

## 1. Einleitung

In den vergangenen Jahrzehnten wurden auf dem Gebiet der Verbesserung der Fruchtbarkeitsleistung und der Biotechnik große Fortschritte erzielt. Besonders die künstliche Besamung gehört heute zu den wichtigsten Fortpflanzungstechniken in der Tierzucht. Daneben hat auch der Embryotransfer (ET) an Bedeutung gewonnen. Durch Anwendung des ET können beim Rind die Nachkommenschaften um das 10- bis 20-fache, in Ausnahmefällen auch um das 50-fache erhöht werden. ET-assoziierte Maßnahmen wie Teilung, Geschlechtsbestimmung und Tiefgefrierkonservierung von Embryonen, in-vitro-Befruchtung und Gentransfer eröffnen zusätzliche züchterische Möglichkeiten. In der kommerziellen Schweinehaltung oder bei der Verbreitung überlegener Genetik aus Zuchtbetrieben in kommerzielle Herden wird beim Schwein bis auf die intensiv angewandte künstliche Besamung gegenwärtig keines der genannten Verfahren routinemäßig eingesetzt. Dies liegt zum einen an der hohen Fruchtbarkeit beim Schwein, die den Nutzen zusätzlicher Nachkommen einschränkt, und zum anderen an den derzeit noch wenig praxistauglichen Verfahren.

Dennoch können im Zusammenhang mit dem weltweiten Anwachsen der Schweineproduktion international operierende Organisationen großen Nutzen aus der Möglichkeit eines Transportes von Embryonen anstatt lebender Tiere ziehen. Neben einer erheblichen Reduzierung der Transportkosten können damit auch die Risiken einer weltweiten Krankheitsverschleppung minimiert werden. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn die Embryonen vor dem Transport tiefgefroren werden können. Auch die Seuchenausbrüche der Europäischen Schweinepest oder der Aujeszky'schen Krankheit in den letzten Jahren haben dazu geführt, daß eine Konservierung der Genetik wertvoller Zuchtbestände über eine Tiefgefrierung von Embryonen wünschenswert wäre. Obwohl sowohl die Gewinnung als auch der Transfer von Embryonen chirurgisch erfolgen kann, würde die Möglichkeit, Embryonen mit minimal-invasiven Techniken wie der Endoskopie zu gewinnen und nichtchirurgisch transzervikal zu übertragen, die Effizienz und Rentabilität einer solchen Anwendung erhöhen und wäre auch unter Aspekten des Tierschutzes vorzuziehen. Letzteres, wie auch ein verbesserter Gesundheitsstatus der Schweineherden durch den Transport von

Embryonen statt lebender Tiere, sind wichtig für eine Akzeptanz dieser Verfahren durch die Öffentlichkeit.

Ein Problem des unblutigen Embryotransfers beim Schwein stellt die im Verhältnis zur künstlichen Besamung zumeist niedrige Abferkelrate der Empfänger bei unbefriedigender Wurfgröße und einer infolgedessen geringen Überlebensrate der übertragenen Embryonen dar. Dies gilt insbesondere, wenn die Embryonen im Uteruskörper abgesetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen anhand von Embryotransferversuchen, Hormonergänzung nach ET und Steroidrezeptornachweis im Uterus drei Problemfelder untersucht werden, die als Gründe für die niedrigen Trächtigkeits- und Überlebensraten in Frage kommen.

