

## 6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Durchführbarkeit und Ausbeute der ultraschallgeleiteten Follikelpunktion bei trächtigen Tieren zu bestimmen und das Risiko der Methode für Spendertier und Fetus abzuschätzen. Des Weiteren sollten Faktoren identifiziert werden, die die Ergebnisse der Follikelpunktion mit nachfolgender In vitro Produktion bei graviden Rindern und Kühen beeinflussen, und die in vitro produzierten Embryonen sollten auf ihre Entwicklungskompetenz geprüft werden. Dazu wurden vier Versuche durchgeführt. In Versuch 1 wurden 12 Rinder und 11 Kühe vom 2. Trächtigkeitsmonat an zweimal wöchentlich punktiert. Die Punktionen wurden bis zu dem Zeitpunkt wiederholt, an dem die Durchführung technisch nicht mehr möglich war. In Versuch 2 wurden 10 Rinder nach spontaner Brunst besamt, in den folgenden vier Wochen achtmal punktiert und dann auf Trächtigkeit untersucht. In Versuch 3 wurden 17 trächtige Rinder und Kühe je achtmal punktiert, 9 der Tiere wurden zur Vorbereitung jeder Punktion mit FSH behandelt, 8 Tiere dienten als Kontrolle. IVP-taugliche Oozyten aus den Versuchen 1- 3 wurden dem In vitro Produktionsverfahren unterzogen. In Versuch 4 wurden transfertaugliche Embryonen auf 20 Empfängertiere übertragen.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden insgesamt 530 Punktionssitzungen bei 35 trächtigen Rindern und Kühen durchgeführt. Zwei Tiere wurden in zwei aufeinander folgenden Trächtigkeiten als Spendertiere herangezogen. Jedes Tier wurde mindestens fünfmal, höchstens 34mal punktiert. Verluste der Trächtigkeit wurden bei zwei Tieren festgestellt. Die Aborte wurden jeweils ca. 2 Monate nach der letzten Punktion beobachtet und standen damit offenbar nicht in direktem Zusammenhang mit dem OPU- Verfahren.

2. OPU ist bei Rindern durchschnittlich bis zum 80. Tag (66- 107), bei Kühen durchschnittlich bis zum 137. Tag (110- 189) der Trächtigkeit erfolgreich einsetzbar. Bei Verwendung einer Stufe zum Hochstellen der Vordergliedmaßen während der Punktion konnte die Punktionsdauer bei Rindern bis zum 102. Tag, bei Kühen bis zum 142. Tag der Trächtigkeit verlängert werden. Darüber hinaus wurden durch diese Methode störende Seitwärtsbewegungen des Spendertieres minimiert (Versuch 1).

3. Bei trächtigen Rindern und Kühen konnten pro OPU- Sitzung durchschnittlich 7,4 Follikel punktiert und 3,9 Oozyten gewonnen werden. Eine Wiederfindungsrate (Oozyten/ Follikel) von 53,1% wurde ermittelt. Es wurden sowohl bei den Rindern als auch bei den Kühen starke individuelle Schwankungen in der Zahl punktierter Follikel und gewonnener Oozyten beobachtet (Versuch 1).

4. Das Trächtigkeitsstadium konnte als endogener Einflußfaktor auf das OPU-Ergebnis identifiziert werden. Während sich zwischen dem 2., 3. und 4. Trächtigkeitsmonat keine signifikanten Unterschiede bei der Zahl punktierter Follikel und gewonnener Oozyten ergaben, wurden bei Kühen vom 5. Trächtigkeitsmonat an weniger Follikel punktiert und Oozyten gewonnen ( $p < 0,01$ ); (Punktionen bei Rindern konnten nur bis zum 4. Trächtigkeitsmonat erfolgreich durchgeführt werden). Der Vergleich der Ergebnisse zwischen Rindern und Kühen im gleichen Trächtigkeitsmonat ergab keine signifikanten Unterschiede (Versuch 1).

