

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für den Hauptversuch vom Schlachthof in Erlangen 4464 Ovarien von geschlachteten Rindern zum EIT-Labor des Besamungsvereins Neustadt an der Aisch gebracht. Dort wurden die Oozyten gewonnen, gereift, in vitro befruchtet und kultiviert. Anschließend wurden die entstandenen Blastozysten unter verschiedenen Versuchsbedingungen eingefroren, aufgetaut und die Überlebens- u. Schlupfraten festgestellt. Ein Teil der eingefrorenen Blastozysten wurde für Transferversuche verwendet.

Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Insgesamt wurden 48392 Oozyten gewonnen. Nach der In-vitro-Fertilisation teilten sich 33624, was einer Teilungsrate von 69,5 % entspricht, wovon sich 7131 zu Blastozysten entwickelten (21,2 %).

2. Im ersten Versuchsabschnitt wurde von 10 verschiedenen Bullen Samen aus 3 verschiedenen Fraktionen A, B u. C nach einer Swim-up-Dauer von 15 bis 60 min gewonnen und die Teilungs- u. Blastozysteraten nach IVF festgestellt.

Weder bei Verwendung einer definierten Menge Spermasuspension (15 µl Befruchtungstropfen) noch bei einer definierten Spermienzahl (100000-200000/Befruchtungstropfen) noch bei unterschiedlicher Swim-up-Dauer konnten zwischen den einzelnen Fraktionen Unterschiede hinsichtlich der Teilungs- u. Weiterentwicklungsraten festgestellt werden. Lediglich bei einer Spermienkonzentration von 200000 in 10 µl Spermasuspension/Befruchtungstropfen ergaben sich bei den Blastozystenraten signifikant bessere Ergebnisse von 22,8 % vs. 19,7 % zugunsten der unteren Fraktion B.

3. Im zweiten Versuchsabschnitt wurden die Teilungs- u. Blastozystenraten nach Zugabe von 1 µg/ml Heparin (Kontrollgruppe) und 0 µg/ml Heparin (Versuchsgruppe), bzw. nach Zugabe von 1 µg/ml Heparin (Kontrollgruppe) und 10 µg/ml Heparin (Versuchsgruppe), zur Kapazitationsauslösung der Spermien über einen Zeitraum von 15 Minuten gegenübergestellt.

Im 1. Versuch wurden 2662 Oozyten in der Kontrollgruppe und 2499 Oozyten in der Versuchsgruppe verwendet. Beim Zusatz von 1 µg/ml gegenüber 0 µg/ml Heparin zum Kapazitationsmedium waren sowohl die Teilungsraten mit 72,3 % vs. 34,3 % als auch die Blastozystenraten mit 26,7 % vs. 18,5 % signifikant erhöht. Im 2. Versuch wurden 2777 Oozyten für die Kontrollgruppe und 2598 Oozyten für die Versuchsgruppe verwendet. Hierbei zeigte sich, daß die Teilungsraten der Versuchs- u. Kontrollgruppen mit 63,2 % bzw. 65,1 % sich gering signifikant unterschieden. In der Versuchsgruppe lag die Blastozystenrate mit 14,3 % gegenüber der Kontrollgruppe mit 28,3 % signifikant niedriger.

4. Im dritten Versuchsabschnitt wurde der Einfluß der Kapazitationszeit von 2 min (Versuchsgruppe) bzw. 15 min (Kontrollgruppe) auf die Teilungs- u. Blastozystenraten untersucht.

Es entfielen 5219 der Oozyten auf die Versuchsgruppe und 5149 Oozyten auf die Kontrollgruppe. Bei einer Kapazitationsdauer von 15 min gegenüber 2 min war sowohl die Teilungsrate mit 72,4 % gegenüber 68,5 % als auch die Blastozystenraten mit 21,2 % gegenüber 17,4 % signifikant erhöht. Die Teilungs- u. Weiterentwicklungsraten der ersten 3 Versuchsabschnitte sind dem Anhang zu entnehmen.

5. Im vierten Versuchsabschnitt wurden die Teilungs- u. Blastozystenraten bei Verwendung von Samen verschiedener Bullen nach verschiedenen Kapazitationszeiten (2, 15, 30 und 45 Minuten) mit unterschiedlichen Heparingehalten (0,5 u. 1 µg/ml Heparin) untersucht. Für diese Versuchsserie wurden insgesamt 3810 Oozyten mit dem Spermia 5 verschiedener Bullen in vitro befruchtet. Bei einer kurzen Kapazitationszeit von 2 min lagen die Teilungs- u. Blastozystenraten mit 57,5 % u. 13,7 % am ungünstigsten. Durch eine Verlängerung der Kapazitationszeit auf 15 min stiegen die Teilungsraten auf 67,5 % deutlich u. die Blastozystenraten auf 16,5 % gering. Nach 30 und 45 min Kapazitationsdauer gingen die Teilungsraten von 63,5 % auf 59,9 % zurück. Ähnlich verhielten sich die Teilungsraten bei 0,5 µg/ml Heparinzusatz. Dagegen verhielten sich die Blastozystenraten nahezu umgekehrt. Mit zunehmender Kapazitationsdauer auf 30 bzw. 45 min steigerten sich - mit einer Ausnahme (30 min, 0,5 µg/ml Heparin, 33,5 %) - die Blastozystenraten von 13,7 % und 16,5 % bei einer Kapazitationsdauer von 2 bzw. 15 min auf 53,7 %, 50,4 % bzw. 55,9 % bei 30 u. 45 min Kapazitationsdauer.

