist der Durchmesser des Spekulum zu groß, um das Einführen bis in den engen parazervikalen Raum zu erlauben. Zervix und Spekulum werden durch die Abdomenwand palpatorisch aufgesucht (Andersen, 1975; Farstad, 1984a). Um die Palpation zu ermöglichen ist es wichtig, dass die Hündin eine leere Blase und einen leeren Magen hat (Linde-Forsberg, 1995). Die Zervix ist während des Prooestrus stark vergrößert. Sie ist für gewöhnlich ein bis zwei Zentimeter vor und leicht oberhalb des Spekulum zu ertasten. Sie wird durch die Abdomenwand zwischen Daumen und Zeigefinger fixiert. Dann wird der Metallkatheter durch das Spekulum hindurch, bis zur Zervix eingeführt. Die Manipulation der Zervix verändert den Winkel des Zervikalkanals zu einer mehr horizontalen Position. Durch vorsichtiges Suchen nach dem externen Ostium wird die Spitze des Katheters mit der Zervix in Kontakt gebracht. Ist die Öffnung lokalisiert, wird der Katheter in den Zervikalkanal geschoben. Nun erfolgt mittels Injektionsspritze die möglichst langsame Instillation des Spermas über den Metallkatheter. Beim Spermafluss sollte es keinen Widerstand geben. Ist die Position des Katheter nicht korrekt, kommt es zu einem starken Spermarückfluss zwischen Spekulum und Katheter. Um die gesamte Spermadosis aus dem Katheter im Uterus zu deponieren, wird auch bei der "Norwegischen" TCI final eine entsprechende Menge Luft in den Katheter injiziert. Das Geräusch das dabei entsteht, ist bei intrauteriner Lage des Katheters anders als bei intravaginaler (Andersen, 1975; Farstad, 1984a).

3.2.5.2.2 Endoskopische TCI

Die endoskopische TCI wurde von Wilson (1993) etabliert. Die Insemination erfolgt hierbei unter Zuhilfenahme eines Urethrozystoskops (Storz Extended Length Cystourethroscope, Coleta, CA) ausgestattet mit einem Teleskop mit einem 30° geneigten

Blickwinkel, einem Spekulum, einem Überbrückungsteil und einer kalten Lichtquelle (Arbeitslänge 29 cm). Am Endoskop kann eine Videokamera angebracht werden. Zur Insemination bei den meisten Hündinnen eignet sich ein 8 Gauge (G) Blasenkatheeter, bei kleinen, noch nicht gedeckten Hündinnen, ist mitunter ein 6 G Katheter erforderlich (Wilson, 2001). Durch die Verwendung eines Faseroptik-Endoskops werden die direkte Betrachtung der Zervix und das Einbringen eines flexiblen Katheters in dem Muttermund unter optischer Kontrolle ermöglicht. Um diese Technik anzuwenden, ist viel praktische Erfahrung erforderlich (Wilson, 1993).

Bei der endoskopischen TCI wird die Hündin auf einer eigens für diese Methode entworfenen Plattform auf einem hydraulischen Tisch in stehender Position gehalten. An der Plattform kann die Hündin durch das Halsband und ein Leinenband, das rund um das Abdomen angebracht wird, fixiert werden. Durch diese Fixierung werden Seitwärtsbewegungen und das Hinsetzen des Tieres verhindert. Die Verwendung eines hydraulischen Tisches garantiert die optimale Position des Durchführenden zur Hündin, sie ist aber nicht zwingend notwendig (Wilson, 1993, 2001).

Das Endoskop wird unter Sichtkontrolle durch die Vaginalfalten hindurchgeführt. Im Prooestrus und frühen Oestrus können die Mukosafalten das Vorankommen des Endoskops erschweren, da sie das Lumen in dieser Zyklusphase stark einengen. Im Oestrus, wenn die Ödematisierung des Gewebes zurückgeht, ist das Einführen des Endoskops in der Regel einfacher (Lindsay, 1983). Der kaudale Tuberkel der DMF ist bei den meisten Tieren deutlich zu erkennen. An diesem Punkt wird das Lumen bei einigen Hündinnen sehr eng. Die Führung des Endoskops erfolgt durch vorsichtige Manipulation in die weiteste Vaginalspalte. Wird das Endoskop an eine Seite der DMF gedrückt, muss es zurückgezogen werden um dann erneut zu versuchen, die Parazervix ventral zu passieren. Die vaginale Zervixportio erscheint als weiterer Tuberkel, ist ihre Öffnung nach kaudoventral oder ventral gerichtet, ist sie nicht sofort sichtbar. Bei Hündinnen, bei denen das Ostium nicht von einer deutlichen Faltenrosette umgeben ist, ist dieses nur durch den Ausfluss seroangiöser Flüssigkeit aus der Zervix zu lokalisieren.

Um den Katheter unter optischer Kontrolle in die Zervix einzuführen, muss das Endoskop ventral unter den zervikalen Tuberkel gebracht werden. Das starre

Endoskop wird dazu benutzt, den zervikalen Tuberkel zu bewegen und den Winkel des Zervikalkanals zu verändern. Ist die Spitze des Katheters in die Zervixöffnung eingeführt, wird dieser unter ständigen Drehbewegungen vorwärtsbewegt, so weit es ohne starken Kraftaufwand möglich ist. Es ist wichtig sicherzustellen, dass der Katheter bei der Spermadeponierung korrekt plziert ist. Kommt es zum Spermarückfluss, wird die Insemination gestoppt und der Katheter repositioniert (Wilson, 2001).

3.2.5.3 Intrauterine Insemination (IUI) mittels Laparotomie

Eine andere Möglichkeit der intrauterinen Insemination (IUI) bei der Hündin ist die Besamung mittels Laparotomie (Andersen, 1972a, b; Silva et al., 1995; Tsutsui et al., 1989b). Hierbei wird nach medioventralem Zugang zur Bauchhöhle über die Linea alba das Sperma mit einer Injektionsspritze (ca. 1 ml) durch die Uteruswand in den Uteruskörper (Andersen, 1972a, b) oder in den mittleren Teil des Uterushorns in Richtung Uterushornspitze (Tsutsui et al., 1989b) injiziert.

3.2.5.4 Laparoskopische intrauterine Insemination

Die laparoskopische intrauterine Insemination (IUI) bei der Hündin wurde von Silva et al. (1995) entwickelt. Bei der laparoskopischen IUI erfolgt nach chirurgischer Vorbereitung des OP-Bereiches die Insufflation des Abdomens mit drei bis fünf Liter Kohlendioxyd mittels 10 cm Veress-Nadel, die in der Linea alba, ein Zentimeter oberhalb des Nabels, eingeführt wird. Das Laparoskop (8 mm Ø, Linse mit Winkel von 0° mit elektrischer Lichtquelle und Kamera) wird ohne vorherige Hautinzision mittels Trokar in der Mittellinie, einen Zentimeter kaudal des Nabels, in den Abdominalraum eingeführt. Die Uterushörner sind kranial und kaudal der Harnblase lokalisiert. Ein zweiter Trokar (5 mm Ø) wird, ebenfalls ohne vorherige Hautinzision, auf der rechten Seite des Tieres, etwa zwei bis drei Zentimeter lateral neben der Mammarreiste, in den Abdomen eingeführt. Im Anschluss wird eine endoskopische Pinzette durch den Kanal dieses Trokars eingeführt, um damit den Uteruskörper nahe der Bifurkation zu fassen. Der fixierte Uteruskörper wird in Richtung ventraler Abdominalwand angehoben, so dass ein Uterushorn im Bereich der Muskellagen

lokalisiert ist und so für die Insertion eines Katheters (18 G) durch die Abdominalwand zugänglich ist. Der Katheter wird so geführt, dass er das Uterushorn proximal der Bifurkation in Richtung Ovar penetriert. Die Nadel des Katheters wird entfernt, seine Plastikscheide verbleibt im Uteruslumen. Wird das Sperma in einem Volumen von ca. einem Milliliter in den Katheter injiziert, beult sich die Uteruswand vor dem Katheter aus. Dies ist ein Zeichen für die richtige Position des Katheters. Nach der Entfernung des Katheter und der endoskopischen Zange nimmt der Uterus seine physiologische Lage wieder ein. Ist dies geschehen, wird das Laparoskop entfernt und das Kohlendioxyd durch eine Kanüle abgelassen. Die abdominalen Zugänge werden chirurgisch verschlossen (Silva et al., 1995).

3.2.5.5 Wahl der Inseminationstechniken

Die intravaginale Insemination (IVI) ist bei der Hündin relativ einfach und risikolos durchzuführen. Bei der Besamung mit frischem oder für wenige Tage gekühlt gelagertem Sperma werden mit dieser Methode gute Ergebnisse erzielt. Die Angaben über die Trächtigkeitsraten nach retrospektiver Bewertung größerer Probandengruppen reichen von 62 bis 95 % (Goodman und Cain, 1993; Linde-Forsberg und Forsberg, 1989, 1993; Pinto et al., 1999). Beim Vergleich der Trächtigkeitsraten und der Wurfgrößen nach der IVI mit frischem und gekühltem Sperma konnten Pinto et al. (1999) keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Bei der Verwendung von gefrierkonserviertem Hundesperma sind die Ergebnisse nach der intrauterinen Insemination (IUI) in der Regel besser als nach IVI (Andersen, 1972a, 1975; Farstad, 1984a; Farstad und Andersen Berg, 1989; Fontbonne und Badinand, 1993a; Fougner et al., 1973; Govette et al., 1996; Linde-Forsberg und Forsberg, 1989, 1993; Olar et al., 1989; Rota et al., 1997, 1999; Silva et al., 1995; Smith und Graham, 1984). Die Ursachen hierfür sind die schlechteren Bedingungen für das Überleben der Hundespermien in der Vagina im Vergleich zum Uterus, die im Vergleich zu frischen Spermien geringere Überlebensrate und Motilität bei TG-Samenproben und der damit verbundene eingeschränkte Spermientransport durch die Zervix. Für den Erfolg der artifiziellen Insemination (AI) ist es entscheidend, eine überlebensfähige Spermienpopulation im Uterus zu etablieren (Concannon und Battista, 1989; Davies, 1982; Doak et al., 1967; England, 1993; England und Ponzio,

1996; Feldman und Nelson, 1996b; Linde-Forsberg und Forsberg, 1989; Morton und Bruce, 1989; Peña et al., 1998a; Rota et al., 1999).

Nach der IUI mit gefrierkonserviertem Hundesperma wurden Konzeptionsraten von 46 bis 84 % erzielten (Andersen, 1980; Farstad, 1984a; Farstad und Andersen-Berg, 1989, Linde-Forsberg und Forsberg, 1989; Rota et al., 1999; Smith, 1984; Wilson, 1993, 2001) (Tabelle 22). Die Trächtigkeitsrate von 84 % liegt nahe an dem Bereich, wie er bei gut kontrollierter natürlicher Paarung erwartet wird (Rota et al., 1999). Nöthling et al. (1995) berichteten nach der transzervikalen intrauterinen Insemination (TCI) mit gefroren-aufgetautem Sperma über eine Trächtigkeitsrate von 88 %. Die Hündinnen wurden bei dieser Untersuchung allerdings durchschnittlich 5,6 mal während des Oestrus besamt. Eine so hohe Besamungsfrequenz ist bei der routinemäßigen AI nicht praktikabel.

Tab. 22: Trächtigkeitsraten und Wurfgrößen nach intravaginaler bzw. transzervikaler intrauteriner Insemination mit frischem oder gefroren-aufgetautem Hundesperma (GA) und nach natürlicher Paarung

Insemination	Sperma- art	Anzahl der Hündinnen	Trächtigkeits- rate (%)	Wurfgröße (Durchschnitt)	Quelle
Intravaginal	Frisch	12	25	5,0	Farstad, 1984a
Intrauterin	frisch	25	84	5,6	
	GA	30	67	5,6	
Natürliche Paarung		25	92	5,2	
Intravaginal	GA	38	52,6	4,2	Fontbonne und Badinand, 1993a
Intrauterin		19	73,6	5,5	
Intrauterin	GA	46	80,0	5,0	Wilson, 1993

Silva et al. (1996) erzielten nach IVI mittels Osiris-Katheter bzw. nach laparoskopischer IUI mit gefroren-aufgetautem Hundesperma vergleichbare Trächtigkeitsraten. Rota et al. (1999) konnten jedoch keinen Vorteil bei der Verwendung des Osiris-Katheters zur IVI feststellen. In beiden Studien war die

Größe der Untersuchungsgruppen allerdings sehr klein (jeweils 5 Hündinnen), was ihre Aussagekraft erheblich einschränkt.

Es existieren keine Untersuchungen, in denen die chirurgische IUI und die TCI direkt verglichen werden. Der Vergleich der Ergebnisse der wenigen existierenden Studien ist schwierig, da gerade bei der Verwendung von gefrierkonserviertem Sperma viele Faktoren involviert sind, die Einfluss auf die Erfolgsrate haben (Wilson, 2001). Die chirurgische IUI ist zwar technisch einfach, muss aber unbedingt in der fertilen Periode durchgeführt werden. Außerdem ist diese Methode mit dem Narkoserisiko verbunden. Die tiefe Allgemeinanästhesie könnte sich außerdem negativ auf die Uterusmotilität und die Oozytenmigration auswirken (Jedruch und Gajewski, 1986; Jedruch et al., 1989). Darüber hinaus wird es in einigen europäischen Ländern als unethisch angesehen, die Insemination chirurgisch durchzuführen, wenn eine alternative nicht-chirurgische Methode zur Verfügung steht (Farstad, 2000a). Viele Hundebesitzer und Tierärzte bevorzugen daher das nicht-chirurgische Vorgehen bei der Besamung (Silva et al., 1996). In den USA scheint jedoch die chirurgische Insemination die Methode der Wahl zu sein (Farstad, 2000a). Über den Erfolg der laparoskopischen IUI liegen bisher kaum Daten vor. Ihr Vorteil gegenüber der IUI mittels Laparotomie ist, dass es sich um einen weniger invasiven Eingriff handelt, mit dem auch die mehrmalige Insemination möglich ist (Silva et al., 1996).

Die transzervikale Insemination (TCI) ist weniger risikobehaftet als die chirurgische Besamung, sie erfordert einen geringeren Geräteaufwand und ist somit weniger kostenintensiv. Um die TCI durchführen zu können, ist allerdings viel praktische Erfahrung erforderlich. Auch sie ist nicht ganz ohne Risiko für die Hündin. Bei zu starker Kraftanwendung kann es zu Traumata oder zur Perforation kommen (Wilson, 1993, 2001). Bei der in Norwegen praktizierten TCI reagiert ein Teil der Hündinnen ablehnend auf die Palpation, besonders dann, wenn sich die Prozedur durch die schwierige Passage des Zervikalkanals verlängert (Wilson, 1993). Die Sedation ist aber für gewöhnlich nicht erforderlich. Bei der endoskopischen Methode kann sich der Ausführende direkt von der Deponierung des Spermas in den Uterus überzeugen. Der Erfolg bei der Identifikation der Zervikalöffnung und bei der Katheterisierung des Zervikalkanals hängt hierbei aber in hohem Maße von der Erfahrung des Ausführenden ab (Wilson, 1993, 2001). Hündinnen im Oestrus mit

einem Duldungsverhalten tolerieren diese Technik sehr gut, so dass eine Sedation in der Regel auch bei dieser Technik nicht erforderlich ist (Wilson, 2001). Weder mit der "Norwegischen" noch mit endoskopischen TCI ist es jedoch möglich, alle Hündinnen zu besamen. Vor allem bei noch nicht gedeckten Hündinnen kleiner Rassen, bei "Toy"-Rassen wie Chihuahua und bei adipösen Tieren können Probleme auftreten (Thomassen et al., 2001; Wilson, 1993, 2001). Bei der Wahl der Technik zur TCI sind letztendlich auch die hohen Kosten für die Anschaffung eines Endoskops entscheidend (Wilson, 2001).

3.2.6 Inseminationsdosis, -volumen und -frequenz

Über das geeignetste Inseminationsvolumen und die erforderliche Inseminationsdosis bei der artifiziellen Insemination (AI) von Hündinnen liegen nur sehr wenige Daten vor. Die eingesetzten Inseminationsdosen wurden mehr oder weniger willkürlich festgelegt (Morton, 1988). Die verwendeten Inseminationsvolumina liegen im allgemeinen zwischen einem und drei Milliliter (Rota et al., 1999; Thomassen et al., 2001; Tsutsui et al., 1988).

Bei der Besamung mit frischem Sperma wird häufig die unverdünnte spermienreiche Fraktion verwendet (Farstad, 1984a). Nach einer einmaligen vaginalen Deponierung von 100×10^6 lebenden, frischen Spermien in die kraniale Vagina von Hündinnen war die Trächtigkeitsrate im Vergleich zu einer Dosis von 200×10^6 , unabhängig vom Inseminationsvolumen (1 bis 3 ml), signifikant reduziert. Bezüglich der Wurfgrößen wurde dabei kein Unterschied festgestellt (Tsutsui et al., 1988) (Tabelle 23). Bei der chirurgischen Deponierung von frischem Hundesperma mittels Laparotomie in ein Uterushorn, kam es bei einer Dosis von 10×10^6 Spermien zu einer hohen Trächtigkeitsrate (91 %), für die Befruchtung von Eizellen beider Ovarien wurden 20×10^6 Spermien benötigt (Tsutsui et al., 1989a). Für maximale Konzeptionsraten bei der intravaginalen Insemination (IVI) von Hündinnen mit frischem Sperma ist demnach eine ca. 10-fach höhere Spermiedosis erforderlich als bei intrauteriner Insemination (IUI) (Tsutsui et al., 1988, 1989a). Um bei der IVI mit frischem Sperma bei der Hündin ähnliche Konzeptionsraten und Wurfgrößen zu erzielen wie bei der natürlicher Paarung, sollte die Spermienkonzentration 200×10^6 Spermien/ml nicht unterschreiten (Tsutsui et al., 1988).

Tab. 23: Konzeptionsraten bei Hündinnen nach einmaliger intravaginaler Insemination mit frischem Sperma in Abhängigkeit von Inseminationsvolumen und dem Anteil lebender Spermien pro Insemination (nach Tsutsui et al., 1988)

Anzahl lebender Spermien pro Insemination	Anzahl der Hündinnen	Konzeptionsrate (%)
$2,0 \times 10^8$	8	89,0
$1,0 \times 10^8$	15	33,3
$0,5 \times 10^8$	13	46,0
$0,25 \times 10^8$	8	0

Bei der AI mit gefrierkonserviertem Hundesperma ist wegen dessen kürzerer Überlebensdauer und geringerer Fertilisationskapazität eine höhere Besamungsdosis erforderlich (Rota et al., 1999). Die für maximale Trächtigkeitsraten minimal erforderliche Inseminationsdosis bei der Verwendung von TG-Samen wurde bisher noch nicht bestimmt (Morton und Bruce, 1989; Peña und Linde-Forsberg, 2000b). In frühen Studien wurden mehrmalige Besamung mit hohen Spermienzahlen durchgeführt (Seager et al., 1975; Platz und Seager, 1977). Heute geht man davon aus, dass bei der IUI mit einer Gesamtmenge von 150 bis 200×10^6 Spermien, mit einem Anteil von mindestens 50 % lebenden Zellen nach dem Auftauen, akzeptable Trächtigkeitsraten und Wurfgrößen erzielt werden können (Andersen, 1975, 1980; Farstad, 1984a; Farstad und Andersen Berg, 1989; Morton und Bruce, 1989; Rota et al., 1998, 1999; Thomassen et al., 2001). Wilson (1993) zeigte, dass auch mit kleineren Mengen zufriedenstellende Konzeptionsraten möglich sind. Die zweimalige transzervikale intrauterine Insemination mit jeweils 30 bis 35×10^6 normalen lebenden Spermien führte zu einer Trächtigkeitsrate von 85 % (n=7), die durchschnittliche Wurfgröße lag bei 7,8 (Wilson, 1993).

Die Inseminationsfrequenz hat ebenfalls Einfluss auf den Erfolg der AI (Linde-Forsberg und Forsberg, 1989). Speziell beim Einsatz von kryokonserviertem Sperma führten wiederholte Inseminationen zur Steigerung der Konzeptionsraten und der Wurfgrößen (Farstad und Anderson-Berg, 1989; Linde-Forsberg und Forsberg, 1989; Wilson, 1993). Die erste Besamung sollte ein bis zwei Tage vor dem optimalen Termin erfolgen, damit eine eventuelle Variabilität des Zeitpunktes der Ovulation kompensiert werden kann (England und Concannon, 2002).

3.3 Hormonelle Zyklusbeeinflussung bei der Hündin

Der potentielle Nutzen der hormonellen Zyklusinduktion bei Hündinnen wurde schon vor vielen Jahren erkannt (Bardens, 1971; McBride et al., 2001; Scorgie, 1939; Sokolowski et al., 1968). Trotz des beträchtlichen Interesses an Methoden zur Verkürzung des Anoestrus und zur Induktion eines synchronen fertilen Oestrus, sind die Faktoren, die für die Erhaltung und die Dauer des Anoestrus, für den Eintritt der Follikel in die Wachstumsphase und für den Beginn des nächsten Prooestrus bei der Hündin verantwortlich sind, nicht geklärt. Effiziente und wiederholbare Techniken zur Induktion der Superovulation und der Oestrussynchronisation bei der Hündin sind derzeit noch nicht etabliert (Westhusin et al., 2001).

3.3.1 Zyklusinduktion

3.3.1.1 Gonadotropin-Behandlung

In den meisten Studien zur Zyklusinduktion bei Hündinnen erfolgte die Behandlung mit den heterologen Gonadotropin-Präparaten "Pregnant Mare's Serum Gonadotropin" (PMSG) (20 bis 500 IU pro Tag für neun bis 14 Tage) zur Stimulation der folliculären Entwicklung und humanem Choriongonadotropin (hCG) (500 IU) zur Induktion der Ovulation (Archbald et al., 1980; Chaffaux et al., 1984; Chakraborty et al., 1982; Jones et al., 1973b; Nakao et al., 1985; Thun et al., 1977; Vanderlip et al., 1987; Wright, 1982). In anderen Studien wurde versucht, durch eine FSH-Administration (1 bis 16 mg für 1 bis 12 Tage) einen fertilen Zyklus bei der Hündin zu induzieren (Olson et al., 1981; Shille et al., 1984). Die verwendeten Protokolle zeigten jedoch erhebliche Defizite bezüglich ihrer Effizienz und Reproduzierbarkeit (Archbald et al., 1980; Chaffaux et al., 1984; Chakraborty et al., 1982; Jones et al., 1973b; Nakao et al., 1985; Olson et al., 1981; Shille et al., 1984; Thun et al., 1977; Vanderlip et al., 1987; Wright, 1982). Die Behandlung mit PMSG und hCG war für gewöhnlich erfolgreicher als die mit FSH (Kusuma et al., 1993). Probleme bei der Bewertung und beim Vergleich vieler Untersuchungen bereiten die limitierte Zahl der Versuchstiere, das unzureichend definierte Stadium des Anoestrus der behandelten Hündinnen und die unterschiedlichen Kriterien, die bei der Auswertung herangezogen wurden. So wurde nicht in allen Untersuchungen die Fertilität der

induzierten Ovulation getestet oder die resultierenden Trächtigkeiten wurden abgebrochen (Archbald et al., 1980; Chakraborty et al., 1982; Jones et al., 1973b; Olson et al., 1981; Thun et al., 1977; Wright, 1982) (Tabelle 24).

Arnold et al. (1989) berichteten über erhebliche Nebenwirkungen nach der Behandlung mit exogenem Gonadotropin, deren Ursache im behandlungsbedingten Hyperöstrogenismus vermutet wurde. So kam es bei der Hälfte der behandelten Hündinnen nach jeder Paarung zu starkem blutigen Ausfluss. Außerdem wurden Veränderungen des Blutbildes (milde nichtregenerative Anämie, starke Thrombozytopenie und Granulozytopenie) und Knochenmarkssuppression (Suppression der Vorstufen von Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten) beobachtet. 30 Tage nach der ersten Injektion traten Fieber und Anorexie auf. Bei einem Tier wurde nach der zweiten Kopulation die Vagina in der Fornix-Region perforiert. Bei diesem Tier wurde im Rahmen der chirurgischen Versorgung der Verletzung eine Überstimulation beider Ovarien festgestellt. Beide Ovarien hatten etwa die Größe von Hühnereiern und waren bedeckt von flüssigkeitsgefüllten Zysten mit Durchmessern von ein bis vier Millimetern. PMSG scheint die Hauptursache für den Hyperöstrogenismus zu sein (Arnold et al., 1989). Kusuma et al. (1993) beobachteten allerdings ähnliche Nebenwirkungen nach der Ovulationsinduktion mit hCG (nach Metergolinbehandlung) ohne vorherige PMSG-Gabe. Die unphysiologisch hohe Östrogenkonzentration im Blut hat möglicherweise auch inhibitorischen Einfluss auf die Implantation der Embryonen. Dies würde die relativ niedrigen Trächtigkeitsraten nach der Zyklusinduktion mit heterologem Gonadotropin erklären (Arnold et al., 1989; Chaffaux et al., 1984; Nakao et al., 1985; Renton et al., 1981; Thun et al., 1977).

Tab. 24: Inzidenz der Zyklusinduktion und vollendeter Trächtigkeiten nach hormoneller Behandlung anoestrischer Hündinnen mit exogenem Gonadotropin oder FSH

Hormone		Anzahl behandelte Hündinnen	Inzidenz des beobachteten Oestrusverhaltens (%)	Vollendete Trächtigkeiten (%)	Quelle
Follikelstimulation	Ovulationsauslösung				
PMSG		9	33	kA	Sokolowski et al., 1969
PMSG	hCG	8	38	kA	Sokolowski et al., 1969
PMSG	hCG	6	100	kA	Jones et al., 1973b
PMSG	hCG	25	72	0	Thun et al., 1977
PMSG	hCG	8	70	kA	Archbald et al., 1980
PMSG	hCG	6	50	0	Renton et al., 1981
PMSG	hCG	8	60	kA	Wright, 1982
PMSG		kA	80	kA	Chakraborty et al., 1982
PMSG	hCG	15	87	20	Chaffaux et al., 1984
PMSG	GnRH	5	60	0	Chaffaux et al., 1984
PMSG	hCG	15	60	13	Nakao et al., 1985
PMSG	hCG	6	50	50	Arnold et al., 1989
FSH	LH	10	70	0	Paisley und Fahning, 1977
FSH		3	0	kA	Olson et al., 1981
DES + FSH		9	90	kA	Olson et al., 1981
FSH		9	44	11	Shille et al., 1984
FSH	LH	5	0	0	Shille et al., 1984

DES: Diethylstilbestrol; FSH: Follikelstimulierendes Hormon; GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormon; hCG: humanes Choriongonadotropin; kA: keine Angaben; LH: Luteinisierungshormon; PMSG: Pregnant Mare's Serum Gonadotropin

3.3.1.2 Behandlung mit Gonadotropin Releasing Hormon

Ein anderer Ansatz zur Zyklusinduktion bei anoestrischen Hündinnen ist die Behandlung mit Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH). Wegen seiner minimalen antigenen Wirkung wird GnRH in vielen Bereichen der Reproduktionsmedizin bei der Therapie von Reproduktionsproblemen und zur Verbesserung der reproduktiven Effizienz von Haustieren eingesetzt (Kawate et al., 1997; Mori et al., 1988). Die biologische Halbwertszeit des nativen GnRH's beträgt beim Hund $2,2 \pm 0,1$ Minuten (Inaba et al., 1994). Durch die Behandlung mit exogenem GnRH ist es möglich, die LH-Ausschüttung zu induzieren, die wiederum die Entwicklung präovulatorischer Follikel stimuliert (Concannon, 1989). Bei anoestrischen Hündinnen war die Induktion von Prooestrus und fertilelem Oestrus durch die pulsierte Applikation von GnRH mittels Infusionspumpen möglich (Cain et al., 1988, 1989; Vanderlip et al., 1987). Die hohen Kosten derartiger Infusionspumpen und die Notwendigkeit der intravenösen Katheterisierung limitieren diese Art der Applikation aber für wissenschaftliche Untersuchungen (Concannon, 1989).

Die konstante subkutane Infusion hoher Konzentrationen des GnRH-Superagonisten Lutrelin ($[D-Trp^6, NMeLeu^7, Pro^9NET]$ GnRH; WY40972, Wyeth Laboratories, Philadelphia, PA, USA) (0,33 oder 1,0 mg/ml Lutrelin in Aqua dest. 3,0 bzw. 1,0 μ l/ Stunde; Tagesdosis: 24 μ g) über eine osmotische Pumpe (Alzet Modell 2 ML4 oder 2002; Alza Corp., Palo Alta, CA, USA) für eine Dauer von 14 Tagen induzierte bei anoestrischen Hündinnen (90 bis 146 Tage nach dem vorangegangenen Oestrus) über mehrere Tage die Freisetzung großer Mengen von LH. Bei der Mehrheit der behandelten Hündinnen war diese Stimulation ausreichend, um Prooestrus, Oestrus, eine schnelle Entwicklung der Follikel und die spontane Ovulation zu induzieren. Bei trächtig gewordenen Hündinnen, war die endogene LH-Konzentration zwischen Tag 8 und Tag 15 höher als bei Tieren, bei denen es zur Ovulation aber nicht zur Fertilisation kam. Bei Hündinnen, bei denen die Ovulation ausblieb, waren die LH-Konzentrationen im Plasma am geringsten (Concannon, 1989) (Tabelle 25).

Tab. 25: Endogene LH-Konzentrationen von Hündinnen nach hormoneller Zyklusstimulation mit Lutrelin (s.c. über osmotische Pumpe, Tagesdosis: 24 µg) zwischen dem 8. und 15. Tag nach Behandlungsbeginn (nach Concannon, 1989)

	Anzahl der Hündinnen	Mittelwerte der endogene LH-Konzentration ng/ml
Insgesamt behandelt	24	3,3
Keine Ovulation	6	1,9
Ovulation ohne Duldung	9	2,7
Trächtigkeit	9	4,7
Kontrolle (spontaner Zyklus)	12	16,0

Durch eine einzige subkutane Injektion einer Mikrokapsel, die langanhaltend den GnRH-Agonisten Leuprolidazetat (LA; [D-Leu⁶,Pro⁹NET]-GnRH; 100 µg/kg s.c.) freisetzt, war es möglich, bei präpubertären (n=6) und bei adulten anoestrischen Hündinnen (n=12) fertile Zyklen zu induzieren. Bei den Hündinnen stieg die LA-Konzentration im Serum unmittelbar nach der Injektion stark an, um für ca. einen Monat einen Plateauwert zu halten. Am ersten Tag des induzierten Oestrus wurden die Tiere mit dem GnRH-Analagon Fertirelin ([Pro⁹NET]-GnRH, 3 µg/kg, i.m.) behandelt (Inaba et al., 1998). Bei allen Hündinnen trat ca. 10 Tage nach der LA-Applikation oestrisches Verhalten auf und es kam zur Paarung. Die durchschnittliche Wurfgröße lag bei 4,1 Welpen. Bei den Hündinnen im späten Anoestrus waren die Muster des zirkulierenden Östrogens und Progesterons vergleichbar mit denen im natürlichen Zyklus. Bei den präpubertären Hündinnen, die nicht trächtig wurden, wurde ein insuffizientes Progesteron-Profil beobachtet. LA scheint somit ein geeignetes Mittel zu sein, um einen fertilen Oestrus bei der Haushündin zu induzieren (Inaba et al., 1998).

3.3.1.3 Behandlung mit Ergotaminderivaten

Wie bereits erwähnt, kann die Therapie mit Ergotaminderivaten zur Verkürzung der Anoestrusdauer führen (siehe 2.1.6.1.2 Prolaktin). Nach der Administration prolaktinsenkender Dosen von Bromocriptin, Cabergolin und Metergolin war es möglich, fertile Zyklen mit relativ hoher Trächtigkeitsrate zu induzieren (Jöchle, 1999;

Kusuma et al., 1993; van Haften et al., 1989; Verstegen et al., 1999; Zöldág et al., 2001) (Tabelle 26).

