

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Dichtegradientenzentrifugation in Percoll als Spermaaufbereitungsmethode alternativ zum "Swim-up"-Verfahren für die In-vitro-Fertilisation von Rinderoozyten eingesetzt werden kann. Tiefgefriersperma verschiedener Bullen wurde vergleichend nach beiden Methoden aufbereitet. Die Beurteilung erfolgte nach der zurückgewonnenen Spermienanzahl, der Teilungs- und der Weiterentwicklungsrate nach In-vitro-Befruchtung.

Außerdem wurde untersucht, ob sich durch die Zugabe von Pentoxifyllin die Spermienmotilität bzw. die Teilungs- und Weiterentwicklungsraten nach In-vitro-Befruchtung verbessern lassen. Pentoxifyllin wurde in einer Konzentration von 2mg/ml zum Tiefgefriersperma vor dem Einfrieren zum Spermaverdünner, bzw. zum Nativsperma und zum Tiefgefriersperma unmittelbar nach dem Auftauen zugegeben.

Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

1. Bei Verwendung von Tiefgefriersperma von sechs verschiedenen Bullen zur In-vitro-Befruchtung wurden Teilungsraten zwischen 43-69% und Weiterentwicklungsraten zu Morulae/Blastozysten zwischen 2,6-18,1% ermittelt. Dabei ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Bullen.

2. Zwischen den Non-return-Raten und den In-vitro-Befruchtungs- und Kultivierungsergebnissen bei Verwendung von Samen sechs verschiedener Bullen konnten keine signifikanten Beziehungen ermittelt werden. Die entsprechenden Werte lagen bei  $r=0,4$  bzw.  $r=0,6$ .

3. Durch die Dichtegradientenzentrifugation in Percoll konnte die nach der Spermaaufbereitung zurückgewonnene Anzahl der Spermien signifikant um das 2-4fache im Vergleich zum "Swim-up" gesteigert werden. Die Spermienkonzentrationen stiegen bei allen Bullen von 3-12 Mio SP/ml nach dem "Swim-up" auf 12-39 Mio Sp/ml nach der Dichtegradientenzentrifugation in Percoll.

4. Die In-vitro-Teilungs- und Weiterentwicklungsraten waren nach der Aufbereitung des Spermias mit der Dichtegradientenzentrifugation in Percoll bei vier Bullen höher als nach der Aufbereitung mit dem "Swim-up"-Verfahren.

Bei einem Bullen konnte die In-vitro-Befruchtungsrate durch die Dichtegradientenzentrifugation in Percoll signifikant von 57,6 auf 72,5% verbessert werden. Bei zwei Bullen mit schlechter In-vitro-Befruchtungsrate erhöhte sich die Weiterentwicklungsraten von 3,3 bzw 6,1% auf 9,2 bzw. 11,1%.

5. Die Variabilität der In-vitro-Befruchtungs- und Weiterentwicklungsergebnisse zwischen verschiedenen Bullen konnte durch die Dichtegradientenzentrifugation in Percoll im Vergleich zum "Swim-up" leicht verringert werden.

6. Durch Pentoxifyllinzugabe (2mg/ml) zum Sperma verschiedener Bullen vor dem Einfrieren konnte die Spermienmotilität nach dem Auftauen des Tiefgefrierspermias nicht verbessert werden. Bei Pentoxifyllinzugabe zum Spermaverdünner kam es zu einer signifikanten Verschlechterung der Spermienmotilität von 50 auf 30%.

7. Die Pentoxifyllinzugabe (2mg/ml) zum Sperma zweier Bullen nach dem Auftauen des Tiefgefrierspermias veränderte die In-vitro-Teilungsraten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nicht signifikant (70,5 vs. 69,5% bzw. 72,4 vs. 72,4%). Auch die In-vitro-Weiterentwicklungsraten zeigten mit 8,8 vs. 8,0% bzw. 12,1, vs. 13,8% keine signifikanten Änderungen.

8. Beim Einsatz von Tiefgefriersperma mit einer Pentoxifyllinzugabe (2mg/ml) zum Spermaverdünner vor dem Einfrieren konnte die In-vitro-Weiterentwicklungsrate der Oocyten bei einem von zwei Bullen signifikant von 8,8 auf 14,1% verbessert werden.

