

Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



Embryotransfer beim Pferd

Klewitz J, Heer P, Behrendt D, Probst J, Martinsson G

Sieme H

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2010; 7 (3), 184-189

www.kup.at/repromedizin

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, D-I-R, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz

Embryotransfer beim Pferd

J. Klewitz¹, P. Heer², D. Behrendt², J. Probst¹, G. Martinsson², H. Sieme¹

Im Rahmen der equinen Reproduktionsmedizin hat der kommerzielle Embryotransfer (ET) in den vergangenen Jahren kontinuierlich zugenommen. Nach transzervikaler Embryogewinnung zwischen D 6 und 8 nach der Ovulation werden die Embryonen entweder direkt, transzervikal auf eine zyklussynchrone Empfängerstute übertragen, gekühlt innerhalb von 12–24 Stunden zu einer synchronen Trägerstute transportiert oder kryokonserviert (konventionelle Tiefgefrierung oder Vitrifikation).

Die Embryogewinnungsrate wird von der Geschlechtsgesundheit und dem Alter der Spenderstute, der Qualität des eingesetzten Spermas, dem Besamungsmanagement, dem Tag der Embryogewinnung und der Anzahl der Ovulationen pro Zyklus beeinflusst. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Superovulationsprotokolle zur Steigerung der Ovulationsrate untersucht, um die Effizienz des equinen Embryotransfers zu steigern.

Die frühestens 7 Tage nach der Übertragung des Embryos ermittelte Trächtigkeitsrate hängt vorwiegend von der Zyklussynchronität der Spender- und Empfängerstute, der Embryoqualität, der Geschlechtsgesundheit der Empfängerstute und der Transfermethode ab.

Auch nach Einführung des praxisreifen Embryotransfers zieht der equine ET weiterhin das wissenschaftliche Interesse auf sich. Durch Verbesserung der Superovulationsprotokolle und der Kryokonservierung soll die Effizienz gesteigert und eine saisonale und räumliche Unabhängigkeit erzielt werden, um der Pferdezucht langfristig ein wirtschaftliches biotechnisches Verfahren zu eröffnen.

Schlüsselwörter: Stute, Embryotransfer, Superovulation, eFSH, Kryokonservierung

Equine Embryo Transfer. In the field of equine reproduction commercial embryo transfer activity is continuously increasing in the last years. After transcervical embryo recovery on D 6–8 after ovulation the embryo is either transferred straight away to synchronic recipient mare, cooled shipped to the synchronic recipient within 12–24 hours or cryopreserved (conventional freezing or vitrification).

Embryo recovery is influenced by genital health and age of the donor, semen quality, insemination regime, day of embryo recovery and number of ovulations per cycle. In the last years different superovulation protocols were tested to increase embryo recovery and the efficiency of equine embryo-transfer.

Pregnancy rate detected 7 days after ET depends on donor-recipient synchrony, embryo quality, general and reproductive health of the recipient and transfer technique.

Although it is now fairly widespread in equine clinical practice, ET continues to attract scientific interest to further improve efficiency by optimizing superovulation protocols and achieve seasonal and regional independence by improved cryopreservation. **J Reproduktionsmed Endokrinol 2010; 7 (3): 184–9.**

Key words: mare, embryo transfer, superovulation, eFSH, cryopreservation

■ Einleitung

Als praxisreifes biotechnisches Verfahren hat in den vergangenen Jahren der kommerzielle Embryotransfer (ET) zur Realisierung verschiedener züchterischer Zielsetzungen Einzug in die Pferdezucht gehalten. Wesentliche Gründe zur Anwendung des ETs sind die Möglichkeit, von einer Stute mit guter Nachkommenleistung mehrere Embryonen pro Jahr zu gewinnen und die parallele Zuchtnutzung von Sportpferden ohne Unterbrechung des Trainings- oder Turniereinsatzes. Durch die Besamung und Spülung 2-jähriger Stuten kann eine vorzeitige Zuchtnutzung erfolgen, die zu einer Verkürzung des Generationsintervalls beiträgt. Aus medizinischer Sicht ist der Embryotransfer bei Stuten indiziert, die aufgrund extragenitaler und genitaler Erkrankungen selbst keine Frucht mehr austragen können oder nicht den

Belastungen und Risiken einer Trächtigkeit ausgesetzt werden sollten.

Der Weg von den ersten Berichten erfolgreicher Übertragung equiner Embryonen im Jahr 1972 [1, 2] bis zur praxisreifen, kommerziellen Anwendung gestaltete sich aus unterschiedlichen Gründen schwierig. So sind die Erfolgsaussichten mit einer Spülrate von ca. 50 % (35–70 %) bei singulärer Ovulation begrenzt und das Management aufgrund täglicher Ovulationskontrollen und der Auswahl und Synchronisation der Empfängerstuten aufwendig. Hinzu kommen fehlendes Equipment und technische Erfahrung sowie die Skepsis der Züchter und Zuchtverbände, die lange Zeit jährlich nur ein Fohlen pro genetische Mutter akzeptierten [3].

In Südamerika und den Vereinigten Staaten wird der Embryotransfer seit

Ende der 1990er-Jahre praxisreif eingesetzt und durch Entwicklungen in den ET-Programmen und Verbesserungen der Rentabilität von Spülung, transzervikaler Übertragung, Embryonenlagerung und Rezipientenbereitstellung kommerziell erfolgreich betrieben (Tab. 1). Insbesondere die Möglichkeit des gekühlten Transportes bei 5 °C bis zu 24 h ohne merklichen Vitalitätsverlust der Embryonen [4] machte den Einsatz des ETs der Pferdezucht zugänglich. So können Embryonen nach der Spülung zu spezialisierten Zentren geschickt werden, die eine Auswahl synchronisierter Rezipientenstuten bereitstellen.