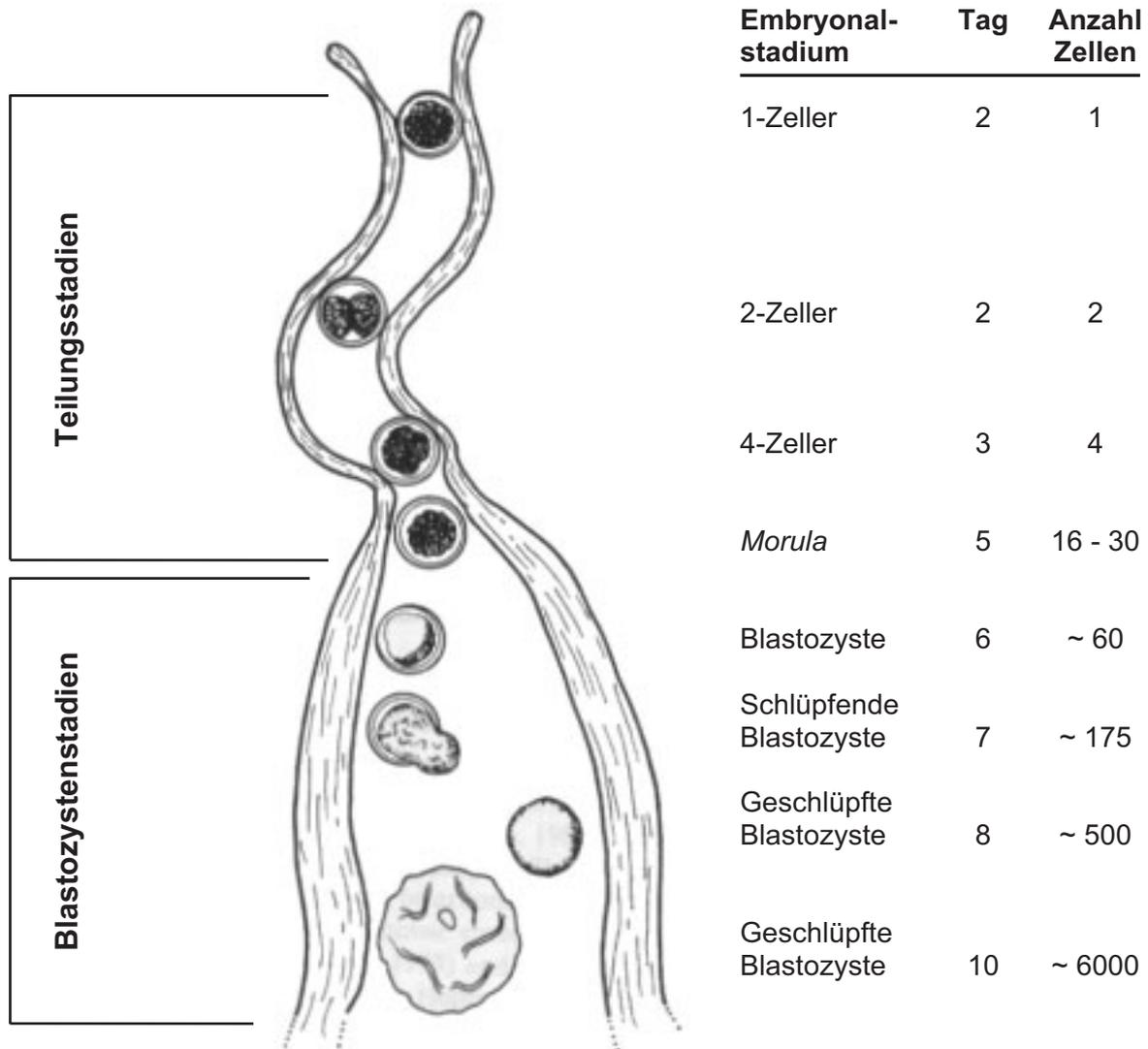
Gegenüber zahlreichen Haustierarten und nicht zuletzt dem Menschen befindet sich die Tiefgefrierkonservierung beim Schwein noch im experimentellen Stadium. Dies liegt an einer sehr hohen Kältesensitivität porciner Embryonen, die bei konventionellen Einfrierverfahren rasch zum Absterben derselben führt. Eine erfolgreiche Kryokonservierung von Embryonen würde zusätzliche Anwendungsmöglichkeiten des Embryotransfers beim Schwein bieten, da die Embryogewinnung nach wie vor die Notwendigkeit birgt, passende Empfängertiere zeitgleich zur Verfügung haben zu müssen. Daher wurde im letzten Teil eine neue Tiefgefriermethode getestet.

## 2. Übertragung von Embryonen in verschiedene Uterusabschnitte

### 2.1 Literaturübersicht

#### 2.1.1 Embryonalentwicklung bis zur Implantation

Während des 48 bis 72 Stunden dauernden Östrus des Schweines kann es zur erfolgreichen Befruchtung der im letzten Drittel der Brunst ovulierten Eizellen kommen. Ihr folgt eine im Mittel 115 Tage dauernde Trächtigkeit. Nach der Befruchtung der Oozyte am Übergang von Eileiterampulle zum Isthmus erfolgt die erste Teilung 17 bis 19 Stunden nach der Ovulation (STROBAND und VAN DER LENDE, 1990). Das 2-Zell-Stadium dauert 6 bis 8 Stunden, das sich anschließende 4-Zell-Stadium 20 bis 24 Stunden (OXENREIDER und DAY, 1965; HUNTER, 1974; ANDERSON, 1978). PRATHER und FIRST (1988) stellten fest, daß im 4-Zell-Stadium die Entwicklungskontrolle vom Muttertier auf den Embryo übergeht, der ab diesem Stadium erstmals eigene DNA synthetisiert. Die Embryonen treten in der Regel im 4- bis 8-Zell-Stadium in den *Uterus* über (OXENREIDER und DAY, 1965; PERRY und ROWLANDS, 1962) und verbleiben die nächsten 2 bis 3 Tage in der Hornspitze. Da auch unbefruchtete Eizellen in den *Uterus* gelangen, stellten STROBAND und VAN DER LENDE (1990) fest, daß der Übertritt vom Eileiter in den *Uterus* unabhängig von einer Befruchtung der Oozyte erfolgt. Das 8- bis 16-Zell- bzw. frühe Morulastadium wird um den Tag 4 nach der Ovulation erreicht (STROBAND und VAN DER LENDE, 1990). Am Tag 5 *post coitum* (*p.c.*) erfolgt im Morulastadium die Kompaktierung (HUNTER, 1974), bei der sich die einzelnen Blastomeren enger zusammengruppierten und nicht mehr deutlich voneinander abzugrenzen sind. Von diesem Zeitpunkt an können die Embryonen selektiv Steroide aufnehmen (NIEMANN und ELSAESSER, 1986, 1987). Am Tag 5 bis 6 *p.c.* erreichen Schweineembryonen das Blastozystenstadium. Die Umwandlung von der kompaktierten *Morula* zur Blastozyste scheint durch geringe Mengen Östradiol-17 $\beta$  aus der Uterusflüssigkeit (ZAVY *et al.*, 1980) vermittelt zu werden (NIEMANN und ELSAESSER, 1986, 1987). Bis zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Embryonen in der Uterushornspitze und beginnen ab Tag 6 in Richtung Uteruskörper zu wandern (POPE *et al.*, 1982b; DZIUK, 1985) und sich gleichmäßig über beide Uterushörner zu verteilen (OXENREIDER und DAY, 1965).



