

# **Ansätze zur Verbesserung der Trächtigkeitsrate bei Empfängerstuten in Embryotransferprogrammen**

Christine Auricha<sup>a,b</sup>, Petra Koblichkea, Sven Budik<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Graf-Lehndorff-Institut für Pferdewissenschaften, D-16845 Neustadt (Dosse)

<sup>b</sup>Besamungs- und ET-Station, Vet.-Med Universität, A-1210 Wien

## **Einleitung**

Der Embryotransfer (ET) als eine neue Reproduktionsbiotechnik wird zunehmend auch in der Pferdezucht angeboten. Der ET ermöglicht es, Leistungsstuten parallel sowohl im Turniersport als auch in der Zucht einzusetzen, mehrere Fohlen pro Jahr von einer Stute zu erhalten oder Embryonen aus zweijährigen oder aus sehr alten Stuten durch Empfängerstuten austragen und aufziehen zu lassen.

Der Erfolg des ET wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst, und die mittels ET erzielten Trächtigkeitsraten zeigen eine hohe Variabilität. Mit adäquater Ausrüstung und Erfahrung des ET-Tierarztes ist bei Verwendung fertiler Embryonenspender heute eine Embryonengewinnungsrate von 60 bis 70% erreichbar. Dagegen ist die Trächtigkeitsrate der Empfängerstuten nach Übertragung eines Embryos oft nicht zufriedenstellend und erreicht nur selten 65% (Hinrichs et al., 1993; Carnevale et al., 2000). Neue Ansätze zur Verbesserung der Trächtigkeitsrate beim ET sollten sich daher vor allem mit den Empfängerstuten befassen. Folgende Gründe werden für schlechte Trächtigkeitsraten nach ET angenommen:

- (1) Asynchronität des Sexualzyklus von Spender- und Empfängerstute und dadurch Übertragung des Embryo in einen Uterus, der für die Etablierung einer Trächtigkeit keine optimalen Bedingungen bietet
- (2) Verwendung von Stuten mit herabgesetzter Fruchtbarkeit als Embryonempfänger
- (3) Auslösung einer Entzündungsreaktion des Endometriums (Gebärmutterschleimhaut) durch die Übertragung des Embryos mit nachfolgendem Absterben des Embryos (Allen, 2005).
- (4) Mechanische Irritation des Endometriums bei der Embryonenübertragung mit nachfolgender Prostglandinfreisetzung und Rückbildung des Gelbkörpers vor der maternalen Erkennung der Trächtigkeit (Handler et al., 2003).

Während (1) und (2) durch die Verfügbarkeit einer ausreichenden Anzahl geschlechtsgesunder Empfängerstuten und exakte Ermittlung des Ovulationszeitpunktes von Spender- und Empfängerstuten vermieden werden können, erfordern (3) und (4) eine experimentelle Überprüfung und darauf aufbauende Behandlungsansätze. Ziel der eigenen Studien war es, den Einfluss einer entzündungshemmenden Behandlung auf die Trächtigkeitraten nach transzervikalem ET sowohl hinsichtlich der Pathomechanismen als auch in der praktischen Anwendung eines ET-Programms zu untersuchen. Dabei lagen die Hypothesen zugrunde, dass es zu einer

durch den Transfer ausgelösten Entzündung im Endometrium kommt, die wiederum zu einer vermehrten Prostaglandinsynthese und Luteolyse führt.

