

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, mit Hilfe der laparoskopischen intrauterinen Besamung die Effizienz der Produktion von Vorkern-Stadien für die Mikroinjektion sowie von Morulae und Blastozysten für Kryokonservierung u./o. Embryotransfer zu steigern. Damit sollte die Befruchtungsraten, die bei brunstsynchronisierten und superovulierten Schafen nach Natursprung häufig stark erniedrigt sind, verbessert werden.

An 191 Tieren (Australian Merinos) wurde zunächst die Eignung der laparoskopischen intrauterinen Besamungsmethode für den Praxiseinsatz überprüft (Versuchsabschnitt I). Dabei sollten mit frisch-verdünntem Spermia befriedigende Trächtigkeitsraten erzielt werden. Im Hauptversuch (Versuchsabschnitt II) wurden insgesamt 64 Tiere der Rassen Schwarzköpfiges Fleischschaf, Merinolandschaf, Finnschaf und Kreuzungstiere mit Besamungsdosen von 50 oder 300 mio Spermien nach Frisch-Verdünnung, Flüssigkonservierung oder Tiefkühlkonservierung des Spermias besamt oder als Kontrolle durch einen fertilen Bock gedeckt. 24 bis 26 h post inseminationem erfolgte die Spülung der Eileiter zur Eizell- bzw. Embryonengewinnung und Überprüfung des Besamungserfolges. Im letzten Teil (Versuchsabschnitt III) wurden weitere 8 Tiere (Ostfriesische Milchschafe) zweimal im Abstand von 90 Tagen mit frisch-verdünntem Spermia besamt und die Eizellen bzw. Embryonen 6 Tage post inseminationem gewonnen, um die Auswirkungen einer wiederholten laparoskopischen intrauterinen Besamung innerhalb einer Besamungssaison auf die Entwicklungsfähigkeit der befruchteten Eizellen zu untersuchen.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

- 1.) Im Feldversuch wurde durch laparoskopische intrauterine Besamung von 191 Schafen mit 300 mio frisch-verdünnten Spermien eine Trächtigkeitsrate (d 40) von 53,9% erzielt. Dabei ergaben sich keine signifikante Unterschiede in den Trächtigkeitsraten (55,2%; 48,3%; 61,7%; 57,1%; 41,7%) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Brunstdetektion (Vorabend; bis 7.00 Uhr; bis 10.00 Uhr; bis 14.00 Uhr; keine Brunstdetektion)
- 2.) Die Anteile Schafe mit starker, mittlerer und schwacher Uteruskontraktilität zum Zeitpunkt der Besamung unterschieden sich mit 69,6%, 26,2% und 4,2% signifikant voneinander ($p < 0,001$). Zwischen den Trächtigkeitsraten (d 40) dieser Gruppen

