Aus dem Department für biomedizinische Wissenschaften
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für In-vivo und In-vitro Modelle

(vormals: Institut für Labortierkunde)

Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Maik Dahlhoff

Untersuchungen zur intrauterinen Spermienwanderung nach künstlicher Besamung bei der Maus

Bachelorarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von

Anabel Kammerlander

Wien, im Mai 2021

Betreuer: Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.sc.agr. Thomas Kolbe
Institut für In-vivo und In-vitro Modelle
Department für biomedizinische Wissenschaften
Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachter: Dr. med. vet. Jörg Burgstaller
Institut für Tierzucht und Genetik
Department für biomedizinische Wissenschaften
Veterinärmedizinische Universität Wien

1.Einleitung und Fragestellung 1

1.1 Künstliche Besamung 1

1.2 Künstliche Besamung als Alternative zur IVF 2

1.3 Fortpflanzung bei der Maus 3
1.3.1 Der Zyklus bei der Maus 3
1.3.2 Kopulation und Plugbildung 3

1.4 Fragestellung 4

2. Material und Methoden 5

2.1 Materialien 5
2.1.1 Haltungsmaterialien 5
2.1.2 Verbrauchsgegenstände 5
2.1.3 Laborgeräte 5

2.2 Tiere 6
2.2.1 Tierhaltung 6
2.2.2 Weibchen 6
2.2.3 Männchen 6
2.2.4 Vasektomierte Männchen 7

2.3 Methoden zur künstlichen Besamung 7
2.3.1 Östrusinduktion mittels Hormongabe oder pheromonaler Stimulation 7
2.3.2 Östrusbestimmung 8
2.3.2.1 Äußerliche Merkmale 9
2.3.2.2 Vaginaler Abstrich 9
2.3.2.3 Paarungsbereitschaft 11
2.3.3 Spermiengewinnung 11
2.3.3.1 Nebenhodenschwanzpräparation 12
2.3.3.2 Aufbereitung der Spermien 12
2.3.3.3 Auszählen der Spermien 13
2.3.4 Besamung 13
2.3.5 Vaginalplugkontrolle 16

2.4 Methoden zur Untersuchung der intrauterinen Spermienwanderung 17
2.4.1 Spülung der Uterushörner und der Eileiter 17
2.4.1.1 Präparation von Uterushorn und Eileiter 17
2.4.1.2 Spülung mit THY 18
2.4.1.3 Bewertung und Analyse der Spülung 19
2.4.2 Fluoreszenzmarkierung 19

3. Ergebnisse und Diskussion 21

3.1 Ergebnisse 21
3.1.1 Östrusbestimmung 21
3.1.2 Trächtigkeiten 22
3.1.3 Spülung der Uterushörner und Eileiter 22

3.1.4 Spülung mit Fluoreszenzmarkierung der Spermien 24

3.2 Diskussion *26*
3.2.1 Östrusbestimmung 26
3.2.2 Trächtigkeiten 26
3.2.3 Spülung von Spermien ohne Fluoreszenzmarkierung 27
3.2.4 Spülung von Spermien mit Fluoreszenzmarkierung 28
3.2.5 Weitere Überlegungen 28

4. Zusammenfassung 30

5. Summary 31

6. Literaturverzeichnis 32

7. Appendix 33

7.1 Glossar *33*

7.2 Abkürzungsverzeichnis *33*

7.3 Abbildungsverzeichnis *34*

7.4 Tabellenverzeichnis *34*

7.5 Herstellung der Medien *35*

1.Einleitung und Fragestellung

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Methode der nicht-chirurgischen Besamung bei der Maus (*Mus musculus*) erprobt und anschließend die intrauterine Spermienwanderung untersucht, um ein besseres Bild von den Abläufen, die sich nach einer solchen Besamung ereignen, zu bekommen. Diese weiterführenden Untersuchungen sollen außerdem eine Basis für weitere Forschungen, die als Ziel die routinemäßige Etablierung der künstlichen Besamung haben, bieten.

1.1 Künstliche Besamung

Die künstliche Besamung ist ein biotechnisches Verfahren, dessen Ursprung im Altertum liegt und das große Vorteile in der Tierzucht mit sich bringt.
Erfolgreiche Experimente mit dieser Methode wurden bereits in den Jahren 1779 – 1785 durch den Ordenspriester Larazzo Spellanzani durchgeführt.
Von da an wurde die künstliche Besamung als eine Methode der Tierproduktion stetig weiterentwickelt. Diese Entwicklungen führten auch zu der Möglichkeit, Spermien einzufrieren und zu lagern, was dem Verfahren den großen Durchbruch in der Mitte des 20. Jahrhunderts bescherte. In der Landwirtschaft bietet die künstliche Besamung zahlreiche Vorteile, wie die Erhöhung des Zuchtfortschritts durch und eine orts- und zeitunabhängige Reproduktion oder die Eindämmung von Seuchen. (Busch und Waberski 2007)

Auch bei Haustieren wurde die Methode der künstlichen Besamung weiterentwickelt, wenn auch zögerlicher als bei den landwirtschaftlichen Nutztieren. Durch das Wachstum der Hundezucht konnte auch ein steigender Bedarf an Samenübertragungen verzeichnet werden, wobei hier die Anzahl an Übertragungen mit Tiefgefriersperma jene mit Frischsamen übersteigt. (Busch und Waberski 2007)

Bei der Maus ist die künstliche Besamung als nicht-chirurgische Methode der Reproduktionsmedizin zwar beschrieben, allerdings noch nicht routinemäßig etabliert. Andere

Verfahren wie die *In-vitro*-Fertilisation (IVF) sind in diesem Bereich bislang vorherrschend. (Stone et al. 2015)

1.2 Künstliche Besamung als Alternative zur IVF

Sowohl durch die künstliche Besamung als auch durch die IVF kann die Entstehung entwicklungsfähiger Embryonen erreicht werden. Bei beiden Methoden können frisch gewonnene, wie auch kryokonservierte Spermien verwendet werden.
Die *In-vitro* Produktion von Mäusen besteht aus der Entnahme zahlreicher gereifter Oozyten, einer Befruchtung, die *in-vitro* stattfindet (IVF), und einer anschließenden Übertragung der befruchteten Eizellen in ein Ammentier zur Weiterentwicklung. Dieses Verfahren ist somit zeitaufwändig und bedarf vieler Ressourcen, sowie hohem technischen Geschick. (Stone et al., 2015)

Das Prinzip der künstlichen Besamung beruht darauf, die Spermien – welche in folgender Arbeit als solche, aber auch als Samenzellen bezeichnet werden – direkt in den Fortpflanzungsapparat des Weibchens zu applizieren, sodass die Befruchtung der Eizellen und die Entwicklung der Embryonen *In-vivo* passiert. Die Methode kann eine ressourcensparende und simple Alternative zur IVF bilden, wobei zwischen einer chirurgischen und einer nicht-chirurgischen Variante unterschieden werden kann. (Stone et al. 2015)
Bei der chirurgischen Besamung wird nur eine kleine Menge an Spermien benötigt, die direkt in den Eileiter überführt wird. (Nakagata 1992, zitiert nach Stone et al. 2015)
Diese Variante hat den Nachteil, dass ein chirurgischer Eingriff erfolgen muss, um einen Zugang zum weiblichen Reproduktionstrakt zu ermöglichen. Dazu ist der Einsatz von Anästhesie und Analgesie erforderlich.
Die nicht-chirurgische Besamung hingegen kann ohne die Gabe von Schmerzmedikation und Narkosemittel erfolgen, was den Stress, denen die Tiere bei der Behandlung ausgesetzt werden, minimiert. Dazu wird der Spermientransfer unter Anwendung des Non-Surgical-Embryo-Transfer Device (NSET-Device) vollzogen, welches ursprünglich für den nicht-chirurgischen Transfer von Embryonen gedacht war. (Stone et al. 2015)

Mit dem NSET-Device können die Kosten gesenkt werden, da weniger Ausrüstung verwendet werden muss. Zudem werden die möglichen Komplikationen, die im Zuge der Narkose und der post-operativen Pflege entstehen, eliminiert. Die Besamung erfordert nach diesem Verfahren außerdem einen geringeren Zeitaufwand als die chirurgische Variante. (Green et al. 2018)

1.3 Fortpflanzung bei der Maus

Die Geschlechtsreife erreichen Mäuse nach 4-7 Wochen, wobei sie erst mit 6-8 Wochen für die Zucht verwendet werden sollten. (Purdue Institutional Animal Care and Use Committee 2016)

1.3.1 Der Zyklus bei der Maus

Aufgrund der kurzen Zyklusdauer von 4-5 Tagen sind Mäuse, wie Nagetiere allgemein, gute Modelle für Versuche, in denen der Zyklus untersucht oder manipuliert werden soll. Der Vorteil liegt hier in der Brunst, die alle 4-5 Tage auftritt. Der Östruszyklus ist bei den Mäusen zudem nicht saisonal bedingt und tritt das ganze Jahr über auf. (Caligioni 2009)
Der Zyklus kann in vier Phasen unterteilt werden:

- Proöstrus
- Östrus
- Diöstrus
- Metöstrus

Nur während der Östrusphase lassen sich die Weibchen von den Männchen decken, 8-12 Stunden nach Beginn dieser Phasen setzt bei den weiblichen Tieren die Ovulation ein. (Purdue Institutional Animal Care and Use Committee 2016)

1.3.2 Kopulation und Plugbildung

Bei dem Geschlechtsakt wird die Samenflüssigkeit in den unteren Teil des Genitaltraktes, der Vagina, abgegeben. Beschrieben ist ebenso, dass die Spermien sich nach der Abgabe in den Uterus zum Eileiter hinaufbewegen und sich dort in der Region des Isthmus ansammeln, wobei die wenigsten Samenzellen die *Ampulla tubae uterinae* (Abschnitt des Eileiters) erreichen, wo die Befruchtung stattfindet. (Muro et al. 2016, Purdue Institutional Animal, Care and Use Committee 2016).