**Abbildung 1:** Teilungs- und Blastozystenstadien von Schweineembryonen bis Tag 10 der Embryonalentwicklung (nach DAVIS, 1985)

Bei einem Durchmesser von etwa 0,5 bis 1,0 mm „schlüpft“ der expandierte Embryo aus der *Zona pellucida* und setzt seine Expansion auf 2 bis 6 mm bis Tag 10 der Trächtigkeit fort (Abb. 1). Diese Expansion scheint unabhängig von Östrogenen vonstatten zu gehen (NIEMANN und ELSAESSER, 1987). Danach erfolgt ein rasches Längenwachstum (Elongation) zwischen den Tagen 10 und 16. Die Schweineblastozysten unterliegen während dieser Entwicklung deutlichen morphologischen Veränderungen. Zwischen den Tagen 10 und 12 der Trächtigkeit entwickelt sich der Trophoblast des Embryos von einer kugelartigen (sphärischen) Form, mit 3 bis 10 mm Durchmesser, zur röhrenartigen (tubulären) Form, mit 10 bis 50 mm Länge, um anschließend in einer fadenförmigen (filamentösen) Form am Tag 16 der Trächtigkeit Längen von 700 bis 1000 mm zu erreichen (PERRY und ROWLANDS, 1962; ANDERSON, 1978;

STROBAND und VAN DER LENDE, 1990). Zwischen dem kugelförmigen und frühen filamentösen Stadium verlängern sich die Blastozysten mit 30 bis 45 mm/h und zwar anscheinend nur durch zelluläre Umwandlungsprozesse des Trophektoderms und des Endoderms sowie einer Reorganisation des Zytoskeletts und nicht durch einen Anstieg in der Mitoseaktivität (GEISERT *et al.*, 1982b; MATTSON *et al.*, 1990; PUSATERI *et al.*, 1990). Die Elongation von der röhrenförmigen zur beginnenden fadenförmigen Morphologie, mit etwa 150 mm Länge, vollzieht sich innerhalb eines Zeitraumes von etwa 2 bis 3 Stunden (GEISERT *et al.*, 1982b). Der oder die Auslöser für die Elongation sind nach wie vor unklar, wobei nach ALBERTINI *et al.* (1987) Veränderungen in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts des Embryo beteiligt sind. YELICH *et al.* (1997) vermuten zusätzlich eine Beteiligung des Retinsäurerezeptors (RAR), des retinolbindenden Proteins (RBP) und des „transforming growth factors“ (TGF) an der schnellen Trophoblastenelongation. Die Anwesenheit von Östriol (E<sub>3</sub>) in der Uterusflüssigkeit ist mit der Blastozystenelongation assoziiert, während die Anwesenheit von Prostaglandinen in der uterinen Flüssigkeit für die Elongation nicht notwendig zu sein scheint (GEISERT *et al.* 1982a, 1986). Am Tag 12 sind die Embryonen gleichmäßig im *Uterus* verteilt (DHINDSA *et al.*, 1967; DZIUK, 1985). Bis zu diesem Zeitpunkt können sie durch den *Uterus* wandern, müssen aber vor dem Tag 13 an der Stelle angekommen sein, an der sie implantieren werden, um überleben zu können (POLGE und DZIUK, 1970). Die Anheftung der Embryonen ist um den Tag 18 mit der charakteristischen Verflechtung der Mikrovilli von Embryo und Muttertier abgeschlossen (PERRY *et al.*, 1973; DANTZER, 1985).

### 2.1.1.1 Embryonenwanderung und -verteilung

Zwischen Tag 6 und 7 schlüpfen die Blastozysten aus der *Zona pellucida* und beginnen eine Wanderung durch die Uterushörner, wobei einige Embryonen bereits am Tag 8 das gegenüberliegende Horn erreicht haben (DHINDSA *et al.*, 1967). Transferversuche mit genetisch markierten Embryonen von DZIUK *et al.* (1964) belegten, daß sich transferierte Embryonen durchmischen und nicht unbedingt in dem Uterushorn anheften, in welches sie übertragen worden sind. Das Phänomen der Embryonenwanderung ist zwar noch nicht hinlänglich geklärt, es wird aber vermutlich durch freies Östradiol und Histamine im Uterussekret gesteuert (POPE *et al.*, 1982b; SCHILLING *et al.*, 1982).