

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
unter kommissarischer Leitung von Prof. Dr. U. Matis

# **Untersuchungen zur Embryogewinnung beim Hund**

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

von

Beate Kristina Kienzle  
aus Ludwigsburg  
München 2006

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

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer  
**1. Gutachter:** Univ.-Prof. Dr. J. Braun  
**2. Gutachter:** Priv.-Doz. Dr. A. Höflich

Tag der Promotion: 28. Juli 2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literatur.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Deckzeitpunktbestimmung bei der Hündin.....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Zyklusstadien der Hündin.....	2
2.1.1.1 <i>Proöstrus</i> .....	2
2.1.1.2 <i>Östrus</i> .....	3
2.1.1.3 <i>Metöstrus</i> .....	4
2.1.1.4 <i>Anöstrus</i> .....	6
<b>2.2 Läufigkeitsinduktion.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Künstliche Besamung der Hündin .....</b>	<b>10</b>
2.3.1 Besamungszeitpunkt.....	10
2.3.1.1 <i>Verhalten der Hündin</i> .....	10
2.3.1.2 <i>Äußeres Genitale</i> .....	10
2.3.1.3 <i>Vaginalausfluss</i> .....	10
2.3.1.4 <i>Vaginoskopische Untersuchung</i> .....	11
2.3.1.5 <i>Zytologische Untersuchung</i> .....	11
2.3.1.6 <i>Progesteronkonzentration</i> .....	11
2.3.1.7 <i>LH-Konzentration</i> .....	12
2.3.2 Spermagewinnung .....	12
2.3.3 Spermaarten .....	13
2.3.4 Besamungstechniken.....	13
2.3.5 Erzielte Trächtigkeitsraten im Bezug auf Spermaart und Besamungstechnik	14
<b>2.4 Embryonen.....</b>	<b>15</b>
2.4.1 Ovulation, Befruchtung und embryonale Entwicklung .....	15
2.4.2 Embryogewinnung .....	17
2.4.3 In-vitro-Produktion von Embryonen.....	17
2.4.4 Medien für die In-vitro-Reifung und -Befruchtung von Eizellen .....	19
<b>2.5 Embryonale Stammzellen .....</b>	<b>20</b>
2.5.1 <i>Verwendung</i> .....	21
2.5.2 <i>Stand der Forschung</i> .....	21
2.5.3 <i>Gewinnung ES</i> .....	21
2.5.4 Differenzierung von ES-Zellen .....	22
2.5.4.1 <i>In vivo Differenzierung von ES-Zellen</i> .....	22
2.5.4.2 <i>In-vitro-Differenzierung von ES-Zellen</i> .....	23
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Versuchstiere .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Läufigkeitsinduktion.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3 Klinische Untersuchung der Hunde.....</b>	<b>25</b>
3.3.1 Überprüfung des Duldungsreflexes.....	25
3.3.2 Adspektion des äußeren Genitales .....	25
3.3.3 Vaginoskopie .....	26

3.3.4	Vaginalzytologie .....	26
3.3.5	Progesterontest.....	27
<b>3.4</b>	<b>Besamungs- oder Deckzeitpunkt .....</b>	<b>27</b>
3.4.1	Künstliche Besamung .....	28
3.4.2	Natursprung .....	28
<b>3.5</b>	<b>Embryogewinnung .....</b>	<b>29</b>
3.5.1	Ovariohysterektomie .....	29
3.5.2	Uterusspülung .....	29
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Beurteilung des Ovulationszeitpunktes .....</b>	<b>31</b>
4.1.1	Progesteron .....	31
4.1.2	Klinische Parameter .....	31
4.1.3	Untersuchungen der läufigkeitsinduzierten Hündinnen .....	43
4.1.4	Kombination mehrerer Ovulationskriterien .....	47
<b>4.2</b>	<b>Embryogewinnung .....</b>	<b>49</b>
4.2.1	Trächtigkeitsrate.....	49
4.2.2	Embryorate und Wiederfindungsrate.....	49
4.2.3	Anzahl der Corpora lutea .....	51
4.2.4	Anzahl der Embryonen.....	52
4.2.5	Entwicklungsstadien der gewonnenen Embryonen.....	53
<b>4.3</b>	<b>Morphologie der Embryonen.....</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>68</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>80</b>
<b>9.1</b>	<b>Untersuchungsprotokoll .....</b>	<b>80</b>
<b>9.3</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>82</b>
<b>9.4</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>83</b>
<b>9.5</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>84</b>

## 1 Einleitung

Techniken zur assistierten Reproduktion von Säugetieren gewinnen immer mehr an Bedeutung, verlangen aber andererseits gute Kenntnisse über die Reifung von Gameten, den Vorgang der Befruchtung und der frühembryonalen Entwicklung. Genau in diesem Bereich klafft bisher beim Hund eine große Lücke. 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. Wie die Beispiele anderer Tierarten, insbesondere beim Rind zeigen, können umgekehrt solche Methoden sehr wirkungsvoll eingesetzt werden, um spezifische Vorgänge im Genitale am In-vitro-Modell zu untersuchen. So liegen zum Beispiel beim Hund bisher nur sehr wenige Informationen zur frühembryonalen Entwicklung vor.

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen eines größeren Projektes, in dem aus embryonalen Stammzellen beim Hund hämatopoetische Stammzellen differenziert werden sollen. Dazu war es notwendig, Embryonen eines möglichst definierten Entwicklungsstandes zu gewinnen. Zu diesem Zweck wurde bei Hündinnen entweder im spontanen oder im induzierten Östrus durch mehrere Untersuchungstechniken die Ovulation und damit der günstigste Besamungszeitpunkt bestimmt. Die Embryogewinnung wurde dann nach Ovariohysterektomie durch Uterusspülung in einem Zeitraum von 10 bis 17 Tage post ovulationem durchgeführt.

## 2 Literatur

### 2.1 Deckzeitpunktbestimmung bei der Hündin

#### 2.1.1 Zyklusstadien der Hündin

Die erste Einteilung der Zyklusstadien der Säugetiere erfolgte 1900 durch HEAPE in Proöstrus, Östrus, Metöstrus, Diöstrus und Anöstrus. Beim Hund werden Proöstrus und Östrus zusammen als Läufigkeit bezeichnet (MAHI-BROWN 1991; BERCHTOLD 1997a).

##### 2.1.1.1 *Proöstrus*

Mit dem Proöstrus beginnt die Läufigkeit der Hündin. Die durchschnittliche Länge beträgt neun Tage (KOOISTRA et al. 1999), kann aber zwischen zwei und 25 Tagen variieren (FELDMAN und NELSON 2004). In dieser Phase ist die Hündin für den Rüden attraktiv, lässt sich jedoch noch nicht von ihm decken (LORIN 1993, ALLEN 1994). Die Vulva beginnt sich zu ödematisieren und es ist ein blutiger Vaginalausfluß zu sehen (CONCANNON et al. 1989), der zum Ende hin fleischwasserfarben wird (BERCHTOLD 1997a). Durch die Ödematisierung sind vaginoskopisch die vergrößerten, rundlichen Schleimhautfalten zu sehen (LINDSAY und CONCANNON 1986; FELDMAN und NELSON 2004), die zusammen mit den entstehenden Querfurchen eine kopfsteinpflasterartige Oberfläche bilden (TAMMER et al. 1994). Diese Ödematisierung ist auf das im Proöstrus beginnende Follikelwachstum zurückzuführen (FELDMAN und NELSON 2004; GÜNZEL-APEL 1994), was ein Anstieg der Östrogenkonzentration zur Folge hat. Über den Östrogengipfel, der noch im Proöstrus erreicht wird, gibt es

unterschiedliche Untersuchungen, die von 62,4pg/ml (CONCANNON et al. 1975) bis zu 110pg/ml (OLSON et al. 1982) reichen.

In der Vaginalzytologie sind zu Beginn noch tiefere Epithelzellen, wie Parabasalzellen (JOHNSON 1994; HENSEL 1998) und Intermediärzellen zu finden (ARNOLD 1995, ENGLAND 1998). Später steigt die Anzahl der oberflächlichen Epithelzellen, der so genannten Superfizialzellen an (PARRY und IHRKE 1997; FELDMAN und NELSON 2004). Ein bis fünf Tage vor Beginn des Östrus können sie bis auf nahezu 100% ansteigen (CONCANNON und DIGREGORIO 1986). Neben den Epithelzellen kommen im Ausstrich auch Erythrozyten vor (PARRY und IHRKE 1997, HENSEL 1998), wobei ihre Anzahl individuellen Schwankungen unterliegt (BUCKNER 1979, GÜNZEL und KOIVISTO 1984). Außerdem sind zu Beginn des Proöstrus noch wenige neutrophile Granulozyten zu finden (DREIER 1997, JOHNSON 1994), die im späten Proöstrus fehlen (FELDMAN und NELSON 2004).

### 2.1.1.2 Östrus

Als Östrus wird die Zeit definiert, in der die Hündin das Aufspringen des Rüden duldet (FELDMAN und NELSON 2004) (s. 2.3.1.1.). Diese Phase hat eine durchschnittliche Länge von fünf bis zehn Tagen (JÖCHLE 1987, FELDMAN und NELSON 2004) und beinhaltet Ovulation und Gelbkörperanbildung (GÜNZEL-APEL 1994).

Der Vaginalausfluss wird während des Östrus heller und schleimiger (BERCHTOLD 1997a) (s. 2.3.1.3.) und die Vulvaödematisierung, die sich im Proöstrus aufbaut nimmt ab (s. 2.3.1.2.). Aufgrund des Rückganges der Ödematisierung bilden sich schon vor der Ovulation auf den Schleimhautkissen zahlreiche Sekundärfalten (WABERSKY und GÜNZEL-APEL 1990; ARNOLD 1995), die nach der Ovulation durch weiteres Abschwellen der Schleimhaut zu einem Bild maximaler Verwinkelung mit spitz erscheinenden Kanten führen (LINDSAY und CONCANNON 1986; ARNOLD 1995; FELDMAN und NELSON 2004) (s. 2.3.1.4.). Wie die Vaginalschleimhaut ändert sich auch der

Vaginalausstrich im Zusammenhang mit der Ovulation. Vor der Ovulation kommen fast ausschließlich Superfizialzellen vor, die in Haufen liegen (WRIGHT und PARRY 1989; ARNOLD 1995), was dem Bild des späten Proöstrus entspricht (FELDMAN und NELSON 2004). Postovulatorisch folgt dann ein abrupter Wechsel zum Zellmischbild (GÜNZEL und KOIVISTO 1984). (s. 2.3.1.5.).

Hormonell wird der Östrus mit dem LH-Gipfel eingeleitet. Während oder kurz nach diesem LH-Gipfel erreicht das Progesteron, aufgrund der beim Hund einzigartigen präovulatorischen Luteinisierung der Follikel, meßbare Werte (CONCANNON et al. 1975) (s. 2.3.1.6.). Zusätzlich kommt es im Östrus zu einem raschen Abfall der Östrogenkonzentration (HADLEY 1975, OLSON et al. 1982), die Werte unter 15pg/ml am Ende des Östrus erreicht (FELDMAN und NELSON 2004). Aufgrund der fallenden Östrogen- und der steigenden Progesteronkonzentration findet etwa zwei Tage nach der LH-Welle die Ovulation statt (PHEMISTER et al. 1973; BOUCHARD et al. 1990). Nach der Ovulation steigt die Progesteronkonzentration dann auf Höchstwerte an (CONCANNON 1993) (s. 2.3.1.6.).

#### 2.1.1.3 Metöstrus

Die sich an den Östrus anschließende Phase wird als Diöstrus oder Metöstrus bezeichnet. Meist werden beide Begriffe synonym verwendet (CONCANNON 1989; RÜSSE 1991), wobei beide Begriffe für den Hund nicht wirklich zutreffend sind. Der Metöstrus ist die Phase der Gelbkörperaktivität (ALLEN 1994; FELDMAN und NELSON 2004; OLSON et al. 1989), weshalb er auch als Lutealphase bezeichnet werden könnte. Er beginnt am ersten Tag, an dem die Hündin den Rüden nicht mehr duldet (BLENDINGER et al. 1994; CONCANNON et al. 1975) und endet mit einer Progesteronkonzentration unter 1ng/ml (FELDMAN und NELSON 2004) oder mit der Geburt (FELDMAN und NELSON 2004), wodurch seine Dauer neun bis zwölf Wochen beträgt (BERCHTOLD 1997a; CONCANNON et al. 1975, CONCANNON et al. 1989).

Die Vulva ist in dieser Phase nicht mehr ödematisiert, die Vaginalschleimhaut erscheint sehr viel dünner und es entstehen Längsfalten (WABERSKY und

GÜNZEL-APEL 1990; TAMMER et al. 1994; ARNOLD 1995). Die Schleimhautoberfläche ist blaßrosa (ARNOLD 1995) oder rosarot (TAMMER et al. 1994) und zeigt sich gescheckt durch Flächen von dicker weißer und dünner roter Schleimhaut (LINDSAY und CONCANNON 1986).

In der Vaginalzytologie beginnt der Metöstrus mit einem Zellumschwung von vorwiegend Superfizialzellen zu vorwiegend Parabasal- und Intermediärzellen (WRIGHT und PARRY 1989, FELDMAN und NELSON 2004). Außerdem treten wieder neutrophile Granulozyten auf. Der Zellumschwung kann auch erst in den ersten Tagen des Metöstrus stattfinden (WABERSKY und GÜNZEL-APEL 1990, JOHNSON 1994), findet jedoch relativ konstant sieben bis neun Tage nach dem LH-Gipfel statt (CONCANNON und DIGREGORIO 1986). Daneben sind in der Vaginalzytologie noch spezielle Metöstruszellen zu sehen. Dies sind große Intermediärzellen (FELDMAN und NELSON 2004) oder modifizierte Parabasalzellen (HENSEL 1998; WRIGHT und PARRY 1989) mit eingeschlossenen neutrophilen Granulozyten.

Drei bis vier Wochen nach der Ovulation erreicht die Progesteronkonzentration ihr Maximum (TAMMER et al. 1994). Es werden Werte von 15-90ng/ml erreicht (CONCANNON et al. 1989). Im letzten Viertel der Trächtigkeit steigen zusätzlich die Prolaktinwerte bis zur Geburt stetig an (GRÄF 1978). Die Verläufe dieser beiden Hormone sind bei trächtigen und bei nichtträchtigen Hündinnen nahezu identisch. Eine Unterscheidungsmöglichkeit in hormoneller Hinsicht bietet das Relaxin. Dies ist ein Hormon, das hauptsächlich plazentaren Ursprungs ist. Bei nichtträchtigen Hündinnen bleiben die Relaxinwerte unter 0,25ng/ml (TSUTSUI und STEWART 1991) oder sind gar nicht zu messen (STEINETZ et al. 1989). Bei trächtigen Hündinnen kann es in der zweiten Trächtigkeitshälfte gemessen werden (STEINETZ et al. 1989). Es erreicht Konzentrationen von über 3ng/ml (TSUTSUI und STEWART 1991).

### 2.1.1.4 Anöstrus

Als letzte Phase schließt sich der Anöstrus an. Er beginnt bei trächtigen Hündinnen mit der Geburt und endet mit dem darauf folgenden Proöstrus (FELDMAN und NELSON 2004). In dieser Phase herrscht nahezu eine Inaktivität der Ovarien (ALLEN 1994). Es konnte jedoch auch im Anöstrus eine geringe hormonelle Aktivität nachgewiesen werden (FELDMAN und NELSON 2004). In mehreren Schüben reifen an den Ovarien Follikel heran und bilden sich wieder zurück, bis dieser Vorgang in eine neue Läufigkeit mündet (JÖCHLE 1995, KOOISTRA et al. 1999). Die Dauer variiert dabei zwischen zwei bis zehn Monaten, wodurch das Läufigkeitsintervall erheblichen Schwankungen unterliegt. Das Brunstintervall jedes Einzeltieres ist jedoch relativ konstant (BERCHTOLD 1997a; CONCANNON 1986b; PARADIS 1991).

Am Verhalten der Hündin lässt sich der Anöstrus nicht vom Metöstrus unterscheiden (FELDMAN und NELSON 2004). Auch am äußeren Genitale gibt es in dieser Phase keine Besonderheiten. Die Vulva ist klein (BERCHTOLD 1997a) und die Hündin zeigt keinen Ausfluss. Vaginoskopisch sind nur kleine, sehr flache und einfache Schleimhautfalten mit runden Konturen zu sehen (LINDSAY 1983; LINDSAY und CONCANNON 1986). Die Schleimhaut selbst ist rosarot bis rot (LINDSAY und CONCANNON 1986; TAMMER et al. 1994). Im Vaginalausstrich sind im Anöstrus nur wenige Zellen zu finden (CHRISTIANSEN 1984; CONCANNON und DIGREGORIO 1986; DREIER 1997; HENSEL 1998).

## 2.2 Läufigkeitsinduktion

Für die Läufigkeitsinduktion wurden verschiedene Methoden beschrieben. So ist eine Behandlung mit FSH (Shille et al. 1984), eine Kombination von FSH und LH (SHILLE et al. 1984), eine Kombination von Östrogenen und FSH (BOUCHARD et al. 1991), oder die Gabe anderer exogener Gonadotropine, wie eCG möglich (CHAFFAUX et al. 1984; NAKAO et al. 1985; ARNOLD et al. 1989). Außerdem kommen übergeordnete GnRH-Agonisten (CONCANNON et al. 1989; INABA et al. 1998; TRIGG 2001; WRIGHT et al. 2001) und sogar Prolaktin-Antagonisten

(VERSTEGEN et al. 1999; ZÖLDAG et al. 2001) zur Anwendung.

Die künstlich zugeführten Hormone FSH und LH sollen, wie die körpereigenen Hormone zu einem Follikelwachstum und anschließender Ovulation führen. Hierfür wurden Versuche beschrieben, bei denen 14 anöstrischen Hündinnen einmalig, oder über mehrere Tage FSH injiziert wurde. (Oder sie bekamen eine Kombination aus FSH und LH). Die Behandlungsversuche erzielten jedoch keine großen Erfolge. Es wurden nur vier der behandelten Hündinnen läufig, und davon nur eine trächtig (SHILLE et al. 1984).

Andere exogene Gonadotropine, die zur Anwendung kamen, waren eCG, das hauptsächlich wie FSH wirkt (CHAFFAUX et al. 1984; NAKAO et al. 1985; ARNOLD et al. 1989; HANDAJA KUSUMA und TAINTURIER 1993) und hCG, das LH-Wirkung zeigt. Nach einer Behandlung mit eCG, um das Follikelwachstum zu stimulieren, bekamen die Hündinnen teilweise eine einmalige hCG Injektion (CHAFFAUX et al. 1984; NAKAO et al. 1985; ARNOLD et al. 1989) oder GnRH- (CHAFFAUX et al. 1984) Injektion, um eine Ovulation auszulösen. Eine ausschließliche eCG-Behandlung brachte wenig Erfolg. Nur vier der zehn behandelten Hündinnen zeigten Proöstrussymptome. Von ihnen ovulierten nur zwei und davon wurde keine trächtig (HANDAJA KUSUMA und TAINTURIER 1993). Eine Behandlung mit eCG über fünf Tage und anschließender hCG-Injektion war erfolgreicher. Dabei wurden sechs der sechs Hündinnen im Versuch läufig und drei von ihnen wurden trächtig und bekamen Welpen (ARNOLD et al. 1989). Andere Kombinationen von eCG und hCG brachten wieder weniger Erfolge. Nach neuntägiger eCG-Gabe und einmaliger hCG-Injektion wurden von elf anöstrischen Hündinnen sieben läufig und von vier metöstrischen Hündinnen vier läufig. Es wurden jedoch nur drei der insgesamt elf läufigen Hündinnen trächtig ((NAKAO et al. 1985)). Bei einer eCG-Behandlung über zehn Tage und anschließender hCG-Gabe wurden von 17 Hündinnen alle läufig. Bei drei der Hündinnen konnten im Ultraschall Trächtigkeiten nachgewiesen werden, die dann aber abgebrochen wurden (ARNOLD et al. 1989). Allgemein ist zu sagen, dass eine eCG-Gabe mit anschließender hCG-Injektion bei Hündinnen im späten Anostrus besser gelang, als im frühen Anostrus (CHAFFAUX et al. 1984). Der Behandlung mit eCG und anschließender GnRH-Injektion statt LH-Injektion wurden fünf Hündinnen unterzogen, von denen drei läufig, aber keine trächtig wurde (CHAFFAUX et al. 1984).

Ein Grund für die schlechte Trächtigkeits- und Geburtenrate scheint eine geringe Progesteronkonzentration zu sein. Es wurden Werte von 2ng/ml (ARNOLD et al. 1989) bis 8ng/ml (CHAFFAUX et al. 1984) angegeben. Nur bei den Hündinnen, die im späten Anostrus behandelt wurden erreichte das Progesteron Werte von 19ng/ml (CHAFFAUX et al. 1984). Als weiterer Grund muss wohl auch die verkürzte Östrusdauer von durchschnittlich nur drei Tagen genannt werden (CHAFFAUX et al. 1984).

In einem anderen Versuch wurde Hündinnen zur Läufigkeitsinduktion nach einer FSH-Behandlung DES verabreicht. Dies ist ein synthetisches Stilbenderivat mit östrogener Wirkung. Von 13 behandelten Hündinnen wurden neun läufig und vier trächtig. Die Hündinnen zeigten jedoch alle einen verkürzten Proöstrus von durchschnittlich nur 1,7 Tagen. Östrogenbedingte Nebenwirkungen wurden keine beschrieben (BOUCHARD et al. 1991).

GnRH-Analoga bewirken wie körpereigenes GnRH einen Anstieg der FSH- und LH-Ausschüttung und leiten so die Läufigkeit ein. Als GnRH-Analoga wurden Lutrelin (CONCANNON et al. 1989), Leuprolid, Fertirelin (INABA et al. 1997), Deslorelin (TRIGG et al. 2001) oder Buserelin (ROTA et al. 2003) verwendet. Eine 14-tägige Behandlung mit Lutrelin wurde bei 24 Hündinnen durchgeführt, die sich zwischen dem 90. und 146. Tag des Anostrus befanden. 21 der 24 Hunde zeigten Proöstruserscheinungen und 18 von ihnen ovulierten. Von den 18 Hündinnen wurden jedoch nur neun trächtig. Als Grund für das schlechte Ergebnis wurde der eventuell fehlende LH-Peak angenommen. Möglich wäre dies, wenn aufgrund der zugeführten GnRH-Analoga zu wenig körpereigenes GnRH produziert worden wäre (CONCANNON et al. 1989). In einer anderen Studie wurden zwölf anostrischen Hündinnen und sechs Hündinnen vor der ersten Läufigkeit eine Mikrokapsel mit Leuprolidacetat implantiert. Zusätzlich bekamen sie am ersten Tag des Proöstrus eine einmalig Fertirelininjektion. Alle Hündinnen wurden läufig und 14 von ihnen trächtig (INABA et al. 1997). Deslorelin wurde ebenfalls in Form von Implantaten eingesetzt, die entweder 3, 6 oder 12mg enthielten. Von den neun Hündinnen mit den 3mg-Implantaten wurden zwar acht läufig, aber keine von ihnen trächtig. Mit 6mg-Implantaten wurden von 18 Hündinnen 14 läufig und sechs trächtig. 12mg-Implantate bekamen 13 Hündinnen, die alle läufig wurden. Trächtig wurden davon jedoch nur vier (TRIGG et al. 2001). Deslorelin wurde bisher vor allem zur Läufigkeitssuppression verwendet, da bei dauerhafter Gabe nach der

ersten induzierten Läufigkeit keine weitere mehr folgt (WRIGHT et al. 2001; TRIGG et al. 2001).

Die Möglichkeit einer Läufigkeitsinduktion mit Prolaktinantagonisten lässt sich wohl nicht nur auf die Verringerung der Prolaktinkonzentration zurückführen. Diese Medikamente haben noch einen zweiten Wirkungsmechanismus, durch den die Ausschüttung von FSH und LH erhöht wird, wodurch der Proöstrus eingeleitet wird (KOOISTRA et al. 1999). Als Prolaktinantagonisten werden Dopamin-Agonisten, wie Cabergolin (VERSTEGEN et al. 1999) und Bromocriptin (ZÖLDAG et al. 2001) oder der Serotonin-Antagonist Metergolin (HANDAJA KUSUMA und TAINTURIER 1993) eingesetzt. Mit Metergolin wurden 20 Hündinnen bis zum Einsetzen des Proöstrus behandelt. 18 der 20 Hündinnen wurden läufig und dreizehn von ihnen trächtig (HANDAJA KUSUMA und TAINTURIER 1993). Mit Cabergolin wurden im Versuch 15 Hündinnen behandelt. Ihnen wurde zu unterschiedlichen Zeiten im Anostrus täglich Cabergolin bis zum Auftreten von Proöstruserscheinungen verabreicht. Die Dauer der Behandlung war bei Hündinnen im späten Anostrus kürzer als bei Hündinnen im frühen Anostrus. 14 der 15 Hündinnen wurden läufig und zwölf davon trächtig (VERSTEGEN et al. 1999). Die Läufigkeitsinduktion mit Bromocriptin wurde an 48 Hunden durchgeführt. Sie bekamen über drei Tage 0,3mg pro Hund und anschließend 0,6-2,5mg, je nach Verträglichkeit und Gewicht. Die Dauer der Behandlung ging drei bis sechs Tage über den Läufigkeitsbeginn hinaus. Von den 48 Hündinnen wurden 46 läufig, wovon jedoch nur 40 ovulierten. Die Trächtigkeitsrate betrug 83% und ein Wurf bestand im Durchschnitt aus fünf Welpen (ZÖLDAG et al. 2001).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Proöstruserscheinungen bei einer Läufigkeitsinduktion mit Prolaktinantagonisten in den meisten Fällen zu beobachten sind, jedoch sind die Ovulations- und Trächtigkeitsraten meist niedriger. In vergleichenden Studien hat sich gezeigt, dass bei einer Behandlung mit dem Dopamin-Agonisten Cabergolin die Läufigkeits- und Trächtigkeitsrate bei 83% liegt und bei einer Behandlung mit dem GnRH-Agonisten Buserelin nur bei 25% (ROTA et al. 2003).

## 2.3 Künstliche Besamung der Hündin

### 2.3.1 Besamungszeitpunkt

Im Gegensatz zum natürlichen Deckakt ist bei der künstlichen Besamung eine genauere Bestimmung der Ovulation und der Zeit, in der die Eizellen befruchtungsfähig sind nötig. Hierfür bedient man sich mehrerer Untersuchungen.

#### 2.3.1.1 *Verhalten der Hündin*

Als erster Anhaltspunkt dient das Verhalten der Hündin. Sobald die Hündin in den Östrus kommt duldet sie das Aufspringen des Rüden (GÜNZEL und KOIVISTO 1984; CONCANNON et al. 1989). Bei der Untersuchung kann dieses Verhalten mit dem Duldungsreflex nachgewiesen werden, indem man die Hündin seitlich am Schwanzansatz krault. Die Hündin nimmt bei voller Duldung den Schwanz auf die Seite und zieht die Vulva nach dorsal.

#### 2.3.1.2 *Äußeres Genitale*

Das äußere Genitale der Hündin ist zu Beginn des Östrus wie im Proöstrus ödematisiert und derb (JÖCHLE 1976). Ungefähr einen Tag vor dem LH-Gipfel wird die Vulva dann weicher (CONCANNON et al. 1989).

#### 2.3.1.3 *Vaginalausfluss*

Der Vaginalausfluss ändert sich von dem blutigen Ausfluss im Proöstrus (JÖCHLE 1976; BERCHTOLD 1997a) zu einem helleren schleimigen Ausfluss (BERCHTOLD 1997a), der selten blutig bleibt (FELDMAN und NELSON 2004). Außerdem nimmt die Menge des vaginalen Ausflusses im Östrus ab (JÖCHLE 1976, BERCHTOLD 1997a).