Nach der Kopulation entsteht in der Vagina ein Kopulationsplug – auch Vaginalplug genannt. Dieser besteht aus Samenzellen, Schleim und Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen wie der Vesikulardrüse. Zu diesen Sekreten zählt auch das Protein mit dem Namen „seminal vesical secretion 2“ (SVS2). Der Plug verschließt die vaginale Öffnung und ist dabei von außen als weißlich-milchiger Propf sichtbar. Das Vorhandenseins der Kopulationsplug gibt Aufschluss darüber, dass eine Verpaarung stattgefunden hat, garantiert jedoch nicht die erfolgreiche Befruchtung (Purdue Institutional Animal Care and Use Committee 2016, Kawano und Yoshida 2007)

1.4 Fragestellung

Da die künstliche Besamung in nicht-chirurgischer Form bei der Labormaus noch nicht etabliert ist und die bisherigen Ergebnisse sehr variabel ausfallen (Stone et al. 2015), wurde im Zuge dieser Arbeit auf die einzelnen Schritte des Verfahrens eingegangen und versucht, mögliche Fehlerquellen zu identifizieren. Die Durchführung einiger Besamungsreihen ergaben keine Trächtigkeiten, was zu weiteren Untersuchungsfragen führte. Im Zuge dessen wurde die Qualität der Spermien untersucht und der Zeitpunkt des Östrus genauer bestimmt. Zu diesem Zwecke wurden mehrere Methoden der Östrusbestimmung erprobt.
Die Ergebnisse dieser Versuche sollen Aufschluss geben, mit welcher Methode die Bestimmung der Zyklusphasen genau und zeiteffizient erfolgen kann.
Da nun diese beiden Bereiche – die Qualität und Menge der Spermien, sowie der Östrus – durch diese Experimente abgedeckt und als Fehlerquellen ausgeschlossen werden konnten, wurde der Fokus auf die Untersuchung der intrauterinen Spermienwanderung gelegt.

Es sollte gezeigt werden, dass ein möglicher Grund der niedrigen Trächtigkeitsraten bei der künstlichen Besamung (Winkelmayer 2016) in der Spermienwanderung innerhalb des weiblichen Genitaltraktes liegt. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die Zyklusphase Einfluss auf das Verhalten der Spermien im Genitaltrakt nimmt.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Haltungsmaterialien

- Käfig Typ IIL, IVC Blue Line Classic, Deutschland GmbH
- Einstreu, Lignocel Select, Rettenmaier Austria GmbH & Co KG, Österreich
- Zellstoff, MaiMed Cellulose Swabs – AD Medical, Österreich
- Kartonhäuschen, GLP Des Res Dome Home, Claus GmbH, Deutschland
- Kartonrollen, GLP Fun Tunnel, Claus GmbH, Deutschland
- Haltungsfutter, V1534-DV727, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsgegenstände

- Spritzen (1 ml und 10 ml), Braun, Deutschland
- Kanülen (0.30*12 mm und 0.90*40 mm), Sterican, Österreich
- Pipettenspitzen, Greiner, Österreich
- Petrischalen (35 mm), Falcon, Österreich
- Tubes (10 ml), Sarstedt, Deutschland
- NSET-Device, ParaTechs, USA
- NaCl, S9888-500G, Sigma-Aldrich, Österreich
- Mineralöl, L-7066, Fisher BioReagents, USA
- hCG, „Chlorulon“, Intervet, Österreich
- PMSG, „Folligon“, Intervet, Österreich
- Präinkubationsmedium (THY + MBCD)
- Hoechst 33342, Cat-No 14533, Sigma-Aldrich, Österreich

2.1.3 Laborgeräte

- Sezierbesteck, Medicon, Österreich
- Kolbenhubpipetten, Corning Österreich
- Heizplatte, Medite OTS 40, Deutschland
- Hemocytometer, Neubauer-Profundeur, Marienfeld, Deutschland
- Mikroskop, Axio Vert 200, Zeiss, Deutschland
- Mikroskop, MZ 12.5, Leica, Deutschland

2.2 Tiere

Für die Versuche wurden Mäuse des Auszuchtstammes RjOrl:SWISS (CD-1), stammend aus institutseigener Zucht, verwendet.

2.2.1 Tierhaltung

Die Tiere wurden in der Barrieretierhaltung am Institut für *In-vivo* und *In-vitro* Modelle geboren und dort bis zu Beginn der Versuche gehalten. Danach wurden die Mäuse in Versuchsräume der Gebäude AA und GA überstellt, wo sie in offener Haltung in Käfigen Typ II oder geschlossenen IVC-Käfigen Typ IIL gehalten wurden. Das Lichtprogramm wurde auf einen 12-Stunden-Rhythmus geschalten und spendete zwischen 6:00 und 18:00 Licht. Die Temperatur war auf einen Wert von 20 °C ± 1 °C eingestellt, die relative Luftfeuchtigkeit betrug um die 50 % ± 10 %.

Innerhalb der Versuchstierräume wurden die Mäuse - getrennt nach Weibchen und Spendermännchen in Dreier- und Vierergruppen Gruppen gehalten. Die vasektomierten Männchen wurden zu Beginn der Versuchsreihe in Einzelhaltung gesetzt.

Die Käfige enthielten diverse Ausstattung, die als Enrichment dient. Dazu gehören Nestbaumaterialien wie Zellstoff und Kartonhäuschen oder Kartonröhren.

Aufbereitetes Leitungswasser (chloriert, 8 ppm) wurde den Tieren *ad libitum* zur Verfügung gestellt, ebenso Haltungsfutter der Firma Ssniff Spezialdiäten (V1534-DV727).

2.2.2 Weibchen

Für die Versuche wurden Weibchen im Alter von 10-14 Wochen eingesetzt. In den Käfigen befanden sich immer zwischen 3 und 5 Weibchen, die Käfigzusammensetzungen wurden bis zum Zeitpunkt der Besamung nicht verändert. Lediglich für einige Versuche wurden die Tiere im Vorhinein auf ihren Zykluszeitpunkt untersucht und die Weibchen räumlich von den anderen, die keine Merkmale des Östrus aufwiesen, getrennt.

2.2.3 Männchen

Die verwendeten Männchen, die sich im Alter von 3-5 Monaten befanden, wurden in kleinen Gruppen von 2 bis 3 Tieren aus der Tierhaltungsbarriere geholt und bis Versuchsbeginn in

jenem Versuchsraum gehalten, in dem sich auch die Weibchen und die vasektomierten Männchen befanden.

2.2.4 Vasektomierte Männchen

Nach der Besamung wurden die Weibchen jeweils zu einem Männchen gesetzt, damit durch den Fortpflanzungsakt und die Bildung des Vaginalplugs der Zeitpunkt des Östrus bestätigt werden konnte und durch den Deckreiz eine hormonelle Vorbereitung der Trächtigkeit erfolgen konnte. Dazu durfte das Männchen nicht mehr in der Lage sein, das Weibchen selbst zu befruchten, weshalb ausschließlich Böcke, die zuvor vasektomiert worden waren, verwendet wurden. Diese waren im Durchschnitt älter als sechs Monate und lebten vor dem ersten Kontakt mit weiblichen Mäusen in Gruppenhaltung in der Barriere. Vor den ersten Besamungen wurden die Böcke einzeln in Käfige gesetzt.

2.3 Methoden zur künstlichen Besamung

2.3.1 Östrusinduktion mittels Hormongabe oder pheromonaler Stimulation

Im Vorfeld der eigentlichen Untersuchungen wurden zwei Möglichkeiten erprobt, um die Weibchen gezielt in den Östrus zu versetzen.

Die erste Option bestand aus der Injektion von zwei Hormonen, die im Zusammenspiel den Östrus vorzeitig auslösen sollten. Dazu wurden die Hormone PSMG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) und hCG (humanes Choriongonadotropin) in zeitlichem Abstand verabreicht.

Die Hormone wurden im Vorhinein von einer Ausgangskonzentration von 5 U/ml jeweils auf 1 U/ml verdünnt – dies geschah durch eine 1:5 Verdünnung mit NaCl. Jede Maus bekam diese Dosis jeweils in einem Volumen von 100 µl injiziert. Die Verdünnung war notwendig, um nur eine Brunstinduktion anstelle einer Superovulation zu erreichen. Nach Superovulation und *In-vivo*-Befruchtung kommt es häufig zu keiner Trächtigkeit.

Die genannte Menge wurde in eine Spritze mit 30 Gx1/2-Kanüle aufgezogen und das Hormongemisch *intraperitoneal* appliziert. Das Weibchen wurde dabei fixiert und in Schräglage gebracht, sodass der Kopf nach unten geneigt war. Der Einstich erfolgte in einem Winkel von 45° nach gängiger Praxis.

Auf diese Art wurde als Erstes PMSG appliziert und etwa 48 Stunden später hCG. 16 Stunden nach der Gabe von hCG wurde dann die Besamung durchgeführt.