## **Material und Methoden**

In Experiment 1 wurden 27 ETs in 3 Gruppen durchgeführt (n=9/Gruppe). Die Empfängerstuten der Behandlungsgruppen M und F wurden vom 1. bis zum 4. Tag nach dem ET je nach Gruppenzugehörigkeit mit den nicht steroidal entzündungshemmenden Meclofenaminsäure bzw. Flunixin Meglumin behandelt. Den Tieren der Kontrollgruppe (C) 0,9% NaCl 1x tgl. i.v. verabreicht. Vier Tage später wurde eine Rückgewinnung der Embryonen durchgeführt. Im positiven Fall erfolgte eine Beurteilung der Embryonengröße und -qualität. Weiterhin wurde nach der Spülung eine Endometriumsbiopsie zur histologischen und biochemischen Auswertung entnommen. Zur Feststellung einer eventuellen bakteriellen Kontamination wurden verschiedene Tupferproben genommen. Zur Messung von Prostaglandinmetaboliten (PGFM) und Progesteron wurden wiederholt Blutproben entnommen (Koblischke et al. 2008).

In Experiment 2 wurden 14 Embryonen auf Empfängerstuten übertragen. Die Empfängerstuten wurden mit den nicht steroidal entzündungshemmenden Flunixin Meglumin am Tag des ET und Vedaprofen an den beiden folgenden Tagen behandelt (Koblischke, 2008).

## **Ergebnisse und Diskussion**

Experiment 1: In 10 Fällen konnte ein Embryo 4 Tage nach dem Transfer zurückgewonnen werden (Gruppe M: n=4, Gruppen F und C je n=3). Es lag kein Einfluß der Behandlung auf Wiederfindungsrate, Embryonenqualität und -größe vor. Bei 3 Tieren in Gruppe C kam es zu einer vorzeitigen Luteolyse (Abnahme der Progesteronkonzentration unter 1 ng/ml), die PGFM Sekretion war in dieser Gruppe im Vergleich zu den Behandlungsgruppen an den Tagen 2 bis 4 nach der Embryonenübertragung signifikant höher ( $p < 0,05$ ). Folge einer Luteolyse ist in jedem Fall der Verlust des Embryos.

In Übereinstimmung mit der erhöhten PGFM-Konzentration war auch die Zahl der Epithelzellen mit positiver Anfärbung für das Enzym COX-2 (Cyclooxygenase 2) in der Uterusschleimhaut bei Stuten der Gruppe C höher ( $62,6 \pm 14,2$  Zellen/Gesichtsfeld) als in den Behandlungsgruppen M ( $23,3 \pm 7,6$ ) und F ( $17,5 \pm 2,1$ ;  $p < 0,01$ ). COX-2 ist ein Schlüsselenzym der maternalen Trächtigkeitserkennung (Boerboom et al. 2004) und seine Zunahme bei unbehandelten ET-Empfängerstuten deutet darauf hin, dass der ET luteolytische Mechanismen aktiviert, die durch die Behandlung in den Gruppen M und F blockiert wurden.

Die histologische Auswertung der Endometriumsbiopsien ergab eine stärkere Infiltration der oberflächlichen Gewebeschichten mit Entzündungszellen (neutrophilen Granulozyten) bei den Tieren der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Eine bakterielle Besiedlung konnte nur sporadisch nachgewiesen werden, meist handelte es sich um geringgradige Kontamination mit Schleimhautflora. Auch ohne bakterielle Kontamination indu-

ziert die Embryonenübertragung damit bei den Empfängerstuten über mehrere Tage eine vermehrte Einwanderung von neutrophilen Granulozyten.

In Experiment 1 konnte damit nachgewiesen werden dass durch den transzervikalen Embryotransfer eine subklinische Entzündungsreaktion des Endometriums hervorgerufen wird, die die Etablierung einer Trächtigkeit verhindert. Eine Behandlung mit nicht-steroidalen Entzündungshemmern unterdrückt diese ET-induzierte Entzündungsreaktion.

Experiment 2: Die Embryonengewinnungsraten in einem kommerziellen E-Programm unterschieden sich deutlich zwischen Stutengruppen. Mit 13 Embryonenspülungen bei Sportstuten konnten 10 Embryonen gewonnen und mit 5 Spülungen bei Zuchtstuten, die im Vorjahr nicht tragend geworden waren, 4 Embryonen gewonnen werden. Bei Stuten in der Fohlenrosse (n=5) konnte dagegen in keinem Fall ein Embryo gewonnen werden. Solange Follikelkontrollen und Besamung ohne Einschränkungen durchgeführt werden können, sind Sportstuten damit als Embryonenspender gut geeignet. Training und Wettbewerb wirken sich auf die Fruchtbarkeit solcher Stuten nicht negativ aus.