### *2.3.1.4 Vaginoskopische Untersuchung*

Vaginoskopisch kann man bei der Hündin ein präovulatorisches Bild von einem postovulatorischen unterscheiden. Auf der Oberfläche der stark ödematisierten Schleimhaut (DREIER und DREIER 1993) mit Blockmalzstruktur (DREIER 1978), wie sie sich im Proöstrus bildet, entstehen zusätzliche Furchen, wodurch die Schleimhaut in kleinere, runde, zerknitterte Falten unterteilt wird (LINDSAY und CONCANNON 1986). Zusätzlich erscheint die Schleimhaut blass und trocken (DREIER 1978). Postovulatorisch führt das Zurückgehen der Ödematisierung zu einer maximalen Verwinkelung der Schleimhaut mit spitz erscheinenden Kanten (LINDSAY und CONCANNON 1986), und bis auf etwas Sekret sieht die Schleimhaut noch trockener aus (LINDSAY und CONCANNON 1986).

### *2.3.1.5 Zytologische Untersuchung*

Über die Zytologie im Östrus gibt es unterschiedliche Beschreibungen. Nach Feldman und Nelson (2004) veränderte sich das Zellbild vom späten Proöstrus bis zum Ende des Östrus nicht. Andere Arbeitsgruppen fanden im Östrus zunehmend mehr Superfizialzellen (GÜNZEL und KOIVISTO 1984, CONCANNON et al. 1989). Die Untersuchungen von Concannon und Digregorio (1986) ergaben, dass der Ausstrich ab dem LH-Gipfel für sechs bis acht Tage von Superfizialzellen beherrscht wird. Postovulatorisch findet im Ausstrich ein abrupter Wechsel zum Zellmischbild statt (GÜNZEL und KOIVISTO 1984). Die Superfizialzellen liegen in Haufen (WRIGHT und PARRY 1989, ARNOLD 1995). Phemister und Holst (1973) beschrieben den Übergang von hauptsächlich oberflächlichen Zellen zu vorwiegend Intermediär- und Parabasalzellen in der Vaginalzytologie als Beginn des Diöstrus.

### *2.3.1.6 Progesteronkonzentration*

Mit dem präovulatorischen Progesteronanstieg bei der Hündin sind ebenfalls Aussagen über den Zyklusstand zu treffen. Zur Zeit des LH-Gipfels steigt die

Progesteronkonzentration auf Werte von  $0,84 \pm 0,1$  ng/ml an, steigt dann auf  $2,56 \pm 0,3$  und erreicht zur Zeit der Ovulation einen Wert von  $5,44 \pm 0,93$  ng/ml (CONCANNON et al. 1977a). Bouchard et al. (1990) fanden am Tag der Ovulation Progesteronwerte von  $4,9 \pm 1,0$  ng/ml. Günzel-Apel et al. (1990) kamen bei ihren Untersuchungen der Progesteronkonzentration ebenfalls auf circa 2,5 ng/ml zur Zeit des LH-Gipfels und auf 5,0 ng/ml bei der Ovulation. Bei Feldman und Nelson (2004) liegt der Progesteronwert zur Zeit der Ovulation zwischen 4 und 10 ng/ml.

#### 2.3.1.7 LH-Konzentration

Auch das Plasma-LH ist ein Hormon, das unter Versuchsbedingungen bestimmt werden kann. Das wichtigste im Konzentrationsverlauf dieses Hormons stellt der LH-Gipfel dar. Um diesen festzustellen sind jedoch mindestens zwei Blutentnahmen täglich nötig, da die Höchstwerte nur für einige Stunden erreicht werden. Mit der LH-Welle beginnt der Östrus. Die Ovulation findet zwei Tage (PHEMISTER et al. 1973; BOUCHARD et al. 1990) beziehungsweise 24 bis 72 Stunden nach der LH-Welle (FELDMAN und NELSON 2004) statt.

#### 2.3.2 Spermagewinnung

Rüden geben das Ejakulat in drei Phasen ab. Die erste Phase, das Vorsekret, ist Prostatasekret und enthält keine Spermien. Danach kommt eine zweite spermienreiche Phase und als letztes wieder eine spermienarme klare Phase aus Prostatasekret (FELDMAN und NELSON 2004). Für die Spermagewinnung ist es hilfreich den Rüden zur sexuellen Stimulierung hinter eine läufige Hündin zu stellen, dem Rüden einen Vaginaltupfer einer läufigen Hündin anzubieten, oder eine anöstrische Hündin mit p-Methylbenzoësäure, einer wesentlichen Komponente des Pheromoncocktails läufiger Hündinnen, zu präparieren (KUTZLER 2005). Der Bulbusschwellkörper wird dann durch das Präputium hindurch massiert, bis eine Teilerektion eintritt. Nach Beginn der Erektion wird das Präputium so weit zurückverlagert, dass der Bulbus und die Pars longa glandis extrapräputial zu liegen kommen. Anschließend wird der Penisschaft kaudal des Bulbus mit Daumen und Zeigefinger umfasst und fixiert. Nach den Frikitionsbewe-

gungen lässt man den Rüden über den Arm umsteigen und lenkt den Penis nach kaudoventral ab (GÜNZEL 1986).

### 2.3.3 Spermaarten

Das gewonnene Ejakulat kann direkt als Frischsperma (FARSTAD 1984; TSUTSUI et al. 1988; SILVA et al. 1996) verwendet werden, es kann flüssig konserviert (PINTO et al. 1999) oder tiefgefroren (FARSTAD 1984; SILVA et al. 1996; FONTBONNE und BADINAND 1993) werden. Frischsperma sollte direkt nach der Gewinnung auf die Hündin übertragen werden. Allerdings können auch noch nach zweitägiger Lagerung bei 4°C Befruchtungsraten von 70% erreicht werden (TSUTSUI et al. 2003). Für flüssigkonserviertes Sperma wird die spermienreiche Phase mit einem gebräuchlichen Verdünner versetzt und über 2 Stunden auf 5°C heruntergekühlt. Die Aufbewahrung erfolgt anschließend bei 4°C. In flüssigkonserviertem Sperma bleiben Vitalität und Motilität der Samenzellen über mehrere Tage erhalten, jedoch ist der zeitliche Verlauf der Befruchtungsfähigkeit schwierig einzuschätzen, da diese offensichtlich nur bedingt mit der Abnahme der Motilität korreliert (TSUTSUI et al. 2003). Flüssigkonserviertes Sperma sollte daher innerhalb von 2-3 Tagen verwendet werden. Für Tiefgefriersperma ist eine hohe Ausgangsqualität des Ejakulats nötig, da es durch die Kryokonservierung immer zu Verlusten kommt. Für die Tiefgefrierung sind verschiedene Verdünner und Temperaturprofile publiziert (DOBRINSKI et al. 1993; SZASZ et al. 2000). Die Aufbewahrung von Tiefgefriersperma erfolgt in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Vor der Samenübertragung muss es im Wasserbad bei 37°C für 20 Sekunden aufgetaut werden. Allgemein gilt, dass vor jeder Samenübertragung zumindest die Motilität des zu übertragenden Spermazells überprüft werden sollte.

### 2.3.4 Besamungstechniken

Grundsätzlich ist bei der Besamung zwischen einer intravaginalen und intrauterinen Besamung zu unterscheiden. Für die intravaginale Besamung wird

das Ejakulat mittels Pipetten tief in die Vagina platziert (SILVA et al. 1996; FONTBONNE und BADINAND 1993). Bei der intrauterinen Besamung sind mehrere Methoden zu unterscheiden. Transcervical kann zum einen ein starrer Katheter bei transabdominaler Fixation der Zervix eingeführt werden, oder es kann mit Hilfe eines Endoskops ein Katheter in den Uterus eingeführt werden (ANDERSEN 1975; FARSTAD 1984; FONTBONNE und BADINAND 1993; WILSON 2001). Eine dritte Methode ist den Samen im Rahmen einer Laparotomie oder Laparoskopie (SILVA et al. 1995) direkt in den Uterus zu injiziert.

### 2.3.5 Erzielte Trächtigkeitsraten im Bezug auf Spermaart und Besamungstechnik

Bei natürlichen Deckakten wurden Trächtigkeitsraten von über 90% erreicht (TSUTSUI et al. 1988; FARSTAD 1984; LINDE-FORSBERG und FORSBERG 1993). Aber auch mit Frischsperma konnten Trächtigkeitsraten von über 80% erreicht werden (SILVA et al. 1999; FARSTAD 1984; TSUTSUI et al. 1988). Aufgrund der langen Befruchtungsfähigkeit von frischen Hundespermien von etwa 5-7 Tagen können mit Nativsperma und frischem flüssigkonserviertem Sperma selbst bei suboptimalem Besamungsmanagement akzeptable Befruchtungsergebnisse erzielt werden (JEFFCOATE und LINDSAY 1989). Im Gegensatz dazu wird die Überlebensdauer von kryokonserviertem Sperma im weiblichen Genitale auf kürzer als 12-24 Stunden geschätzt. Bei intravaginaler Besamung mit gekühltem Sperma wurden Trächtigkeitsraten von 95% erreicht (PINTO et al. 1999). Hingegen lagen die Trächtigkeitsraten nach einer intravaginalen Besamung mit Tiefgefriersperma nur bei 50-60% (FONTBONNE und BADINAND 1993; SILVA et al. 1996). Mit Tiefgefriersperma konnten durch intrauterine Besamungen bessere Erfolge erzielt werden als mit intravaginalen Besamungen (FARSTAD 1984; FONTBONNE und BADINAND 1993; LINDEFORSBERG et al. 1999). Die meisten Autoren konnten in der Wurfgröße keine Unterschiede zwischen künstlicher Besamung und natürlichem Deckakt feststellen (TSUTSUI et al. 1988; PINTO et al. 1999; FARSTAD 1984). Allerdings sind durch Doppelbesamungen signifikant höhere Trächtigkeitsraten zu erzielen (LINDE-FORSBERG und FORSBERG 1993).

## 2.4 Embryonen

### 2.4.1 Ovulation, Befruchtung und embryonale Entwicklung

Die präimplantative Entwicklung des Embryos beim Hund wurde schon von mehreren Wissenschaftlern erforscht. Um das Alter des Embryos zu berechnen verwendeten sie verschiedene Ereignisse als Bezugspunkte. Die Rechnungen gingen von dem Deckakt (HOLST und PHEMISTER 1971), von dem LH-Peak (CONCANNON et al. 2001; BYSTED et al. 2001) oder von der Ovulation (RENTON et al. 1991; TSUTSUI et al. 2001) aus. Die Ovulation wurde mit Hilfe der LH-Welle (RENTON et al. 1991) oder des Progesteronanstiegs (RENTON et al. 1991; TSUTSUI et al. 2001) berechnet. Die Plasma-LH-Konzentration wurde mittels eines Radioimmunoassays bestimmt (van HAAFTEN et al. 1994). Der Progesteronanstieg beginnt mit der LH-Welle (CONCANNON et al. 1975) und die Ovulation findet 24 bis 72 Stunden (FELDMAN und NELSON 2004) bzw. 2 Tage nach der LH-Welle (CONCANNON et al. 2001) statt. Die Ovulation kann bis zu 96 Stunden andauern (CONCANNON et al. 1975, 1977a; WILDT et al. 1979). Bei kleineren Rassen ovulieren weniger Eizellen (2-10) im Vergleich zu größeren Rassen (5-15) (FELDMAN und NELSON 2004).

Die Eizellen ovulieren beim Hund als primäre Oozyten (TSUTSUI 1989; YAMADA et al. 1993) und sind dann erst nach der Reifeteilung als sekundäre Oozyten befruchtungsfähig. Diese Eizellreifung ist 48 bis 72 Stunden (FELDMAN und NELSON 2004) bzw. 60 bis 108 Stunden (TSUTSUI 1989) nach der Ovulation abgeschlossen. Danach bleiben die Eizellen für mindestens 24 Stunden (FELDMAN und NELSON 2004) bzw. bis zu 48 Stunden (BADINAND et al. 1993) befruchtungsfähig.

Eizellen wurden vom 1. bis zum 8. Tag nach dem Deckakt mit einer Größe von 142 $\mu$ m bis 171 $\mu$ m isoliert (HOLST und PHEMISTER 1971). Die Befruchtung der Eizellen findet noch im Eileiter statt. Embryonen im 8-16-Zell-Stadium wurden am 1.-8. Tag nach dem Deckakt (HOLST und PHEMISTER 1971) und am 8. und 9. Tag nach der Ovulation im Eileiter (TSUTSUI et al. 2001) gefunden. Morulae wurden am 5.-12. Tag nach dem Deckakt in einer Größe von 191 $\mu$ m bis 197 $\mu$ m (HOLST und PHEMISTER 1971), am 11. und 12. Tag nach dem LH-Peak

(CONCANNON et al. 2001; BYSTED et al. 2001) und am 9., 10. und 11. Tag nach der Ovulation gefunden (TSUTSUI et al. 2001). Sie befanden sich ab dem 12. Tag nach dem LH-Peak im Uterus (CONCANNON et al. 2001; TSUTSUI et al. 2001). Blastocysten wurden am 12. und 13. Tag nach der Ovulation aus dem Eileiter isoliert (RENTON et al. 1991). Im Uterus fand man sie vom 8.-20. Tag nach dem Deckakt in einer Größe von 215µm bis 2270µm (HOLST und PHEMISTER 1971),

Tab. 1: Zusammenfassung der bisherigen Arbeiten zur Embryogewinnung:

	Alter im Bezug auf			
	den Deckakt	den LH-Gipfel	die Ovulation	
	Holst und Phemister (1971)	Concannon et al (2001) Bysted et al (2001)	Renton et al (1991)	Tsutsui et al (2001)
<b>Eizellen im Eileiter</b>	1.-8. Tag	-	-	-
<b>Embryonen im 8-16-Zell-Stadium</b>	1.-8. Tag	-	-	8.-9. Tag
<b>Morulae im Eileiter</b>	5.-12. Tag	11.-12. Tag	-	9.-11. Tag
<b>Morulae im Uterus</b>	5.-12. Tag	12. Tag	-	12. Tag
<b>Blastocysten im Eileiter</b>	-	-	12.-13. Tag	-
<b>Blastocysten im Uterus</b>	8.-20. Tag	13.-21. Tag	-	-
<b>Implantation</b>	-	21. Tag	-	-

vom 13.-21. Tag nach dem LH-Peak (CONCANNON et al. 2001) und am 10. Tag nach der Ovulation (TSUTSUI et al. 2001). Zur Implantation der Blastocysten kommt es ab dem 21. Tag (CONCANNON et al. 2001) und bis zum 23. Tag nach der LH-Welle (FELDMAN und NELSON 2004) (s. Tab.1).

## 2.4.2 Embryogewinnung

Für die Gewinnung von Embryonen aus dem Uterus bei Hunden wurden verschiedene Verfahren beschrieben. Es wurde nach Laparotomie ein Foley-Katheter vaginal eingeführt und bis in den Uterus vorgeschoben, worüber mehrmals in den Uterus hineingespült wurde und die Embryonen so gewonnen wurden (ARCBALD et al. 1980).

Bei einer weiteren Methode zur Embryogewinnung wurden die Embryonen nach Laparotomie und Ovariohysterektomie durch Punktion des Uterus an der Uterushornspitze herausgespült (KINNEY 1979).

## 2.4.3 In-vitro-Produktion von Embryonen

Für die Embryogewinnung beim Hund wurden schon mehrere Versuchsansätze beschrieben, die alle nicht den gewünschten Erfolg brachten. Oozyten wurden hierfür durch Slicing der Ovarien nach Ovariektomie gewonnen. Die Hündinnen wurden teils vor der Operation superovuliert, indem sie zunächst mit exogenen Gonadotropinen behandelt wurden und 72 Stunden vor dem Eingriff einmalig hCG injiziert bekamen (YAMADA et al. 1992, 1993). Meist wurden jedoch Ovarien von Hündinnen aus unterschiedlichen Zyklusstadien verwendet (MAHI und YANAGIMACHI 1976; HEWITT und ENGLAND 1998; NICKSON et al. 1993; OTOI et al. 2000; FUJII et al. 2000; RODRIGUES et al. 2004). Für die Kultivierung wurden Oozyten ersten Grades ausgewählt, die ein dunkel pigmentiertes Zytoplasma und von einer oder mehreren Lagen Cummuluszellen umgeben waren (NICKSON et al. 1993; HEWITT und ENGLAND 1998; OTOI et al. 2000; FUJII et al. 2000). Die Kultivierung der Oozyten erfolgte über 72 Stunden (MAHI und YANAGIMACHI 1976; YAMADA et al. 1992, 1993; NICKSON et al. 1993; OTOI et al. 2000; FUJII et al. 2000; RODRIGUES et al. 2004), wobei nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden keine weitere Reifung zu beobachten war (BOGLIOLO et al. 2002). Nach der Kultivierung erreichten nur 10% bis 12% die Metaphase II (YAMADA et al. 1993; FUJII et al. 2000; RODRIGUES et al. 2004). Nach einer Kultivierungszeit von 120 Stunden konnte auch kein besseres Ergebnis erzielt werden (FUJII et al. 2000). Eine höhere Reifungsrate wurde bei präovulatorischen Eizellen erreicht (YAMADA et al. 1993; LUVONI et al. 2001).

Oozyten aus anöstrischen Ovarien erreichten nur eine Reifungsrate von 11,1% (LUVONI et al. 2001) bzw. 12,1% (YAMADA et al. 1993). Im Gegensatz dazu konnte nach Superovulation eine Reifungsrate von 32% (YAMADA et al. 1992, 1993) und bei Oozyten von Hündinnen im Proöstrus sogar bis zu 67% erreicht werden (LUVONI et al. 2001). Neben dem Zyklusstadium nahm auch das Reifungsmedium Einfluss auf die Reifungsrate der Eizellen (OTOI et al. 2000; BOGLIOLO et al. 2002; RODRIGUES et al. 2004). Durch Erhöhung des Östradiols von 1 $\mu$ g/ml auf 20 $\mu$ g/ml und Zusatz von humanem Somatotropin war eine Steigerung der Reifungsrate von 10,2% auf 14,1% möglich (RODRIGUES et al. 2004). Durch Zusatz von Eileiterzellen war eine Steigerung der Reifungsrate auf 60% zu erreichen (BOGLIOLO et al. 2002).

Andere Untersuchungen bezogen sich auf das Verhältnis von Eizellgröße (HEWITT und ENGLAND 1998; OTOI 2001) zum Reifungspotential der Oozyten. Sie fanden heraus, dass Eizellen mit einem Durchmesser von über 100 $\mu$ m (HEWITT und ENGLAND 1998) bzw. über 120 $\mu$ m (OTOI et al. 2001) ein erhöhtes Reifungspotential besaßen, und dass diese auch teilweise mit der zweiten Reifeteilung begonnen hatten (HEWITT und ENGLAND 1998). Der Anteil an Oozyten mit einem Durchmesser von über 120 $\mu$ m ist in der Follikelphase am größten (OTOI et al. 2001).

Ein weiterer Aspekt, der berücksichtigt wurde, war das Alter der Hündin. Bei Hündinnen unter sechs Jahren war ein erhöhtes Reifungspotential der Oozyten zu erkennen (HEWITT und ENGLAND 1998).

Bei den meisten Untersuchungen wurde nach der Eizellreifung eine In-vitro-Fertilisation durchgeführt (MAHI und YANAGIMACHI 1976; YAMADA et al. 1992, 1993; NICKSON et al. 1993; OTOI et al. 2000; ENGLAND et al. 2001; Rodrigues et al. 2004). Dabei fand man heraus, dass beim Hund die Penetrationshäufigkeit der Spermien nicht vom Reifegrad der Eizellen abhängig war (MAHI und YANAGIMACHI 1976). Schon nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden waren Pronuklei zu sehen. Nach 12 Stunden konnten in bis zu 37,5% der befruchteten Eizellen Pronuklei nachgewiesen werden (NICKSON et al. 1993). Nach 48 Stunden waren Embryonen vom 2- (ENGLAND et al. 2001) bis zum 8-Zell-Stadium zu beobachten (YAMADA et al. 1992; RODRIGUES et al. 2004). Die Teilungsrate betrug ca. 10% (OTOI et al. 2000; RODRIGUES et al. 2004). Durch

die Verwendung von bovinen Cummuluszellen als Feederzellen war eine Steigerung der Teilungsrate auf 15,7% möglich (OTOI et al. 2000). Ein Embryo erreichte sogar das Blastocystenstadium (OTOI et al. 2000).

Es wurden auch schon versucht, die gewonnenen Embryonen auf eine Hündin zu übertragen, was bisher jedoch noch nicht gelang (ENGLAND et al. 2001).

#### 2.4.4 Medien für die In-vitro-Reifung und -Befruchtung von Eizellen

Für die In-vitro-Reifung von Eizellen wurde fast immer Tissue Culture Medium (TCM)-199 (MAHI und YANAGIMACHI 1976; NICKSON et al. 1993; OTOI et al. 2000; LUVONI et al. 2001; BOGLIOLO et al. 2002; RODRIGUES et al. 2004) mit verschiedenen Zusätzen verwendet. Dies war zum einen fetales Kälberserum (MAHI und YANAGIMACHI 1976; YAMADA 1992, 1993; OTOI et al. 2000) in Konzentrationen von 5% (OTOI et al. 2000) bis 10% (YAMADA et al. 1992, 1993). Bei Yamada (1992, 1993) wurde das Serum zuvor hitzeinaktiviert. Anstatt fetalem Kälberserum wurde auch bovines Serumalbumin (LUVONI et al. 2001; ENLAND et al. 2001), oder Serum von östrischen Hündinnen (NICKSON et al. 1993) zu TCM-199 zugegeben. Zusätzlich wurden häufig Antibiotika (MAHI und YANAGIMACHI 1976; OTOI et al. 2000), wie Gentamicin (YAMADA et al. 1992, 1993) verwendet. Ein weiterer Bestandteil des Reifungsmediums stellten Hormone, wie Östradiol (NICKSON et al. 1993; BOGLIOLO et al. 2002; RODRIGUES et al. 2004), FSH (LUVONI et al. 2001; BOGLIOLO et al. 2002), LH (LUVONI et al. 2001; BOGLIOLO et al. 2002), Progesteron (BOGLIOLO et al. 2002), humanes Somatotropin (RODRIGUES et al. 2004) und Insulin (OTOI et al. 2000) dar. Eine Steigerung der Reifungsrate erzielten Bogliolo et al. (2002) durch die Zugabe von Eileiterzellen. Als Reifungszeit wurden 48 (NICKSON et al. 1993; BOGLIOLO et al. 2002; RODRIGUES et al. 2004) oder 72 Stunden (LUVONI et al. 2001) angegeben.

Für die In-vitro-Befruchtung wurde ebenfalls TCM-199 mit 10% fetalem Kälberserum und 50mg/ml Gentamicinsulfat verwendet (NICKSON et al. 1993). Es wurde aber auch Whitten's Medium (YAMADA et al. 1992) und synthetische Eileitersuspension mit 4mg/ml BSA (RODRIGUES et al. 2004) beschrieben. Die Befruchtung wurde bei 37°C und mit 5% Kohlenstoffdioxid in der Luft durchgeführt (YAMADA et al. 1992; RODRIGUES et al. 2004).

Für die Gewinnung und Kultivierung von Hundeembryonen wurde phosphatgepufferte Kochsalzlösung (ARCBALD et al. 1980) oder Ringerlösung mit dem Zusatz von 20% Hundeserum (TSUTSUI 1989) verwendet. Ein weiteres Medium war HAM's F10 mit dem Zusatz von hitzebehandeltem fetalem Kälberserum, Penicillin und Streptomycin (KINNEY et al. 1979).

## 2.5 Embryonale Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die sich zum einen selbsterneuern können und zum anderen das Potential besitzen sich in eine oder mehrere spezialisierte Zellen zu differenzieren (BISHOP et al. 2002). Man unterscheidet totipotente und pluripotente Stammzellen. Befruchtete Eizellen (Zygoten) und Blastomeren zwischen dem 2-und 8-Zellstadium werden als totipotent bezeichnet, d.h. aus jeder einzelnen Blastomere kann ein komplettes Individuum entstehen und sie können alle Gewebe des Organismus bilden. Diese Fähigkeit nimmt mit späteren Teilungsstadien ab. Insbesondere nach der Differenzierung in embryonale innere Zellmasse (ICM) und extraembryonales Trophektoderm in der Blastocyste, sind die embryonalen Zellen lediglich noch pluripotent, d.h. sie können zwar noch alle Zellarten, aber keinen kompletten Organismus mehr bilden. Danach kommt es zur Differenzierung und Determination der ICM, was die Entwicklungspotenz und die Vielfalt möglicher Zellfunktionen vormals totipotenter Zellen weiter einschränkt. Im adulten Säugetierorganismus sind dann etwa 200 differenzierte und hoch spezialisierte Zelltypen zu finden. Aber auch Gewebe und Organe von Föten und sogar der adulte Organismus enthalten sich selbst erneuernde Zellpopulationen. Diese somatischen Stammzellen finden sich im Blut (PHILIPS et al. 2000)-, im Knochenmark (WEISSMANN et al. 2001) und sogar im ZNS (ERIKSSON et al. 1998, GAGE 1998). In vielen Geweben und Organen geht die Regeneration von Stammzellen aus, die in der Lage sind sich beständig zu teilen. Sie scheinen eine ähnlich umfassende Plastizität wie ES-Zellen zu besitzen, und sogar Gewebe, die ursprünglich von anderen Keimblättern

als dem Mesoderm gebildet wurden regenerieren zu können (BRAZELTON et al. 2000).

### *2.5.1 Verwendung*

Embryonale Stammzellen bieten realistische Möglichkeiten im Zell- und Gewebeersatz und in der Transplantationsmedizin. Darüber hinaus dienen sie In-vitro als Entwicklungsmodell in der Grundlagenforschung oder als Testsystem in der Embryotoxikologie oder Pharmakologie.

### *2.5.2 Stand der Forschung*

Die Stammzellforschung begann mit der Etablierung von Stammzellen aus Carcinomen. Auch beim Hund wurde schon aus einem Mammatumor eine Stammzelllinie etabliert (PRIOSOERYANTO et al. 1995). Der Nachteil embryonaler Carcinomzellen ist jedoch ein häufig veränderter Karyotyp, der Tumorbildung in den Chimären zur Folge haben kann. Zum ersten Mal wurden ES-Zellen Anfang der 80er Jahre bei der Maus (MARTIN 1981; EVANS und KAUFMAN 1981) gewonnen. In den letzten Jahren kam es auch bei landwirtschaftlichen Nutztieren zur Etablierung pluripotenter Zelllinien. Der Einsatz verschiedenster Ko-Kultursysteme, Wachstumsfaktoren und Differenzierungs-inhibitoren hat aber bisher lediglich ES-Zell-ähnliche Zellen hervorgebracht. Diese weisen charakteristische Morphologie und Oberflächenmarker auf und zeigen ein gewisses Differenzierungspotential In-vitro wie In-vivo, aber nach Reintegration in Embryonen beteiligen sich neben den ES-Zellen der Maus nur noch die vom Huhn stammenden an der Ausbildung der Keimbahn.

### *2.5.3 Gewinnung ES*

Die Gewinnung der ES-Zellen ist auf unterschiedlichen Wegen möglich. Sie können aus verschiedenen präimplantativen Embryonalstadien und sogar von einzelnen Blastomeren von 2- bis 16-Zell Embryonen (DOETSCHMANN et al. 1985; EISTETTER et al. 1989), aus isolierter ICM oder aus PGC, etabliert werden.

Es wurden hierfür unterschiedliche Techniken entwickelt. Intakte Blastocysten wurden entweder nach dem Schlüpfen aus der Zona pellucida oder nach dem Entfernen der Zona durch Inkubation in zona-auflösenden Reagenzien, auf sogenannte „Ammen“- oder „Feeder“-Zellen kultiviert. Nach 2 bis 4 Tagen attachierten die Blastocysten auf diesen Zellen und die sprossartig über den flächig auswachsenden Trophoblast emporragende ICM wurde isoliert, mechanisch wie auch enzymatisch disaggregiert und zur Vermehrung auf neue Feederzellen überführt (=passagiert).