Ersichtlich ist dieser Ablauf anhand eines beispielhaften Zeitplans in Tab.1.

Tabelle 1: Zeitlicher Ablauf der Besamungsreihen

	PMSG 1 U/ml	**hCG 1 U/ml**	**Besamung**
Woche 1	Montag, 17:00	Mittwoch, 17:30	Donnerstag, 9:00
Woche 2	Dienstag, 17:30	Donnerstag, 17:00	Freitag, 9:00
Woche 3	Montag, 17:00	Mittwoch, 17:00	Donnerstag, 9:00

Parallel zur Hormongabe wurde eine weitere Methode zur Stimulation des Östrus erprobt. Dazu wurden elf Weibchen den Pheromonen, die von vasektomierten Männchen abgegeben wurden und auf natürliche Weise den Östrus auslösen sollten, ausgesetzt. Jeweils ein Männchen und ein Weibchen wurden in einen Käfig gesetzt, der durch ein Metallgitter in der Mitte geteilt war. So konnten sich die Tiere gegenseitig riechen, sehen und hören, allerdings keinen physischen Kontakt miteinander aufnehmen. Diese Weibchen wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Gruppe I bestand aus sechs Weibchen, die zusätzlich mit Hormoninjektionen nach bekanntem Protokoll (siehe Punkt 2.3.1) stimuliert wurden. Gruppe II, bestehend aus ebenfalls sechs Tieren, erhielt keine Hormone.
Es sollte eine positive Wirkung der Pheromone als zusätzliches Mittel der Östrusstimulation gezeigt werden.

2.3.2 Östrusbestimmung

Eine korrekte Bestimmung des Zeitpunkts des Östrus ist von Bedeutung für eine erfolgreiche Besamungsreihe und für die Einteilung der Weibchen in Gruppen, wenn es um die intrauterine Spermienwanderung geht. Besonders bei diesen Versuchen ist das Interesse groß, im Östrus befindliche Weibchen von jenen zu unterscheiden, die zyklusmäßig nicht dem richtigen Stadium zuzuordnen sind.
Die Bestimmung erfolgte durch drei separate Methoden, die in manchen Fällen auch kombiniert angewendet wurden.

2.3.2.1 Äußerliche Merkmale

Die erste Methode basiert auf der Untersuchung der Weibchen nach äußerlichen Merkmalen des Östrus. Zu diesen zählen primär die Schwellung und Verfärbung der Genitalien. Eine verdickte und violett oder dunkelrosa verfärbte Vulva war ein erstes Anzeichen auf einen bevorstehenden oder bereits eingetretenen Östrus. Weibchen, die auf diese Beschreibung passten, wurden aus einem Pool von etwa 20-30 Tieren ausgewählt und markiert, damit diese später bevorzugt für die Versuche herangezogen werden konnten.

2.3.2.2 Vaginaler Abstrich

Eine weitere Methode bot der vaginale Abstrich, bei dem die Zellen des vaginalen Schleimhautepithels unter dem Mikroskop begutachtet werden konnten. Bestimmte Zellformen (siehe Abb. 1), sowie das Vorkommen – oder Fehlen – von Leukozyten können ein Hinweis auf das Zyklusstadium sein.

Für diesen Abstrich wurde zunächst NaCl in einer Petrischale auf der Heizplatte erwärmt und anschließend mit einer Spritze ohne Kanüle aufgezogen. Schon wenige Tropfen pro Maus waren ausreichend. Das Weibchen wurde auf das Gitter des Käfigs gesetzt und in der Schräge der Futterraufe platziert. Mit zwei Fingern wurde sanfter Druck auf den Oberkörper ausgeübt und gleichzeitig der Schwanz mit Daumen und Zeigefinger fixiert und hochgedrückt, sodass mit der zweiten Hand vorsichtig die Spritze einige Millimeter in die Vagina eingeführt werden konnte. Eine kleine Menge der zuvor aufgezogenen NaCl-Lösung wurde in die Vagina appliziert und gleich wieder in die Spritze aufgezogen. Diese Flüssigkeit, die nun Epithelzellen enthielt, wurde auf einen Objektträger getropft und unter dem Mikroskop untersucht, während die Maus markiert und zurück in den Käfig gesetzt wurde. Diese Markierung diente der späteren Zuordnung.

In Abb. 1 ersichtlich sind die verschiedenen Stadien des Zyklus bei der Maus, gegliedert nach den entnommenen Zellen aus dem vaginalen Schleimhautepithel und bezeichnet mit den Buchstaben *a, b, c, d.*

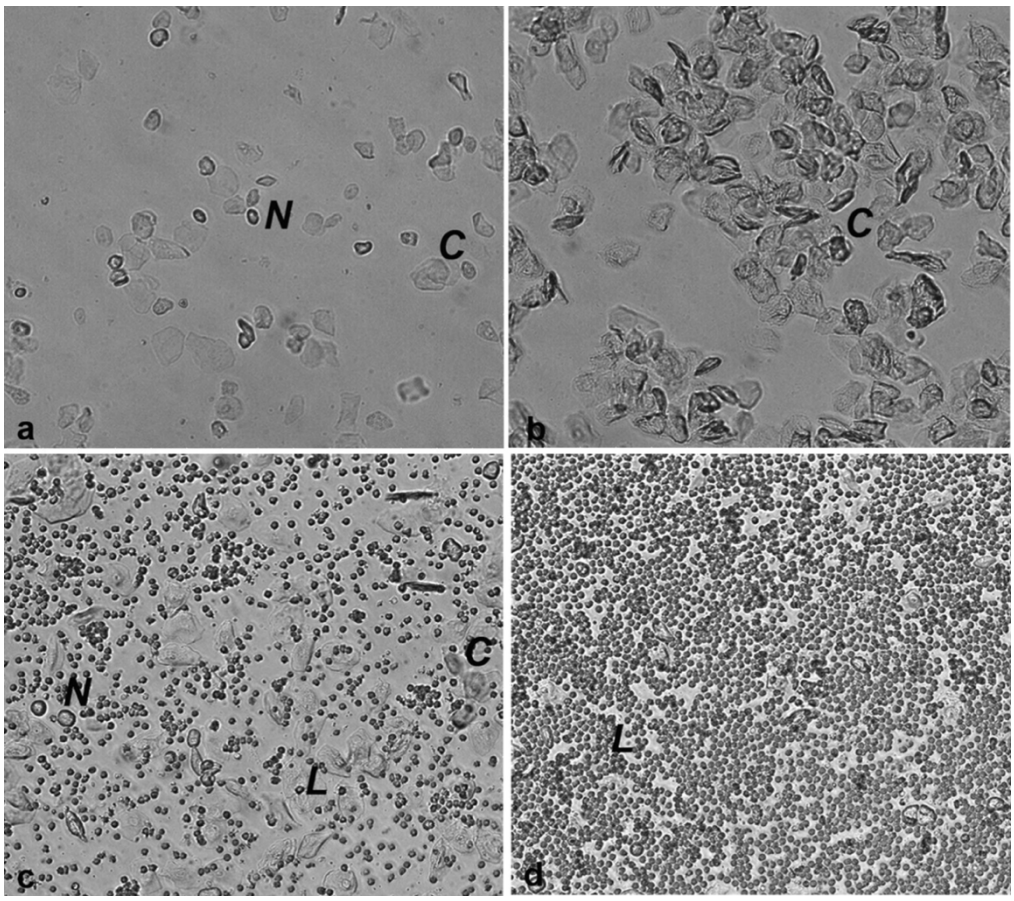

Abbildung 1a-d: Zyklusstadien bei der Maus anhand der Zellen im vaginalen Schleimhautepithel (Caligioni 2009)

Die Bezeichnungen in der Abbildung lauten wie folgt:

N – kernhaltige epitheliale Zellen (nucleated epithelial cells)

C – verhornte Zellen (cornified cells)

L – Leukozyten (leucocytes)

Abbildung 1a zeigt das Stadium des Proöstrus, welches durch das Vorkommen von kernhaltigen epithelialen Zellen (N) und einigen einzelnen verhornten Zellen (C) charakterisiert ist. In 1b erkennt man überwiegend verhornte Zellen (C), was für einen Östrus spricht. Das dritte Stadium, der Metöstrus, ist in Abbildung 1c dargestellt und zeigt das Vorkommen aller drei Arten von Zellen. Sowohl Leukozyten (L), als auch verhornte Zellen (C) und kernhaltige epitheliale Zellen (N) sind zu erkennen.

Im Diöstrus, hier in Abbildung 1d erkennbar, sind fast ausschließlich Leukozyten (L) zu erkennen. (Caligioni 2009)

30 Weibchen wurden zur Verfügung gestellt, die alle auf diese Art und Weise untersucht worden waren. Nach diesen Abbildungen und Beschreibungen der einzelnen Zyklusstadien wurden die Abstrichproben der Weibchen eingeordnet und jene Tiere, deren Proben am ehesten Abbildung 1b entsprachen – und die dadurch als östrisch eingestuft werden konnten – in separaten Käfigen untergebracht.

Diese Methode konnte als zusätzliche Verifizierung nach vorangegangener Bestimmung durch äußerliche Begutachtung (siehe 2.3.3.1) angewendet werden. Dabei wurden nur jene Weibchen untersucht, die zuvor ausgewählt worden waren, weil sie die äußerlichen Merkmale des Östrus zeigten. Dadurch konnte der Pool der Weibchen für den weiteren Versuch weiter eingegrenzt werden.