Tab. 26: Inzidenz der Oestrusinduktion, der vollendeten Trächtigkeiten und mittlere Wurfgröße nach der Behandlung anoestrischer Hündinnen mit Ergotaminderivaten

Präparat	Anzahl behandelter Hündinnen	Oestrusinduktion (%)	Vollendete Trächtigkeiten (%)	Mittlere Wurfgröße	Quelle
Bromocriptin	4	100,0	74,0		van Haften et al., 1989
PMSG + Bromocriptin	7	71,0	0	-	van Haften et al., 1989
Metergolin	12	83,3	75,0	kA	Kusuma et al., 1993
Metergolin + hCG	8	75,0	50,0	kA	Kusuma et al., 1993
Metergolin + PMSG	10	40,0	0	kA	Kusuma et al., 1993
Cabergolin	15	93,3	80,0	4,5	Verstegen et al., 1999
Bromocriptin (graduell)	48	83,3	81,2	4,8	Zöldág et al., 2001

hCG: humanes Choriongonadotropin

kA: keine Angaben

PMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotropin

Wegen des häufig auftretenden Vomitus nach der Behandlung mit Bromocriptin, findet dieser Wirkstoff in der Praxis nur geringe Akzeptanz. In der Untersuchung von Zöldág et al. (2001) wurden nach der allmählichen Gewöhnung an das Präparat (0,3 mg/Tier für drei Tage, danach 0,6 bis 2,5 mg/kg für sieben bis 19 Tage) keine Nebenwirkungen beobachtet. Bei der Mehrzahl der so behandelten Hündinnen (n=48) führte diese Behandlung nach 10 bis 31 Tagen zur Oestrusinduktion (bei 40 Tieren Ovulation, bei 6 Tieren oestrisches Verhalten aber keine Ovulation), die Trächtigkeitsrate lag bei 83 %, bei 97,5 % der trächtig gewordenen Tiere kam es zur Geburt lebender Junger, die durchschnittliche Wurfgröße war mit 4,8 relativ klein (Zöldág et al., 2001).

Ein Problem bei der Zyklusinduktion mit Prolaktinhibitoren ergibt sich durch das nicht genau vorherzusagende Zeitintervall vom Behandlungsbeginn bis zur Oestrusinduktion. Es kann eine Dauer von drei bis 38 Tagen haben (Kusuma et al., 1993; Verstegen et al., 1999). Es hat sich gezeigt, dass das Anoestrusstadium die

Empfindlichkeit gegenüber der Applikation von Cabergolin beeinflusst (Jöchle et al., 1989; Verstegen et al., 1999). Bei 93 % (14 von 15) der mit diesem Wirkstoff behandelten Hündinnen kam es vier bis 30 Tage nach Behandlungsbeginn zum Einsetzen des Prooestrus. Der Effekt der Cabergolin-Applikation vollzog sich bei Tieren im frühen Anoestrus (93. bis 108. Tag nach dem letzten Oestrus) langsamer (durchschnittliches Behandlungsintervall bis zum Einsetzen des Prooestrus 20 Tage) als bei Tieren im mittleren (123. bis 156. Tag) oder späten Anoestrus (161. bis 192. Tag) (durchschnittliches Behandlungsintervall 14 bzw. sechs Tage) (Verstegen et al., 1999). Bei der Zyklusinduktion mit Metergolin wurde ein derartiger Zusammenhang nicht festgestellt (Kusuma et al., 1993).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Induktion eines fertilen Oestrus bei der Hündin nur durch die Behandlung mit Prolaktininhibitoren nebenwirkungsfrei und auch unter Praxisbedingungen möglich ist. Eine effiziente und wiederholbare Oestrus-Induktion und die präzise Zyklussynchronisation kann durch die bisher untersuchten Behandlungsmethoden aber nicht gewährleistet werden (Westhusin et al., 2001).

3.3.2 Induktion der Superovulation

Zur Induktion der Superovulation bei der Hündin existiert bisher nur ein Behandlungsprotokoll. Hierbei werden die Hündinnen täglich mit 100 bis 400 µg Östron behandelt, bis vaginaler Ausfluss festgestellt werden kann. Ist dies der Fall, erfolgt für drei Tage die Applikation von 400 IU equinem und 100 IU humanem Choriongonadotropin (s.c.), am dritten und vierten Tag danach die einmalige Injektion von 10 µg Östradiol (i.m.), beim Einsetzen des Oestrus die von 1000 hCG (i.v.) (Takeishi et al., 1971; Yamada et al., 1992, 1993).

Yamada et al. (1992, 1993) untersuchten die Ovarien anoestrischer Hündinnen (n=16) (Plasma-Progesteron < 10 ng/ml) 48, 72 bzw. 96 Stunden nach der letzten hCG-Injektion mittels Laparotomie auf das Vorhandensein von vergrößerten und / oder rupturierten Follikeln. Das genaue Anoestrus-Stadium der Tiere zum Zeitpunkt ihrer Behandlung wurde nicht definiert. Bei allen behandelten Tieren wurde durch die Superovulationsbehandlung die Follikelentwicklung induziert. Zur Ovulation schien es

ca. 72 Stunden nach der letzten hCG-Injektion zu kommen (Yamada et al., 1992, 1993) (Tabelle 27).

Tab. 27: Follikelentwicklung auf Hundeovarien nach hormoneller Induktion der Superovulation (nach Yamada et al., 1992)

Stunden nach Ende der Hormonbehandlung	Anzahl behandelte Hündinnen	Anteil (%) der Hündinnen mit			Anzahl der Follikel pro Hündin (Mittelwert)
		Vergrößerten Follikeln*	vergrößerten* und rupturierten Follikeln**	Rupturierten Follikeln**	
48	2	100	0	0	50-84 (67)
72	10	50	50	0	21-164 (70)
96	4	0	0	100	18-84 (43)

* Follikel mit klarer Flüssigkeit gefüllt, über die Ovaroberfläche hervorragten, Durchmesser größer als 3 mm

** kollabierte Follikel, hämorrhagisch, rupturierte Punkte

3.4 In-vitro-Produktion von Hundeembryonen

Die Methode der In-vitro-Produktion von Embryonen umfasst drei Schritte: die In-vitro-Reifung (IVM) und die In-vitro-Fertilisation (IVF) von Oozyten sowie die In-vitro-Kultivierung (IVC) befruchteter Eizellen (Niemann und Meinecke, 1993).

Die Fähigkeit von Oozyten, unter geeigneten Bedingungen in vitro die Meiose wieder aufzunehmen, wird als meiotische Kompetenz bezeichnet. Man vermutet, dass die meiotische Kompetenz in zwei Phasen erlangt wird, wobei zuerst die Meiose wieder aufgenommen wird und in einem zweiten Schritt die Eizelle in die Lage versetzt wird, bis zur Metaphase II zu reifen (Sorensen und Wassarman, 1976).

Mahi und Yanagimachi (1976) zeigten erstmals, dass Hundeeizellen in vitro zur Wiederaufnahme der Meiose und zur Reifung angeregt und auch fertilisiert werden können. Inzwischen wurden einige verschiedene Untersuchungen auf dem Gebiet der IVM, IVF und der IVC beim Haushund durchgeführt. Die Entwicklungskompetenz von Hundeeizellen scheint wesentlich geringer zu sein als die der Eizellen vieler anderer Spezies. Die Effizienz der IVM und die Entwicklungsrate in vitro fertilisierter

Hundeoocyten war bislang sehr gering (Bolamba et al., 1998; Fujii et al., 2000; Hewitt et al., 1998; Hewitt und England, 1997; 1998b, 1999a, b; Luvoni et al., 2001; Mahi und Yanagimachi, 1978; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 1999, 2000a, b; Saint-Dizier et al., 2001a, b; Songsasen et al., 2002; Theiss, 1997; Yamada et al., 1992, 1993). Berichte über die Kryokonservierung von Hundeeembryonen existieren bisher nicht.

Die In-vitro-Studien bei Hundeeizellen erfolgten in der Mehrheit der Untersuchungen unter modifizierten Kulturbedingungen, wie sie bei der In-vitro-Kultivierung von Oozyten anderer Haustierspezies verwendet werden (Fujii et al., 2000; Hewitt und England, 1998b, 1999b; Mahi und Yanagimachi, 1976, 1978; Otoi et al., 2000a, b; Saint-Dizier et al., 2001a, b; Theiss, 1997; Yamada et al., 1992, 1993). Da sich das Reproduktionsgeschehen bei der Hündin aber in wesentlichen Punkten von dem anderer Spezies unterscheidet (steigende Serumkonzentration von Progesteron vor der Ovulation, Ovulation von Oozyten im GV-Stadium, meiotische Reifung der caninen Eizellen im Eileiter), sind die bei anderen Spezies erfolgreich eingesetzten Kulturbedingungen möglicherweise für Hundeeizellen ungeeignet (Hewitt und England, 1997; Songsasen et al., 2002).

3.4.1 Gewinnung von Hundeoocyten für die In-vitro-Kultivierung

Die Hundeoocyten für die In-vitro-Untersuchungen werden für gewöhnlich von Ovarien gewonnen, die im Rahmen routinemäßig durchgeführter Ovariohysterektomien (OH) anfallen. In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um Material von Hündinnen in verschiedenen Zyklusphasen. Der Transport der Hundeoovarien ins Labor erfolgt in 38°C warmer NaCl- oder PBS-Lösung, eventuell mit dem Zusatz eines Antibiotikums. Die Gewinnung der Oozyten erfolgt in der Regel innerhalb eines Zeitraums von bis zu zwei Stunden nach der OH (Fujii et al., 2000; Hewitt und England, 1997; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2000a; Songsasen et al., 2002; Theiss, 1997).

Bei Rinderovarien erfolgt die Isolation der Eizellen häufig durch die Punktion der Follikel mittels Injektionsspritze. Da sich bei der Hündin die Follikel unter der Ovaroberfläche befinden und erst einige Tage vor der Ovulation über diese

hervorragend, ist es nicht bei allen Ovarien möglich, Oozyten mittels Follikelpunktion zu gewinnen (Mahi und Yanagimachi, 1976; Tsutsui, 1989; Yamada et al., 1992, 1993).

Eine andere Möglichkeit zur Oozytenisolation von Ovarien ist die "Slicing-Methode". Hierbei werden die Eizellen durch das Zerschneiden der äußeren Schicht des Ovars mittels Skalpell in eine Kulturschale mit sterilem 30 bis 38°C warmen Medium (PBS; "tissue culture medium" (TCM) 199 + 0,3 % BSA oder TALP-HEPES; Anhang 7.2.1) entlassen (Fujii et al., 2000; Hewitt und England, 1997; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2000a; Songsasen et al., 2002; Theiss, 1997). Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie die Eizellgewinnung bei Ovarien von Hündinnen aller Zyklusstadien erlaubt, außerdem ist die Zahl der gewonnenen Oozyten wesentlich höher als bei der Follikelpunktion (Hewitt und England, 1998a, b; Nickson et al., 1993). Allerdings ist die mittels "Slicing-Methode" isolierte Oozytenpopulation höchst heterogen (Hewitt und England, 1998b).

Nur canine Eizellen, die ein homogenes dunkles Zytoplasma und eine intakte Zellmembran besitzen und von mindestens zwei kompletten Lagen Kumuluszellen umgeben sind, eignen sich für die In-vitro-Kultivierung (Fujii et al., 2000; Hewitt und England, 1997; Mahi und Yanagimachi, 1976; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2000a; Songsasen et al., 2002; Theiss, 1997; Yamada et al., 1992, 1993) (Tabelle 28). Die Kumuluszellen gewährleisten in vivo den Transfer nutritiver Stoffe zur Hundeeizelle, dieser Stoffaustausch scheint auch für die Entwicklung in vitro essentiell zu sein (Nickson et al., 1993).

Das Zyklusstadium der Hündin zum Zeitpunkt der OH scheint einen wesentlichen Einfluss auf die Anzahl und die Qualität der gewonnenen Eizellen zu haben. Oozyten von jungen, noch nicht geschlechtsreifen Hündinnen sind kleiner als die adulter Tiere. Die Mehrheit dieser Eizellen erwies sich für die IVM und IVF als ungeeignet, da sie nur von unvollständigen Kumuluszelllagen umgeben oder degeneriert waren (Nickson et al., 1993).

Tab. 28: Oozytenbeurteilung – morphologische Kriterien (nach Theiss, 1997)

Kategorie	morphologische Kriterien
A	dunkles Ooplasma, intakte Ooplasmamembran, mindestens zwei intakte Kumuluszelllagen
B	homogenes dunkles Ooplasma, intakte Ooplasmamembran, Kumuluszelllagen nicht intakt
C	homogenes dunkles Ooplasma, intakte Ooplasmamembran, keine Kumuluszellen
D	inhomogenes oder helles Ooplasma und / oder defekte Ooplasmamembran und / oder nur Oozytenbruchstücke

Die Angaben darüber, in welcher Zyklusphase bei geschlechtsreifen Hündinnen die höchste Anzahl an morphologisch einwandfreien Oozyten isoliert werden kann, variieren. Während bei Nickson et al. (1993) von Ovarien im späten Anoestrus die meisten für die In-vitro-Kultivierung geeigneten Oozyten gewonnen wurden, war dies bei Fujii et al. (2000) bei Ovarien mit funktionellem lutealen Gewebe der Fall (Tabelle 29).

Tab. 29: Anzahl und Zustand der von Hündinnen in unterschiedlichen Zyklusstadien gewonnenen Kumulus-Oozyten-Komplexe (COC's)

	Reproduktionsstatus der Hündinnen				Quelle
	Follikel- phase	Metoestrus	Früher Anoestrus	Später Anoestrus	
Anzahl der Hündinnen	1	3	2	4	Nickson et al., 1993
COC's pro Hündin (Durchschnitt)	62	46	85	104	
morphologisch gute COC's (%)	55	52	31	44	
Hündinnen (n)	4	5	10		Fujii et al., 2000
COC's pro Hündin (Durchschnitt)	104	206	236		
morphologisch gute COC's (%)	56	46	31		

Das Alter der Donorhündinnen scheint die Anzahl der zu gewinnenden Oozyten ebenfalls zu beeinflussen. Mit zunehmendem Alter der Hündin nimmt nicht nur die Anzahl der zu gewinnenden Eizellen ab, auch die meiotische Kompetenz dieser Oozyten scheint reduziert zu sein (Hewitt und England, 1998b; Theiss, 1997) (Tabelle 30). Eizellen von Hündinnen, die älter als sieben Jahre sind, sollten nicht für die IVM und IVF verwendet werden (Hewitt und England, 1998b).

Tab. 30: Zahl der gewonnenen Kumulus-Oozyten-Komplexe (COC's) in Abhängigkeit vom Alter der Hündin (nach Theiss, 1997)

Alter (Jahre)	Durchschnittliche Anzahl der gewonnenen COC's
< 1	275,0
5 – 6	71,7
13 – 14	7,3

3.4.2 Untersuchung des Zellkerns von Hundeeizyten

Bei Eizellen von Mäusen kann der Germinalvesikel direkt unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden (Cross und Brinster, 1970). Bei Hundeeizellen ist dies wegen des dunklen, mit dichtem Lipid angefüllten Ooplasmas nicht möglich (Hewitt et al., 1998). Um den Zustand des nukleären Materials der Hundeeizellen bzw. der caninen Embryonen mikroskopisch beurteilen zu können, ist es erforderlich, sie zu fixieren und zu färben. Zuvor müssen die Kumuluszellen von den Eizellen entfernt werden. Bei anderen Spezies wird hierfür Hyaluronidase verwendet, canine Kumuluszellen sind gegen diese Behandlung weitgehend resistent. Eine Möglichkeit ist die mechanische Denudierung mittels Pipette. Hierbei werden die Kumulus-Oozyten-Komplexe (COC's) mit einer Glaspipette, die etwa den Durchmesser der Eizelle besitzt, hin und her pipettiert (Mahi und Yanagimachi, 1976). Es ist aber auch möglich, die Kumuluszellen von den COC's nach 10-minütiger Inkubation in 1 %-igem (w/v) Natriumzitrat bei Raumtemperatur durch ca. dreiminütiges vortexen zu entfernen (Hewitt et al., 1998; Hewitt und England, 1997; Theiss, 1997).

Die Sichtbarmachung des Kernmaterials von Hundeeizellen ist mit mehreren Methoden möglich. In den meisten bisher durchgeführten Untersuchungen erfolgte

die Essigsäure-Alkohol-Fixation zur Entfernung der Lipid-Dotter-Körper in Verbindung mit einer Aceto-Orcein-Färbung (Anhang 7.6.2). Die Fixation kann dabei mit oder ohne die Anwesenheit von Chloroform und mit einem oder mehreren Fixationsschritten erfolgen. Die gefärbten Oozyten werden mikroskopisch unter Phasenkontrastbeleuchtung ausgewertet (Hewitt und England, 1997; Mahi und Yanagimachi, 1976; Nickson et al., 1993; Renton et al., 1991; Theiss, 1997; Yamada et al., 1992, 1993). Eine andere Möglichkeit zur Untersuchung des Kernmaterials von Hundeoocyten stellt die Fluoreszenzmikroskopie dar. Die Färbung der Oozyten erfolgt in diesem Fall mit Propidiumjodid (PI) (Anhang 7.6.3), Hoechst 33258 (Anhang 7.6.4) und / oder Fluoreszein Isothiozyanat konjugiertem Weizenkeim Agglutinin (WGA-FITC) (Anhang 7.6.5) (Garner et al., 1986; Hay, 1996; Hewitt et al., 1998, 2001).

Nach der Färbung in vitro kultivierter Hundeoocyten ist die Degenerationsrate, die durch Karyopyknose, nicht identifizierbare intrazytoplasmatische Strukturen oder Verlust der Zytoplasmamembran charakterisiert ist, häufig sehr hoch. Sie kann bis zu ca. 60 % betragen (Fujii et al., 2000; Hewitt et al., 1998a; Luvoni et al., 2001; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2000 a, b; Saint-Dizier et al., 2001b; Songsasen et al., 2002; Theiss, 1997). Der Vergleich von sieben verschiedenen Färbemethoden bei nicht kultivierten Hundeeizellen zeigte beachtliche Unterschiede bezüglich der Effizienz der Fixierung, der Klärung des dunklen Ooplasmas und der Anfärbung des Kernmaterials (Hewitt et al., 1998). Die besten Färbeergebnisse wurden in dieser Studie nach Aceto-Orcein-Färbung bei Denudierung in Natriumzitat und zweifacher Fixation in Anwesenheit von Chloroform (Methode G) und nach der PI-Färbung (Methoden F) erzielt (Hewitt et al., 1998) (Tabelle 31).

Tab. 31: Vergleich von Färbemethoden für Hundeeizellen (nach Hewitt et al., 1998)

	Denudierung	Fixation	Färbung	Ergebnis	Gefärbter GV (%)
A	Pipette	1. Deckglaspräparat (Anhang 7.6.1) 2. Essigsäure:Methanol (1:3 v/v) 48 Stunden	Aceto-Orcein (Anhang 7.6.2)		32
B	Pipette	1. Deckglaspräparat (Anhang 7.6.1) 2. Essigsäure:Ethanol:Chloroform (3:6:1 v/v) 2 bis 3 Minuten 3. Essigsäure:Ethanol (1:3 v/v) 48 Stunden bei 4°C	Aceto-Orcein (Anhang 7.6.2)	zusätzliche Fixation verbesserte Anfärbung	73
C	Pipette	1. Eizellen in Uhrglas 2. Essigsäure:Ethanol:Chloroform (3:6:1 v/v), 2 bis 3 Minuten 3. Deckglaspräparat (Anhang 7.6.1) 4. Essigsäure: Ethanol (1:3 v/v) 48 Stunden	Aceto-Orcein (Anhang 7.6.2)	gegenüber A	80
D	Pipette	Wie B, aber Fixation der frei flotierenden Oozyten in Uhrglas	Aceto-Orcein (Anhang 7.6.2)	kein Vorteil durch Fixation im Uhrglas	69
E	Pipette	10 Minuten in Glutaraldehyd	Hoechst 33258 (Anhang 7.6.3)	kein signifikanter Unterschied	81
F	Pipette	Eine Stunde in PBS	PI (Anhang 7.6.4)	zwischen Fluoreszenz -methoden	91
G	Na-Zitrat	1. Deckglaspräparat (Anhang 7.6.1) 2. Essigsäure:Ethanol:Chloroform (3:6:1 v/v) 2 bis 3 Minuten 3. Essigsäure:Ethanol (1:3 v/v) 48 Stunden bei 4°C	Aceto-Orcein (Anhang 7.6.2)	signifikant besser als E	90

Mit der Fluoreszenzmikroskopie ist nur die Auswertung einer Bildebene möglich, deshalb ist bei fertilisierten Hundeoocyten die Beurteilung der Spermienlokalisierung in Assoziation zur Eizelle nicht immer eindeutig möglich (Hay, 1996; Hewitt et al., 2001). Eine genauere Technik zur Bestimmung der Präsenz von Spermienköpfen stellt die "konfokale Laserscanner-Mikroskopie" dar. Bei dieser Methode wird im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie nicht das gesamte Untersuchungsfeld belichtet, sondern die fluoreszenzgefärbten Proben werden mit einem einzigen Laserpunkt gescannt. Durch die konfokale Vorrichtung (Pinhole) im optischen System werden hierbei Lichtstrahlen von Ebenen oberhalb und unterhalb der Brennpunktebene nicht detektiert. Da nur Licht der Brennpunktebene beobachtet wird, sind mit dieser Technik optische Serienschnitte durch die Eizelle möglich, wodurch ein komplettes Bild erzeugt werden kann (Sheppard und Shotton, 1997). Der Vergleich der Effizienz der Fluoreszenz- und der konfokalen Laserscanner-Mikroskopie bei der Untersuchung *in vitro* fertilisierter Hundeeizellen nach der Färbung mit PI (Identifikation von Oozyten- und Spermienkern) und Weizenkeim Agglutinin konjugiertem Fluorescein-Isothiocyanat (WGA-FITC) (Identifikation der ZP) (Anhang 7.6.5) zeigte, dass die Fluoreszenzmikroskopie geeignet ist, um die Präsenz und die Lokalisation von Hundespermien in Relation zu homologen Eizellen zu untersuchen. Allerdings wurde nicht die Assoziation von allen Spermien zur Eizelle detektiert, die mit der konfokalen Mikroskopie erfasst wurden. Die Fluoreszenzmikroskopie erkannte nur 66 % der mit den Oozyten interagierenden Spermien. Die Unterscheidung von Spermienbindung und -penetration war bei der Fluoreszenzmikroskopie mit einer Sensitivität und Spezifität von 97 % bzw. 100 % möglich (Hewitt et al., 2001).

Im Rahmen der mikroskopischen Untersuchung werden das meiotische Reifestadium der Eizellen, bei fertilisierten Oozyten die Lokalisation und die Anzahl anwesender Spermien, der Zustand der Spermienköpfe bzw. des männlichen und weiblichen Chromatins beurteilt (Bolamba et al., 1998; Fujii et al., 2000; Hewitt et al., 1998; Hewitt und England, 1997; 1998b, 1999a, b; Luvoni et al., 2001; Mahi und Yanagimachi, 1978; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 1999, 2000a, b; Saint-Dizier et al., 2001a, b; Songsasen et al., 2002; Theiss, 1997; Yamada et al., 1992, 1993) (Tabelle 32).

Tab. 32: Bewertungskriterien für Oozytenreifungsstadien (nach Hewitt und England, 1997)

Stadium	Charakteristika
Germinalvesikel (GV)	Oozyten mit vesikulärem Nukleus mit deutlichem Nukleolus umgeben von feinen Chromatinfilamenten
Abbau des Germinalvesikels (Germinalvesicle Breakdown = GVBD)	Wiederaufnahme der Meiose: Chromatinkondensation, nukleärer Vesikel verschwundene (drei Bilder möglich): <ol style="list-style-type: none"> 1. schwach gefärbter Nukleolus, deutlich sichtbare lange und dünne Chromosomen, um den Nukleolus in ähnlicher Formation wie im GV 2. Nukleolus nicht sichtbar, einzelne Chromosomen nicht zu identifizieren 3. unmittelbare Wiederaufnahme der Meiose und Vervollständigung der Metaphase I
Metaphase I (M I)	Formation von Bivalenten wird vervollständigt
Anaphase I (A I)	Auftreten von zwei Gruppen von Chromosomen, auseinanderziehen der Paare, Bewegung zur entgegengesetzten Seite der Meiosespindel
Metaphase II (M II)	Chromosomen in dichtgepackten Gruppen oder gut ausgebreitet, was ihre Identifizierung ermöglicht, Formation der ersten Polarkörperchen

Die Mehrzahl der mittels Follikelpunktion oder "Slicing-Methode" isolierten caninen Oozyten befindet sich im Germinalvesikel (GV)-Stadium (Fujii et al., 2000; Hewitt und England, 1997; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2000a; Songsasen et al., 2002; Theiss, 1997; Yamada et al., 1992, 1993). Es ist aber bekannt, dass es bei einem geringen Anteil der Oozyten zur intrafollikulären Reifung kommen kann. Bereits in der ersten Untersuchung zur In-vitro-Kultivierung von Hundeeozyten zeigte das Kernmaterial einer Eizelle vor der Kultivierung die Charakteristika von Chromatin in der Anaphase I (Mahi und Yanagimachi, 1976). In einigen Untersuchungen war die Anzahl der Oozyten, bei denen es bereits im Follikel zur nukleären Reifung kam, allerdings auffallend hoch (Hewitt und England, 1998a, b; Luvoni et al., 2001). So lag bei Hewitt und England (1998a) der Anteil der Eizellen, bei denen es bereits zum Abbau des Germinalvesikels (Germinalvesicle Breakdown = GVBD) gekommen war, bei 7 %. Der Anteil der Oozyten im GVBD-Stadium wurde hierbei nicht vom Zyklusstadium der Hündin beeinflusst (Hewitt und England, 1998a) (Tabelle 33). In einer anderen Untersuchung befand sich die Mehrzahl der isolierten kleinen

(Durchmesser < 100 µm) und mittleren (Durchmesser = 100 µm) Eizellen im GV-Stadium, bei den großen Oozyten (Durchmesser > 100 µm) war der Anteil derer, die sich im GVBD-Stadium befanden, mit 25 % aber sehr hoch (Hewitt und England, 1998b). Es wäre möglich, dass es sich hierbei um Eizellen aus atretischen Follikeln handelt, denn es ist generell akzeptiert, dass es in solchen Follikeln spontan zum GVBD kommen kann (Gougeon und Testart, 1986; Hewitt und England, 1998b).

Tab. 33: Kernmorphologie von Oozyten von Hündinnen in unterschiedlichen Zyklusstadien unmittelbar nach ihrer Gewinnung

Zyklusstadium	Anzahl der Eizellen	Anteil der Oozyten (%) in			Quelle
		GV	GVBD	Metaphase I bis II	
Anoestrus	25	44	48	0	Luvoni et al., 2001
Später Prooestrus	36	89	8	0	
Anoestrus	1	100	0	0	Hewitt und England, 1998a
Prooestrus	53	60	8	2	
Oestrus	40	80	7	0	
Metoestrus	358	80	7	0	

GV: Germinalvesikel

GVBD: Germinalvesikel Breakdown

Um den Reifungszustand der Eizellen nach ihrer In-vitro-Kultivierung zu beurteilen, wurde auch die molekularbiologische Bestimmung der synthetisierten mRNA-Konzentration für das Zona pellucida Glykoprotein 3 (ZP3) eingesetzt. Die Grundlage hierfür war die Kenntnis des spezifischen Synthesemusters der ZP3-mRNA bei murinen Eizellen (Bleil und Wassarman, 1980a, b; Shimizu et al., 1983). Bei unreifen, in ihrer Entwicklung arretierten Mausoozyten ist die Synthesemenge der ZP3-mRNA gering, sie steigt bei Oozyten in der Wachstumsphase, um während der späten meiotischen Reifung, unmittelbar vor der Ovulation, unter den Ausgangswert abzufallen (Blei und Wassarman, 1980a; Philpott et al., 1987). Die Situation beim Hund unterscheidet sich von der bei der Maus. Bei morphologisch einwandfreien Hundeeizellen kam es während der IVM zum Anstieg der Expression der ZP3-mRNA, der Gipfel trat nach 48-stündiger Reifung auf. Bei 39 % dieser Eizellen kam

es nach 24 Stunden in Kultur zur Extrusion des ersten Polkörperchens. Möglicherweise ist der unreife Zustand, in dem die Hundeoocyten ovuliert werden, die Ursache hierfür. Weitere Untersuchungen des ZP3-mRNA-Synthesemusters könnten dazu beitragen, die Vorgänge während der meiotischen Reifung caniner Oocyten aufzuklären (Nickson et al., 1993).

3.4.3 In-vitro-Reifung (IVM) von Hundeoocyten

Die Effizienz der In-vitro-Reifung (in vitro maturation = IVM) von Hundeoocyten ist bislang sehr gering. Bei den ersten IVM-Versuchen lag der maximale Anteil der Oocyten, die die Meiose wieder aufnahmen (GVBD) bei 47,5 % (Mahi und Yanagimachi, 1976). Der bisher höchste beobachtete Anteil von Hundeeizellen, bei denen es in Kultur zum GVBD kam, lag bei 71,4 %, die höchste Reifungsrate bis zur Metaphase I bis II zwischen 30 und 40 % (Hewitt et al., 1998; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2001; Songsasen et al., 2002; Theiss, 1997; Yamada et al., 1992, 1993).

Die IVM caniner COC's erfolgt in Gruppen von ca. zwei bis 20 Oocyten, in einem Volumen von 100 bis 500 µl Kulturmedium, das mit Mineralöl überschichtet wird und bei 37 bis 38°C in wasserdampfgesättigter 5 %-iger CO₂ Atmosphäre für die Dauer von 24 bis 120 Stunden kultiviert wird (Fujii et al., 2000; Hewitt und England, 1997, 1998a, b, c; Mahi und Yanagimachi, 1976; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2000a; Songsasen et al., 2002; Theiss, 1997; Yamada et al., 1992, 1993).

In der Mehrzahl der bisherigen Untersuchung erfolgte die Kultivierung der Hundeeizellen in modifiziertem TCM (tissue culture medium) 199 oder in modifizierter Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung (Anhang 7.2.2) (Fujii et al., 2000; Hewitt und England, 1997, 1998a, b, c; Mahi und Yanagimachi, 1976; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2000a; Songsasen et al., 2002; Theiss, 1997; Yamada et al., 1992, 1993). TCM 199 kommt bei der Kultivierung von bovinen Eizellen routinemäßig zum Einsatz. Die nukleäre Reifung von murinen und porcinen Oocyten wird durch den relativ hohen Anteil an Hypoxanthin (4 mmol) in diesem Medium inhibiert (Eppig und Downs, 1987; Downs, 1999; Gordon; 1994; Xia et al., 2000). Durch die Kultivierung von Hundeeizellen in dem hypoxanthinfreien Komplexmedium CMRL1066, konnten die Ergebnisse der IVM nicht verbessert werden. Im Gegenteil, der Anteil von

Hundeeizellen, die sich bis zur Metaphase II entwickelten, war signifikant reduziert. Da die Zusammensetzung von CMRL1066 und TCM 199 aber auch bei anderen Komponenten differiert, ist keine abschließende Aussage über einen Zusammenhang des IVM-Erfolges bei Hundeoocyten mit Hypoxanthin möglich (Songsasen et al., 2002). Die Anwesenheit von Energiesubstrat wie Pyruvat oder Glukose im Reifungsmedium scheint die Komplettierung der Meiose von Hundeeizellen zu unterstützen. Dieser Effekt wurde bislang aber nur bei einer sehr kleinen Zahl von Oozyten (n=42) untersucht (Songsasen et al., 2002).

3.4.3.1 In-vitro-Reifungsdauer

Die IVM von Hundeeizellen erfolgt in der Regel für eine Dauer von 24 bis 96 Stunden (Fujii et al., 2000; Hewitt und England, 1997, 1998a, b, c; Mahi und Yanagimachi, 1976; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2000a; Songsasen et al., 2002; Theiss, 1997; Yamada et al., 1992, 1993). Für die Wiederaufnahme und Vollendung der Meiose scheint die Kultivierung für ca. 72 Stunden am geeignetsten zu sein (Fujii et al., 2000; Saint-Dizier, 2001b; Yamada et al., 1992) (Tabelle 34). Durch die Kultivierung für 120 Stunden konnte der Anteil der caninen Oozyten, die die Metaphase II erreichten, nicht gesteigert werden (Fujii et al., 2000). Auch bei der IVM von Eizellen anoestrischer Hündinnen für die Dauer von bis zu 144 Stunden zeigte sich keinerlei Tendenz zu einer Erhöhung der Reifungsrate (Yamada et al., 1992).