Zur Etablierung von ES-Zelllinien bedarf es bestimmter Kulturbedingungen, die die Proliferation der Zellen fördern und ihre Differenzierung verhindern. Ein Beispiel dafür sind Feederzellen, die aus fötalen Mausfibroblasten gewonnen werden können (WOBUS et al. 1984). Anstelle von Feederzellen können auch so genannte

konditionierte Medien verwendet werden, in denen die Zellen zuvor für eine bestimmte Zeit kultiviert wurden. Dabei kommt es zur Aufnahme toxischer Metabolite und Abgabe positiv wirkender Stoffe, was eine Modifizierung der Medien zur Folge hat. (SMITH und HOOPER 1987). Ein Beispiel für einen Differenzierungshemmefaktor ist der Leukemia Inhibitory Factor (SMITH et al. 1988, WILLIAMS et al. 1988)

#### 2.5.4 Differenzierung von ES-Zellen

##### 2.5.4.1 *In-vivo-Differenzierung von ES-Zellen*

Die Pluripotenz von ES-Zellen zeigt sich besonders in ihrem In-vivo-Differenzierungsverhalten. Bei der Transplantation von ES-Zellen in immundefizierte Mäuse konnte zum Beispiel die Entwicklung von Teratokarzinome mit differenzierten, aber auch undifferenzierten, proliferierenden Zellen beobachtet werden (EVANS 1983). Bei einer Injektion von ES-Zellen in Blastocysten konnte eine Beteiligung an der normalen Embryonalentwicklung beobachtet werden (BRADLEY et al. 1984). Es ist theoretisch möglich lebensfähige Nachkommen zu entwickeln, die vollständig von ES-Zellen abstammen (NAGY et al. 1990).

#### 2.5.4.2 *In-vitro-Differenzierung von ES-Zellen*

Durch die In-vitro-Differenzierung der ES-Zellen konnten für die Grundlagenforschung und Zelltherapie wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. ES-Zellen können so als Modell für die Differenzierungsprozesse während der frühen Embryonalentwicklung, insbesondere für die dabei ablaufende Determination einzelner Zelllinien, die dafür verantwortlichen Steuersignale und dabei auftretende Störungen genutzt werden. Der erste Schritt der gezielten In-vitro-Differenzierung ist die Bildung differenzierter „embryoid bodies“ (=EB). Dies sind runde flüssigkeitsgefüllte Hohlkörper in denen keine Morphogenese stattfindet (WOBUS et al. 1984; DOETSCHMAN et al. 1985; WILES und KELLER 1991). Mit verschiedenen Protokollen war die gezielte Differenzierung von ES-Zellen in Herzmuskelzellen (WOBUS et al. 1998; MALTSEV et al. 1993), in Skelettmuskelzellen (MILLER-HANCE et al. 1993; ROHWEDEL et al. 1994), in Nerven- und Gliazellen (STRÜBING et al. 1995; BAIN et al. 1995, FRAICHARD et al. 1995), in Epithelzellen (BAGUTTI et al. 1996) oder in hämatopoetischen Zellen (SCHMITT et al. 1991; WILES et al. 1991; NAKANO et al. 1996) möglich. Dabei handelt es sich jedoch immer um eine Mischpopulation aus differenzierten Zellen mit einem mehr oder weniger großen Anteil einer bestimmten Zellart. Häufig auch noch undifferenzierte Zellen nachgewiesen werden, was eine erhebliche negative Konsequenz für einen etwaigen Einsatz humaner ES-Zell-Derivate in der Zellersatztherapie darstellt.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere

Bei 21 Hunden verschiedener Rassen, die zur elektiven Kastration vorgesehen waren, wurde der Eingriff mit dem Einverständnis der Besitzer so terminiert, dass die Hunde entsprechend vorbereitet werden konnten. Es wurden 8 Hunde der Rasse Beagle eigens für die Untersuchung eingesetzt (AZ: 209.1/211-2531.3-7/04). Unter den Hündinnen waren 3 Golden Retriever, 2 Labrador Retriever, 1 Deutscher Schäferhund, 1 Rottweiler, 1 Jack Russel Terrier, 9 Beagles, 1 Dobermann, 1 Deutsche Dogge, 1 Kleinspitz und 9 Mischlingshunde.

Die Hunde waren zwischen 1 und 10 Jahre alt und wogen zwischen 4 und 56 Kilogramm. 6 Hunde wurden in der ersten Läufigkeit besamt, 4 in der zweiten und 8 in der dritten Läufigkeit. Die restlichen 11 Hündinnen waren schon mindestens viermal läufig.

#### 3.2 Läufigkeitsinduktion

Unter den 29 Hunden waren 7 bei denen die Läufigkeit induziert wurde. Dabei handelte es sich ausschließlich um Hunde der Rasse Beagle. Die Hündinnen wurden zunächst gynäkologisch untersucht, um sicher zu gehen, dass sie sich im Anostrus befanden. 3 der Hündinnen wurden anschließend mit dem Prolaktinantagonisten Cabergolin (Galastop) behandelt. Sie bekamen 5µg pro Kilogramm Körpergewicht einmal täglich. Eine der Hündinnen wurde nach 20 Tagen läufig, eine nach 22 Tagen und eine nach 28 Tagen. Die anderen 4 Hündinnen bekamen ein Deslorelinimplantat (Suprerolin®, Firma: PEPTECH mit 4,7mg Deslorelin) subkutan injiziert, woraufhin zwischen 4 und 6 Tagen nach der Einsetzung blutiger Vaginalausfluss zu sehen war. Sobald die Läufigkeit eintrat

wurden die Deslorelinimplantate unter Lokalanästhesie mit 2ml Lidocain 2% wieder entfernt. Die läufigkeitsinduzierten Hündinnen wurden dann spätestens ab dem 5. Tag der vaginalen Blutung wie die restlichen Hündinnen täglich untersucht.

### **3.3 Klinische Untersuchung der Hunde**

Die Hunde wurden ab dem ersten oder spätestens ab dem sechsten Tag der Läufigkeit untersucht. Die Untersuchungen fanden meist täglich, aber mindestens jeden zweiten Tag statt, um den Ovulationszeitpunkt möglichst genau bestimmen zu können. Die Untersuchungen wurden immer im selben Raum und von derselben Person durchgeführt. Sie umfassten eine Überprüfung des Duldungsreflexes, die Adspektion des äußeren Genitales, eine Vaginoskopie, eine Vaginalzytologie und die Bestimmung von Progesteron im Blutplasma.

#### **3.3.1 Überprüfung des Duldungsreflexes**

Die Hündinnen wurden seitlich der Vulva gekrault und der Grad der Duldung in einer Skala von - bis +++ eingeteilt.

Mit dem Erreichen von +++ auf dieser Skala wurde der Beginn des Östrus festgelegt und die Ovulation fand somit 24-48 Stunden später statt.

#### **3.3.2 Adspektion des äußeren Genitales**

Bei der Untersuchung des äußeren Genitales wurde zum einen die Ödematisierung und die Konsistenz der Vulva, und zum anderen die Farbe und die Menge des Vaginalausflusses beurteilt. Der Ödematisierungsgrad wurde mit „hoch-“, „mittel-“ oder „geringgradig“ ödematisiert angegeben. Die Konsistenz der Vulva war „derb“, „derb-elastisch“ oder „weich“. Die Menge des Vaginalausflusses wurde mit Hilfe einer Skala von - bis +++ angegeben, und für die Beschreibung der Farbe wurden die Begriffe „rot“, „fleischwasserfarben“ oder „klar“ verwendet. Zum Zeitpunkt der Ovulation wurde adspektatorisch eine mittel- bis geringgradig

ödematisierte Vulva erwartet, die palpatorisch von derb-elastischer Konsistenz war. Die Ausflussmenge durfte höchstens + betragen und musste fleischwasserfarben oder klar sein.

### 3.3.3 Vaginoskopie

Sie wurde mit Rektaloskopen mit einer Länge von 20-25cm und einem Durchmesser von 0,3-1cm (Fa. Heine) mit angeschlossener Kaltlichtquelle (HK7000, Fa. Heine) durchgeführt. Der Durchmesser wurde an die jeweilige Hundegröße und den Zyklusstand angepasst. Bei der Untersuchung wurden die Schleimhautödematisierung, die Schleimhautfarbe und ihre Fältelung beurteilt. Zusätzlich wurden die Flüssigkeitsmenge und –farbe in der Vagina beschrieben. Die Ödematisierung der Schleimhaut konnte gering-, mittel- oder hochgradig sein. Zur Beschreibung der Schleimhautfarbe wurde die Begriffe „rosa“, „blassrosa“ und „blass“ verwendet. Bei der Fältelung unterschied man „keine Fältelung“, „beginnende Sekundärfältelung“, „Sekundärfältelung mit runden Kanten“ und „Sekundärfältelung mit eckigen Kanten“. Die Flüssigkeitsmenge wurde mittels einer Skala von - bis +++ eingeteilt. Und die Flüssigkeitsfarbe wurde mit „rot“, „fleischwasserfarben“ oder „klar“ beschrieben.

Zum Zeitpunkt der Ovulation sollte die Schleimhaut geringgradig ödematisiert und blass sein. Die Sekundärfältelung sollte eckige Kanten besitzen, und die Flüssigkeitsmenge sollte höchstens + betragen und fleischwasserfarben oder klar sein.

### 3.3.4 Vaginalzytologie

Für die Gewinnung eines Vaginalausstriches wurde ein steriler, mit Kochsalzlösung befeuchteter langstieler Wattetupfer durch einen Otoskopaufsatzt (Fa. Eickemeyer) hindurch in die Vagina eingeführt. Je nach Hundegröße wurde ein 6,5cm o. 9cm langer Otoskopaufsatzt (Fa. Eickemeyer) verwendet. Auf einem Objektträger wurde der Tupfer in zwei Bahnen unter leichtem Druck ausgerollt. Der Ausstrich wurde zunächst mit Sprühfixierer (Merckofix, Fa. Merck, Darmstadt) fixiert und, nachdem er getrocknet war, nach PAPANICOLAOU (Färbeprotokoll s. Anhang) gefärbt.

In der Zytologie konnte bei den Schleimhautzellen zwischen Zellen aus tieferen Schichten und Superfizialzellen unterschieden werden, es wurde das Vorhandensein von Leukozyten und Erythrozyten registriert, der Azidophilieindex wurde errechnet, das Vorhandensein von Schollen, von Zelldetritus und Zellhaufen wurde notiert. Zur Zeit der LH-Welle waren nur noch Superfizialzellen zu sehen, die zu 90% azidophil gefärbt waren. Zur Ovulation hin nahm sowohl der Azidophilieindex, der dann bis zu 100% betragen konnte, als auch die Zellzahl zu, wodurch die Zellen teilweise in Haufen lagen. Konnte kein deutlicher ovulatorischer Ausstrich gefunden werden, dann wurde die Vaginalzytologie retrospektiv wie der Progesteronverlauf beurteilt, indem man die Ovulation auf einen Tag vor der Gewinnung des postovulatorischen Ausstriches datierte. Als postovulatorisch wurden diejenigen Ausstriche beurteilt, bei denen 100% azidophile Superfizialzellen zu sehen waren, oder wenn ein deutlicher Zellumschwung im Ausstrich zu erkennen war.

### 3.3.5 Progesterontest

Zur Bestimmung der Progesteronkonzentration im Plasma wurde ein quantitativer ELISA-Test benutzt. Die Testplatte war mit IgG (Schaf-Anti-Ratte) beschichtet, als Enzymmarker wurde 3-HRP-CMO (Fa. Sigma) benutzt, als Antikörper ein 2-HA-anti-Progesteron (Fa. Sigma) benutzt. Die Platten wurden photometrisch bei 450nm ausgewertet. Die Genauigkeit des Testes ist zwischen 2ng/ml und 10ng/ml am höchsten, weshalb alle Werte unter 2ng/ml als Minimum und alle Werte über 10ng/ml als Maximum angegeben wurden. Wenn es bei der Verlaufskontrolle des Progesterons zu einem sprunghaften Anstieg der Plasmakonzentration auf 10ng/ml oder darüber kam, dann wurde 24 Stunde zuvor die Ovulation angenommen.

## 3.4 Besamungs- oder Deckzeitpunkt

Die Hündinnen wurden ab dem Zeitpunkt der errechneten Ovulation besamt bzw.

gedeckt. Alle Hündinnen wurden zwei- bis dreimal im Abstand von ein bis zwei Tagen besamt bzw. gedeckt. Die Besamungen bzw. Deckakte wurden zwischen 3 Tagen vor und 3 Tagen nach der errechneten Ovulation durchgeführt. Es standen dafür 2 Rüden der Rasse Beagle zur Verfügung, die beide Sperma von hoher Qualität produzieren.

#### 3.4.1 Künstliche Besamung

Für die künstliche Besamung wurde Frischsperma von beiden Beaglerüden verwendet, das unmittelbar vor der Samenübertragung gewonnen worden war. Auf die Hündin wurde möglichst nur die zweite spermienreiche Phase des Ejakulats übertragen. Wenn diese nicht getrennt gewonnen werden konnte, dann wurde ein Gemisch der verschiedenen Phasen übertragen.

Mit Hilfe des Rektaloskops (Fa. Heine) wurde ein Einmalbesamungskatheter für Rinder (Länge: 44,5cm) vaginal eingeführt und möglichst etwas unter die Dorsalfalte geschoben. Nach der Entfernung des Rektaloskops wurde eine 5ml Einmalspritze (Fa. Braun), in der sich das Sperma befand, auf das kaudale Ende des Katheters aufgesetzt und das Ejakulat in den Katheter gespritzt. Damit kein Sperma in dem Katheter zurück blieb, wurde noch einmal Luft hinterher gespritzt. Die Hündin wurde anschließend für 5 bis 15 Minuten an den Hintergliedmaßen etwas angehoben, um einen Rückfluss des Spermias zu vermeiden.

#### 3.4.2 Natursprung

Der Natursprung wurde nur von einem der beiden Beaglerüden durchgeführt. Es wurden nur die 8 Beaglehündinnen teilweise gedeckt, die eigens für den Versuch zur Verfügung standen. Die Rüden wurden zusammen mit den Hündinnen in einen Raum gesperrt, der über ein Fenster eingesehen werden konnte. Der Deckakt musste vollständig mit Hängen abgelaufen sein, bevor die Tiere wieder getrennt wurden. Kam es zu keinem Deckakt, oder war dieser nur unvollständig, dann wurden die Hündinnen anschließend noch künstlich besamt.

### 3.5 Embryogewinnung

#### 3.5.1 Ovariohysterektomie

Zwischen Tag 12 und Tag 17 nach dem errechneten Ovulationszeitpunkt wurden die Hündinnen ovariohysterektomiert. Hierfür wurden die Hündinnen in Vollnarkose gelegt. Die Narkose wurde mit 0,2ml/kg KGW L-Palamivet (Fa. Intervet) und 0,02mg/kg KGW Azepromazin (Vetranquil 1%, Fa. Albrecht), oder mit 5mg/kg KGW Propofol (Fa. Essex, München) und 1mg/kg KGW Diazepam (Diazepam-ratiopharm® 10, Fa. Ratiopharm GmbH) eingeleitet und mit einer Inhalationsnarkose mit 1,5-2 Vol% Isofluran und Sauerstoff aufrechterhalten. Als Analgetikum für die Operation bekamen die Hunde entweder 4mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl®, Fa. Pfizer) oder 0,02mg/kg KGW Piritramid (Dipidolor®, Fa. Janssen-Clag). Als Antibiotikum wurde 25mg/kg KGW Cefazolin (Fa. Hexal) einmalig zur Operation gegeben. Die Hündinnen wurden für die Operation vorbereitet, indem der Bauch geschoren und gewaschen wurde. Danach wurden die Hündinnen auf dem Operationstisch in ventrodorsaler Lage ausgebunden. Vor der Operation wurde der rasierte Bereich noch desinfiziert. Es wurde eine Laparotomie in der Linea alba durchgeführt. Für die Ovariohysterektomie wurden jeweils kranial der Ovarien und kaudal der Cervix Ligaturen mit Vicrylfäden gesetzt. An dem OP-Präparat selbst wurden Klemmen gesetzt, um einen Blutfluss zu vermeiden. Die Klemmen wurden so platziert, dass es zu keinen Quetschungen an den Uterushörnern kam. Für die postoperative Analgesie bekamen die Hündinnen für 3 Tage 4mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl®, Fa. Pfizer).

#### 3.5.2 Uterusspülung

Aus dem Uterus wurden direkt nach der Operation die Embryonen gewonnen. Hierfür wurde das Organ mit einem sauberen Tuch getrocknet und mit einer Schere das Mesometrium und das Fettgewebe entfernt. Die beiden Uterushörner wurden am Übergang zum Corpus uteri abgesetzt und mit einer Darmklemme verschlossen. Beide Uterushörner wurden nacheinander gespült und die

Spülflüssigkeit getrennt gesammelt. Die Uterushornspitzen wurden mit einer geraden Augenkanüle 0,6x30mm (Fa. Eickemayer) durchstochen. Mit Hilfe einer 5ml Einmalspritze (Fa. Braun) wurde Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (PBS) (Fa. Sigma, Steinheim) mit 4% bovinem Serumalbumin (Fa. Sigma, Steinheim) in das Uteruslumen injiziert. Die Darmklemme wurde während dessen über einer Petrischale entfernt. Jedes Uterushorn wurde insgesamt mit 15 ml der PBS-Albumin- Lösung gespült. Die Spülösung wurde unter einem Stereo-Mikroskop (Fa. Wild Heerbrugg) bei 15facher Vergrößerung auf Embryonen durchsucht. Die Beurteilung der Embryonen erfolgte an einem Invert-Mikroskop (Zeiss Axiovert 25) mit bis zu 400facher Gesamtvergrößerung.

Die Zahl der Corpora lutea wurde auf beiden Ovarien ebenfalls ermittelt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Beurteilung des Ovulationszeitpunktes

#### 4.1.1 Progesteron

Zur Bestimmung eines Ovulationszeitpunktes wird der Progesteronverlauf quasi als „Goldstandard“ benutzt. In diesen Untersuchungen wurde retrospektiv ein sprunghafter Anstieg der Progesteronwerte, in der Regel auf Werte von 10ng/ml oder höher, als Indiz für die Ovulation 24 Stunden vorher bewertet. Auf Grund dieses Kriteriums konnte bei allen untersuchten Hündinnen retrospektiv ein Ovulationszeitpunkt festgelegt werden.

#### 4.1.2 Klinische Parameter

Nicht in allen Fällen ergaben die klinischen Parameter sichere, mit dem Parameter Progesteron übereinstimmende Hinweise zur Ovulation. Durch die Kombination mehrerer Parameter wurde in manchen Fällen ein anderer Ovulationszeitpunkt ermittelt; die Ovulation wurde dann erwartet, wenn mindestens 3 der 5 Parameter den Ovulationskriterien entsprachen.

Eindeutige Veränderungen am äußeren Genitale (mittel- bis geringgradig ödematisierte Vulva von derbelastischer Konsistenz und 1+fleischwasserfarbener oder klarer Vaginalausfluss) waren bei 3 Hündinnen (10,3%) nicht festzustellen (Abbildungen 15,19 und 21). In 5 Fällen (17%) konnte keine maximale Duldung während des wahrscheinlichen Ovulationszeitraumes beobachtet werden (Abbildungen 11, 12, 15, 23 und 24). Die typische Veränderung der Zellpopulation in der Vaginalzytologie (von ausschließlich Superfizialzellen, die zu 90 bis 100% azidophil gefärbt sind, hin zu einem Zellmischbild) blieb bei 8 Hündinnen aus (Abbildungen 6, 10, 15, 17, 18, 20, 23 und 26). Damit war dieses Kriterium das am wenigsten Aussagekräftigste zur Bestimmung des Ovulationszeitpunktes (8 von

29 Fällen; 27,2%). Die Befunde der vaginoskopischen Untersuchung (geringgradig ödematisierte, blasse Schleimhaut und 1+ fleischwasserfarbenes oder klares Vaginalsekret) ergaben nur in einem Fall kein typisches Bild (Abbildung 24).

In den Abbildungen 1 bis 29 sind die Untersuchungsergebnisse einzeln für jede Hündin dargestellt. Der Progesteronverlauf ist über den gesamten Untersuchungszeitraum eingetragen, wohingegen die Befunde des äußeren Genitales, der Duldung, der Vaginalzytologie und der Vaginoskopie nur für die Tage angegeben sind, an denen die Untersuchungsergebnisse den Ovulationskriterien (s. Material und Methode 3.3) entsprachen. Die Ovulation, festgelegt durch den Progesteronverlauf wird mit einem Pfeil nach unten dargestellt, die Ovulation festgelegt durch Erfüllung von mindestens 3 der Ovulationskriterien wird durch einen Pfeil nach oben dargestellt. Außerdem enthalten die Schaubilder die Besamungszeitpunkte, die in einem Zeitraum von 3 Tage vor bis 3 Tage nach der Ovulation lagen.