2.3.2.3 Paarungsbereitschaft

Als letzte Methode sei die Deckbereitschaft der Weibchen zu erwähnen. Vor der Besamung wurden die Weibchen jeweils zu einem vasektomierten Bock in den Käfig gesetzt und beobachtet, ob sich die Weibchen nach einer Zeitspanne von etwa 10-15 Min. von dem Männchen decken ließen. Die Bereitschaft dazu wurde als Anzeichen des Östrus angesehen. Zeigten die Weibchen vermehrt Abwehrhaltung gegenüber den Böcken, in Form von Fauchen, Quietschen oder Ausweichen, so wurden diese als nicht im Östrus befindlich identifiziert.

2.3.3 Spermiengewinnung

Pro Versuchsdurchgang wurden zwei bis maximal drei Männchen euthanasiert, um deren Spermien zu extrahieren und gesammelt aufzubereiten. Diese Vermischung der Spermien mehrerer Männchen diente der Steigerung der Spermiendichte.

Pro Nebenhodenschwanz, der präpariert wurde, wurden 150 µl THY-Medium vorbereitet. Dazu wurde die Lösung in eine Petrischale pipettiert und auf die Wärmeplatte, die auf eine Temperatur von 37 °C eingestellt war, gelegt. Dies diente dem Erhalt der physiologischen Umgebungstemperatur und sollte ein verfrühtes Absterben der Spermien durch Kälteeinwirkungen vorbeugen.

2.3.3.1 Nebenhodenschwanzpräparation

Zu Beginn wurde das Spendermännchen mittels zervikaler Dislokation euthanasiert und in Rückenlage auf die Arbeitsfläche gelegt. Das Fell wurde mit 70 %igem Ethanol besprüht, bevor mit chirurgischem Besteck ein etwa 2 cm langer, horizontaler Schnitt im unteren Bauchfell gesetzt wurde. Der Bauchraum wurde anschließend nach beiden Seiten hin lateral eröffnet. Durch Lokalisation der Hoden und Weiterverfolgung des *Ductus epididymis* konnte der *Cauda epididymis* (Nebenhodenschwanz) erreicht werden. Vorsichtig wurde dieser mit einer Pinzette angehoben, ohne das Gewebe zu quetschen, während mit der Schere das Fett- und Bindegewebe vom Nebenhodenschwanz getrennt wurde.

2.3.3.2 Aufbereitung der Spermien

Die präparierten Nebenhodenschwänze wurden anschließend in das vorgewärmte Medium gebracht und unter dem Mikroskop angeschnitten, um das verstärkte Ausschwimmen der Spermien zu ermöglichen. Nach fünf Minuten wurden dann die Gewebestücke aus der Petrischale entfernt und diese zurück auf die Heizplatte gestellt. Zwei verschiedene Möglichkeiten wurden erprobt, um das Austrocknen des Spermiengemischs in der nächsten Phase – der Kapazitation der Spermien - zu verhindern. Eine Möglichkeit besteht darin, die Flüssigkeit mit Mineralöl zu bedecken. Dazu wurde das Öl mit der Pipette langsam aufgetragen, bis die Oberfläche des Spermiengemischs vollständig bedeckt war. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass es im späteren Verlauf des Versuches zu Verunreinigungen kommen kann, wenn beim Abpipettieren der Spermienflüssigkeit Ölreste an der Pipettenspitze haften bleiben und in das nächste Gefäß mitüberführt werden. Aus diesem Grund wurde eine weitere Methode zur Vorbeugung des Austrocknens etabliert. Dabei wurde das Gemisch aus Spermien und dem Medium gleich nach Herausnehmen der Gewebestücke in eine verschließbare Eprouvette gefüllt und so auf die Heizplatte gelegt. Dort wurden sie für 45 Min. zum Dekapazitieren verwahrt. Danach wurde durch eine Begutachtung der Spermien unter dem Lichtmikroskop die Motilität überprüft. Wurde diese auf etwa 80 % oder höher geschätzt, konnte der Versuch nach Plan fortgeführt werden.

2.3.3.3 Auszählen der Spermien

Zum Auszählen der Spermien wurde eine 1:50 Verdünnung des Spermiengemischs mit NaCl hergestellt. Dazu wurden 10 µl der Spermienlösung mit 490 µl NaCl vermengt. Durch mehrmaliges Auf-, und Abpipettieren der Lösung wurde eine Durchmischung beider Substanzen sichergestellt. Aus diesem Gemisch wurden anschließend einige Tropfen auf die Zählkammer getropft und anschließend unter dem Mikroskop begutachtet. Verwendet wurde eine Neubauer-Profundeur Zählkammer mit einem 5x5 Raster.

Aus diesem Raster wurden nach zuvor festgelegtem Muster 6 Kästchen ausgezählt und der Mittelwert (x) genommen. Dieser wurde anschließend in folgender Formel zur Berechnung der Gesamtspermienzahl pro ml eingefügt:

$$x * 25 * 10 * 50 * 1000 = Spermiendichte\ pro\ ml$$

Um auf eine Dichte von 1.000.000 Spermien pro 40 µl – die Menge, die pro Maus appliziert wurde – zu kommen, wurde die errechnete Spermiendichte pro ml herangezogen, auf 40 µl gerechnet und die notwendige Verdünnung mit abermals vorgewärmten THY durchgeführt.

2.3.4 Besamung

Für die Durchführung der künstlichen Besamung wurden zunächst alle notwendigen Vorbereitungen getroffen. NaCl wurde dem Kühlschrank entnommen und auf der Heizplatte, die auf 37 °C eingestellt worden war, gewärmt. Die frisch entnommene Spermienlösung wurde ebenso bis zuletzt auf der Heizplatte warmgehalten, damit die Motilität der Spermien nicht durch Kälteeinwirkung nachließ.

Verwendet wurde das NSET-Device der Firma ParaTechs, das aus einem 26 mm langen Katheter und zwei Spekula unterschiedlichen Durchmessers bestand. Zur Schonung der Weibchen wurde allerdings nur das kleine Spekulum verwendet, welches 13 mm in der Länge und 2 mm im Durchmesser misst. Dieses wurde vor Beginn des Versuchs in die vorgewärmte NaCl-Lösung gelegt, um das Einführen zu erleichtern und schonender für die Weibchen zu gestalten.

Der flexible Katheter wurde auf eine Pipette gesteckt und 20 µl der Spermienlösung aufgezogen. Das Weibchen wurde in die Futterraufe eines leeren Käfigs gesetzt und in

Schräglage versetzt, was das Einführen des Katheters vereinfacht. Mit zwei Fingern wurde sanft auf Höhe der Schultern Druck ausgeübt, während mit Zeigefinger und Daumen der Schwanz leicht angehoben wurde. Das Spekulum konnte nun vorsichtig in die Vagina gesetzt werden, wie in Abb. 2 ersichtlich.

Abbildung 2: Positionieren des Spekulums

Anschließend wurde der Katheter, ohne dass Druck auf ihn ausgeübt werden musste, durch das Spekulum hindurch in voller Länge eingeführt und die Spermien durch Drücken der Pipetten abgegeben. In Abb. 3 wird dieser Vorgang verdeutlicht.
Da die Vagina der Maus weniger als 26 mm in der Länge misst, konnte man sich, insofern der Katheter bis zum Anschlag des Katheterhalses eingeführt werden konnte, sicher sein, dass die *Cervix* passiert wurde und die Spermien direkt im Uterushorn appliziert werden konnten.

Abbildung 3: Künstliche Besamung unter Anwendung des NSET-Verfahrens

Dieser Vorgang wurde wiederholt, um auf eine Gesamtspermienmenge von 40 µl zu kommen. In Abb. 4 zu sehen ist, wie weit der Katheter durchschnittlich in das Uterushorn hineinreichte. Im Zuge der Untersuchungen der Trächtigkeitsrate wurden die Weibchen nach der Besamung sofort zu je einem vasektomierten Bock in den Käfig gesetzt.

Abbildung 4: Länge des NSET-Katheters an der eröffneten Maus gezeigt

2.3.5 Vaginalplugkontrolle

Bei den Versuchen, in denen die Trächtigkeitsrate untersucht werden sollte, wurden die Weibchen nach der Besamung auf einen Plug hin kontrolliert.

Als Vaginalplug wird der weißlich-gelbe Propf, der sich nach einem natürlichen Deckakt in der Vagina des Weibchens bildet und diese verschließt, bezeichnet. Die Bildung eines solchen Plugs kann Aufschluss auf die Paarungsbereitschaft der Mäuse geben und als Indikator des möglichen Östrus gelten.

Zwischen sechs und acht Stunden nach der künstlichen Besamung wurde die erste Kontrolle durchgeführt. Dazu wurde das Weibchen aus dem Käfig genommen, in die Futterraufe gesetzt und der Schwanz angehoben, um einen besseren Blick auf den Genitalbereich zu bekommen.

Als Plug-positiv wurden Weibchen bezeichnet, bei denen ein solcher Propf – wie in Abb. 5 zu sehen - erkennbar war.

24 Stunden nach der Besamung wurde eine zweite Plugkontrolle durchgeführt. Danach wurden die Weibchen aus den Käfigen der Böcke entfernt und wieder in Gruppen gesetzt, wobei sie demnach, ob sich ein Plug feststellen ließ oder nicht, aufgeteilt wurden.

