

6. Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß hochgereinigter gonadotroper Hormone und von Serum östrischer Sauen (SöS) (Hormongehalte: 3,3 ng LH, 3,2 ng FSH, 15 pg Östradiol und <1 ng Progesteron pro ml) auf die in-vitro Reifung isolierter Kumulus-Oozyten Komplexe (KOK) des Schweines untersucht. Die KOK wurden durch Spülung von 2 - 5 mm großen Follikeln von Ovarien präpuberaler Schlachtsauen gewonnen und nach morphologischen Kriterien klassifiziert (homogen granuliertes Plasma, mehr als drei Lagen dichtes Kumulusgewebe: Klasse I; zwei bis drei Lagen dicke Zellschicht: Klasse II). Alle Versuche wurden an Eizellen beider Klassen durchgeführt und jeweils mit einer Kontrollgruppe ohne Hormonzusatz oder Verwendung östrischen Serums verglichen. Die Kultur fand für 48 Stunden auf einem Schwenker in modifiziertem Tissue Culture Medium 199 E statt (Temperatur: 39° C, Atmosphäre: 5% CO₂ in Luft, 95% Luftfeuchtigkeit). In vier Versuchen wurden insgesamt 3626 Eizellen ausgewertet:

- 1.) Zugabe von porzinem hochgereinigtem luteinisierendem Hormon (LH) in den Konzentrationen 10, 5, und 1 µg pro ml Kulturmedium
- 2.) Zugabe von porzinem hochgereinigtem follikelstimulierendem Hormon (FSH) in den Konzentrationen 10, 5, und 1 µg pro ml Kulturmedium
- 3.) Kombination von LH (10 und 1 µg pro ml) mit FSH (10, 5, und 1 µg/ml)
- 4.) Kombination von FSH/LH (10/1 und 5/1 µg/ml) mit jeweils 10% und 20% SöS.

Nach der Kultur wurde die Kumulusexpansion bewertet. Im Anschluß an Denudierung, Fixation und Färbung wurde der Anteil an Eizellen im

Keimblasenstadium (unreife Eizellen) und in der zweiten Metaphase der Meiose (reife Eizellen) bestimmt. Andere Kernstadien wurden als degeneriert eingestuft. Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

- 1.) LH übte bei alleiniger Zugabe in den Konzentrationen 10 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Medium einen reifungshemmenden Einfluß auf die Eizellen aus, induzierte aber eine geringgradige Expansion des Cumulus oophorus.
 - 2.) FSH bewirkte eine erhöhte Kernreifungsrate und deutliche Expansion des Cumulus oophorus in allen gewählten Konzentrationen.
 - 3.) Die Zugabe von LH und FSH führte zu einem erhöhten Anteil von Eizellen in Metaphase II und zu einer deutlichen Expansion des Cumulus. Zusätzlich induzierte eine geringe LH-Zugabe bei Kombination mit hohen FSH-Konzentrationen (1 μg LH mit 5 oder 10 μg FSH pro ml) eine stärkere Kumulusexpansion als alle anderen Kombinationen.
 - 4.) Nur bei Zusatz von SöS wurden Unterschiede zwischen den Eizellklassen deutlich; Eizellen der Klasse I reiften vermehrt zur Metaphase II.
 - 5.) Bezüglich der Kumulusexpansion zeigte sich bei Eizellen der Klasse II das Medium mit 10% SöS dem mit 20% geringfügig überlegen.
 - 6.) Die höchsten Reifungsraten wurden bei einem Zusatz von 20% SöS zu Kulturmedium mit 10 μg FSH und 1 μg LH pro ml erzielt.
- Die Stimulation von Kumulusexpansion und Kernreifung durch Gonadotropine und Serum östrischer Sauen wurde klar dargestellt.

7. Summary

Peter Müsse

Influence of highly purified gonadotropic hormones and serum of estrus sows on cumulus expansion and nuclear maturation of porcine oocytes in-vitro

The influence of highly purified gonadotropic hormones and serum of estrus sows (SES) (hormone contents: 3.3 ng LH, 3.2 ng FSH, 15 pg estradiol, < 1 ng progesterone per ml) on the in-vitro maturation of isolated porcine cumulus oocyte complexes (COC) was studied. The COC were harvested by flushing follicles of 2 - 5 mm diameter and classified according to their morphology (evenly granulated cytoplasm, more than three layers of cumulus cells: Class I; two to three layers of cumulus cells: Class II). All experiments were carried out with oocytes of both classes and compared to a control group without the additional hormones and SES. The oocytes were cultured for 48 h in modified Tissue Culture Medium 199E (temperature: 39°C, atmosphere: 5% CO₂ in air, 95% humidity) in a gently agitated system. 3626 oocytes were evaluated in four experiments:

- 1.) Addition of porcine luteinizing hormone (LH) in concentrations of 10, 5 and 1 µg per ml medium
- 2.) Addition of porcine follicle stimulating hormone (FSH) in concentrations of 10, 5 and 1 µg per ml medium
- 3.) Combination of LH (10 and 1 µg/ml) with FSH (10, 5, and 1 µg/ml)
- 4.) Combination of FSH/LH (10/1 and 5/1 µg/ml) with 10% or 20% of SES

After culture the expansion of the cumulus oophorus was classified. After denuding, fixation and staining the percentage of oocytes in the germinal vesicle stage (non-maturing oocytes) and second metaphase of meiosis (mature oocytes) could be determined. Other nuclear stages were classified as degenerate. The following results were obtained:

- 1.) Addition of LH exclusively (10 and 5 μg per ml medium) exerted a depressing effect on the maturation of porcine oocytes, but induced a slight expansion of the cumulus oophorus.
- 2.) FSH induced a higher frequency of maturation and a distinct expansion of the cumulus oophorus in all concentrations tested.
- 3.) Addition of LH and FSH in all combinations caused more oocytes to mature to metaphase II and a distinct expansion of the cumulus oophorus. Low concentrations of LH combined with high FSH supplements (1 μg LH with 5 or 10 μg FSH per ml) induced a higher expansion than all other concentrations.
- 4.) Differences between the two classes became apparent with the use of SES only. Class I oocytes showed a higher proportion of oocytes in the second metaphase.
- 5.) Concerning the expansion of the cumulus the addition of 10% SES proved superior to 20% SES.
- 6.) The highest frequency of maturation was obtained in a medium containing 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FSH, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LH and 20% SES.

The stimulation of cumulus expansion and nuclear maturation by gonadotropic hormones and SES was clearly demonstrated.