Seit 2003 wurde mit der Gründung der für den innergemeinschaftlichen Handel zugelassenen Embryotransfereinrichtung im Landgestüt Celle und der ET-Station auf einem Privatgestüt (Lewitzhof) in den neuen Bundesländern die ET-Akti-

Eingegangen: 08.10.2009; akzeptiert nach Revision: 26.05.2010

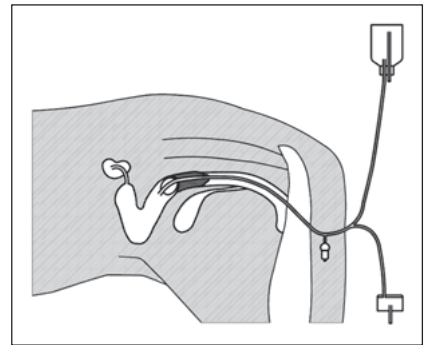
Aus der ¹Klinik für Pferde und Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover und dem ²Niedersächsischen Landgestüt Celle

Korrespondenzadresse: Jutta Klewitz, Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, D-30559 Hannover, Bünteweg 15; E-Mail: jutta.klewitz@tiho-hannover.de

Tabelle 1: Anzahl der equinen Embryotransfers weltweit im Jahr 2008. Nach [IETS-Newsletter, 2009]

Land	Anzahl der Spülungen	Transfer-taugliche Embryonen	Anzahl übertragener Embryonen	
			Frisch	Tiefgefroren/Aufgetaut
Argentinien	15.000	9000	9000	
Brasilien	14.200	9900	9800	35
Kanada	42	36	36	
Europa	1216	1043*	1014	–
Südafrika	56	48	48	–
Australien	24	15	15	
USA	13.500	6840	6500	340
Gesamt	44.338	27.082	26.606	379

* inkl. 48 in vitro produzierte Embryonen

**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der transzervikalen Embryonengewinnung beim Pferd

Auch die Kryokonservierung equiner Embryonen gestaltet sich schwierig [7].

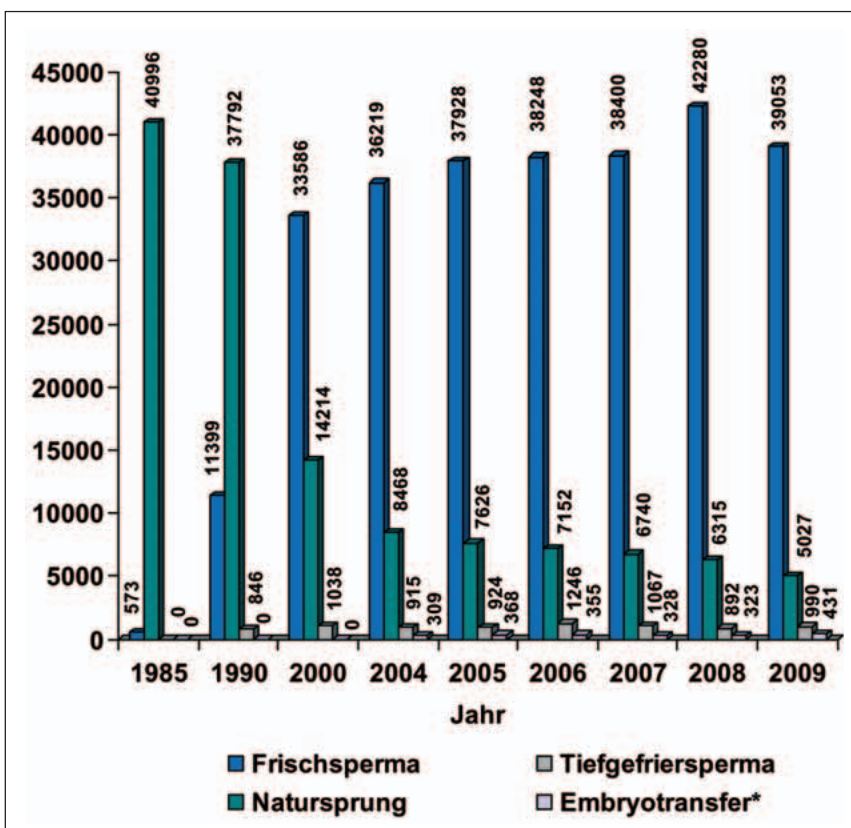
In diesem Artikel werden das Verfahren des Embryotransfers beim Pferd und die Einflussfaktoren auf die Embryogewinnungs- und Trächtigkeitsraten beschrieben.

■ Verfahren des Embryo-transfers

Embryonengewinnung und -beurteilung

Die Spülung der Spenderstute erfolgt in der Regel am 7. oder 8. Tag (D) nach der Ovulation (= D0). Aufgrund des im Vergleich zu anderen Spezies langen Eileitertransportes beim Pferd kann der Embryo erst 144–156 Stunden nach der Ovulation aus dem Uterus gewonnen werden [8, 9]. Ab Tag 9 wird der verhältnismäßig große Embryo jedoch leicht bei der Gewinnung, der Lagerung oder dem Transfer beschädigt [10, 11].

Zur transzervikalen Embryogewinnung wird ein kommerziell verfügbarer Spülkatheter vorsichtig durch den Gebärmutterhals eingeführt und bis in den Gebärmutterkörper vorgeschoben, ohne die Zervix dabei stark zu dilatieren. Mithilfe eines ca. 70 ml Luft fassenden Ballons wird der Spülschlauch vor dem inneren Muttermund fixiert, sodass das Uteruslumen nach außen abgedichtet ist (Abb. 2). Je nach Größe der Gebärmutter werden bei Warmblutstuten ca. 1–2 l Spülmedium in den Uterus infundiert und anschließend abgehebert. Als Spülmedium wird klassischerweise auf 32–35 °C erwärmtes Dulbeccos PBS mit Zugabe von fetalem Kälberserum oder bovinen Serumalbumin eingesetzt, um ein Festsetzen des Embryos am Silikon oder Plastik des Spülsystems zu verhindern. Alternativen