Abbildung 5: Vaginalplug

2.4 Methoden zur Untersuchung der intrauterinen Spermienwanderung

2.4.1 Spülung der Uterushörner und der Eileiter

Nach der künstlichen Besamung sollte die Spermienwanderung innerhalb des weiblichen Genitaltraktes untersucht werden. Dazu wurden die Uterushörner samt Eileiter von zuvor besamten Weibchen präpariert und unter dem Mikroskop mit THY-Medium durchgespült. Die verwendeten Mäuse waren im Vorhinein in Gruppen eingeteilt worden, um den Zeitpunkt der Eröffnung und Spülung für jede Maus genau festzulegen. Diese Bestimmung wurde anhand der in Punkt 2.3.3 beschriebenen Methoden durchgeführt. Zu bestimmten Uhrzeiten nach der Besamung wurden die Weibchen in Zweier- und Vierergruppen untersucht.
Die Besamung fand um 11:00 Vormittags statt, in Tab. 2 sind die Gruppen und die Uhrzeiten aufgelistet:

Tabelle 2: Auflistung der Gruppen – Spülung ohne Fluoreszenzmarkierung der Spermien

Gruppe	Anzahl der Weibchen	Uhrzeit der Untersuchung	Zeit nach Besamung
1	2	11:10	10 Min.
2	4	11:30	30 Min.
3	4	12:00	60 Min.
4	2	12:30	90 Min.
5	2	13:00	120 Min.

2.4.1.1 Präparation von Uterushorn und Eileiter

Zunächst wurden die Weibchen mittels zervikaler Dislokation eliminiert und der Bauchraum eröffnet. Dies geschah, indem das Bauchfell in Vorbereitung mit 70 %igem Ethanol besprüht wurde und mit chirurgischem Besteck ein lateraler Schnitt im unteren Bauchdrittel gesetzt wurde. Anschließend wurde das Bauchfell oberhalb des Schnittes nach *cranial* und jenes unterhalb des Schnittes nach *caudal* gezogen, um die Bauchdecke freizulegen. Diese wurde angehoben und ebenfalls durch zwei Schnitte lateral auf beide Seiten hin eröffnet.

Im Anschluss wurden die Uterushörner lokalisiert und mit der Pinzette wurde das Fettgewebe, welches den Bauchraum ausfüllte, entfernt. War der Genitaltrakt freigelegt, konnte ein Uterushorn gemeinsam mit dem zugehörigen Eileiter rauspräpariert werden. Auf Höhe der *Ampulla tubae uterinae* wurde vorsichtig das Gewebe durchtrennt und durch Anheben des Eileiters und des Uterushorns konnte das Gekröse aufgespannt und abgetrennt werden. Der zweite Schnitt wurde am *Corpus uteri,* dem unpaarigen Teil des Uterus, welcher an die *Cervix* grenzt, gesetzt. Somit konnte das Uterushorn mit Eileiter gänzlich entnommen werden. Das Gewebe wurde sofort in eine Petrischale – gefüllt mit vorgewärmtem THY-Medium – gelegt, damit Blut und Reste des Gekröses abgespült werden konnten. Dann wurde der Eileiter vom Uterushorn abgetrennt und beide Gewebestücke wurden in seperate, trockene Petrischalen überführt, wie in Abb. 6 zu sehen. Der Vorgang wurde für das Uterushorn der anderen Körperhälfte wiederholt und die genaue Uhrzeit der Entnahme wurde notiert.

Abbildung 6: Präpariertes Uterushorn in der Petrischale

2.4.1.2 Spülung mit THY

Jede Petrischale, mit entweder einem Uterushorn oder einem Eileiter, wurde einzeln unter dem Mikroskop begutachtet und das darin liegende Gewebe auf Sauberkeit und Vollständigkeit überprüft.

Auf der Heizplatte war zuvor schon TYH-Medium erwärmt worden, welches nun in eine Spritze mit 30 Gx1/2-Kanüle aufgezogen wurde.

Mit einer Pinzette wurde das Uterushorn auf der cranialen Seite, welche an den Eileiter angrenzen würde, fixiert, während die Kanüle der Spritze in die Öffnung des Horns eingeführt und das Medium langsam appliziert wurde. Füllte sich das Uterushorn sichtbar und nahm an Volumen zu, bevor die Flüssigkeit am unteren Ende wieder austrat, wurde die Spülung als erfolgreich beurteilt. Das Medium sollte nun, nachdem es das Uterushorn in voller Länge passiert hatte, noch lebensfähige Spermien in großer Menge enthalten.
Der Eileiter wurde nach demselben Schema gespült. Durch Betrachten von allen Seiten wurde die *Ampulla tubae uterinae* anhand ihrer etwas breiteren Struktur lokalisiert und mit der Pinzette fixiert, während mit einer Kanüle das Medium in den Eileiter appliziert werden konnte.

2.4.1.3 Bewertung und Analyse der Spülung

Befanden sich Spermien nach der Spülung in dem Medium, so wurde zuerst die Motilität derer überprüft. Des Weiteren wurde die Menge an Spermien begutachtet. Es fand keine Zählung - wie in Punkt 2.3.4.3 beschrieben – statt.
Entstanden bei der Entnahme oder Spülung Verletzungen an den Gefäßen des Gewebes, so konnte dies zu Verunreinigungen mit Blut führen. Wurden in diesem Fall Spermien, welche vorhanden, aber nicht mehr lebendig waren, identifiziert, so wurde dieser Umstand auf jene Verunreinigung zurückgeführt und die Spermien als vorhanden gewertet.

2.4.2 Fluoreszenzmarkierung

Um die Spermien, die sich innerhalb des Genitaltraktes befunden hatten, aber nicht gespült werden konnten, sichtbar zu machen, wurden diese mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Im Anschluss konnten die Samenzellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops dargestellt werden. Für die Färbung der Spermien wurde der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst33342 verwendet, der blau fluoresziert. 5 µl von Hoechst33342 wurden mit 5 ml THY vermischt und während des Versuchs keinem direkten Licht ausgesetzt. Die Eprouvette wurde dazu mit Aluminiumfolie umwickelt und im Kühlschrank gelagert.

Für den Versuch wurden drei Männchen euthanasiert und die insgesamt sechs Nebenhodenschwänze entnommen. Diese wurden für fünf Minuten in 900 µl der verdünnten Fluoreszenzlösung gelegt, um die Spermien ausschwimmen zu lassen. Anschließend wurden

die Gewebereste entfernt und die Flüssigkeit in eine Eprouvette überführt. Das Gemisch wurde für 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und anschließend resuspendiert. Danach erfolgte eine zweite Zentrifugation bei gleichen Bedingungen. Die Spermienlösung wurde anschließend nach Protokoll (siehe Punkt 2.3.4.3.) ausgezählt, berechnet und verdünnt.
Unter Verwendung der in Punkt 2.3.3 beschriebenen Methoden wurden sowohl gezielt Weibchen im Östrus, als auch welche, die sich nicht im Östrus befindlich schienen, ausgewählt. Alle Weibchen wurden nach gängiger Praxis (beschrieben in Punkt 2.3.5) besamt und in Gruppen zu jeweils 2-3 Individuen unterteilt. Die Besamung fand um 11:00 Vormittags statt.

Tabelle 3: Auflistung der Gruppen - Spülung mit Fluoreszenzmarkierung der Spermien

Gruppe	Anzahl der Weibchen	Zyklusstadium	Uhrzeit der Untersuchung	Zeit nach Besamung
1	2	Östrus	12:00	60 Min.
2	2	Östrus	15:00	180 Min.
3	2	Diöstrus	12:00	60 Min.
4	2	Diöstrus	15:00	180 Min.
5	3	Diöstrus	16:00	240 Min.

Die entnommenen Gewebeproben wurden anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und ausgewertet. In Abb. 7 zu sehen sind die blau fluoreszierenden Spermien, die innerhalb der Uterushörner gefunden werden konnten.

Abbildung 7: Fluoreszierende Spermien unter dem Mikroskop

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Ergebnisse

3.1.1 Östrusbestimmung

Als Zeichen des Östrus wurde bei der Bestimmung das Vorhandensein eines Vaginalplugs gewertet, da dieser nur auftreten kann, wenn das Weibchen nach der Besamung den Deckakt mit dem vasektomierten Männchen zulässt. Diese Deckbereitschaft spricht für das Zyklusstadium des Östrus, und da die Mäuse nicht unter ständiger Beobachtung standen, wurde die Identifikation des Vaginalplugs stellvertretend als positives Ergebnis gewertet.

Die Entstehung dieser Vaginalplugs konnte bei Versuchen, bei denen der Östrus durch die Gabe von PMSG und hcG hervorgerufen werden sollte, weniger häufig beobachtet werden, als bei anderen Methoden.
Je nach Versuch konnten bei einer Stichprobengröße von 8-10 Weibchen maximal 1-2 Vaginalplugs identifiziert werden. Einige Versuchsreihen ergaben keinen einzigen Plug, was dementsprechend gedeutet wurde, dass sich von allen besamten Weibchen kein einziges im Östrusstadium befunden hatte.

Bei den Versuchsreihen, bei denen die Untersuchung des Einflusses von Pheromonen auf das Zyklusstadium im Vordergrund standen, wurden die Weibchen in einem geteilten Käfig mit je einem Männchen gehalten, um den Pheromonen ausgesetzt zu sein. In zwei Gruppen – zu je sechs Individuen - wurden die Weibchen anschließend besamt: die erste Gruppe erhielt zusätzlich noch die Hormone PMSG und hCG, die zweite Gruppe nicht.
In der ersten Gruppe konnte bei 2 der 6 Weibchen ein Östrus bestimmt werden, während bei der zweiten Gruppe kein Weibchen dem Zyklusstadium des Östrus zugeordnet werden konnte.