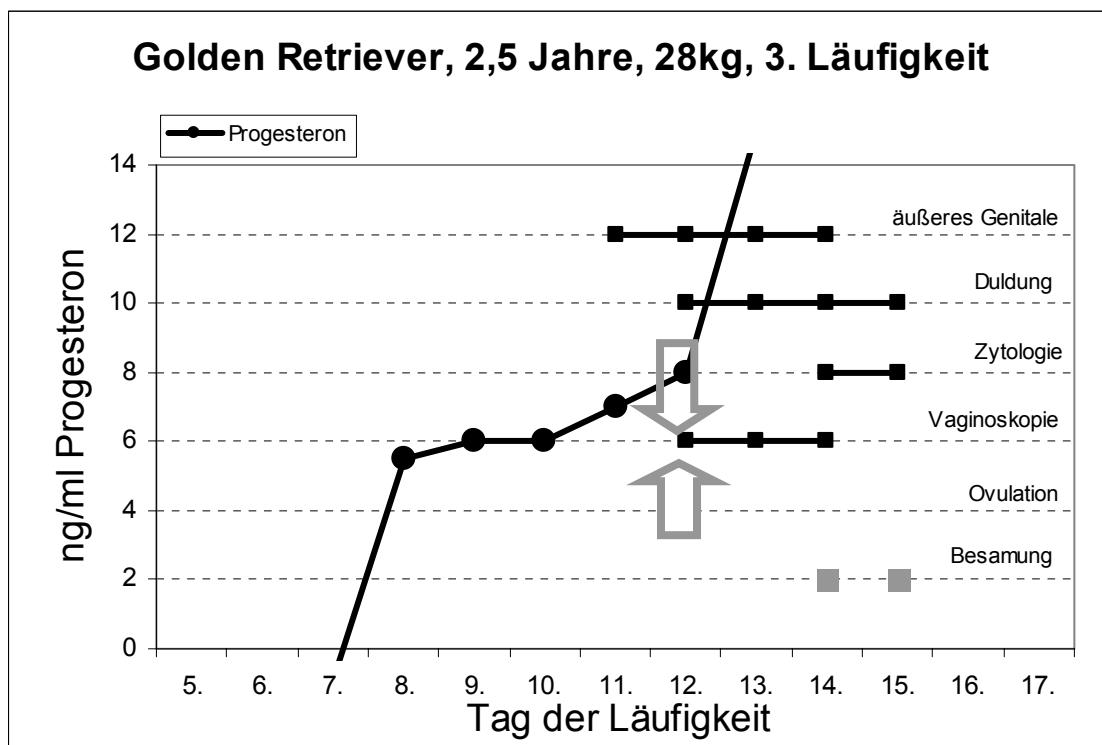


Abb.1

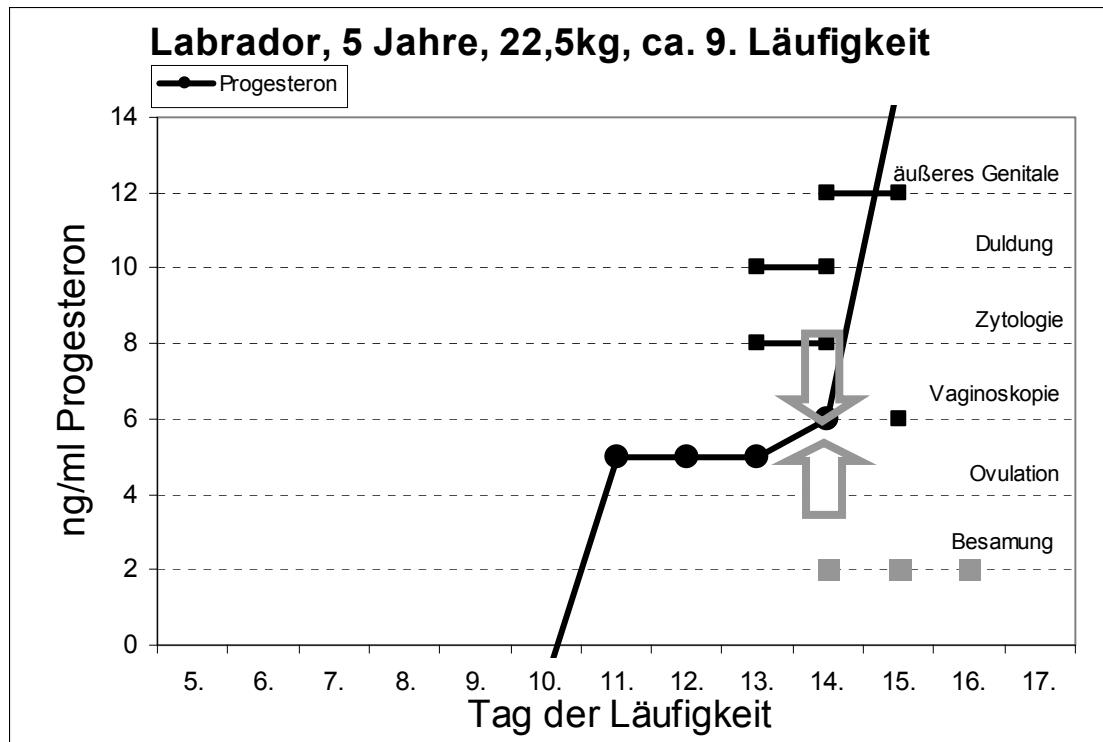


Abb. 2

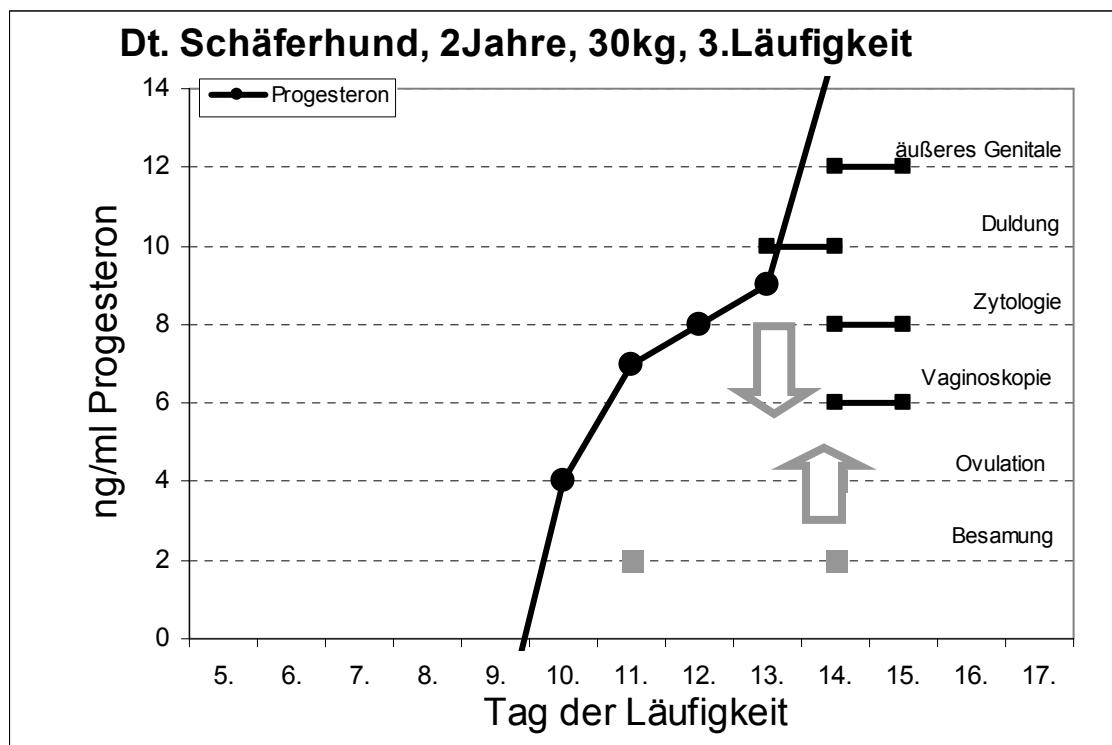


Abb. 3

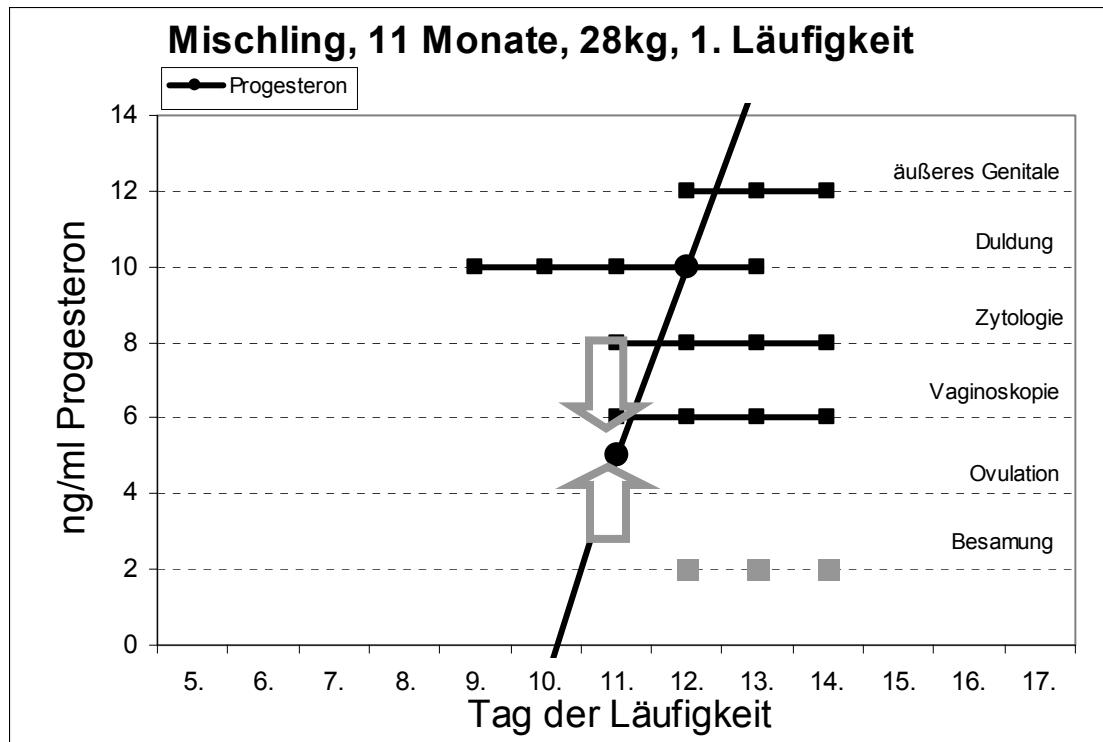


Abb. 4

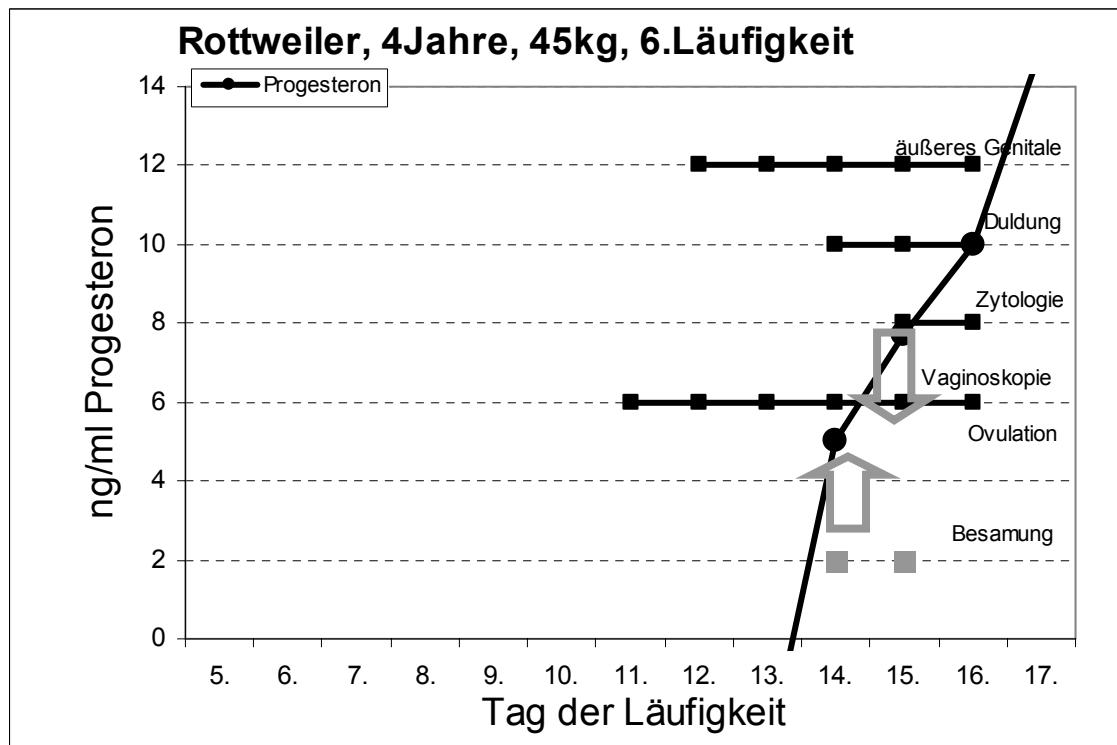


Abb. 5

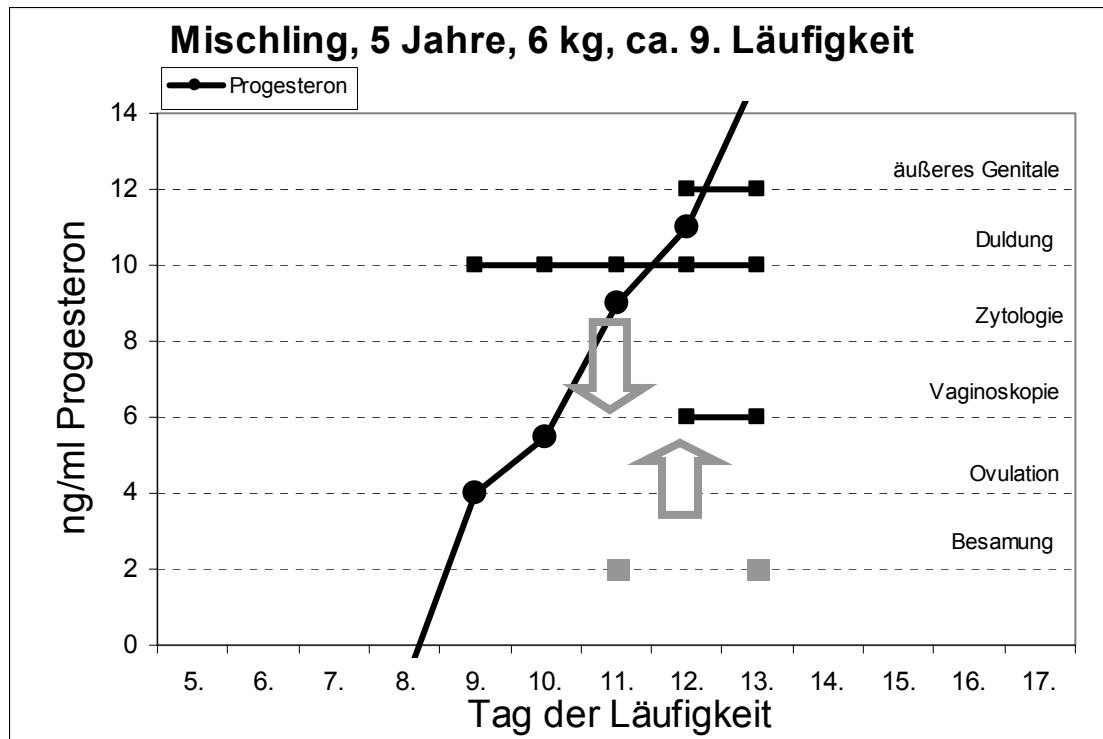


Abb. 6

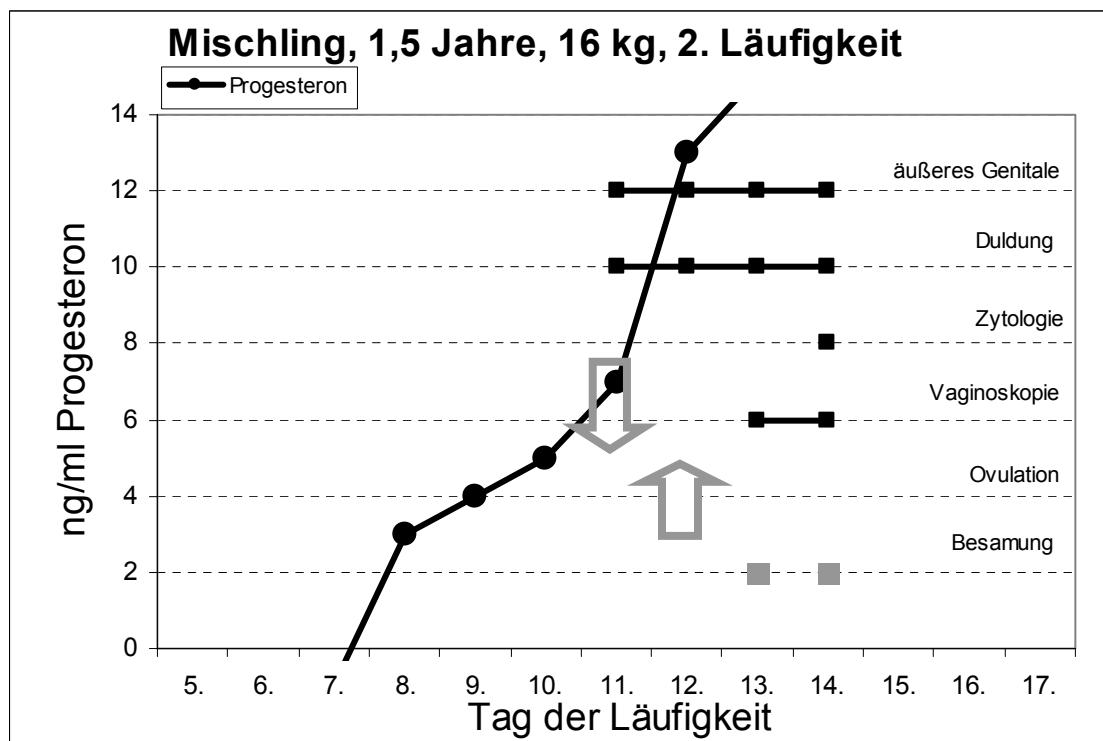


Abb. 7

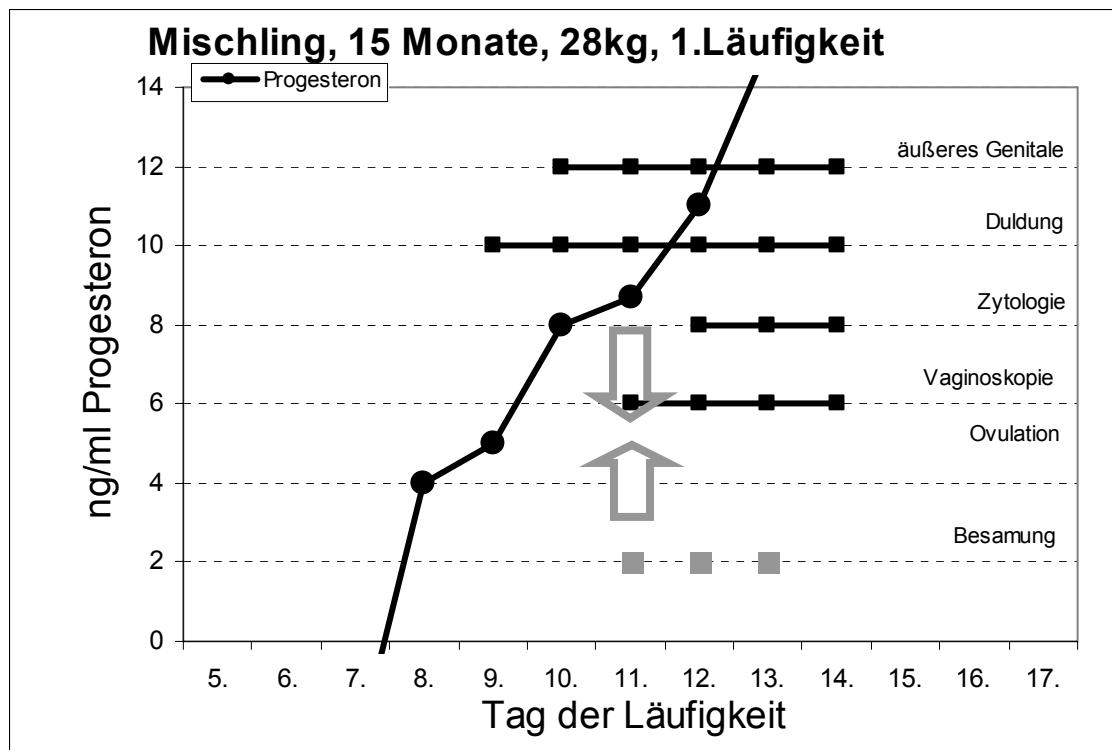


Abb. 8

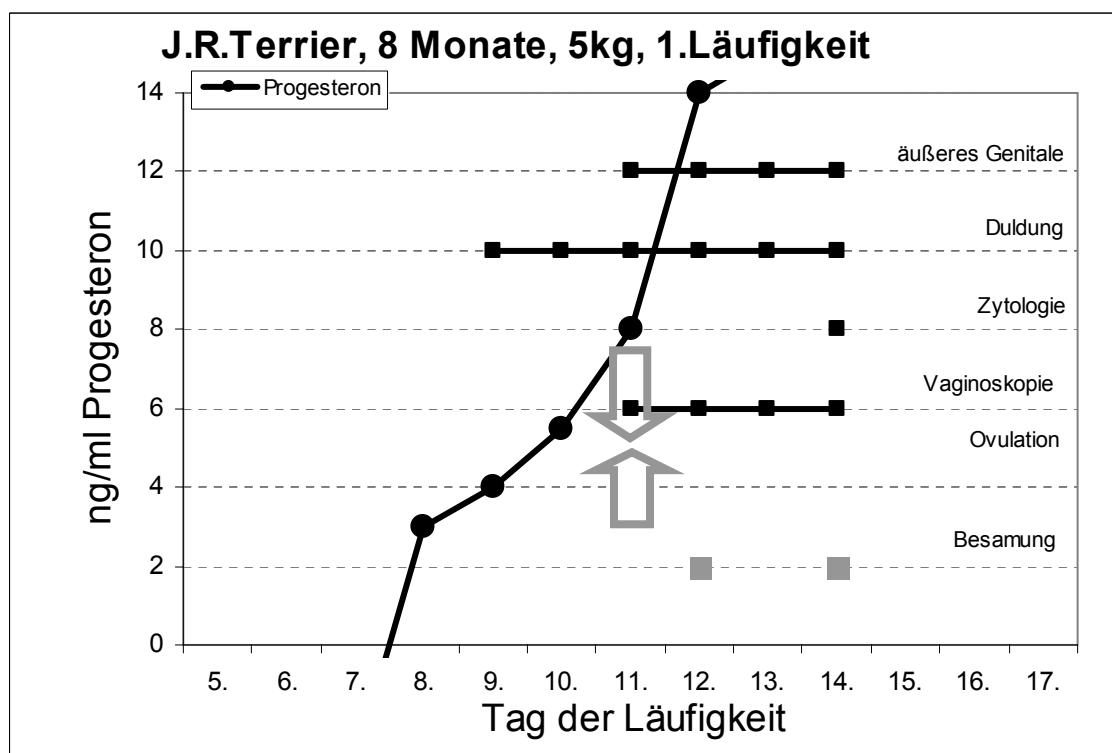


Abb. 9

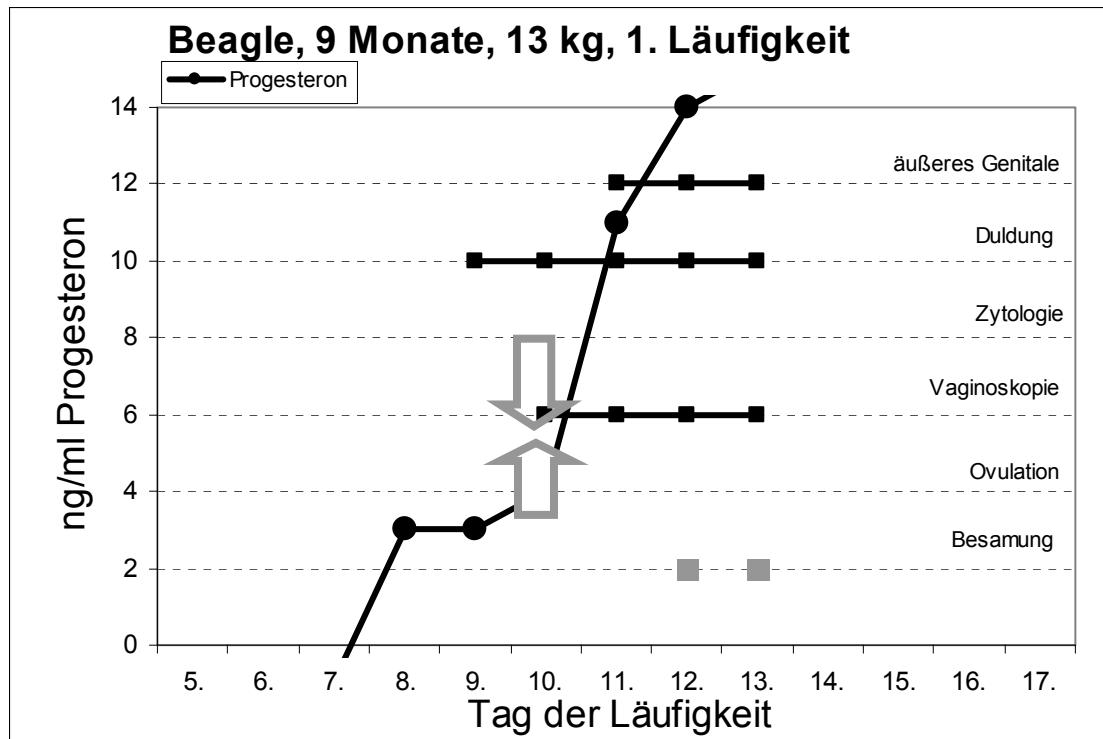


Abb. 10

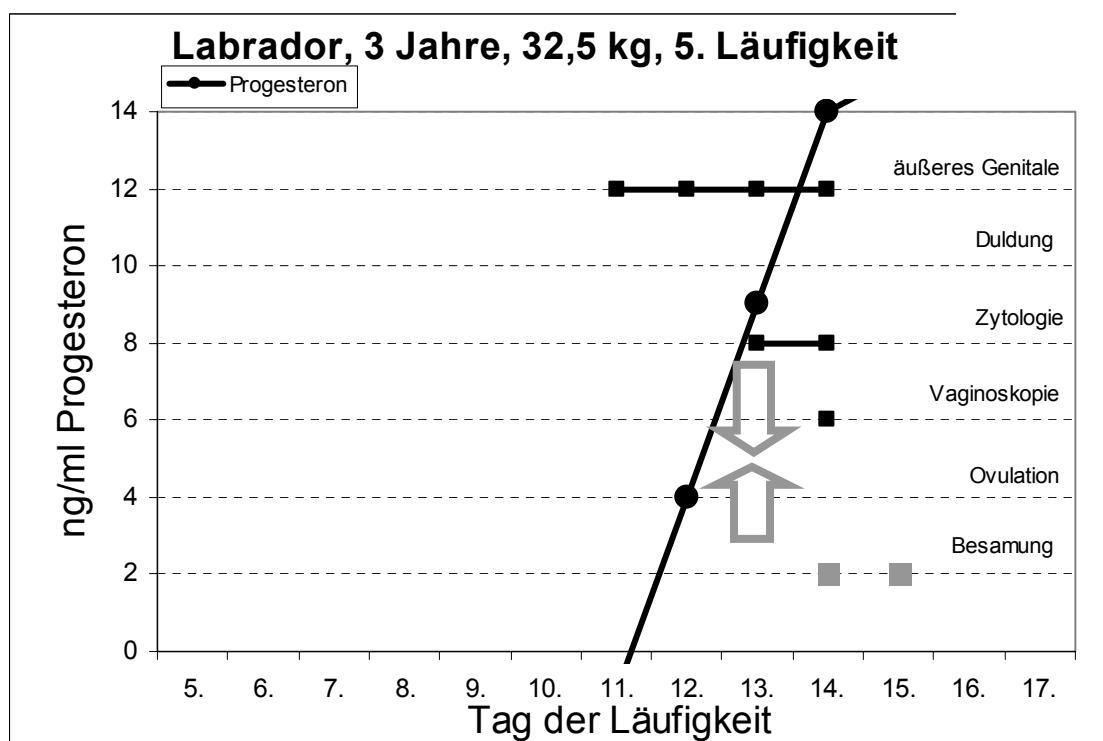


Abb. 11

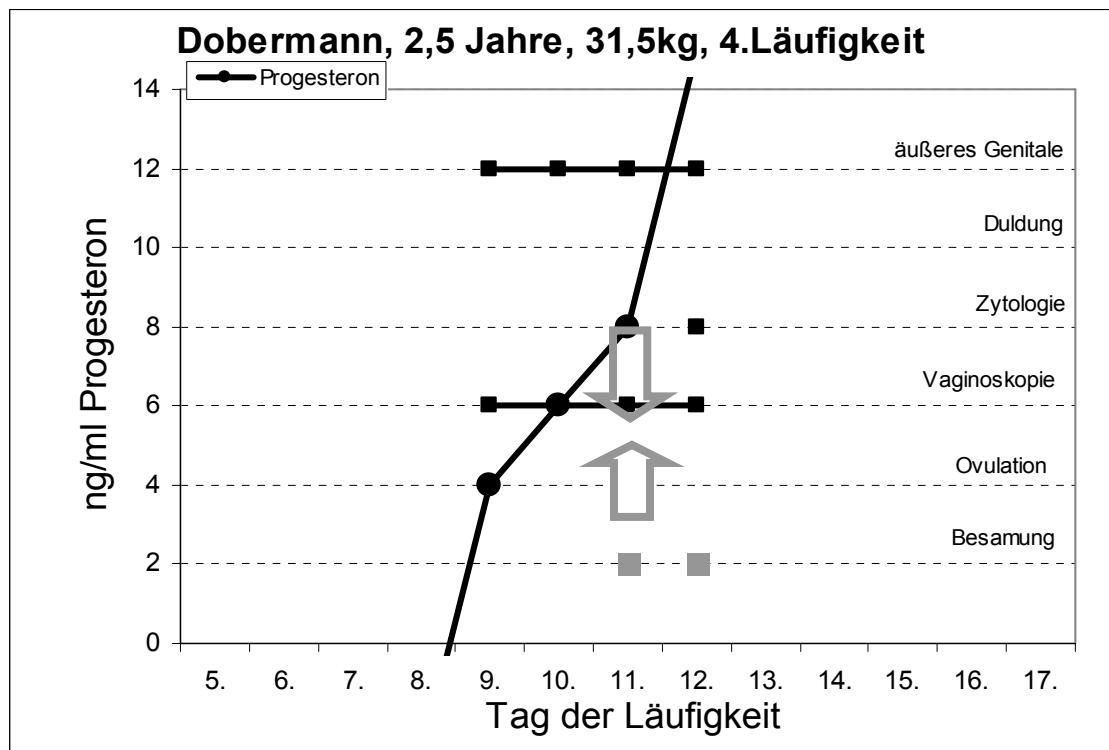


Abb. 12

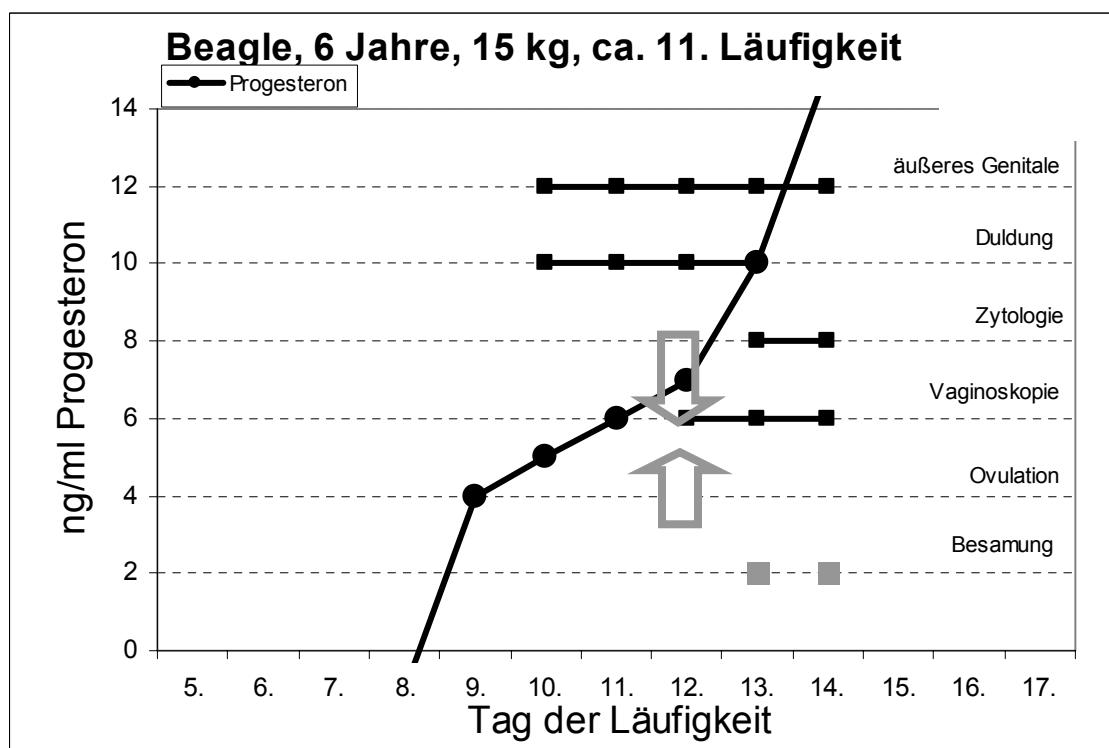


Abb. 13

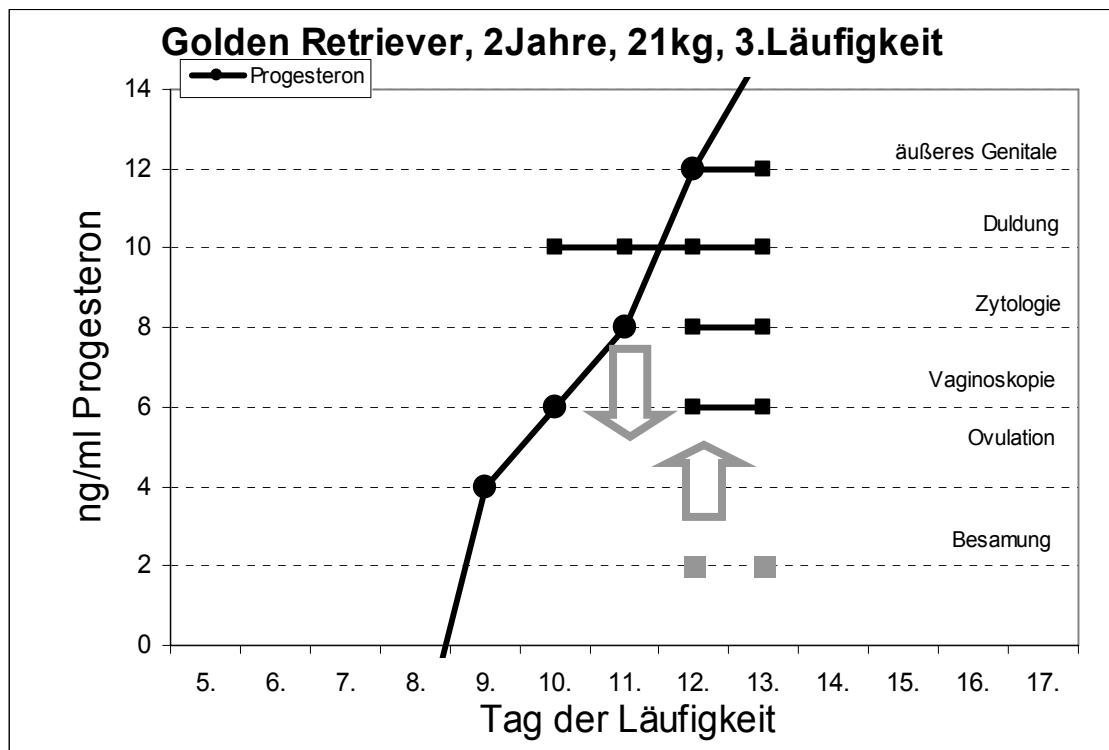


Abb. 14

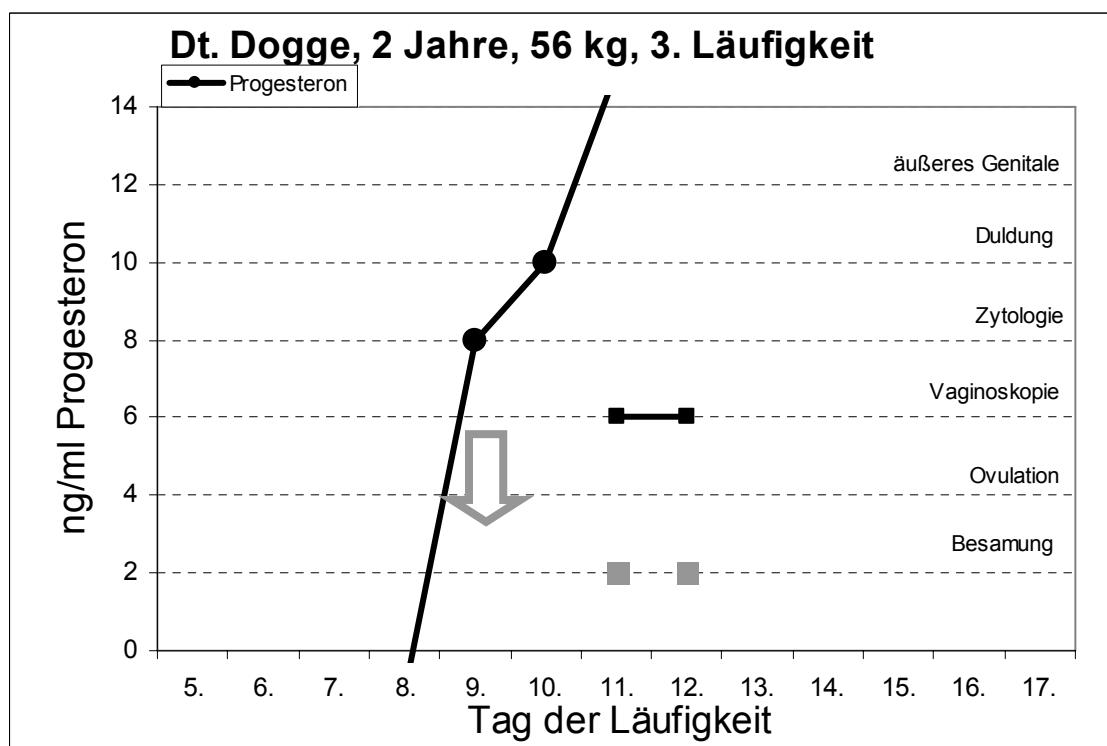


Abb. 15

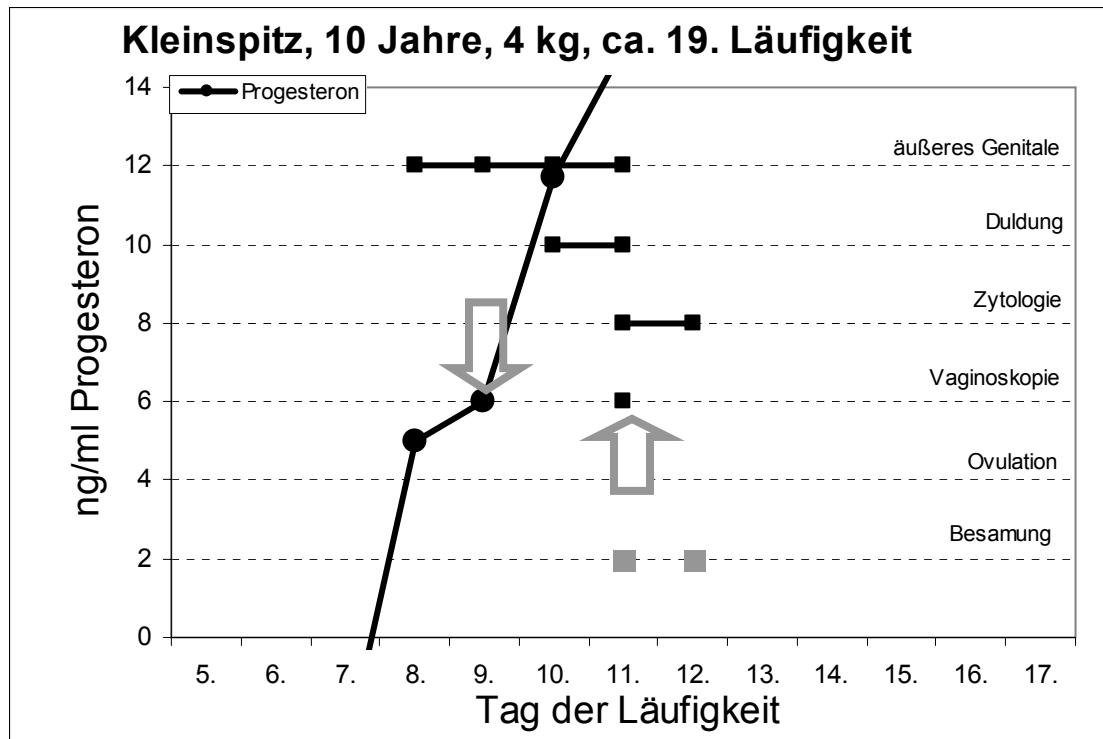


Abb. 16

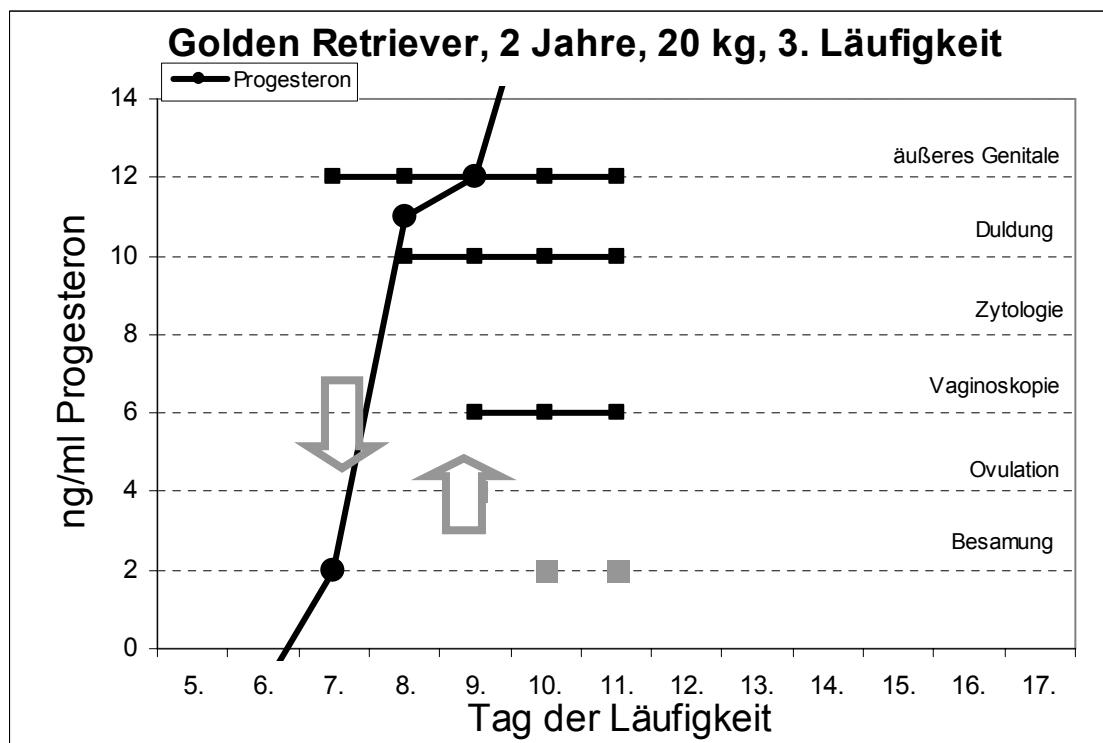


Abb. 17

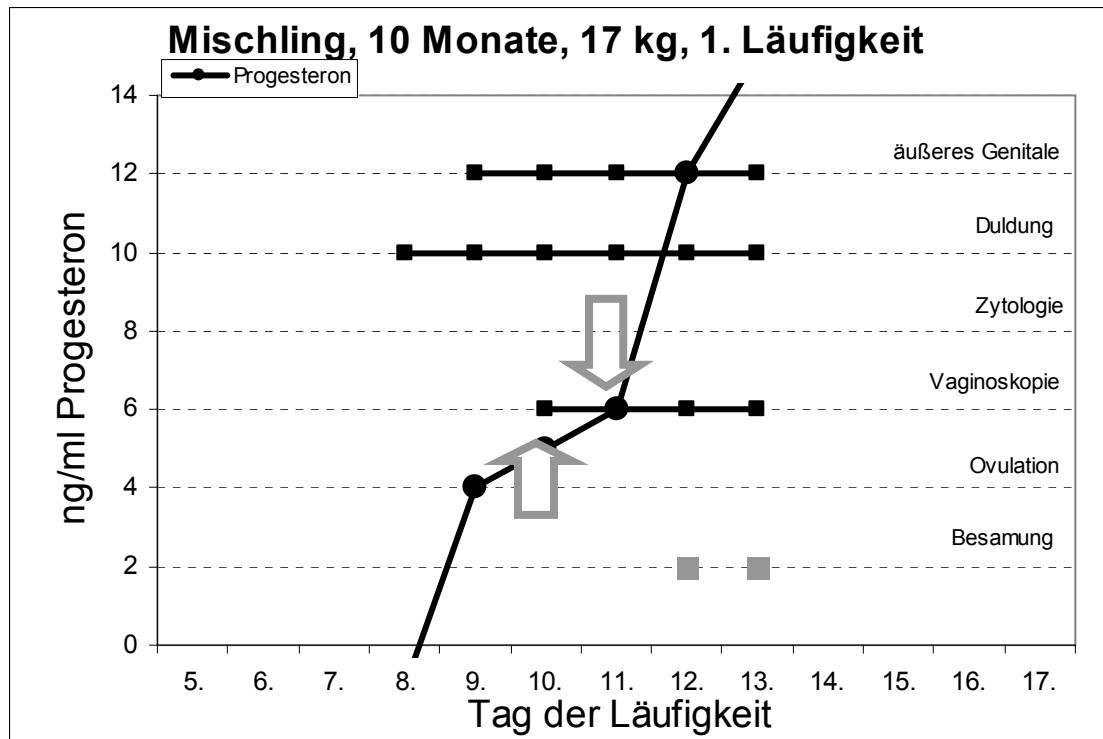


Abb. 18

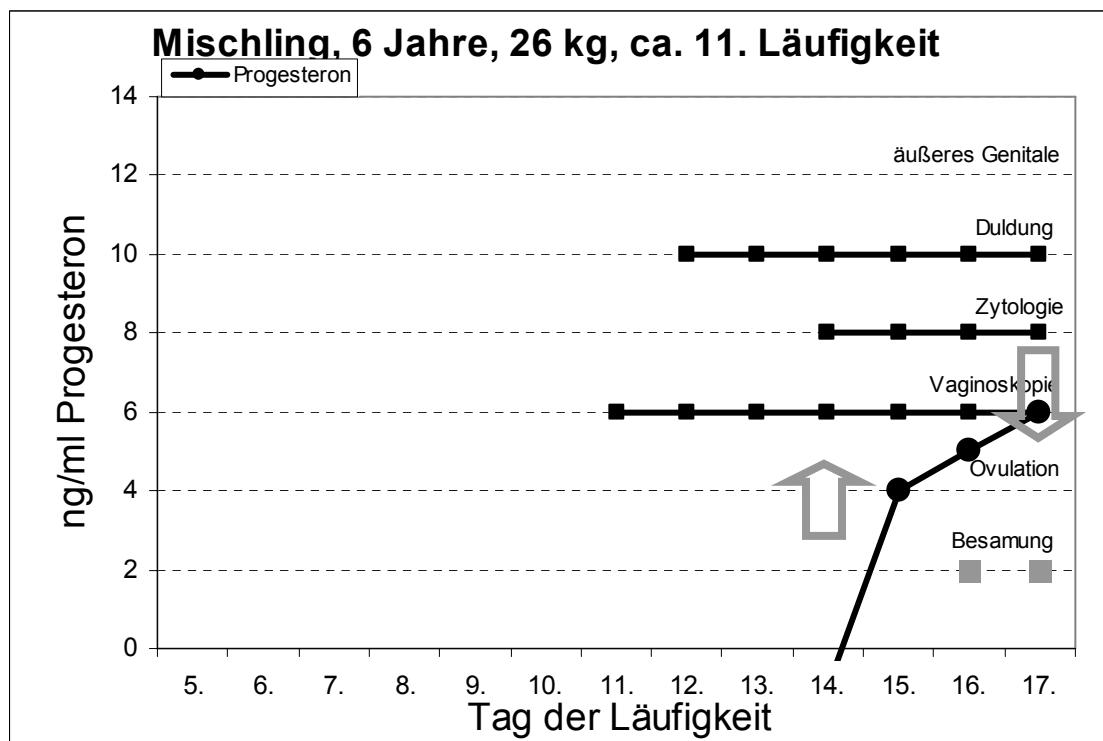


Abb. 19

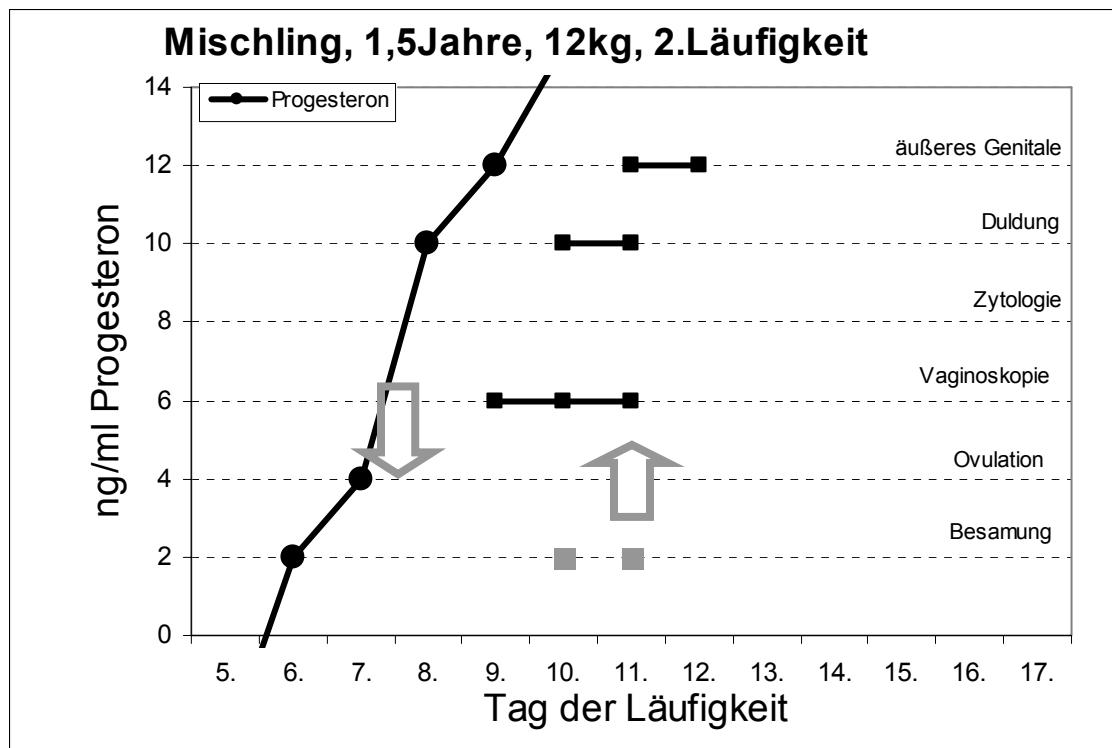


Abb. 20

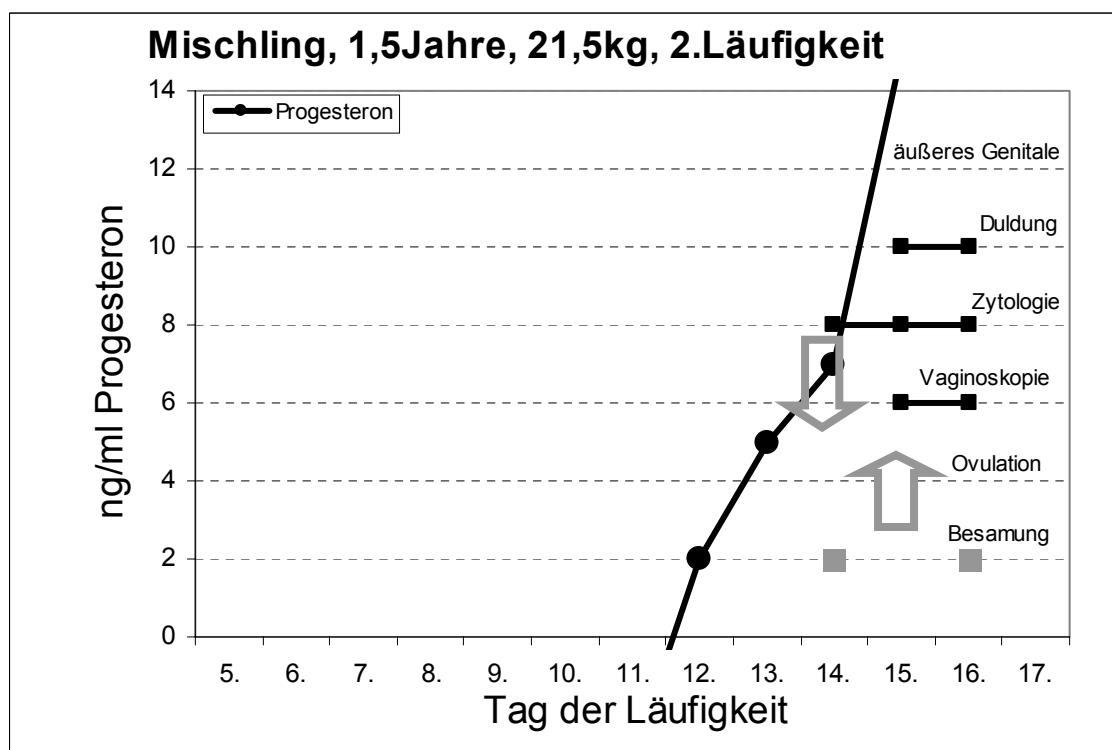


Abb. 21

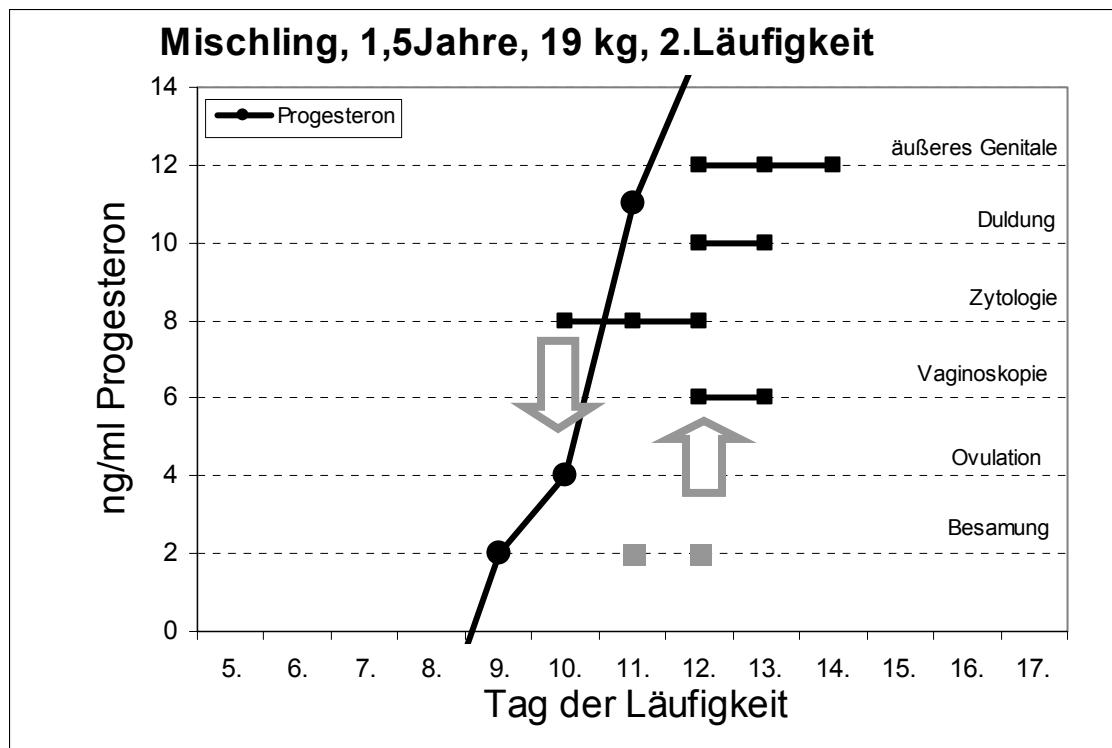


Abb. 22

#### 4.1.3 Untersuchungen der läufigkeitsinduzierten Hündinnen

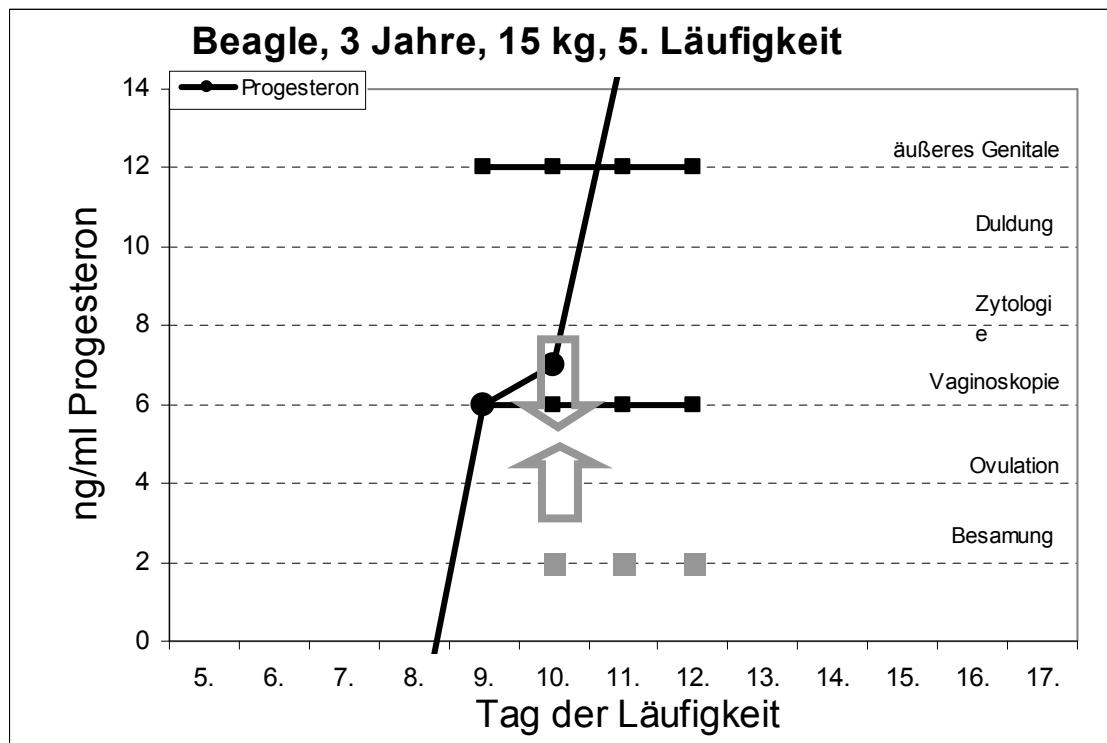


Abb. 23: Läufigkeitsinduktion mit Cabergolin über 20 Tage

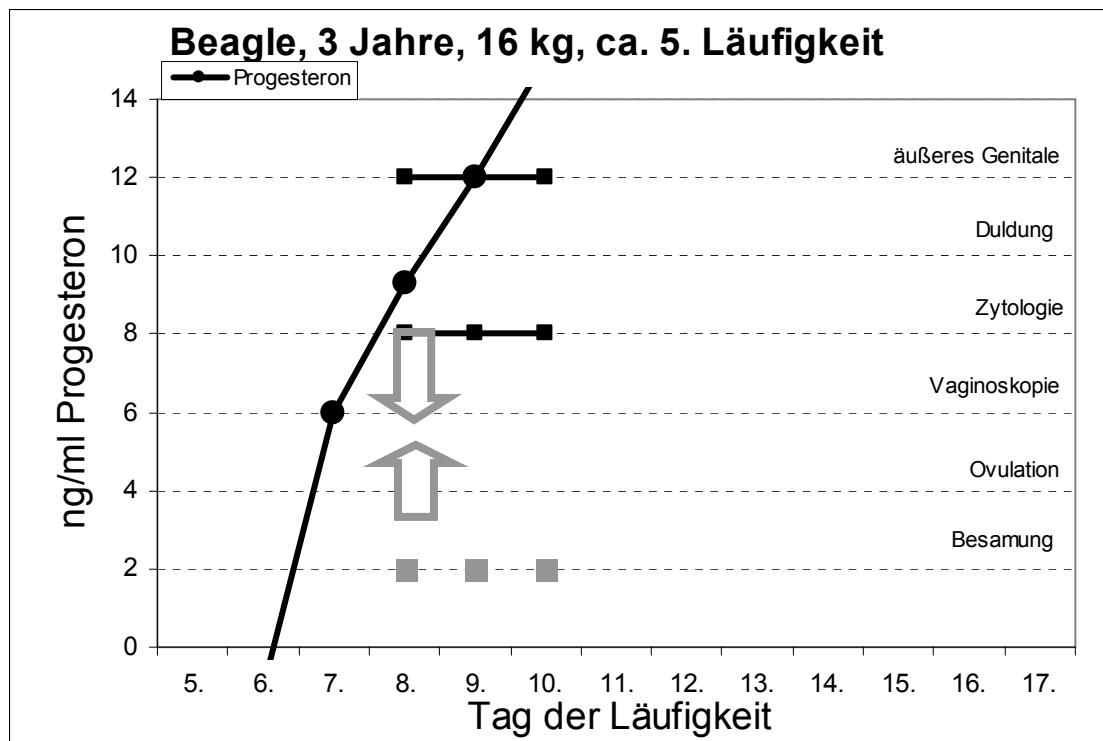


Abb. 24: Läufigkeitsinduktion mit Cabergolin über 22 Tage

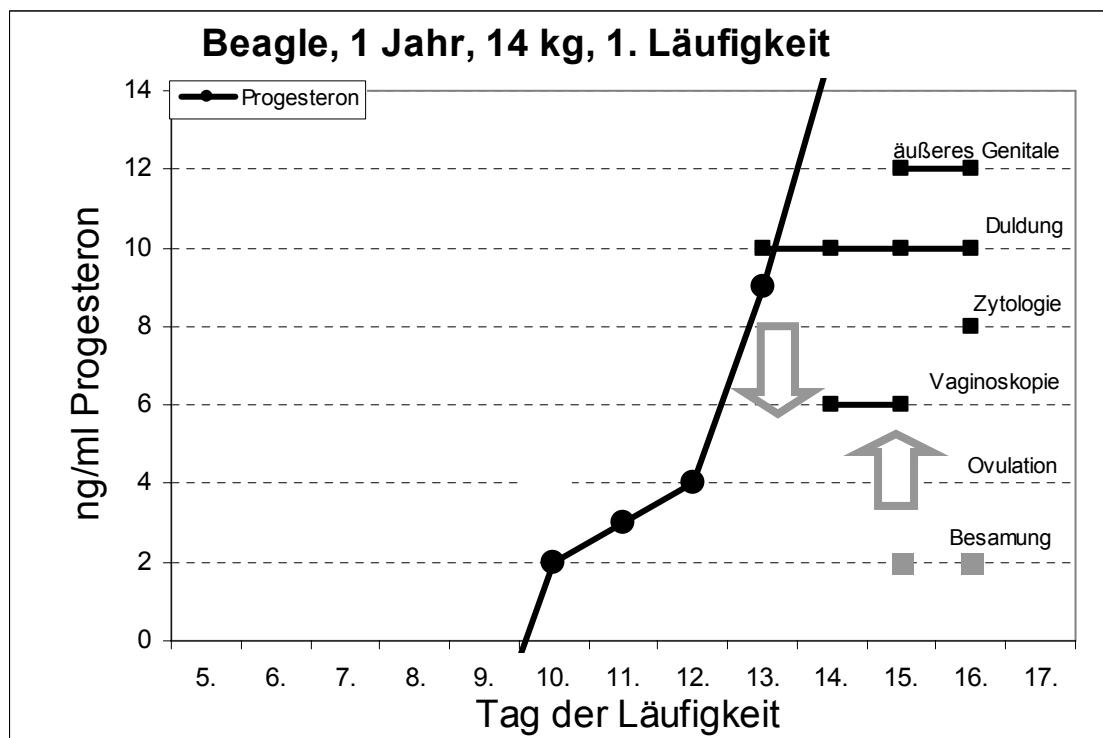


Abb. 25: Läufigkeitsinduktion mit Cabergolin über 28 Tage

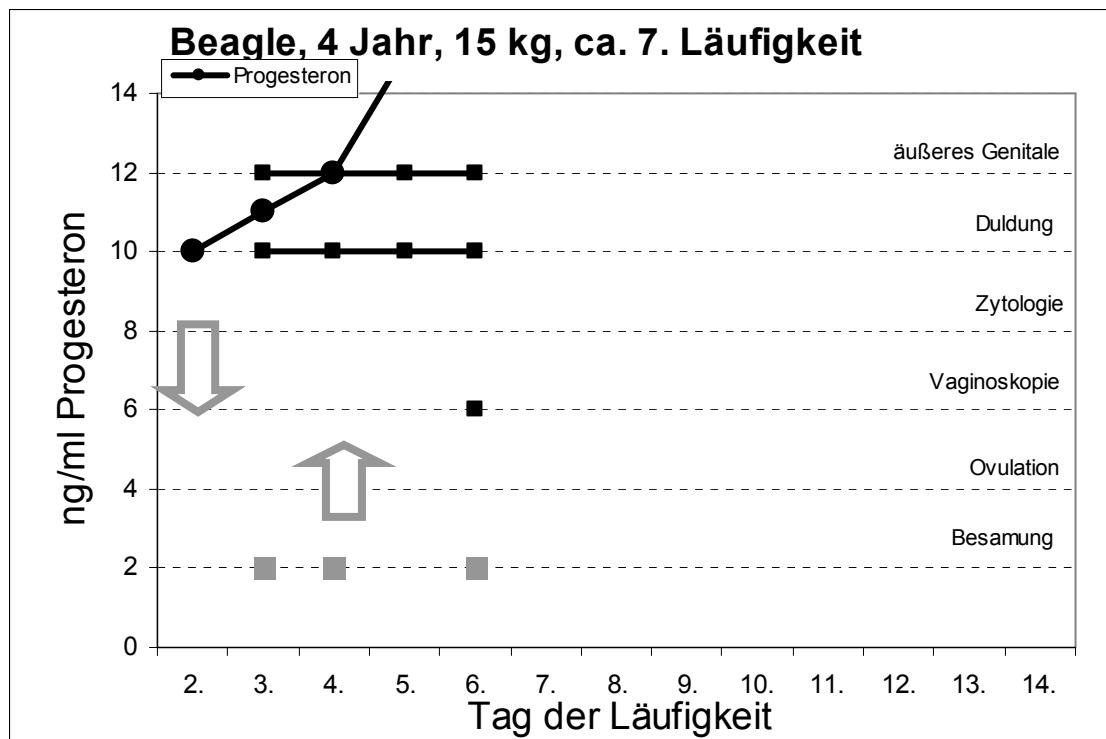


Abb. 26: Läufigkeitsinduktion mit Deslorelin-Implantat über 6 Tage

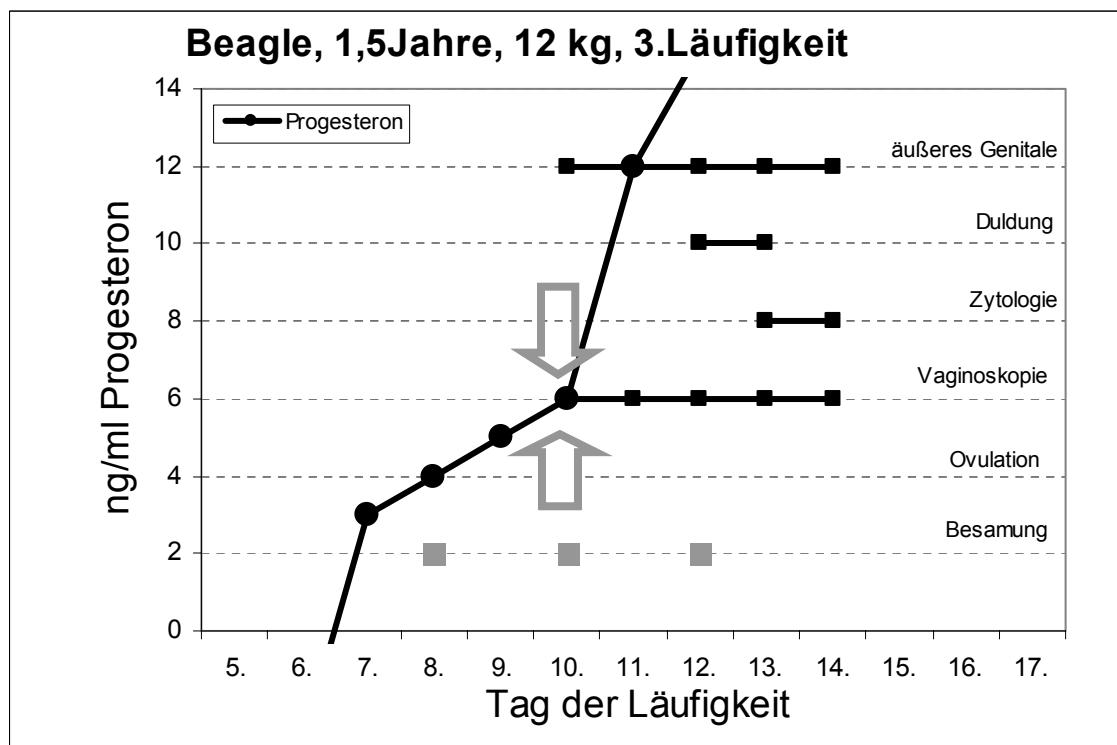


Abb. 27: Läufigkeitsinduktion mit Deslorelin-Implantat über 5 Tage

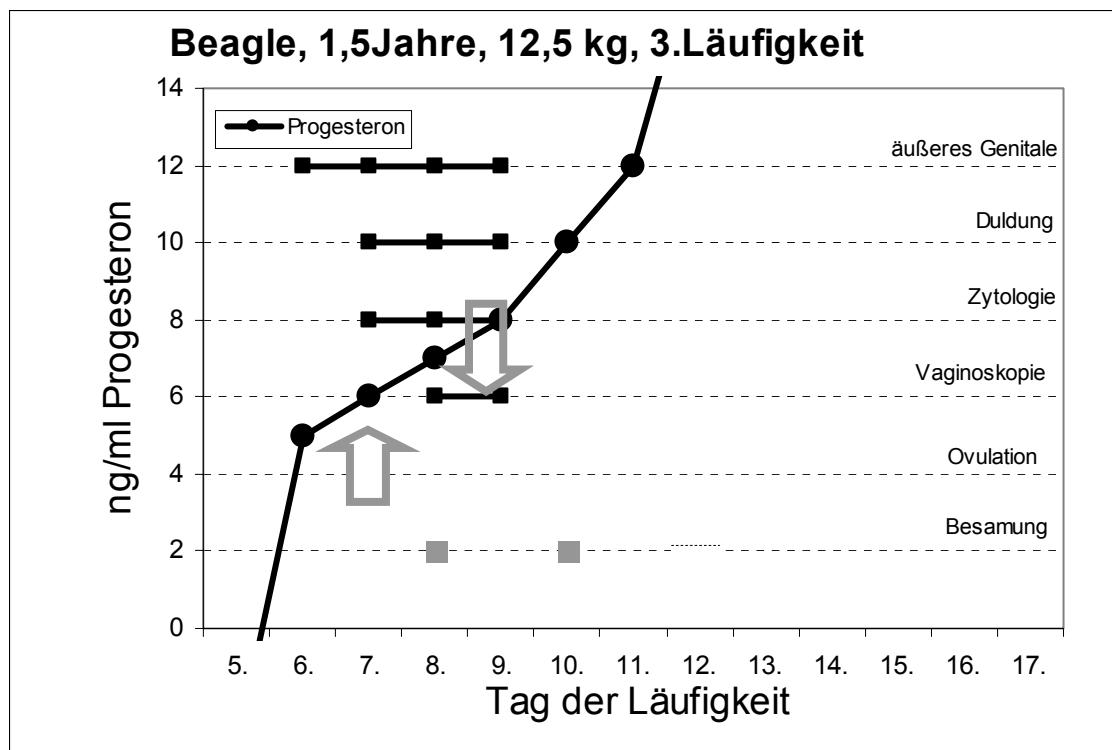


Abb. 28: Läufigkeitsinduktion mit Deslorelin-Implantat über 5 Tage

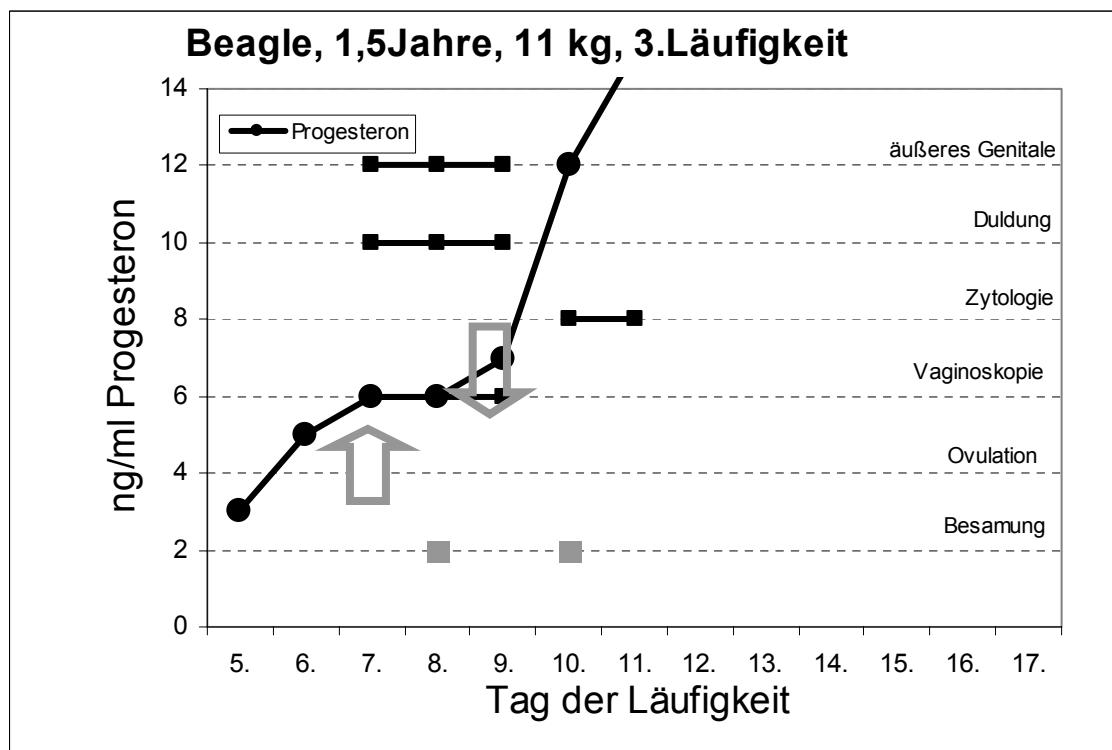


Abb. 29: Läufigkeitsinduktion mit Deslorelin-Implantat über 5 Tage

#### 4.1.4 Kombination mehrerer Ovulationskriterien

Bei den einzelnen Hündinnen wurden über unterschiedlich viele Tage hinweg mehrere Ovulationskriterien gleichzeitig erfüllt. Am häufigsten wurden 3 Kriterien gleichzeitig erfüllt. Bei einer Hündin wurden sogar über 4 Tage 3 Kriterien erfüllt. Mit dem geringsten prozentualen Anteil wurden alle 5 Ovulationskriterien erfüllt. Nur bei 3 Hündinnen war dies der Fall, und bei jeder dieser Hündinnen auch immer nur für einen Tag.

Nur bei 17,2% der Hündinnen war die Ovulation durch Kombination der verschiedenen Parameter eindeutig auf einen Tag festzulegen. Dies waren die Hündinnen in den Abbildungen 2, 16, 20, 23 und 24. Bei den Hündinnen in Abbildung 3, 6, 11, 12, 14, 21, 22, 25 und 26 kamen für die Ovulation 2 Tage in Frage, was mit 31,0% den größten prozentualen Anteil ergab. Die Hündinnen, bei denen man sich zwischen 3 beziehungsweise 4 Tagen entscheiden musste, machten jeweils einen prozentualen Anteil von 24,1% aus. Bei den Hündinnen in Abbildung 1, 5, 7, 13, 17, 28 und 29 war die Ovulation an 3 Tagen möglich. Bei den Hündinnen in Abbildung 4, 8, 9, 10, 18, 19 und 27 waren sogar 4 Tage möglich. Bei der Hündin in Abbildung 15 war über den gesamten Untersuchungszeitraum kein Ovulationstermin zu bestimmen, da bei ihr nur 2 der 5 Ovulationskriterien gleichzeitig erfüllt wurden. Bei allen Hündinnen, bei denen die Ovulation an mehreren Tagen stattfinden konnte, wurde der frühest mögliche Termin als Ovulationszeitpunkt festgelegt (Tab. 2).