5. Von insgesamt 1396 KOK aus 344 OPU- Sitzungen wurden 685 KOK als IVP-tauglich beurteilt (49,1%). Die IVP-tauglichen KOK wurden in vitro gereift, befruchtet und kultiviert. Es konnten 141 transfertaugliche Embryonen (0,4 Embryonen pro Tier und Puktionssitzung) erstellt werden. In den Ergebnissen der In vitro Produktion zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Rindern und Kühen (Versuch 1).

6. Nach Besamung und 8 OPU- Sitzungen in den darauf folgenden vier Wochen wurden 5 der 10 Rinder für trächtig befunden (Trächtigkeitsrate 50%). Die Ergebnisse des Ovum pick up waren zwischen trächtigen und nicht trächtigen Rindern nicht signifikant unterschiedlich (Versuch 2).

7. In der Gruppe der gonadotropinbehandelten Tiere (200mg FSH 72 Stunden vor jeder Punktion) war die Zahl der pro OPU- Sitzung aspirierten Follikel höher ( $p < 0,01$ ) als in der Kontrollgruppe (12,9 gegenüber 8,3). Die Zahl der gewonnenen Oozyten (6,0 gegenüber 4,7) und in vitro produzierten Embryonen (1,0 gegenüber 0,6) pro Sitzung war jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Bei einem Tier konnten nach Gonadotropinbehandlung pro Punktionssitzung 26,0 Follikel punktiert, 15,5 Oozyten gewonnen und 4,4 Embryonen produziert werden (Versuch 3).

8. 20 unblutige Transfers auf synchrone und  $\pm 24$  Stunden asynchrone Empfängertiere resultierten in 10 Trächtigkeiten (Trächtigkeitsrate 50%). Zwei Aborte wurden am Ende des 2. Trächtigkeitsmonats, ein Abort im 5. Trächtigkeitsmonat beobachtet. Um bei den verbleibenden 7 Trächtigkeiten eine Trächtigkeitsdauer von 283 Tagen nicht zu überschreiten, wurden 4 Geburten eingeleitet, 3 Geburten erfolgten spontan. In einem Fall wurden Zwillinge geboren. Das durchschnittliche Geburtsgewicht der sechs einzeln geborenen Kälber betrug 53kg (44- 66kg). Die hohen Geburtsgewichte waren die Ursache für mittelschwere bis schwere Geburten, in einem Fall mußte eine Schnittentbindung durchgeführt werden. Ein Kalb mit einem Geburtsgewicht von 66kg verendete kurz nach dem Auszug. (Versuch 4).

Die Ergebnisse zeigen, daß OPU bei gleichbleibenden Ergebnissen und ohne Risiko für Spendertier und Fetus in den ersten 3 bis 4 Monaten der Trächtigkeit bei Rindern und Kühen eingesetzt werden kann. Vom 5. Trächtigkeitsmonat an ist die Zahl der Follikel und der gewonnenen Oozyten bei Kühen verringert. Gonadotropinbehandlungen führen nur in Einzelfällen zu einer Erhöhung der Ausbeute des Ovum pick up. Durch Transfer von in vitro produzierten Embryonen aus graviden Spendern werden befriedigende Trächtigkeitsraten erzielt. Durch den Einsatz der ultraschallgeleitete Follikelpunktion bei trächtigen Rindern und Kühen kann ein wichtiger Beitrag zu einer verbesserten Ausnutzung des weiblichen Keimzellpotentials in der Rinderzucht geleistet werden.

## 7 Summary

Eckhard Eikelmann

### Repeated Ultrasound Guided Follicular Aspiration in pregnant Heifers and Cows

The purpose of this study was to examine the feasibility and effectiveness of repeated ultrasound guided follicle aspiration in pregnant cattle and to estimate the risk of this method for donor and fetus. Additionally, factors affecting yields of ovum pick up (OPU) and subsequent in vitro production (IVP) in pregnant animals were identified and the developmental competency of the in vitro produced embryos was tested. In Exp. 1, 12 heifers and 11 cows (parity  $\geq 1$ ) were punctured twice weekly starting from the second month of pregnancy. Oocyte recovery continued until it was technically impossible. In Exp. 2, ten heifers were artificially inseminated after spontaneous estrus and punctured for the period of the following 4 weeks. On the day of the 8<sup>th</sup> session, the animals were checked for pregnancy. In Exp. 3, 17 pregnant heifers and cows were subjected to 8 OPU sessions. 9 animals were treated with FSH prior to each session, 8 animals served as control. Suitable oocytes recovered in Exp. 1, 2 and 3 were used for IVP procedure. In Exp. 4, resulting embryos were transferred nonsurgically to 20 recipients.