6. Im Zeitraum von April 1997 bis November 1997 wurden insgesamt 2426 expandierte Rinderblastozysten in 3 Versuchen unter Berücksichtigung der Einfriergeschwindigkeit von 0,3°, 0,5° u 0,8° C/min eingefroren, aufgetaut u anschließend im Brutschrank bei 38,5° C kultiviert

Das Einfriermedium bestand aus mod PBS + 20 % FCS u dem Kryoprotektivum 10 % Ethylenglykol (EG), 10 % EG + 0,2 M Sucrose (S), 10 % EG + 0,3 M S, 10 % EG + 0,5 M S u 20 % EG.

Im 1. Versuch (Auftaumedium u Kulturmedium = TCM 199 + 20 % FCS bei 38,5° C) erreichten die Schlupfraten nach dem Auftauen mit 20 % EG als Kryoprotektivum 50,9 %, mit 10 % EG dagegen nur 12,7 %. Bei Zusätzen mit 0,2, 0,3 u 0,5 M Sucrose betrugen die Schlupfraten 24,9 %, 20,8 % u 18,6 %.

Im 2. Versuch (Auftau- u Ausverdünnungsmedium = mod Ménèzo-B₂-Medium bei 20° C, Kulturmedium = TCM 199 + 20 % FCS bei 38,5° C) lagen die Schlupfraten mit 58,4 % bei Verwendung von 10 % EG als Kryoprotektivum am höchsten und bei 10 % EG + 0,5 M S u 20 % EG mit 21,3 % u 29,0 % am niedrigsten. Die Supplementierung von 10 % EG + 0,2 M S u 0,3 M S brachte Schlupfraten von 47,6 % u 50 %.

Im 3. Versuch (Auftau- u Ausverdünnungsmedium = mod PBS + 20 % FCS + 0,3 M S bei 20° C; Kulturmedium = TCM 199 + 20 % FCS bei 38,5° C) wurden Schlupfraten mit 10 % EG von 46,3 % erreicht, nach Benutzung von 10 % EG + 0,2 M S u 20 % EG als Kryoprotektivum fielen die Ergebnisse auf 37,5 % bzw 24,5 % ab.

Unterschiedliche Einfriergeschwindigkeiten von 0,3°, 0,5° u 0,8° C haben die oben genannten Ergebnisse nicht beeinflusst.

7. Bei 23 Direkttransfers (One-step) wurde eine Trächtigkeitsrate von 61,2 % erreicht. Die Pailletten wurden 5 mal einem und 18 mal mit je zwei Embryonen aufgezogen, wobei die Embryonen in dem Mittelsegment der Paillette in 10 % EG + 0,2 M S als Kryoprotektivum eingefroren wurden. Die Randsegmente enthielten mod-Ménèzo-B₂-Medium. Weitere 8 Transfers wurden nach Tiefgefrierung und Auftauen (s.o.) u 24-stündiger Zwischenkultivierung übertragen. Es wurde bei Verwendung von 2 Embryonen Paillette eine Trächtigkeitsrate von 50 % erreicht.

Matthias Streicher

Experiments on the determination of the fertilization capacity of sperm of different bulls after changing the swim up procedure, the heparin treatment, and the incubation period with heparin during in vitro fertilization of cattle oocytes, and experiments on the cryopreservation with in vitro produced cattle blastocysts with ethylenglycol and sucrose

Summary

A total of 4464 ovaries from slaughtered cows have been transported from the slaughterhouse in Erlangen to the ET-laboratory of the „Besamungsverein Neustadt an der Aisch“. There the oocytes have been collected, matured, fertilized with different methods and cultured in vitro. Afterwards the resulting blastocysts were frozen under various experimental conditions, thawed and the post-thaw-survival and hatching rates were established. Frozen blastocysts were partly used for transfer experiments.

In detail, the following results were obtained

1. Altogether 48392 oocytes were collected. After in vitro fertilization 33624 oocytes cleaved (69,5 %) and 7131 reached the blastocyst stage (21,2 %).

2. In the first part of the experiment semen of 10 different bulls from 3 different sections A, B and C was obtained after a swim-up-period of 15 to 60 minutes. Cleavage- and blastocyst rates were evaluated after IVF.

Neither by the utilization of a definite amount of spermatozoa in a suspension (15µl fertilization drops), nor by a definite number of spermatozoa (100000-200000 fertilization drop), nor by differing swim-up-periods differences were ascertained between the individual fractions with regard the cleavage and further developmental rates. Only with a sperm concentration of 20000 per µl in a 10 µl fertilization drop blastocyst rates increased significantly (22,8 % vs. 19,7 %) in favour of the lower fraction B.