Tab. 2: Anzahl der möglichen Ovulationstage, wenn mindestens 3 Kriterien zur Festlegung der Ovulation erfüllt sein müssen.

Anzahl der möglichen Ovulationstage	Anzahl der Hunde	Prozentualer Anteil
1 Tag	5	17,2%
2 Tage	9	31,0%
3 Tage	7	24,1%
4 Tage	7	24,1%
kein Tag	1	3,4%

Tab. 3: Erfüllung der Ovulationskriterien durch die klinischen Parameter in dem Zeitraum von 3 Tage vor bis 3 Tage nach der Ovulation (Tag 0), die auf Grund des Progesteronverlaufs festgelegt wurde.

klinische Parameter	Tage vor und nach der Ovulation (Tag 0)						
	-3	-2	-1	0	1	2	3
<b>äußeres Genitale</b>	6,8%	23,8%	37,4%	57,8%	68%	61,2%	34%
<b>Vaginoskopie</b>	3,4%	10,2%	20,4%	44,2%	57,8%	68%	37,4%
<b>Vaginalzytologie</b>	0%	3,4%	6,8%	30,6%	40,8%	20,7%	27,2%
<b>Duldung</b>	3,4%	27,2%	40,8%	54,4%	57,8%	51%	37,4%

Die klinischen Parameter entsprachen unterschiedlich häufig am Tag der Ovulation (Tag 0), festgelegt auf Grund des Progesteronverlaufes, bzw. einige Tage vor oder nach dieser Ovulation, den jeweiligen Ovulationskriterien. Generell waren die klinischen Parameter nach der Ovulation (Tag 1 und 2) häufiger im Sinne der Ovulationskriterien verändert als am Tag der Ovulation. Die Befunde der Vaginoskopie entsprachen mit 68% sogar erst 2 Tage nach der Ovulation am häufigsten den Ovulationskriterien (s. Tab. 3).

Wenn der Ovulationszeitpunkt auf Grund der Kombination der Ovulationskriterien festgelegt wurde, fiel dieser in 12 Fällen auf denselben Tag wie bei Benutzung des Progesteronanstiegs als Kriterium. In je 7 Fällen lagen sie 1 Tag bzw. 2 Tage auseinander. In einem Fall lagen die Ovulationszeitpunkte 3 Tage auseinander und in einem Fall sogar 4 Tage (Abb. 19 und 20). Bei einer Hündin konnten die Ovulationszeitpunkte nicht verglichen werden, da bei ihr kein Ovulationszeitpunkt durch Kombination der verschiedenen Parameter festgelegt werden konnte (Abb. 15).

## 4.2 Embryogewinnung

### 4.2.1 Trächtigkeitsrate

Bei 23 von insgesamt 29 Hündinnen konnte mindestens ein Embryo gewonnen werden. Dies ergibt eine Trächtigkeitsrate von 79,3%.

Von den 7 läufigkeitsinduzierten Hündinnen waren 6 trächtig (Trächtigkeitsrate 85,7%).

### 4.2.2 Embryorate und Wiederfindungsrate

Insgesamt konnten 101 Embryonen im physiologischen Entwicklungsstadium bei den 23 Hündinnen gewonnen werden. Es wurden zwischen 1 und 10 Embryonen bei den einzelnen Hündinnen gezählt. Im Durchschnitt konnten somit 4,4 Embryonen pro Hündin gewonnen werden.

Neben normal entwickelten Embryonen wurden 21 retardierte Embryonen und unbefruchtete Eizellen gefunden. Unter den retardierten Embryonen waren ausschließlich solche, deren Morphologie einem Zwei-, Drei- oder Vierzeller entsprach. Außerdem wurden bei 3 Hündinnen leere Zonae pellucidae gewonnen (Tab. 4 Z.p.)

