

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Einflußfaktoren Durchmesser und Wachstumsverhalten von Follikeln auf Wiederfindungsrate und weitere Entwicklungsfähigkeit der COK bis zum übertragungsfähigen Embryo sowie den Einfluß der Punktion auf Zyklus und Fruchtbarkeitsverhalten adulter Spenderkuhe zu untersuchen. Zudem galt es anhand erarbeiteter Ergebnisse ein möglichst „ertragreiches Spendertier“ zu charakterisieren. Der Einsatz der transvaginalen ultraschallgeleiteten Follikelpunktion wurde bei speziellen Indikationen mit oder ohne hormonelle Stimulation als Alternative zum klassischen ET-Programm bei älteren und wertvollen Spenderkuhen überprüft.

Im ersten Versuch wurden bei 31 Versuchstieren von September 1995 bis September 1996 die nach drei Größenkategorien eingeteilten Follikel einzeln aufgefangen, nach morphologischen Kriterien in 5 Kategorien eingeteilt und in einem IVP-Verfahren eingesetzt. Für jede Kategorie und Durchmessergruppe wurden die Entwicklungsraten bestimmt.

Im zweiten Versuch wurden bei den 31 Spendertieren einzelne Follikel über 4 Tage (letzter Beobachtungstag = Punktionstag) beobachtet. Der Inhalt der Follikel wurde einzeln aufgefangen, klassifiziert und einem IVP-Verfahren unterzogen.

Im dritten Versuch wurde über einen Zeitraum von 8 Wochen das Zyklus- und Fruchtbarkeitsverhalten bei 24 Spenderkuhen während einer einmal wöchentlich stattfindenden Punktion überprüft. Die gewonnenen COK wurden einem IVP-Verfahren unterzogen. Bei Auftreten einer Brunst erfolgte eine Insemination des Spendertieres. Die Donoren wurden 6 Wochen nach erfolgter Insemination auf Trächtigkeit untersucht.

In einem vierten Versuch wurden zur Ermittlung eines produktiven Spendertieres die erbrachten Leistungen von 48 Spenderkuhen (Follikelanzahl, Oozytenanzahl, Menge IVP-tauglicher Oozyten und produzierte Embryonen) unter den Aspekten Alter,

Geschlechtsgesundheit und Reproduktionsstatus ausgewertet. Die Tiere wurden einmal wöchentlich punktiert.

Im fünften Versuch wurden 7 genetisch wertvolle Spendertiere in unregelmäßigen Abständen punktiert, um transfertaugliche Embryonen zu produzieren. Bei einzelnen Tieren erfolgte eine hormonelle Stimulation mit FSH.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1. In Versuch 1 war die Wiederfindungsrate bei den 5 - 8 mm großen Follikel mit 76,7% gegenüber den Größengruppen 2 - 4 mm (38,2%) und  $\geq 9$  mm (24,0%) signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöht
2. Die Reifungs- und Befruchtungsraten der Durchmessergruppe  $\geq 9$  mm (55,3%) waren gegenüber den Gruppen 2 - 4 mm (74,8%) und 5 - 8 mm (75,6%) signifikant erniedrigt ( $p < 0,001$ ).
3. Die Blastozystenraten zwischen den drei Durchmessergruppen (2 - 4 mm, 5 - 8 mm,  $\geq 9$  mm) zeigten keine signifikanten Unterschiede.
4. Im zweiten Versuch waren sowohl der Anteil der IVP-tauglichen COK (75,9%) als auch die Blastozystenrate (9,2%) aus Follikeln mit beobachtetem Wachstum gegenüber der konstanten Gruppe (COK IVP-tauglich 51,4% und Blastozystenrate 0%) signifikant erhöht.
5. Im dritten Versuch zeigten 91,7% der Spendertiere Brunsterscheinungen, wobei der Anteil unregelmäßiger Zyklen während des Punktionsverlaufes bei 62,5% lag.
6. Neben 76 produzierten Embryonen konnten bei den 24 Donoren 6 Trächtigkeiten, aus denen 9 lebend geborene Kälber hervorgingen, erzielt werden
7. Im vierten Versuch wurden beim Vergleich der Leistungen von 48 Spendertieren unter dem Aspekt des Alters bei den 2 - 3 Jahre alten Tieren signifikant ( $p < 0,05$ )

