

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, welches System der Ko-Kultivierung besonders für die Produktion größerer Zahlen von Embryonen in-vitro geeignet ist.

Dazu wurde nach In-vitro-Reifung und In-vitro-Befruchtung die Weiterentwicklungsfähigkeit der Embryonen auf verschiedenen einschichtigen Zellrasen untersucht.

Außerdem wurde die Vitalität der Blastozysten durch ihre Fähigkeit in-vitro zu schlüpfen überprüft. Zu diesem Zweck wurden sie entweder auf Feederlayern oder in zellfreiem Medium weitere vier Tage kultiviert.

Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

1. Durch Follikelpunktion wurden von 239 Ovarien 952 Oozyten mit einem geschlossenen Cumuluszellsaum gewonnen. Das entspricht einer durchschnittlichen Ausbeute von vier Eizellen pro Eierstock. Nach Incision der Eierstocksoberfläche von 20 Ovarien wurden 172 kultivierungsfähige Oozyten isoliert. Das entspricht einer durchschnittlichen Ausbeute pro Eierstock von acht Eizellen. Die Unterschiede zwischen den beiden Gewinnungsmethoden sind hochsignifikant.

2. Nach 24stündiger In-vitro-Maturation waren 89% der durch Follikelpunktion und 91% der durch Incision gewonnenen Oozyten gereift. Der Reifezustand wurde anhand der Cumuluszell-expansion bestimmt.

3. Bei der In-vitro-Befruchtung teilten sich 68% der nach Follikelpunktion und 74% der nach Incision maturierten Oozyten.

4. Die in-vitro befruchteten Oozyten wurden über sechs Tage auf sechs verschiedenen Feederlayern kultiviert. Auf Feederlayern aus bovinen Uterusepithelien wurden keine Teilungsstadien mit mehr als 16 Blastomeren beobachtet. Auf bovinen embryonalen Fibroblasten teilten sich lediglich 6% der Oozyten bis zum Morula- oder Blastozystenstadium. Hochsignifikant höhere Kultivierungsergebnisse ermöglichte die Ko-Kultivierung befruchteter Oozyten mit Cumuluszellen (31%), bovinen Granulosazellen (29%), bovinen Eileiterepithelien (25%) und murinen embryonalen Fibroblasten (28%).

5. Bei der Weiterkultivierung der entstandenen Blastozysten über vier Tage schlüpfen 19,4% der auf Feederlayern inkubierten Blastozysten und 69,2% der in zellfreie Medien übertragenen Blastozysten aus ihren Zonae pellucidae.

6. Durch den Transfer von zwei Blastozysten aus der Ko-Kultivierung mit Eileiterepithelien auf D7 Empfängertiere wurden zwei Trächtigkeiten erzielt.

7. Die vorliegenden Ergebnisse lassen erkennen, daß für die Produktion einer großen Zahl übertragungsfähiger Embryonen nach In-vitro-Befruchtung die Ko-Kultivierung mit Cumuluszellen besonders geeignet ist.

Claudia Reintjes:

Investigations on the co-cultivation of in vitro matured and in vitro fertilized bovine oocytes

Summary

In the present study it was to be investigated which system of co-cultivation is especially suited for the in vitro production of larger numbers of embryos.

For this the ability of the embryos obtained after in vitro maturation and fertilization to further development on various cell monolayers was examined.

In addition the viability of the blastocysts was checked on their ability to hatch in vitro. For this purpose they were cultivated on either feeder layers or cell-free media for four days.

The following results were obtained:

1. A total of 952 oocytes with a closed cumulus cell layer were obtained from 239 ovaries by punctation. This corresponds to an average yield of four oocytes per ovary. After incision of the surface of 20 ovaries, 172 cultivatable oocytes were isolated. This corresponds to an average yield of eight oocytes per ovary. The differences between the two methods of collection are highly significant.

2. Following in vitro maturation for 24 hours, 89% of the oocytes obtained by punctation and 91% of the oocytes obtained by incision had matured. The maturation state was determined on the basis of cumulus cell expansion.

3. Sixty-eight percent of the oocytes matured after follicle punctation and 74% of the oocytes matured after incision cleaved after in vitro fertilization.

4. The in vitro fertilized oocytes were cultivated for six days on six various feeder layers. No cleavage stages with more than 16 blastomeres were seen on feeder layers of bovine uterine epithelia. Only 6% of the oocytes cleaved to the morula or blastocyst stage on bovine embryonal fibroblasts.

Highly significantly higher results were made possible through the co-cultivation with cumulus cells (31%), bovine granulosa cells (29%), bovine oviductal epithelia (25%), and murine embryonal fibroblasts (28%).

5. With further cultivation on the developed blastocysts for four days, 19,4% of the blastocysts incubated on feeder layers and 69,2% of the blastocyst transferred to cell-free media hatched from their zonae pellucidae.

6. Two pregnancies were obtained through transfer of two blastocysts co-cultivated with oviductal epithelia to D7 recipients.

7. These results show that co-cultivation with cumulus cells is especially suited for the production of a large number of transferable embryos.