Von 14 übertragenen Embryonen führten 11 zu einer Trächtigkeit (79%). Alle mit nicht-steroidalen Entzündungshemmern behandelten Empfängerstuten konnten bis zum 60. Tag der Trächtigkeit nachverfolgt werden und waren zu diesem Zeitpunkt weiterhin tragend. Dieses Ergebnis liegt deutlich über den in der Literatur beschriebenen Trächtigkeitsraten (Savage & Woodcock, 1988; Squires et al., 2003). Die Behandlung mit nicht-steroidalen Antiphlogistika verbessert daher die Trächtigkeitsrate von Embryonen-Empfängerstuten erheblich.

## **Zusammenfassung**

Die Embryonenübertragung induziert bei den Empfängerstuten eine subklinische Entzündung des Endometrium und eine vermehrte Prostaglandinsekretion, z.T. mit nachfolgender Luteolyse. Die Behandlung mit nicht-steroidalen Antiphlogistika reduziert das Ausmaß dieser Entzündung erheblich und führt damit zu hohen Trächtigkeitsraten nach Embryonenübertragung beim Pferd. Eine solche Behandlung sollte daher in ET-Programmen routinemäßig bei allen Stuten durchgeführt werden.

## **Literatur**

- (1) Allen W.R. (2005): The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reprod. Dom. Anim.* 40: 310-329
- (2) Boerboom, D., Brown, K.A., Vaillancourt, D., Poitras, P., Goff, A.K., Watanabe, K., Dore, M., Sirois, J. (2004): Expression of key prostaglandin synthases in equine endometrium during late diestrus and early pregnancy. *Biol. Reprod.* 70: 391-399
- (3) Carnevale E.M., Ramirez R.J., Squires E.L., Alvarenga M.A., Vanderwall D.K., McCue P.M. (2000): Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology* 54: 965-979

- (4) Handler, J., Königshofer, M., Kindahl, H., Schams, D., Aurich, C. (2003): Secretion patterns of oxytocin and PGF<sub>2</sub>alpha-metabolite in response to cervical dilatation in cyclic mares. *Theriogenology* 59: 1381-1391
- (5) Hinrichs, K. (1993): Embryo transfer in the mare: a status report. *Animal Reprod. Sci.* 33: 227-240.
- (6) Koblischke, P. (2008): Response of embryo recipient mares to treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. Wien, Vet.-Med. Univ., Diss.
- (7) Koblischke, P., Kindahl, H., Budik, S., Aurich, J.E., Palm, F., Walter, I., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Hoppen, H.-O., Aurich, C (2008): Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. *Theriogenology* 70: 1147-1158
- (8) Savage, N.C., Woodcock, L.A. (1988): Use of two-year old mares as embryo donors in a commercial embryo transfer programme. *Equine Vet. J. Suppl.* 8, 68-70.
- (9) Squires, E.L., Carnevale, E.M., McCue, P.M., Bruemmer, J.E. (2003): Embryo technologies in the horse. *Theriogenology* 59: 151-170

Die Untersuchungen wurden durch das Österreichische Bundesministerium für Landwirtschaft, Fortswirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft gefördert.

*Aurich C, Koblischke P, Budik S (2009) Ansätze zur Verbesserung der Trächtigkeitsrate bei Empfängerstuten in Embryotransferprogrammen. In: Gauly M, von Borstel U (Hrsg). Göttinger Pferdetage 2009, Zucht und Haltung von Sportpferden, FN-Verlag der Deutschen Reiterlichen Vereinigung, Warendorf, 264-269*