**Abbildung 1:** Entwicklung der Bedeckungsarten in der deutschen Reitferdezucht. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung aus [5]. * Anzahl der tragenden Empfängerstuten

vitäten in Deutschland nennenswert erweitert (Abb. 1). Die ansteigende Zahl der nach § 15 Binnenmarkt-Tierseuchenschutzverordnung (Richtlinie 92/65/EWG v. 13.07.1992, Entsch. 95/176/EG v. 6.4.95, Verordnung 176/2010 Änderung Richtlinie 92/65/EWG v. 02.03.2010) beantragten und genehmigten Embryotransfereinrichtungen für Pferde verdeutlicht das zunehmende Interesse der Praxis an der Durchführung des ETs. Einen weiteren Impuls bietet der seit Februar 2006 genehmigte Export von Pferdeem-

bryonen in die USA nach Beantragung einer Einfuhrerlaubnis durch den amerikanischen Importeur (www.aphis.usda.gov/vs/ncie).

Auch nach der Einführung des praxisreifen, kommerziellen ETs zieht der equine Embryotransfer weiterhin das wissenschaftliche Interesse auf sich. So mangelt es nach wie vor an einem überzeugenden Behandlungsschema, um die Problematik der Superovulations-Induktion bei der Stute [6] zu überwinden.

tiv eignen sich kommerziell erhältliche, gebrauchsfertige Medien oder kostengünstige Ringer-Laktat-Lösung. Unter verschiedenen erhältlichen Spülsystemen werden von den meisten Autoren geschlossene Systeme mit zentralem Y-Stück bevorzugt, sodass die Spülflüssigkeit durch einen Schlauch in den Uterus fließen kann und über einen zweiten Schlauch mit angeschlossenem In-line-Filter abgehebert wird. Der Vorgang wird in der Regel mit je 1 Liter Spülflüssigkeit 3–4× wiederholt. In einigen Zentren wird nach erfolgloser erster Spülung das Spülprozedere unter Oxytocinapplikation wiederholt, wodurch eine Steigerung der Embryogewinnungsrate erzielt wird [12, 13]. Der Großteil der klaren, zellarmen Spüllösung passiert den 75 µm In-line-Filter. Nur in den verbleibenden 50 ml Lösung wird der Embryo mithilfe eines Stereomikroskops (Vergrößerung ×10–×50) gesucht und anhand Größe, Entwicklungsstadium (späte Morula, frühe oder geschlüpfte Blastozyste) und Qualität beurteilt. Die Größe variiert in der Regel zwischen ca. 150 µm Durchmesser am Tag 6 bis zu 1,2 mm am Tag 8, wobei gelegentlich wachstumsverzögerte Embryonen oder kleinere Embryonen bei asynchroner Doppelovulation auftreten. Die Qualität des Embryos wird entsprechend einer Einteilung in Grad 1–4 (exzellent bis degeneriert) beurteilt [10].

Embryonenaufbereitung und transzervikaler Transfer

Bis vor wenigen Jahren wurden die gewonnen Embryonen routinemäßig chirurgisch über eine Laparatomie unter Vollnarkose [14] oder über die Flanke unter lokaler Infiltrationsanästhesie am stehenden, sedierten Pferd in die Gebärmutterhornspitze übertragen [15]. Da sich durch die ebenfalls erfolgreiche Methode des transzervikalen, nicht-chirurgischen Transfers eine schnelle, kostengünstige und wenig invasive Alternative bot, wird heute auf die chirurgische Übertragung weitestgehend verzichtet.

Vor dem Transfer auf die Empfängerstute wird der Embryo durch mehrfaches Umsetzen in ein kommerziell erhältliches „holding medium“ (z. B. Emcare Embryo Holding Solution®, ICP, Auckland, NZ; ViGro Holding Plus®, AB Technology, Pullmann, WA, USA; Ham's F10 Medium) gewaschen, um ihn von eventuell anhaftenden Zellen oder Mikro-

organismen zu befreien. Beim direkten Transfer vor Ort wird der Embryo je nach Größe in eine 0,25- oder 0,5-ml-Paillette aufgesogen [16] und diese in eine spezielle Transferpipette verbracht. Nach transvaginaler Einführung der Pipette und Passieren des Zervikalkanals – ähnlich einer Besamung – wird der Embryo im Gebärmutterkörper der Rezipientenstute abgesetzt. Bei sachgemäßer Durchführung und geeigneten Spender- und Empfängertieren sind mit diesem Verfahren Embryogewinnungsraten zwischen 40 und 50 % zu erwarten.

Gekühlter Transport

Eine der bedeutendsten Entwicklungen des kommerziellen Embryotransfers ist die Möglichkeit des gekühlten Transportes bei 5 °C bis zu 24 h ohne merklichen Vitalitätsverlust der Embryonen [17, 18]. Besonders in den USA und Brasilien nahm die Zahl transportierter Embryonen in den vergangenen 10 Jahren deutlich zu [7], da sie Besitzern und Praktikern eine Anwendung des ETs ohne die Problematik der Rezipientenbereitstellung aus dem eigenen Bestand ermöglicht. Für den Transport stehen unterschiedliche Medien zur Verfügung.

So wurde kein Unterschied in der Trächtigkeitsrate direkt übertragener oder bis zu 24 h in Ham's-F-10-Medium transportierter Embryonen ermittelt [4]. Da dieses Medium jedoch eine Begasung mit 5 % CO₂, 5 % O₂ und 90 % N₂ voraussetzt, haben sich mittlerweile in der Praxis gepufferte Medien (Embryo Holding Solution®, ViGro Holding Plus®) durchgesetzt, mit denen vielversprechende Trächtigkeitsraten nach gekühltem Transport zu verzeichnen sind.