3. In the second experiment cleavage and blastocyst rates after addition of 1 $\mu\text{g/ml}$ heparin (control group) and 0 $\mu\text{g/ml}$ heparin (test group) (experiment 1), or after the addition of 1 $\mu\text{g/ml}$ heparin (control group) and 10 $\mu\text{g/ml}$ heparin (test group) (experiment 2), were compared within the capacitation period of 15 minutes interval. During the first experiment 2662 oocytes were used in the control group and 2499 oocytes were used in the test group. Addition of 1 $\mu\text{g/ml}$ vs. 0 $\mu\text{g/ml}$ heparin to the incubation medium increased the cleavage-rates significantly to 72,3 % vs. 34,3 %. Blastocyst rates increased significantly also to 26,7 % vs. 18,5 %. In the second experiment 2777 oocytes were used for the control group and 2598 for the test group. The cleavage rates of the test- and the control group were about similar. The subsequent embryo development decreased from 28,3 % (control group) to 14,3 % (test group).

4. In the third experiment the influence of the incubation time in the presence of heparin for 2 minutes (test group) and 15 minutes (control group) on the cleavage and blastocyst rates, was examined.

A total of 5219 oocytes were allotted to the test group and 5149 oocytes to the control group. After an incubation period of 15 minutes with heparin, compared to 2 minutes, cleavage rates significantly increased from 68,5 % to 72,4 %, and blastocyst rates increased from 17,4 % to 21,2 %.

5. In the fourth experiment the cleavage- and blastocyst rates were examined after IVF with semen from five bulls. Additionally the incubation time varied from 2, 15, 30 and 45 minutes and the heparin content was modified from 0,5 to 1 $\mu\text{g/ml}$. In this experiments altogether 3810 oocytes were fertilized in vitro. After a short incubation time of 2 minutes the cleavage- and blastocyst rates were 57,5 % and 13,4 % respectively. When the incubation time with heparin was increased to 15 minutes the cleavage rates increased significantly to 67,5 %, and the blastocyst rates to 16,5 %. After 30 and 45 minutes of incubation, the cleavage rates decreased to 63,5 % and 59,9 %. The cleavage rates reacted similarly with the addition of 0,5 $\mu\text{g/ml}$ heparin. However, blastocyst rates showed opposite results. Prolonged incubation periods in the presence of heparin to 30 or 45 minutes improved subsequent embryo developmental rates, with one exception (30 min, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Heparin, 33,5 %), from 13,7 % or 16,5 %. An incubation period of 2 or 15 minutes in the presence of heparin resulted in 53,7 %, 50,4 % and 55,9 %. Using a incubation period of 30 or 45 minutes

6. From April 1997 to November 1997 three freezing-experiments were carried out, and altogether 2426 expanded bovine blastocysts were frozen, thawed and then cultured in the incubator at 38,5° C. Freezing-rate were 0,3°, 0,5° and 0,8° C/min

The freezing solution consisted of mod. PBS + 20 % FCS and the cryoprotectant ethylenglycol (EG) 10 %, 10 % EG + 0,2 M Sucrose (S), 10 % EG + 0,3 M S, 10 % EG + 0,5 M S u 20 % EG. During experiment 1 (thawing solution and culture medium TCM 199 + 20 % FCS at 38,5° C) the hatching rate, after thawing with 20 % EG as cryoprotectant was 50,9 %. However, only 12,7 % were obtained using 10 % EG. By adding 0,2, 0,3 and 0,5 M sucrose the hatching rates were 24,9 %, 20,8 % u 18,6 %. During experiment 2 (thawing-and dilutionsolution was mod-Ménézo-B₂-solution at 20° C, culture medium was TCM 199 + 20 % FCS at 38,5° C) Hatching rates were highest (58,4 %) when using 10 % EG as cryoprotectant, and lowest with 10 % EG + 0,5 M S or 20 % EG (21,3 % and 29,0 %). The supplementation of 10 % EG + 0,2 M S and 0,3 M S resulted in hatching rates of 47,6 % and 50,4 %.

During experiment 3 (thawing-and dilution solution: mod. PBS + 20 % FCS + 0,3 M S at 20° C, culture medium + TCM 199 + 20 % FCS, 38,5° C) hatching rates were 46,3 % using 10 % EG as cryoprotectant. After use of 10 % EG + 0,2 M S and 20 % EG as cryoprotectant the results decreased to 37,5 % and 24,5 % respectively.

Varying freezing rates of 0,3°, 0,5° and 0,8° C/min did not influence the results significantly.

8. With 23 direct embryo transfers (one-step method) a pregnancy rate of 61,1 % was achieved. In five cases each straw contained 1 and in 18 cases 2 embryos. The embryos were frozen in the middle segment of the straw in a 10 % EG + 0,2 M S cryoprotectant solution. The dilution segments contained mod-Ménézo-B₂-solution. Another 8 transfers were accomplished after freezing and thawing and an additional 24 hour period of in vitro culture. Using 2 embryos/straw a pregnancy rate of 50 % was achieved.