Die nächste Methode bediente sich der äußerlichen Betrachtung aller Mäuse eines Pools, aus welchem dann jene ausgewählt wurden, die Merkmale eines Östrus zeigten.
Nach der Besamung zeigte sich bei fünf der neun ausgewählten Weibchen ein Vaginalplug. Somit konnte der Östrus bei mehr als der Hälfte der Individuen des Versuches bestätigt werden.

Die Methode mit der höchsten Trefferquote war jene, bei der zuerst eine äußerliche Begutachtung erfolgte und anschließend ein Vaginalabstrich entnommen wurde. Durch diese Bestimmung in zwei Phasen konnte der anfängliche Pool, der 30 Tiere umfasste, so weit eingeschränkt werden, dass nur noch jene neun Weibchen besamt wurden, die sowohl äußerliche, als auch zelluläre Merkmale des Östrus zeigten.
Acht der neun Tiere dieser Versuchsreihe befanden sich auch tatsächlich im Östrus.

3.1.2 Trächtigkeiten

Unter Anwendung der beschriebenen Methoden zur Herbeiführung des Östrus durch hormonelle und pheromonale Stimulation konnten keine Trächtigkeiten erzielt werden. Auch die Bestimmung des Zyklusstadiums anhand von äußerlichen Merkmalen, durch Epithelzelluntersuchungen der vaginalen Schleimhaut, oder anhand der Deckbereitschaft führten zwar zu Erfolgen in Hinblick auf die Bildung von Vaginalplugs, jedoch nicht zu einer vollendeten Befruchtung mit resultierender Trächtigkeit.

3.1.3 Spülung der Uterushörner und Eileiter

Bei diesem Versuch wurden 14 Weibchen zeitgleich besamt und in Zweier- und Vierergruppen geordnet untersucht.
Es wurden die Uterushörner und Eileiter der Tiere entnommen und separat gespült, um den Weg der Spermien nach der Besamung nachzuverfolgen.
Die Ergebnisse der Spülungen von Uterushörnern und Eileiter sind in Tab. 4 dargestellt. Das Vorhandensein von motilen Spermien wurde in folgender Tabelle mit einem Haken bewertet, während das Kreuz bedeutet, dass keine Spermien – selbst keine immobilen – mehr auffindbar waren. Um die Unterscheidung von vereinzelten Spermien und dem Auftreten einer Vielzahl von Samenzellen zu verdeutlichen, wurde die Bezeichnung „viel“ in der Tabelle hinzugefügt.

Tabelle 4: Ergebnisse der Spülung ohne Fluoreszenzmarkierung der Spermien

Gruppe	Probennahme	Nummer	Uterushorn links	Uterushorn rechts	Eileiter links	Eileiter rechts
1	Nach 10 Min.	1	✓ viel	✓viel	x	x
1	Nach 10 Min.	2	✓ viel	x	x	x
2	Nach 30 Min.	3	✓ viel	✓	x	x
2	Nach 30 Min.	4	✓	✓viel	x	x
2	Nach 30 Min.	5	✓	✓ viel	x	x
2	Nach 30 Min.	6	✓ viel	x	x	x
3	Nach 60 Min.	7	✓ viel	✓ viel	x	x
3	Nach 60 Min.	8	✓	✓	x	x
3	Nach 60 Min.	9	x	✓viel	x	✓
3	Nach 60 Min.	10	✓	✓	✓	
4	Nach 90 Min.	11	x	x	x	x
4	Nach 90 Min.	12	x	x	x	x
5	Nach 120 Min.	12	✓ viel	x	✓	x
5	Nach 120 Min.	14	x	x	x	x

Betrachtet man diese Ergebnisse, wird ersichtlich, dass die Spermien nur in wenigen Fällen die Eileiter erreichen konnten. Jene Weibchen, die nach 10 Min. und 30 Min. untersucht wurden, wiesen eine hohe Menge an motilen Spermien in beiden Uterushörnern auf.

Allerdings konnten nach dieser Zeitspanne noch keine Samenzellen in den Eileitern identifiziert werden. Es zeigte sich bei genauerer Betrachtung eine eindeutige Ansammlung von Spermien im oberen Bereich des Uterushornes. Man kann anhand dieser Beobachtung davon ausgehen, dass sich die Spermien in den 60 Min. nach der Besamung bereits vom mittleren Teil des Uterushornes, in welches sie appliziert wurden, wegbewegt hatten und bis zum Übergang zum Eileiter vordringen konnten.

Nach 90 Minuten konnten keine Samenzellen mehr identifiziert werden, nach 120 Minuten nur vereinzelt auf einer Seite.
Die Tatsache, dass bei manchen Mäusen nur in einem der beiden Uterushörner das Vorkommen von Samenzellen festgestellt werden konnte, könnte darauf zurückzuführen sein, dass beim Besamen der Katheter zweimal aufgezogen und eingeführt werden muss, um die Menge von 40 µl zu erreichen. Dabei kann es passieren, dass die Spermien zweimal in dasselbe Uterushorn appliziert werden, was die hohe Menge an Samenzellen in einem der beiden Hörner und die Abstinenz jener Zellen im anderen erklärt.
Prinzipiell kann gesagt werden, dass die Spermien 90 Min. nach der Besamung nicht mehr in der gespülten Lösung, die lichtmikroskopisch untersucht wurde, vorhanden waren.

3.1.4 Spülung mit Fluoreszenzmarkierung der Spermien

Vorangegangene Versuche zeigten auf, dass nach einer gewissen Zeit nach der Besamung keine Spermien mehr aus dem Genitaltrakt der Maus gespült werden konnten. Um zu überprüfen, ob die Samenzellen abgebaut wurden oder sich noch im Uterus befanden und lediglich nicht mehr herausgespült werden konnten, wurde ein weiterer Versuch gestartet, bei dem die Spermien im Uterus und in den Eileitern sichtbar gemacht werden sollten.
Dazu wurden die Samenzellen nach der Entnahme aus den Nebenhodenschwänzen in Fluoreszenzfarbe gelegt und so gefärbt.
11 Weibchen wurden in 5 Gruppen geteilt – diese Einteilung erfolgte nach Zyklusstadium und der Zeit, nach welcher sie eröffnet und untersucht werden sollten.

Zu den beschriebenen Zeitpunkten – ersichtlich in Tab. 4 - erfolgte die Entnahme des Genitaltraktes, nachdem die Mäuse um 11:00 besamt worden waren. Im Anschluss daran wurde dieser unter dem Lichtmikroskop mit erwärmtem Medium gespült und die Lösung auf Spermien untersucht. Notiert wurde, ob Samenzellen identifiziert werden konnten. In einem zweiten Schritt wurden die Gewebestücke aus der Petrischale entfernt und auf einen Objektträger aufgelegt. Die Uterushörner wurden mit einem Skalpell der Länge nach geteilt und zur Seite aufgeklappt, sodass die innen liegende Schleimhaut freigelegt wurde.

Mit dem Fluoreszenzmikroskop konnten nun die Gewebestücke auf Spermien untersucht werden. Waren Samenzellen vorhanden, so leuchteten diese aufgrund der Fluoreszenzfärbung hellblau.

Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung („LM“) und der Beobachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop („F“) sind in Tab.5 dargestellt. Wie auch in Tab.4 bedeutet ein Haken das Vorhandensein von Spermien, während das rote Kreuz auf die Abwesenheit der Samenzellen hinweist.

Tabelle 5: Ergebnisse der Spülung mit Fluoreszenzmarkierung der Spermien

Gruppe und Uhrzeit	Maus	Uterushorn links, LM	Uterushorn rechts, LM	Uterushorn links, F	Uterushorn rechts, F
1 – 12:00	1	x	x	x	x
1 – 12:00	2	x	x	✓	✓
2 – 15:00	3	x	x	x	x
2 – 15:00	4	x	x	✓	✓
3 – 12:00	5	✓	✓	✓	x
3 – 12:00	6	x	x	✓	✓
4 – 15:00	7	x	x	✓	✓
4 – 15:00	8	x	x	x	✓
5 – 16:00	9	x	x	✓	✓
5 – 16:00	10	x	x	✓	✓
5 – 16:00	11	x	x	✓	✓

Ersichtlich ist hier, dass ungeachtet des Zeitpunktes und der Östrusstadien der Tiere keine Samenzellen unter dem Lichtmikroskop identifiziert werden konnten, mit Ausnahme bei Tier Nr. 5. Bei diesem handelt es sich um ein Weibchen, das sich nicht im Östrus befand und eine Stunde nach der Besamung eröffnet und untersucht worden war.

Bei den meisten Individuen konnten fluoreszierende Samenzellen, auch wenn diese nicht mehr gespült werden konnten, im Gewebe festgestellt werden. Unter dem Fluoreszenzmikroskop war

zu sehen, dass die Spermien in den Uterushörnern verteilt waren und unbeweglich schienen. Einzelne Zellen waren kaum anzutreffen, in den meisten Fällen hatten sich mehrere Spermien zusammengelagert.