Embryontiefgefrierung

Die Kryokonservierung eröffnet die Möglichkeit einer vollständigen räumlichen und saisonalen Trennung von Embryonengewinnung und -transfer und somit die Unabhängigkeit von der Synchronisation des Empfängers. Sie ermöglicht die Nutzung überzähliger Embryonen bei Mehrfachovulationen und den Aufbau von Embryonenbanken, die als genetische Reserve genutzt werden können. Doch diese Konservierungstechnik gestaltete sich seit dem ersten lebend geborenen Fohlen (1982) aus einem tiefgefrorenen Pferdeembryo [19] schwierig. Unabhängig vom Einfriermedium und Kryoprotektivum können

in der konventionellen Slow-freezing-Methode nur akzeptable Trächtigkeitsraten von 50–60 % erzielt werden, wenn die Morula oder frühe Blastozyste einen Durchmesser von < 300 µm besitzt [13, 20–22]. Diese Kriterien werden in einem sehr schmalen Zeitfenster kurz nach der Ankunft des Embryos im Uterus zwischen 144 und 168 Stunden nach der Ovulation erfüllt. Als eine Ursache für die erhöhte Apoptoserate bei der Tiefgefrierung größerer Embryonen [23] wird die nur beim Pferd vorkommende azelluläre Glykoproteinkapsel angesehen, die sich während der Blastulation am Tag 6 zwischen dem Pferdeembryo und der umgebenden Zona pellucida ausbildet [24, 25]. Eine negative Korrelation zwischen der Kapseldicke und der Einfrierfähigkeit equiner Embryonen führte zu der Vermutung, dass die Diffusion von Kryoprotektiva in den Embryo behindert wird [26, 27]. Methodisch wird bei der Kryokonservierung zwischen der konventionellen Slow-freezing-Methode mit stufenweiser Zugabe und Verdünnung des Gefrierschutzmittels [28], dem One-step-Verfahren ohne Ausverdünnung des Kryoprotektors und der Vitrifikation unterschieden.

Bei der konventionellen Slow-freezing-Methode wird der Embryo nach stufenweiser Glyzerinzugabe und Aufziehen in eine 0,25- oder 0,5-ml-Paillette mit einer Kühlrate von 3 °C/min zunächst von Zimmertemperatur auf –6 bis –7 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wird die Eiskristallbildung (seeding) ausgelöst. Nach einer Äquilibrationszeit von 10 min erfolgt die weitere Abkühlung mit einer Abkühlrate von 0,3 °C bis zu einer Temperatur von –30 °C, bevor die Embryonen in flüssigen Stickstoff überführt werden. Nach dem Auftauen für 30 sec bei 37 °C im Wasserbad wird das Glyzerin stufenweise ausverdünn. Alternativ werden in der Literatur 1,2-Propanediol [29], die Kombination von 1,2-Propanediol und Glyzerin [30] und Ethylenglykol [27, 31] diskutiert, die jedoch im Vergleich zu Glyzerin gleichwertige oder schlechtere Einfrierergebnisse erbrachten.

Um die Kosten eines voll- oder halb-automatischen Einfriergerätes zu umgehen, gewann in den vergangenen Jahren die Vitrifikation zur Kryokonservierung equiner Embryonen an Bedeutung. Unter Vitrifikation ist die Versetzung in

einen glasähnlichen Zustand zu verstehen, wobei die Viskosität der extra- und intrazellulären Flüssigkeit derartig zunimmt, dass die Flüssigkeiten erstarren, ohne Eiskristalle zu bilden. Dazu werden die Embryonen in Einfriermedien mit sehr hohen Konzentrationen an Kryoprotektiva gegeben, wodurch den Zellen in kürzester Zeit möglichst viel Wasser entzogen wird, bevor sie mit dem umgebenden Medium direkt in flüssigen Stickstoff gegeben werden. Mit dieser weniger aufwendigen Technik konnten ähnliche Auftauergebnisse wie bei der konventionellen Slow-freezing-Methode [32, 33] und akzeptable Trächtigkeitsraten (> 60 %) erreicht werden [34], wobei besonders bei der Vitrifikation eine Embryonengröße von < 300 µm essenziell für das Überleben des Embryos zu sein scheint. Ein kommerziell erhältliches Vitrifikationskit (Equine Vitrifikationkit®, Bioniche Animal Health, USA) ermöglicht eine erfolgreiche Embryonenkryokonservierung unter Praxisbedingungen unter der Voraussetzung, dass kurzzeitige Aufenthaltszeiten in den verschiedenen Medien eingehalten werden, um toxische Einflüsse der Vitrifikationsmedien auf den Embryo zu minimieren.

■ Einflussfaktoren auf die Embryogewinnungsrate

Die entscheidendsten Faktoren für den Erfolg einer Embryospülung sind das Besamungsmanagement und die Geschlechtsgesundheit von Stute und Hengst [7, 35]. Eine erfolgreiche Embryogewinnungsrate ist nur bei genitalgesunden Stuten, ohne vorberichtliche Fruchtbarkeitsprobleme, zu erwarten und sinkt drastisch bei Spenderstuten über 15 Jahren [15, 36, 37]. Bei der Besamung spielen neben der Qualität des Spermas, die Art der Samenkonservierung, die Spermiendosis und der Besamungszeitpunkt eine Rolle. Frischsperma, d. h. am Tag der Samengewinnung übertragenes flüssigkonserviertes Sperma, ist aufgrund deutlich besserer Embryonengewinnungsraten dem Versand- und Tiefgefriersperma vorzuziehen. Bei der Besamung junger, fertiler Stuten mit Frischsperma von fertilen Hengsten liegt die Embryogewinnungsrate > 70 % [38]. Da jedoch häufig ältere Sport- oder Zuchtstuten mit Nachkommenleistung zum Embryotransfer vorgestellt werden und der Einsatz von

Versand- oder Tiefgefriersperma gewünscht wird, schwanken die Embryogewinnungsraten in der Praxis zwischen 30 und 50 % [13].

