

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Technik der ultraschallgeleiteten Follikelpunktion bei präpuberalen HF-Rindern im Alter von 6 Monaten zu verbessern und die Polyspermierate der gewonnenen Oozyten durch Reduktion der Spermakonzentrationen (von 1×10^6 - auf $0,5 \times 10^6$ - und $0,25 \times 10^6$ Spermien/ml) in der in vitro Fertilisation zu senken. Durch vergleichenden Einsatz von zwei Spermachargen eines Bullen sollten mögliche den Effekte der Chargen dargestellt werden. Als eine mögliche Ursache der beschriebenen hohen Polyspermierate wurde die Verteilung der kortikalen Granula in Oozyten präpuberaler Rinder mit Hilfe einer Fluoreszenzfärbung und nachfolgender Auswertung mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Sowohl für die Fertilisationsversuche als auch für die Anfärbung der kortikalen Granula dienten Oozyten adulter Spender als Kontrolle. In einem weiteren Versuch wurde die Erzeugung von Nachwuchs von züchterisch wertvollen Kälbern angestrebt.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1. Mit dem im Umfang reduzierten OPU-Träger ist die ultraschallgeleitete Follikelpunktion bei 6 Monate alten Kälbern der Rasse Holstein-Friesian ohne aufwendige, vorherige Selektion auf genügend große Beckenverhältnisse möglich.
2. Die Punktionen in den Versuchsabschnitten I-V ergaben pro Punktionstermin im Durchschnitt pro Kalb 9,5-18,2 Follikel, 5,2-8,7 KOKs und 1,7-4,3 IVP taugliche Oozyten. Zwischen den einzelnen Spendertieren bestanden erhebliche individuelle Unterschiede.
3. Die Fertilisationskontrollen der Oozyten juveniler Spender zeigten, daß sich die zwei eingesetzten Spermachargen eines Bullen erheblich im Ausmaß der

polyspermen Befruchtung unterschieden. Durch eine Reduktion der Spermienkonzentration in der IVF konnte eine Senkung der Polyspermierate (für die Charge 3434: von 52,2% auf 27,0% und für die Charge 1835: von 12,4 auf 6,6%) erreicht werden. Die maximale Rate der monosperm zu befruchtenden Oozyten scheint bei Oozyten präpuberaler Rinder unter den gegebenen Bedingungen bei ca. 55% zu liegen.

4. Die Fertilisationskontrolle bei den Oozyten adulter Rinder wies ebenfalls eine starke Abhängigkeit der Polyspermierate in der IVF von der Spermiencharge (49,5% für Charge 3434 und 18,5% für Charge 1835 bei jeweils 1×10^6 Spermien/ml) auf. Das Fertilisationsverhalten entsprach dem von Oozyten juveniler Rinder mit dem Unterschied einer höheren maximalen monospermen Befruchtungsrates (bis zu 77%).
5. Die kortikalen Granula waren in den Oozyten präpuberaler Rinder zu 100% in Haufen angeordnet. Bei den Oozyten adulter Spender wiesen 66% ebenfalls eine Anordnung in Haufen auf und 33% zeigten eine Verteilung der Granula einzeln entlang dem Oolemm.
6. Von den morphologisch für IVF-tauglich eingestuften Oozyten entwickelten sich ca. 9% zu übertragungsfähigen Embryonen. Aus dem Transfer von 22 Embryonen auf 20 Empfängertiere resultierten 6 Trächtigkeiten, die komplikationslos verliefen. Es konnten 5 lebende Kälber entwickelt werden. Eine Geburt lief spontan ab, die anderen 5 wurden eingeleitet. In zwei Fällen wurde ein Kaiserschnitt durchgeführt. Ein Kalb starb bei der Geburt (Geburtsgewicht 60 kg, Empfängertier Färse). Das durchschnittliche Geburtsgewicht der aus in vitro Produktion stammenden Kälber (51,6 kg) war deutlich höher als das der Kälber aus künstlicher Besamung (44,7 kg) in der Milchviehherde des Instituts. Von den 6 Kälbern sind 4 männlich und 2 weiblich (eins verstorben).

