

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, inwieweit sich verschiedene Versuchsbedingungen und hormonale Vorbehandlungen der Spendertiere auf die In-vitro-Befruchtungsergebnisse von Rinderoozyten auswirken

Dazu wurde in Vorversuchen geprüft, ob durch eine Vorbehandlung der Schlachtkuhen mit einem GnRH- Analogon bzw. einem synthetischen GnRH die Oozytenqualität und durch Hormonzugabe in zwei verschiedenen Konzentrationen zum Befruchtungsmedium die Befruchtungsergebnisse verbessert werden können. Weiterhin wurde geklärt, ob die Verwendung von Frischsperma anstatt TG- Sperma zur Befruchtung einen positiven Einfluß auf die Befruchtungsraten ausübt. Die Bewertungskriterien, die zu diesen Untersuchungen herangezogen wurden, waren die Teilungs- und Weiterentwicklungsraten (Blastozystenraten) nach IVF.

In den Hauptversuchen wurde der Einfluß unterschiedlicher morphologischer Beschaffenheiten der Oozyten und der Einfluß der Maturationsdauer geprüft. Dazu dienten als Bewertungsträger die Metaphase II- Raten und die Blastozysten- Raten nach IVF.

Darüber hinaus wurde untersucht, mit welchem Erfolg IVP-Embryonen aus einem unterschiedlich zusammengesetzten Maturations- und Kultivierungsmedium auf Empfängertiere übertragen und ob Embryonen aus morphologisch „schlechteren“ Eizellen und nach veränderter Maturationsdauer mit Erfolg transferiert werden können.

Folgende Ergebnisse wurden im einzelnen ermittelt:

1. Durch Verabreichung des GnRH- Analogon Receptal[®] vor der Schlachtung an die Schlachtkuhen konnten nach IVF zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe keine Unterschiede weder bei den Teilungs- (47,4 % vs. 53,2 %) noch bei den Weiterentwicklungsraten (22,2 % vs. 22,4 %) nachgewiesen werden.

2. Nach der Behandlung der Schlachttiere mit dem synthetischen GnRH-Produkt Fertagyl® zeigten sich nach IVF keine signifikanten Unterschiede in den Teilungs- (62,5 % vs 59,1 %) oder Weiterentwicklungsraten (19,7 % vs 14,2 %) zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen.
3. Weder durch den Zusatz von 1 µg/ml, noch durch den Zusatz von 10 µg/ml des GnRH-Agonisten „des- Gly [D- Ala]- LH- RH Ethylamide“ (Fa Sigma) zum Befruchtungsmedium waren nach IVF signifikante Verbesserungen in den Befruchtungs- (1 µg/ml 57,5 % vs 59,7 %, 10 µg/ml 43,5 % vs 45,5 %) und Weiterentwicklungsraten (1 µg/ml 28,2 % vs 27,6 %, 10 µg/ml: 19,5 % vs 17,7 %) bei den Versuchs- bzw. Kontrollgruppen zu erzielen
4. Die Verwendung von Frischsperma anstatt TG- Sperma für die Befruchtung ließ keine Verbesserungen in den Befruchtungs- (55,0 % vs 57,6 %) und Weiterentwicklungsraten (26,2 % vs 33,2 %) nach IVF zu.
5. Nach der Gewinnung der Oozyten aus den Ovarien konnten sie wie folgt den einzelnen Oozytenqualitätsklassen zugeordnet werden 41,1 % der Eizellen gehörten den Qualitätsklassen 1+2 an, 18,7 % der Eizellen gehörten zu der Qualitätsklasse 3, 28,5 % waren der Qualitätsklasse 4 zuzuordnen und 11,7 % waren der Qualitätsklasse 5 zugehörig
6. Oozyten der Qualitätsklasse 3 wiesen bereits bei einer Maturationsdauer von 18 Std eine Metaphase II- Rate mit 55 % auf. Auch nach Verlängerungen der Maturationszeiten verharrten die Metaphase II- Raten auf diesem Niveau
7. Eizellen der Qualitätsklasse 3 zeigten nach einer 18 Std. Maturationsdauer gegenüber der 24 Std. Maturationsdauer eine signifikant höhere Teilungsrate mit 50,9 % vs 38,2 %. Die entsprechenden Weiterentwicklungsraten betragen 12,4 bzw. 5,0 % bei den Eizellen nach 18- stündiger bzw. 24- stündiger Maturationsdauer
8. Aus Ovarien wertvoller Zuchtkuhe nach Schlachtung konnten durchschnittlich 19,7 Oozyten sehr guter und guter Qualität (Qualitätsklassen 1+2) und durchschnittlich 9,6 Oozyten der Qualitätsklasse 3 pro Eierstock gewonnen werden