Die Gewinnungsraten werden des Weiteren vom Zeitpunkt der Embryospülung beeinflusst. Da der Pferdeembryo erst 148 Stunden nach der Ovulation in den Uterus eintritt, ist eine Spülung am Tag 6, der sich für die Gewinnung eines präexpansiven Embryos zur Kryokonservierung eignet, mit einer geringeren Erfolgsaussicht verbunden als bei einer Spülung am Tag 7 oder 8 [39]. Hinzu kommt, dass die Dauer der Eileiterpassage von vielen weiteren Faktoren beeinflusst wird. So wurde eine Verzögerung zu Beginn der Saison und bei der Nutzung älterer Spenderstuten [7, 37] beobachtet.

Multiple Ovulationen – Superovulation

Üblicherweise ovuliert die Stute einen singulären Follikel pro Rosse. Bei Voll- (~22 %) und Warmblütern (~15 %) werden jedoch Doppel- oder Dreifachovulationen beobachtet [40], die zu einer Steigerung der Embryogewinnungs- und Trächtigkeitsraten führen [15, 38]. Eine offensichtliche Möglichkeit, die Effizienz des Embryotransfers zu verbessern, ist die medikamentöse Auslösung multipler Ovulationen. Im Vergleich zum Rind gestaltet sich die Superovulation bei der Stute jedoch schwierig. Zu den verschiedenen Behandlungsprotokollen [6], mit denen maximal eine Verdoppelung der Ovulationsrate erzielt wurde, zählten eCG [41], GnRH [42], porcine hypophysäre FSH-Präparationen [43], Wachstumshormone, equine Hypophysenextrakte [44] und die aktive [45] und passive [46] Immunisierung gegen Inhibin [47].

Als Ursache für die Schwierigkeiten bei der Superovulationsinduktion bei der Stute wird neben einer relativen Unempfindlichkeit der equinen FSH-Rezeptoren [47] die von anderen Tierarten abweichende Ovaranatomie mit einer begrenzten Ovulationsfläche diskutiert. Während bei den übrigen Haussäugetieren die Zona vasculosa im Inneren und die Zona parenchymatosa in der Peripherie des Eierstocks liegt, umgibt bei der Stute die gefäß- und bindegewebsreiche Zona vasculosa das Keimepithel und lässt nur die Fossa ovarii als Ovulations-

grube frei. In den vergangenen Jahren war ein aus equinen Hypophysenextrakten aufgereinigtes Präparat zur Superovulationsbehandlung bei der Stute kommerziell erhältlich (eFSH®, Bioniche Animal Health, Ontario, Kanada), mit dem unter Praxisbedingungen 0,65–2 Embryonen pro Zyklus gewonnen wurden. Die Kosten einer solchen Behandlung waren jedoch erheblich und der Erfolg variierte individuell zwischen den Stuten. Weitere Probleme umfassten die Registrierungsproblematik eines biologischen Hypophysenprodukts in Europa und die Herstellung eines exakten FSH-LH-Verhältnisses bei der Extraktion, da eine zu geringe FSH-Dosis in einer ungenügenden Stimulation resultiert, während ein zu hohes LH-FSH-Verhältnis zur vorzeitigen Luteinisierung der Follikel und ausbleibenden Ovulationen führte [48]. Eine Lösung für diese Probleme könnte die Entwicklung eines rekombinanten equinen FSH-Produkts (reFSH) bringen, das mittels neuer Single-Chain-Expressionstechnik hergestellt wurde und bei Stuten zu einer Stimulation der Follikelentwicklung führte [49].

Eine extreme Erhöhung der Ovulationsrate muss nicht unbedingt das Ziel sein, da so auch eine größere Anzahl atretischer Follikel rekrutiert wird, die keine lebensfähige Eizelle oder Embryo erbringen. Außerdem sind höhere Ovulationsraten nicht unbedingt mit einer größeren Embryonenzahl verbunden, insbesondere, wenn es sich um ipsilaterale Ovulationen handelt. Eine Ursache könnte sein, dass nicht alle Follikel die Ovulationsgrube erreichen und luteinisieren, ohne die Eizelle zu entlassen [50].

■ Einflussfaktoren auf die Trächtigkeitsrate

Embryoqualität

Die unter dem Lichtmikroskop beurteilbare Embryonenqualität hat einen deutlichen Einfluss sowohl auf die Trächtigkeitsrate [10] als auch auf die Trächtigkeitsverlustrate [11]. Ein Großteil der gewonnenen Embryonen (> 90 %) wird nach der Einteilung von McKinnon und Squires in die Kategorie exzellent (1) oder gut (2) eingeordnet [11]. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass früh degenerierende Embryonen die Eileiter nicht komplett passieren. Während bei der Übertragung von Grad-1- und -2-Embryonen eine Trächtigkeits-

rate von 68 % erzielt wurde, wurden bei Grad-3- und -4-Embryonen nur 40 % erreicht [11]. Wurde eine Entwicklungsverzögerung anhand eines Morula- oder sehr kleinen Blastozystenstadiums am Tag 7 oder 8 nach der Ovulation deutlich, waren die Erfolgsaussichten ebenfalls reduziert [7]. Neben der unter Praxisbedingungen üblichen lichtmikroskopischen Beurteilung gibt es komplexere Analyseverfahren, wie die Qualitätsbeurteilung mit dem membranimpermeablen Fluoreszenzfarbstoff 4,6-Diamidino-2-Phenylindole-Dihydrochloride (DAPI), der zur Detektion toter Zellen genutzt wird.