- (57,1%; 50,0%; 25,0%) konnten aufgrund der unterschiedlichen Gruppengrößen keine signifikanten Unterschiede errechnet werden.
- 3.) Die Spermaapplikation von 300 mio frisch-verdünnten Spermien in beide Uterushörner oder in nur ein Horn hatte keinen statistisch signifikanten Einfluß auf die Trächtigkeitsraten (d 40) von 53,4% oder 46,6%.
 - 4.) Nach laparoskopischer intrauteriner Besamung oder Bedeckung (Kontrollgruppe) von 64 Schafen zur Gewinnung von Vorkern-Stadien zur Mikroinjektion wurden insgesamt 527 Gelbkörper (\bar{x} 8,2 \pm 4,7 pro Tier) gezählt und 427 Eizellen (EZ) (\bar{x} 6,7 \pm 4,9 pro Tier) gewonnen. Dies entspricht einer Eizellgewinnungsrate (EGR) von 78,0 \pm 26,4%. Von den gewonnenen Eizellen waren 62,3% befruchtet und 37,7% unbefruchtet. Insgesamt wurden 50,6% Vorkern-Stadien, 11,7% Zweizell-Stadien, 18,5% unreife EZ, 13,1% reife, unbefruchtete EZ und 6,1% degenerierte EZ gewonnen.
 - 5.) Nach laparoskopischer intrauteriner Besamung von jeweils 9 Schafen pro Besamungsgruppe nach Einsatz von 300 mio frisch-verdünnten Spermien, 50 mio frisch-verdünnten Spermien, 300 mio tiefkühlkonservierten Spermien, 50 bzw. 300 mio flüssigkonservierten Spermien und 50 mio tiefkühlkonservierten Spermien ergaben sich Befruchtungsraten (BR) von 83,8%, 72,7%, 66,0%, 53,0%, 49,0% und 43,8%. In der Kontrollgruppe, in der 10 Schafe jeweils einmal von dem selben Bock gedeckt worden waren, lag die BR bei 61,4%. Mit einer Ausnahme (50 mio frisch-verdünnte Spermien) war die BR nach Verwendung von 300 mio frisch-verdünnten Spermien signifikant ($p < 0,05$) höher als in allen anderen Gruppen. Nach Besamung mit 50 mio frisch-verdünnten Spermien ergab sich eine signifikant ($p < 0,05$) höhere BR gegenüber den BR nach Verwendung von 300 und 50 mio flüssigkonservierten und 50 mio tiefkühlkonservierten Spermien. Außerdem konnte eine signifikant ($p < 0,05$) höhere BR nach Besamung mit 300 mio als nach Verwendung von 50 mio tiefkühlkonservierten Spermien errechnet werden.
 - 6.) Unabhängig von der Art der Spermakonservierung wurden die BR nach Verwendung von 50 oder 300 mio Spermien zur laparoskopischen intrauterinen Besamung bei jeweils 27 Tieren über alle Besamungsgruppen verglichen. Mit der Besamungsdosis von 300 mio Spermien wurde eine BR von 68,2% erzielt, die signifikant ($p < 0,05$) höher war als nach Verwendung von 50 mio Spermien (BR 56,8%).

- 7.) Unabhängig von der Besamungsdosis wurden die Befruchtungsraten nach Einsatz des unterschiedlich konservierten Spermas bei jeweils 18 Schafen über alle Besamungsgruppen verglichen. Die BR nach Verwendung von frisch-verdünntem Sperma unterschied sich signifikant von denen nach Einsatz von flüssigkonserviertem und tiefkühlkonserviertem Sperma (78,9%^a, 51,3%^b, 55,4%^b a : b = p < 0,001).
- 8.) Die EGR war bei den Kreuzungstieren signifikant höher als bei den Merinos, Schwarzköpfigen Fleischschafen und Finnschafen (93,0 %^a, 79,7%^b, 79,5%^b, 78,3%^b a : b = p < 0,05). Die durchschnittliche Anzahl gewonnener EZ pro Tier war bei den Merinos (\bar{x} 8,9 ± 7,1) signifikant (p < 0,05) größer als bei den Schwarzköpfigen Fleischschafen (\bar{x} 5,6 ± 4,4). Die BR war bei den Kreuzungstieren höher als bei Merinos, Finnschafen und Schwarzköpfen (78,8%^a, 69,4%^{a,b}, 59,3%^{b,c}, 52,1%^c a : b : c = p < 0,05). Bei den Kreuzungstieren wurden auch signifikant mehr Vorkern-Stadien gewonnen als bei den Finnschafen, Schwarzköpfigen Fleischschafen und Merinos (69,7%^a, 52,8%^b, 45,0%^{b,c}, 42,9%^{b,c} a : b = p < 0,05; a : c = p < 0,01).
- 9.) Die Altersgruppen ≤ 3 Jahre, 4 bis 6 Jahre und ≥ 7 Jahre wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede in der EGR (82,1%; 81,5%; 78,7%) und der durchschnittlichen Anzahl gewonnener Eizellen pro Schaf (8,9 ± 7,5; 5,8 ± 3,6; 6,3 ± 2,9) auf. Dagegen war die BR in der Altersgruppe ≤ 3 Jahre mit 74,6% signifikant (p < 0,05) höher als in den anderen beiden Gruppen mit 56,8 bzw. 55,0%. Der Anteil an Vorkern-Stadien nahm mit steigendem Alter ab (53,5%; 50,3%; 47,0%), die Unterschiede waren allerdings nicht statistisch signifikant. In der Altersgruppe ≤ 3 Jahre wurde mit 21,1% der größte Anteil an Zweizell-Stadien und mit 9,9% der kleinste Anteil an unreifen EZ gewonnen, diese Unterschiede waren gegenüber den beiden anderen Altersgruppen sowohl bei den Zweizell-Stadien (6,5%; 8,0% p < 0,01) als auch bei den unreifen EZ (23,2%; 22,0% p < 0,05) signifikant.
- 10.) Die Anzahl früherer Laparotomien (OP) zur Embryonengewinnung (0 OP; 1 OP; 2 OP; ≥ 3 OP) beeinflusste weder die EGR (79,7%; 80,1%; 88,9%; 87,5%) noch die durchschnittliche Anzahl gewonnener EZ pro Schaf (8,6 ± 6,7; 6,4 ± 3,7; 5,0 ± 2,8; 5,2 ± 3,8). Die BR sank dagegen mit steigender Anzahl früherer Laparotomien (71,9%; 58,1%; 56,3%; 31,0%). Sie war in der Tiergruppe 0 OP signifikant (p < 0,05)