3.2 Diskussion

3.2.1 Östrusbestimmung

Die Ergebnisse in Form von Vaginalplugbildungen implizieren, dass die Bestimmung des Zyklusstadiums am genauesten durch die Methode der Vaginalspülung erfolgen kann. Die Untersuchung des vaginalen Schleimhautepithels erwies sich als genau und konnte dank der vorangegangenen Begutachtung der äußeren Merkmale sehr zeiteffizient durchgeführt werden, da nicht von allen Tieren, die sich im Pool befanden, die Proben genommen werden mussten.
Die im Vergleich zu den anderen Methoden niedrigen Trefferquoten, die bei der Herbeiführung des Östrus durch Hormongabe erreicht wurden, geben Anlass, die Signifikanz jener Methode zu überdenken. Bei wiederholt hohen Trefferquoten nach der Injektion von hCG und PMSG könnte man eine stabile Grundlage für die künstliche Besamung schaffen, da die Tiere verlässlich in den Östrus versetzt werden könnten, und nur eine kleinere Anzahl an Weibchen benötigt werden würde. Doch die in diesen Versuchen ermittelten Zahlen schließen dies aus.

Hat man einen großen Pool an Weibchen zur Verfügung, kann durch die in Punkt 2.3.3.2 beschriebenen Methode zur Östrusbestimmung durch Vaginalspülungen eine hohe Trefferquote erzielt werden. Es muss zwar eine gewisse Menge an Tieren zur Verfügung stehen, allerdings kann eine sichere Anzahl an Weibchen im passenden Östrusstadium garantiert werden. Hier sind Kosten und Nutzen gegeneinander abzuwägen, um die passende Alternative zu wählen.

3.2.2 Trächtigkeiten

In den Versuchen der künstlichen Besamung konnten keine Trächtigkeiten erreicht werden, weshalb in weiteren Versuchen auf die intrauterine Spermienwanderung eingegangen wurde. Da die gute Qualität der Spermien vor und nach der Besamung festgestellt werden konnte und der Östrus ebenso bei den Weibchen durch die Bildung eines Vaginalplugs nachzuweisen war,

kam die Vermutung auf, dass der Grund für die misslungene Befruchtung in der Bewegung der Spermien innerhalb des weiblichen Genitaltraktes liegen müsse.

3.2.3 Spülung von Spermien ohne Fluoreszenzmarkierung

Bei diesen Spülungen des Genitaltraktes wurde die Lösung lichtmikroskopisch auf vorhandene Spermien untersucht. In der ersten Stunde nach der Besamung konnten in den meisten Fällen zahlreiche Samenzellen gefunden werden, was den Erwartungen im Vorfeld entsprach. In den Eileitern konnten bei diesen Gruppen kaum Samenzellen gespült werden, was bedeuten könnte, dass die Zeit, die die Spermien brauchen, um die Uterushörner zu passieren, etwa eine Stunde oder länger beträgt. Ab 60 Min. wurde die Zahl der Weibchen, denen Samenzellen im Uterus durch die Spülungen nachgewiesen werden konnten, deutlich weniger. Dafür konnten besagte Zellen in den Eileitern gefunden werden.
Nach 90 Minuten wurden nur noch vereinzelte Samenzellen festgestellt, von denen einige nicht mehr beweglich waren. Dieser Umstand könnte auf einen Stillstand innerhalb der Uterushörner hindeuten. Dafür spräche, dass nach dieser Zeit keine Spermien in den Eileitern gefunden wurden und die Spülungen der Uterushörner keine Samenzellen mehr aufwiesen. Wenn die Zellen jedoch weder in den Uterushörnern identifiziert werden konnten, noch in den Eileitern, stellt sich die Frage nach dem Verbleib der Spermien.
Eine Möglichkeit, die in Betracht gezogen wurde, ist, dass sich die Spermien zwar noch im Genitaltrakt aufhalten, allerdings ab einem gewissen Zeitpunkt nicht mehr durch die Spülung vom Gewebe gelöst werden können. Dies könnte bedeuten, dass sich die Samenzellen in der Schleimhaut, die die Uterushörner auskleidet, festsetzen. Befindet sich die Maus nicht im geeigneten Zyklusstadium, so könnte es zu einem Abwehrmechanismus gegen die Spermien kommen, der das Gewebe veranlasst, die Samenzellen aufzunehmen und abzubauen.

Um zu überprüfen, ob die Spermien nach einer gewissen Zeit, in welcher sie nicht mehr herausgespült werden konnten, noch im Genitaltrakt vorhanden waren, wurde in einer neuen Versuchsreihe das Sperma mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt, bevor es zur Besamung kam. So sind die Spermien, sofern sie nicht abgebaut sind, zu erkennen und können identifiziert werden.

3.2.4 Spülung von Spermien mit Fluoreszenzmarkierung

Die Spülungen nach der Besamung mit fluoreszenzmarkierten Spermien ergaben, dass die Spermien nach einer Stunde nicht mehr aus dem Genitaltrakt gespült werden konnten. Die Untersuchungen der gespülten Lösung unter dem Lichtmikroskop erzielten nur bei einem einzigen Weibchen einen Treffer. Dieses Tier befand sich augenscheinlich nicht im Zyklusstadium des Östrus. Die Gewebeproben wurden nach der Begutachtung im Lichtmikroskop durch einen Schnitt geteilt und flach auf einen Objektträger gelegt, um unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet zu werden. Der Umstand, dass bei den meisten Tieren noch Spermien gefunden wurden, unterstützt die Theorie, dass sich die Samenzellen in der Uteruswand festsetzen, und deshalb nicht durch die Spülungen sichtbar gemacht werden konnten. Die fluoreszierenden Spermien, die in den Uterushörnern zu erkennen waren, bewegten sich allerdings nicht mehr. Das könnte bedeuten, dass die Spermien von der Uteruswand abgebaut werden und in der Folge absterben.

3.2.5 Weitere Überlegungen

Welche Mechanismen dahinterstecken, dass Samenzellen an der Uterusschleimhaut haften bleiben und so ihre Motilität verlieren, bleibt offen für weitere Untersuchungen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass bei den Versuchen dieser Arbeit nur reine Spermien übertragen wurden und nicht das vollständige Ejakulat der Männchen. In diesem befinden sich neben Samenzellen noch andere Komponenten, die zur Aufrechterhaltung der Spermienmotilität im weiblichen Genitaltrakt beitragen können. Eines dieser Komponenten ist SVS2, ein Protein, das vom Seminalvesikel – einer akzessorischen Geschlechtsdrüse - sekretiert wird und auch Bestandteil des Vaginalplugs ist. (Kawano und Yoshida 2007, Kawano et al. 2014)

Des Weiteren ist beschrieben, dass SVS2 bei der *In-vivo* Fertilisation von Bedeutung ist und dazu beiträgt, dass die Samenzellen dem Uterus-induzierten Zelltod entgehen können.

Gezeigt wurde dies, indem Mauschimären, denen das Gen für die Sekretion von SVS2 fehlte, generiert und verpaart wurden. Die Fertilität dieser Mäuse war stark eingeschränkt, was sich in der Anzahl der Nachkommen niederschlug, und die Bildung des Kopulationsplugs in der Vagina der Weibchen blieb aus. Damit zeigt sich die Bedeutsamkeit von SVS2 in der *In-vivo* Befruchtung und bei der Vaginalplugbildung. Bei der IVF hingegen konnten mit Samen dieser

genetisch veränderten Männchen vergleichbare Ergebnisse erzielt werden, wie mit Spermien von Mäusen, die das Gen für SVS2 besaßen. (Kawano et al. 2014)
In Betracht zu ziehen ist außerdem, dass Männchen, denen die Seminalvesikel chirurgisch entfernt wurden, keine Nachkommen zeugten und als steril betrachtet wurden. Weibchen, die mit diesen Böcken verpaart wurden, bildeten zudem keinen Kopulationsplug nach dem Deckakt. Das Fehlen des Vaginalplugs führt zwar zu einer verminderten Fertilität, da sich ohne den Verschluss der Vagina weniger Samenzellen in dem Geschlechtsapparat befinden, jedoch nicht zu einer Infertilität. (Kawano et al.2014) Beide Umstände können also separat auf das Fehlen von SVS2 zurückzuführen sein.
Man geht außerdem davon aus, dass das Seminalplasma zur Stabilisierung der Spermienplasmamembranen beiträgt und verhindert, dass die Kapazitation frühzeitig stattfindet. (Kawano et al. 2014)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Grund für die niedrigen Trächtigkeitsraten bei künstlichen Besamungen in der Abstinenz von SVS2 liegen könnte, was eine Folge der Übertragung der reinen Spermien und nicht des Ejakulats ist. Da SVS2 eine protektive Wirkung gegen die zytotoxischen Faktoren des Uterus bietet (Kawano et al. 2014), ist das Vorhandensein dieses Proteins unerlässlich bei *In-vivo* Fertilisationen.
Um die Trächtigkeitsrate bei künstlichen Besamungen zu erhöhen, müsste noch mehr an der Möglichkeit geforscht werden, die Spermien innerhalb des Uterus zu schützen, sei es durch SVS2 oder anderen protektiven Faktoren.
Dies könnte möglicherweise durch die Exprimierung von SVS2 in den Samenzellen erfolgen. Eine andere Option wäre die Etablierung einer Methode, mit der das Ejakulat der Böcke gewonnen werden kann, da bei der Verwendung von Spermien aus den Nebenhodenschwänzen die wichtigen Faktoren, die Bestandteil des Ejakulates sind, fehlen.

Weitere Forschungen sind notwendig, um die künstliche Besamung weiterzuentwickeln und routinemäßig zu etablieren. Diese Arbeit soll Aufschluss über die intrauterine Spermienwanderung geben und über die möglichen Hindernisse, denen die Samenzellen auf ihrem Weg zur reifen Eizelle begegnen könnten.