Transfermethode

Der Erfolg des transzervikalen und chirurgischen Embryotransfers wird von der Übertragungstechnik beeinflusst [7, 50]. Dabei stellen bakterielle Kontaminationen des Progesteron-dominierten Uterus [50] und hormonelle Imbalancen, die sich in Form einer Oxytocin- [51] oder PGF2 α -Ausschüttung [52] nach exzessiver Dilatation oder Manipulation der Zervix äußern, die größten Gefahren dar. Aus diesem Grund werden in vielen Embryotransfereinrichtungen systemisch Antibiotika vor und nach dem Transfer und/oder NSAIDs verabreicht, um eine transferinduzierte PGF2 α -Ausschüttung und anschließende Luteolyse zu verhindern. Zur Luteolyseprophylaxe wird weiterhin die Progestagen-Behandlung über 2–3 Wochen nach der Übertragung diskutiert, eine Beeinträchtigung der Lutealfunktion wurde nach transzervikalem Transfer jedoch selten beobachtet [53]. Da von erfahrenen Operateuren auch ohne jegliche unterstützende Behandlung hohe Trächtigkeitsraten erzielt wurden [16, 38], sollte besonders auf die schonende Übertragungstechnik geachtet werden, bei der die Transferpipette ohne großen Widerstand in den Uteruskörper eingeführt und der Embryo sicher vor der inneren Muttermundöffnung im Gebärmutterkörper abgesetzt wird.

Zyklussynchronität der Spender- und Empfängerstute

Den größten Einfluss auf die Trächtigkeitsrate nach der Übertragung des Embryos hat die Synchronität der Spender- und Empfängerstute. Durch die große Variabilität der Rossedauer wird die Ovulationsterminierung bei Spender- und Empfängerstute erschwert. Es wurden ähnliche Trächtigkeitsraten bei

Empfängerstuten erzielt, die einen Tag vor bis zu 3 Tagen nach der Spenderstute (D-1 bis D3) ovulierten [54]. Außerhalb dieses Zeitfensters sinkt die Erfolgsrate jedoch drastisch.

In der Regel wird der Transfer eines 7–8 Tage alten Embryos auf eine Empfängerstute praktiziert, die 0–2 Tage nach der Spenderstute ovulierte. Um diese Synchronität zu erreichen, steht normalerweise eine Rezipientenherde oder ein Minimum von 2–3 Empfängerstuten zur Verfügung, bei denen mit unterschiedlichen Hormonregimen [50] die Rosse und Ovulation induziert wird. Ein einfaches Behandlungsschema sieht die Rosseinduktion mit PGF2 α bei einem funktionellen, mindestens 5 Tage alten Gelbkörper vor, wobei die zeitliche Abstimmung der Injektion bei Spender- und Empfängerstute von der Größe der Ovarfollikel abhängt. Sobald beide Stuten deutliche Rossesymptome zeigen, werden tägliche Follikelkontrollen durchgeführt. Die „Feinabstimmung“ erfolgt mit humanem Choriongonadotropin (hCG, Ovogest®, Intervet, ORT) oder GnRH-Implantaten (Ovuplant®, Selectavet, Weyarn), welches bei Follikeln > 35 mm zur Ovulationsauslösung innerhalb von 36–48 Stunden nach der Injektion führt. Wenn bei der Spenderstute die Ovulation beobachtet wird, erfolgt die medikamentöse Auslösung der Ovulation bei der Empfängerstute, wodurch sie im optimalen Zeitfenster bis zu 2 Tagen nach der Ovulation der Spenderstute ovuliert.

Alter, Geschlechtsgesundheit und Größe der Empfängerstute

Obwohl die Synchronität der Empfängerstute den wichtigsten Einflussfaktor für den Erfolg der Embryonenübertragung darstellt, werden noch weitere Aspekte bei der Auswahl eines geeigneten Rezipienten berücksichtigt. Die Empfängerstuten sollten in gutem Allgemein- und Ernährungszustand und relativ jung (3–12 Jahre) sein, da Alter ein prädisponierender Faktor für Trächtigkeitsverluste aufgrund endometrialer Degeneration ist [55]. Bei der Beurteilung der Genitalgesundheit sollte neben normalen Zyklusintervallen und Freisein von pathologischen Veränderungen (z. B. endometrialer Zysten, uterine Flüssigkeitsansammlungen, Pneumovagina) besonders Augenmerk auf die Zervix und

den uterinen Tonus gelegt werden. Falls infolge von Zervixverletzungen die Passage der Pipette in den Uterus erschwert ist, sinken die Erfolgsaussichten bei der transzervikalen Übertragung. Ein geringer uteriner und zervikaler Tonus um den Zeitpunkt der Übertragung (ca. Tag 5 nach der Ovulation) ist ebenfalls mit einer niedrigeren Trächtigkeitsrate und einem höheren Risiko des Trächtigkeitsverlustes verbunden [11].

Ein häufig diskutierter Aspekt ist die Größe der Empfängerstute im Verhältnis zu Spenderstute und Hengst. Mehrere Studien in Newmarket, bei denen Vollblutembryonen auf Ponystuten und umgekehrt transferiert wurden, zeigten, dass ein Ungleichgewicht zwischen „genetischer Größe“ des Embryos und Empfängerstute die intrauterine und postnatale Entwicklung beeinflussen. Eine Übertragung auf kleinere Empfängerstuten führt zu einer Wachstumsverzögerung des Fetus, die postnatal unter Umständen nicht vollständig kompensiert werden [56]. Vollblutfohlen, die sich in einem Ponyuterus entwickelten, zeigten nach der Geburt deutliche Anzeichen von Unreife [57]. Aus eigener Erfahrung wurde jedoch bei der Übertragung von Warmblutembryonen auf Traber-, Vollblut- oder Freibergerstuten eine geringfügig reduzierte Geburtsgröße in der postnatalen Entwicklung kompensiert.

Schlussfolgerung

In den vergangenen Jahren konnten durch zahlreiche wissenschaftliche Untersuchungen Verbesserungen in der Embryonengewinnung und -übertragung, des gekühlten Transports und der Tiefgefrierkonservierung equiner Embryonen erzielt werden. Durch Einführung des praxisreifen Embryotransfers und der zunehmenden Akzeptanz in der deutschen Pferdezucht nahm die Embryotransferaktivität bei der Stute in Deutschland seit 2003 rasant zu, sodass im Jahr 2009 bereits 431 tragende Empfängerstuten registriert wurden [5]. Der equine Embryotransfer zieht weiterhin das wissenschaftliche Interesse auf sich, um durch eine Verbesserung der Superovulationsprotokolle, der Kryokonservierung und der In-vitro-Produktion equiner Embryonen die Effizienz des Embryotransfers und assoziierter Biotechnologien beim Pferd zu steigern.