Unter den 23 trächtigen Hündinnen waren 15 Hündinnen bei denen ausschließlich Embryonen im physiologischen Entwicklungsstadium gefunden wurden. Unter ihnen waren 4, bei denen die Anzahl der gezählten Gelbkörper der Anzahl der Embryonen entsprach, was eine Embryorate von 100% bedeutet. Bei 8 Hündinnen wurden neben physiologisch entwickelten Embryonen auch unbefruchtete Eizellen und retardierte Embryonen gewonnen. Bei 2 Hündinnen kamen neben Embryonen auch mehrere Zonae pellucidae vor. Bei einer Hündin wurden sogar nur Zonae pellucidae gefunden. Eine Zona pellucida wurden nicht als Embryo angesehen, wurde jedoch bei der Wiederfindungsrate berücksichtigt. Die Embryorate schwankte zwischen 0% und 100%. Bei den restlichen 3 Hündinnen wurden nur unbefruchtete Eizellen und retardierte Embryonen gewonnen. Die Wiederfindungsrate schwankte zwischen 36% und 100% (Mittel 77%), wobei in sechs Fällen 100% erreicht wurden.

In der folgenden Tabelle (Tab. 4) sind nur die trächtigen Hündinnen aufgeführt, da bei den nichtträchtigen Hündinnen weder Embryonalstadien noch unbefruchtete Eizellen gefunden wurden.

Tab.4: Anzahl der Corpora lutea, der gewonnenen Embryonen, Eizellen und Zona pellucida (Z.p.) mit Wiederfindungsrate aller trächtigen Hunde, sowie der Anteil Embryonen (Cl/Embryo) und die Wiederfindungsrate (Embryo+Eizelle/Cl). Die Nummern der Hunde entsprechen den Abbildungen.

Hund	Anzahl Corpora lutea	Anzahl Embryonen Anteil %	Eizellen/ retardierte Embryonen	Wiederfin- dungsrate in %
<b>1</b>	8	8 (100)	-	100
<b>3</b>	10	6 (60)	-	60
<b>4</b>	7	7 (100)	-	100
<b>5</b>	11	10 (90,9)	1	100
<b>6</b>	3	2 (66,7)	-	66,7
<b>8</b>	12	4 (33,3)	5 Z.p.	75
<b>9</b>	4	2 (50)	2	100
<b>10</b>	7	5 (71,4)	-	71,4
<b>11</b>	10	9 (90)	-	90
<b>12</b>	11	4 (36,4)	3	63,6
<b>13</b>	9	4 (44,4)	3	77,8
<b>14</b>	10	8 (80)	-	80
<b>15</b>	16	(0)	13 Z.p.	81,2
<b>16</b>	3	(0)	3	100
<b>17</b>	11	(0)	4	36,4
<b>18</b>	12	2 (16,7)	8 Z.p.	83,3
<b>20</b>	5	3 (60)	-	60
<b>23</b>	7	6 (85,7)	-	85,7
<b>24</b>	7	7 (100)	-	100
<b>25</b>	9	7 (77,8)	-	77,8
<b>26</b>	7	4 (57,1)	1	71,4
<b>28</b>	3	3 (100)	-	100
<b>29</b>	8	(0)	6	75

#### 4.2.3 Anzahl der Corpora lutea

Bei den 29 Hündinnen im Versuch wurden insgesamt 245 Gelbkörper gezählt (Tab. 4). Bei den einzelnen Hündinnen schwankte die Anzahl zwischen 3 und 16 Corpora lutea. Im Durchschnitt wurden 8,4 Corpora lutea pro Hündin gezählt.

Abbildung 31 zeigt den Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl der Gelbkörper auf beiden Ovarien und des Körpergewichts in Kilogramm. Es ließ sich erkennen, dass mit zunehmendem Körpergewicht die Gelbkörperanzahl stieg. Die Hündinnen unter 10 Kilogramm Körpergewicht hatten zum Beispiel nur bis zu 4 Gelbkörper auf den Ovarien, wohingegen die Hündin mit über 50 Kilogramm Körpergewicht 16 Gelbkörper hatte.

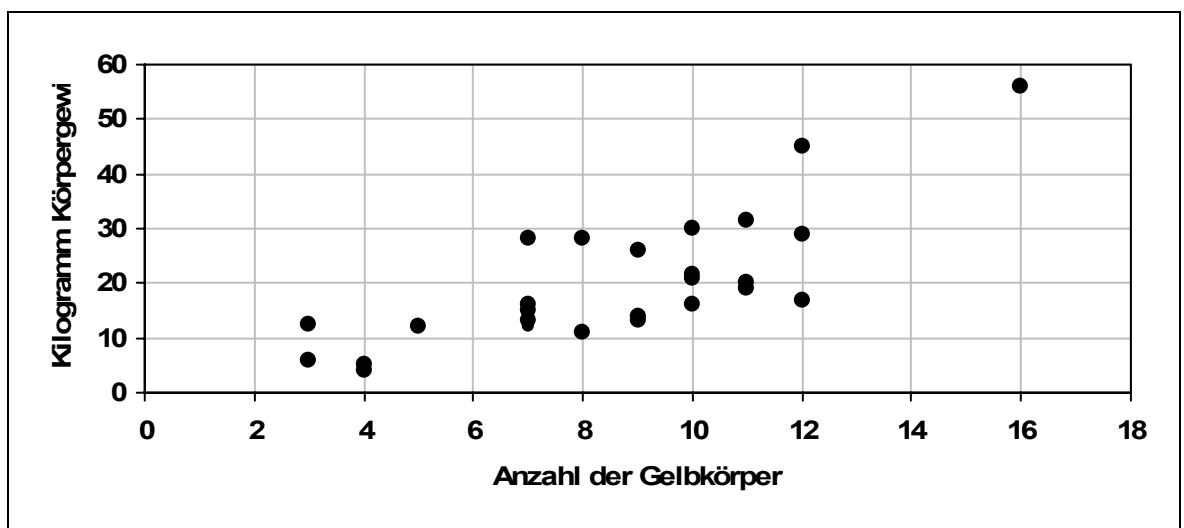


Abb. 31: Anzahl der Gelbkörper im Bezug auf die Körpermasse der Hündinnen.

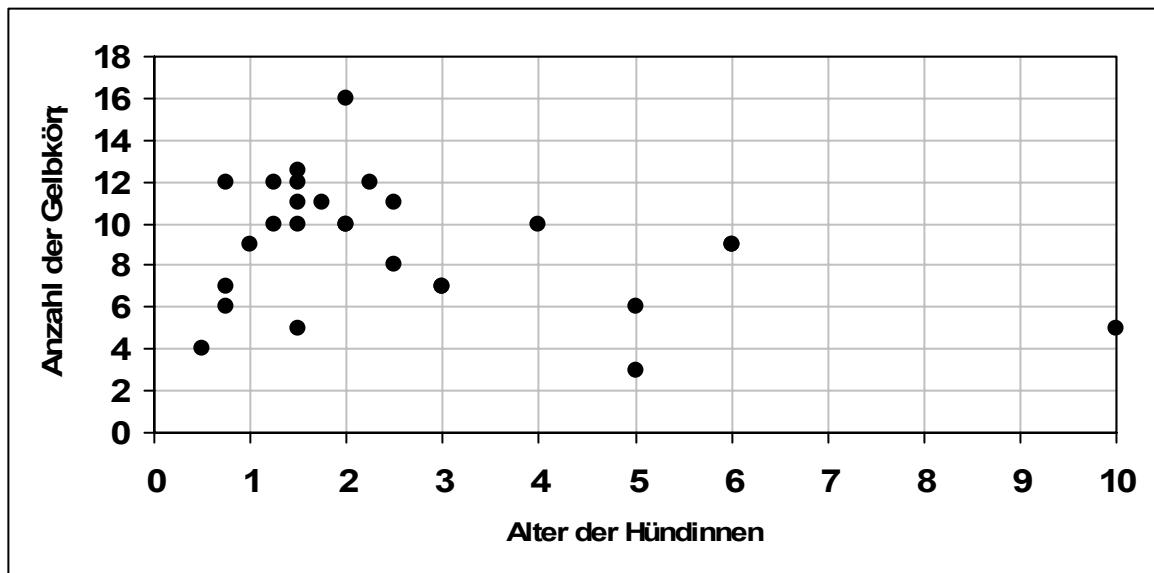


Abb. 32: Anzahl der Gelbkörper im Bezug auf das Alter der Hündinnen.

In Abbildung 32 ist das Alter der Hündinnen in Bezug auf die Gesamtzahl der Corpora lutea beider Ovarien gesetzt. Hier konnte keine deutliche Tendenz erkannt werden.

