

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, festzustellen, ob der Zusatz von Casein-Phosphopeptiden (CPP) zum Befruchtungsmedium die Variabilitäten in den In-vitro-Ergebnissen zwischen Bullen und Spermienchargen desselben Bullen ausgleichen kann. Dazu wurden in TCM 199 mit Zusatz von Hormonen und Serum von östrischen Kühen in vitro Rinderoozyten gereift und mit tiefgefrorenem und wieder aufgetautem Sperma von mehreren Bullen, und mit verschiedenen Spermienchargen desselben Bullen in vitro befruchtet. Als Befruchtungsmedium wurde BO-Medium (BRACKETT u. OLIPHANT 1975) ohne CPP-Zusatz (Kontrolle) oder mit Zusatz von CPP eingesetzt. In einem weiteren Versuch wurde der Effekt von CPP im Befruchtungsmedium in einem vergleichenden Einsatz zweier Befruchtungssysteme, BO-System und TALP-System (PARRISH et al. 1986), untersucht. Das BO-System ist durch die Kapazitationsförderer Koffein und Heparin charakterisiert und die Spermien werden gewaschen. Das TALP-System beinhaltet die Kapazitationsförderer Heparin, Hypotaurin, Epinephrin und Penicillamin. Im TALP-System werden die Spermien gewaschen und einem „swim-up“-Verfahren unterzogen. Der Reifungs- und Befruchtungserfolg wurde durch Fixation der Eizellen und Färbung mit Acetoorcein überprüft. Bei den Penetrationsversuchen wurde nach 5, 7, 9 und 18 Stunden Gameten-Kokultur fixiert. Als penetriert galten Eizellen, in denen ein Spermenschwanz bei 400facher Vergrößerung nachzuweisen war. Die Hälfte der Zygoten wurde nicht fixiert, sondern in TCM 199 mit Serumzusatz bis zu 12 Tage kultiviert. Durch stereomikroskopische Beurteilung wurde der Teilungs- und Entwicklungserfolg erfaßt. Die Qualität der Embryonen aus den Kontrollgruppen (ohne CPP-Zusatz) und den Versuchsgruppen (mit CPP-Zusatz) wurden durch Zellzählung mit Hilfe der Differentialfärbung an geschlüpften Blastozysten ermittelt. Für diese Arbeit sind 1679 in einem Schlachthaus gesammelte Ovarien „gesliced“ worden, von denen 15951 Oozyten in den Versuchen verwendet werden konnten. Das entspricht einer Gewinnungsrate von 9,5 Oozyten pro Ovar. Es wurden nur Oozyten mit einheitlich dunkel gefärbtem, kugeligem Eizellplasma und mehrlagigem, kompakten Kumulus (LEIBFRIED u. FIRST 1979) sowie mit mehr oder weniger vielen Granulosazellen gesammelt, zusammengebracht und zufällig auf die Versuchsgruppen verteilt.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1.) Bei der In-vitro-Reifung von Rinderoozyten ohne Einteilung nach Klassen ist eine Kernreifungsrate (Metaphase II) von 82 % nach 22 Stunden Reifungsdauer erzielt worden. Der Reifungsgrad zum Zeitpunkt 22 Stunden und 23 Stunden nach Kulturbeginn war nicht signifikant verschieden ($P = 0,7245$).

2.) Im BO-System, unter Einsatz von 5 verschiedenen Bullen, wobei von zwei Bullen je zwei Spermienchargen untersucht wurden, zeigte CPP einen deutlichen stimulierenden Effekt. Die Penetrationsrate wurde durch CPP in signifikanter Weise von durchschnittlich 20,7 % auf 43,9 % gesteigert. Weiterhin wurde ein Einfluß des Bullen und der Spermiencharge auf die Penetration festgestellt ($P = 0,0001$). Es gab Wechselwirkungen zwischen dem Bullen und dem Zusatz von CPP ($P = 0,001$). Die Polyspermierate hing von dem eingesetzten Bullen ab, und CPP steigerte die Rate von durchschnittlich 2,9 % auf 5,2 %.

Bei den Entwicklungsergebnissen wurde als einziger Einflußfaktor die Zugabe von CPP ermittelt. CPP steigerte statistisch signifikant die durchschnittliche Teilungsrate von 25 % auf 41 % und die durchschnittliche Blastozystenrate von 6 % auf 13 %.