■ Relevanz für die Praxis

Der kommerzielle Embryotransfer hat in den vergangenen Jahren Einzug in die deutsche Pferdezucht gehalten. Neben der Anzahl der zugelassenen Embryotransfereinrichtungen nimmt auch das Interesse der Pferdepraxis an der Methodik der transzervikalen Embryonengewinnung und -übertragung sowie der -aufbereitung und des Versandes gekühlter Embryonen stetig zu. Verschiedene Einflussfaktoren auf die Embryogewinnungsrate der Spenderstuten und Trächtigkeitsrate bei den Empfängerstuten sollten berücksichtigt werden, um unter Praxisbedingungen hohe Erfolgsraten im equinen Embryotransfer zu erzielen.

Literatur:

- Allen WR, Rowson LEA. Transfer of ova between horses and donkeys. Proceedings of the 7th International Congress on Animal Reproduction and AI, Munich, 1972; 484–78.
- Oguri N, Tsutsumi Y. Non-surgical egg transfer in mares. J Reproduction Fert 1974; 41: 313–20.
- Hudson JJ, McCue PM. How to increase embryo recovery rates and transfer success. Proc Am Ass equine Practns 2004; 50: 406–8.
- Carney NJ, Squires EL, Cook VM, Seidel GE Jr, Jasko DJ. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. Theriogenology 1991; 36: 23–32.
- Jahresbericht 2009 der Deutschen Reiterlichen Vereinigung (FN) e.V. <http://www.pferd-aktuell.de/Pferdethemen-A-Z/J-wie-Jahresturnierlizenz/Jahresbericht-FN/-4861/Jahresbericht-FN.htm>
- McCue PM. Superovulation. Vet Clin North Am Equine Pract 1996; 12: 1–11.
- Squires EL, McCue PM, Vanderwall D. The current status of equine embryo transfer. Theriogenology 1999; 51: 91–104.
- Battut I, Colchen S, Fieni F, Tainturier D, Bruyas JF. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. Equine Vet J (Suppl) 1997; 25: 60–2.
- Battut I, Grandchamp des Raux A, Nicaise JL, Fieni F, Tainturier D and Bruyas JF. When do equine embryos enter the uterine cavity? An attempt to answer. R&W Publications, Newmarket; 2001.
- McKinnon EL. Morphologic assessment of the equine embryo. J Amvetmed Ass 1988; 192: 401–6.
- Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall DK, McCue PM. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. Theriogenology 2000; 54: 965–79.
- McCue PM, Niswender KD, Macon KA. Modification of the flush procedure to enhance embryo recovery. Jequine vet Sci 2003; 23: 336–7.
- Squires EL, Carnevale EM, McCue PM, Bruemmer JE. Embryo technologies in the horse. Theriogenology 2003; 59: 151–70.
- Allen WR (ed). Embryotransfer in the horse. CRC Press, Boca Raton, FL, 1982.
- Squires EL, Garcia RH, Ginther OJ. Factors affecting the success of equine embryo transfer. Equine Vet J (Suppl) 1985; 3: 920–5.
- Jasko DJ. Comparison of pregnancy rates following non-surgical transfer of day 8 embryos using various transfer devices. Theriogenology 2002; 58: 713–6.
- Carnevale EM, Squires EL, McKinnon AO. Comparison of Ham's F10 with CO2 or Hepes buffer for storage of equine embryos at 5°C for 24 h. J Anim Sci 1987; 65: 1775–81.
- Pashen RL. Short-term storage and survival of horse embryos after refrigeration at 4°C. J Reprod Fert (Suppl) 1987; 35: 697–8.
- Yanamoto Y, Oguri N, Tsutsumi Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. J Reprod Fert (Suppl) 1982; 32: 399–403.
- Czlonkowska M, Boyle MS, Allen WR. Deep freezing of horse embryos. J Reprod Fert 1985; 75: 485–90.
- Slade NP, Takeda T, Squires EL, Eldsen RP, Seidel GE Jr. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. Theriogenology 1985; 24: 45–58.
- Skidmore JA, Boyle MS, Allen WR. A comparison of two different methods of freezing horse embryos. J Reprod Fert (Suppl) 1991; 44: 714–6.
- Tharasanit T, Colenbrander B, Stout TA. Effect of cryopreservation on the cellular integrity of equine embryos. Reproduction 2005; 129: 789–98.
- Betteridge KJ, Eaglesome MD, Mitchell D, Flood PF, Beriault R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. J Anat 1982; 135: 191–209.
- Flood PF, Betteridge KJ, Dicoee MS. Transmission electron microscopy of horse embryos 3–16 days after ovulation. J Reprod Fert (Suppl) 1982; 32: 319–27.
- Legrand E, Bencharif D, Battut I, Tainturier D, Bruyas JF. Horse embryo freezing: Influence of thickness of the capsule. Proceedings of the 15th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association, Lyon, France, 1999; 184–5.
- Bruyas JF, Sanson JP, Battut I, Fiéni F, Tainturier D. Comparison of the cryoprotectant properties of glycerol and ethylene glycol for early (day 6) equine embryo. J Reprod Fert (Suppl) 2000; 56: 549–60.
- Lagneaux D, Pomarici A, Sattler M, Bruneau T, Duchamp G, Camillo F. Effect of L-glutamine for freezing equine embryos-evaluation of DAPI staining and transfer of multiple embryos to recipient mare. J Reprod Fert (Suppl) 2000; 56: 561–8.
- Meira C, Alvarenga MA, Pappa OF, Abba E, Landon E, Alvarenga FC. Cryopreservation of equine embryos using glycerol and 1,2-propanediol as cryoprotectants. Equine Vet J (Suppl) 1993; 15: 64–6.
- Ferreira JCP, Meira C, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Alvarenga MA, Buratini J. Cryopreservation of equine embryos with glycerol plus sucrose and glycerol plus 1,2-propanediol. Equine Vet J (Suppl.) 1997; 25: 88–94.