Tab. 34: Einfluss der IVM-Dauer auf die meiotische Reifung von Hundeoocyten (nach Fujii et al., 2000)

Reifungs- dauer	Anzahl der Eizellen	Anteil der Oozyten (%) in				
		Germinalvesikel	Diakinese	Metaphase I	Metaphase II	Degeneration
24	22	59	32	9	0	0
48	24	42	21	25	0	13
72	66	26	41	11	11	6
96	30	33	47	0	10	10
120	24	29	46	4	13	8

3.4.3.2 Einfluss von Oozytendurchmesser und Zyklusstadium

Für IVM- und IVF-Studien mit Hundeeizellen wurden bisher hauptsächlich die Eizellen von Tieren in verschiedenen Zyklusstadien gewonnen (Fujii et al., 2000; Hewitt und England, 1998b, c, 1999a, b; Mahi und Yanagimachi, 1976; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2000a, b, 2001; Saint-Dizier et al., 2001a, b; Songsasen et al., 2002; Theiss, 1997). Es ist allerdings bekannt, dass die meiotische Kompetenz boviner Oozyten sowohl von der Größe der Follikel, aus denen sie isoliert wurden, als auch vom Durchmesser der Eizellen selbst abhängig ist (Fair et al., 1995; Lonergan et al., 1994; Otoi, 1997). Eizellen von Mensch, Hamster und Maus erwerben die Fähigkeit zur meiotischen Reifung erst dann, wenn sie ihre Wachstumsphase nahezu abgeschlossen und eine spezifische Größe erreicht haben (Durinzi et al., 1995; Iwamatsu und Yanagimachi, 1975; Sorensen und Wassarman, 1976). Es gibt Hinweise dafür, dass auch bei Hundeeizellen die intrafollikuläre Reifung für den Erwerb der meiotischen Kompetenz von großer Bedeutung ist (England et al., 2001; Yamada et al., 1992, 1993). So konnten von Hundeeizellen in der Follikelphase signifikant mehr Eizellen mit Durchmessern von 120 µm oder mehr isoliert werden als von dioestrischen und anoestrischen Ovarien (Follikelphase > Dioestrus > Anoestrus) (Otoi et al., 2001) (Tabelle 35). Bei der In-vitro-Reifung von Hundeeizellen, deren Durchmesser größer als 100 bzw. 110 µm waren, wurden signifikant höhere Reifungsraten erzielt (Hewitt und England, 1998b; Otoi et al., 2000a; Theiss, 1997) (Tabelle 36).

Tab. 35: Einfluss des Zyklusstadiums zum Zeitpunkt der Ovariengewinnung auf den Durchmesser von Hundeeizellen (nach Otoi et al., 2001)

Zyklusstadium	Anzahl der Hündinnen	Anzahl der Eizellen	Durchschnittlicher Durchmesser der Eizellen (µm)	Anteil (%) der Eizellen nach Durchmesser	
				< 110 µm	≥ 120 µm
Anoestrus	8	219	103,6	69,7	5,5
Dioestrus	8	262	107,7	58,3	13,3
Follikelphase	4	167	119,2	17,8	50,8

Tab. 36: Effekt des Eizelldurchmessers auf die meiotische Reifung caniner Oozyten nach 72-stündiger In-vitro-Kultivierung (nach Otoi et al., 2000a)

	Eizellen nach Durchmesser (µm)			
	< 100	100 bis <110	110 bis <120	</=120
Anzahl der gewonnenen Oozyten	74	107	164	65
Anteil der Oozyten (%) in:				
Germinalvesikel	47,3	44,9	14,0	9,2
Diakinese	5,4	17,8	12,2	18,5
Metaphase I	2,7	14,0	29,9	24,6
Metaphase II	0	0	4,9	21,5
Nicht identifiziert	44,6	23,4	37,2	23,1

Der Anteil der Oozyten, die nach der IVM die Meiose vollendeten, war bei Eizellen von Ovarien in der Follikelphase höher als bei Eizellen von dioestrischen oder anoestrischen Hündinnen. Die Oozyten von dioestrischen Hündinnen zeigten eine signifikant höhere meiotische Kompetenz als die anoestrischer Tiere (Otoi et al., 2001) (Tabelle 37).

Tab. 37: Einfluss des Zyklusstadiums bei der Oozytenisolation auf das Ergebnis der IVM (für 72 Stunden) von Hundeeizellen (nach Otoi et al., 2001)

Zyklusstadium	Anzahl der Hündinnen	Anzahl der Oozyten	Anteil der Oozyten (%) in				Anteil (%) der Oozyten mit nicht identifizierbarem Nukleus
			GV	Diakinese	M I	M II	
Anoestrus	8	219	33,3	24,6	28,3	1,8	11,4
Dioestrus	8	262	29,0	16,0	21,4	4,6	28,2
Follikelphase	4	167	11,4	23,4	26,3	12,0	25,7

GV: Germinalvesikel

M I/II: Metaphase I/II

Yamada et al. (1992, 1993) gewannen mittels Follikelpunktion Eizellen aus antralen Follikeln (Durchmesser > 3 mm) von Hündinnen, die mit exogenem Gonadotropin zur

Superovulation stimuliert wurden (siehe 3.3.2 Induktion der Superovulation). Von diesen Oozyten entwickelte sich *in vitro* ein signifikant höherer Anteil zur Metaphase II, als dies bei Eizellen aus kleinen Follikeln (Durchmesser < 3 mm) anoestrischer Kontrolltieren der Fall war (Kapitel 2.3.2 Superovulation) (Tabelle 38). Der hormonelle Einfluss im Follikel vor der Ovulation stellt bei caninen Eizellen möglicherweise den Haupteinflussfaktor auf ihre Fähigkeit, die Meiose *in vitro* wieder aufzunehmen, dar (Hewitt und England, 1998b; Yamada et al., 1992, 1993).

Tab. 38: Meiotische Kompetenz von Hundeeizellen aus antralen Follikeln hormonstimulierter Hündinnen und von anoestrischen Ovarien (nach Yamada et al., 1993)

Herkunft der Eizellen	Kultivierungsdauer (Stunden)	Anzahl der Eizellen	Anteil der Eizellen (%) in:		
			Germinalvesikel	Metaphase I	Metaphase II
antraler Follikeln hormonstimulierter Hündinnen	0	23	100	0	0
	48	22	68	0	27
	96	43	67	2	28
anoestrische Hündinnen	0	32	100	0	0
	48	91	92	0	8
	96	86	95	0	5
	144	79	91	0	9

Bei Fuchsoozyten sind zur Wiederaufnahme und zur Kontrolle der Meiose *in vitro* lebendige, differenzierte Kumuluszellen erforderlich (Krogenæs et al., 1993). Die Kommunikation der Follikelzellen mit der Eizelle über Gap Junctions scheint Einfluss auf die meiotische Differenzierung und den Erwerb der meiotischen Kompetenz caniner Oozyten zu nehmen (Philips und Dekel, 1991; Luvoni et al., 2001). Auch bei Hundeeizellen scheint die Zellkommunikation mit den Kumuluszellen über Gap Junctions für die Effizienz der IVM von Bedeutung zu sein (Luvoni et al., 2001). Gap Junctions erlauben den Austausch von Nährstoffen, Ionen und kleinen regulatorischen Molekülen wie Kalzium-Ionen oder cAMP zwischen kommunikationskompetenten Zellen (Grazul-Bilska et al., 1997). Es gibt Hinweise, dass bei der Hündin das Zyklusstadium den funktionellen Status der Gap Junctions und somit die

Kommunikation zwischen Kumuluszellen und Eizelle beeinflusst. Luvoni et al. (2001) untersuchten die Kommunikation zwischen Hundeeizellen und den sie umgebenden Kumuluszellen mittels Fluoreszenzdiffusion. Nach der Mikroinjektion von Luziferin-Lösung (Dilithiumsalz 3 % w/v, Sigma Chemical Co) in die Hundeoocyten gab es bei COC's von anoestrischen Hündinnen keine Hinweise auf eine Oocyten-Kumuluszell-Kommunikation. Bei COC's von Hündinnen im späten Prooestrus konnte hingegen bei 89 % Fluoreszenzdiffusion in die Kumuluszellen nachgewiesen werden. Möglicherweise sind nur kommunikationskompetente canine COC's für die IVM geeignet (Luvoni et al., 2001).

3.4.3.3 Supplementation von Serum oder Hormonen

Um die Kultivierungsbedingungen für Hundeeizellen zu optimieren wurde versucht, das Reifungsmedium durch Serum- oder Hormonsupplementation zu verbessern (Hewitt et al., 1998; Hewitt und England, 1997, 1999b; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 1999; Yamada et al., 1993). Bei der In-vitro-Kultivierung von caninen Oocyten wird dem Reifungsmedium routinemäßig ein Anteil von 5 bis 20 % fetalem Kälberserum (FKS) oder 0,3 bis 4 % bovinem Serumalbumin (BSA) zugesetzt (Bolamba et al., 1998; Fujii et al., 2000; Hewitt und England, 1999b; Mahi und Yanagimachi, 1976; Otoi et al., 1999, 2000b; Renton et al., 1991; Saint-Dizier et al., 2001a; Yamada et al., 1992, 1993). Beim direkten Vergleich der verschiedenen FKS- und BSA-Supplementationen erwiesen sich BSA und hohe Konzentrationen FKS als geeignet (Hewitt et al., 1998). FKS und BSA enthalten einige undefinierte Komponenten, die die Proliferation der Oocyten beeinflussen. Die Konzentration dieser Komponenten variiert in Abhängigkeit von der Serumquelle (Bavister, 1995). Bei Rindereizellen wurde ein Zusammenhang von Serumquelle und Kernreifungskinetik nachgewiesen (Nakagawa et al., 1994). Die differierende BSA- und Serumzusammensetzung könnte auch eine Ursache für die relativ große Varianz der Ergebnisse bei der IVM von Hundeeizellen sein. Um diesen Einflussfaktor auszuschließen, untersuchten Songsasen et al. (2002) die Eignung von proteinfreiem Medium für die Reifung von Hundeoocyten. Die Reifungsrate war vergleichbar mit denen früherer Studien, im Durchschnitt entwickelten sich 20 % der Hundeeizellen (n=801) bis zur Metaphase II.

Die Supplementation von LH, FSH oder beiden (je 1 µg/ml) scheint weder den Anteil der Eizellen, die die Meiose wiederaufnehmen, noch die Anzahl der Oozyten, die zur Metaphase I bis II reifen, positiv zu beeinflussen (Hewitt und England, 1999b) (Tabelle 39). Es gibt aber Hinweise darauf, dass die Anwesenheit von LH im Reifungsmedium die Vollendung der Meiose der Hundeeizellen hemmt (Songsasen et al., 2002).

Tab. 39: Einfluss von FSH- und LH-Supplementation auf die IVM von Hundeeizellen (nach Hewitt und England, 1999b)

	Reifungs- dauer	Ohne Gonadotropin	LH (1 µg/ml)	FSH (1µg/ml)	LH + FSH (je 1 µg/ml)
Anzahl der Eizellen	48 Stunden	25	25	31	34
Anteil (%) der Eizellen in:					
GVBD		20	36	45	29
Metaphase I bis II		0	8	0	3
Anzahl der Eizellen	96 Stunden	18	5	25	25
Anteil (%) der Eizellen in:					
GVBD		39	23	28	40
Metaphase I bis II		0	0	12	0

GVBD: Germinalvesikel Breakdown

Nach der Zugabe von Serum oestrischer Hündinnen (10 %) und Östrogen (20 µg/ml) zum Kulturmedium wurde bei ca. 40 % der Hundeeozyten die Extrusion des Polkörperchens beobachtet (Nickson et al., 1993). Diese Reifungsrate ist dem Ergebnis ähnlich, das nach der IVM von Eizellen aus antralen Follikeln hormonstimulierter Hündinnen erzielt wurde (Yamada et al., 1992, 1993). Nach der Supplementation von Östradiol oder Progesteron (je 1 µg/ml) allein bzw. in Kombination konnte allerdings keine Verbesserung der Reifungsrate der caninen Eizellen festgestellt werden. Möglicherweise war die gewählte Konzentration dieser Hormone ungeeignet (Hewitt und England, 1997). Beim Vergleich der Zugabe von Serum oestrischer, anoestrischer oder metoestrischer Hündinnen (5, 10 oder 20 %) bzw. von BSA (0,3 %) zum Kulturmedium, erschien die Supplementation mit 10 %

Serum von Hündinnen im Oestrus optimal (Otoi et al., 1999) (Tabelle 40). Der positive Einfluss der Serumsupplementation könnte auch darin begründet sein, dass im Serum von Hündinnen neben Östradiol und Progesteron weitere Komponenten enthalten sind, die die Entwicklung der Oozyten anregen.

Tab. 40: Einfluss der Supplementation des Kulturmediums mit Serum von Hündinnen in verschiedenen Zyklusstadien in Konzentrationen von 5, 10 bzw. 20 % auf die IVM caniner Eizellen (nach Otoi et al., 1999)

Zyklusstadium bei Gewinnung des Serum	Serumkonzentration (%)	Anzahl der Eizellen	Anteil der Eizellen (%) mit meiotischer Reifung			
			Total	Diakinese	Metaphase I	Metaphase II
Anoestrus	5	52	25,0	11,8	7,7	3,8
	10	44	29,5	18,2	6,8	2,3
	20	36	33,3	16,7	2,8	11,1
Oestrus	5	40	37,5	15,0	7,5	12,5
	10	43	67,4	25,6	23,3	16,3
	20	54	50,0	11,1	24,1	9,3
Metoestrus	5	37	27,0	8,1	5,4	8,1
	10	33	30,3	15,2	6,1	9,1
	20	38	39,5	18,4	5,3	13,2
Kontrolle	0	51	35,3	9,8	21,6	3,9

Die kombinierte Zugabe von Gonadotropinen und Steroidhormonen zum Reifungsmedium von Hundeozyten wurde bisher noch nicht untersucht (Hewitt und England, 1999b).

3.4.3.4 Kultivierung mit Eileiterflüssigkeit oder Eileiter-Epithelzellen

Bei einigen Spezies ist bekannt, dass die Komponenten der Oviduktflüssigkeit einen wichtigen Einfluss auf die Fertilisation und die frühe Embryonalentwicklung haben (Brackett und Mastroianni, 1974; David et al., 1969; Gardner und Leese, 1990; Gould, 1974; Mastroianni et al., 1970; Moghissi, 1970). Bei Oozyten von Kaninchen

konnte durch Zugabe von Eileiter- oder Uterusflüssigkeit zum Kulturmedium die Fertilisationsrate *in vitro* signifikant gesteigert werden (Brackett und Williams, 1965). Speziell bei Hundeeizellen, die als primäre Oozyten ovuliert werden und bei denen sich die Reifung und Fertilisation im Eileiter vollzieht, könnten Eileiterkomponenten essentiell für die meiotische Entwicklung sein. Ein *In-vitro*-Modell, das die Umgebung des Eileiters nachahmt, könnte möglicherweise zur Verbesserung der Effizienz von IVM und IVF bei Hundeeizellen beitragen (Tsutsui, 1989; Hewitt und England, 1999a).

Für die *In-vitro*-Kultivierung von bovinen und ovinen Oozyten wurde eine synthetische Oviduktflüssigkeit (Synthetic oviductal fluid = SOF) (Anhang 7.2.2.9) etabliert, die in ihrer Zusammensetzung der Eileiterflüssigkeit dieser Spezies ähnliche ist (Tervit et al., 1972). Die Zusammensetzung der Eileiterflüssigkeit variiert allerdings zwischen den einzelnen Spezies und sie ist auch abhängig vom jeweiligen Zyklusstadium (Brackett und Mastroianni, 1974; David et al., 1969; Gardner und Leese, 1990; Mastroianni et al., 1970; Moghissi, 1970). Möglicherweise sind diese Differenzen die Ursache dafür, dass SOF die Reifungsrate von Hundeeozyten nicht verbessern konnte (Hewitt und England, 1999a).

Nach der Ovulation kommt es im Eileiter zum physikalischen Kontakt zwischen den Epithelzellen und den Oozyten bzw. Embryonen (Elliott, 1974). Die Kultivierung von Hundeeozyten in der Anwesenheit von caninen Eileiter-Epithelzellen war ein weiterer Ansatz, ihre meiotische Kompetenz zu steigern. Für die Gewinnung der Epithelzellen wurden die Eileiter von Hündinnen nach der OH vom Ovargewebe getrennt und mit Kulturmedium (HEPES-gepuffertes modifiziertes TCM 199; Anhang 7.2.2.5) gewaschen. Beim Vergleich verschiedener Methoden zur Gewinnung von epithelialen Eileiterzellen (Spülen, ausstreichen mit Zange, abschaben der Oberfläche des eröffneten Eileiters mit Skalpell oder Objektträger) erwies sich das Abschaben der Eileiteroberfläche mittels Skalpellklinge als effizienteste Methode. Aus diesem Grund wurde diese Technik für die weiteren Untersuchungen angewendet (Hewitt und England, 1999a). Die Co-Kultivierung der Hundeeozyten erfolgte mit durchschnittlich 6×10^4 Eileiter-Epithelzellen in 400 μ l Kulturmedium (modifiziertes TCM 199-HEPES oder Co-Kultur-Medium; Anhang 7.2.2.8).

Der Anteil der Hundeeizellen, die sich bis zur Metaphase I bis II entwickelten, war nach 96-stündiger Kultivierung im Co-Kultursystem höher als bei der IVM ohne die Anwesenheit epithelialer Eileiterzellen, die Reifungsrate lag jedoch auch hier nur bei maximal 9 %. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Epithelzellen für die Co-Kultivierung von Hündinnen in unterschiedlichen Zyklusstadien gewonnen (Hewitt und England, 1999a). Die Eileiterzellen zeigen unter Östrogen-Einfluss im Prooestrus und Oestrus ein anderes Sekretionsmuster als in anderen Zyklusstadien. Es wäre denkbar, dass durch die Co-Kultivierung mit den Eileiter-Epithelzellen häufiger Hündinnen die meiotische Kompetenz der Hundeeizellen deutlicher verbessert werden könnte (Hewitt und England, 1999a; O'Day-Bowman et al., 1996). Möglicherweise ist die Co-Kultivierung mit epithelialen Eileiterzellen aber auch ungeeignet, um die Eileiterumgebung in vitro nachzuahmen, da sich im Kultursystem nur eine limitierte Zahl von Zelltypen formiert und so nur eine geringe Sekretionshöhe erreicht wird (Hewitt und England, 1999a).

3.4.3.5 In-vitro-Reifung in caninen Follikeln

Mit dem Ziel, die In-vitro-Kulturbedingungen für caninen Oozyten zu optimieren, untersuchten Durrant et al. (1998) eine Methode zur IVM ganzer Follikeln. Die Isolation der caninen Follikel erfolgte hierbei durch enzymatische Verdauung (Durrant et al., 1998). Ein großer Anteil der Eizellen aus präantralen und frühen antralen Follikeln besaß die für präovulatorische Oozyten typischen dichten zytoplasmatischen Lipidcharakteristika. Das Zyklusstadium der Hündinnen beeinflusste die Follikelqualität nicht (Bolamba et al., 1998; Durrant et al., 1998) (Anhang 7.3).

Nach der In-vitro-Kultivierung präantraler und früher antraler Follikeln (152 bis 886 µm Durchmesser) entwickelten sich maximal 11,5 bzw. 8,7 % der Eizellen bis zur Metaphase I bis II. Die Effizienz dieser Methode war somit nicht besser als die mit herkömmlichen Kultivierungssystemen (Bolamba et al., 1998) (Tabelle 41).

Tab. 41: Ergebnisse der IVM von Hundeoocyten nach Kultivierung in präantralen Follikeln und frühen antralen Follikeln (nach Bolamba et al., 1998)

	Kultivierungs- dauer (Stunden)	Anzahl der Eizellen	Anteil der Oozyten (%) in			Anteil degenerierter Oozyten (%)
			GV	GVBD-DK	Metaphase I/II	
präantrale Follikel	0 (Kontrolle)	318	59,1	19,2	0,9	20,7
	24	374	32,1	27,8	5,3	34,7
	48	407	40,8	18,7	11,5	29,0
	72	407	35,4	24,8	9,9	30,0
frühe antrale Follikeln	0 (Kontrolle)	108	57,4	27,8	0,9	13,9
	24	115	39,1	23,5	0,9	36,5
	48	126	38,9	28,6	8,7	23,8
	72	106	28,3	34,9	7,5	29,2

GV: Germinalvesikel

GVBD-DK: Germinalvesikel Breakdown-Diakinese

3.4.4 In-vitro-Fertilisation (IVF) von Hundeoocyten

3.4.4.1 Präparation von Hundeoocyten für die IVF

Bei den bisherigen IVF-Studien mit Hundeoocyten wurden sowohl frisch gewonnene als auch für 24 bis 72 Stunden vorkultivierte Oozyten verwendet (Mahi und Yanagimachi, 1976; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2000a, b; Saint-Dizier et al., 2001a, b; Songsasen et al., 2002; Theiss, 1997; Yamada et al., 1992, 1993).

Die Dauer der vorangegangenen IVM der Hundeeizellen scheint Einfluss auf ihre Fähigkeit zur Interaktion mit den Spermien zu haben. Bei 24 Stunden vorgereiften Hundeoocyten wurde innerhalb einer Inkubationsdauer von bis zu 12 Stunden nach der IVF keine Spermienanheftung beobachtet. Bei 48 und 72 Stunden vorgereiften Eizellen war dies unmittelbar nach der Zugabe der Spermien der Fall. Eine Stunde später kam es bei diesen Oozyten zur Penetration der Zona pellucida, nach weiteren 11 Stunden wurde Pronukleusformation beobachtet. Hundeeizellen scheinen demnach eine IVM-Dauer von mindestens 24 Stunden zu benötigen, bevor ihre

Penetration und Befruchtung möglich ist. Nach einer IVM-Dauer von 48 bis 72 Stunden scheint sich allerdings die Oozyten-Kumulus-Assoziation zu verschlechtern, während sich bei spontan ovulierten Hundeoocyten die Kumuluszellen nicht vor ihrem fünften Tag in Kultur lösen. Ursachen könnten Defizite im Kulturmedium oder der Reifezustand der Oocyten sein (Nickson et al., 1993).

3.4.4.2 Präparation der Hundespermien für die IVF

Für die In-vitro-Fertilisation (IVF) von Hundeeizellen wurde vorwiegend Nativsperma verwendet, von dessen spermienreicher Fraktion das Seminalplasma durch zweimalige Zentrifugation und Resuspension (in Brackett-, Oliphant-, BWW-Medium, CCM oder MCM; Anhang 7.4.1) entfernt wurde (Mahi und Yanagimachi, 1976; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2000a; Songsasen et al., 2002; Yamada et al., 1992, 1993). In wenigen Studien wurde zum Separieren der motilen von den geschädigten und unbeweglichen Hundespermien das "swim-up"-Verfahren (Anhang 7.4.2) durchgeführt. Diese Methode scheint allerdings beim Hund wegen der geringen Viskosität des Spermas nicht sehr effektiv zu sein (Mahi-Brown, 1991; Nickson et al., 1993; Songsasen et al., 2002).

Werden Hundespermien direkt nach dem Waschen zu den Eizellen gegeben, kommt es erst nach einigen Stunden Kultivierung zur Penetration der Zona pellucida, da die Spermien erst die Kapazitation durchlaufen müssen (Mahi und Yanagimachi, 1976). Aus diesem Grund werden Hundespermien für gewöhnlich in Kulturmedium (CCM; THY-Medium; Brackett-Oliphant- oder modifiziertem TCM 199-Medium) bei 37 bis 38°C in wasserdampfgesättigter CO₂ Atmosphäre (5 %) präinkubiert (Mahi und Yanagimachi, 1978; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2000a; Songsasen et al., 2002; Theiss, 1997; Yamada et al., 1992, 1993).

Der Ablauf der Kapazitation und der akrosomalen Exozytose von Hundespermien in vitro und die hierfür erforderlichen Kulturbedingungen sind nicht völlig geklärt (Hewitt und England, 1999c; Shimazu et al., 1992; Yamada et al., 1992). Bei Präinkubation in caninem Kapazitationsmedium (CCM) (Anhang 7.4.1.3) benötigen canine Spermien mindestens sieben Stunden für ihre Kapazitation (Mahi und Yanagimachi, 1978). In mTHY-Medium (Anhang 7.2.1.2) ist die Zeitdauer, die für die Kapazitation

erforderlich ist, mit ca. vier bis fünf Stunden wesentlich kürzer (Schimazu et al., 1992; Yamada et al., 1992). Als mögliche Ursache dafür kommt die höhere Albuminkonzentrationen in mTHY-Medium (mTHY: 4 mg/ml; CCM: 2 mg/ml) in Frage, da Albumin Cholesterole bindet, dessen Entfernung aus der Zellmembran für die Membranfusion erforderlich ist (Davis, 1981).

Auch bei der Anwesenheit des divalenten kationischen Ionophors A 23187 lief die In-vitro-Kapazitation von Hundespermien schneller ab (Hewitt und England, 1998c). Durch A 23187 kommt es zum Kalzium-Influx in die Zellen und zur Bildung von lipophilen Komplexen mit Ca-Ionen, die durch die Plasmamembran der Spermien transportiert werden (Aitken et al., 1984; Green, 1978; Tesarik, 1985). Die Zugabe von Glycosaminoglycanen (GAG) aus dem Reproduktionstrakt von Hündinnen zum Kapazitationsmedium begünstigte die Geschwindigkeit der Kapazitation von Hundespermien ebenfalls (Kawakami et al., 1999). Da die GAG-Konzentration im Reproduktionstrakt oestrischer Hündinnen signifikant höher ist als bei anoestrischen Tieren, liegt die Vermutung nahe, dass Glycosaminoglycane auch in vivo mit der Spermienkapazitation assoziiert sind (Kawakami et al., 1999). Hewitt und England (1999c) versuchten mittels der dualen Fluoreszenzfärbung mit Chlortetracyclin (CTC) und Hoechst 33258 (siehe 3.2.2.5 Plasmamembranintegrität und akrosomaler Status), die optimalen Kulturbedingungen für canine Spermien zu bestimmen. Hierfür verglichen sie canines Kapazitationsmedium (CCM; Anhang 7.4.1) mit modifiziertem Tyrodesmedium (TALP, TALP-Hepes; Anhang 7.4.1) bei den pH-Werten 7,4 und 7,8. Die Kultivierung erfolgte bei 20 bzw. 39°C für bis zu acht Stunden. Bei 39°C verliefen Kapazitation und Akrosomenreaktion schneller. Der Anteil akrosomenreagerter Spermien war bei dieser Temperatur nach acht Stunden Kultivierung bei einem pH-Wert von 7,8 signifikant höher. Außerdem gab es Hinweise darauf, dass die Inkubation in Medium mit einem pH-Wert von 7,8 auch die Spermienkapazitation unterstützt. Um die Bedingungen, die im weiblichen Reproduktionstrakt angetroffen werden, in vitro nachzuahmen, ist möglicherweise ein Kompromiss erforderlich, denn idealerweise sollte es in vitro zur Begünstigung der Kapazitation aber gleichzeitig auch zur Limitation der spontan auftretenden Akrosomenreaktion kommen, da dies auch im Eileiter die Wahrscheinlichkeit, dass es zur Fertilisation der Oozyten kommt, erhöht (Hewitt und England, 1999c).

Tab. 42: Präparation von Hundespermien für die IVF

Behandlung des Spermias vor der Zugabe zu den Oozyten	Spermien/ml bei		Quelle
	Kapazitation	IVF	
In BWW- Medium direkt zu den Oozyten	--	$1-5 \times 10^6$	Mahi und Yanagimachi, 1976
sieben Stunden Inkubation in CCM bzw. MCM	5×10^6	5×10^6	Mahi und Yanagimachi, 1978
fünf Stunden Inkubation in mTHY-Medium	$6-40 \times 10^7$	$5-10 \times 10^5$	Yamada et al., 1992, 1993
eine Stunde "swim up" in modifiziertem TCM 199	1 ml Sperma 3 ml Medium	5×10^5	Nickson et al., 1993
vier Stunden Inkubation in mTHY	5×10^7	1×10^7	Theiss, 1997
bis acht Stunden Inkubation CCM oder modifiziertem Tyrodesmedium (pH 7,4 / 7,8) bei 20 bzw. 39 °C	--	$5-10 \times 10^6$	Hewitt und England, 1999c
fünf Stunden Inkubation in Brackett-Oliphant-Medium	KA	1×10^6	Otoi et al., 2000a, b
in TCM 199-Medium direkt zu den Oozyten	--	1×10^6	Saint-Dizier et al., 2001a, b
"swim up" in TALP-HEPES, dann vier Stunden in CCM	1×10^7	von 10^7 /ml 10 µl in 90 µl	Songsasen et al., 2002

CCM: Canines Kapazitationsmedium

KA: keine Angaben

MCA: Minimales Kapazitationsmedium

Die Präinkubation von Hundespermien im Kapazitationsmedium wurden bisher in Konzentrationen von 5×10^6 und 6 bis 40×10^7 durchgeführt (Mahi und Yanagimachi, 1978; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2000a; Songsasen et al., 2002; Theiss, 1997;

Yamada et al., 1992, 1993). Der Einfluss der Spermienkonzentration auf die erforderliche Dauer für die In-vitro-Kapazitation und deren Effizienz wurde bisher noch nicht untersucht (Schimazu et al., 1992) (Tabelle 42).

3.4.4.3 Fertilisation und Pronukleusformation in vitro

Bei der IVF werden die caninen Eizellen mit ca. $0,5$ bis 10×10^6 Hundespermien pro Milliliter Kultivierungsmedium (mTCM; Brackett-Oliphant-Medium; IVC; Anhang 7.2.2.2, 7.4.1.1, 7.2.1.10) fertilisiert und mit diesen bei 37 bis $38,5^\circ\text{C}$ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO_2 co-kultiviert (Mahi und Yanagimachi, 1976; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2000a; Songsasen et al., 2002; Theiss, 1997; Yamada et al., 1992, 1993). Nickson et al. (1993) transferierten die Hundeeizellen für die IVF auf einen Monolayer caniner Eileiter-Epithelzellen, da sie zu dem Ergebnis kamen, dass dadurch die Motilität und Fertilisationskapazität der Hundespermien im Co-Kultursystem besser erhalten bleiben (Nickson et al., 1993).

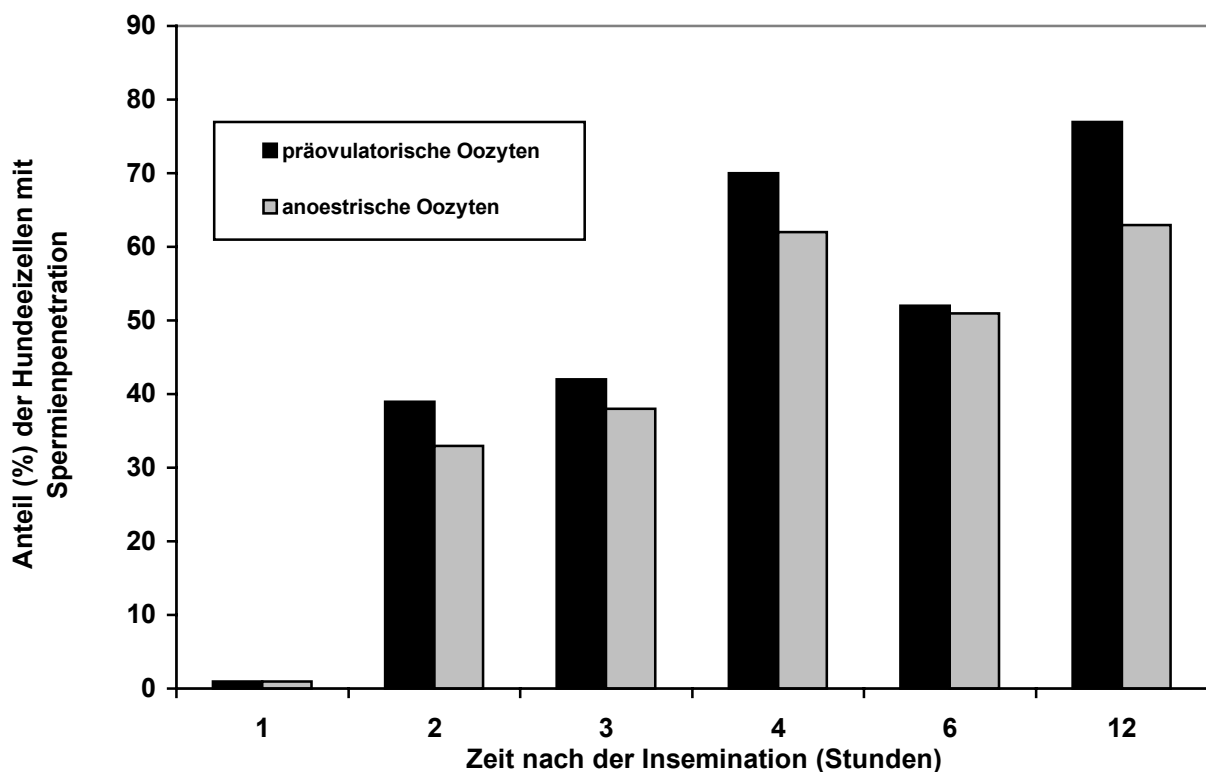
Canine Spermien sind in vitro in der Lage, Hundeoocyten unabhängig von deren Entwicklungsstadium zu penetrieren. Sowohl bei Hundeeizellen im GV-Stadium als auch bei in vitro gereiften und selbst bei leicht degenerierten Eizellen kann es zur Spermienpenetration kommen (Mahi und Yanagimachi, 1976; Yamada et al., 1992, 1993). Die beobachtete Spermienpenetrationsrate ist häufig sehr hoch. Bei Mahi und Yanagimachi (1976) kam es nach der Co-Kultivierung für 11 bis 24 Stunden bei 73% der vorgereiften Hundeeizellen (IVM 24 bis 72 Stunden) zur Spermienpenetration, bei frisch gewonnenen Oocyten lag der Anteil bei $77,6\%$. Eine Dekondensation der Spermienköpfe war jedoch nur bei $21,6\%$ ($n=310$) der Eizellen zu beobachten.