3.) Bei der Untersuchung der Effekte von CPP in zwei verschiedenen Befruchtungssystemen (BO und TALP) kamen drei Bullen, zwei mit je zwei Spermienchargen, zum Einsatz. Die eingesetzten Spermienchargen waren zum Teil identisch mit denen aus dem ersten Versuch. CPP war bei einigen Spermienchargen in der Lage, Penetrationsrate (Spermiencharge N4), Teilungsrate (N4, R1 und P) und Blastozystenrate (N3 und P) statistisch signifikant zu steigern. Aber ein insgesamt für alle Bullen oder Spermienchargen geltender positiver Effekt von CPP war in diesem Versuch nicht zu beobachten ($P > 0,14$). Die durchschnittlichen Penetrationsraten lagen bei 32,2 % (ohne CPP), bei 35,3 % (mit CPP); die Teilungsraten lagen bei 39,7 % (ohne CPP) und bei 44,0 % (mit CPP); die Blastozystenraten bei 12,7 % (ohne CPP) und 13,6 % (mit CPP). Auch hatte CPP keinen Einfluß auf die Gesamtzellzahl (Ges.) und das Verhältnis Innere-Zellmasse-Zellzahlen zu Gesamtzellzahl (ICM/Ges.) bei den produzierten Blastozysten (GLM: $P = 0,75$ für Ges. und $P = 0,13$ für ICM/Ges.).

In diesem Versuch förderte das BO-System die Penetrations- und Polyspermieraten statistisch signifikant gegenüber dem TALP-System (BO: 36,1 % und TALP: 31,4 % beziehungsweise BO: 4,8 % und TALP: 2,7 %). Dagegen förderte das TALP-System die Teilungs- und Blastozystenraten statistisch signifikant gegenüber dem BO-

System (BO: 34,6 % und TALP: 49,1 % beziehungsweise BO: 10,6 % und TALP: 15,7 %). In beiden Systemen blieb der Einfluß auf die Zellzahlen der geschlüpften Blastozysten gleich (GLM: $P = 0,9$ für Ges. und $P = 0,0529$ für ICM/Ges.).

Bei allen untersuchten Parametern (Penetrations-, Polyspermie-, Teilungs-, Blastozystenrate, Gesamtzellzahl und Verhältnis ICM/Ges.) war ein signifikanter Einfluß des Bullen und der Spermiencharge (bei der Charge nicht auf ICM/Ges.) festzustellen. Zudem trat bei der Penetrationsrate eine Wechselwirkung zwischen Bullen und dem Befruchtungssystem auf, und die Gesamtzellzahl war auch abhängig von dem Tag des Schlupfes.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß keines der untersuchten Befruchtungssysteme in der Lage war, sowohl die Penetration als auch die Vorbereitungen zur Embryonalentwicklung in optimaler Weise zu unterstützen. Die Hauptursachen für die Variabilitäten des In-vitro-Produktionserfolges, gemessen an Penetrations-, Teilungs- und Blastozystenrate, waren der Bullen und die Spermiencharge. Die Gesamtzellzahl bei geschlüpften in vitro produzierten Embryonen wurde vom Bullen, von der Spermiencharge und vom Tag des Schlupfes beeinflusst. Das Verhältnis innerer Zellmasse zu Gesamtzellzahl wurde wesentlich vom Bullen bestimmt. Ein steigernder Effekt von CPP im BefruchtungsmEDIUM auf die Penetrations-, Teilungs- und Entwicklungsraten nach Einsatz individueller Spermienchargen in vitro wurde nachgewiesen. CPP bleibt ohne Einfluß auf die anhand der Zellzahlen und des Verhältnisses ICM/Ges. ermittelte Qualität der geschlüpften Blastozysten.

Das Vorhandensein von Wechselwirkungen zwischen dem Bullen und CPP sowie dem Bullen und dem Befruchtungssystem spricht dafür, daß es schwer sein wird, ein für alle Bullen gleichermaßen optimales Befruchtungssystem zu etablieren.

Die Variabilität zwischen Bullen ist durch genetische Eigenschaften und umweltbedingte Einflüsse (unter anderem Tiefgefrieren) bedingt. Dementsprechend können die Variabilitäten nur so weit ausgeglichen werden, wie es möglich ist, die Auswirkungen von umweltbedingten Schäden und bedingt genetisch veranlagten Membran- oder Enzymdefekte zu mildern. Es wird nicht möglich sein, die Ergebnisse aller Bullen in vitro gleich gut zu machen. Und weil es in vivo auf andere Spermieigenschaften ankommt als in vitro, wird vermutet, daß die in vitro guten Bullen nicht auch in vivo die besten sein müssen. Es sollte weiterhin getestet werden, ob ein routinemäßiges Zusetzen von CPP zum BefruchtungsmEDIUM nicht vorteilhaft wäre.

