

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die große Variabilität der Gewinnungsraten nach Anwendung von OPU und Superovulation ist ein limitierender Faktor in der praktischen Anwendung und erschwert einen echten Effizienzvergleich. Die Beantwortung der Frage nach den Ursachen dieser Variabilitäten kann durch die Feststellung von Zusammenhängen zwischen den Gewinnungsraten aus verschiedenen Verfahren einen Fortschritt erfahren, indem verfahrensspezifische, technische Einflüsse minimiert werden und lediglich tierspezifische Einflüßfaktoren ursächlich sind. Dadurch kann die Empfehlung für das eine oder das andere Verfahren unabhängig vom Spendertier auf Grund weiterer Faktoren getroffen werden (z.B. technische Möglichkeiten, Effizienz auf Jahreshasis, Reproduktionsstatus des Spendertieres etc.).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einer vergleichenden Studie die Effizienz zweier Verfahren zur Gewinnung entwicklungsfähiger Embryonen zu überprüfen und festzustellen, ob es eine tierindividuelle oder eine verfahrensspezifische Eignung von Spendertieren gibt.

Für die Versuche wurden 40 Spendertiere sowohl einer ultraschallgeleiteten Follikelpunktion (OPU) mit anschließender In vitro-Produktion als auch einem Embryonengewinnungsverfahren nach Superovulation mit PMSG unterzogen, wobei die Reihenfolge der Verfahren zufällig gewählt wurde. Ein Teil der Spendertiere wurde zusätzlich einer weiteren Superovulationsbehandlung mit FSH unterzogen. Die gewonnenen Embryonen aus allen Verfahren wurden morphologisch klassifiziert und entweder zur Bestimmung der Zellzahl (Trophektoderm-, ICM- und Gesamtzellzahl) gefärbt oder zur Bestimmung der Schlupfraten weitere 4 bis 6 Tage in Kulturmedium belassen.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1. Nach Stimulation mit PMSG konnten bei allen Versuchstieren durchschnittlich $1,9 \pm 0,4$ transfertaugliche Embryonen gewonnen werden. Bezogen auf die Tiere, die auf die Behandlung mit mindestens drei palpierbaren Funktionskörpern reagiert haben („Positiv-Reagenten“) konnten $3,5 \pm 2,9$ transfertaugliche Embryonen produziert werden. Nach Stimulation mit FSH konnten bei 15 Versuchstieren durchschnittlich $1,9 \pm 0,6$

transfertaugliche Embryonen erzielt werden. Nach OPU mit anschließender In vitro-Produktion wurden durchschnittlich $0,6 \pm 0,1$ transfertaugliche Embryonen pro Tier und Punktionssitzung erzeugt.

2. Zwischen der Gesamtzahl gewonnener Embryonen und Eizellen aus Superovulation nach PMSG und der Gesamtzahl Kumulus-Oozyten-Komplexe nach OPU besteht eine signifikante, positive Korrelation ($z=0,376$; $p \leq 0,02$).

3. Die Anzahl transfertauglicher Embryonen aus Superovulation nach PMSG und die Anzahl transfertauglicher Embryonen aus OPU/TVP sind hochsignifikant korreliert ($z=0,431$; $p \leq 0,006$).

4. Zwischen Spendertieren, die mit FSH superovuliert wurden, und den Gewinnungsraten aus OPU konnten keine signifikanten Korrelationen ermittelt werden.

5. Zwischen den Gewinnungsraten nach Superovulation mit PMSG oder FSH waren keine Unterschiede festzustellen.

6. Die Reihenfolge der Gewinnungsverfahren (SO / OPU oder OPU / SO) beeinflusste das Ergebnis nicht.

7. Die Schlupfraten in-vivo und in-vitro erzeugter Embryonen unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,001$). Von 200 in-vitro erzeugten Embryonen sind 127 (63,5%) vollständig aus ihrer Zona pellucida geschlüpft. Von 43 in-vivo erzeugten Embryonen hingegen schlüpfen 42 (97,7%) vollständig aus der Zona pellucida.

8. Die Zellzahlen in-vivo und in-vitro erzeugter Embryonen an Tag 8 unterscheiden sich signifikant. In-vitro erzeugte Embryonen hatten im Vergleich zu in-vivo produzierten Embryonen durchschnittlich eine geringere Anzahl Trophektodermzellen (21,7 bzw. 49,3;

$p \leq 0,001$), Innere Zellmasse (22,1 bzw. 34,3; $p \leq 0,005$) als auch Gesamtzellen (43,8 bzw. 83,5; $p \leq 0,001$).

9. Die Zona pellucida in-vivo erzeugter Embryonen war wesentlich widerstandsfähiger gegen die Einwirkung von Pronase (Protease Typ XXV) als die Zona pellucida in-vitro produzierter Embryonen. Die Einwirkungsdauer des Enzyms bis zur Auflösung der Zona pellucida unterschied sich signifikant (1465,7 Sekunden bzw. 56,4 Sekunden; $p \leq 0,001$).