mehr COK (2 - 3 Jahre  $7,9 \pm 3,8$ , 4 - 6 Jahre  $5,5 \pm 3,5$ , 7 - 12 Jahre  $5,7 \pm 3,6$ ), IVP-taugliche COK (2 - 3 Jahre  $4,6 \pm 2,7$ , 4 - 6 Jahre  $2,9 \pm 2,2$ , 7 - 12 Jahre  $3,0 \pm 2,5$ ) und Embryonen (2 - 3 Jahre  $8,0 \pm 2,8$ , 4 - 6 Jahre  $4,4 \pm 3,2$ , 7 - 12 Jahre  $2,8 \pm 3,2$ ) produziert. Beim Vergleich der Ergebnisse unter dem Gesichtspunkt des Reproduktionsstatus konnten bei den Rindern signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr Embryonen ( $7,3 \pm 3,3$ ) im Vergleich zu laktierenden Tieren ( $3,7 \pm 3,0$ ) und zu trockenstehenden Tieren ( $5,4 \pm 4,8$ ) erzielt werden.

8. Der Einsatz von FSH zu hormoneller Stimulation erbrachte bei 3 Tieren eine Verbesserung der COK-Qualität, was sich in 13 Embryonen niederschlug. Zwei sehr alte Tiere (19 und 23 Jahre) reagierten nicht auf die hormonelle Stimulation und lieferten auch keine IVP-tauglichen Oozyten. Zwei kurz vor dem Erreichen der Zuchtreife stehende Tiere erbrachten nach einem einmaligen Punktionstermin 8 Embryonen. Die Tiere wurden nicht hormonell stimuliert.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß Follikeldurchmesser und Entwicklungsverhalten der Follikel einen beträchtlichen Einfluß auf COK-Qualität und deren Entwicklungskompetenz ausüben und OPU geeignet ist, die In vivo-Verhältnisse zu untersuchen. Die Kombination zweier biotechnologischer Verfahren (OPU, KB), die das Keimzellpotential und die Leistungsreserven (Milchproduktion) besser ausnutzen, kann als durchführbar angesehen werden. Weitere Untersuchungen zur Klärung der doch niedrigeren Trächtigkeitsrate sind aber erforderlich. Die Beurteilung von Spendertierergebnissen unter verschiedenen Aspekten zur Ermittlung eines optimalen Spendertieres, ist als flankierende Maßnahme anwendbar. Sie kann aber nur bis zu einem bestimmten Grad dafür sorgen, Spendertiergruppen homogen zusammenzustellen, da äußere Einflußfaktoren nicht immer bekannt sind und kalkuliert werden können. Auch wenn es sich bei den genetisch wertvollen Spendertieren im letzten Versuchsabschnitt nur um sehr kleines Zahlenmaterial handelt, kann OPU durchaus als erfolgreiche Alternative bei Versagen anderer biotechnologischer Verfahren (ET, Insemination)

angesehen werden. Dies gilt besonders für im Verlauf der Jahre infertil gewordene wertvolle Tiere. Für sie besteht so die Möglichkeit, ihr Erbmateriale weiterzugeben

## 7. SUMMARY

Georg Klossok

### Animal specific effects on the results of transvaginal ultrasound guided follicle aspiration in adult cows

The purpose of the work described above was to investigate the effects of a follicle's diameter and developmental state on the recovery rate and developmental potential (following IVP) of cumulus oocyte complexes (COC) obtained by transvaginal ultrasound-guided follicle-puncture (ovum-pick-up, OPU). The influence of follicle puncture on the subsequent estrous cycling and reproductive potential of adult donor cows was also studied. The ultimate objective of this work was to produce a definition of the ideal donor animal. Specifically, transvaginal ultrasound-guided follicle-puncture was evaluated as an alternative to the classical embryo transfer technique in older valuable donor cows, with or without hormonal stimulation according to conventional indications.

In the first experiment, which ran from September 1995 to September 1996, 31 donor animals were used. Follicles were classified into three size categories and each was then further subdivided into five categories based on morphological criteria prior to IVP. The development rate was then determined for each morphology / diameter group.