Nach der IVF in vitro gereifter Oocyten (für 48 bis 72 Stunden) aus antralen Follikeln (Durchmesser > 3 mm) hormonstimulierter Hündinnen (siehe 3.3.2 Induktion der Superovulation) und aus Follikeln von anoestrischen Tiere (Durchmesser < 3 mm), wurden nach einer ein- bis zweistündigen Befruchtungsphase gleich hohe Penetrationsraten beobachtet (Yamada et al., 1992, 1993) (Abbildung 6). Hierbei kam es häufig zu Polyspermie (bis zu ca. 60% der fertilisierten Oocyten). Der ursächliche Faktor für die hohe Polyspermierate könnte eine Fehlfunktion der kortikalen Granula sein (Moore, 2001; Niemann und Meinecke, 1993; Otoi et al.,

2000a; Songsasen et al., 2002; Yamada et al., 1992, 1993).

Obwohl es unabhängig vom Reifezustand der Hundeoocyten zur Spermienpenetration kommen kann, scheint das Reifestadium, das die Eizellen vor der IVF in vivo erlangt haben, Einfluss auf die weitere Entwicklung zu haben. Acht Stunden nach der IVF von Oozyten aus antralen Follikeln entwickelten sich die ersten männlichen Pronuklei. Nach 12 Stunden waren bei 37 % (17 von 46) dieser Eizellen männliche und weibliche Pronuklei anzutreffen, bei Eizellen aus Follikeln anoestrischer Tiere war dies nur bei 2 % (1 von 50) der Fall. Somit steigert die intrafollikuläre Entwicklung der Eizellen im antralen Follikel – trotz des unreifen Zustandes der Hundeoocyten zum Zeitpunkt der Ovulation – ihre In-vitro-Entwicklungskompetenz (Yamada et al., 1992, 1993). Männliche Vorkerne waren nur in Eizellen anzutreffen, in denen es auch zur Entwicklung des weiblichen Pronukleus kam (Yamada et al., 1992).

Abb. 6: Spermienpenetration bei in vitro gereiften Eizellen (48 bis 72 Stunden) aus antralen Follikeln hormonstimulierter Hündinnen und aus Follikeln anoestrischer Tiere nach ihrer (nach Yamada et al., 1993)



Während eine klare Beziehung zwischen dem Eizelldurchmesser zum Zeitpunkt der Gewinnung und der meiotischen Kompetenz von Hundeeizellen besteht, wurde ein solcher Zusammenhang bei der Spermienpenetration nicht beobachtet. Die Hundeoocyten erlauben die Penetration von Spermien unabhängig von ihrem Durchmesser (Otoi et al., 2000a) (Tabelle 43).

Tab. 43: Einfluss des Eizelldurchmessers auf die Spermienpenetration (nach Otoi et al., 2000a)

Oozyten- durchmesser (μm)	Anzahl der Oozyten	Anteil der Eizellen (%) mit Spermienpenetration			Nicht identifizierbar (%)
		gesamt	Monospermie	Polyspermie	
< 100	52	10	4	6	69
100 bis < 110	96	25	13	13	50
110 bis < 120	79	22	14	8	34
120 und mehr	40	20	10	10	55

Es ist nicht geklärt, ob sich der Ablauf der Spermienpenetration und die anschließende Entwicklung bei unreifen und reifen Hundeoocyten unterscheiden (Yamada et al., 1993). Mahi und Yanagimachi (1976) konnten bei in vitro fertilisierten unreifen Hundeeizellen die Dekondensation von Spermienköpfen beobachten. Andere Autoren berichteten nur von einer moderaten Vergrößerung des Spermienkopfes im Ooplasma von Hundeoocyten im GV-Stadium (Saint-Dizier et al., 2001a, b; Yamada et al., 1992, 1993). Zur Formation des männlichen Pronukleus kommt es erst, wenn auch das weibliche Chromatin das Pronukleusstadium erreicht hat (Saint-Dizier et al., 2001a; Yamada et al., 1992, 1993). Es wird angenommen, dass während der caninen Eizellreifung die gleichen Zytoplasmafaktoren die Transformation von männlichem und weiblichem Chromatin bewirken (Saint-Dizier et al., 2001a).

Die In-vitro-Spermienpenetration im frühen GV-Stadium hatte einen gewissen stimulierenden Effekt auf die Wiederaufnahme der Meiose in vitro, für die Vollendung der meiotischen Reifung in vitro scheinen aber andere Faktoren entscheidend zu sein (Saint-Dizier et al., 2001a, b) (Tabelle 44).

Tab. 44: Übersicht über die IVF-Ergebnisse bei Hundeeizellen

Dauer der (Stunden)		Anzahl der Eizellen	Anteil der Oozyten (%) mit			Quelle
IVM	IVF		Spermienpenetration	Pronukleus	Zellteilung	
0	11-24	77	77,6 (Zona)	27,3	0	Mahi und Yanagimachi, 1976
24-72	11-24	240	73,0 (Zona)	19,7	0	
72	12	59	78,0	37,0	15,0	Yamada et al., 1992, 1993
	48	41				
	72	62				
	96	45				
24	1	10	0	0	0	Nickson et al., 1993
24	12	18	44	0		
48	1	56	50	0		
48	12	40	100	37,5		
72	1	4	100	0		
72	12	12	83	20,0		
0	24	103	1	0	0	Theiss, 1997
72	20	267	50	40	0	Otoi et al., 2000a
72	10 Tage	217	75		15,7	Otoi et al., 2000b
24	24		60	18,3	0	Saint-Dizier et al., 2001a, b
48	24	103	33,9	5,5	8,2	Songsasen et al., 2002
		85				

3.4.5 In-vitro-Kultivierung (IVC) befruchteter Hundeeizellen

Die erste Zellteilung einer Hundeeizelle in vitro gelang nach der Kultivierung von in vivo fertilisierten Eizellen. Diese wurden von einer fünf Tage nach der Ovulation euthanasierten Hündin durch Spülen des Reproduktionstraktes gewonnen. In einem Fall kam es zur Entwicklung aus dem Ein-Zell- bis zum Morula-Stadium. Die erste Teilung wurde 23 Stunden nach der Gewinnung beobachtet, zu weiteren Teilungen kam es nach 48, 96 bzw. 120 Stunden (Renton et al., 1991).

Nur einige wenige Forschungsgruppen berichteten über die Entwicklung von frühen Hundeembryonen nach der In-vitro-Reifung und -Fertilisation (Yamada et al., 1992; Otoi et al., 2000b; England et al., 2001; Songsasen et al., 2002). Die in vitro fertilisierten Hundeoocyten wurden hierbei nach ca. 15 bis 20 Stunden Befruchtungsphase in frisches Kulturmedium (Anhang 7.2.2) umgesetzt. Der maximale Anteil der Oozyten, bei denen Zellteilung beobachtet wurde, lag bei 28,4 % (42 von 148). Die Eizellen für diese Untersuchung wurden von antralen Follikeln nach hormoneller Stimulation der Superovulation gewonnen (Yamada et al., 1992). Zwei der Embryonen entwickelten sich bis zum Acht-Zell-Stadium (Yamada et al., 1992) (Tabelle 45). Es existiert bislang nur ein Bericht über die Entwicklung eines Hundeembryos nach der IVF über dieses Stadium hinaus. Hierbei erfolgte nach der IVM (72 Stunden) die sechsstündige Co-Kultivierung mit kapazitierten Hundespermien und im Anschluss der Transfer der fertilisierten Oozyten auf eine Schicht boviner Kumuluszellen. Neun Tage nach der Insemination wurde die Entwicklung einer Blastozyste beobachtet (Otoi et al., 2000b).

Tab. 45: Entwicklungsrate von in vitro gereiften und fertilisierten Hundeoocyten (nach Yamada et al., 1992)

Stunden nach der Insemination	Anzahl der Oozyten	Anteil der Oozyten (%) die sich entwickelten zum Stadium:				
		Ein-Zell	Zwei-Zell	Vier-Zell	Sechs-Zell	Acht-Zell
48	41	85	10	0	0	0
72	62	66	10	11	2	2
96	45	67	9	9	4	2

3.4.6 Intrazytoplasmatische Spermien-Injektion (ICSI)

Beim Menschen wird die intrazytoplasmatische Spermien-Injektion (ICSI) bei bestimmten Formen der Unfruchtbarkeit des Mannes zur IVF benutzt. Die ICSI erlaubt die Fertilisation mit immobilisierten Spermien und ermöglicht die Fusion von Nuklei in verschiedenen Entwicklungsstadien (Farstad, 2000b). Die Durchführbarkeit der ICSI bei Hundeeizellen wurde von Fulton et al. (1998) untersucht.

Die Hundeeizellen für die ICSI wurden mittels enzymatischer Digestion (Kollagenase/DNAse) von frischen Ovarien gewonnen und für 48 Stunden in modifiziertem TCM 199 (Anhang 7.2.2.7) gereift. Die ICSI erfolgte bei Oozyten, bei denen es zur Formation des ersten Polkörperchens kam. Diese Eizellen wurden mit einer feinen Glaspipette denudiert. Über Nacht gelagerte Spermien wurden durch Zentrifugation im Percoll-Dichtegradienten (45 bis 90 %) für die Injektion vorbereitet und in 10 µl 10 %-igem Polyvinylpyrrolidon suspendiert. Eine einzelne immobilisierte Spermienzelle (Brechen des Schwanzes durch Schlag mit der Spitze der Injektionspipette) wurde mit dem Schwanz zuerst in die Injektionspipette aspiriert. Unmittelbar vor Penetration der ZP wurde überflüssige Flüssigkeit aus der Injektionspipette entfernt. Vor der Injektion wurde eine kleine Menge des Ooplasmas aspiriert. Nach der Spermieninjektion wurde die Pipette entfernt. Bei Kontrolloozyten erfolgte die Injektion von Medium. Die fertilisierten Eizellen wurden zurück in Medium (Anhang 7.2.2.7) verbracht und für 12 Stunden bei 38°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. Nach Essigsäure-Ethanol-Fixation und Aceto-Orcein-Färbung (Anhang 7.6.2) erfolgte die lichtmikroskopische Auswertung (Fulton et al., 1998).

Bei 42,1 % (16 von 38) der mittels ICSI fertilisierten Eizellen war dekondensiertes Spermienchromatin zusammen mit einem weiblichen Pronukleus anzutreffen, in 7,8 % der Oozyten (3 von 38) waren sowohl männliche als auch weibliche Pronuklei vorhanden, Zellteilung wurde nicht beobachtet (Fulton et al., 1998). Diese Untersuchung zeigte, dass die ICSI beim Hund prinzipiell möglich ist. Um die Methode zu etablieren, sind aber die Verbesserung der Fertilisationsrate einerseits, die Optimierung der In-vitro-Produktion von caninen Embryonen andererseits erforderlich. Bei Kombination der ICSI mit der IVM, der IVC von Embryonen und dem

Embryonentransfer wäre die Möglichkeit gegeben, bestimmte Formen der Infertilität bei Rüden zu überwinden. Diese Methode würde außerdem eine Möglichkeit eröffnen, das genetische Material bedrohter Carnivoren zu konservieren (Fulton et al., 1998).

3.4.7 Entwicklungsblock in vitro

Bei vielen Spezies, bei denen Untersuchungen zur In-vitro-Produktion von Embryonen erfolgten, wurde von einem In-vitro-Entwicklungsblock berichtet. Dieser meiotische Block scheint speziesspezifisch in verschiedenen Embryonalstadien einzutreten (McGinnis und Youngs, 1992; Sparks et al., 1992; Wright und Bondioli, 1981). Bei der IVC boviner und oviner Embryonen war es möglich, diese Entwicklungsblockade durch die Etablierung eines speziellen Kultursystems zu überwinden (Gandolfi und Moor, 1987; Eyestone und First, 1989). Ob und in welchem Entwicklungsstadium eine derartige Blockade auch bei der In-vitro-Kultivierung von Hundeoocyten auftritt, ist nicht bekannt. Es ist denkbar, dass die Aktivierung des embryonalen Genoms, die bei Hundembryonen in vivo im Acht-Zell-Stadium erfolgt, bei der Blockade der In-vitro-Entwicklung der Embryonen eine Rolle spielt (Bysted und Greve, 2000). Die bisherigen Informationen, die über die In-vitro-Kultivierung von Hundembryonen zur Verfügung stehen, lassen wegen ihres eher anekdotischen Charakters allerdings keinen Rückschluss auf die Existenz eines derartigen In-vitro-Entwicklungsblock bei dieser Spezies zu (Farstad, 2000b).

3.5 Embryonentransfer (ET)

Über den Embryonentransfer (ET) bei Hündinnen existieren nur einige wenige Berichte (England et al., 2001; Kinney et al., 1979; Takeishi et al., 1980; Tsutsui et al., 1989b, 2001a, b; Westhusin et al., 2001). Da bislang keine effektiven und reproduzierbaren Protokolle zur Zyklussynchronisation für Hündinnen zur Verfügung stehen, erfolgte der ET in der Regel zwischen Tieren, deren angenommener spontaner Ovulationszeitpunkt eng beieinander lag (max. vier Tage Differenz) (Tsutsui et al., 2001b).

3.5.1 Embryonengewinnung aus Eileiter oder Uterus

Die Embryonengewinnung kann bei der Hündin in situ durch das Spülen der Uterushörner mittels Foley-Katheter (8 F oder 10 F) durchgeführt werden. Dieser Eingriff erfolgt in Vollnarkose. Hierbei wird durch ein starres Stilett, das durch die Vulva in den Vaginalkanal eingeführt wurde, ein Katheter geleitet. Nach medioventraler Laparotomie wird der Katheter palpatorisch an der äußeren Zervixöffnung lokalisiert, durch die Zervix hindurch in das Uteruslumen geführt und in einer Entfernung von ca. zwei Zentimeter vor der Uterusbifurkation positioniert. Nach Entfernung des Stiletts wird die Ballonmanschette des Katheters aufgeblasen. Das Spülen des Uterushorns erfolgt durch mehrmalige Injektion von Spüllösung (ca. 10 ml PBS) etwa vier Zentimeter von der uterotubalen Verbindung entfernt. Die durch den Katheter abfließende Spüllösung wird in einer Petrischale aufgefangen. Um die Embryonen dem jeweiligen Ovar zuordnen zu können, wird während des Spülens jeweils das ipsilaterale Uterushorn abgeklemmt. Durch die Anzahl der vorhandenen Corpora lutea kann die Ovulationsrate bestimmt werden (Archbald et al., 1980; Kinney et al., 1979; Tsutsui et al., 2001a).

Die beachtliche Proliferation des Endometriums zum Zeitpunkt der Anwesenheit von Embryonen im Reproduktionstrakt der Hündin macht es schwer, das Uteruslumen in situ zu spülen. So erfolgte in einigen Untersuchungen die Gewinnung der Embryonen durch Spülung der exzidierten Eileiter bzw. Uteri (mit Ringerlösung + 20 % caninem Serum) (Archbald et al., 1980; Thun et al., 1977; Tsutsui et al., 1989b, 2000a, b).

Beim Vergleich der beiden Methode zur Embryonengewinnung war der Anteil der durchschnittlich gewonnenen Embryonen (Anzahl der Embryonen in Relation zur Anzahl der Corpora lutea) bei der Exzisionsmethode mit 95 bis 99 % signifikant höher als bei der In-situ-Methode mit 38 bis 42 % (Tsutsui et al., 2001a, b) (Tabelle 46).

Tab. 46: Rate der Embryonengewinnung nach Uterusexzision und nach Uterusspülung in situ im Rahmen der Laparotomie (nach Tsutsui et al., 2001a, b)

Art der Embryonengewinnung	Anzahl der Tiere	Tag der Gewinnung nach der Ovulation	Anzahl der C.II. pro Tier	Anzahl pro Tier gewonnener Embryonen	Gewinnungsrate (%)	Zellstadium
Uterusexzision ^a	3	3	7-9	7-9	100	1
	3	4	8-10	8-10	100	1 bis 8
	1	5	6	5	83	2 bis 4
	2	6	7-9	je 7	78-100	2 bis 8
	1	7	6	5	83	8
Gesamt ^a :	10		77	73	95	
Uterusexzision ^b	6	8	7-11	7-11	100	8 bis 16
	7	9	6-12	5-12	83-100	16 bis B
	2	10	7-11	7-11	100	KM, B
	1	11	8	8	100	KM
	Gesamt ^b :	16		145	141	99
Spülung in situ ^a	1	5	7	3	43	1
	1	6	8	3	38	1
	1	7	6	2	33	8
	Gesamt ^a :	3		21	8	38
Spülung in situ ^b	2	10	7	1-5	14-71	KM
	1	11	12	5	42	KM
	Gesamt ^b :	3		26	11	42

B: Blastozyste
 KM: Kompaktmorula

a: Tsutsui et al., 2001a; b: Tsutsui et al., 2001b

Die Gewinnung der Hundeembryonen erfolgte in den verschiedenen Studien ca. fünf bis 11 Tage nach der Ovulation bzw. drei bis 15 Tage nach der Paarung (Kinney et al., 1979; Tsutsui et al., 1989b, 2001a, b). Je nach Zeitpunkt der Gewinnung setzte sich die Population aus Eizellen im Ein-Zell-Stadium bis Embryonen im Morula- oder Blastozysten-Stadium zusammen (Archbald et al., 1980; Kinney et al., 1979; Tsutsui et al., 2001a, b).

3.5.2 Transfer der Embryonen

Der erste Nachweis, dass weibliche Tiere der Spezies *Canis familiaris* Embryonen von anderen weiblichen Tieren der selben Spezies akzeptieren, wurde von Kinney et al. (1979) erbracht. In dieser Untersuchung erfolgte der Transfer der Embryonen chirurgisch in den Uterus der Empfängertiere. Bei zwei von fünf Tieren kam es nach dem Transfer von insgesamt 28 Embryonen zur Geburt von einem bzw. zwei Welpen (Kinney et al., 1979).

In den ET-Studien von Tsutsui et al. (1989b, 2001b) erfolgte der Transfer der Embryonen nach medioventraler Laparotomie durch eine mittels Injektionsnadel hergestellte Punktion in die Spitze des Uterushorns, auf dessen Seite auf dem Ovar die höhere Anzahl Corpora lutea vorhanden war (Tsutsui et al., 1989b, 2001b). Tsutsui et al. (1989b) berichteten über die Geburt von zwei Welpen 54 Tage nach dem Transfer von acht Hundeembryonen im Morula-Stadium. Bei der Untersuchung der Implantationsstellen zeigte sich, dass es vom Ort der Transplantation zur intrauterinen Migration in das gegenüberliegende Uterushorn gekommen war. Nach dem Transfer von Blastozysten kam es nicht zur Trächtigkeit. Das Hauptproblem schien dabei die Schrumpfung der gewonnenen Embryonen im expandierten Blastozysten-Stadium 12 Tage nach der Ovulation zu sein. Es wird angenommen, dass Embryonen in diesem Entwicklungsstadium für den ET ungeeignet sind (Tsutsui et al., 1989b). Bei Tsutsui et al. (2001b) lag nach dem Transfer von Embryonen im Acht- bis Blastozysten-Stadium der Anteil der geborenen Welpen in Relation zur Anzahl der transferierten Embryonen bei 51,9 %.

Eine andere Möglichkeit des ET's ist es, die Embryonen mittels Glaspipette bzw. Katheter über den Fimbrientrichter in den oberen (1,5 cm Entfernung) oder unteren Teil (5 cm Entfernung) des Eileiters der Hündinnen zu transferieren. Wegen der komplexen anatomischen Struktur der Bursa ovarica und der abdominalen Eileiteröffnung bei der Hündin, ist diese Technik allerdings sehr schwierig anzuwenden. Bei sieben Hündinnen, bei denen der Transfer in den oberen Teil des Eileiters erfolgte, kam es nicht zur Trächtigkeit. Von acht Hündinnen, bei denen die Embryonen in den unteren Eileiter transferiert wurden, wurden vier Tiere trüchtig. Die Relation zwischen geborenen Welpen und transferierten Embryonen lag hierbei

zwischen 50 und 100 % (durchschnittlich 82,5 %) (Tsutsui et al., 2001a). Hundeembryonen sind ca. drei Tage nach der Ovulation im mittleren und vier Tage nach der Ovulation im unteren Bereich des Eileiters lokalisiert. Demnach scheint ihr Transfer in den oberen Eileiterbereich drei Tage nach der Paarung ungeeignet zu sein (Tsutsui et al., 2001a). Der Einfluss des Entwicklungsstadiums der transferierten Embryonen darauf, bleibt zu klären.

Neben dem Entwicklungszustand der Embryonen zum Zeitpunkt ihres Transfers, wird der Erfolg des ET's wesentlich von der Zyklussynchronität der Donor- und Rezipiententiere beeinflusst. Bei den Rezipienten, bei denen die Ovulation zwei bis vier Tagen nach der der Donorhündin erfolgte, kam es nach dem Transfer von Embryonen in Morula- oder Kompaktmorula-Stadium nicht zur Trächtigkeit. 12 der 21 Tiere mit -1 bis +2 Tagen Asynchronität bezüglich der Ovulation, wurden nach dem Transfer von Embryonen im Acht-Zell- bis Blastozysten-Stadium trüchtig. Die Implantationsrate war dabei mit 87,9 % relativ hoch (Tsutsui et al., 2001b). Da die Anzahl der Tiere in den einzelnen Gruppen relativ klein war, bleibt zu klären, welche maximale Asynchronität bezüglich des Ovulationszeitpunktes beim ET tolerierbar ist.

Die Trächtigkeit nach dem ET tendiert dazu länger zu sein, als die nach natürlicher Paarung (Tsutsui et al., 1989b, 2001a, b). Die Dauer vom Tag der Ovulation bis zur Geburt gesunder, lebender Welpen betrug nach dem ET zwischen 63 und 68 Tagen. Es wird angenommen, dass der Embryo durch den Transfer vorübergehend in der Entwicklung gehemmt wird (Tsutsui et al., 2001a, b) (Tabelle 47).

Tab. 47: Übersicht über die Ergebnisse der Embryonentransferstudien bei Haushündinnen

Anzahl Donor-tiere	Tag der Gewinnung	Rezipientenhündinnen		Transferierte Embryonen			Trächtigkeit	Wurfgröße	Quelle
		Anzahl	Zyklusstatus	Anzahl	Technik	Zellstadium			
5	14 bis 14 Tag nach Paarung	5	Oestrus max. vier Tage nach Donor	28 im Durchschnitt 5,6 pro Tier	In Punktur-wunde in eröffnetes Uterushorn	kA	2	1, 2	Kinney et al., 1979
1	kA	1	Bereits trächtig	1	kA	kA	1	1	Takeishi et al., 1980
3	8 bis 10 Tage nach der Paarung	3	Oestrus ca. zur gleichen Zeit wie Donor	8 / 5 / 5	Transfer mittels Glaspipette durch Loch in die Uterusspitze	Morula bis Blastozyste	1	2 / 0 / 0	Tsutsui et al., 1989b
13	2 bis 3 Tage nach der Paarung	7 o 8 u	± 1 Tag Ovulation	1 bis 7 pro Tier	Transfer mittels Glaspipette durch Loch in die Uterusspitze	1 bis 8	0 o 4 u	0 1-5 (82,5 % ^a)	Tsutsui et al., 2001a
19	4 bis 9 Tage nach der Paarung	24	-4 bis +2 Tage Zyklusdifferenz	1 bis 10 pro Tier	Transfer mittels Glaspipette durch Loch in die Uterusspitze	8 bis Blastozyste	12	1-4 (51,9 % ^a)	Tsutsui et al., 2001b

a: Anteil der Welpen in Relation zur Anzahl der transferierten Embryonen; kA: keine Angaben; o / u: oberes / unteres Uterushorn

3.5.3 Transfer in vitro produzierter Embryonen

Es existiert ein Bericht über den Transfer von in vitro erzeugten Hundeembryonen in eine Rezipientenhündin. Hierbei wurden vier anoestrische Hündinnen für 12 bis 15 Tage täglich mit 5,0 µg/kg Cabergolin (Galastop; Vetem) behandelt, bis es zum Prooestrus kam. Drei Tiere, bei denen der Zeitpunkt, zu dem die Plasma-Progesteronkonzentration über 5 ng/ml anstieg, nicht mehr als 36 Stunden auseinander lag, wurden als Donortiere verwendet. Von den Ovarien dieser Hündinnen wurden insgesamt 169 morphologisch einwandfreier COC's gewonnen. Diese wurden 24 bis 72 Stunden in vitro gereift und im Anschluss mit kapazitierten Spermien in einer Endkonzentration von 1×10^6 Spermien/ml fertilisiert. Nach der Co-Kultivierung für 12 Stunden wurden die COC's in frisches Medium transferiert und für 48 Stunden kultiviert. 90 der gereiften Embryonen wurden für den Transfer vorgesehen, zwei von ihnen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im Zwei-Zell-Stadium (England et al., 2001).

Für den ET wurde der Uteruskörper des Rezipiententieres durch eine kleine medioventrale Inzision nach außen verlagert. Ein 18 G Katheter wurde ca. zwei Zentimeter kranial der Zervix ins Lumen des Uterus eingeführt. Dann wurden die Embryonen in Kulturmedium mit einer feine Glaspipette durch den Katheter in das Uteruslumen verbracht. Nach der Entfernung des Katheters wurde für eine Minute Druck auf die Punktionsstelle ausgeübt. Um sicherzustellen, dass der Eingriff keinen negativen Einfluss auf die luteale Funktion genommen hat, wurden die Hündinnen am OP-Tag sowie am zweiten und vierten Tag danach jeweils mit 30 mg Progesteron (Progesteron injizierbar; Intervet; s.c.) behandelt.

Im Rahmen der ultrasonographischen Trächtigkeitsuntersuchung (5,0 MHz Linear-Transducer) 20 Tagen nach dem Transfer, wurden im Uterus der Hündin drei spherische echoarme Konzepte, zwei davon mit vier, einer mit fünf Millimeter Durchmesser, identifiziert. Ein Konzeptus war in der proximalen Region des Uteruskörpers präsent, die beiden anderen im linken Uterushorn. Am folgenden Tag zeigte sich keine signifikante Veränderung. Für ihr angenommenes Alter wurden die Konzepte als zu klein beurteilt. Die Serumkonzentrationen von Progesteron, Fibrinogen und Relaxin (9,7 ng/ml, 1,4 g/l bzw. 2,0 ng/ml) waren weitere Hinweise für

eine frühe Trächtigkeit. Am 22. Tag nach dem Transfer waren die Konzeptionsonographisch nicht mehr nachzuweisen. Nach der Ovariohysterektomie am gleichen Tag erfolgte die histologische Untersuchung des Uterus. Dazu wurden im Abstand von fünf Millimeter Schnitt (6 μm) angefertigt und mit Haematoxylin / Eosin gefärbt. In zwei Bereichen des linken Uterushorns wurden frei im Uteruslumen Teile der Choriovitellinmembran identifiziert, anderes embryonales Gewebe war nicht nachweisbar. Obwohl es bei dieser Studie nicht zu einer Trächtigkeit kam, stellt sie den ersten Hinweis darauf dar, dass der Transfer von in vitro gereiften Eizellen bei der Hündin möglich ist (England et al., 2001).

3.6 Klonierung von Haushunden

Das Interesse am Klonen von Hunden und anderen Haustieren nimmt derzeit stark zu. Zum einen besteht das Interesse, Genotypen gefährdeter caniner Spezies zu konservieren, auf der anderen Seite existiert auch der Wunsch einiger Tierhalter, durch diese Technik ihr Lieblingstier reproduzieren zu können. Es gibt keinen Grund anzunehmen, dass die Möglichkeit des Klonierens auf einige Spezies limitiert ist (Westhusin et al., 2001). Durch die Transplantation von Zellkernen aus somatischen Zellen adulter Tiere in enukleierte Eizellen wurden bereits Schafe, Rinder, Mäuse und auch eine Katze geklont (Hill et al., 2000; Kato et al., 1998; Renard et al., 1999; Shin et al., 2002; Wakayama et al., 1998; Wakayama und Yanagimachi, 1999; Wells et al., 1999; Wilmut et al., 1997).

Es existiert bisher kein Bericht über die erfolgreiche Klonierung eines Haushundes. Die bisher einzige Publikation, die sich mit der Klonierung beim Hund befasste, ist von Westhusin et al. (2001). Im Rahmen dieser Untersuchung wurden vier bis sieben Tage nach dem LH-Gipfel ovulierte, nicht fertilisierter Oozyten von Hündinnen gewonnen. Nach medioventraler Laparotomie wurde der Reproduktionstrakt der Hündinnen über das fimbrientragende Ende des Eileiters gespült. Hierzu wurde der Bursaschlitz des Eileiters durch digitale Manipulation hervorgeklappt und wenn nötig mit einer Schere erweitert. Die Eileiteröffnung wurde zwischen den Fimbrien visuell lokalisiert und mit einem Katheter kanalisiert. Am Übergang des Eileiters in den Uterus wurde über eine feine Injektionsnadel Embryonen-Spülmedium (TL Hepes Lösung, BioWhittaker, Walkersville, MD) in das Lumen injiziert, welches über den

Katheter direkt in einer sterilen Plastikpetrischale aufgefangen wurde. Alternativ wurden bovine Eizellen (Bomed, Madison, WS) als Rezipienten für den Kerntransfer verwendet (Westhusin et al., 2001).

Die Eizellen wurden denudiert und durch 15- bis 20-minütige Inkubation im Operationsmedium (Anhang 7.2.4.2) mit 5 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma) und 7,5 µg/ml Zytochalasin B (Sigma) für die E nukleation präpariert, dann in Kulturschalen mit Operationsmedium überführt und mit Mineralöl überschichtet. Mit einer scharfen Pipette (17 bis 19 µm Durchmesser) wurden das erste Polkörperchen und der Teil des Ooplasmas, der die Metaphase II Chromosomen enthielt, entfernt. Nach der E nukleation wurde mittels UV-Exposition unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft, ob alle gefärbten Metaphase-Chromosomen aus den Eizellen entfernt wurden (Westhusin et al., 2001).

Die Zellkerne für die Kerntransplantation wurden von Fibrozyten einer 11-jährigen Mischlingshündin gewonnen. Hierfür wurde ein kleines Hautstück (ca. 1 x 3 cm) aseptisch durch chirurgische Biopsie gewonnen. Die Fibroblasten wurden nach den Standards für die Etablierung von Gewebekulturen gewonnen und nach der Trypsinierung in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml kultiviert (Anhang 7.7.1; Hill et al., 2000; Westhusin et al., 2001).

Die Kern-Donorzellen wurden in Mikrotropfen gegeben, die die enukleierten Eizellen enthielten. Mittels Mikromanipulator wurde eine einzelne Donorzelle in den Perivitellinraum einer enukleierten Eizelle gesetzt, so dass die Plasmamembranen in engen Kontakt kamen (Westhusin et al., 2001). Die Oozyten-Fibroblasten-Paare wurden zwei mal mit Fusionsmedium gewaschen und in Fusionskammern gegeben. Die Paare wurden manuell ausgerichtet und mittels "BTX Elektrocell Manipulator 200" (BTX Inc, San Diego, CA) fusioniert (Liu et al., 1997; nach Westhusin et al., 2001). Nach der Fusion wurden die Zellpaare in eine Elektro-Fusionskammer in Fusionsmedium gegeben und durch elektrische Pulse aktiviert (nach Kato et al., 1998; in Westhusin et al., 2001). An diese Prozedur schloss sich eine fünfstündige Inkubation in Operationsmedium (Anhang 7.2.4.2) mit 10 µg/ml Cycloheximid (Sigma) und 5 µg/ml Zytochalasin B (Sigma) bei 39°C an (Westhusin et al., 2001). Bei der Verwendung boviner Eizellen erfolgte die Aktivierung der Fusionspaare durch

vierminütige Inkubation in 5 $\mu\text{mol/ml}$ Ionomycin (Sigma), gefolgt von einer fünfstündigen Inkubation in 10 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid (Sigma) und 5 $\mu\text{g/ml}$ Zytochalsin B (Sigma). Nach der Aktivierung wurden die fusionierten Zellpaare lichtmikroskopisch untersucht. Um das Cycloheximid komplett zu entfernen, wurden die fusionierten Paare drei mal gewaschen und dann auf B2-vero-Zellmonolayern bei 39°C kultiviert (ATCC, Manassas, VA) (Westhusin et al., 2001).