höher war als in allen anderen Gruppen. Die Tiergruppe 3 OP wies außerdem eine signifikant ($p < 0,05$) niedrigere BR als die Gruppen 1 OP und 2 OP auf.

- 11.) Die zweimalige laparoskopische intrauterine Besamung im Abstand von 90 Tagen war ohne statistisch signifikante Unterschiede in bezug auf die EGR (63,8% und 51,9%), die durchschnittliche Anzahl gewonnener EZ pro Schaf ($3,8 \pm 1,9$ und $4,5 \pm 1,9$), die BR (90,0% u. 85,2%) und den Anteil tiefgefriertauglicher Embryonen (76,7% u. 74,1%) möglich. Während nach der ersten Besamung am Tag 6 post inseminationem 30,0%^a Morulae und 56,7%^a Blastozysten gewonnen wurden, waren nach der Wiederholung keine (0%^b) Morulae, aber 85,2%^b Blastozysten gewinnbar. Damit ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Verteilung der gewonnenen Embryonalstadien zwischen den beiden Versuchsdurchgängen ($a : b = p < 0,05$).
- 12.) Die laparoskopische intrauterine Besamung mittels zweier ventraler Zugänge in die Bauchhöhle war mit 2 bis 3 Hilfspersonen innerhalb von durchschnittlich 3 min ($2,9 \pm 1,4$ min) durchführbar. Die Besamungspipette aus Glas konnte auch zur Manipulation im Bauchraum genutzt werden. Die erfolgreiche intrauterine Spermaapplikation war am leichten Abfluß des Spermas aus der Besamungspipette in das Uterushornlumina erkennbar. Die Einstichstelle am Uterushorn verursachte in der Regel eine leichte Blutung, nach einem Tag war nur noch eine ca. 1 mm² große Einziehung sichtbar, die nach 6 Tagen vollständig verschwunden war. Von den besamten Schafen im Feldversuch, die keiner Laparotomie zur Embryonengewinnung unterzogen worden waren, wiesen nach wiederholter Laparoskopie lediglich 8,2% leicht lösbare Adhäsionen der Bauchwand an der früheren Einstichstelle mit Netzanteilen auf. Wenn der laparoskopischen intrauterinen Besamung jedoch eine Laparotomie zur Embryonengewinnung vorausgegangen war, wurden regelmäßig Verklebungen und Verwachsungen von Bauchfell- und Netzanteilen, von Genitaltrakt und Netzanteilen sowie Verwachsungen zwischen Uterus u./o. Eileiter und Ovarien beobachtet.

7 SUMMARY

Petra Wirth

Laparoscopic intra-uterine insemination in ewes using different methods of sperm preservation and insemination doses to improve the yield of transferable embryos

It is generally found that poor fertilization rates are obtained when natural mating follows synchronization and superovulation. Laparoscopic intra-uterine insemination in ewes was performed to improve the efficiency of production of pronucleus stage embryos commonly used for investigations such as microinjection and to improve the yield of morulae and blastocysts for cryopreservation or embryo transfer.