#### 4.2.4 Anzahl der Embryonen

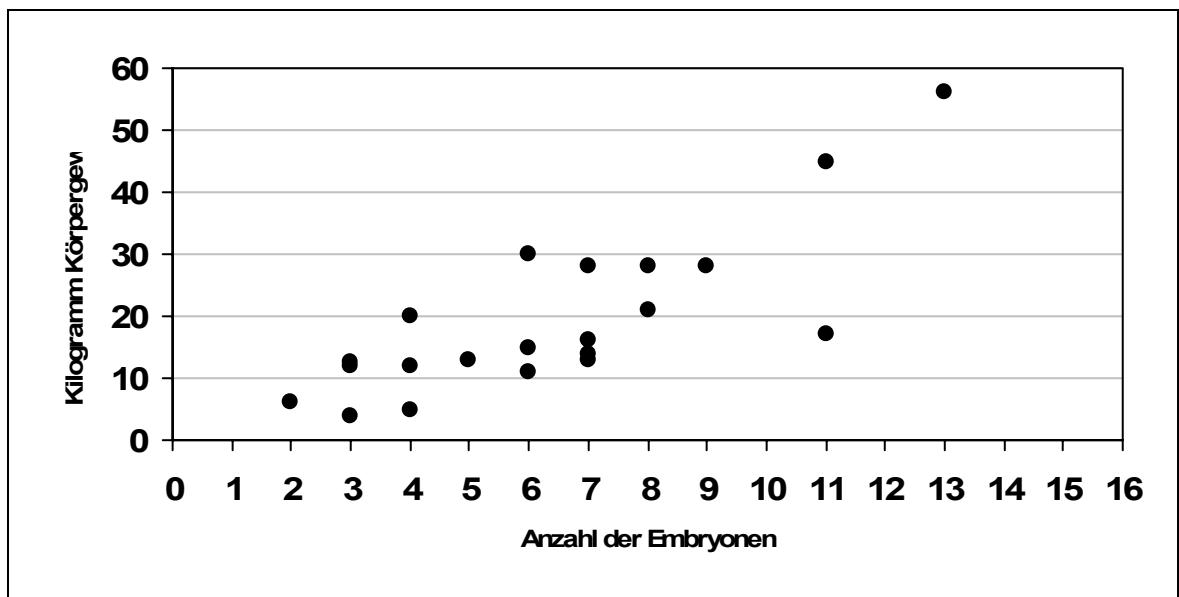


Abb. 30: Anzahl der gewonnenen Embryonen im Bezug auf die Körpermasse der Hündinnen.

Abbildung 30 zeigt den Zusammenhang zwischen der Anzahl der gewonnenen Embryonen im Bezug auf das Körpergewicht der Hündinnen. Es ließ sich eine Tendenz erkennen, dass je schwerer die Hündin ist, desto mehr Embryonen gewonnen werden konnten.

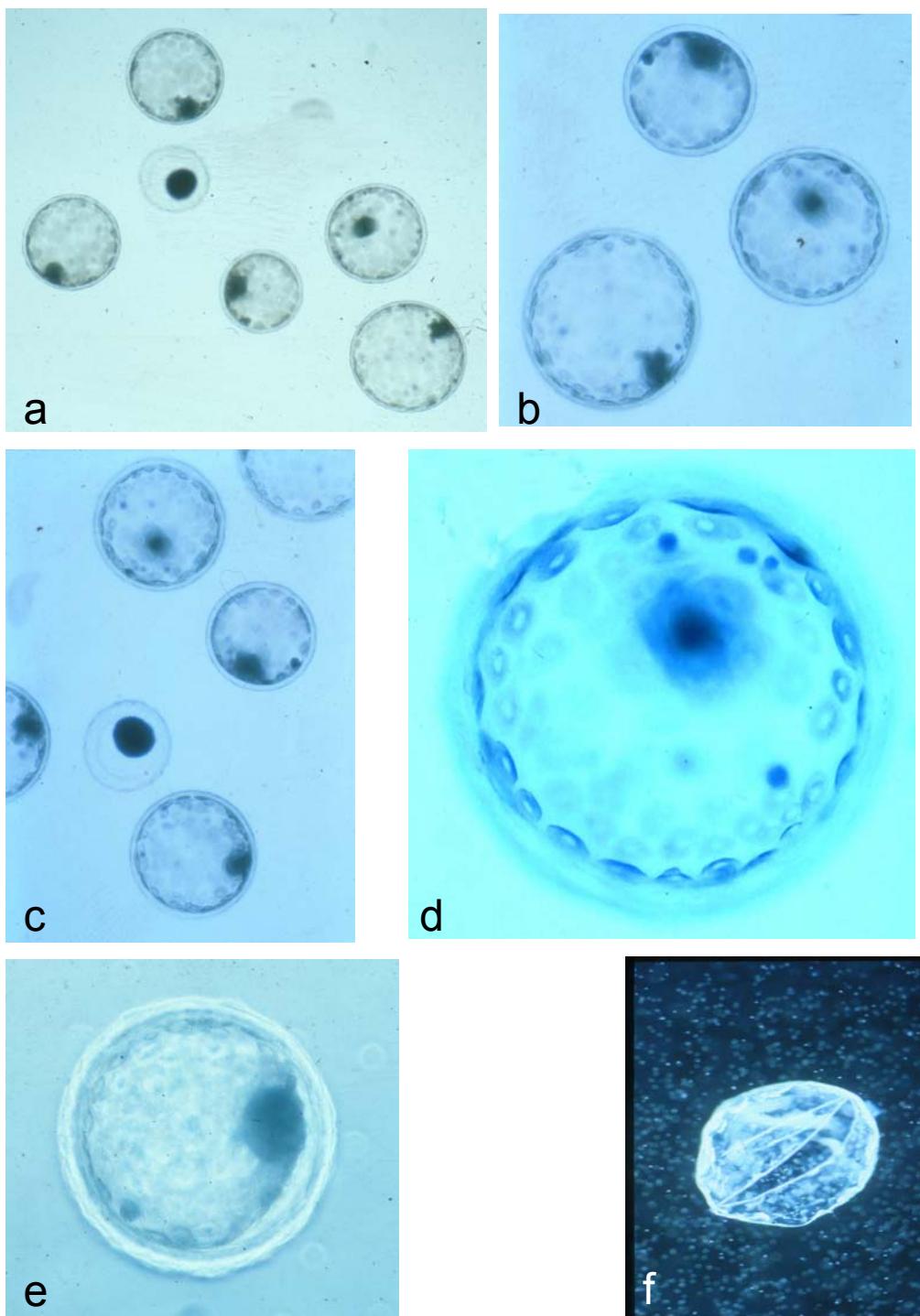
#### 4.2.5 Entwicklungsstadien der gewonnenen Embryonen

In Tabelle 5 sind die frühen Embryonalstadien aufgelistet, die zwischen dem 10. und dem 17. Tag nach der Ovulation gewonnen werden konnten. Am 9. Tag nach der Ovulation wurden nur Morulae gewonnen. Ab dem 15. Tag konnten nur noch Blastocysten gewonnen werden und ab dem 16. Tag nur expandierte Blastocysten (s. Abbildungen unter 8.3). An Tag 15, 16 und 17 nach der Ovulation fand man neben den Blastocysten auch leere Zonae pellucidae und einen geschlüpften Embryo. Neben Embryonen im erwarteten physiologischen Entwicklungsstadium wurden auch unbefruchtete Eizellen, Zwei-, Drei- und Vierzeller gefunden, die sich vermutlich nicht weiterentwickelt haben.

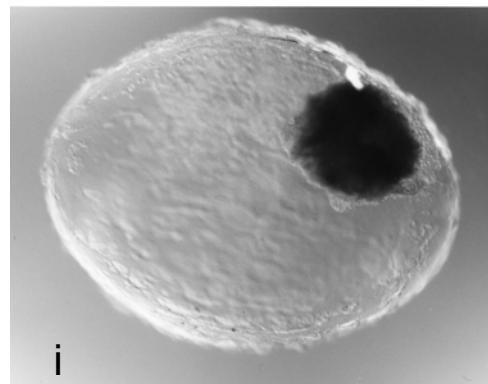
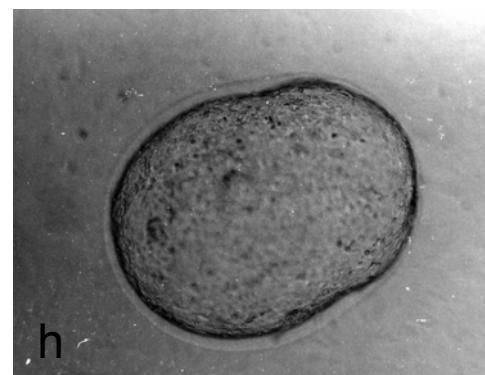
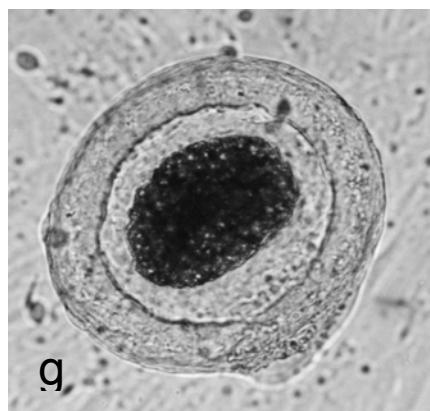
Tab. 5: Entwicklungsstadien der Embryonen im Bezug auf den Ovulationszeitpunkt.

<b>Tag nach der Ovulation</b>	<b>Morulae</b>	<b>Blastocysten</b>	<b>expandierte Blastocysten</b>	<b>Sonstiges</b>
<b>10.</b>	-	-	-	1 Zweizeller 2 unbefruchtete Eizellen
<b>11.</b>	9	-	-	-
<b>12.</b>	2	18	6	7 Zweizeller 1 Vierzeller 1 unbefruchtete Eizelle
<b>13.</b>	-	13	-	1 unbefruchtete Eizelle
<b>14.</b>	3	23	9	1 unbefruchtete Eizelle
<b>15.</b>	-	11	-	13 leere Zonae pellucidae
<b>16.</b>	-	-	4	5 leere Zonae pellucidae 1 geschlüpfter Embryo 3 unbefruchtete Eizellen 1 Zweizeller, 5 Dreizeller
<b>17.</b>	-	-	2	9 leere Zonae pellucidae

### 4.3 Morphologie der Embryonen



a: 5 Embryonen und eine unbefruchtete Eizelle 12 Tage nach der Ovulation, Objektiv 20x; b: 3 Embryonen 12 Tage nach der Ovulation, Objektiv 20x; c: 3 Embryonen und 1 unbefruchtete Eizelle 12 Tage nach der Ovulation, Objektiv 20x; d: 1 Embryo 12 Tage nach der Ovulation; Objektiv 32x e: 1 Embryo 15 Tage nach der Ovulation, Objektiv 20x; f: Zona pellucida 17 Tage nach der Ovulation, Objektiv 20x



g: unbefruchtete Eizelle Tag 12 nach der Ovulation, Objektiv 32x; h-l: Embryo 16 Tage nach der Ovulation, Objektiv 10x; i: kollabiert in der Zona pellucida

## 5 Diskussion

Die fröhembryonale Entwicklung beim Hund ist bisher kaum untersucht. Dies liegt auch daran, dass es bisher, etwa wie beim Rind oder anderen Haustierarten, nicht möglich ist, Embryonen durch In-vitro-Reifung und -Befruchtung und anschließender Kultivierung zu erzeugen. Nur in Ausnahmefällen war es bisher beim Hund möglich, konstant hohe Reifungsraten zur Metaphase II zu erzielen (BOGLIOLI et al. 2002; Songsasen et al., 2002, 2005). In den meisten Fällen werden jedoch sehr niedrige Reifungsraten von maximal 14% erzielt (RODRIGUES et al. 2004; LUVONI et al. 2001; FUJII et al. 2000), so dass nach der In-vitro-Fertilisation nur in einem Fall die Entwicklung eines Embryos bis zur Blastocyste gelang (OTOI et al. 2000). Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen eines größeren Projektes, in dem aus embryonalen Stammzellen beim Hund hämatopoetische Stammzellen differenziert werden sollen.

In der vorliegenden Arbeit standen 29 Hunde für die Embryogewinnung zur Verfügung. Um das Entwicklungsstadium der Embryonen möglichst genau festlegen zu können, benötigt man exakte Kenntnisse über den Ovulationszeitpunkt. In anderen Arbeiten wurde als Bezugspunkt zum Beispiel der Deckakt (Holst und Phemister 1971) oder der LH-Gipfel (Concannon et al. 2001) verwendet. Um die Ovulation als Bezugspunkt nutzen zu können, ist eine möglichst exakte Einschätzung erforderlich. Kompliziert wird dieses Vorhaben auch durch die Tatsache, dass die Länge oder die Variabilität der Zeitspanne für die Ovulation von mehreren Eizellen bisher nicht bekannt ist. Des Weiteren ist beim Hund die Ovulation nicht mit dem Zeitpunkt der Befruchtung identisch (Holst und Phemister 1971).

Zur Bestimmung der Ovulation stehen beim Hund verschiedene Verfahren zur Verfügung. Zu den klinischen Untersuchungsmethoden zählen die Beurteilung der Duldung der Hündin, die Beurteilung des äußeren Genitales, die vaginoskopische Untersuchung und die Vaginalzytologie. Reynaud et al. (2005) haben die

Ultraschalluntersuchung am Ovar zur Festlegung des Ovulationszeitraums benutzt. Außerdem kann man durch Hormonbestimmungen Anhaltspunkte über den Ovulationszeitpunkt gewinnen. Während die Bestimmung der präovulatorischen LH-Ausschüttung wegen der aufwändigen Methodik nur selten benutzt wurde (CONCANNON et al. 2001), ist die Bestimmung des Progesteronanstieges auch für klinische Zwecke inzwischen ein Routineverfahren (Günzel-Apel 1990). In der vorliegenden Arbeit wurde der Ovulationszeitpunkt zum einen anhand des Progesteronverlaufs festgelegt und zum anderen wurden 4 klinische Untersuchungsmethoden eingesetzt, um den Ovulationszeitraum möglichst genau zu bestimmen.

Die Festlegung der Ovulation durch Kombination von Progesteron mit den klinischen Parametern stellte sich teilweise als schwierig dar, da mit Ausnahme des Parameters Progesteron, nicht immer alle Parameter einen typischen Verlauf hatten. Trotzdem deckten sich der retrospektiv über den Progesteronverlauf festgelegte Ovulationszeitpunkt und der durch Kombination mehrere klinischer Verfahren ermittelte Zeitpunkt (Tag) in fast der Hälfte der Fälle. Nur in 2 Fällen lagen die Ergebnisse mehr als 2 Tage auseinander. Dies zeigt, dass bei standardisierter und sorgfältiger Anwendung klinischer Untersuchungstechniken, diese eine zufriedenstellende Genauigkeit aufweisen können.

Nach einer Läufigkeitsinduktion kann ein verkürzter Proöstrus auftreten (CHAFFAUX et al. 1984). Dies war auch in der vorliegenden Arbeit der Fall. Bei 2 Hündinnen fand die Ovulation schon am 8. Tag der vaginalen Blutung statt, bei einer Hündin sogar am 3. Tag. In der vorliegenden Arbeit zeigten aber alle läufigkeitsinduzierten Hündinnen einen normalen Progesteronverlauf. Dies bedeutet, dass bei allen Hündinnen eine Ovulation erfolgte und die Gelbkörper im ausreichenden Maße Progesteron produzierten, zumindest bis zum Tag der Ovariohysterektomie. In anderen Arbeiten blieb teilweise nach Läufigkeitsinduktion die Ovulation aus, oder die Gelbkörper produzierten nur geringe Progesteronkonzentrationen, weshalb es zu keiner Aufrechterhaltung der Trächtigkeit kam (ARNOLD et al. 1989; CHAFFAUX et al. 1984).

In dieser Arbeit wurden im Durchschnitt 8,4 Corpora lutea pro Hündin gezählt.

Dies entspricht in etwa der Arbeit von Reynaud et al. (2005), die durchschnittlich  $7,9 \pm 0,6$  Corpora lutea pro Hündin fanden. Es zeigte sich eine deutliche Beziehung zwischen Körpergewicht und Zahl der Ovulationen (Corpora lutea). Dies konnte auch schon in früheren Arbeiten beobachtet werden (Feldman und Nelson 2004). Allerdings konnte die Aussage, dass bei mittelalten Hunden mehr Eizellen ovulieren als bei sehr jungen oder sehr alten (Feldman und Nelson 2004) nicht bestätigt werden. In dieser Arbeit waren die meisten Hunde zwischen 8 Monate und 3 Jahre alt und in dieser Altersklasse konnte kein Unterschied in der Anzahl der Embryonen oder der Anzahl der Gelbkörper festgestellt werden. Auch Reynaud et al. (2005) konnten keinen signifikanten Einfluss des Alters der Hündinnen auf die Zahl der Gelbkörper finden.

Die Trächtigkeitsrate lag in dieser Arbeit bei 79,3%. Dies entspricht anderen Arbeiten, bei denen die Hündinnen ebenfalls mit Frischsperma besamt wurden (Silva et al. 1996; Farstad 1984; Tsutsui et al. 1988). Die Hündinnen wurden in dieser Arbeit mindestens zweimal besamt. In früheren Arbeiten (Linde-Forsberg und Forsberg 1993) konnten durch Doppelbesamungen signifikant höhere Trächtigkeitsraten als nach einmaliger KB erzielt werden. Die durchschnittliche Zahl von 4,4 ausgespülten Embryonen mit physiologischer Entwicklung bedeutet, dass etwa die Hälfte der ovulierten Eizellen befruchtet wurde und eine physiologische Embryonalentwicklung, zumindest bis zum Tag 12 bis 17 post ovulationem stattfand. Dies könnte darauf hinweisen, dass doch bei einigen Hunden der Besamungszeitpunkt nicht optimal gewählt worden war. Andererseits könnte dies auch durch ein in dieser Hinsicht eingeschränktes Befruchtungsvermögen bei den verwendeten Rüden bedingt sein.

Die Trächtigkeitsrate bei den läufigkeitsinduzierten Hündinnen lag bei 85,7%. Auch andere Autoren erreichten nach Läufigkeitsinduktion mit Prolaktinantagonisten Trächtigkeitsraten von 80% (VERSTEGEN et al. 1999; Zöldag et al. 2001), während nach Läufigkeitsinduktion mit Deslorelinimplantaten nur Trächtigkeitsraten von 33,3% erreicht wurden (TRIGG et al. 2001). Das eigene Zahlenmaterial ist hier jedoch zu klein, um fundierte Vergleiche anstellen zu können. Frühere Versuche zur Läufigkeitsinduktion mit FSH oder eCG brachten sehr niedrige Trächtigkeitsraten (BOUCHARD et al. 1991; NAKAO et al. 1985;

ARNOLD et al. 1989).

Für die Embryogewinnung wurde in der vorliegenden Arbeit der Uterus nach Ovariohysterektomie gespült. Nach demselben Verfahren gewann auch Kinney (1977) Embryonen. Eine andere Methode, bei der die Embryonen über einen Foley-Katheter aus dem Uterus *in situ* gespült wurden wurde von ARCHBALD et al. (1980) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde im Vergleich zu früheren Arbeiten (Bysted et al. 2001; Renton et al. 1991) eine hohe Wiederfindungsrate erzielt. Im Schnitt wurden in der eigenen Arbeit 6,5 Eizellen/Embryonen ausgespült. Die Wiederfindungsrate variierte zwischen 36,4% und 100% und betrug im Durchschnitt 80,7%. Eine Wiederfindungsrate von über 100% kann dann vorkommen, wenn aus einem Follikel mehrere Eizellen ovulieren. Das Vorkommen so genannter polyovularer Follikel wurde zum Beispiel von Bysted et al. (2001) bestätigt. Auch in der Studie von Reynaud et al. (2005), in der zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Ovulation bei einzelnen Tieren die Zahl der Eizellen/Embryonen die Zahl der Corpora lutea übertraf, variierte die Wiederfindungsrate bei den einzelnen Hündinnen zwischen 0% und 150%, was durch Ovulation mehrerer Eizellen aus einem Follikel erklärt werden könnte. Diese Autoren erwähnen aber auch, dass eventuell in manchen Fällen die Zahl der Corpora lutea durch Beobachtung der Ovaroberfläche unterschätzt werden kann und so eine scheinbare Diskrepanz zwischen Corpora lutea und Zahl der gespülten Eizellen/Embryonen auftreten kann.

Die durchschnittliche Anzahl von ausgespülten, vollentwickelten Embryonen bei den trächtigen Hündinnen betrug in der vorliegenden Arbeit 4,4 Embryonen. Der durchschnittliche Anteil voll entwickelter Embryonen an der Gesamtzahl der Corpora lutea einer Hündin lag mit 57,4% etwas über der durchschnittlichen Embryorate früherer Arbeiten (Bysted et al. 2001). Bei 2 Hündinnen wurden neben voll entwickelten Embryonen mit Zona pellucida noch zusätzliche Eihüllen (Zona pellucida) gefunden und in einem Fall 13 Zonae pellucidae ohne weitere Embryonen. Bei allen 3 Hündinnen lag der Zeitpunkt der Ovariohysterektomie mindestens am Tag 15 *post ovulationem*. Man kann annehmen, dass bereits geschlüpfte Embryonen beim Hund sehr fragil sind und durch den relativ hohen Druck bei der hier angewendeten Spülmethode zerstört wurden. Für eine

Gewinnung von Embryonen in diesem fortgeschrittenen Stadium müsste wohl eine schonendere Spülmethode entwickelt werden.

In früheren Arbeiten zur Gewinnung präimplantativer Embryonen beim Hund wurde das Entwicklungsstadium der Embryonen entweder auf den Deckakt (HOLST und PHEMISTER 1971), auf den LH-Gipfel (CONCANNON et al. 2001; BYSTED et al. 2001) oder, wie in der vorliegenden Arbeit, auf die Ovulation (TSUTSUI et al. 2001) bezogen. In der vorliegenden Arbeit wurden 11 Tage nach der Ovulation zum ersten Mal Morulae im Uterus gefunden. Tsutsui et al. (2001) konnten erst einen Tag später Morulae aus dem Uterus gewinnen. Concannon et al. (2001) und Bysted et al. (2001) konnten sogar schon 12 Tage nach dem LH-Gipfel (also am 10. Tag *post ov.*) Morulae im Uterus finden. Diese Unterschiede, die auf Beobachtungen an einzelnen Hunden beruhen, können durchaus durch einen unterschiedlichen Zeitpunkt der Entwicklung zur Metaphase II oder der Spermienpenetration beruhen. In der Arbeit von Reynaud et al. (2005) wurden Oozyten in Metaphase II von 54 bis 127 Stunden *post ov.* gefunden. Ebenso wurden nach der Befruchtung Embryonen im 2- bis 8-Zellstadium in einer Hündin beobachtet. Daher ist es auch durchaus vorstellbar, dass bei synchroner Entwicklung innerhalb einer Hündin beträchtliche Differenzen im Entwicklungsstand zwischen Embryonen vorkommen können. Die Beobachtung von Holst und Phemister (1971), die sogar schon ab dem 5. Tag nach dem Deckakt Morulae im Uterus fanden, dürfte auf der Tatsache beruhen, dass der Deckakt keine Aussage über den Zeitpunkt der Ovulation erlaubt. Der späteste Zeitpunkt zu dem noch Morulae im Uterus gefunden wurden, war in der vorliegenden Arbeit der 14. Tag nach der Ovulation. Blastocysten konnten dann ab dem 12. Tag und bis zum 16. Tag nach der Ovulation gefunden werden. Concannon et al. (2001) und Bysted et al. (2001) fanden schon ab dem 13. und bis zum 21. Tag nach dem LH-Gipfel Blastocysten. Bei Holst und Phemister (1971) werden sie vom 8. bis zum 20. Tag nach dem Deckakt aus dem Uterus gespült. In der vorliegenden Arbeit wurden die leeren Zonae pellucidae am 15., 16. und 17. Tag nach der Ovulation gewonnen. Dies entspricht dem Zeitraum von Concannon et al. (2001) der feststellte, dass die Embryonen vom 18. bis 19. Tag nach dem LH-Gipfel aus der Zona pellucida schlüpfen. Insgesamt scheint beim Hund eine exakte Vorhersage des Embryonalstadiums durch die relativ langsame

Embryonalentwicklung und die Unsicherheit bei der Bestimmung des Ovulationszeitpunkts mit einer Variabilität von mindestens  $\pm 1$  Tag schwierig zu sein.

Bei den trächtigen Hündinnen wurden neben Embryonen im physiologischen Entwicklungszustand auch Eizellen, retardierte Embryonen und leere Zonae pellucidae gefunden. Bei anderen Autoren wird dies nicht beschrieben. Bei 5 der 23 trächtigen Hündinnen waren unter anderem auch unbefruchtete Eizellen aus dem Uterus gespült wurden. Embryonalstadien die nicht dem erwarteten physiologischen Entwicklungszustand entsprachen waren Zwei-, Drei- oder Vierzeller am Tag 10 bis 17 post ovulationem. Solche retardierten Embryonen könnten entweder durch Parthenogenese entstanden sein oder die befruchteten Eizellen hatten sich nicht weiterentwickelt. Die Möglichkeit, dass der Ovulationszeitpunkt nicht korrekt bestimmt wurde ist bis auf einen Hund, bei dem ausschließlich Zwei- und Dreizeller gefunden wurden auszuschließen, da neben den retardierten Embryonen auch immer Embryonen im erwarteten physiologischen Entwicklungszustand gefunden wurden.

Das Phänomen, das bei keinem der nichträchtigen Hunde unbefruchtete Eizellen gefunden wurden, kann vorerst nicht erklärt werden. Beim Pferd ist ein Mechanismus bekannt, durch den die Embryonen aus dem Eileiter in den Uterus transportiert werden, während nicht befruchtete Eizellen im Eileiter verbleiben (Steffenhagen et al. 1972). Da in mehreren Fällen (bei 5 Hunden) unbefruchtete Eizellen zusammen mit Embryonen gefunden wurden, ist nicht davon auszugehen, dass solche Eizellen nicht im Zeitraum bis zur Embryogewinnung so stark degenerieren, dass sie in der Spülflüssigkeit nicht mehr gefunden werden.

Zusammenfassend kann aus diesen Untersuchungen gefolgert werden, dass durch eine klinische und hormonanalytische Untersuchung der Zeitpunkt der Ovulation und damit der optimale Zeitraum für die KB mit hinreichender Genauigkeit ermittelt werden kann. Bei Verwendung fertiler Rüden ist eine hohe Trächtigkeitsrate zu erzielen. Die Gewinnung der Embryonen durch Spülung am exzenterierten Uterus ist einfach, für die Gewinnung geschlüpfter Embryonen müssten aber schonendere Methoden angewendet werden. Die relativ langsam

ablaufende Embryonalentwicklung beim Hund mit mindestens 11 Tagen von der Befruchtung bis zum Schlüpfen der Blastocysten macht eine taggenaue Ansprache eines bestimmten Embryonalstadiums schwierig.

## 6 Zusammenfassung

Beim Hund liegen bisher nur sehr wenige Informationen zur frühembryonalen Entwicklung vor. Ziel dieser Arbeit war es, Embryonen eines definierten Entwicklungsstandes im Zeitraum von Tag 10 – 17 post ov. zu gewinnen.

Bei 29 Hunden verschiedener Rassen wurden durch klinische Untersuchungen (Dulding, äußeres Genitale, Vaginoskopie und Vaginalzytologie) und die Bestimmung der Progesteronkonzentration im Blutplasma der Ovulationszeitpunkt bestimmt. 22 Tieren waren in der spontanen Läufigkeit, bei 7 Tieren wurde die Läufigkeit induziert, entweder durch Applikation von 5 $\mu$ g/kg Cabergolin einmal täglich oral (3 Tiere) oder durch ein subkutanes Implantat eines GnRH-Agonisten (Deslorelin). Sobald die Hündinnen blutigen Vaginalausfluss zeigten wurde das Cabergolin abgesetzt bzw. das Deslorelinimplantat unter Lokalanästhesie entfernt. Alle Hündinnen wurden dann in der Regel täglich untersucht. Die Ovulation wurde zum einen durch die klinischen Untersuchungen und zum anderen retrospektiv durch den Progesteronverlauf festgelegt. Die Hündinnen wurden um den Ovulationszeitpunkt mindestens zweimal besamt oder gedeckt. Dafür wurden 2 Rüden mit bekannt guter Spermaqualität benutzt. Für die Besamung wurde Frischsperma verwendet, das intravaginal platziert wurde. Die Hündinnen wurden zwischen dem 10. und 17. Tag post ov. ovariohysterektomiert. Anschließend wurden beide Uterushörner gespült und die Spülflüssigkeit auf Embryonen untersucht. Zusätzlich wurden die Corpora lutea beider Ovarien gezählt.