Bei 63 der 109 gewonnen Eizellen (von 17 Donorhündinnen), wurde die Qualität als gut genug beurteilt, um als Wirtszelle zu fungieren. Bei 61 diesen Oozyten war die Eukleation, bei 43 die Fusion mit caninen Fibroblasten erfolgreich. Bei 23 % der fusionierten Zellen kam es nach ein bis zwei Tagen In-vitro-Kultivierung zur Teilung zum Zwei- bis Sechs-Zell-Stadium. Fünf dieser Embryonen wurden in den Reproduktionstrakt von drei Rezipiententieren transferiert. Hierbei kam es in keinem Fall zur Trächtigkeit.

Beim Einsatz boviner Eizellen war bei 291 der 745 Oozyten-Fibroblasten-Paare die Fusion erfolgreich. 38 % der 160 Fusionspaare, bei denen es zur Zellteilung kam, entwickelten sich zum Zwei- oder Vier-Zell-Stadium, 43 % zum Acht- oder 16-Zell-Stadium. Obwohl ein Teil der fusionierten Zellen in Kultur früh begannen sich zu teilen, kam es nicht zur Entwicklung bis zum Blastozystenstadium. Von den Embryonen, die sich in vitro bis zum Zwei- bis Vier-Zell-Stadium entwickelten, wurden 47 in vier Rezipiententiere transferiert. Am 19. Tag nach dem Embryonentransfer wurde ultrasonographisch ein Konzeptus nachgewiesen, zu einer anschließenden Trächtigkeit kam es aber nicht (Westhusin et al., 2001).

Um die Technologie der Klonierung beim Hund zu etablieren, ist die Verbesserung assoziierter Methoden wie der IVM von Eizellen, der IVC von Hundeembryonen, dem Embryonentransfer und der Zyklusinduktion von wesentlicher Bedeutung. Die Basistechnologie der Kerntransplantation scheint bei der Klonierung von Hunden nicht der limitierende Faktor zu sein (Westhusin et al., 2001)

3.7 Xenotransplantation von ovariellen caninen Gewebe

Das Ziel einer Untersuchung von Metcalfe et al. (2001) war die Produktion fertilisierbarer caniner Eizellen durch die Xenotransplantation von frischem Ovargewebe präpubertärer Hündinnen in SCID-(Severe combined immunodeficient)-Mäuse. Das ovarielle canine Gewebe wurde hierbei unter die Nierenkapsel von sieben Wochen alten, ovariektomierten SCID-Mäusen transplantiert. In bestimmten Intervallen nach der Transplantation wurden die Rezipienten getötet und die Transplantat entfernt. Für die routinemäßige histologische Untersuchung erfolgte die Wachs-Paraffin-Einbettung und die Haematoxylin-Eosin-Färbung. Die Anzahl und Entwicklungsstadien der Follikel wurden mittels 5 µm Serienschnitten quantitativ untersucht (Metcalfe, 2001).

Die Transplantation des Gewebes verlief erfolgreich. 56 Tage nach der Transplantation wurde die Entwicklung von Primordialfollikeln beobachtet, zur Entwicklung von antralen Stadien kam es jedoch nicht. Die Rezipienten zeigten persistierende vaginale Verhornung und Uterusdilatation. Diese Veränderungen stimmten allerdings weder mit dem Zyklusgeschehen bei der Hündin noch dem bei der Maus überein. Die mögliche Ursache hierfür ist, dass es im Transplantat zur Hormonproduktion kam, die Kommunikation zwischen Rezipienten-Hypothalamus und dem gonadalen Transplantat jedoch ungenügend war (Metcalfe, 2001). Durch eine Verfeinerung dieser Technik wäre die posthume Produktion von Oozyten wertvoller Caniden möglich.

4 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die kritische Sichtung und Zusammenstellung der Literatur über Fortpflanzungsphysiologie, assistierte Reproduktion und damit assoziierten Biotechniken beim Haushund (*Canis familiaris*).

Bei der Hündin kommt es zur präovulatorischen Follikelluteinisierung. Dadurch werden die Eizellen bereits ein bis zwei Tage vor der Ovulation steigenden Progesteronkonzentrationen ausgesetzt. Die Ovulation erfolgt etwa zwei Tage nach dem LH-Gipfel. Beim Hund kommt es zur Ovulation primärer Oozyten mit intaktem Germinalvesikel, die für die Vollendung der meiotischen Reifung zwei bis fünf Tage benötigen.

Die artifizielle Insemination (AI) kann bei der Hündin intravaginal oder intrauterin mit frischem, gekühltem oder gefroren-aufgetautem Sperma erfolgen. Die intrauterine Insemination (IUI) kann chirurgisch mittels Laparotomie oder Laparoskopie vorgenommen werden oder nicht-chirurgisch durch transzervikale Katheterisierung erfolgen. Nach IUI von Hündinnen sind Geburtsraten und Wurfgrößen hoch und nahe an denen nach natürlicher Anpaarung. Die Kryokonservierung von Hundesperma wurde erfolgreich durchgeführt und eine Vielfalt von Verdünnern, Einfrier- und Auftau-Protokollen wurde publiziert. Bei der AI mit kryokonserviertem Sperma sind die Trächtigkeitsraten nach intravaginaler Deponierung des Spermias deutlich geringer als bei intrauteriner Besamung.

Die erfolgreiche Induktion eines fertilen Oestrus, die Zyklussynchronisation und die Superovulation durch Hormonbehandlung sind beim Hund bislang nur in Ansätzen untersucht.

Canine Eizellen sind in der Lage, *in vitro* spontan die Meiose wieder aufzunehmen, die Reifungsrate ist aber wesentlich geringer als bei den Oozyten anderer Haustiere. Bei der In-vitro-Reifung (IVM) von Hundeeizellen kommt es in Abhängigkeit vom Kultursystem bei ca. 20 bis 70 % der Eizellen zum Abbau des Germinalvesikels (GVBD) aber nur ca. 10 bis 40 % der Oozyten reiften bis zur Metaphase I bis II. Kumulismorphologie, Zyklusstadium, Oozytengröße, die Kommunikation zwischen

Eizelle und Kumuluszellen über Gap Junctions, das Alter der Donorhündin und die Anwesenheit von Serum im Kulturmediums haben Einfluss auf die Effizienz der IVM. Es wurde gezeigt, dass Hundezellen, die in präantralen oder frühen antralen Follikeln *in vitro* kultiviert werden, bis zur Metaphase zu reifen können. Das Entwicklungspotential dieser Eizellen war vergleichbar mit dem von isolierten Kumulus-Oozyten-Komplexen.

Die optimalen Kulturbedingungen, die zur Induktion der Kapazitation und der akrosomalen Exozytose bei Canidenspermien erforderlich sind, sind noch nicht bekannt. Hundespermien sind in der Lage, die Zona pellucida und den Vitellus von homologen Eizellen unabhängig von deren Entwicklungsstadium zu penetrieren. Das Entwicklungspotential fertilisierter Hundeozyten *in vitro* ist gering und verläuft nur bis zu einem frühen Embryonenstadium. Nur in einem Fall wurde nach der IVF über die Entwicklung einer Blastozyste berichtet.

Nach dem chirurgischen Transfer von *ex vivo* gewonnenen Hundeembryonen kam es zur Geburt lebender Welpen, die Erfolgsrate war allerdings gering. Derzeit existieren keine Berichte über die Produktion lebender Welpen nach IVF aus *in vivo* oder *in vitro* gereiften Hundeozyten. In einer Studie wurden 20 Tage nach dem Transfer *in vitro* fertilisierter Hundeeizellen im Rahmen der ultrasonographischen Untersuchung drei Fruchtanlagen identifiziert, es kam aber nicht zur erfolgreichen Trächtigkeit. Die Entwicklung zuverlässiger Methoden zur Kryokonservierung von Embryonen steht beim Hund noch aus.

Die bisherige Forschung auf dem Gebiet der assistierten Reproduktion beim Hund wurde nur punktuell vorangetrieben. Wegen der zunehmenden Bedeutung von Hunden als Begleittier, aber auch wegen des Modellcharakters für Wildcaniden ist in der Zukunft damit zu rechnen, dass das Interesse an der Entwicklung zuverlässiger Methoden zur *In-vitro*-Produktion von Embryonen, deren Kryokonservierung und dem Transfer von Embryonen zunimmt.

5 Summary

Reproductive physiology and assisted reproduction technology in domestic dogs (*Canis familiaris*) – a review of literature

The aim of this work was the evaluation of literature about physiology of reproduction, assisted reproduction technologies and associated biotechniques in domestic dogs (*Canis familiaris*).

In the bitch preovulatory follicular luteinization results in exposure of oocytes to increasing concentrations of progesterone 1-2 days prior to ovulation. Ovulation occurs approximately two days after the LH-peak. The bitch ovulates primary oocytes with intact germinal vesicle, which requires 2-5 days for the completion of the meiotic divisions within the oviduct.

Artificial insemination (AI) in bitch can be performed either intravaginally or intrauterinely with fresh, chilled or frozen-thawed spermatozoa. Intrauterine insemination (IUI) may be carried out surgically by laparotomy or laparoscopy or non-surgically using transcervical catheterization. In the bitch, IUI results in a high whelping rate and litter size comparable to those after natural mating. Cryopreservation of dog semen has been successfully accomplished and a variety of extenders, freezing and thawing protocols have been published. AI with cryopreserved semen generally yields lower pregnancy rates if intravaginal deposition of semen is used.

A reliable method for synchronization and induction of a fertile oestrus cycle as well as superovulation by hormone treatment are not available.

Canine oocytes may resume meiosis spontaneously in vitro, although at a much lower efficiency than in most other domestic species. In vitro maturation (IVM) of oocytes results in 20 to 70 % oocytes entering germinal vesicle breakdown (GVBD). Only 10 to 40 % oocytes progress to metaphase I to II. It has been shown, that cumulus morphology, stage of estrous cycle, oocyte size, cumulus-oocyte communication through gap junctions, age of oocyte donors, and serum

supplementation of the culture medium influence the efficiency of IVM. Dog oocytes cultured within advanced preantral and early antral follicles in vitro are competent to resume meiosis and mature to the metaphase stage. The developmental potential of these oocytes was comparable to isolated cumulus oocyte complexes.

The optimal culture conditions required for induction of capacitation and acrosomal exocytosis of canine sperm are yet to be established. Dog spermatozoa are able to penetrate the zona pellucida and the vitellus of homologous oocytes irrespective of the oocyte maturation stage. The developmental potential of fertilized dog oocytes in vitro is very low. Only one case of development to the blastocyst stage after in vitro fertilization (IVF) has been reported.

The surgical transfer of ex vivo collected dog embryos resulted in birth of live puppies although the success rates were low. Up to date no reports of production of live pups after IVF from in vivo or in vitro matured dog oocytes exists. In one study three conceptuses were identified by ultrasonography twenty days after transfer of in vitro fertilised oocytes but no further development could be observed. Reliable protocols for cryopreservation of dog embryos have yet to be developed.

Until recently, there has been limited interest in assisted reproduction techniques in the dogs. The rising significance of dogs as companion animals as well as interest in comparative aspects with wild-life canides will stimulate research in the fields of in vitro production of embryos, cryopreservation and embryo transfer of embryos.

6 Literaturverzeichnis

Abaigar, T., Holt, W. V., Harrison, R. A. and del Barrio, G. (1999): Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol Reprod* **60** (1), 32-41.

Aitken, R. J., Ross, A., Hargreave, T., Richardson, D. and Best, F. (1984): Analysis of human sperm function following exposure to the ionophore A23187. Comparison of normospermic and oligozoospermic men. *J Androl* **5** (5), 321-329.

Allen, W. E. (1994): Fruchtbarkeit und Geburtshilfe beim Hund. *In: Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.* pp. 29-31.

Almquist, J. O., Rosenberger, J. L. and Branas, R. J. (1979): Effect of thawing time in warm water on fertility of bovine spermatozoa in plastic straws. *J Dairy Sci* **62**, 772-775.

Almlid, T. and Johnson, L. A. (1988): Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J Anim Sci* **66** (11), 2899-2905.

Amadal, J. and Andersen, K. (1968): Fast thawing of bull semen frozen in straws. *Proc VIth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination II* 973-976.

Amann, R. P. (1986): Reproductive physiology and endocrinology of the dog. *In: "Current Therapy in Theriogenology"* (Morrow, D. A., ed.) WB Saunders Co, Philadelphia, 2nd Edt. pp. 532.

Ancel, P. and Bouin, P. (1908): Rut et corps jaune chez la chienne. *C R Soc Biol* **65**, 365-367.

Andersen, A. C. and Simpson, M. E. (1973): The ovary and reproductive cycle of the dog (beagle). Geon-X, Inc., Laos Altos, California.

Andersen, A. C. and Wooten, E. (1959): The estrus cycle in the dog. *In: "Reproduction in Domestic Animals"* (Cole, H. H. and Cupps, P. T., eds.) Academic Press, New York. Vol. 1, pp. 392.

Andersen, D. (1927): The rate of passage of the mammalian ovum through various portions of the fallopian tube. *Am J Physiol* **82**, 557-569.

Andersen, K. (1972a): Fertility of frozen dog semen. *Acta veterinaria scandinavica* **13**, 128-134.

Andersen, K. (1972b): Fertility of frozen dog semen. *Proc VIIth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination (München)* **3**, 1703-1706.

Andersen, K. (1975): Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene* **10** (1), 1-4.

Andersen, K. (1976): Artificial uterine insemination in dogs. *Proc VIIIth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination (Krakow)* **4**, 960.

Andersen, K. (1980): Artificial insemination and storage of canine semen. *In: "Current Therapy in Theriogenology"* (Morrow, D. A., ed.) Saunders, W. B., Philadelphia. pp. 661-665.

Anderson, E. (1974): Comparative aspects of the ultrastructure of the female gamete. *Int Rev Cytol Suppl* (4), 1-70.

Andrews, J. C., Howard, J. G., Bavister, B. D. and Wildt, D. E. (1992): Sperm capacitation in the domestic cat (*Felis catus*) and leopard cat (*Felis bengalensis*) as studied with a salt-stored zona pellucida penetration assay. *Mol Reprod Dev* **31** (3), 200-207.

- Arbeiter, K. and Barsch, E. (1988):** Möglichkeiten der Läufigkeitsinduktion bei der Hündin mit einem Ergolin-Derivat. *J Vet med A* **35** (2), 111-117.
- Archbald, L. F., Baker, B. A., Clooney, L. L. and Godke, R. A. (1980):** A surgical method for collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotropins. *Vet Med Small Anim Clin* **75** (2), 228-238.
- Arnold, S., Arnold, P., Concannon, P. W., Weilenmann, R., Hubler, M., Casal, M., Dobeli, Fairburn, A., Eggenberger, E. and Rusch, P. (1989):** Effect of duration of PMSG treatment on induction of oestrus, pregnancy rates and the complications of hyper-oestrogenism in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* **39** 115-122.
- Arriola, J. and Foote, R. H. (1987):** Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J Dairy Sci* **70** (8), 1664-1670.
- Aughey, E. and Renton, J. P. (1971):** The ultrastructure of abnormal spermatozoa in a stud dog. *J Reprod Fertil* **25** (2), 303-304.
- Aumüller, R. and Willecke, H. (1987):** Coputergesteuerte Messung von Ebersamen mit dem Cellsoft® System unter besonderer Berücksichtigung der verwendeten Verdüner und der erzielten Befruchtungsergebnisse. *Tierärztliche Umschau* **44**, 380-385.
- Austad, R., Lunde, A. and Sjaastad, O. V. (1976):** Peripheral plasma levels of oestradiol-17 beta and progesterone in the bitch during the oestrous cycle, in normal pregnancy and after dexamethasone treatment. *J Reprod Fertil* **46** (1), 129-136.
- Badinand, F., Fontbonne, A., Maurel, M. C. and Siliart, B. (1993):** Fertilization time in the bitch in relation to plasma concentration of oestradiol, progesterone and luteinizing hormone and vaginal smears. *J Reprod Fertil Suppl* **47**, 63-67.
- Bane, A. (1970):** Sterility in male dogs. *Nordisk veterinärmedicin* **22**, 561-566.
- Bardens, J. W. (1971):** Hormonal therapy for ovarian and testicular dysfunction in the dog. *J Am Vet Med Assoc* **159** (11), 1405.
- Barros, C. and Munoz, G. (1974):** Sperm penetration in vitro of mouse oocytes at various times after maturation. *J Reprod Fertil* **31**, 237-247.
- Barros, C. (1974):** Capacitation of mammalian spermatozoa. In: "Physiology and Genetics of Reproduction" (Coutinho, E. M. and Fuchs, F., eds.) Plenum Press, New York., pp. 3-24.
- Bartlett, D. J. (1962):** Studies on dog semen. 1. Morphological characteristics. *J Reprod Fertil* **3**, 173-189.
- Bartoov, B., Ben-Barak, J., Mayevsky, A., Sneider, M., Yogev, L. and Lightman, A. (1991):** Sperm motility index: a new parameter for human sperm evaluation. *Fertil Steril* **56** (1), 108-112.
- Battista, M., Parks, J. and Concannon, P. W. (1988):** Canine sperm post thaw survival following freezing in straws or pellets using pipes, lactose, tris or tres extenders. *Proc XIth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination (Dublin)* **3**, 229 (Abstract).
- Bavister, B. D., Leibfried, M. L. and Lieberman, G. (1983):** Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol Reprod* **28** (1), 235-247.
- Bavister, B. D. (1995):** Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* **2**, 91-148.
- Bedford, J. M. (1998):** Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol Reprod* **59** (6), 1275-1287.
- Bedford, J. M. and Kim, H. H. (1993):** Sperm/egg binding patterns and oocyte cytology in retrospective analysis of fertilization failure in vitro. *Hum Reprod* **8** (3), 453-463.

- Bedford, J. M., Mock, O. B., Nagdas, S. K., Winfrey, V. P. and Olson, G. E. (1999):** Reproductive features of the eastern mole (*Scalopus aquaticus*) and star-nose mole (*Condylura cristata*). *J Reprod Fertil* **117** (2), 345-353.
- Berchtold, M. (1997a):** Gynäkologie. In: "Klinik der Hundekrankheiten" (Freudiger, U., Grünbaum, E.-G. und Schimke, E., eds.) Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 2nd Edt. Paperback-Sonderausgabe, pp. 625-664.
- Berchtold, M. (1997b):** Andrologie. In: "Klinik der Hundekrankheiten" (Freudiger, U., Grünbaum, E.-G. und Schimke, E., eds.) Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 2nd Edt. Paperback-Sonderausgabe, pp. 665-677.
- Berger, T., Anderson, D. L. and Penedo, M. C. T. (1996):** Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. *Anim Reprod Sci* **44**, 231-239.
- Biggers, J. D. (1971):** Metabolism of mouse embryos. *J Reprod Fertil Suppl* **14**, 41-54.
- Biggers, J. D., Whitten, W. K. and Whittingham, D. G. (1971):** The culture of mouse embryos in vitro. In: "Methods of Mammalian Embryology" (Daniel, J. C., ed.) Freeman & Co., San Francisco, pp. 86-116.
- Bischoff, T. L. W. (1845):** Entwicklungsgeschichte des Haushundeies. In: Friedrich Vieweg und Sohn, Braunschweig.
- Blachshaw, A. W. (1954):** The prevention of temperature shock of bull and ram semen. *J Biol Sci* **7**, 573-582.
- Blandau, R. J. (1961):** Biology of Eggs and Implantation. In: "Sex and Internal Secretion" (Young, W. C., ed.) Williams and Wilkins Co., Baltimore. Vol. II, pp. 797-882.
- Bleil, J. D. and Wassarman, P. M. (1980a):** Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* **20** (3), 873-882.
- Bleil, J. D. and Wassarman, P. M. (1980b):** Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol* **76** (1), 185-202.
- Bolamba, D., Borden-Russ, K. D. and Durrant, B. S. (1998):** In vitro maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology* **49** (5), 933-942.
- Bouchard, G. F., Morris, J. K., Sikes, J. D. and Youngquist, R. S. (1990):** Effects of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology* **34** (1), 147-157.
- Boucher, J. H., Foote, R. H. and W., K. R. (1958):** The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido, and depletion of sperm reserves. *Cornell Vet* **48**, 67-86.
- Boyers, S. P., Davis, R. O. and Katz, D. F. (1989):** Automatic semen analysis. *Current Problems in Obstetrics and Gynecological Function* **12**, 171-200.
- Brackett, B. G. and Mastroianni, J. L. (1974):** Composition of oviductal fluid. In: "The Oviduct and Its Functions" (Johnson, A. D. and Foley, C. W., eds.) Academic Press, New York. pp. 133-160.
- Brackett, B. G. and Williams, W. L. (1965):** In vitro fertilization of rabbit ova. *J Exp Zool* **160** (3), 271-281.
- Brackett, B. G. and Oliphant, G. (1975):** Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* **12** 260-274.

- Brewis, I., Morton, I., Moore, H. and England, G. (1999):** Solubilised zona pellucida proteins and progesterone induce calcium influx and the acrosome reaction in capacitated dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series* **24**, 19
- Brewis, I. A., Morton, I. E., Moore, H. D. and England, G. C. (2001):** Solubilized zona pellucida proteins and progesterone induce calcium influx and the acrosome reaction in capacitated dog spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **60** (4), 491-497.
- Brucker, C. and Lipford, G. B. (1995):** The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. *Hum Reprod Update* **1** (1), 51-62.
- Bunck, C., Froin, H. R. and Günzel-Apel, A.-R. (2002):** Erfahrungen mit einem kommerziellen Relaxin-Assay zum Trächtignachweis beim Hund. *Kleintierpraxis* **47** (1), 5-10.
- Burkman, L. J., Coddington, C. C., Franken, D. R., Krugen, T. F., Rosenwaks, Z. and Hogen, G. D. (1988):** The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil Steril* **49** (4), 688-697.
- Bysted, B. and Greve, T. (2000):** Activation of the embryonic genome in the dog. *Theriogenology* **53** (1), 269
- Bysted, B. V., Dieleman, S. J., Hyttel, P. and Greve, T. (2001):** Embryonic developmental stages in relation to the LH peak in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 181-186.
- Cain, J. L., Cain, G. R., Feldman, E. C., Lasley, B. L. and Stabenfeldt, G. H. (1988):** Use of pulsatile intravenous administration of gonadotropin-releasing hormone to induce fertile estrus in bitches. *Am J Vet Res* **49** (11), 1993-1996.
- Cain, J. L., Lasley, B. L., Cain, G. R., Feldman, E. C. and Stabenfeldt, G. H. (1989):** Induction of ovulation in bitches with pulsatile or continuous infusion of GnRH. *J Reprod Fertil Suppl* **39** 143-147.
- Castle, P. E. and Dean, J. (1999):** Manipulating the genome to study reproduction. Mice with 'humanized' zonae pellucidae. *Hum Reprod* **14** (8), 1927-1939.
- Caswell, A. H. and Hutchison, J. D. (1971):** Visualization of membrane bound cations by a fluorescent technique. *Biochem Biophys Res Commun* **42** (1), 43-49.
- Chaffaux, S., Locci, D., Pontois, M., Deletang, F. and Thibier, M. (1984):** Induction of ovarian activity in anoestrous beagle bitches. *Br Vet J* **140** (2), 191-195.
- Chakraborty, P. (1987):** Reproductive hormone concentrations during estrus, pregnancy and pseudopregnancy in the Labrador bitch. *Theriogenology* **27** 827-840.
- Chakraborty, P. K., Panko, W. B. and Seager, S. W. J. (1978):** Hormonal levels during estrous cycle, pregnancy and pseudopregnancy in the Labrador bitch. *Proc 70th Ann Meeting Am Soc Anim Sci, Michigan* **338**, 349-350.
- Chakraborty, P. K., Wildt, D. E. and Seager, S. W. (1982):** Induction of estrus and ovulation in the cat and dog. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **12** (1), 85-92.
- Challis, J. R., Patel, F. A. and Pomini, F. (1999):** Prostaglandin dehydrogenase and the initiation of labor. *J Perinat Med* **27** (1), 26-34.
- Chong, A. P., Walters, C. A. and Weinrieb, S. A. (1983):** The neglected laboratory test. The semen analysis. *J Androl* **4** (4), 280-282.
- Christensen, G. C. (1964):** The urogenital system and mammary glands. *In: "Anatomy of the Dog"* (Miller, M. E., Christensen, G. C. and Evans, H. E., eds.) W. B. Saunders, Philadelphia. pp. 741-806.
- Christiansen, J. (1984):** Reproduction in the Dog and Cat. *In: Bailliere Tindall, London.* pp. 80-123.

- Cobb, L. M. (1959):** The radiographic outline of the genital system of the bitch. *Vet Rec* **71**, 66-68.
- Codde, J. M. and Berger, T. (1995):** In vivo fertility of rams in relation to sperm-zona pellucida penetration of ovine oocytes. *Theriogenology* **44**, 901-906.
- Concannon, P. W. (1993):** Biology of gonadotropin secretion in adult and pregnancy female dog. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* **47**, 3-27
- Concannon, P., Tsutsui, T. and Shille, V. (2001):** Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 169-179.
- Concannon, P. W. (1986a):** Canine pregnancy and parturition. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **16** (3), 453-475.
- Concannon, P. W. (1986b):** Canine physiology of reproduction. *In: "Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment"* (Burke, T. J., ed.) Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 23-77.
- Concannon, P. W. (1989):** Induction of fertile oestrus in anoestrous dogs by constant infusion of GnRH agonist. *J Reprod Fertil Suppl* **39**, 149-160.
- Concannon, P. W. (1991):** Artificial insemination in dog. *Proc of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology*, 247-250.
- Concannon, P. W. (1993):** Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *J Reprod Fertil Suppl* **47**, 3-27.
- Concannon, P. W. and Battista, M. (1989):** Canine semen freezing and artificial insemination. *In: "Current Veterinary Therapy, Small Animal Practice"* (Kirk, R. W., ed.) WB Saunders Co, Philadelphia, Vol. X, pp. 1247-1259.
- Concannon, P. W., Butler, W. R., Hansel, W., Knight, P. J. and Hamilton, J. M. (1978):** Parturition and lactation in the bitch: serum progesterone, cortisol and prolactin. *Biol Reprod* **19** (5), 1113-1118.
- Concannon, P. W. and DiGregorio, G. B. (1986):** Canine vaginal cytology. *In: "Small Animal Reproduction and Infertility"* (Burke, T., ed.) Lea and Febiger, Philadelphia. pp. 96-111.
- Concannon, P. W., Hansel, W. and McEntee, K. (1977a):** Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol Reprod* **17**, 604-613.
- Concannon, P. W., Hansel, W. and Visek, W. J. (1975):** The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biol Reprod* **13** (1), 112-121.
- Concannon, P. W., McCann, J. P. and Temple, M. (1989):** Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J Reprod Fertil Suppl* **39**, 3-25.
- Concannon, P. W., Powers, M. E., Holder, W. and Hansel, W. (1977b):** Pregnancy and parturition in the bitch. *Biol Reprod* **16** (4), 517-526.
- Concannon, P. W. and Verstegen, J. (1999):** Pregnancy in dogs and cats. *In: "Encyclopedia of Reproduction"* (Knobli, E. and Neil, J., eds.) Academic Press, New York. pp. 336-345.
- Concannon, P. W., Weinstein, P., Whaley, S. and Frank, D. (1987):** Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and by bromocriptine. *J Reprod Fertil* **81** (1), 175-180.
- Concannon, P. W., Whaley, S. and Lein, D. H. (1983):** Canine gestation length: variation related to time at mating and fertile life of spermatozoa. *Am J Vet Res* **44**, 1819-1821.
- Conley, A. J., Concannon, P. W. and Evans, L. E. (1984):** Bromocriptine induced abortion in the bitch. *Proc 10th Internat Congr Anim Reprod & Art Insem, Urbana, IL*, 504-506.

- Correa, J. R., Rodriguez, M. C., Patterson, D. J. and Zavos, P. M. (1996):** Thawing and processed of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology* **46**, 413-420.
- Correa, J. R. and Zavos, P. M. (1995):** Frozen-thawed bovine spermatozoa diluted by slow or rapid dilution method: measurements on occurrence of osmotic shock and sperm viability. *Theriogenology* **44**, 963-971.
- Cross, P. C. and Brinster, R. L. (1970):** In vitro development of mouse oocytes. *Biol Reprod* **3** (3), 298-307.
- Cummins, J. M. and Woodall, P. F. (1985):** On mammalian sperm dimensions. *J Reprod Fertil* **75** (1), 153-175.
- Cupps, P. T., Anderson, L. L. and Cole, L. L. (1969):** The estrous cycle. In: "Reproduction in domestic animals" (H., C. H. and Cupps, P. T., eds.) Academic Press, New York, 2nd Edt., pp. 217-225.
- Curry, M. R. and Watson, P. F. (1994):** Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology* **31** (1), 39-46.
- Curry, M. R. and Watson, P. F. (1995):** Sperm structure and function. In: "Gametes - The Spermatozoon" (Grudzinskas, J. G. and Yovich, J. L., eds.) Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 45-69.
- Daurio, C. P., Gilman, M. R., Pulliam, J. D. and Seward, R. L. (1987):** Reproductive evaluation of male beagles and the safety of ivermectin. *Am J Vet Res* **48** (12), 1755-1760.
- David, A., Brackett, B. G., Garcia, C. R. and Mastroianni, L., Jr. (1969):** Composition of rabbit oviduct fluid in ligated segments of the Fallopian tube. *J Reprod Fertil* **19** (2), 285-289.
- Davies, P. R. (1982):** A Study of Spermatogenesis, Rates of Sperm Production, and Methods of Preserving the semen in dog. PhD Thesis, University of Sydney, Australia
- Davis, B. K. (1981):** Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78** (12), 7560-7564.
- Deibel, F. C. J., Smith, J. E., Crabo, B. G. and Graham, E. F. (1976):** Evaluation of six assays of sperm quality by means of their accuracy, precision and sensitivity in separating known induced levels of damage. *Proc 8th Int Congr Anim Reprod Artif Insem* **4**, 888-891.
- Doak, R. L., Hall, A. and Dale, H. E. (1967):** Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. *J Reprod Fertil* **13** (1), 51-58.
- Dobrinski, I., Lulai, C., Barth, A. D. and Post, K. (1993):** Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J Reprod Fertil Suppl* **47**, 291-296.
- Dott, H. M. and Foster, G. C. (1972):** A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'life-dead' stain. *J Reprod Fertil* **29** (3), 443-445.
- Dott, H. M. and Foster, G. C. (1979):** The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer. *J Reprod Fertil* **55** (1), 161-166.
- Douglas-Hamilton, D. H. (1995):** Validation procedures for the Hamilton Thorne Integrated Visual Optical System sperm and cell analyzer. *Qual Assur* **4** (4), 340-347.
- Douglas-Hamilton, D. H., Osol, R., Osol, G., Driscoll, D. and Noble, H. (1984):** A field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology* **22**, 291-304.

- Downs, S. M. (1999):** Control of the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *In: "Gametes - the oocyte"* (Grudzinskas, J. G. and Yovich, J. L., eds.) Cambridge University Press, Cambridge. pp. 150-192.
- Dunbar, B. S., Dudkiewicz, A. and Bundman, D. S. (1991):** Comparative structure and function of mammalian zona pellucida. *In: "A comparative overview of mammalian fertilization"* (Dunbar, B. S. and O'Rand, M. G., eds.) Plenum Press, New York. pp. 97-114.
- Dunphy, B. C., Kay, R., Barratt, C. L. and Cooke, I. D. (1989):** Quality control during the conventional analysis of semen, an essential exercise. *J Androl* **10** (5), 378-385.
- Durinzi, K. L., Saniga, E. M. and Lanzendorf, S. E. (1995):** The relationship between size and maturation in vitro in the unstimulated human oocyte. *Fertil Steril* **63** (2), 404-406.
- Durrant, B. S., Pratt, N. C., Russ, K. D. and Bolamba, D. (1998):** Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology* **49** (5), 917-932.
- Edqvist, L. E., Johansson, E. D., Kasstrom, H., Olsson, S. E. and Richkind, M. (1975):** Blood plasma levels of progesterone and oestradiol in the dog during the oestrous cycle and pregnancy. *Acta Endocrinol (Copenh)* **78** (3), 554-564.
- Edwards, R. G. (1962):** Meiosis in ovarian oocytes of adult mammals. *Nature* **196**, 446-450.
- Edwards, R. G. (1965):** Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* **208** (8), 349-351.
- Edwards, R. G. (1966):** Mammalian eggs in the laboratory. *Sci Am* **215** (2), 72-81.
- Ehlers, J. P. (2000):** Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Vaginalzytologie bei der Hündin und ihr Einsatz bei der Bestimmung des optimalen Belegungszeitraumes. Diss vet med. Universität München
- Einspanier, A., Bunck, C., Salpigidou, P., Marten, A., Fuhrmann, K., Hoppen, H. O. and Gunzel-Apel, A. R. (2002):** Relaxin: ein wichtiger Graviditätsindikator bei der Hündin. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **109** (1), 8-12.
- Elliott, D. S. (1974):** Ova and embryo metabolism: functions of the oviduct. *In: "The Oviduct and Its Functions"* (Johnson, A. D. and Foley, C. W., eds.) Academic Press, New York. pp. 300-332.
- Enders, A. C. (1971):** The fine structure of the blastocyst. *In: "The Biology of the Blastocyste"* (Blaudau, R. J., ed.) Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp. 71-94.
- England, G. and Concannon, P. W. (2002):** Determination of the optimal breeding time in the bitch: Basic Considerations. *In: "Recent Advances in Small Animal Reproduction"* (Concannon, P. W., England, G., Verstegen, J. and Linde-Forsberg, C., eds.) International Veterinary Information Service, Ithaca, New York.
- England, G. C. (1993):** Cryopreservation of dog semen: a review. *J Reprod Fertil Suppl* **47**, 243-255.
- England, G. C. and Allen, W. E. (1989a):** Seminal characteristics and fertility in dogs. *Vet Rec* **125** (15), 399.
- England, G. C. and Allen, W. E. (1989b):** Real-time ultrasonic imaging of the ovary and uterus of the dog. *J Reprod Fertil Suppl* **39**, 91-100.
- England, G. C., Verstegen, J. P. and Hewitt, D. A. (2001):** Pregnancy following in vitro fertilisation of canine oocytes. *Vet Rec* **148** (1), 20-22.
- England, G. C. and Yeager, A. E. (1993):** Ultrasonographic appearance of the ovary and uterus of the bitch during oestrus, ovulation and early pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl* **47**, 107-117.