10. Der traumatische Einfluß der Verfahren auf die Spendertiere war gering. Bei 23 nach Versuchsende besamten Spendertieren konnte bei 20 (87,0%) eine Trächtigkeit erzielt werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Variabilität in den Gewinnungsraten für das einzelne Spendertier verfahrensunabhängig war. Die Eignung eines gesunden Spendertieres scheint demnach für beide Verfahren gleich zu sein. Die Ursachen für die Variabilität sind daher eher beim einzelnen Spendertier als in den Gewinnungsverfahren begründet.

Bezogen auf Jahresbasis ist OPU 3, 5 bis 5 fach effektiver als die Embryonenproduktion durch Superovulation. Insbesondere die Anwendung unabhängig vom Reproduktionsstatus des Spendertieres und die häufige Wiederholbarkeit sind als wesentlicher Vorteil dieser Technik zu nennen. Eine Kombination beider Verfahren kann eine Steigerung der Effizienz von Zuchtprogrammen bringen.

Zwischen in-vivo und in-vitro produzierten Embryonen bestehen Unterschiede, deren Aufklärung weitere Untersuchungen erfordert.

7. SUMMARY

Hauke Holdefleiss

Collection and development of bovine embryos produced by superovulation or in vitro following OPU in the same animals.

The enormous variability in the results following OPU and superovulation limits practical application and complicates a true comparison of efficiency of both technologies. The underlying mechanism for this could be elucidated by determining the correlation between the rates of the two production systems minimizing the technical effects and focusing only on the individual animal. This would allow to decide which of the procedures is to be selected or the selection could be based on further reasons (e.g. technical equipment, efficiency per year, reproductive status of donor etc.).

The objectives of the present work were to investigate the efficiency of the two different procedures for the production of developmentally competent bovine embryos and to determine whether there is an individual or a process specific suitability of the donor animal. A total of 40 donors were employed for ultrasound guided follicular aspiration (OPU) followed by in vitro production as well as for collecting embryos after superovulation with PMSG. The order of the procedures was chosen by chance. Furtheron a certain percentage of the donors were used in a second superovulation procedure with FSH. All embryos were classified by morphological criteria and either stained to determine cell numbers (trophectoderm, ICM and total cell number) or left in culture media for another 4 to 6 days to assess hatching.

The following results were obtained:

1. After stimulation with PMSG an average of 1.9 ± 0.4 transferable embryos were produced within all donors. Within donors that had at least three palpable corpora lutea („positive responders“) an average of 3.5 ± 2.9 transferable embryos were produced. After stimulation

with FSH 15 donors produced an average of 1.9 ± 0.6 transferable embryos. After OPU followed by in vitro production 0.6 ± 0.1 transferable embryos per donor and session were obtained.

2. A significant correlation was found between the total number of oocytes and embryos after superovulation with PMSG and the total number of cumulus-oocyte-complexes collected after OPU ($z=0.376$; $p \leq 0.02$).

3. The number of transferable embryos after superovulation with PMSG and the number transferable embryos after OPU/IVP were highly significantly correlated ($z=0.431$; $p \leq 0.006$).

4. No significant correlation was found between donors superovulated with FSH and the OPU-results.

5. No correlation was found between superovulation with PMSG or with FSH.

6. The order of the two procedures (SO/OPU or OPU followed by SO) did not affect the results.

7. The hatching rates were significantly different between in vivo and in vitro produced embryos ($p \leq 0.001$). In total, 127 (63.5%) of 200 in vitro produced embryos left their zona pellucida, whereas 42 (97.7%) of 43 in vivo produced embryos hatched.

8. The number of cells on day 8 of in vivo and in vitro produced embryos was significantly different. In vitro produced embryos had a lower average number of trophectoderm cells (21.7 versus 49.3; $p \leq 0.001$), ICM (22.1 versus 34.3; $p \leq 0.005$) as well as total cell number (43.8 versus 83.5; $p \leq 0.001$) than in vivo produced embryos.

9. The zona pellucida of in vivo produced embryos was more resistant against the digestion with pronase (protease type XXV) than the zona pellucida of in vitro produced embryos. The

time for the enzyme to dissolve the zona pellucida was significantly longer (1465.7 seconds versus 56.4 seconds; $p < 0.001$).

10. Both procedures did not interfere with the future reproductive efficiency of donors. Twenty (87.0%) out of 23 donors became pregnant after insemination after the experiments.

These results show that the variability was independent from the procedure but attributed to each individual donor. The suitability of a healthy donor cow seems to be equal for both procedures.

Calculating on a yearly basis OPU is 3.5 to 5 times more effective in embryo production than superovulation. In particular, the possibility to employ OPU independently from the reproductive status of the donor cow and the high repeatability are important advantages of this technology. A combination of both procedures could result in an improvement of the efficiency of breeding programmes.

The differences between in vivo and in vitro produced embryos require further investigations.