Die Ergebnisse zeigen, daß die Polyspermierate in der in vitro Fertilisation von den eingesetzten Spermien beeinflußt wurde. Eine Senkung der Spermienkonzentration bewirkte eine Reduktion der Polyspermierate und eine Steigerung der monospermen Befruchtung. Diese Ergebnisse trafen auf Oozyten präpuberaler und adulter Spender gleichermaßen zu. Ein Unterschied bestand jedoch in der unterschiedlichen monospermen Befruchtungskompetenz, die für Oozyten adulter Rinder deutlich über der für Oozyten präpuberaler Rinder lag. Die Verteilung der kortikalen Granula war bei allen Oozyten präpuberaler und der Mehrzahl der in vitro maturierten Oozyten adulter Spender abweichend von den in vivo Beobachtungen aus der Literatur. Eine gezielte in vitro Fertilisation von Kälberoozyten war nach Untersuchung des Spermas auf IVF-Tauglichkeit möglich und resultierte in 5 lebenden Kälbern, deren Geburtsgewicht signifikant höher war als das der Nachzucht aus künstlicher Besamung. Für einen verstärkten Einsatz der in vitro Produktion in der Praxis ist eine Lösung der Problematik übergroßer Kälber erforderlich.

7. SUMMARY

Kai-Uwe Frank

Experimental investigations of in vitro fertilization of oocytes of prepubertal heifers

The aim of the present work was to improve the technique of ultrasound-guided follicular aspiration from prepubertal heifers with an age of 6 months and to reduce the rate of polyspermy of the collected oocytes through reduced insemination doses (from 1×10^6 to 0.5×10^6 and 0.25×10^6 sperm/ml) in the in vitro fertilization process.

A comparative use of two semen batches from the same bull should reveal potential effects of individual batches. As a possible cause of the described high rate of polyspermy, the distribution of the cortical granules in prepubertal oocytes was investigated with the aid of the Confocal-Laser-Scanning-Microscope (CLSM). Adult oocytes were used as a control for the fertilization experiment as well as for the staining of the cortical granules. In a further experiment, the production of offspring from calves of superior genetic value was investigated.

The following results were obtained:

1. With the OPU-carrier with reduced diameter it was possible, to carry out ultrasound-guided follicular aspiration in 6 months old Holstein-Friesian calves, without prior selection for size of the pelvis.
2. The punctures in the trial-sections I-V resulted, in an average of 9.5 – 16.2 follicles, 5.2 – 8.7 COCs and 1.7 – 4.3 oocytes per calf suitable for IVP. There were considerable differences among the donors.
3. Fertilization patterns of juvenile oocytes revealed that the two different semen batches from one bull differed considerably in the degree of polyspermic fertilization. By reducing the insemination dose in the IVF, it was possible to decrease the rate of polyspermy (for batch 3434: from 52.2 to 27.0% and for

batch 1835: from 12.4 to 6.6%). The maximum rate of prepubertal oocytes to be monospermic-fertilized was around 55%.

4. The fertilization control of adult oocytes also showed that the rate of polyspermy in the IVF depended on the semen batch. The fertilization pattern corresponded to that of juvenile oocytes, with higher maximum monospermic fertilization rate (up to 77%)
5. All cortical granules in prepubertal oocytes were arranged in clusters. In the adult oocytes, 66% were arranged in clusters and 33% showed a distribution as single granules along the oolemma.
6. From prepubertal oocytes classified morphologically suitable for IVF, approx. 9% developed into transferable embryos. The transfer of 22 embryos to 20 recipients resulted in 6 pregnancies which progressed without complications and which produced five live calves. One parturition was spontaneous, the other 5 were induced. In two cases a caesarean section was carried out. One calf died during parturition (recipient heifer, birthweight 60 kg). The average birthweight of the in vitro produced calves (51.6 kg) was considerably higher than that (44.7 kg) of the offspring produced during the same period by artificial insemination in the dairy herd of the institute. Of the 6 calves, 4 were male and 2 female (The dead calf was female).

The results show, that the rate of polyspermy after in vitro fertilization was heavily affected by the semen used. A decrease in the insemination dose caused a reduction in the rate of polyspermy and an increase in monospermic fertilization. These results were similar for prepubertal and adult oocytes. There was a difference, however, in the competence of monospermic fertilization which, was significant higher when adult oocytes were compared with prepubertal oocytes. The distribution of the cortical

granules was in in all all prepubertal and in the majority of the in vitro matured adult oocytes different from the in vivo observations in literature. In vitro fertilization of calf oocytes was possible after testing the sperm for IVF-suitability and resulted in transferable blastocysts and 5 live calves, whose birth weight was considerably higher than that of offspring generated in parallel by artificial insemination. A solution of the Large Calve Syndrome is necessary before an increased use of in vitro production should be carried out under field conditions.