- England, G. C. W. (1992):** The cryopreservation of dog semen. PhD Thesis, University of London, UK, Royal Veterinary College
- England, G. C. W. and Ponzio, P. (1996):** Comparison of the Quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology* **46**, 165-171.
- Eppig, J. J. and Downs, S. M. (1987):** The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development in vitro: maintenance of meiotic arrest and gonadotropin-induced oocyte maturation. *Dev Biol* **119** (2), 313-321.
- Eppig, J. J. and Schroeder, A. C. (1986):** Culture systems for mammalian oocyte development: Progress and prospects. *Theriogenology* **25**, 97-106.
- Ericsson, R. J. (1967):** A fluorometric method for measurement of sperm capacitation. *Proc Soc Exp Biol Med* **125** (4), 1115-1118.
- Evans, H. M. and Cole, H. H. (1931):** An introduction to the study of the oestrus cycle in the dog. *Mem Univ Calif* **9**, 66-119.
- Evans, E. I. (1933):** The transport of spermatozoa in the dog. *Am J Physiol* **105**, 287-293.
- Eyestone, W. H. and First, N. L. (1989):** Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fertil* **85** (2), 715-720.
- Fair, T., Hyttel, P. and Greve, T. (1995):** Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* **42** (4), 437-442.
- Farrant, J., Walter, C. A., Lee, H. and McGann, L. E. (1977):** Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. *Cryobiology* **14** (3), 273-286.
- Farrell, P., Trouern-Trend, V., Foote, R. H. and Douglas-Hamilton, D. (1995):** Repeatability of measurements on human, rabbit, and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. *Fertil Steril* **64** (1), 208-210.
- Farstad, W. (1984a):** Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *J Small Anim Pract* **25**, 561-565.
- Farstad, W. (1984b):** The correlation between a cyclus coefficient based on cytological indices in the vaginal smear and circulating progesterone in oestrous bitches. *Zuchthygiene* **19**, 211-217.
- Farstad, W. (1996):** Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim Reprod Sci* **42** 251-260.
- Farstad, W. (2000a):** Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* **53** (1), 175-186.
- Farstad, W. (2000b):** Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim Reprod Sci* **60-61**, 375-387.
- Farstad, W. and Andersen Berg, K. (1989):** Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J Reprod Fertil Suppl* **39**, 289-292.
- Farstad, W., Krogenæs, A., Nagyova, E., Hafne, A. L. and Hyttel, P. (1993):** In vitro techniques in fox reproduction. *Livest Prod Sci* **36**, 23-27.
- Fazeli, A. R., Holt, C., Steenweg, W., Bevers, M. M., Holt, W. V. and Colenbrander, B. (1995):** Development of a sperm hemizona binding assay for boar semen. *Theriogenology* **44**, 17-27.
- Fazeli, A. R., Steenweg, W., Bevers, M. M., Bracher, V., Parlevliet, J. and Colenbrander, B. (1993b):** Use of sperm binding to homologous hemizona pellucida to predict stallion fertility. *Equine Veterinary Journal* **15** (Suppl), 57-59.

- Fazeli, A. R., Steenweg, W., Bevers, M. M., de Loos, F. A., van den Broek, J. and Colenbrander, B. (1993a):** Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. *Vet Rec* **132** (1), 14-16.
- Fazeli, A. R., Zhang, B. R., Steenweg, W., Larsson, B., Bevers, M. M., van den Broek, J., Rodriguez-Martinez, H. and Colenbrander, B. (1997):** Relationship between sperm-zona pellucida binding assay and the 56-day nonreturn rate of cattle inseminated with frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* **48**, 853-863.
- Feldman, E. C. and Nelson, R. W. (1996a):** Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. *In: "Canine and Feline Endocrinology and Reproduction"* (Feldman, E. C. and Nelson, R. W., eds.) W. B. Saunders Company, Philadelphia, 2nd Edt., pp. 673-690.
- Feldman, E. C. and Nelson, R. W. (1996b):** Artificial insemination, fresh extended semen, and frozen semen. *In: "Canine and Feline Endocrinology and Reproduction"* (Feldman, E. C. and Nelson, R. W., eds.) W. B. Saunders Company, Philadelphia, 2nd Edt., pp. 734-739.
- Feldman, E. C. and Nelson, R. W. (1996c):** Ovarian cycle and vaginal cytology. *In: "Canine and Feline Endocrinology and Reproduction"* (Feldman, E. C. and Nelson, R. W., eds.) W. B. Saunders Company, Philadelphia, 2nd Edt., pp. 526-546.
- Ferguson, J. M., Renton, J. P., Farstad, W. and Douglas, T. A. (1989):** Insemination of beagle bitches with frozen semen. *J Reprod Fertil Suppl* **39**, 293-298.
- Fiser, P. S. and Fairfull, R. W. (1984):** The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology* **21** (5), 542-551.
- Florman, H. M. (1994):** Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca²⁺ are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev Biol* **165** (1), 152-164.
- Fontbonne, A. and Badinand, F. (1993a):** Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *J Reprod Fertil Suppl* **47**, 325-327.
- Fontbonne, A. and Badinand, F. (1993b):** Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *J Reprod Fertil Suppl* **47**, 531-532.
- Foote, R. H. (1964):** Extenders for freezing dog semen. *Am J Vet Res* **25**, 37-39.
- Foote, R. H. and Onuma, H. (1970):** Superovulation, ovum collection, culture and transfer. A review. *J Dairy Sci* **53**, 1681-1692.
- Fougner, J. A., Aamdal, J. and Andersen, K. (1973):** Intrauterine insemination with frozen semen in the blue fox. *Nord Vet Med* **25** (3), 144-149.
- Fougner, J. A. and Forsberg, M. (1987):** Effect of different sperm numbers on fertility after artificial insemination of foxes. *Acta vet scand* **28**, 403-407.
- Fraser, L. (1982):** Ca²⁺ is required for mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *J Androl* **3**, 412-419.
- Fraser, L. R., Abeydeera, L. R. and Niwa, K. (1995):** Ca(2+)-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* **40** (2), 233-241.
- Frewein, J., Vollmerhaus, B. and Amselgruber, W. (1994):** Weibliche Geschlechtsorgane. *In: "Anatomie von Hund und Katze"* (Frewein, J. und Vollmerhaus, B., eds.) Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin. pp. 224-230.
- Friedman, M. H. (1957):** The effect of O-diazoacetyl (Azaserine) on the pregnancy of the dog. *J Am vet med Ass* **130**, 160.

- Fujii, M., Otoi, T., Murakami, M., Tanaka, M., Une, S. and Suzuki, T. (2000):** The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. *J Vet Med Sci* **62** (3), 305-307.
- Fulton, R. M., Keskinetepe, L., Durrant, B. S. and Fayrer-Hosken, R. A. (1998):** Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) for the treatment of canine infertility. *Theriogenology* **49**, 366 (Abstract).
- Gandolfi, F. and Moor, R. M. (1987):** Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* **81** (1), 23-28.
- Gao, D. Y., Mazur, P., Kleinhans, F. W., Watson, P. F., Noiles, E. E. and Critser, J. K. (1992):** Glycerol permeability of human spermatozoa and its activation energy. *Cryobiology* **29** (6), 657-667.
- Gardner, D. K. and Leese, H. J. (1990):** Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *J Reprod Fertil* **88** (1), 361-368.
- Garner, D. L., Pinkel, D., Johnson, L. A. and Pace, M. M. (1986):** Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol Reprod* **34** (1), 127-138.
- Gier, H. T. (1950):** Early embryology of the dog. *Anat Rec* **108**, 561-562.
- Gier, H. T. (1960):** The estrous cycle in the bitch: vaginal fluid. *Vet Scope* **5**, 2-9.
- Gill, H. P., Kaufman, C. F., Foote, R. H. and Kirk, R. W. (1970):** Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen. *Am J Vet Res* **31** (10), 1807-1813.
- Gobello, C., de la Sota, R. L. and Goya, R. G. (2001a):** Study of the change of prolactin and progesterone during dopaminergic agonist treatments in pseudopregnant bitches. *Anim Reprod Sci* **66** (3-4), 257-267.
- Gobello, C., Baschar, H., Castex, G., de la Sota, R. L. and Goya, R. G. (2001b):** Dioestrous ovariectomy: a model to study the role of progesterone in the onset of canine pseudopregnancy Study of the change of prolactin and progesterone during dopaminergic agonist treatments in pseudopregnant bitches. *J Reprod Fertil Suppl* **57** (3-4), 55-60.
- Gobello, C., de la Sota, R. L. and Goya, R. G. (2001c):** A review of canine pseudocyesis. *Reprod Domest Anim* **36** (6), 283-288.
- Goodman, M. F. and Cain, J. L. (1993):** Retrospective evaluation of artificial insemination with chilled extended semen in the dog. *J Reprod Fertil* **47**, 554 (Abstract).
- Gordon, I. (1994):** Laboratory production of cattle embryos. *In: CAN International, Oxon, UK.* pp. 1-640.
- Gougeon, A. and Testart, J. (1986):** Germinal vesicle breakdown in oocytes of human atretic follicles during the menstrual cycle. *J Reprod Fertil* **78** (2), 389-401.
- Gould, K. G. (1974):** Fertilisation: a function of the oviduct. *In: "The Oviduct and Its Functions"* (Johnson, A. D. and Foley, C. W., eds.) Academic Press, New York. pp. 271-300.
- Govette, G., Linde-Forsberg, C. and Ström, B. (1996):** A successful concept for freezing of dog semen. *Proc 13th Int Cong Anim Reprod (ICAR)* **2**, 5-8.
- Gräf, K.-J. (1978):** Serum oestrogen, progesterone and prolactin concentrations in cyclic, pregnant and lactating beagle dogs. *J Reprod Fertil* **52** (1), 9-14.
- Gräf, K.-J. and EL Etreby (1979):** Endocrinology of Reproduction in the female Beagle Dog and its Significance in Mammary Gland Tumorigenesis. *Acta Endocrinologica, Suppl* **90**, 222.
- Graham, J. K., Kunze, E. and Hammerstedt, R. H. (1990):** Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* **43** (1), 55-64.

- Grazul-Bilska, A. T., Reynolds, L. P. and Redmer, D. A. (1997):** Gap junctions in the ovaries. *Biol Reprod* **57** (5), 947-957.
- Green, D. P. (1978):** The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. *J Cell Sci* **32**, 137-151.
- Griffiths, W. F. B. and Amoroso, E. C. (1939):** Prooestrus, oestrus, ovulation and mating in the greyhound bitch. *Vet Rec* **51**, 1279-1284.
- Grünau, B. (1994):** Zur Bedeutung von Prolaktin bei der Pseudogravidität der Hündin. Diss med vet. Tierärztliche Hochschule Hannover
- Gudermuth, D. F., Concannon, P. W., Daels, P. F. and Lasley, B. L. (1998):** Pregnancy-specific elevations in fecal concentrations of estradiol, testosterone and progesterone in the domestic dog (*Canis familiaris*). *Theriogenology* **50** (2), 237-248.
- Guerin, P., Ferrer, M., Fontbonne, A., Benigni, L., Jacquet, M. and Menezo, Y. (1999):** In vitro capacitation of dog spermatozoa as assessed by chlortetracycline staining. *Theriogenology* **52** (4), 617-628.
- Günzel-Apel, A.-R. (1994):** Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund. In: Gustav Fischer Verlag, Jena. pp. 26-29.
- Günzel-Apel, A. R., Gunther, C., Terhaer, P. and Bader, H. (1993):** Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* **47**, 271-278.
- Hadley, J. C. (1975):** Total unconjugated oestrogen and progesterone concentrations in peripheral blood during the oestrous cycle of the dog. *J Reprod Fertil* **44** (3), 445-451.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K. and Nolan, J. P. (1990):** Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* **11** (1), 73-88.
- Hancock, J. L. and Rowlands, I. W. (1949):** The physiology of reproduction in the dog. *Vet Rec* **47**, 771-776.
- Harrison, R. A. P. and Miller, N. G. A. (1998):** Applying flow cytometry to the investigation of live sperm suspensions. *Proc BAS Advanced Topics in Andrology Sperm Biology: New Techniques, New Insights* 1-3.
- Harrison, R. A. and Vickers, S. E. (1990):** Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* **88** (1), 343-352.
- Harrop, A. E. (1954):** Artificial insemination of a bitch with preserved semen. *Br Vet J* **110**, 424-425.
- Harrop, A. E. (1960):** Reproduction in the dog. In: (Cox, T. a., ed.) Bailliere, London.
- Harrop, A. E. (1962):** Artificial insemination in dog. In: "The Semen of Animals and Artificial Insemination" (Maule, P. T., ed.) Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham, Royal, UK. pp. 304-315.
- Harrop, A. E. (1966):** The infertile male dog. *J Small Anim Pract* **7** (11), 723-725.
- Hay, M., King, W., Gartley, C. and Goodrowe, K. (1994):** Influence of spermatozoa on in vitro nuclear maturation of canine ova. *Biology of Reproduction Supplement* **50**, 145
- Hay, M. A. (1996):** Canine Gametes: Evaluation of Oocyte Maturation and Penetrating Potential of Spermatozoa Pre-freeze and Post-thaw. PhD Thesis. University of Guelph,
- Hay, M. A., King, W. A., Gartley, C. J., Leibo, S. P. and Goodrowe, K. L. (1997a):** Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* **51**, 99-108.

- Hay, M. A., King, W. A., Gartley, C. J., Leibo, S. P. and Goodrowe, K. L. (1997b):** Canine spermatozoa - cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology* **48**, 1329-1342.
- Heape, W. (1897):** Artificial insemination of mammals and the subsequent fertilization or impregnation of their ova. *Proc Royal Soc, London* **61**, 52-63. (in Farstad, 2000a)
- Heape, W. (1900):** The "sexual season" of mammals and the relation of the "pro-oestrus" to menstruation. *Quart J Microscopy Sci* **44**, 1-68. (in Olson et al., 1989)
- Helenius, A., McCaslin, D. R., Fries, E. and Tandford, C. (1979):** Properties of detergents. *Meth Enzymol* **56** 734
- Hewitt, D. A. and England, G. C. (1997):** Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J Reprod Fertil Suppl* **51**, 83-91.
- Hewitt, D. A. and England, G. C. W. (1998a):** Incidence of oocyte nuclear maturation within the ovarian follicle of the bitch. *Veterinary Record* **143** 590-591.
- Hewitt, D. A. and England, G. C. (1998b):** The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. *Theriogenology* **49** (5), 957-966.
- Hewitt, D. A. and England, G. C. (1998c):** An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Anim Reprod Sci* **51** (4), 321-332.
- Hewitt, D. A. and England, G. C. (1999a):** Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro. *Anim Reprod Sci* **55** (1), 63-75.
- Hewitt, D. A. and England, G. C. (1999b):** Influence of gonadotrophin supplementation on the in vitro maturation of bitch oocytes. *Vet Rec* **144** (9), 237-239.
- Hewitt, D. A. and England, G. C. W. (1999c):** Culture conditions required to induce capacitation and the acrosome reaction of canine sperm in vitro. *Veterinary Record* **144** 22-23.
- Hewitt, D. A. and England, G. C. (2001):** Manipulation of canine fertility using in vitro culture techniques. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 111-125.
- Hewitt, D. A. and England, G. C. W. (1997):** The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. *Anim Reprod Sci* **50**, 123-139.
- Hewitt, D. A., Fletcher, S. and England, G. C. (2001):** Test of canine sperm function in vitro using primary homologous oocytes with fluorescence and confocal microscopy. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 127-136.
- Hewitt, D. A., Watson, P. F. and England, G. C. (1998):** Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology* **49** (6), 1083-1101.
- Heywood, R. and Sortwell, R. J. (1971):** Semen evaluation in the Beagle dog. *J Small Anim Pract* **12** (6), 343-346.
- Hill, J. R., Winger, Q. A., Long, C. R., Looney, C. R., Thompson, J. A. and Westhusin, M. E. (2000):** Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol Reprod* **62** (5), 1135-1140.
- Holst, P. A. and Phemister, R. D. (1971):** The prenatal development of the dog: preimplantation events. *Biol Reprod* **5** (2), 194-206.
- Holst, P. A. and Phemister, R. D. (1974):** Onset of diestrus in the Beagle bitch: definition and significance. *Am J Vet Res* **35** (3), 401-406.
- Holt, W. V., Head, M. F. and North, R. D. (1992):** Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol Reprod* **46** (6), 1086-1094.

- Holt, W. V. and North, R. D. (1994):** Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol Reprod* **51** (3), 414-424.
- Howard, J. and Wildt, D. E. (1990):** Ejaculate-hormonal traits in the leopard cat (*Felis bengalensis*) and sperm function as measured by in vitro penetration of zona-free hamster ova and zona-intact domestic cat oocytes. *Mol Reprod Dev* **26** (2), 163-174.
- Huggins, C. (1947):** The prostatic secretion. *Harvey Lect* **42**, 148-193.
- Iguer-Ouada, M. and Verstegen, J. P. (2001a):** Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology* **55** (3), 733-749.
- Iguer-Ouada, M. and Verstegen, J. P. (2001b):** Validation of the sperm quality analyzer (SQA) for dog sperm analysis. *Theriogenology* **55** (5), 1143-1158.
- Iguer-Ouada, M. and Verstegen, J. P. (2001c):** Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* **55** (2), 671-684.
- Inaba, T., Matsui, N., Shimizu, R. and Imori, T. (1984):** Use of echography in bitches for detection of ovulation and pregnancy. *Vet Rec* **115** (11), 276-277.
- Inaba, T., Shimada, S., Gonda, M., Mori, J., Tokunaga, T., Geshi, M. and Torii, R. (1994):** Enzyme immunoassay of gonadotropin releasing hormone in the canine hypothalamus and plasma using monoclonal antibodies. *Br Vet J* **150** (1), 85-92.
- Inaba, T., Tani, H., Gonda, M., Nakagawa, A., Ohmura, M., Mori, J., Torii, R., Tamada, H. and Sawada, T. (1998):** Induction of fertile estrus in bitches using a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate). *Theriogenology* **49** (5), 975-982.
- Ivanova, M. and Mollova, M. (1993):** Zona-penetration in vitro test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology* **40**, 397-410.
- Ivanova, M., Mollova, M., Ivanova-Kicheva, M. G., Petrov, M., Djarkova, T. and Somlev, B. (1999):** Effect of cryopreservation of zona-binding capacity of canine spermatozoa in vitro. *Theriogenology* **52** (1), 163-170.
- Ivanova-Kicheva, M. G., Nikolov, I. I., Dacheva, D. P., Ivanov, I. H. and Ivanova, I. B. (1992):** Testing of different media for cryopreservation of dog semen. *Proc 12th Int Congress on Animal Reproduction, The Hague* **4**, 1776-1778.
- Ivanova-Kicheva, M. G., Subev, M. S., Bobadov, N. D., Dacheva, D. P. and Rouseva, I. A. (1995):** Effect of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. *Theriogenology* **44**, 563-569.
- Iwamatsu, T. and Chang, M. C. (1972):** Sperm penetration in vitro of mouse oocytes at various times during maturation. *J Reprod Fertil* **31** (2), 237-247.
- Iwamatsu, T. and Yanagimachi, R. (1975):** Maturation in vitro of ovarian oocytes of prepubertal and adult hamsters. *J Reprod Fertil* **45** (1), 83-90.
- Jasko, D. L., Little, T. V., Smith, T., Lein, D. M. and Foote, R. H. (1988):** Objective analysis of stallion sperm motility. *Theriogenology* **30**, 1159-1167.
- Jedruch, J. and Gajewski, Z. (1986):** The effect of detomidine hydrochloride (Domosedan) on the electrical activity of the uterus in cows. *Acta Vet Scand Suppl* **82**, 189-192.
- Jedruch, J., Gajewski, Z. and Ratajska-Michalczak, K. (1989):** Uterine motor responses to an alpha 2-adrenergic agonist medetomidine hydrochloride in the bitches during the end of gestation and the post-partum period. *Acta Vet Scand Suppl* **85**, 129-134.

- Jeffcoate, I. A. (1992):** Concentrations of luteinizing hormone and oestradiol in plasma and response to injection of gonadotrophin-releasing hormone analogue at selected stages of anoestrus in domestic bitches. *J Reprod Fertil* **94** (2), 423-429.
- Jeffcoate, I. A. and Lindsay, F. E. (1989):** Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *J Reprod Fertil Suppl* **39**, 277-287.
- Jöchle, W. (1995):** Zur Rolle des Prolaktins in der Fortpflanzung bei Hund und Katze. *Kleintierpraxis* **40**, 381-398.
- Jöchle, W. (1999):** Zur kausalen Behandlung der Scheinträchtigkeit der Hündin. *Tierärztl Prax* **27 (K)**, 120-124.
- Jöchle, W., Arbeiter, K., Post, K., Ballabio, R. and D'Ver, A. S. (1989):** Effects on pseudopregnancy, pregnancy and interoestrous intervals of pharmacological suppression of prolactin secretion in female dogs and cats. *J Reprod Fertil Suppl* **39**, 199-207.
- Johnston, G. R., Feeney, D. A., Rivers, B. and Walter, P. A. (1991):** Diagnostic imaging of the male canine reproductive organs. Methods and limitations. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **21** (3), 553-589.
- Johnston, S. T. (1980):** False pregnancy in the bitch. In: "Current Veterinary Theriogenology" (Morrow, D. A., ed.) Saunders, Philadelphia. pp. 623-624.
- Jonckhere, F. (1930):** Contribution a'histogenèse de l'ovaire des mammifères. L'ovaire de *Canis familiaris*. *Arch Biol* **40**, 357-436.
- Jones, D. E. and Joshua, J. O. (1982):** Reproductive Clinical Problems in the Dog. In: (Sons, J. W. a., ed.), Bristol, England, pp. 49.
- Jones, G. E., Boyns, A. R., Bel, E. T., Christie, D. W. and Parkes, M. F. (1973b):** Immunoreactive luteinizing hormones and progesterone during pregnancy and following gonadotrophin administration in beagle bitches. *Acta Endocrinol (Copenh)* **72** (3), 573-581.
- Jones, G. E., Boyns, A. R., Cameron, E. H., Bell, E. T., Christie, D. W. and Parkes, M. F. (1973a):** Plasma oestradiol, luteinizing hormone and progesterone during pregnancy in the Beagle bitch. *J Reprod Fertil* **35** (1), 187-189.
- Katila, T., Combes, G. B., Varner, D. D. and Blanchard, T. L. (1997):** Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. *Theriogenology* **48**, 1085-1092.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. (1998):** Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* **282** (5396), 2095-2098.
- Kawakami, E., Arai, T. and Nakamura, U. (1999):** Effects of medium containing heparin and theophylline on capacitation and metabolic enzyme activities of ejaculated spermatozoa from dogs with asthenozoospermia. *Anim Reprod Sci* **54** (4), 251-259.
- Kawakami, E., Arai, T., Oishi, I., Hori, T. and Tsutsui, T. (2000):** Induction of dog sperm capacitation by glycosaminoglycans and glycosaminoglycan amounts of oviductal and uterine fluids in bitches. *J Vet Med Sci* **62** (1), 65-68.
- Kawakami, E., Kashiwagi, C., Hori, T. and Tsutsui, T. (2001):** Effects of canine oviduct epithelial cells on movement and capacitation of homologous spermatozoa in vitro. *Anim Reprod Sci* **68** (1-2), 121-131.
- Kawate, N., Yamada, H., Suga, T., Inaba, T. and Mori, J. (1997):** Induction of luteinizing hormone surge by pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone analogue in cows with follicular cysts. *J Vet Med Sci* **59** (6), 463-466.

- Kay, V. J., Coutts, J. R. and Robertson, L. (1994):** Effects of pentoxifylline and progesterone on human sperm capacitation and acrosome reaction. *Hum Reprod* **9** (12), 2318-2323.
- Kinney, G. M., Pennycook, J. W., Michael, D., Schriver, M. D., Templeton, J. W., Duane, C. and Kraemer, D. C. (1979):** Surgical collection and transfer of canine embryos. *Biol Reprod* **20** (Suppl 1), 96 (Abstract).
- Klonisch, T., Hombach-Klonisch, S., Froehlich, C., Kauffold, J., Steger, K., Steinetz, B. G. and Fischer, B. (1999):** Canine preprorelaxin: nucleic acid sequence and localization within the canine placenta. *Biol Reprod* **60** (3), 551-557.
- Knuth, U. A., Neuwinger, J. and Nieschlag, E. (1989):** Bias to routine semen analysis by uncontrolled changes in laboratory environment--detection by long-term sampling of monthly means for quality control. *Int J Androl* **12** (5), 375-383.
- Kooistra, H. S., Okkens, A. C., Bevers, M. M., Popp-Snijders, C., van Haften, B., Dieleman, S. J. and Schoemaker, J. (1999):** Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of the estrous cycle and anestrus in beagle bitches. *Biol Reprod* **60** (1), 65-71.
- Kosiniak, K., Bittmar, A. and Sallwerk, K. (1992):** Relationship between biochemical components of dog seminal plasma and semen freezability. *Proc 12th Int Congress on Animal Reproduction, The Hague* **4**, 1791-1792.
- Kraemer, D. C., Flow, B. L., Schriver, M. D., Kinney, G. M. and Pennycook, J. W. (1979):** Embryo transfer in the nonhuman primate, feline and canine. *Theriogenology* **11** (1), 51-62.
- Krogenæs, A., Nagyova, E., Farstad, W. and Hafne, A. L. (1993):** In vitro maturation of blue fox oocytes and cAMP production in oocyte cumulus cells complexes. *Theriogenology* **39**, 250 (Abstract).
- Kuroda, H. and Hiroe, K. (1972):** Studies on the metabolism of the dog. I. Seasonal variation on the semen quality and on the aerobic metabolism of spermatozoa. *Jpn J Anim Reprod* **17** 89-98.
- Kusuma, P. S. and Tainturier, D. (1993):** Comparison of induction of oestrus in dogs using metergoline, metergoline plus human chorionic gonadotrophin, or pregnant mares' serum gonadotrophin. *J Reprod Fertil Suppl* **47**, 363-370.
- Lagerstedt, A. S. and Obel, N. (1987):** Uterine cannulation in the bitch. *Zentralbl Veterinarmed A* **34** (2), 90-101.
- Larsen, R. E. (1980):** Infertility in the male dog. In: "Current Therapy in Theriogenology" (Morrow, W. B., ed.) Saunders, W. B., Philadelphia. pp. 646-654.
- Larsson, K., Einarsson, S. and Nicander, L. (1976):** Influence of thawing diluents on vitality, acrosome morphology, ultrastructure and enzyme release of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet Scand* **17** (1), 83-100.
- Lees, G. E. and Castleberry, M. W. (1977):** The use of frozen semen for artificial insemination of German shepherd dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* **13**, 382-386.
- Leipold, S. D., Graham, J. K., Squires, E. L., McCue, P. M., Brinsko, S. P. and Vanderwall, D. K. (1998):** Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. *Theriogenology* **49** (8), 1537-1543.
- Linde, C. and Karlsson, I. (1984):** The correlation between the cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. *J Small Anim Pract* **25**, 77-82.
- Linde-Forsberg, C. (1991):** Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **21** (3), 467-485.
- Linde-Forsberg, C. (1995):** Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* **10** (1), 48-58.

- Linde-Forsberg, C. and Forsberg, M. (1989):** Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J Reprod Fertil Suppl* **39**, 299-310.
- Linde-Forsberg, C. and Forsberg, M. (1993):** Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* **47**, 313-323.
- Linde-Forsberg, C., Strom Holst, B. and Govette, G. (1999):** Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology* **52** (1), 11-23.
- Lindsay, F. E. F. (1983):** The normal endoscopic appearance of the caudal reproductive tract of the cyclic and non-cyclic bitch: post uterine endoscopy. *J Small Anim Pract* **24**, 1-15.
- Lindsay, F. E. F. and Concannon, P. W. (1986):** Normal canine vaginoscopy. In: "Small Animal Reproduction and Infertility" (Burke, T., ed.) Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 112-120.
- Liu, L., Sun, Q., Duan, C., Liu, H., Song, X., Qian, J. and Chen, D. (1997):** Subzonal fertilization of mouse round spermatids. *Science in China* **40** 152-158. (in Westhusin et al., 2001)
- Løfstedt, F. (1956):** Die künstliche Besamung beim Hund und die Möglichkeit zur Aufbewahrung von Spermien bei niedrigen Temperaturen. *Kynologischer Weltkongress, Dortmund*, 195-200.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M. P. and Gordon, I. (1994):** Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Reprod Dev* **37** (1), 48-53.
- Luvoni, G. C., Luciano, A. M., Modina, S. and Gandolfi, F. (2001):** Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of in vitro maturation. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 141-146.
- Mack, S. O., Wolf, D. P. and Tash, J. S. (1988):** Quantitation of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. *Biol Reprod* **38** (2), 270-281.
- Magerkurth, C., Topfer-Petersen, E., Schwartz, P. and Michelmann, H. W. (1999):** Scanning electron microscopy analysis of the human zona pellucida: influence of maturity and fertilization on morphology and sperm binding pattern. *Hum Reprod* **14** (4), 1057-1066.
- Mahi, C. A. and Yanagimachi, R. (1976):** Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. *J Exp Zool* **196** (2), 189-196.
- Mahi, C. A. and Yanagimachi, R. (1978):** Capacitation, acrosome reaction, and egg penetration by canine spermatozoa in a simple defined medium. *Gamete Res* **1**, 101-109.
- Mahi-Brown, C. A. (1991):** Fertilization in Dogs. In: "A Comparative Overview of Mammalian Fertilization" (Dunbar, B. S. and O'Rand, M. G., eds.) Plenum Press, New York, pp. 281-297.
- Makler, A., Tatcher, M. and Mohilever, J. (1980):** Sperm semi-autoanalysis by a combination of multiple exposure photography (MEP) and computer techniques. *Int J Fertil* **25** (1), 62-66.
- Mann, G. E., Campbell, B. K., McNeilly, A. S. and Baird, D. T. (1992):** The role of inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J Endocrinol* **133** (3), 381-391.
- Mann, T. (1964):** Spermiostatic, spermicidal and antispermatogenic substances. In: "The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract" (Mann, T., ed.) Methuen & Co Ltd, London. pp. 379-396.
- Martin, I. C. A. (1963a):** The freezing of dog spermatozoa to -79°C. *Research in Veterinary Science* **4**, 304-314.
- Martin, I. C. A. (1963b):** The deep freezing of dog spermatozoa in diluents containing skim-milk. *Res Vet Sci* **4**, 315-325.