7. SUMMARY

Ute Kreysing

Experiment to reduce the variability in fertilization and development rates obtained between bulls and between ejaculates of one bull by supplementing the in vitro fertilization medium with casein-phosphopeptides

The aim of the present work was to examine, whether casein-phosphopeptides (CPP) as a supplement of in vitro fertilization (IVF) medium could improve the yield of embryos and could abolish the variability in fertilization and development rates between bulls and between ejaculates of the same bull. Bovine oocytes were matured in TCM-199 supplemented with estrus cow serum and hormones and fertilized with frozen/thawed semen of different bulls and different ejaculates from one bull. The IVF medium was BO medium (BRACKETT and OLIPHANT 1975) without CPP (as control) or supplemented with CPP. Another experiment was conducted to compare the effect of CPP in two different IVF systems. These systems were first the above BO system, which uses heparin and caffeine as the mean of capacitation and the TALP system (PARRISH et al.1986), which includes heparin, hypotaurine, epinephrine and penicillamine. In the TALP system the sperm were washed and submitted to a swim-up procedure, whereas in the BO system the sperm were washed only. To monitor maturation and fertilization rates, oocytes were fixed and stained with aceto-orcein. In a penetration experiment, oocytes were fixed after 5, 7, 9, and 18 hours of sperm oocyte coculture. Only zygotes with a visible sperm tail at 400x magnification were considered to be penetrated. Half of the oocytes/zygotes were not fixed but cultivated in TCM-199 with serum to evaluate development. To determine the quality of the embryos produced, the cell number of hatched blastocysts was counted by means of a differential dye technique. A total of 1679 ovaries were collected at a local slaughterhouse and sliced to release the oocytes. Only oocytes with an evenly dark coloured cytoplasm, a thick and compact cumulus and a reasonable number of granulosa cells were collected, pooled and randomly distributed to the different groups. 15951 oocytes were used in the experiments, an average yield of 9.5 per ovary.

The following results were obtained:

1.) After 22 hours of *in vitro* maturation 82 % of the bovine oocytes examined were at metaphase II and considered to be mature. There was no difference between 22 and 23 hours of maturation ($p = 0.7245$).

2.) The application of CPP in the BO system had a statistically significant effect. Five different bulls were used, with two bulls having two ejaculates tested each. CPP raised the penetration rate from 20.7 % to 43.9 %, the polyspermy rate from 2.9 % to 5.2 % and the cleavage and blastocyst rates from 25 % to 41 % and from 6 % to 13 %, respectively. There was an effect of the individual bull on the penetration rate ($p \leq 0.0001$) and a interaction between bull and CPP ($p \leq 0.001$).

3.) To test the effect of CPP in two different *in vitro* fertilization systems, three bulls were used, with two bulls having two ejaculates tested each. CPP promoted penetration, polyspermy and development in some ejaculates, but there was no overall effect for CPP ($p > 0.14$). The average penetration rates were 32.2 % (without CPP) and 35.3 % (with CPP); the cleavage rates were 39.7 % (without CPP) and 44.0 % (with CPP) and the blastocyte rates were 12.7 % (without CPP) and 13.6 % (with CPP). There also was no effect seen on the total cell number or on the proportion of inner cell mass cells (ICM) and total cell number (tcn) (GLM: $p = 0.75$ for total cell number and $p = 0.13$ für ICM/tcn).

This experiment revealed, that the BO system gave improved penetration and polyspermy (BO: 36.1 % and TALP: 31.4 % ; BO: 4.8 % and TALP: 2.7 % resp.), while the TALP system improved the development (cleavage: BO: 34.6 % and TALP: 49.1 % ; blastocysts: BO: 10.6 % and TALP: 15.7 %). These fertilizing systems did not differ with respect to the cell number and proportion of ICM/tcn of the hatched blastocysts produced (GLM: $p = 0.9$ for tcn. and $p = 0.0529$ for ICM/tcn). All the parameters under observation - penetration, polyspermy, cleavage, total cell number and proportion of ICM/tcn - were significantly influenced by which bull was used and by which ejaculate of an individual bull (except ICM/tcn for ejaculate). In addition there was an interaction between the bull and the fertilization system. The total cell number depended on the day when hatching took place.

From the results of this work it is obvious, that neither fertilization system was able to promote penetration and development equally in an optimal manner. The main

cause of variation in in vitro production of bovine embryos is the bull used and the quality of the specific ejaculate of a given bull. The total cell number of hatched blastocysts was influenced by the bull used, the ejaculate of the bull and the day of hatching. The promoting effect of casein-phosphopeptides on penetration and development has been proven when it has been used as a supplement to the fertilization medium. CPP does not affect the cell numbers or the proportion of ICM/tcn of the hatched blastocysts produced.

The presence of interaction between the bull and CPP and between the bull and the fertilizing system indicates that it will be difficult to establish an in vitro fertilization system that will support each individual bull in an optimal manner.

Summarizing the results given here, it is concluded, that the variability among bulls is caused by genetic and environmental factors. The difference between bulls can only be diminished as far as it is possible to reduce environmentally caused defects. It will not be possible to elevate the in vitro results of every individual bull to the same level. Furthermore the best bulls in vivo must not be the best ones in vitro, as there are other characteristics important for in vitro than in vivo fertilization. It will be worthwhile to test CPP in a larger study in the context of routine application of in vitro production.