4. Zusammenfassung

Bei der Labormaus ist reproduktionsmedizinisch die Technik der *In-vitro*-Fertilisation (IVF) vorherrschend, welche gute Ergebnisse erzielt und bereits erprobt ist. Die künstliche Besamung kann eine weniger invasive Alternative zur IVF bieten, da die Weibchen keinem chirurgischen Eingriff für den Transfer der Embryonen unterzogen werden müssen. Bisher ist diese Methode der nicht-chirurgischen Besamung bei der Labormaus zwar beschrieben, allerdings noch nicht routinemäßig etabliert. (Stone et al. 2015)
Ziel dieser Arbeit ist, nach bereits existierenden Protokollen die künstliche Besamung an SWISS-Mäusen zu erproben und im Zuge dessen die intrauterine Spermienwanderung genauer zu untersuchen.

Die Weibchen wurden zu Beginn der Versuche auf das Stadium des Östruszyklus überprüft und anschließend mit frischen Spermien, welche aus den Nebenhodenschwänzen der Böcke gewonnen wurden, besamt. Nach der Besamung wurden die Weibchen in regelmäßigen Zeitabständen euthanasiert und die Uterushörner samt Eileiter wurden entnommen. Das Gewebe wurde unter dem Lichtmikroskop gespült und auf Samenzellen untersucht. Zusätzlich wurden in weiteren Versuchen fluoreszierende Spermien bei der Besamung eingesetzt, um die Spermien, die sich in der Uteruswand festgesetzt hatten, sichtbar zu machen.

Die Samenzellen ließen sich nur bis etwa 60 Min. nach der Besamung aus dem Genitaltrakt der Weibchen herausspülen. Gewebestücke, die nach Ablauf dieser Zeit gespült wurden, wiesen keine Spermien mehr auf. Bei den Versuchen, in denen fluoreszenzmarkierte Samenzellen verwendet wurden, konnten diese noch bis zu vier Stunden nach der Besamung unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden, wobei diese nicht mehr beweglich waren.
Die Ergebnisse deuten auf einen Stillstand innerhalb des Genitaltraktes hin, der etwa eine Stunde nach der Applikation der Samenzellen in den Uterus eintritt.

Ob dieser Stillstand zu den niedrigen Trächtigkeitsraten bei der künstlichen Besamung beiträgt, und wie dieser verhindert werden kann, sollte Gegenstand künftiger Forschungen werden.

5. Summary

In laboratory mice, the predominant reproductive technique is *in vitro* fertilisation (IVF), which produces good results and is already well established. Artificial insemination can offer a less invasive alternative to IVF, as females do not need to undergo surgery for the transfer of embryos. To date, this method of non-surgical insemination has been described in the laboratory mouse but has not yet been routinely established. (Stone, et al. 2015)
The aim of this work is to test artificial insemination in SWISS mice according to existing protocols and to investigate the following intrauterine sperm migration in more detail.

At the beginning of the experiments, the females were checked for the stage of the oestrus cycle and then inseminated with fresh sperm obtained from the epididymal tails of the males. After insemination, the females were euthanised at regular intervals and the uterine horns including the oviducts were removed. The tissue was rinsed under a light microscope and examined for sperm cells. In addition, fluorescent sperm cells were used in further experiments during insemination to make the sperm cells that had lodged in the uterine wall visible.

The sperm could only be flushed out of the genital tract of the females up to about 60 min after insemination. Pieces of tissue that were rinsed after this time no longer showed any sperm. In the experiments in which fluorescently labelled sperm cells were used, they could still be visualised under the microscope up to 4 hours after insemination, although they were no longer mobile.
The results suggest a stoppage within the genital tract that occurs about one hour after the application of the spermatozoa into the uterus.

Whether this arrest contributes to the low pregnancy rates in artificial insemination, and how it can be prevented, should be the subject of future research.

6. Literaturverzeichnis

Busch W, Waberski D. 2007. Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren. Stuttgart: Schattauer.

Caligioni C. 2009. Assessing Reproductive Status/Stage in Mice. Current Protocols in Neuroscience, 48 (1).

Green M, Bass S, Spear B. 2018. A device for the simple and rapid transcervical transfer of mouse embryos eliminates the need for surgery and potential post-operative complications. BIOTECHNIQUES, 47 (5).

Kawano N, Araki N, Yoshida K, Hibino T, Ohnami N, Makino M, Kanai S, Hasuwa H, Yoshida M, Miyado K, Umezawa A. Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. 2014. Proc Natl Acad Sci U S A, 111 (11): 4145-50.

Kawano N, Yoshida M. 2007. Semen-Coagulating Protein, SVS2, in Mouse Seminal Plasma Controls Sperm Fertility. Biology of Reproduction, 76 (3): 353-361.

Muro Y, Hasuwa H, Isotani A, Miyata H, Yamagata K, Ikawa M, Yangimachi R, Okabe M. 2016. Behavior of Mouse Spermatozoa in the Female Reproductive Tract from Soon after Mating to the Beginning of Fertilization. Biology of Reproduction, 94 (4): 80,1-7.

Purdue Institutional Animal Care and Use Committee e. V. https://www.purdue.edu/research/regulatory-affairs/animal-research/docs/Mouse%20Breeding%20Colony%20Management%20Document.pdf (Zugriff am 11.05.2021)

Stone B, Steele K, Fath-Goodin A. 2015. A rapid and effective nonsurgical artificial insemination protocol using the NSETTM device for sperm transfer in mice without anesthesia. Transgenic Res, 24 (4): 775-781.

7. Appendix

7.1 Glossar

Ad libitum	nach Belieben
Ampulla tubae uterinae	Aufweitung des Eileiters
Cauda epididymis	Nebenhodenschwanz
Caudal	zum Steißbein hin
Cervix	Gebärmutterhals
Corpus uteri	unpaariger Teil der Gebärmutter
cranial	zum Schädel hin
Ductus epididymis	Nebenhodengang
intraperitoneal	im Bauchfellraum liegend
In-vitro	im Reagenzglas durchgeführt
In-vivo	am lebenden Objekt durchgeführt
IVC	individually ventilated cage (dt.: individuell belüfteter Käfig)
Uterus	Gebärmutter

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
hCG	humanes Choriongonadotropin
IVF	*In-vitro*-Fertilisation
NSET	non-surgical embryo transfer
PMSG	pregnant mare serum gonadotropin
rpm	revolutions per minute (dt.: Umdrehungen pro Minute)
SVS2	seminal vesicle secretion 2
Tab.	Tabelle
TYH	Toyoda, Yokoyama, Hoshi

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zyklusstadien bei der Maus anhand der Zellen im vaginalen Schleimhautepithel (Caligioni 2009) 10
Abbildung 2: Positionieren des Spekulums 14
Abbildung 3: Künstliche Besamung unter Anwendung des NSET-Verfahrens 15
Abbildung 4: Länge des NSET-Katheters an der eröffneten Maus gezeigt 15
Abbildung 5: Vaginalplug 16
Abbildung 6: Präpariertes Uterushorn in der Petrischale 18
Abbildung 7: Fluoreszierende Spermien unter dem Mikroskop 20

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zeitlicher Ablauf der Besamungsreihen 8
Tabelle 2: Auflistung der Gruppen – Spülung ohne Fluoreszenzmarkierung der Spermien 17
Tabelle 3: Auflistung der Gruppen - Spülung mit Fluoreszenzmarkierung der Spermien 20
Tabelle 4: Ergebnisse der Spülung ohne Fluoreszenzmarkierung der Spermien 23
Tabelle 5: Ergebnisse der Spülung mit Fluoreszenzmarkierung der Spermien 25

7.5 Herstellung der Medien

Zusammensetzung des Präinkubationsmedium (THY + MBCD) PI-Medium:

Chemikalie	**g / 100ml**		
NaCl	0,6976	Sigma	S9888
KCl	0,0356	Sigma	P5405
$MgSO_4$ x $7H_2O$	0,0293	Sigma	230391
KH_2PO_4	0,0162	Sigma	P5655
$NaHCO_3$	0,2106	Sigma	S5761
Sodium-Pyruvat	0,0055	Sigma	P4562
Glucose	0,1000	Sigma	G6152
$CaCl_2$ x $2H_2O$	0,0251	Sigma	C7902
Methyl – ß - cyclodextrin	0,0983	Sigma	C4555
Penicillin G	0,0075	Sigma	P7794
Streptomycin	0,0050	Sigma	S1277
Polyvinylalcohol	0,1000	Sigma	P8136

Herstellung von PMSG (5UI) [Folligon Fa. Intervet]:

- Lösungsmittel zu Lyophilisat mit Spritzen und Kanülen pipettieren
- Aufgelöstes Hormon in Becherglas geben
- 15 ml NaCl pro Flasche hinzugeben
- Rühren mit Magnetrührer
- Epis zu 1,25 ml mit dem Handystep aliquotieren
- Bei -80°C einfrieren

Herstellung von hCG (5IU) [Chlorulon Fa. Intervet]

- Lösungsmittel zu Lyophilisat mit Spritzen und Kanülen pipettieren
- Aufgelöstes Hormon in Becherglas geben
- 25 ml NaCl pro Flasche hinzugeben
- Rühren mit Magnetrührer
- Epis zu 1,25 ml mit dem Handystep aliquotieren
- Bei -80°C einfrieren