A total of 191 ewes (Australian Merinos) were used in the first stage of the research in which a field protocol for the laparoscopic intra-uterine insemination technique was developed. In this part of the work, fresh-diluted sperm was used to obtain the highest possible pregnancy rates. In the main experiment, 64 ewes (Blackface, Merino, Finnish Sheep and Crossbreeds) were inseminated laparoscopically with doses of 50 or 300 million sperm prepared by either dilution of fresh sperm or by using chilled (4 - 5 °C) or frozen-thawed sperm. Ten animals from this group were naturally mated to serve as controls. The oviducts of all animals were flushed 24 - 26 hours after insemination for egg/embryo recovery and determination of fertilization rates. In the final experiment, eight Friesian Milk Sheep were inseminated laparoscopically twice with fresh-diluted sperm in the same season (90 day period between inseminations) to evaluate the reproductibility of results and of embryonic development when the oviducts were flushed 6 days after insemination.

The following results were obtained:

- 1) The field trial gave a pregnancy rate (day 40) of 53.9% for the 191 animals inseminated with 300 million fresh-diluted sperm. These animals were divided into five groups based on the timing of estrous judged by marking with test rams: 1) marked the eve-

ning before; 2) marked before 7:00 a.m.; 3) marked before 10:00 a.m.; 4) marked before 2:00 p.m. and 5) no marking. There was no significant difference in the pregnancy rates between groups which were 55.2%, 48.3%, 61.7%, 57.1% and 41.7% respectively.

- 2) The animals in the field trial were classified by uterine contractility during the insemination into three groups. Most of the animals (69.6%) had the highest contractility and this group gave a pregnancy rate of 57.1%. The second group which included 26.2% of the animals had a pregnancy rate of 50% and the third group which included only 4.2% of the animals had a pregnancy rate of 25%. While the differences between the number of animals per group were significant ($p < 0.001$), the differences in pregnancy rates were not significant, probably because of the different numbers of animals in the three groups.
- 3) The insemination with 300 million fresh-diluted sperm into both uterine horns or into only one horn produced no significant difference in pregnancy rates at day 40 (53.4% vs 46.6%).
- 4) In the main experiment with 64 ewes, a total of 527 C.L. were detected ($\bar{x} 8.2 \pm 4.7$ per animal) and 427 eggs/embryos were collected. The egg recovery rate was thus 78%. Altogether 62.3% of the eggs/embryos collected were fertilized. Of the 427 eggs/embryos collected, 50.6% were at the pronucleus stage, 11.7% were at the two cell stage, 18.5% were immature/unfertilized, 13.1% were mature/unfertilized and 6.1% were degenerated.
- 5) The following fertilization rates were obtained for the six laparoscopic insemination groups (9 ewes per group) in the main experiment: 83.8% for 300 million fresh-diluted sperm; 72.7% for 50 million fresh-diluted sperm; 66% for 300 million frozen-thawed sperm; 53% for 50 million chilled sperm; 49% for 300 million chilled sperm and 43.8% for 50 million frozen-thawed sperm. In the natural mating control group of ten animals, a fertilization rate of 61.4% was obtained. The fertilization rate obtained with 300 million fresh-diluted sperm was significantly higher ($p < 0.05$) than all other groups except the group with 50 million fresh-diluted sperm. After insemination with 50 million fresh-diluted sperm the fertilization rate was significantly ($p < 0.05$) higher than the groups with chilled sperm and the group with 50 million frozen-thawed sperm. Between the group with frozen-thawed sperm, there was a significantly higher fertilization rate with