9. Die Trachtigkeitsraten von insgesamt 127 transferierten IVP- Embryonen aus wertvollen Zuchtkühen betragen ohne Verwendung der Puffersubstanz HEPES im Maturations- und Kulturmedium 24,6 % (69 Embryonen) und bei 58 Embryonen mit HEPES im Maturations- und Kulturmedium 27,6 %

10 Nach Transfer von 11 Embryonen, die aus Oozyten der Qualitätsklasse 3 nach 18-stündiger Maturation hervorgingen, wurden 36,4 % der Empfängertiere tragend

11 Bei 14 inzwischen geborenen Kalbern waren sieben Kalber lebensschwach, von denen zwei kurz nach der Geburt starben Weiterhin wurden vermehrt Schweregeburten (7 Fälle) mit verlängerten Trachtigkeiten (5 Fälle) beobachtet Infolge von Schweregeburten traten bei zwei Tragertieren Dammnisse auf

Rieke Hahn:

Evaluations of the optimal nuclear maturation period of bovine oocytes with regard to the results of cultivation and transfer of embryos after in vitro fertilisation

Summary

Experimental work has firstly investigated to what extent different trial conditions and hormonal pretreatments of the donor animals have an effect on the in vitro fertilization results of bovine oocytes

Accordingly, pretrials have examined whether the oocyte quality and the fertilization results could be improved by pretreating the slaughtered cattle with a GnRH analogue and adding hormones in two different concentrations to the fertilization medium. Furthermore it was tested whether the use of fresh sperm instead of frozen-thawed semen for fertilization exerts a beneficial influence on the fertilization rate. The criteria applied to these investigations were the rates of first cleavage and further development (blastocyst stages) following IVF.

In the main experiment the influence of different morphological properties of the oocytes and the influence of the maturation period have been examined. The rates of metaphase II and the blastocyst rates served as valuation criteria.

It was then investigated how successfully IVP embryos could be transferred to recipient animals from a different composition of maturation and cultivation medium, and whether embryos could be successfully transferred from morphologically lower quality oocytes, and after an altered maturation period.

The following results were separately obtained:

1. Through the administration of the GnRH analogue Receptal® before the slaughter of the cattle, no difference could be demonstrated between the experimental and control groups after

IVF either in the rate of first cleavage (47.4% vs 53.2%), or in the rate of further development (22.2% vs 22.4%)

2. After treatment of the slaughtered animals with the synthetic GnRH Fertagyl[®], no significant difference was shown between the experimental and control groups in the rate of cleavage (62.5% vs 59.1%), or in the rate of further development (19.7% vs 14.2%).

3. Neither the addition a concentration of 1 µg/ml nor of 10 µg/ml of the GnRH agonist "des-Gly [D-ala]-LH-RH Ethylamide"(Fa Sigma) to the fertilization medium gave a significant improvement in the fertilization rates-(1 µg/ml 57.5% vs 59.7%, 10 µg/ml 43.5% vs 45.5%) or in the rates of further development-(1 µg/ml 28.2% vs 27.6%, 10 µg/ml 19.5% vs 17.7%) in the experimental group compared to the control group after IVF

4. The use of fresh sperm instead of frozen- thawed sperm for fertilization gave no improvement in the fertilization rates-(55.0% vs 57.6%) or in the rates of further development-(26.2% vs 33.2%) after IVF

5. After yielding from the ovaries, the oocytes could be assigned to different classes according to quality 41.1% of the ovaries belonged to class 1 and 2, 18.7% to class 3, 28.5% to class 4, and 11.7% belonged to class 5

6. Quality class 3 oocytes show a metaphase II rate of 55% even after a maturation period of 18hrs. The metaphase II rate also remains at this level after extension of the maturation times

7. Quality class 3 ovaries show a significantly higher cleavage rate after an 18 hour maturation period as opposed to a 24 hour period after IVF-(50.9% vs 38.2%). The corresponding rates of further development for the ovaries were 12.4% (18hr maturation) vs 5.0% (24hr maturation)

8. After slaughter, an average of 19.7 very good and good quality oocytes (quality class 1 and 2) and an average of 9.6 class 3 oocytes per ovary were yielded from the ovaries of valuable breeding cows

9. The gestation rates of 127 transferred IVP embryos from valuable breeding cows were 24.6% without the use of the buffer substance HEPES in the maturation and culture medium (69 embryos), and 27.6% in 58 embryos with HEPES in the media

10. After the transfer of 11 embryos from quality class 3 oocytes after 18 hours of maturation, 36.4% of the recipient animals became pregnant

11. Up to now 14 calves were born, 7 calves showed low vitality, 2 calves died immediately after parturition. Further on 7 cases of dystocia with prolonged gestation (5 calves) were observed. In two cows a ruptured perineum appeared after forced extraction