The following results were obtained:

1. A total of 530 OPU sessions employing 35 pregnant heifers and cows were carried out with two animals being used as donors in two consecutive gestations. Each animal was punctured at least five times and the maximum number of puncture sessions for a single animal was 34 times. Fetal losses were observed in two animals. Both abortions occurred approximately 2 months after the final OPU session. We concluded that there was no causal connection between these fetal losses and the oocyte recovery procedure.

2. Ovum pick up was feasible in heifers until day 80 (66- 107) of gestation and in cows until day 137 (110- 189) of gestation. Using a fixation position with the front feet on a raised step during puncture, the maximum feasible collection period could be extended to day 102 in heifers and day 142 in cows. Additionally, employing this method, disturbing sideward movements of the donors were minimized (Exp. 1).

3. In pregnant heifers and cows, an average of 7.4 follicles were punctured and 3.9 oocytes were recovered. The recovery rate (oocytes / follicles punctured) was 53.1%. A high degree of individual variation was observed within the groups of heifers and cows (Exp.1).

4. The gestational phase was identified as an important factor affecting the results of oocyte recovery. No significant differences in the number of punctured follicles or recovered oocytes were found among months 2, 3 and 4 of gestation. However, the number of follicles punctured and also the number of oocytes recovered were lower ( $p>0.01$ ) in the fifth month of gestation in cows. (Oocyte recovery in heifers was feasible only until the fourth month of gestation). A comparison between the results of OPU in heifers and cows in the same month of gestation did not show significant differences (Exp. 1).

5. Out of a total of 1396 cumulus-oocyte-complexes (COC), originating from 344 OPU sessions, 685 COC were considered suitable for IVP (49.1%). The suitable COC were matured, fertilized and cultured in vitro. In all, 141 transferable embryos were produced (0.4 embryos per animal and OPU session). No significant differences between heifers and cows were observed.

6. After artificial insemination and 8 OPU sessions in the following four weeks, 5 of ten heifers were found to be pregnant (pregnancy rate 50%). The results of OPU were not different between pregnant and non-pregnant animals (Exp. 2).

7. In the group of gonadotropin treated animals (200mg FSH 72 hours prior to each puncture), the number of the punctured follicles per OPU session was higher ( $p < 0.01$ ) than in the control group (12.9 vs. 8.3). However, the number of oocytes obtained (6.0 vs. 4.7) and embryos produced (1.0 vs 0.6) per session were not significantly different. In one gonadotropin treated heifer, 26.0 follicles were aspirated, 15.5 oocytes were recovered and 4.4 embryos were produced per session (Exp. 3).

8. 20 nonsurgical transfers using synchronous and  $\pm 24$ h asynchronous recipients resulted in ten pregnancies (pregnancy rate 50%). Two abortions were observed in the second month and one in the fourth month of gestation. The remaining seven pregnancies were not allowed to proceed more than 283 days, which meant that in four cases, delivery had to be induced. The average birthweight of six calves was 53kg (44- 66kg) which caused difficult deliveries in all cases. The calf which weighed 66kg at birth died shortly after extraction. In another case, Caesarean section was required. The seventh pregnancy resulted in twins (Exp. 4).

These results show that OPU can be used in the first three to four months of gestation in heifers and cows with a constant yield and without risk to donor or fetus. Starting from the fifth month of gestation, the number of follicles which can be punctured and thus the number of oocytes which can be recovered is reduced in cows. Gonadotropin treatment is effective only in very few donors. Sufficiently high pregnancy rates can be obtained following transfer of in vitro produced embryos originating from pregnant donors. Ultrasound guided follicular aspiration in pregnant heifers and cows is an important tool to exploit the female germ cell potential for cattle breeding.