In the second experiment, follicles were monitored in all 31 donor animals over the four days preceding puncture. Following puncture, the contents of each follicle were individually classified and evaluated by the IVP.

In the third experiment, the estrous cycle and the reproductive potential of 24 donor cows was studied during the time period over which they were subjected to a series

of single weekly puncture sessions. They were inseminated when estrus was detected and examined for pregnancy six weeks later.

The fourth experiment involved 48 cows which were subjected to transvaginal ultrasound-guided follicle-puncture once per week. Follicle number, oocyte number, the number of oocytes suitable for IVP and the number of embryos produced by IVP were recorded for each of these animals and correlated with age, sexual health and reproductive status to determine the reproductive capacity of handled by this technique.

In the fifth experiment, seven genetically valuable donor animals were punctured at random intervals to produce transferable embryos. Hormonal stimulation with FSH was used for some of these animals.

The following results were obtained

1. In experiment 1, the recovery rate from 5 - 8 mm follicles (76.7%) was significantly greater ( $p < 0.05$ ) than that from 2 - 4 mm follicles (34.2%) and from follicles greater than 9 mm in diameter (24.0%).
2. The maturation and fertilization rates for follicles with diameter greater than 9 mm (55.3%) were significantly lower than those for 2 - 4 mm (74.8%) and 5 - 8 mm (75.6%) follicles ( $p < 0.001$ ).
3. The blastocyst rates for the three diameter groups were not significantly different.
4. In the second experiment, the rate of COC suitable for IVP (75.9%) and the blastocyst rate (9.2%) from follicles where maturation was observed were significantly higher than from static follicles. COC suitable for IVP (51.4%) and blastocyst rate (0.0%)

5 In the third experiment, 91.7% of the donor animals showed signs of estrus. Of these, 62.5% had irregular estrus during the period of follicle puncture.

6 The 24 donors produced 76 embryos. Following AI, six of the donors became pregnant and 9 live born calves were obtained.

7 In the fourth experiment, comparison of the performance of 48 donor animals by age showed that 2 - 3 year animals produced significantly ( $p < 0.05$ ) more COC ( $7.9 \pm 3.8$ ) than 4 - 6 year animals ( $5.5 \pm 3.5$ ) and 7 - 12 year animals ( $5.7 \pm 3.6$ ). The younger animals also produced significantly more COC suitable for IVP ( $4.6 \pm 2.7$ ) than 4 - 6 year animals ( $2.9 \pm 2.2$ ) and 7 - 12 year animals ( $3.0 \pm 2.5$ ), and significantly more embryos ( $8.0 \pm 2.8$ ) vs ( $4.4 \pm 3.2$ ) and ( $2.8 \pm 3.2$ ), respectively. In a comparison of these results from the standpoint of reproductive status, heifers gave significantly ( $p < 0.05$ ) more embryos ( $7.3 \pm 3.3$ ) than lactating ( $3.7 \pm 3.0$ ) and dry ( $5.4 \pm 4.8$ ) animals.

8 In the fifth experiment, in three animals, hormonal stimulation with FSH improved COC quality and produced 13 viable embryos. Two very old animals (19 and 23 years old) did not respond to hormonal stimulation and gave no oocytes suitable for IVP. Two very young animals gave 8 embryos from a single session without hormonal stimulation.

These results indicate that the diameter and developmental activity of a follicle are strongly correlated with COC quality and thus the potential for subsequent embryonic development. The technique of ovum pick-up (OPU) is an excellent tool for studying this relationship in vivo. The combined application of two biotechnological techniques (OPU and artificial insemination) makes it possible to exploit the full potential of a valuable animal genetic resource, both its germ cell potential and its performance capacity (milk production). However, further investigations are necessary to elucidate the low pregnancy rates. Evaluation of

donor animal data from various aspects for the purpose of defining an ideal donor is a practical second objective. Assembling a homogeneous group of donor animals is only possible to a limited extent since external factors are not always known or controlled. Although there were only a small number of animals in the last part of this research with genetically valuable donor animals, OPU may be seen as a practical alternative when other biotechnical methods (ET, AI) have failed. Particularly, when through the passage of time valuable animals become infertile, the OPU affords a method for further use of the genetic material.