- Martin, J. C., Klug, E. and Gunzel, A. R. (1979):** Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J Reprod Fertil Suppl* (27), 47-51.
- Martinez, E., Vazquez, J. M., Matas, C., Roca, J., Coy, P. and Gadea, J. (1993):** Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* **40**, 547-557.
- Masken, J. F. (1972):** Circulating hormone levels in the cycling beagle. *In: "The Newer Knowledge about Dogs"* Gain Research Center, White Plains. pp. 33-39.
- Mastroianni, L., Jr., Urzua, M. and Stambaugh, R. (1970):** Protein patterns in monkey oviductal fluid before and after ovulation. *Fertil Steril* **21** (12), 817-820.
- Mayenco-Aguirre, A. M. and Perez Cortes, A. B. (1998):** Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology* **50** (2), 195-204.
- Mazur, P. (1965):** The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. *Ann N Y Acad Sci* **125** (2), 658-676.
- Mazur, P., Leibo, S. P., Farrant, J., Chu, E. H. Y., Hanna, M. G. and Smith, L. H. (1970):** Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of mammalian cells. *In: "The Frozen Cell. CIBA Foundation Symposium"* (Wolstenholme, G. E. W. and O'Connor, M., eds.) Churchill Livingstone, London, pp. 69-88.
- Mazur, P. (1984):** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* **247** (3 Pt 1), C125-142.
- Mazur, P. (1985):** Basic concepts in freezing cells. *Proc 1st International Conference on Deep Freezing Boar Semen (Uppsala, Sweden)*, 91-111.
- McBride, M. W., Aughey, E., O'Shaughnessy, P. J. and Jeffcoate, I. A. (2001):** Ovarian function and FSH receptor characteristics during canine anoestrus. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 3-10.
- McCarthy, M. M., Kow, L. M. and Pfaff, D. W. (1992):** Speculations concerning the physiological significance of central oxytocin in maternal behavior. *Ann N Y Acad Sci* **652**, 70-82.
- McDougall, K., Hay, M. A., Goodrowe, K. L., Gartley, C. J. and King, W. A. (1997):** Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. *J Reprod Fertil Suppl* **51**, 25-31.
- McGinnis, L. K. and Youngs, C. R. (1992):** In vitro development of ovine embryos in CZB medium. *Theriogenology* **37**, 559-569.
- McKinnon, A. O. and Walker, J. B. (1998):** Effect of ambient temperature and container on temperature of extended equine semen. *World Eq Vet Rev* **3**, 5-11.
- Metcalfe, S. S., Shaw, J. M. and Gunn, I. M. (2001):** Xenografting of canine ovarian tissue to ovariectomized severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 323-329.
- Mialto, J.-P., Dumon, C. and Cassou, B. (1985):** Insémination artificielle chez la chienne: Mise en place de semence fraîche avec le pistolet souple "OSIRIS". *Pratique médicale et chirurgicale de l'animale de compagnie* **20**, 213-220.
- Moghissi, K. S. (1970):** Human fallopian tube fluid. I. Protein composition. *Fertil Steril* **21** (12), 821-829.
- Moore, H. D. M. (1995):** Modification of sperm membrane antigens during capacitation. *In: "Human Sperm Acrosome Reaction"* (Fenichel, P. and Perinaud, J., eds.) John Libbey, Montrouge. pp. 35-43.
- Moore, H. D. M. (2001):** Molecular biology of fertilization. *Journal of Reproduction and Fertilify Supplement* **57** 105-110

- Moore, H. D. M. and Bedford, J. M. (1993):** The Interaction of Mammalian Gametes in the Femal. *In: "Sperm/Egg Interaction in vivo"* (Hartmann, J. F., ed.) Academic Press, New York. pp. 453-497.
- Mori, J., Ouchi, K., Kawate, N. and Inaba, T. (1988):** GnRH-analogue leads to improved breeding efficiency in cows with retained fetal membranes. *Vet Rec* **123** (13), 352.
- Mortimer, D., Shu, M. A. and Tan, R. (1986):** Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in semen analysis. *Hum Reprod* **1** (5), 299-303.
- Morton, D. B. (1988):** Artificial Insemination with frozen semen in the dog: principles of 'DNA fingerprinting'. *In: "Reproductive Clinical Problems in the dog"* (Jones, D. E. and Joshua, J. O., eds.) Wright, London, 2nd Edt., pp. 169-186.
- Morton, D. B. and Bruce, S. G. (1989):** Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* **39**, 311-316.
- Moyle, W. R. and Campbell, R. K. (1995):** Gonadotropins. *In: "Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology"* (Adashi, E. Y., Rock, J. A. and Rosenwaks
- Muldrew, K. and McGann, L. E. (1994):** The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophys J* **66** (2 Pt 1), 532-541.
- Nakagata, N. and Takeshima, T. (1992):** High fertilizing ability of mouse spermatozoa diluted slowly after cryopreservation. *Theriogenology* **37**, 1283-1291.
- Nakagawa, A., Semple, E. and Leibo, S. P. (1994):** Influence of serum sources on kinetics of nuclear maturation of bovine oocytes. *Theriogenology* **41**, 264 (Abstract).
- Nakao, T., Aoto, Y., Fukushima, S., Moriyoshi, M. and Kawata, K. (1985):** Induction of estrus in bitches with exogenous gonadotropins, and pregnancy rate and blood progesterone profiles. *Jap J vet Sci* **47** (1), 17-24.
- Nett, T. M., Akbar, A. M., Phemister, R. D., Holst, P. A., Reichert, L. E., Jr. and niswender, G. D. (1975):** Levels of lutenizing hormone, estradiol and progesterone in serum during the estrous cycle and pregnancy in the beagle bitch (38491). *Proc Soc Exp Biol Med* **148** (1), 134-139.
- Nett, T. M. and Olson, P. N. S. (1983):** Reproductive physiology of dogs and cats. *In: "Textbook of Veterinary Internal Medicine"* (Ettinger, S. J., ed.) WB Saunders Co, Philadelphia, 2nd Edt., pp. 1698.
- Newberry, W. E. and Gier, H. T. (1952):** Determination of breeding time in the bitch from vaginal smear. *Vet Med* **47**, 390-392.
- Nickson, D. A., Boyd, J. S., Eckersall, P. D., Ferguson, J. M., Harvey, M. J. and Renton, J. P. (1993):** Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. *J Reprod Fertil Suppl* **47**, 231-240.
- Niemann, H. and Meinecke, B. (1993):** In-vitro-Produktion von Embryonen. *In: "Embryotransfer und assoziierte Biotechniken bei landwirtschaftlichen Nutztieren"* (Niemann, H. and Meinecke, B., eds.) Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, pp. 85-104.
- Niwa, K. and Chang, M. C. (1975):** Fertilization of rat eggs in vitro at various times before and after ovulation with special reference to fertilization of ovarian oocytes matured in culture. *J Reprod Fertil* **43** (3), 435-451.
- Niżański, W., Dubiel, A., Bielas, W. and Dejneka, G. J. (2001):** Effects of three cryopreservation methods and two semen extenders on the quality of dog semen after thawing. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 365-369.
- Noden, D. and DeLahunta, A. (1985):** The Embryology of Domestic Animals. *In: (Willkins, W., ed.)*, Baltimore, London.

- Nöthling, J. O., Gerstenberg, C. and Volkmann, D. H. (1995):** Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen--a retrospective study. *J S Afr Vet Assoc* **66** (2), 49-55.
- O'Day-Bowman, M. B., Mavrogianis, P. A., Reuter, L. M., Johnson, D. E., Fazleabas, A. T. and Verhage, H. G. (1996):** Association of oviduct-specific glycoproteins with human and baboon (*Papio anubis*) ovarian oocytes and enhancement of human sperm binding to human hemizona following in vitro incubation. *Biol Reprod* **54** (1), 60-69.
- Oehninger, S., Franken, D., Alexander, N. and Hodgen, G. D. (1992):** Hemizona assay and its impact on the identification and treatment of human sperm dysfunctions. *Andrologia* **24** (6), 307-321.
- Oettlé, E. E. (1982):** Preliminary report: a pregnancy from frozen centrifuged dog semen. *J S Afr Vet Assoc* **53** (4), 269-270.
- Oettlé, E. E. (1986):** Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim Reprod Sci* **12**, 145-150.
- Oettlé, E. E. (1993):** Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod Fertil Suppl* **47**, 257-260.
- Oettlé, E. E. and Soley, J. T. (1988):** Sperm abnormalities in the dog: A light and electron microscopic study. *Vet Med Rev* **59**, 28-70.
- Okkens, A. C., Bevers, M. M., Dieleman, S. J. and Willems, A. H. (1985):** Shortening of the interoestrous interval and the lifespan of the corpus luteum of the cyclic dog by bromocryptine treatment. *Vet Q* **7** (3), 173-176.
- Olar, T. T. (1984):** Cryopreservation of Dog Spermatozoa. PhD Thesis. Fort Collins, CO, Colorado State University
- Olar, T. T., Bowen, R. A. and Pickett, B. W. (1989):** Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology* **31** (2), 451-462.
- Olson, P. N., Bowen, R. A., Behrendt, M. D., Olson, J. D. and Nett, T. M. (1984):** Concentrations of progesterone and luteinizing hormone in the serum of diestrous bitches before and after hysterectomy. *Am J Vet Res* **45** (1), 149-153.
- Olson, P. N., Bowen, R. A. and Nett, T. M. (1981):** Induction of estrus in the bitch. *Proc 118th Ann Mtg Am vet med Ass St Louis*, 96 (Abstract).
- Olson, P. N., Nett, T. M., Bowen, R. A., Sawyer, H. R. and Niswender, G. D. (1989):** Endocrine regulation of the corpus luteum of the bitch as a potential target for altering fertility. *J Reprod Fertil Suppl* **39**, 27-40.
- Onclin, K., Silva, L. D., Donnay, I. and Verstegen, J. P. (1993):** Luteotrophic action of prolactin in dogs and the effects of a dopamine agonist, cabergoline. *J Reprod Fertil Suppl* **47**, 403-409.
- Osinowo, O. and Salamon, S. (1976):** Examination of some processing methods for freezing boar semen. *Aust J Biol Sci* **29** (4), 325-333.
- Otoi, T., Fujii, M., Tanaka, M., Ooka, A. and Suzuki, T. (1999):** Effect of serum on the in vitro maturation of canine oocytes. *Reprod Fertil Dev* **11** (7-8), 387-390.
- Otoi, T., Fujii, M., Tanaka, M., Ooka, A. and Suzuki, T. (2000a):** Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology* **54**, 535-542.
- Otoi, T., Murakami, M., Fujii, M., Tanaka, M., Ooka, A., Une, S. and Suzuki, T. (2000b):** Development of canine oocytes matured and fertilised in vitro. *Vet Rec* **146** (2), 52-53.
- Otoi, T., Ooka, A., Murakami, M., Karja, N. W. and Suzuki, T. (2001):** Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* **13** (2-3), 151-155.

- Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikawa, S. and Suzuki, T. (1997):** Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology* **48**, 769-774.
- Overstreet, J. W. and Bedford, J. M. (1974):** Comparison of the penetrability of the egg vestments in follicular oocytes, unfertilized and fertilized ova of the rabbit. *Dev Biol* **41** (1), 185-192.
- Overstreet, J. W. and Hembree, W. C. (1976):** Penetration of the zona pellucida of nonliving human oocytes by human spermatozoa in vitro. *Fertil Steril* **27** (7), 815-831.
- Pacey, A. A., Davies, N., Warren, M. A., Barratt, C. L. and Cooke, I. D. (1995):** Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. *Hum Reprod* **10** (10), 2603-2609.
- Paisley, L. G. and Fahning, M. L. (1977):** Effects of exogenous follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in bitches. *J Am Vet Med Assoc* **171** (2), 181-185.
- Palacios, A., Valencia, J. and Zarco, L. (1992):** Efecto del sistema de envasado y la concentración espermática sobre el daño acrosomal y la motilidad postdescongelación del semen equino. *Vet Mex* **88**, 315-318.
- Paradis, M. (1991):** Seasonality and variability of the interestrus interval in the bitch. *Theriogenology* **36**, 41-50.
- Parillo, F. and Verini-Supplizi, A. (1999):** Glycohistochemical investigation of canine and feline zonae pellucidae of preantral and antral oocytes. *Acta Histochem* **101** (2), 127-146.
- Patel, F. A., Clifton, V. L., Chwalisz, K. and Challis, J. R. (1999):** Steroid regulation of prostaglandin dehydrogenase activity and expression in human term placenta and chorio-decidua in relation to labor. *J Clin Endocrinol Metab* **84** (1), 291-299.
- Peña, A., Johannisson, A. and Linde-Forsberg, C. (1999):** Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology* **52** (6), 965-980.
- Peña, A. and Linde-Forsberg, C. (2000a):** Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* **54** (6), 859-875.
- Peña, A. and Linde-Forsberg, C. B. (2000b):** Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* **54** (5), 703-718.
- Peña, A. I., Barrio, F., Quintela, L. A. and Herradón, P. G. (1998a):** Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology* **50**, 163-174.
- Peña, A. I., Barrio, F., Quintela, L. A. and Herradón, P. G. (1998b):** Effects of sodium dodecyl sulphate on post-thaw dog semen quality during in vitro incubation at 39°C and 22°C. *Reprod Dom Anim* **33**, 393-398.
- Peña, A. I., Johannisson, A. and Linde-Forsberg, C. (2001):** Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 371-376.
- Peña, A. I., Quintela, L. A. and Herradon, P. G. (1998c):** Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology* **50** (8), 1211-1220.
- Penfold, L. M. and Moore, H. D. (1993):** A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* **99** (1), 131-134.
- Pemister, R. D., Holst, P. A., Spano, J. S. and Hopwood, M. L. (1973):** Time of ovulation in the beagle bitch. *Biol Reprod* **8** (1), 74-82.

- Philips, D. M. and Dekel, N. (1991):** Maturation of the rat cumulus-oocyte complex: structure and function. *Mol Reprod Devel* **28**, 297-306.
- Philpott, C. C., Ringuette, M. J. and Dean, J. (1987):** Oocyte-specific expression and developmental regulation of ZP3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida. *Dev Biol* **121** (2), 568-575.
- Pineda, M. H., Kainer, R. A. and Faulkner, L. C. (1973):** Dorsal median postcervical fold in the canine vagina. *Am J Vet Res* **34** (12), 1487-1491.
- Pinto, C. R., Eilts, B. E. and Paccamonti, D. L. (1998):** The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemination in bitches. *Theriogenology* **50** (2), 301-305.
- Pinto, C. R. F., Paccamonti, D. L. and Eilts, B. E. (1999):** Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology* **52**, 609-616.
- Platz, C. C. and Seager, S. W. (1977):** Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. *Lab Anim Sci* **27** (6), 1013-1016.
- Polge, C., Smith, A. U. and Parkes, A. S. (1949):** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature* **164**, 666.
- Post, K., Evans, L. E. and Jöchle, W. (1988):** Effects of prolactin suppression with cabergoline on the pregnancy of the bitch. *Theriogenology* **29**, 1233-1243.
- Preidkalns, J. and Leiser, R. (1998):** Female reproductive system. In: "Textbook of Veterinary Histology" (Dellman, H. and Eurell, S., eds.) Williams & Wilkins, Baltimore.
- Province, C. A., Amann, B. W., Pickett, B. W. and Squires, E. L. (1984):** Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology* **22** (4), 409-415.
- Pursel, V. G., Johnson, L. A. and Schulmann, L. L. (1972):** Loss of boar sperm fertilising capacity associated with altered acrosome morphology during in vitro storage. *Proc VIIIth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination (München)* **3**, 1525-1600.
- Pursel, V. G., Schulman, L. L. and Johnson, L. A. (1978):** Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J Anim Sci* **47** (1), 198-202.
- Quinn, P. J. (1989):** Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. *J Bioenerg Biomembr* **21** (1), 3-19.
- Quinn, P. J., Chow, P. Y. and White, I. G. (1980):** Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil* **60** (2), 403-407.
- Reimers, T. J., Phemister, R. D. and Niswender, G. D. (1978):** Radioimmunological measurement of follicle stimulating hormone and prolactin in the dog. *Biol Reprod* **19** (3), 673-679.
- Renard, J. P., Chastant, S., Chesne, P., Richard, C., Marchal, J., Cordonnier, N., Chavatte, P. and Vignon, X. (1999):** Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet* **353** (9163), 1489-1491.
- Renton, J. P., Boyd, J. S., Eckersall, P. D., Ferguson, J. M., Harvey, M. J., Mullaney, J. and Perry, B. (1991):** Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil* **93** (1), 221-231.
- Renton, J. P., Munro, C. D., Heathcote, R. H. and Carmichael, S. (1981):** Some aspects of the aetiology, diagnosis and treatment of infertility in the bitch. *J Reprod Fertil* **61** (2), 289-294.
- Rexroad, C. E., Jr. and Powell, A. M. (1993):** Development of ovine embryos co-cultured on oviductal cells, embryonic fibroblasts, or STO cell monolayers. *Biol Reprod* **49** (4), 789-793.
- Riesenbeck, A., Völger, D. and Hoffmann, B. (2001):** Pranahe Beurteilung von Rüdenspermaxis zur Bestimmung von Vitalitätsparametern. *Tierärztl Prax* **29** (K), 116-120.

- Robbins, R. K., Saacke, R. G. and Chandler, P. T. (1976):** Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws. *J Anim Sci* **42** (1), 145-154.
- Rohloff, D., Laiblin, C. and Heidrich, S. (1978):** Untersuchungen über die Gefrierschutzwirkung von DMSO und Glycerin bei der Tiefgefrierung von Rüdensperma. *Berlin München Tierärztl Wschr* **91** (2), 31-33.
- Roszel, J. F. (1992):** Anatomy of the canine uterine cervix. *Comp Cont Ed* **14** 751
- Rota, A., Frishling, A., Vannozzi, I., Camillo, F. and Romagnoli, S. (2001):** Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 377-381.
- Rota, A., Iguer-Ouada, M., Verstegen, J. and Linde-Forsberg, C. (1999):** Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology* **51** (6), 1045-1058.
- Rota, A., Linde-Forsberg, C., Vannozzi, J., Romagnoli, S. and Rodriguez-Martinez, H. (1998):** Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. *Reprod Dom Anim* **33**, 355-361.
- Rota, A., Ström, B. and Linde-Forsberg, C. (1995):** Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology* **44**, 850-900.
- Rota, A., Ström, C., Linde-Forsberg, C. and Rodriguez-Martinez, H. (1997):** Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology* **47**, 1093-1101.
- Rowson, L. E. A. (1954):** Infertility of cow, sow and bitch. *Irish Veterinary Journal* **8**, 216-221.
- Rüsse, I. (1991):** Frühgravidität, Implantation und Plazentation. Hund. In: "Lehrbuch der Embryologie der Haustiere" (Rüsse, I. and Sinowatz, F., eds.) Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg. pp. 192-198.
- Rüsse, I. and Sinowatz, F. (1991):** Gametogenese. In: "Lehrbuch der Embryologie der Haustiere" (Rüsse, I. und Sinowatz, F., eds.) Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg. pp. 42-92.
- Saint-Dizier, M., Renard, J. P. and Chastant-Maillard, S. (2001b):** Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Reproduction* **121** (1), 97-105.
- Saint-Dizier, M., Salomon, J. F., Petit, C., Renard, J. P. and Chastant-Maillard, S. (2001a):** In vitro maturation of bitch oocytes: effect of sperm penetration. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 147-150.
- Schnorr, B. (1996):** Progenese, Vorentwicklung. In: "Embryologie der Haustiere" Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. pp. 3-35.
- Schotterer, A. (1928):** Beitrag zur Feststellung der Eizahl in verschiedenen Altersperioden bei der Hündin. *Anat Anz* **65**, 177-192.
- Schoysman, R. and Van-der-Zwalmen, O. (1992):** Towards the definition of the fertilizing spermatozoa. *Acta Eur Fertil* **23**, 131-140.
- Schröppel, I. (1988):** Untersuchungen der Motilität der Spermien einiger Haustierarten mit einem Computervideomikrographie-Verfahren. Diss med vet. Universität München
- Schutte, A. P. (1967a):** Canine vaginal cytology. 3. Compilation and evaluation of cellular indices. *J Small Anim Pract* **8** (6), 313-317.
- Schutte, A. P. (1967b):** Canine vaginal cytology. II. Cyclic changes. *J Small Anim Pract* **8** (6), 307-311.

- Scrogie, N. J. (1939):** The treatment of sterility in the bitch by use of gonadotropic hormones. *Vet Rec* **51**, 265-268.
- Seager, S. W. and Fletcher, W. S. (1972):** Collection, storage, and insemination of canine semen. *Lab Anim Sci* **22** (2), 177-182.
- Seager, S. W. and Fletcher, W. S. (1973):** Progress on the use of frozen semen in the dog. *Vet Rec* **92** (1), 6-10.
- Seager, S. W., Plats, C. C. and Fletcher, W. S. (1975):** Conception rates and related data using frozen dog semen. *J Reprod Fertil* **45** (1), 189-192.
- Seager, S. W. and Platz, C. C. (1977):** Artificial insemination and frozen semen in the dog. *Vet Clin North Am* **7** (4), 757-764.
- Seager, S. W. J. (1969):** Successful pregnancies using frozen semen in the dog. *A A Digest* **12**, 6.
- Seager, S. W. J. (1976):** Freezing and transportation of dog semen. *Proc VIIIth International Congress on Animal Reproduction an Artificial Insemination (Krakow)* **5**, 1251-1252.
- Seager, S. W. J. (1986):** Artificial insemination in dogs. *In: "Small Animal Reproduction and Infertility: a Clinical Approach to Diagnosis and Treatment"* (Burke, T. J., ed.) Lea & Febiger, Philadelphia. pp. 207-210.
- Sheppard, C. J. R. and Shotton, D. M. (1997):** Confocal laser scanning microscopy. *In: "RMS Handbook"* Bios Scientific Publisher, Oxford.
- Shille, V. M., Thatcher, M. J. and Simmons, K. J. (1984):** Efforts to induce estrus in the bitch, using pituitary gonadotropins. *J Am vet med Ass* **184**, 1469-1473.
- Shimazu, Y., Yamada, S., Kawano, Y., Kawayi, Y., Nakazawa, M., Naito, K. and Toyoda, Y. (1992):** In vitro capacitation of canine spermatozoa. *J Reprod Dev* **38**, 67-71.
- Shimizu, S., Tsuji, M. and Dean, J. (1983):** In vitro biosynthesis of three sulfated glycoproteins of murine zonae pellucidae by oocytes grown in follicle culture. *J Biol Chem* **258** (9), 5858-5863.
- Shimizu, T., Tsutsui, T., Murao, I. and Orima, H. (1990):** Incidence for transuterine migration of embryos in the dog. *Jap J vet Sci* **52** (6), 1273-1275.
- Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L. and Westhusin, M. (2002):** A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* **415** (6874), 859.
- Schummer, A. and Vollmerhaus, B. (1987):** Harn- und Geschlechtsapparat. *In: "Lehrbuch der Anatomie der Haustiere"* (Nickel, R., Schummer, A. und Seiferle, E., eds.) Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 5th Edt. Vol. II, pp. 300-420.
- Shupnik, M. A. (1996):** Gonadal hormone feedback on pituary gonadotropin genes. *Trends Endocrinol Metab* **7**, 272-276.
- Sigman, M. (1993):** Laboratory testing in the evaluation of male infertility. A rational approach. *World J Urol* **11** (2), 96-101.
- Silva, L. D., Onclin, K., Lejeune, B. and Verstegen, J. P. (1996):** Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet Rec* **138** (7), 154-157.
- Silva, L. D. M., Onclin, K., Snaps, F. and Verstegen, J. (1995):** Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology* **43**, 615-623.
- Silva, L. D. M. and Verstegen, J. P. (1995):** Comparison between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* **44**, 571-579.

Singer, C. (1959): A History of Biology. *In: Abelard-Schuman, London.* pp. 580.

Sirivaidyapong, S., Bevers, M. M. and Colenbrander, B. (1999): Acrosome reaction in dog sperm is induced by a membrane-localized progesterone receptor. *J Androl* **20** (4), 537-544.

Smith, F. O. (1984): Cryopreservation of Canine Semen: Technique and Performance. PhD Thesis. University of Minnesota

Smith, F. O. and Graham, E. F. (1984): Cryopreservation of canine semen: technique and performance. *Proc 10th Int Cong Anim Reprod AI* **2**, 216.

Smith, M. S. and McDonald, L. E. (1974): Serum levels of luteinizing hormone and progesterone during the estrous cycle, pseudopregnancy and pregnancy in the dog. *Endocrinology* **94** (2), 404-412.

Smith, S. C. and England, G. C. (2001): Effect of technical settings and semen handling upon motility characteristics of dog spermatozoa measured using computer-aided sperm analysis. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 151-159.

Sokolowski, J. H., Medernach, R. W. and Helper, L. C. (1968): Exogenous hormone therapy to control the estrous cycle of the bitch. *J Am Vet Med Assoc* **153** (4), 425-428.

Songsasen, N., Yu, I. and Leibo, S. P. (2002): Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. *Mol Reprod Dev* **62** (3), 407-415.

Sorensen, R. A. and Wassarman, P. M. (1976): Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol* **50** (2), 531-536.

Sortino, M. A., Cronin, M. J. and Wise, P. M. (1989): Relaxin stimulates prolactin secretion from anterior pituitary cells. *Endocrinology* **124** (4), 2013-2015.

Spallanzani, L. (1776): Opuscoli di fisica animale e vegetabile. Opuscolo II. *In: Osservazioni e sperienze intorno ai vermicelli spermaici dell' homo e degli animali.*, Modena. (in Watson, 1979)

Sparks, A. E. T., Gwazdauskas, F. C. and McGilliard, M. L. (1992): Culture of one-cell bovine embryos in explanted mouse oviduct and bovine oviductal epithelial cells. *Theriogenology* **37** 587-594.

Steinetz, B. G., Goldsmith, L. T., Harvey, H. J. and Lust, G. (1989): Serum relaxin and progesterone concentrations in pregnant, pseudopregnant, and ovariectomized, progestin-treated pregnant bitches: detection of relaxin as a marker of pregnancy. *Am J Vet Res* **50** (1), 68-71.

Stewart, D. R., Henzel, W. J. and Vandlen, R. (1992): Purification and sequence determination of canine relaxin. *J Protein Chem* **11** (3), 247-253.

Ström, B., Rota, A. and Linde-Forsberg, C. (1997): In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* **48**, 247-256.

Ström Holst, B., Larsson, B., Linde-Forsberg, C. and Rodriguez-Martinez, H. (2000a): Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *J Reprod Fertil* **119** (2), 201-206.

Ström Holst, B., Larsson, B., Linde-Forsberg, C. and Rodriguez-Martinez, H. (2000b): Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. *J Reprod Fertil* **119**, 77-83.

Ström Holst, B., Larsson, B., Rodriguez-Martinez, H., Lagerstedt, A.-S. and Linde-Forsberg, C. (2001): Zona pellucida binding assay - a method for evaluation of canine spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 137-140.

Ström Holst, B., Rota, A., Andersen Berg, K., Linde-Forsberg, C. and Rodriguez-Martinez, H. (1998): Canine sperm head damage after freezing-thawing: ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reprod Dom Anim* **33**, 77-82.

- Szollosi, D. (1972):** Changes of some cell organelles during oogenesis in mammals. In: "Oogenesis" (Biggers, J. D. and Schuetz, A. W., eds.) University Park Press, Baltimore. pp. 47-64.
- Takeishi, M., Akai, R., Tsunekane, T., Iwaki, T. and Nakanowatari, K. (1980):** *Jpn J Anim Reprod* **26** (in Tsutsui et al., 1989b), 151-153.
- Takeishi, M., Kodama, Y., Mikami, T., Tsunekane, T. and Iwaki, T. (1971):** Studies on reproduction in the dog. XI. Induction of estrus by hormonal treatment and results of the following insemination. *Jpn J Anim Reprod* **22**, 71-75.
- Takeishi, M., Mikami, T., Kodama, Y., Tsunekane, T. and Iwaki, T. (1976):** Studies on reproduction in the dog. VIII. Artificial insemination using frozen semen. *Jpn J Anim Reprod* **22**, 28-33.
- Telfer, E. and Gosden, R. G. (1987):** A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil* **81** (1), 137-147.
- Tervit, H. R., Whittingham, D. G. and Rowson, L. E. (1972):** Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil* **30** (3), 493-497.
- Tesarik, J. (1985):** Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J Reprod Fertil* **74** (2), 383-388.
- Tesoriero, J. V. (1981):** Early ultrastructural changes of developing oocytes in the dog. *J Morphol* **168** (2), 171-179.
- Tesoriero, J. V. (1982):** A Morphological, Cytochemical, and Chromatographic Analytic of Lipid Yolk Formation in the Oocytes of the Dog. *Gamete Research* **6**, 267-279.
- Thatcher, M., Shille, V., Buhi, W., Alvarez, I., Concannon, P. and Thibeault, D. (1994):** Canine conceptus appearance and de novo protein synthesis in relation to the time of implantation. *Theriogenology* **41**, 1679-1692
- Theiss, T. (1997):** Untersuchungen zur Gewinnung, In-vitro-Reifung und -Fertilisation von Oozyten beim Hund. Diss vet med. Universität München
- Thomas, P. G. A., Larsen, R. E., Burns, J. M. and Hahn, C. N. (1993):** A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* **40**, 1199-1205.
- Thomas, P. G. A., Surman, V., Myers-Wallen, V. N. and Concannon, P. W. (1992):** Addition of sodium dodecyl sulphate to tris-citrate extender improves motility and longevity of frozen-thawed canine spermatozoa. *Proc 12th Int Cong Anim Reprod AI* **4** 1823-1825.
- Thomassen, R., Farstad, W., Krogenaes, A., Fougner, J. A. and Berg, K. A. (2001):** Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 341-346.
- Thun, R., Watson, P. and Jackson, G. L. (1977):** Induction of estrus and ovulation in the bitch, using exogenous gonadotropins. *Am J Vet Med* **38** (4), 483-486.
- Tietz, W. J. and Seliger, W. G. (1967):** Temporal relationship in early canine embryogenesis. *Anat Rec* **157**, 333-334.
- Tsutsui, T. (1975):** Studies on the reproduction in dog. *Jpn J Anim Reprod* **21**, 65-69.
- Tsutsui, T. (1989):** Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* **39**, 269-275.
- Tsutsui, T., Hase, M., Hori, T., Ito, T. and Kawakami, E. (2000a):** Effects of orvus ES paste on canine spermatozoal longevity after freezing and thawing. *J Vet Med Sci* **62** (5), 533-535.

- Tsutsui, T., Hase, M., Hori, T., Komoriya, K., Shimizu, N., Nagakubo, K. and Kawakami, E. (2000b):** Effect of addition of Orvus ES paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes. *J Vet Med Sci* **62** (5), 537-538.
- Tsutsui, T., Hori, T. and Kawakami, E. (2001a):** Intratubal transplantation of early canine embryos. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 309-314.
- Tsutsui, T., Hori, T., Okazaki, H., Tanaka, A., Shiono, M., Yokosuka, M. and Kawakami, E. (2001b):** Transfer of canine embryos at various developmental stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing. *J Vet Med Sci* **63** (4), 401-405.
- Tsutsui, T., Shimada, K., Nishi, M., Kubo, N., Murao, I., Shimizu, T. and Ogasa, A. (1989b):** An experimental trial on embryo transfer in the dog. *Jpn J Vet Sci* **51** (4), 797-800.
- Tsutsui, T., Shimizu, T., Ohara, N., Shiba, Y., Hironaka, T., Orima, H. and Ogasa, A. (1989a):** Relationship between the number of sperms and the rate of implantation in bitches inseminated into unilateral uterine horn. *Jpn J Vet Sci* **51** (2), 257-263.
- Tsutsui, T., Tezuka, T., Shimizu, T., Murao, I., Kawakami, E. and Ogasa, A. (1988):** Artificial insemination with fresh semen in beagle bitches. *Jpn J Vet Sci* **50**, (1), 193-198.
- Valtonen, M. (1992):** Comparative aspects of reproductive physiology in domestic animals. *In: "Reproduction in Carnivorous. Fur bearing animals"* (Tauson, A.-H. and Valtonen, eds.) Jodbrugsforlaget, Copenhagen.
- Van der Strich, O. (1923):** Etude comparée des ovules des mammifères aux différentes périodes de l'ovogenèse, d'après les travaux du Laboratoire d'Histologie et d'Embryologie de l'Université de Grand. *Arch Biol* **33**, 229-300.
- van Gemert, W. (1970):** Puppies from deep frozen semen. *Netherlands Journal of Veterinary Science* **4**, 55-58.
- Van Hafften, B., Bevers, M. J., Van den Brom, W. E., Okkens, A. C., Van Sluijs, F. J., Willemse, A. H. and Dieleman, S. J. (1994):** Increasing sensitivity of the pituitary to GnRH from early to late anoestrus in the beagle bitch. *J Reprod Fert* **101**, 221-225.
- Vanderlip, S. L., Wing, A. E., Felt, P., Linke, D., River, J., Concannon, P. W. and Lasley, B. L. (1987):** Ovulation induction in anestrus bitches by pulsatile administration of GnRH. *Lab Anim Sci* **27**, 459-468.
- Verstegen, J. P., Onclin, K., Silva, L. D. and Concannon, P. W. (1999):** Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. *Theriogenology* **51** (3), 597-611.
- Verstegen, J. P., Onclin, K., Silva, L. D. M. and Concannon, P. W. (1994):** Early termination of anoestrus and induction of fertile estrus in dog by the dopamine super-agonist cadergoline. *Biol Reprod* **50**, Suppl. 1, 157.
- von Baer, K. E. (1827):** De ovi mammalium et hominis genesis. *In: "Facsimile in Sarton (1931)".* (in Farstad, 2000a)
- Wakayama, T., Perry, A. C., Zuccotti, M., Johnson, K. R. and Yanagimachi, R. (1998):** Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* **394** (6691), 369-374.
- Wakayama, T. and Yanagimachi, R. (1999):** Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nat Genet* **22** (2), 127-128.
- Wales, R. G. and White, I. G. (1958):** The interaction of pH, tonicity and electrolyte concentration on the motility of dog spermatozoa. *J Physiol* **141**, 273-280.