- 300 million than with 50 million sperm.
- 6) Pooling the results to isolate the effect of the number of sperm used for laparoscopic intra-uterine insemination (27 ewes inseminated with 300 million and 27 ewes inseminated with 50 million sperm) showed that a significantly higher fertilization rate (68.2%) was obtained with 300 million sperm compared with a fertilization rate of 56.8% with 50 million sperm.
- 7) Pooling the results to isolate the effect of the method of preservation of sperm used for laparoscopic intra-uterine insemination (18 ewes were inseminated with fresh-diluted, chilled or frozen-thawed semen) showed that the fertilization rate obtained with fresh-diluted sperm was significantly higher than with the chilled or frozen-thawed semen (78.9%^a, 51.3%^b, 55.4%^b a : b = p < 0.001).
- 8) The egg recovery rate was significantly higher in the crossbreeds than in purebred Merinos, Blackfaces and Finnish Sheep (93%^a, 79.9%^b, 79.5%^b, 78.3%^b a : b = p < 0.05) The mean number of eggs/embryos collected per animal was significantly greater for Merinos (8.9 ± 7.1) in comparison with Blackfaces (5.6 ± 4.4). The fertilization rate was higher in crossbreeds than in the purebred Merinos, Finnish Sheep, and Blackfaces (78.8%^a, 69.4%^{a,b}, 59.3%^{b,c}, 52.1%^c a : b : c = p < 0.05). It was also possible to collect more pronuclear stage embryos from crossbreeds than from Finnish Sheep, Blackfaces, and Merinos (69.7%^a, 52.8%^b, 45%^{b,c}, 42.9%^{b,c} a : b = p < 0.05; a : c = p < 0.01).
- 9) The effect of age was also examined however the egg recovery rate was not significantly different between ewes ≤ 3 years old (82.1%), ewes 4 - 6 years old (81.5%) and ewes ≥ 7 years old (78.7%). The fertilization rate was significantly (p < 0.05) higher in the group ≤ 3 years old (74.6%) than for the other two groups (56.8% and 55%). The number of pronuclear stage embryos collected for the three age groups were 53.5%, 50.3%, and 47%. The animals ≤ 3 years old gave a significantly higher proportion of two cell stages (21.1%; p < 0.01) and a significantly smaller proportion of immature oocytes (9.9%; p < 0.05) compared to the 4 - 6 years old animals (6.5%, 23.2%) and the animals ≥ 7 years old (8%, 22%).

- 10) Some of the 64 ewes had previously been embryo donors for transgenic experiments. These were compared to animals which had not previously been operated to evaluate any negative influence of the previous handling. There were four groups based on the number of previous ventral mid-line laparotomies (0L, 1L, 2L and \geq 3L). The number of previous laparotomies had no significant influence on the egg recovery rates (79.7%, 80.1%, 88.9% and 87.5%) or the mean number of eggs/embryos collected per sheep (8.6 ± 6.7 , 6.4 ± 3.7 , 5.0 ± 2.8 , 5.2 ± 3.8).
- The fertilization rate in the group with no previous laparotomy was significantly ($p < 0.05$) higher than in all other groups (71.9%, 58.1%, 56.3%, 31%). In the group with \geq 3 laparotomies, a significantly ($p < 0.05$) lower fertilization rate was obtained than in the groups with one or two laparotomies.
- 11) It was possible to repeat the laparoscopic intra-uterine insemination after a 90 day period of recovery without any significant reduction in egg recovery rate (63.8% vs. 51.9%); the mean number of eggs/embryos collected (3.8 ± 1.9 vs. 4.5 ± 1.9); the fertilization rates (90% vs. 85.2%) or the proportion of embryos of the quality required for cryopreservation (76.7% vs. 74.1%). Six days after the first laparoscopic intra-uterine insemination the embryos collected included 30% morulae and 56.6% blastocysts while after the second insemination no (0%) morulae but 85.2% blastocysts were collected. This observed increase in the proportion of blastocysts recovered was significant ($p < 0.05$).
- 12) Laparoscopic Intra-uterine insemination employing two ventral incisions could be carried out in approximately 3 minutes when two or three assistants were available. The glass insemination pipette could be useful in manipulation of the internal organs during the laparoscopic procedure. It was clear when the pipette was in the lumen of the uterus because at that point it was easy to expell the sperm. The location of the incision at the horn of the uterus was identifiable immediately after withdrawal of the pipette by a small spot of blood but one day later there was only a small scar visible. After six days there was no evidence of scar tissue or adhesions. In the field trial, 8% of the ewes which has been subjected to an laparoscopic intra-uterine insemination in the previous year showed a small adhesion of omentum and peritoneum which could be easily pushed aside. On the contrary, animals which had been subjected to more invasive laparotomy had a greater amount of damage.