9. Die In-vitro-Teilungs- und Weiterentwicklungsraten von Rinderoozyten, die mit Tiefgefriersperma befruchtet wurden, dem Pentoxifyllin (2mg/ml) zum Nativsperma vor dem Einfrieren zugegeben worden war, zeigten mit 58,5 bzw. 5,4% im Vergleich zu einer Kontrolle mit 55,7 bzw. 5,3% keine signifikanten Veränderungen.

## **Friedrich Götz**

Investigations into the effects of different techniques of sperm separation (Density Gradient Centrifugation in Percoll and Swim-up Method) on the results of In Vitro Fertilization of Bovine Oocytes While Adding Pentoxifyllin to the Sperm

### **Summery**

The aim of the present study was to find out whether with in vitro fertilization of bovine oocytes density gradient centrifugation in Percoll can be applied as an alternative method of separating sperm versus the swim-up method.

Both techniques were applied to separate frozen-thawed sperm from different bulls. After in vitro fertilization the sperm was evaluated concerning the number of spermatozoa, the cleavage rate and the rate of further development.

Another aim was to find out whether by adding pentoxifyllin the motility of spermatozoa and the cleavage rate and rate of further development after in vitro fertilization can be improved.

Pentoxifyllin was added in a concentration of 2 mg/ml to the sperm extender before freezing and to the nativ sperm and cryopreserved sperm immediately after thawing respectively.

The following results were obtained:

1. When using cryopreserved sperm from six different bulls for in vitro fertilization the cleavage rates obtained were between 43 an 69 per cent and the rates of development into morulae/blastocysts obtained were between 2.6 and 18.1 per cent. Significant differences between the different bulls were observed.

2. No significant correlations between the non-return rates and the results of in vitro fertilization and cultivation when using the semen from six different bulls could be observed. The corresponding values were  $r=0.4$  and  $0.6$  respectively.

3. The number of spermatozoa recovered after separation could be increased significantly the swim-up method through application of density gradient centrifugation in Percoll. In fact, it could be doubled and even quadrupled. The concentration of spermatozoa from all bulls increased from 3-12 mio Sp/ml with the swim-up method to 12-39 mio Sp/ml with the technique of density gradient centrifugation in Percoll.

4. With four bulls the in vitro cleavage and development rates were higher when the sperm was separated through density gradient centrifugation in Percoll than when the swim-up method was applied.

With one bull the in vitro fertilization rate could be increased significantly from 57.6 to 72.5 per cent through density gradient centrifugation in Percoll.

The rate of further development of semen from two bulls with a poor in vitro fertilization rate increased from 3.3 to 9.2 and 6.1 to 11.1 per cent respectively.

5. Application of density gradient centrifugation in Percoll resulted in a slight reduction of variability of results obtained in in vitro fertilization and development rates among different bulls when compared to the swim-up method.

6. Addition of pentoxifyllin (2 mg/ml) to the sperm of different bulls before freezing could not improve the motility spermatozoa after thawing of the cryopreserved sperm.

Addition of pentoxifyllin to the sperm extender led to a significant reduction of the motility of spermatozoa from 50 per cent to 30 per cent.

7. Addition of pentoxifyllin (2 mg/ml) to the frozen-thawed sperm from two bulls after thawing did not significantly change the in vitro cleavage rate when compared to a control group (70.5 vs. 69,5 per cent and 72.4 per cent vs. 72.4 per cent respectively. In vitro development rates did not show any significant changes either (8.8 vs. 8.0 per cent and 12.1 vs. 13.8 per cent respectively).

8. When pentoxifyllin (2 mg/ml) was added to the sperm extender before freezing and the frozen-thawed sperm was used for in vitro fertilization the rate of further development of oocytes could be improved significantly from 8.8 to 14.1 per cent with the sperm from one of two bulls.

9. Addition of pentoxifyllin to the native sperm before freezing did not significantly influence the in vitro cleavage and development rates of bovine oocytes that had been fertilized with frozen-thawed sperm (58.5 per cent and 5.4 per cent vs. 55.7 per cent and 5.3 per cent respectively when compared to a control group).