Die durch unterschiedliche Methoden ermittelten Ovulationszeitpunkte waren in 12 Fällen identisch und lagen nur in 2 Fällen mehr als 2 Tage auseinander. Von den 29 Hündinnen wurden bei 23 Tieren mindestens ein Embryo gefunden (Trächtigkeitsrate 79,3%). Die Trächtigkeitsrate bei den 7 läufigkeitsinduzierten Hündinnen betrug 85,7%. Die Anzahl der Embryonen pro Hündin schwankte zwischen 1 und 10 (Mittel 4,4). Die Tiere hatten zwischen 3 und 16 Corpora lutea (Mittel 8,4). Die Embryorate (Befruchtungsrate) variierte bei den trächtigen Tieren

zwischen 0% und 100% und lag im Mittel bei 57,4%; die Wiederfindungsrate (Embryonen und Eizellen/Corpora lutea) schwankte zwischen 36,4% und 100% und lag im Durchschnitt bei 80,7%. Bei den nichtträchtigen Tieren wurden weder Embryonen noch Eizellen gefunden. Vom 11. bis zum 14. Tag post ov. wurden Morulae gemeinsam mit Blastocysten gefunden und ab dem 15. Tag nur Blastocysten. Bei 3 Tieren (Tag 15.-17. post ov.) wurden leere Eihüllen (Zona pellucida) gefunden, was auf ein Schlüpfen der Blastocysten hinwies.

Zur Gewinnung spezifischer Embryonalstadien beim Hund ist eine genaue Ansprache des Ovulationszeitpunktes wichtig. Bei Verwendung fertiler Rüden ist eine hohe Trächtigkeitsrate zu erzielen. Die Spülung des Uterus nach Ovariohysterektomie ergibt hohe Wiederfindungsraten. Für die Gewinnung geschlüpfter Embryonen müssten andere Spülmethoden angewendet werden. Die relativ langsame ablaufende Embryonalentwicklung beim Hund mit mindestens 11 Tagen von der Befruchtung bis zum Schlüpfen der Blastocysten macht eine taggenaue Ansprache eines bestimmten Embryonalstadiums schwierig.

## 7 Summary

### Embryo recovery in the bitch

Very little information is available on the early embryonic development in the dog. The aim of this study was to recover and examine embryos during a time span from 10 to 17 days post ovulation.

Ovulation was determined in 29 dogs by clinical signs (standing heat, outer genitalia, vaginoscopy and vaginal cytology) and progesterone concentration in blood plasma. 22 dogs had come spontaneously into heat; oestrus had been induced in 7 dogs by daily oral administration of Cabergolin 5 µg/kg or a subcutaneous implant of a GnRH-agonist (Deslorelin). On the day of the first serosanguineous vaginal discharge, medication was stopped or the implant was removed. The animals were then examined daily and ovulation was determined on the basis of clinical signs as well as according to a rise of the progesterone concentration. Two dogs were used throughout the study for either intravaginal insemination of freshly recovered semen or natural mating around the estimated time of ovulation (minimum 2, maximum 3). Animals were subjected to ovariohysterectomy under general anaesthesia between day 10 through 17 post ovulation. The uterine horns were flushed with up to 20 ml of PBS and embryos were searched under a dissecting microscope. The number of corpora lutea present on the ovaries were counted.

The estimated day of ovulation was identical in 12 animals when the day of a rising progesterone concentration or the appearance of typical clinical signs were used as indicator for ovulation. In two cases the estimated day of ovulation was different by more than two days. In 23 out of the 29 animals at least 1 embryo could be recovered (pregnancy rate 79.3 %). The pregnancy rate in the bitches with induced heat was 85.7%. The average number of embryos recovered per bitch was 4.4 (range 1 to 10). The average number of corpora lutea was 8.4 (range 3 to 16). The mean fertilization rate (embryos/corpora lutea) was 57.4 %

(range 0% to 100 %). The recovery rate (embryos and oocytes/ corpora lutea) was 80.7 % (36.4% to 100%). In the 6 non-pregnant animals neither embryos nor oocytes could be found. Embryos in the stage of morula (along with early blastocysts) were detected on day 11 – 14. From day 15 after ovulation only blastocysts were found. In 3 animals (day 15 to 17 post ovulation) one or several empty zona pellucida but no hatched blastocysts were detected.

To recover embryos of a specific developmental stage in the bitch it is important to closely monitor the day of ovulation. A high pregnancy rate can be achieved when fertile dogs are used for natural mating and/or insemination. The flushing of the uterine horns after ovariohysterectomy provides a high recovery rate. Recovery of hatched blastocysts may require a modified flushing procedure. The results demonstrate that it takes at least 11 days from fertilization to hatching for canine embryos. This may complicate the recovery of a specific embryonic stage in a particular bitch.

## 8 Literaturverzeichnis

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

Andersen K (1975): Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg, pp1-4

Archbald LF, Baker BA, Clooney LL, Godke RA (1980): A surgical method for collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotropins. Vet Med Small Anim Clin 75 (2), pp. 228-238

Arnold S, Arnold P, Concannon PW, Weilenmann R, Hubler M, Casal M, Döbeli A, Eggenberger E, Rüsch P (1989): Effect of duration of PMSG treatment on induction of oestrus, pregnancy rates and the complications of hyper-oestrogenism in dogs. J. Reprod. Fert., Suppl 39, 115-122.

Arnold S (1995): Fruchtbarkeitskontrolle beim Hund. In: Fruchtbarkeitskontrolle bei Groß- und Kleintieren, Busch W, Zerbin K (Hrsg.), Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, pp. 346-348.

Berchtold M (1997a): Gynäkologie. In: Klinik der Hundekrankheiten, Freudiger U., Grünbaum E-G, Schimke E (Eds.), Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 2nd Edt, Paperbacksonderausgabe, pp. 625-664.

Bianco P, Robey PG (2001): Stem cells in tissue engineering. Nature 414, 118-121.

Bishop AE, Buttery LDK, Polak JM (2002): Embryonic stem cells. The Journal of Pathology 197, 4:424-429.

- Bogliolo I, Zedda mt, Ledda S, Leoni G, Naitana S, Pau S (2002): Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on in vitro maturation of canine oocytes. Reprod Nutr Dev 42, pp. 265-73.
- Bouchard GF, Solorzano N, Concannon PW, Youngquist R S and Bierschwall CJ (1990): Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesteron. Theriogenology March 1991 Vol.35 No. 3, 603-611.
- Bouchard G, Youngquist RS, Clark B, Concannon PW, Braun WF (1991): Estrus induction in the bitch using a combination Diethylstilbestrol and FSH-P. Theriogenology Vol 36, No. 1, pp 51-65.
- Buckner RG (1979): The Genital System. In: Canine Medicin, 4th Edt, Catcott EJ (Ed.), American Veterinary Publications Inc., Santa Barbara, p. 512.
- Bysted BV, Dieleman SJ, Hyttel P, Greve T (2001): Embryonic developmental stages in relation to the LH peak in dogs. J. Reprod. Fertil., Suppl. 57, pp. 181-186.
- Chaffaux S, Locci D, Pontois M, Deletang F, Thibier M (1984): Induction of ovarian activity in Anoestrus Beagle bitches. Br. vet. J. 140 (2), 191-195.
- Christiansen J (1984): Reproduction in the Dog and Cat. In: Bialliere Tindall, London, pp. 80-123.
- Concannon PW, Hansel W, Visek WJ (1975): The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesteron. Biol Reprod 13(1), pp. 112-121.
- Concannon PW, Hansel W, McEntee K (1977a): Changes in LH, progesteron and sexual behavior associated with preovulaory luteinization in the bitch. Biol. Reprod. 17, pp. 604-613.

- Concannon PW and Digregorio GB (1986): Canine Vaginal Cytology. In: Small Animal Reproduction and Infertility, Burke TJ (Ed.), Lea und Febiger, Philadelphia, pp.96-111.
- Concannon PW (1986b): Canine physiology of reproduction. In: Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment, Burke T.J.(Ed.) Lea Febiger, Philadelphia, pp. 23-77.
- Concannon PW, McCann JP, Temple M (1989): Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. J Reprod Fert, Suppl 39, 3-25.
- Concannon PW (1989): Induction of fertile oestrus in anoestrus dogs by constant infusion of GnRH agonist. J. Reprod. Fertil., Suppl. 39, 149-160.
- Concannon PW (1993): Biology of gonadotropin secretion in adult and prepubertal female dog. J Reprod Fert, Suppl 47, 901-906.
- Concannon PW, Tsutsui T, Shille V(2001): Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. J. Reprod. Fertil., Suppl. 57, pp. 169-179.
- Dobrinski I, Lulai C, Barth AD, Post K (1993): Effect of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. J Reprod Fertil Suppl 47, pp. 291-6.
- Dreier HK (1978): Bestimmung des Deckzeitpunktes bei der Hündin. Kleintierpraxis 23, pp. 263-268.
- Dreier HK, Dreier C (1993): Endoscopic examination of the reproductive tract of the bitch. J. Reprod. Fertil., Suppl. 47, p. 525.
- Dreier HK (1997): Genitaltrakt. In: Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Kraft W., Dürr U.M. (Hrsg) Schattauer, Stuttgart, New York, pp.200-201.

England GCW (1998): Allen's Fertility and Obstetrics in the dog, 2nd Edt, Sutton JB, Swift ST (Eds.) Blackwell Science Ltd, Oxford, pp.18-19.

England GCW, Verstegen JP, Hewitt DA (2001): Pregnancy following in vitro fertilisation of canine oocytes. Veterinary Record 148, pp. 20-22.

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Petersen DA, Gage FH (1998): Neurogenesis in the adult hippocampus. Nat Med 4,1313-1317.

Farstad W (1984): Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. J Small Anim Pract 25, pp 561-565.

Farstad W, Andersen Berg K (1989): Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. J. Reprod. Fert., Suppl 39, pp. 289-292.

Feldman EC, Nelson RW (2004): Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, 3rd Edt, Elsevier Science (USA), pp. 751-928: Canine Female Reproduction.

Fontbonne A, Badinand F (1993): Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of Intravaginal and intrauterine deposition. J. Reprod. Fert., Suppl. 47, pp. 325-327.

Fujii M, Otoi T, Murakami M, Tanaka M, Une S, Suzuki T (2000): The Quality and Maturation of Bitch Oocytes Recovered from Ovaries by slicing Method.J Vet Med Sci 62(3), pp. 305-7.

Gage FH (1998) Cell therapy. Nature 392, 18-24

Gräf K-J (1978): Serum oestrogen, progesteron and prolactin concentration in cyclic, pregnant and lactating beagle dogs. J Reprod Fert 52, 9-14.

- Günzel A-R, Koivisto P (1984): Aktuelles zum Sexualzyklus des Hundes-  
diagnostische Möglichkeiten durch vaginalzytologische Untersuchungen  
mittels Testsimplets. Prakt. Tierarzt 2, pp. 161-171.
- Günzel A-R (1986): Zur Spermagewinnung, -beurteilung, -konservierung sowie  
Samenübertragung beim Hund. Tierärztliche Praxis 14, 275-282.
- Günzel-Apel A-R, Thiet W (1989): Intrauterine Deponierung von Tiefgefriersperma  
nach Laparotomie bei einer Hündin. Kleintierpraxis 35.Jahrgang, S.117-  
180.
- Günzel-Apel A-R, Sieme H und Hoppen H-O (1990): Progesteronbestimmung bei  
der Hündin mittels Mikrotiter-ELSA. Kleintierpraxis 35. Jahrg., S. 473-480.
- Günzel-Apel A-R (1994): Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund.  
Gustav Fischer Verlag Jena.
- Hadley JC (1975): Total unconjugated oestrogen and progesteron concentrations  
in peripheral blood during the oestrous cycle of the dog. j Reprod Fert 44,  
445-451.
- Handaja Kusuma PS und Tainturier D (1993): Comparison of induction of oestrus  
in dogs using metergoline, metergoline plus human chorionic gonatotrophin,  
or pregnant mares` gonadotrophin. J Reprod Fert Suppl 47: 363-370.
- Heape W (1900): The „sexual season“ of mammals and the relation of the  
„Prooestrus“ to menstruation. Quart J. Micr. Sci 44, Part I, pp. 1-70.
- Hensel P (1998): Physiologie des Sexualzyklus beim Hund, Kongressbericht der  
29. Jahresversammlung der Schweizerischen Vereinigung für  
Kleintiermedizin, 7.-9. Mai 1998, Basel.
- Hewitt DA, England GCW (1998): Incidence of oocyte nuclear maturation within  
the ovarian follicle of the bitch. Veterinary Record 143, pp. 590-591.

Hewitt DA, England GCW (1998): The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. Theriogenology 49 (5), pp. 957-966.

Holst PA, Phemister RD(1971): The prenatal development of the dog: preimplantation events. Am J. Vet Res. 35 (3), pp. 401-406.

Holst PA, Phemister MS, Phemister RD (1974): Onset of Diestrus in the Beagle Bitch: Definition and Significance. AM. J. Vet. Res. 35, 401-406.

Inaba T, Tani H, Gonda M, Nakagawa A, Ohmura M, Mori J, Torii R, Tamada H, 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.

Jeffcoat IA, Lindsay FE (1989): Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. J Repro Fertil Suppl 39, pp. 277-87.

Jöchle W (1976): Neuere Erkenntnisse über Fortpflanzungsbiologie von Hund und Katze: Konsequenzen für die Östruskontrolle, Konzeptionsverhütung, Abortauslösung und Therapie. Dtsch. Tieräztl. Wschr. 83, 564-569.

Jöchle W (1987): Zum Sexualzyklus der Hündin: Neuere Einsichten und Konsequenzen für Therapie und Fortpflanzungskontrolle. Tierärztl. Prax. 15, pp. 295-300.

Jöchle W (1995): Zur Rolle des Prolaktins in der Fortpflanzung bei Hund und Katze. Kleintierpraxis 40, 381-398.

Johnson CA (1994): Reproductive Disorders. In: Small animal clinical diagnosis by laboratory methods, 2nd Edt, Willard M.D., Tvedten H., Turnwald G.H. (Eds.), W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 274-275.

- Kinney GM, Pennycook JW, Michael D, Shriver MD, Templeton JW, Duane C, Kraemer DC(1979): Surgical collection and transfer of canine embryos. Biol. Reprod. 20 (Suppl. 1), 96 (Abstract).
- Kooistra HS, Okkens AC, Bevers MM, Popp-Snijders C, Van Haaften B, Dieleman SJ, Schoemaker J (1999): Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of the estrous cycle and anestrous in beagle bitches. Biol Reprod 60, 65-71.
- Kutzler MA (2005): Semen collection in the dog. Theriogenology 64, pp. 747-54.
- Kutzler MA (2005): Induction and synchronization of estrous in dogs. Theriogenology 64, pp. 766-75.
- Linde-Forsberg C, 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. Fert., Suppl. 39, pp. 299-310.
- Linde-Forsberg C, Forsberg M (1993): Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. J. Reprod. Fert., Suppl. 47, pp. 313-323.
- Lindsay FEF (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 FEF and Concannon PW (1986): Normal canine vaginoskopy. In: Small Animal Reproduction and Infertility. (Burke T., ed.) Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 112-120.
- Lorin D (1993): Zyklus (bei Hund und Katze). In: Geburtshilfe bei Haustieren. Busch W, Schulz J (Hrsg.) Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, pp. 541-551.

- Luvoni GC, Luciano AM, Modina S, Gandolfi F (2001): Influence of different stages of the estrous cycle on cumulus-oocytecommunications in canine oocytes: effects on the efficiency of in vitro maturation. J Reprod Fertil Suppl 57, pp. 141-46.
- Mahi-Brown CA (1991): Fertilization in Dogs. In: A Comparative Overview of Mammalian Fertilization, Dunbar B.S., O'Rand M.G. (Eds.), Plenum Press, New York, pp.281-297.
- Mahi CA, Yanagimachi R(1976): Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. J. Exp. Zool. 196 (2), pp. 189-196.
- Nakao T, Aoto Y, Fukushima S, Moriyoshi M, Kawata K (1985): Induction of Estrus in Bitches with Exogenous Gonadotropins, and Pregnancy Rate and Blood Progesterone Profiles. Jon. J. Vet. Sci. 47(1), 17-24.
- Nickson DA, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJA, Renton JP(1993): Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. J. Reprod. Fert., Suppl. 47, pp. 231-240.
- Olson PN, Bowen RA, Behrendt MD, Olson JD, Nett TM (1982): Concentration of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. Biol Reprod 27, 1196-1206.
- Olson PN, Nett TM, Bowen RA, Sawyer HR and Niswender GD (1989): Endocrine regulation of the corpus luteum of the bitch as a potential target for altering fertility. J Reprod Fert, Suppl 39, 27-40.
- Otoi T, Murakami M, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Une S, Suzuki T (2000): Development of canine oocytes matured and fertilised in vitro. Vet Rec 146, pp.52-5.
- Paradis M (1991): Saysonality and variability of interestrous interval in the bitch. Theriogenology 36, 41-50.

- Parry BW, Ihrke PJ (1997): Miscellaneous Laboratory Techniques. In: Laboratory procedures for veterinary technicians, 3rd Edt, Pratt P.W. (Eds.), Mosby-Year Book Inc., St. Louis, pp.594-597.
- Phemister RD, Holst PA, Spano JS, Hopwood ML (1973): Time of ovulation in the Beagle Bitch. *Biol. Reprod.* 8, pp. 74-82.
- Phillips RL, Ernst RE, Brunk B, Ivanova N, Mahan MA, Deanehan JK, Moore KH, Overton GC, Lemischka IR, (2000): The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science* 288, 1635-1640.
- Pinto CRF, Paccamonti DL, Eilts BE (1999): Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology* 52, pp 609-616.
- Renton JP, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJ, Mullaney J, Perry B (1991): Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*canis familiaris*). *J. Reprod. Fertil.* 93 (1), pp. 221-231.
- Rodrigues B, Dos Santos L, Rodrigues J (2004): Embryonic Development of in Vitro Matured and in Vitro Fertilized Dog Oocytes. *Mol Reprod Dev*, pp. 215-23.
- Rota A, Mollo A, Marinelli I, Gabai G, Vincenti L (2003): Evaluation of Cabergoline and Buserelin Efficacy for Oestrous Induction in the Bitch. *Reprod Dom Anim* 38, pp. 440-443.
- Shille VM, Thatcher MJ, Simmons KJ (1984): Efforts to induce estrus in the bitch, using pituitary gonadotrophins. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 184, 1469-1473.
- Silva LDM, Onclin K, Snaps F and Verstegen J (1995): Laprascopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology* 43, pp. 615-623.

- Silva LDM, Onclin K, Lejeune B, Verstegen JP (1996): Comparisons of vaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. Veterinary Records 138, pp. 154-157.
- Songsasen N, Wildt DE (2005): Size of the donor follicle, but not stage of reproductive cycle or seasonality, influences meiotic competency of selected domestic dog oocytes. Mol Reprod Dev; 72(1): 113-9.
- Songsasen N, Yu I, Leibo SP (2002): Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. Mol Reprod Dev; 62(3): 407-15.
- Steinetz BG, Goldsmith LT, Harvey HJ, 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, Vol 50 No 1.
- Szasz F, Gabor G, Solti L, (2000): Comparative study of different methods for dog semen cryopreservation and testing under clinical conditions. Acta Vet Hung 48 (3), pp. 325-33.
- Talbot NC, Rexroad CE, Pursel VG, Powell AM (1993): Alkaline phosphatase staining of pig and sheep epiblast cells in culture. Mol Reprod Dev 36, 139-147.
- Tammer I, Blendinger K, Sobiraj A, Bosted A (1994): Über den Einsatz der exfoliativen Vaginalzytologie im Rahmen der gynäkologischen Befunderhebung bei der Hündin, Tierärztl. Prax. 22, 199-207.
- Trigg TE, Wright PJ, Armour AF, Williamson PE, Junaidi J, Martin GB, Doyle AG, Walsh J (2001): Use of GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. J Reprod Fert, Suppl 57: 255-261.

- Tsutsui T, Tezuka T, Shimizu T, Murao I, Kawakami E, Ogasa A (1988): Artificial Insemination with Fresh Semen in Beagle Bitches. Jpn J Vet Sci 50(1), pp 193-198.
- Tsutsui T (1989): Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. J. Reprod. Fert., Suppl.39, 269-275.
- Tsutsui T., Stewart DR. (1991): Determination of the source of relaxin immunoreactivity during Pregnancy in the dog. J Vet Med Sci 53: 1025.
- Tsutsui T, Hori T, Okazaki H, Tanaka A, Shiono M, Yokosuka M, Kawakami E (2001): Transfer of Canine Embryos at Various Developmantel Stages Recoverd by Hysterectomy or Surgical Uterine Flushing. J. Vet. Med. Sci. 63(4), pp. 401-405.
- van Haaften B, Dielman SJ, Okkens AC, Bevers MM, Willemse AH (1989): Induction of oestrus and ovulation in dogs by treatment with PMSG and/or bromocriptine. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 39, 330-331.
- van Haaften B, Bevers MJ, van den Bram WE, Okkens AC, van Sluijs FJ, Willemse AH, Dieleman SJ (1994): Increasesind sensitivity of the pituitary to GnRH from early to late anoestrus in the beagle bitch. J. Reprod. Fert. 101, pp. 221-225.
- Verstegen JP, Onclin K, Silva LDM, Concannon PW (1999): Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the Dopamine agonist Cabergoline in dogs. Theriogenology 51, 597-611.
- Wabersky D, Günzel-Apel A-R (1990): Zyklusdiagnostik als Grundlage für fruchtbarkeitsfördernde und-hemmende Maßnahmen bei der Hündin, Kleintierpraxis 35, 573-579.

- Wang R, Clark R, Bautch VL (1994): Embryonic stem cell –derived cystic embryoid bodies from vascular channels: an in vitro model of blood vessel development. *Development* 114: 303-316.
- Weissman IL, Anderson DJ, Gage F (2001): Stem and progenitor cells. Origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 387-403.
- Wildt DE, Panko WB, Chakraborty PK, Seager SWJ (1979): Relationship of Serum Estrone, Estradiol 17beta and Progesterone to LH, Sexual Behavior and Time of Ovulation in the Bitch. *Biol. Reprod.* 20 (3), pp. 648-658.
- Wilson MS (2001): Transcervical insemination techniques in the bitch. *Clinical Theriogenology*, Vol.31, Nr. 2, pp. 291-304.
- Wright PJ, Parry BW (1989): Cytology of the Canine reproductive System. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 19, 851-874.
- Wright PJ, Verstegen JP, Onclin K, Jöchle W, Armour AF, Martin GB, Trigg TE (2001): Suppression of the oestrous responses of bitches to the GnRH analogue deslorelin by progestin. *J Reprod Fert, Suppl* 57: 263-268.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawaji H, Nakazawa M, Naito K, Toyoda Y (1992): Maturation, Fertilization, and Development of Dog Oocytes In Vitro. *Biol. Reprod.* 46, pp. 853-858.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawano Y, Nakazawa M, Naito K, Toyoda Y (1993): In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 47, pp. 227-229.
- Zöldag L, Fekete S, Csaky I, Bersenyi A (2001): Fertile estrus induced in bitches by Bromocryptine, a Dopamine agonist: a clinical trial. *Theriogenology* 55, 1657-1666.

## 9 Anhang

### 9.1 Untersuchungsprotokoll

A: Angaben zur Hündin:

Name: \_\_\_\_\_

Rasse: \_\_\_\_\_

Alter: \_\_\_\_\_

Anzahl d. Läufigkeiten: \_\_\_\_\_

Anzahl d. Würfe: \_\_\_\_\_

Bemerkungen: \_\_\_\_\_

B: \_\_\_\_\_

Datum								
Tag d. Läufigkeit								
Duldung								
Äußeres Genitale								
1. Ödemat.								
2. Ausfluß- menge								
3. Ausflußf arbe								
Vaginal-Sh.								
1. Ödemat.								
2. Farbe								
3. Fälte- lung								
4. Flsgkt.- menge								
5. Flsgkt.- farbe								
Vaginalzytologie								
1. tiefe Zellen								
2. Erys								
3. Leukos								
4. Superfizi alz.								
5. Schollen								
6. Al								
7. Zelldetrit us								
Prog.Konz.								
Ovulations- bzw. Besamungs- zeitpunkt								

C: Ovariohysterektomie

Datum: \_\_\_\_\_ Tage nach d. Ovulation

rechts: Anzahl d. GK: \_\_\_\_\_ Anzahl d. Embryonen: \_\_\_\_\_

links: Anzahl d. GK: \_\_\_\_\_ Anzahl d. Embryonen: \_\_\_\_\_

Anzahl d. eingebetteten Embryonen: \_\_\_\_\_

## 9.2 Färbung nach PAPANICOLAOU

1.)	30% Äthanol	20 Sekunden
2.)	Aqua dest.	2 Minuten
3.)	Harris Hämatoxylin (Fa. Merck)	5 Minuten
4.)	0,03 N Hcl	2x eintauchen
5.)	fließendes, warmes Leitungswasser	30 Sekunden
6.)	50% Äthanol	30 Sekunden
7.)	70% Äthanol	30 Sekunden
8.)	80% Äthanol	30 Sekunden
9.)	96% Äthanol	30 Sekunden
10.)	OG 6-Färbelösung (Fa. Merck)	5 Minuten
11.)	96% Äthanol	2x eintauchen
12.)	96% Äthanol	2x eintauchen
13.)	EA 50- Färbelösung (Fa. Merck)	5 Minuten
14.)	96% Äthanol	2x eintauchen
15.)	96% Äthanol	2x eintauchen
16.)	96% Äthanol	2x eintauchen
17.)	absoluter Alkohol	30 Sekunden
18.)	Äthanol-Xylool, 1:1	2 Minuten
19.)	Xylool	2 Minuten
20.)	Xylool	2 Minuten

Quelle: Romeis B (1989): Mikroskopische Technik. 17. Auflage, Urban und Schwarzenbeck, München; Wien; Baltimore. 646f

### 9.3 Abkürzungsverzeichnis

<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
<b>DES</b>	Diäthylstilböstrol
<b>EB</b>	embryoid bodies
<b>eCG</b>	equines Choriongonadotropin
<b>ES</b>	embryonale Stammzellen
<b>FSH</b>	Follikel stimulierendes Hormon
<b>GnRH</b>	Gonadotrpin Releasing Hormon
<b>hCG</b>	humanes Choriongonadotropin
<b>ICM</b>	inner cell mass
<b>KB</b>	künstliche Besamung
<b>KGW</b>	Körpergewicht
<b>LH</b>	Luteinisierungshormon
<b>TCM</b>	tissue culture medium
<b>ZNS</b>	Zentralnervensystem
<b>Zp</b>	Zona pellucida

## 9.4 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. J. Braun für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung.

Ich danke Dr. Schmid, Dr. Trombach und Dr. Ehlers für die nette Aufnahme in die Kleintierabteilung der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der LMU und für die gute Einarbeitung.

Ich danke Prof. Dr. Matis und dem SOS Projekt Mensch und Tier e.V. für die Vermittlung der Versuchshunde.

Ich danke den Mitarbeitern des Biotechnologielabors, die geholfen haben die Embryonen zu gewinnen. Besonders möchte ich Christiane Otzdorff danken.

Ich danke den Besitzern der Versuchshunde ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Außerdem gilt großer Dank meinen Eltern ohne deren jahrelange Unterstützung dies alles nicht möglich gewesen wäre.

## 9.5 Lebenslauf

Name: Beate Kristina Kienzle

Geburtsdatum: 19. September 1977

Geburtsort: Ludwigsburg

Mutter: Christel Kienzle geb. Holfert

Buchhalterin

Vater: Rolf Kienzle

Dipl. Ingenieur

Bruder: Dr. Peter Kienzle

Zahnarzt

1984-1988: Grundschule in Oberriexingen

1988-1997: Friedrich-Abel-Gymnasium in Vaihingen/Enz

Abitur am 18.Juni 1997

1997-2003: Tiermedizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

Staatsexamen 28.Februar 2003

Approbation 7. April 2003

Mai 2003: Beginn der Dissertation an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München bei Prof. J. Braun

seit April 2004: wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

seit April 2005: wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Chirurgischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München