- Wales, R. G. and White, I. G. (1963):** Viability of diluted dog spermatozoa in vitro. *J Reprod Fertil* **5**, 67-76.
- Ward, C. R. and Storey, B. T. (1984):** Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a CTC fluorescence assay. *Dev Biol* **104** 287-296.
- Wassarman, P. M. (1990):** Profile of a mammalian sperm receptor. *Development* **108** (1), 1-17.
- Watson, P. F. (1979):** The preservation of semen in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* **1**, 283-350.
- Watson, P. F. (1981):** The effects of cold shock on sperm cell membranes. *In: "Effects of Low Temperatures on Biological Membranes"* (Clarke, A., ed.) Academic Press, London. pp. 189-218.
- Watson, P. F. (1990):** Artificial Insemination and the Preservation of Semen. *In: "Marshall's Physiology of Reproduction"* (Lammin, G. E., ed.) Churchill Livingstone, Edinburgh, 4nd Edt. Vol. 2, pp. 747-869.
- Watson, P. F. (1995):** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* **7** (4), 871-891.
- Watson, P. F. and Plummer, J. M. (1985):** The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling. *Proc 1st Int Conf on Deep Freezing of Boar Semen*, 113-127.
- Wells, D. N., Misica, P. M. and Tervit, H. R. (1999):** Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* **60** (4), 996-1005.
- Westhusin, M. E., Burghardt, R. C., Ruglia, J. N., Willingham, L. A., Liu, L., Shin, T., Howe, L. M. and Kraemer, D. C. (2001):** Potential for cloning dogs. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 287-293.
- Wheeler, M. B. and Seidel, G. E. J. (1987):** Zona pellucida penetration assay for capacitation of bovine sperm. *Gamete Res* **18**, 237-250.
- Whitney, L. F. (1940):** The time of ovulation in the bitch. *Vet Med* **35**, 182-187.
- Wildt, D. (1991):** Fertilization in Cat. *In: "A Comparative Overview of Mammalian Fertilization"* (O'Rand, B.S.D.a.M.G., ed.) Plenum Press, New York. pp. 299-328.
- Wildt, D. E., Chakraborty, P. K., Panko, W. B. and Seager, S. W. (1978):** Relationship of reproductive behavior, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch. *Biol Reprod* **18** (4), 561-570.
- Wildt, D. E., Panko, W. B., Chakraborty, P. K. and Seager, S. W. (1979):** Relationship of serum estrone, estradiol-17beta and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch. *Biol Reprod* **20** (3), 648-658.
- Williams, W. W. (1920):** Techniques of collecting semen for laboratory examination with a review of several diseased bulls. *Cornell Vet* **10**, 87-94.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. and Campbell, K. H. (1997):** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385** (6619), 810-813.
- Wilson, M. S. (1993):** Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J Reprod Fertil Suppl* **47**, 307-311.
- Wilson, M. S. (2001):** Transcervical insemination techniques in the bitch. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **31** (2), 291-304.
- Woodall, P. F. and Johnstone, I. P. (1988):** Dimensions and allometry of testes, epididymides and spermatozoa in the domestic dog (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil* **82** (2), 603-609.
- Wright, P. J. (1982):** The induction of oestrus in the bitch using daily injections of pregnant mare serum gonadotrophin. *Aust Vet J* **59** (4), 123-124.

- Wright, R. W., Jr. and Bondioli, K. R. (1981):** Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals. *J Anim Sci* **53** (3), 702-729.
- Xia, G. L., Kikuchi, K., Noguchi, J. and Izaïke, Y. (2000):** Short time priming of pig cumulus-oocyte complexes with FSH and forskolin in the presence of hypoxanthine stimulates cumulus cells to secrete a meiosis-activating substance. *Theriogenology* **53** (9), 1807-1815.
- Xu, K. P., Yadav, B. R., Rorie, R. W., Plante, L., Betteridge, K. J. and King, W. A. (1992):** Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviducal epithelial cells. *J Reprod Fertil* **94** (1), 33-43.
- Yamada, S., Shimazu, Y., Kawaji, H., Nakazawa, M., Naito, K. and Toyoda, Y. (1992):** Maturation, fertilization, and development of dog oocytes in vitro. *Biol Reprod* **46** (5), 853-858.
- Yamada, S., Shimazu, Y., Kawano, Y., Nakazawa, M., Naito, K. and Toyoda, Y. (1993):** In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *J Reprod Fertil Suppl* **47**, 227-229.
- Yanagimachi, R. (1988a):** Mammalian fertilization. *In: "The Physiology of Reproduction"* (Knobli, E. and Neil, J. D., eds.) Raven Press, New York. Vol. 1, pp. 135-185.
- Yanagimachi, R. (1988b):** Sperm-egg fusion. Membrane fusion in fertilization. *In: "Current Topics in Membranes and Transport"* (Bonner, F. and Düzgünes, N., eds.) Academic Press, New York. Vol. 32, Cellular Transport and Viral Infection, pp. 3-43.
- Yanagimachi, R. (1994):** Mammalian Fertilization. *In: "The Physiology of Reproduction"* (Knobli, E. and Neil, J. D., eds.) Raven Press, New York. pp. 189-317.
- Yeager, A. E. and Concannon, P. W. (1995):** Association between the preovulatory LH surge and the early ultrasonographic detection of pregnancy and fetal heart-beats in beagle dogs. *Theriogenology* **34** 655-665.
- Yeager, A. E. and Concannon, P. W. (1996):** Ovaries. *In: "Small Animal Ultrasound"* (Green, R. W., ed.) Lippincott-Raven, Philadelphia. pp. 293-303.
- Yubi, A. C. (1984):** Investigations of Dog Semen with Particular Reference to Freezing Techniques. MVM Thesis. University of Glasgow, Faculty of Veterinary Medicine
- Zander, J. (1959):** Gestagens in human pregnancy. *In: "Recent Progress in Endocrinology of Reproduction"* (Lloyd, C. W., ed.) Academic Press, New York, pp. 255.
- Zerobin, K. (1987):** Physiologie der Fortpflanzung. *In: "Lehrbuch der Veterinär-Physiologie"* (Scheunert, A. and Trautmann, A., eds.) Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, pp. 478-521.
- Zhang, B. R., Larsson, B., Lundeheim, N. and Rodriguez-Martinez, H. (1998):** Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. *Int J Androl* **21** (4), 207-216.
- Zöldág, L., Fekete, S., Csaky, I. and Bersenyi, A. (2001):** Fertile estrus induced in bitches by bromocryptine, a dopamine agonist: a clinical trial. *Theriogenology* **55** (8), 1657-1666.

7 Anhang

7.1 Verdüner von Hundesperma

7.1.1 Gebräuchliche Verdünnern bei der Kühlung von Hundesperma

7.1.1.1 TRIS-gepufferter Eidotter-Verdüner (Gill et al., 1970)

100 ml	wässrige Lösung enthalten:
2,4 g	TRIS Base (THAM)
1,3 g	Zitronensäure Monohydrat
1 g	Fruktose
3,8 ml	Glyzerin
20 %	Eidotter

7.1.1.2 Zitrat-Bikarbonat-Eidotter-Verdüner (Province et al., 1984)

100 ml	wässrige Lösung enthalten:	
0,07 g	Zitronensäure Monohydrat	
0,17 g	Natriumbikarbonat	
0,03 g	Kaliumchlorid	
0,75 g	Glyzerin	
0,24 g	Glukose	
20 ml	Eidotter	pH 6,8; 308 mOsm

7.1.1.3 Caprogen-Eidotter-Verdüner (Province et al., 1984)

100 ml	wässrige Lösung enthalten:	
1,56 g	Natriumzitraddihydrat	
0,78 g	Glyzerin	
0,23 g	Glukose	
1 ml	2,5 %-ige N-Caprinsäure	
1 ml	45 mg/dl Katalase	
20 ml	Eidotter	pH 7,0; 326 mOsm

unmittelbar vor Gebrauch mit Stickstoffgas sprudeln

7.1.1.4 Magermilchverdünner (Province et al., 1984)

Magermilch für 10 Minuten auf 95°C erhitzen, dann abkühlen, pH 6.5; 277 mOsm

7.1.1.5 Zitrat-Eidotter-Verdüner (Christiansen, 1984)

80%	Natriumzitratlösung (2,9 %)
20 %	Eidotter

7.1.1.6 TRIS-Fruktose-Verdünner (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001c)

3,025 g	TRIS (Hydroxymethyl)-Aminomethan	
1,7 g	Natriumzitatmonohydrat	
1,25 g	Fruktose	
100 mg	Benzylpenicillin	
100 mg	Dihydrostrepzomycinsulfat	
20 %	Eidotter	
100 ml	Aqua dest.	pH 6,84; 364 mOsm

7.1.1.7 TRIS-Glukose-Verdünner (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001c)

3,025 g	TRIS (Hydroxymethyl)-Aminomethan	
1,7 g	Natriumzitatmonohydrat	
1,25 g	Glukose	
100 mg	Benzylpenicillin	
100 mg	Dihydrostrepzomycinsulfat	
20 %	Eidotter	
100 ml	Aqua dest.	pH 6,82; 381 mOsm

7.1.1.8 TRIS-BES-Verdünner (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001c)

0,43 g	TRIS (Hydroxymethyl)-Aminomethan	
1,49 g	BES (N,N-bis (2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethan-Sulfonsäure)	
3,4 g	Laktose	
0,59 g	Glukose	
100 mg	Benzylpenicillin	
100 mg	Dihydrostrepzomycinsulfat	
20 %	Eidotter	
100 ml	Aqua dest.	pH 6,81; 310 mOsm

7.1.1.9 EDTA-Verdünner (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001c)

6 g	Glukose	
0,37 g	EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure)	
0,12 g	Natriumbikarbonat	
100 mg	Benzylpenicillin	
100 mg	Dihydrostrepzomycinsulfat	
20 %	Eidotter	
100 ml	Aqua dest.	pH 6,81; 464 mOsm

7.1.1.10 Kommerzielle Verdüner

Green-Extender (IMV, International Corp., L'Aigle Cedex, France)
 Fresh-phos (IMV, International Corp., L'Aigle Cedex, France)
 Biladyl (Minitube GmbH, Tiefenbach, Germany)
 EYC (Fresh Plus Extender, Edwards Agri Sales Inc., Baraboo, WI)

7.1.2 Verdünnern für die Kryokonservierung von Hundesperma

7.1.2.1 Pipes Verdüner (Dobrinski et al., 1993)

0,3 mol/l	50 % (v/v) Piperazin-N-N' bis(2-Ethanol-schwefelsäure) pH mit 0,3 mol KOH /l auf 7 einstellen
0,3 mol/l	Dextrose 25 % (v/v)
0,3 mol/l	Natriumzitatmonohydrat 25 % (v/v)
20 % (v/v)	Eidotter
9 % (v/v)	Glyzerin
6 % (v/v)	Linco-Spectin (Upjohn Co., Orangeville, Ontario, Canada)

7.1.2.2 TRIS-Fruktose-Zitrat-Verdüner (Dobrinski et al., 1993)

4,8 g	TRIS (Hydroxymethyl)-Aminomethan
2,6 g	Natriumzitatmonohydrat
2,0 g	Fruktose
40,0 ml	Eidotter
144,4 ml	Aqua dest.
17,6 ml	Glyzerin
0,3 ml	Linco-Spectin (Upjohn Co., Orangeville, Ontario, Canada)

7.1.2.3 TES/TRIS-Verdüner (Silva und Versteegen, 1995)

4,4 g	TES (Sigma)
2,3 g	TRIS (Sigma)
20 ml	Eidotter
67,5 ml	Aqua dest.
8 ml	Glyzerin

7.1.2.4 TRIS-Verdüner (Rota et al., 1997)

2,4 g	TRIS (Hydroxymethyl)-Aminomethan
1,4 g	Zitronensäure Monohydrat
0,8 g	Natrium-benzylpenizillin
0,1 g	Streptomizinsulfat
20 %	Eidotter
3 / 7 ml	Glyzerin
100 ml	Aqua dest.
0 / 1 ml	Epuex STM Paste

7.1.2.5 TRIS-gepufferter Eidotter-Verdüner (Hay et al., 1997a, b)

20 mmol	TRIS
5 mmol	Glukose
6 mmol	Zitronensäure
1000	IU/ml Penizillin
1000 µl/ml	Streptomycin
4 %	Glyzerin
20 %	Eidotter

7.1.2.6 Kommerziell erhältliche Verdüner

Triadyl-Verdüner (Minitub GmbH, Tiefenbach, Deutschland)
 IMV Universalverdünner (I.M.V. International Corp., L'Aigle Cedex, France)
 Laciphos (I.M.V. International Corp., L'Aigle Cedex, France)
 Biociphos (I.M.V. International Corp., L'Aigle Cedex, France)
 C.L.O.N.E. (Pennsylvania, USA; ICG, Pennsylvania, USA)

7.2 Medien für Hundeoocyten /-embryonen

7.2.1 Waschmedien

7.2.1.1 TALP-HEPES Medium (Songsasen et al., 2002)

114,0 mmol/l	NaCl
3,1 mmol/l	KCl
2,0 mmol/l	NaHCO ₃
0,3 mmol/l	NaH ₂ PO ₄
10,0 mmol/l	Laktat (Na-Salz)
2,0 mmol/l	CaCl ₂
0,5 mmol/l	MgCl ₂
10,0 mmol/l	HEPES
0,2 mmol/l	Pyruvat
3,0 mg/ml	BSA
50 µg/ml	Gentamicin

7.2.1.2 H-CZB Medium (Songsasen et al., 2002)

81,62 mmol/l	NaCl
4,83 mmol/l	KCl
1,70 mmol/l	CaCl ₂ 2H ₂ O
1,18 mmol/l	KH ₂ PO ₄
1,18 mmol/l	MgSO ₄ 7H ₂ O
4,00 mmol/l	NaHCO ₃
20,00 mmol/l	HEPES
0,27 mmol/l	Na-Pyruvat
31,30 mmol/l	Na-Laktat
1,00 mmol/l	Glutamin
0,11 mmol/l	EDTA

5,00 g/l	BSA (FR V)	
100,00 U/ml	Na-Penicillin G	
0,70 mg/ml	Streptomycin	
0,01 mg/ml	Phenolrot	pH 7,4; 270 mOsm

7.2.1.3 Medium 199 (Nickson et al., 1993)

TCM 199 mit L-Glutamin (GIBCO)	
25 mmol/ml	Hepes
50 mg/ml	Gentamicinsulfat

7.2.2 IVM/IVF-Medien

7.2.2.1 Kulturmedium nach Mahi und Yanagimachi (1976)

80 %	TCM 199 (Hank's solution base, Difco Labs, Detroit, Michigan)
20 %	FKS
2 mg/ml	NaHCO ₃
100 U/ml	K-Penicillin G
50 µg/ml	Streptomycinsulfat

7.2.2.2 mTHY (modifizierte Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung) (Yamada et al., 1992, 1993)

6,970 g/l	NaCl
0,356 g/l	KCl
0,251 g/l	CaCl ₂ x 7H ₂ O
0,162 g/l	KH ₂ PO ₄
0,293 g/l	MgSO ₄ x 7H ₂ O
2,106 g/l	NaHCO ₃
0,110 g/l	Na-Pyruvat
1,000 g/l	Glukose
10 %	FKS
30 mg/l	Gentamicin

7.2.2.3 Kulturmedium nach Nickson et al. (1993)

TCM 199 mit Hank's Salz und L-Glutamin (GIBCO)	
0,25 mmol/l	Pyruvat
4,79 mmol/l	Lactat
50 mg/ml	Gentamicinsulfat
20 µg/ml	Oestradiol
10 %	Serum einer oestrischen Hündin

7.2.2.4 RR-Medium (Theiss, 1997)

Medium 199 (mit Earle's Salzen, Fa. Seromed)

0,1 g/l	L-Glutamin
0,8 g/l	NaHCO ₃
1,4 g/l	Hepes
2,5 g/l	Pyruvat
0,6 g/l	Ca-Lactat
0,05 g/l	Gentamicin
10 %	ECS (Estrus Cow Serum)

7.2.2.5 Modifiziertes TCM 199-HEPES-Medium

TCM 199-HEPES (Sigma) (Hewitt und England, 1997, 1999a, b; Luvoni et al., 2001)

0,3 %	BSA (Fraktion V)
2 mg/ml	NaHCO ₃
100 IU/ml	Penicillin
50 µg/ml	Streptomycinsulfat

7.2.2.6 Modifiziertes TCM 199-HEPES-II-Medium

TCM 199-HEPES (Sigma) (Hewitt et al., 1998)

0,3/ 4 %	BSA (Fraktion V) oder 0, 5, 10, 20 % FKS
2 mg/ml	NaHCO ₃
100 IU/ml	Penicillin
50 µg/ml	Streptomycinsulfat

7.2.2.7 Modifiziertes TCM 199 (ICSI) (Fulton et al., 1998)

TCM 199 mit

10 %	FKS
15 ng/ml	FSH
5 ng/ml	LH
100 U/ml	Penizillin
0,1 mg/ml	Streptomycin

7.2.2.8 Co-Kulturmedium (Hewitt und England, 1999a)

100 ml TCM 199

0,5 mg	Insulin	
0,5 mg	Transferrin	
0,5 µg	Selenium	
10 µg	Epidermal Growth Factor (EGF)	
2 g	Fungizone (Life Technologies, Paisley)	pH 7,2-7,4; 285 mOsm

7.2.2.9 Synthetische Oviduktflüssigkeit (SOF) (Hewitt und England, 1999a)

107,70 mmol	NaCl	
7,16 mmol	KCl	
1,19 mmol	KH ₂ PO ₄	
1,71 mmol	CaCl ₂	
0,49 mmol	MgCl ₂	
25,07 mmol	NaHCO ₃	
0,33 mmol	Na-Pyruvat	
3,30 mmol	Na-Laktat	
1,50 mmol	Glukose	
32 mg/ml	BSA (Fraktion V)	
100 IU/ml	Penicillin	
50 µg/ml	Streptomycin	pH 7,2-7,4; 270 mOsm

7.2.2.10 In-vitro-Kultur-1 (IVC-1) Medium (Songsasen et al., 2002)

Tyrode Salzlösung

0,3 %	(w/v) BSA
1 % (v/v)	minimal nichtessentielle Aminosäuren (Life Technologies, Grand Island, NY)
0,36 mmol	Pyruvat
2,2mmol	Kalzium-Laktat
1 mmol	Glutamin
9 mmol	NaHCO ₃
50 µg/ml	Gentamicin

7.2.2.11 Modifiziertes TCM 199 nach Fujii et al. (2000)

TCM 199 (Earl's Salze)

25 mmol	HEPES (GIBCO)
5 %	FKS (GIBCO)
50 µg/ml	Gentamicin (Sigma)

7.2.2.12 Modifiziertes TCM 199 nach Otoi et al. (1999, 2000a, 2001)

TCM 199 (Earl's Salze)

25 mmol	HEPES (GIBCO)
5 %	BSA (Sigma)
50 µg/ml	Gentamicin (Sigma)

7.2.3 ET-Medien

7.2.3.1 Spülmedium (Kinney et al., 1979)

Ham' F10	
12,5 %	FKS
50 IU	Penicillin
50 µg/ml	Streptomycin

7.2.3.2 Operationsmedium (Westhusin et al., 2001)

TCM199-HEPES (Gibcon BRL, Grand Island, NY) mit 10 % FKS

7.3 Isolation bzw. Reifung caniner Follikel

7.3.1 Enzym-Verdau-Lösung zur Follikelisolierung (Durrant et al., 1998)

BWW (siehe Anhang 7.4.1.2)	
1000 IU	Kollagenase Typ I, Sigma)
75 IU	DNA-ase 1 /ml (Sigma)
2,5 ml	Enzymlösung / g Gewebe

7.3.2 Isolation caniner Follikel durch Verdauung (Durrant et al., 1998)

- Verdau der zerstückelten Ovarien bei 37°C in Enzym-Lösung für eine Stunde;
- Nach der Entfernung der Enzymlösung durch Filtration (35 µ Nylonfilter) Gewebe und freie Follikel mit BWW (+0,1 % BSA) vom Filter waschen;
- Freie präantrale bzw. frühe antrale Follikeln (APAN bzw. EAN) in frisches Medium umsetzen
- Im weichen Gewebe verbliebene Follikel freipräparieren (mit Hilfe einer 30 G Nadel) und ebenfalls umsetzen;
- Klassifikation der Follikel nach Größe und Charakteristika des Ooplasmas der Eizellen und nach Zahl und Erscheinungsbild der Granulosazelllagen;

7.3.3 Modifiziertes Dulbecco's Eagle's Medium (DME/F-12) (Bolamba et al., 1998)

Modifiziertes Dulbecco's Eagle's Medium/ F-12 Ham Medium (DME/F-12) 1:1	
20 % (v/v)	FKS
2 mmol	L-Glutamin
1 % (v/v)	Antibiotikum-Antimykotikum
1 µg/ml	FSH
10 IU/ml	hCG
1 µg/ml	Östradiol

7.3.4 Follikelkultivierung (Bolamba et al., 1998)

Plastik Kulturplatten (24 well; Costar, Cambridge, MA, USA) wurden mit 350 µl sterilem Agar (0,6 % Agar (w/v) in modifiziertem BWW in BSA) beschichtet, bei 4°C aufbewahrt und vor der Kultivierung für ca. drei Stunden bei 37°C erwärmt. Die Agarbeschichtung schützt vor Verlust der Granulosazellen und unterstützt die Beibehaltung der dreidimensionalen Struktur der Follikel. Zugabe von 400 µl DME/F-12 (7.3.3)

7.3.5 Untersuchung der nuklearen Reifung (Bolamba et al., 1998)

Lösung A: BWW mit BSA und 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon

Lösung B: EGTA-Zitrat-Phosphat-Puffer

2 mmol EGTA

130 mmol NaCl

10 mmol Na₂HPO₄

1,47 mmol KH₂PO₄

11 mmol Natriumzitrat

- Transfer der Follikel in 1:1 Lösung A : Lösung B
- Inkubation bei 37°C über Nacht
- Vortexen für zwei bis drei Minuten
- Isolation der Oozyten
- Deckglaspräparat, Essigsäure-Ethanol-Fixation (1:3, v/v), Aceto-Orcein-Färbung

7.4 In-vitro-Kultivierung von Hundespermien

7.4.1 Medien für die in vitro Kapazitation

7.4.1.1 Brackett-Oliphant-Medium

Brackett-Oliphant-Medium (Otoi et al., 2000b)

3 mg/ml BSA

10 µg/ml Heparin

2,5 mmol Caffein

7.4.1.2 BWW-Medium (Mahi und Yanagimachi, 1976)

83,49 mmol NaCl

4,78 mmol KCl

1,71 mmol CaCl₂

1,19 mmol KH₂PO₄

25,07 mmol NaHCO₃

1,19 mmol MgSO₄

0,25 mmol Na-Pyruvat

21,55 mmol Na-Laktat

5,56 mmol Glukose

1,000 g/l BSA

0,020 g/l Phenolrot

0,050 g/l Gentamicin SO₄

pH 7,8; 302mOsm

7.4.1.3 Canines Kapazitationsmedium (CCM) (Mahi und Yanagimachi, 1978)

83,49mmol	NaCl	
4,78 mmol	KCl	
1,71 mmol	CaCl ₂	
1,19 mmol	KH ₂ PO ₄	
37,61 mmol	NaHCO ₃	
0,25 mmol	Na-Pyruvat	
21,55 mmol	Na-Laktat (60 % Sirup)	
2,78 mmol	Glukose	
2,000 g/l	BSA (Fraktion V)	
0,020 g/l	Phenolrot	
0,050 g/l	Gentamicin SO ₄	pH 7,8; 302mOsm

7.4.1.4 Minimal Kapazitationsmedium (MCM) (Mahi und Yanagimachi, 1978)

102,9 mmol	NaCl
1,71 mmol	CaCl ₂
25,07 mmol	NaHCO ₃
0,25 mmol	Pyruvat
21,55 mmol	Laktat
2,78 mmol	Glukose (nur bei Mahi und Yanagimachi, 1978)
2,0 mg/ml	BSA (nur bei Mahi und Yanagimachi, 1978)

7.4.1.5 TALP (Bavister et al., 1983)

114,0 mmol	NaCl
3,2 mmol	KCl
2,0 mmol	CaCl ₂
0,5 mmol	MgCl ₂ 6H ₂ O
25,0 mmol	NaHCO ₃
0,4 mmol	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O
5,0 mmol	Glukose
10,0 mmol	Laktat (Na-Salz)
0,1 / 0,5 mmol	Pyruvat (Na-Salz)
100 U/ml	Penicillin G
0,01 mg/ml	Phenolrot
3 mg/ml	BSA

7.4.1.6 TALP-Hepes (Bavister et al., 1983)

114,0 mmol	NaCl
3,2 mmol	KCl
2,0 mmol	CaCl ₂
0,5 mmol	MgCl ₂ 6H ₂ O
2,0 mmol	NaHCO ₃
0,4 mmol	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O
5,0 mmol	Glukose

10,0 mmol	Laktat (Na-Salz)
0,1 / 0,5 mmol	Pyruvat (Na-Salz)
Hepes	2,4 mg/ml
100 U/ml	Penicillin G
0,01 mg/ml	Phenolrot
3 mg/ml	BSA

7.4.2 "Swim-up"-Verfahren (Nickson et al., 1993; Niemann und Meinecke, 1993)

- 1 ml der ersten und der zweiten Fraktion von frisch ejakuliertem Hundesperma in ein Zentrifugenröhrchen vorgelegen
- darauf 3 ml mTCM-Medium
- „swim-up“ für eine Stunde, 37°C, 5 % CO₂
- motile Spermien im Überstand werden aufgenommen, geschädigte und unbewegliche Spermien sowie weitere Bestandteile des Ejakulates verbleiben auf dem Boden des Röhrchens
- Spermien im oberen Milliliter in einer Endkonzentration von 5×10^5 Spermien/ml zu den in vitro gereiften Eizellen auf dem Monolayer gegeben.

7.4.2.1 "swim-up"-Medium (Nickson et al., 1993)

TCM 199 mit Hank's Salz und L-Glutamin (GIBCO)	
50 mg/ml	Gentamicinsulfat
10 %	FKS

7.5 Untersuchung von Hundespermien

7.5.1 Formolzitrat-Flüssigfixierung

7.5.1.1 Fixierlösung (Riesenbeck et al., 2001)

2,9 g	tri-Natrium-Zitrat-Dihydrat
100 ml	Aqua dest.
4 ml	Formaldehydlösung (35 %)
0,156 g	Rose Bengal (Sigma)

7.5.1.2 Durchführung der Formolzitrat-Flüssigfixierung (Riesenbeck et al., 2001)

- 300 µl Fixierlösung (7.5.1.1) in ein Gefäß füllen
- 10 µl Sperma hinzugeben, gründlich vermischen
- mit 10 ml der Suspension Deckglaspräparat herstellen
- nach 10- besser 30-minütiger Wartezeit unter Ölimmersion bei 1000-facher Vergrößerung 200 Spermien auf alle pathomorphologischen Veränderungen beurteilen (Akrosomen und apikaler Rand haben besondere Bedeutung)

7.5.2 HOS-Test (Riesenbeck et al., 2001)

7.5.2.1 Hypoosmotische Lösung (150 mOsm)

20,735 g Natrium-Zitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)

1,351 g Fruktose

ad 100 ml Aqua dest.

7.5.2.2 Durchführung des HOS-Tests

- 100 ml Sperma in 1 ml hypoosmolare Lösung
- 30 Minuten bei 37°C inkubieren
- Deckglaspräparat, Beurteilung der Schwanzformen von 200 Spermien bei 400-facher Vergrößerung

7.6 Eizellfärbung

7.6.1 Deckglaspräparat (Theiss, 1997)

- Eizellen auf mit 96 %-igem Ethanol entfetteten Objektträger
- Vor Aufbringen des Deckglases an den Längsseiten Wachsmischung aufbringen (so kann Fixier- bzw. Färbelösung über die Stirnseiten durchfließen)
- Deckglas unter Sichtkontrolle auflegen und vorsichtig festdrücken

7.6.2 Aceto-Orcein Färbung (Fulton et al., 1998; Hewitt et al., 1998a; Theiss, 1997)

Aceto-Orcein: 0,75 bis 2 % Orcein in 45 % Essigsäure

Aceto-Glyzerin: 20 % Glyzerin, 20 % Essigsäure, 60 % Aqua dest.

- Filterpapier an einer Stirnseite des Deckglases anlegen, Aceto-Orcein-Lösung auf gegenüberliegende Seite, so kann Lösung unter Deckglas fließen;
- nach ca. drei Minuten Aceto-Glyzerin-Lösung zur Entfärbung bzw. Differenzierung des Kernmaterials nachlaufen lassen (mit Löschblatt), anschließend trocknen

7.6.3 Propidiumjodid (Hewitt et al., 1998)

Stammlösung: 1 mg/ml in Aqua dest.

Gebrauchslösung: 10 µl Stocklösung in 1 ml PBS

- Vor Färbung Inkubation in PBS, da PI nur tote Zellen permeiert
- Inkubation der Eizellen in Gebrauchslösung
- Auswertung mit Fluoreszenzmikroskop (365 nm Exzitationsfilter), PI färbt Nukleinsäuren

7.6.4 Hoechst 33258 (Hewitt et al., 1998)

Stammlösung: 20 mg/ml Hoechst 33258 in Aqua dest.

Gebrauchslösung: 10 ml Stocklösung in 5 ml PBS + 4 mg BSA

- 10 Minuten Inkubation der Eizellen in Gebrauchslösung
- Untersuchung mit Fluoreszenzmikroskop (365 nm Exzitationsfilter)

7.6.5 Co-Färbung mit PI und WGA-FITC (Hewitt et al., 2001)

PBS (Sigma, Bicester) mit

10 µg/ml PBS (Sigma, Bicester)
 5 µg/ml WGA-FITC (Sigma, Bicester)
 0,1 % DMSO (v/v) (Sigma, Bicester)

- Inkubation der Eizellen in Färbelösung für fünf Minuten
- Deckglaspräparat (7.6.1)
- Auswertung mit Fluoreszenzmikroskop (PI: 585 nm Exzitationsfilter; WGT-FITC: 505-530 nm Exzitationsfilter)
- Auswertung mit Konfokalmikroskopie (PI: 488 nm AR-Laser; WGT-FITC: 543 nm He-Ne-Laser)

7.7 Klonierung

7.7.1 Gewinnung caniner Fibroblasten (Hill et al., 2000)

- Hautbiopsie (ca. 1 x 3 cm) vom subkutanen Gewebe befreien
- Mit Rasierklinge in 1-3 mm große Stücke schneiden
- Transfer in 25 mm² Zellkulturflaschen Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (DMEM/F12, Gibco) + 10 % (v/v) FKS + 1 % (v/v) Penicillin / Streptomycin (Gibco; 10000 U/ml Penicillin G; 10000 µg/ml Streptomycin)
- Kultivierung in wasserdampfgesättigter CO₂ Atmosphäre (5 %) bei 37°C
- Wurde nach 14 Tagen Konfluenz erreicht, erfolgte die Trypsinierung für fünf Minuten
- Der Zellgehalt wurde mittels Partikelzählgerät bestimmt
- Zentrifugation
- Resuspension des Pellets in einer Konzentration von 1 Million Zelle /ml
- Transfer von 250000 Zellen in 25 mm² Zellkulturflaschen
- Fibroblastenpräparation durch Trypsinierung früher Passagen (Passage 3 bis 4; Tag 13 bis 14 in Kultur)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. J. Braun möchte ich für die Überlassung des Themas, seine freundliche, jederzeit gewährte und engagierte Unterstützung und seine produktiven Anregungen bei der Erstellung dieser Arbeit meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. R. Stolla danke ich ebenfalls für die freundliche Unterstützung und für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten.

Allen Mitarbeitern der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik danke ich für die gute Zusammenarbeit, die freundliche Aufnahme und die Mithilfe beim Erstellen der Arbeit.

Meinem Mann Jost danke ich von ganzem Herzen, dass er immer für mich da war und mich mit aller Kraft unterstützt.