- Huhtinen MSA, Paranko J. Comparison of glycerol and ethylene glycol in equine embryo freezing using confocal microscopy, DAPI-staining and non-surgical transfer. Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer. In: Katila T, Wade JF (eds), Havemeyer Foundation Monograph Series 3, R&W Publications, Newmarket, 2000; 3: 52–4.
- Oberstein N, O'Donovan MK, Bruemmer JE, Seidel GE Jr, Carnevale EM, Squires EL. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. Theriogenology 2001; 55: 607–13.
- Moussa M, Bersinger I, Doligez P, Guignot F, Duchamp G, Vidament M, Mermillod P, Bruyas JF. In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. Theriogenology 2005; 64: 1619–32.
- Eldridge-Panuska WD, Caracciolo di Rienza V, Seidel GE, Squires EL, Carnevale EM. Establishment of pregnancies after series dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. Theriogenology 2005; 63: 1308–19.
- Stout TAE. Selection and management of the embryo transfer donor mare. Pferdeheilkunde. 2003; 19: 685–8.
- Vogelsang SGVM. Influence of donor parity and age on the success of commercial equine embryo transfer. Equine vet J (Suppl) 1989; 8: 71–2.
- Meadows S LH, Welsh C. Factors affecting embryo recovery, embryo development and pregnancy rate in a commercial embryo transfer programme. In: Allen WR, Wade JF (eds). Proceedings of the 1st European Equine Gamete Group, Havemeyer Foundation Monograph Series 1, 2000; 61–2.
- Losinno LAJ, Lisa H. Impact of multiple ovulations in a commercial equine embryo transfer programme. In: Katila T, Wade JF (eds). Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation Monograph Series 3, R&W Publications, Newmarket 2001; 81–3.
- Boyle MSSM, Skidmore J, Allen WR. Use of serial progesterone measurements to assess cycle length, time of ovulation and timing of uterine flushes in order to recover equine morulae. Equine Vet J (Suppl) 1989; 8: 10–2.
- Newcombe JR. Incidence of multiple ovulation and multiple pregnancy in mares. Vet Rec 1995; 137: 121–3.
- Day F. Clinical and experimental observations on reproduction in the mare. J Agric Sci Camb 1940; 30: 244–61.
- Ginther OJ, Bergfelt DR. Effect of GnRH treatment during the anovulatory season on multiple ovulation rate and on follicular development during the ensuing pregnancy in mares. J Reprod Fert 1990; 88: 119–26.
- Fortune JK. Purified pig FSH increases the rate of double ovulations in the mare. Equine Vet J (Suppl) 1993; 15: 95–8.
- Hofferer S, Duchamp G, Palmer E. Ovarian response in mares to prolonged treatment with exogenous equine pituitary gonadotrophins. J Reprod Fert (Suppl) 1991; 44: 341–9.
- McKinnon AO, Brown RW, Pashen RL, Greenwood PE, Vasey JR. Increased ovulation rates in mares after immunisation against recombinant bovine inhibin alpha-subunit. Equine Vet J 1992; 24: 144–6.
- McCue PM. Effect on ovulation rate of passive immunization of mares against inhibin. Equine Vet J (Suppl) 1993; 15: 103–6.
- Combarrous Y, Richard F, Martinat N. Mammalian follicle-stimulating hormone receptors and their ligands. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1998; 77: 125–30.
- Briant C, Toutain PL, Ottogalli M, Magallon T, Guillaume D. Kinetic studies and production rate of equine (e) FSH in ovariectomized pony mares. Application to the determination of a dosage regimen for eFSH in a superovulation treatment. J Endocrinol 2004; 182: 43–54.
- Jennings MW, Boime I, Daphna-Iken D, Jablonka-Shariff A, Conley AJ, Colgin M, Bidstrup LA, Meyers-Brown GA, Famula TR, Roser JF. The efficacy of recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) to promote follicular growth in mares using a follicular suppression model. Anim Reprod Sci 2009; 116: 291–307.
- Allen WR. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. Reprod Domest Anim 2005; 40: 310–29.
- Handler J, Konigshofer M, Kindahl H, Schams D, Aurich C. Secretion patterns of oxytocin and PGF2alpha-metabolite in response to cervical dilatation in cyclic mares. Theriogenology 2003; 59: 1381–91.
- Kask K, Odensvik K, Kindahl H. Prostaglandin F2alpha release associated with an embryo transfer procedure in the mare. Equine Vet J 1997; 29: 286–9.
- Stout TAE, Knaap J, Daels PF, Colenbrander B. Does compromised luteal function contribute to failure to establish pregnancy after non-surgical embryo transfer? In: Alvarenga M, Wade JF (eds). Proceedings of the 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation Monograph Series 14, R&W Publications, Newmarket; 2005: 8–9.
- Allen WR. Transfer of ova between horses and donkeys. Proceedings of the 7th International Congress on Animal Reproduction and AI, Munich, 1972: 484–7.
- Ricketts SW, Alonso S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. Equine Vet J 1991; 23: 189–92.
- Allen WR, Wilsher S, Tiplady C, Butterfield RM. The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal Growth. Reproduction 2004; 127: 67–77.
- Ousey JC, Rossdale PD, Fowden AL, Palmer L, Turnbull C, Allen WR. Effects of manipulating intrauterine growth on post natal adrenocortical development and other parameters of maturity in neonatal foals. Equine Vet J 2004; 36: 616–21.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

☒ Medizintechnik-Produkte



Neues CRT-D Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

☒ Bestellung e-Journal-Abo

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

Impressum

Disclaimers & Copyright

Datenschutzerklärung