

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch ultraschallgeleitete Follikelpunktion bei Kühen im Puerperium möglichst früh nach der Abkalbung entwicklungsfähige Oozyten zu gewinnen. Durch Einsatz verschiedener Gonadotropine wurde ein hormonelles Behandlungsschema entwickelt, um Anzahl und Qualität der von puerperalen Kühen gewonnenen Kumulus-Oozyten-Komplexe zu verbessern. Dazu wurden 65 Kühe in Versuchsgruppen von je 6 - 8 Tieren jeweils sechs Wochen zweimal pro Woche punktiert. Die gewonnenen KOK wurden in vitro maturiert und in vitro fertilisiert. Es schloß sich eine in vitro Kultivierung der nach morphologischen Kriterien als IVP-tauglich eingestuftten Oozyten bis zum Stadium der Morula oder Blastozyste am Tag 7 an. In repräsentativen Stichproben wurden Reifungs- und Befruchtungsraten von Oozyten nach Fixation und Färbung kontrolliert. Die Überprüfung der in vitro Entwicklungskompetenz der erzeugten transfertauglichen Embryonen erfolgte durch Übertragung auf Empfängertiere, Bestimmung der Zellzahl sowie der Schlupfraten.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1. Der Beginn der Follikelpunktion war abhängig von der Involution des Genitalapparates und durchschnittlich nach 7,2 Tagen möglich. Die Punktion konnte bei allen Spendern erfolgreich durchgeführt werden. Unipare Tiere (28) hatten nach 5,8 Tagen p.p. die Rückbildung weitgehend abgeschlossen; pluripare Tiere (37) benötigten signifikant längere Zeit (8,4 Tage).
2. Bei Kühen, die zwischen dem 3. und 40. Tag p.p. punktiert wurden, wurden nach 12 Punktionen im Schnitt 8,6 aspirierte Follikel, 5,7 Oozyten (davon 66,7 % IVP-tauglich) und 0,8 Blastozysten (19,7 %) pro Spendertier festgestellt.

3. Nach einmaligem Einsatz von FSH, 48 Stunden vor OPU, konnten 7,1 Oozyten/Spender (13) kultiviert werden. Von diesen waren 71 % entwicklungsfähig (4,4 Oozyten). Es entwickelten sich hieraus 25,0 % Blastozysten (1,1 Embryonen/Spender). Die Ergebnisse waren signifikant höher als die der 28 Kontrolltiere (4,3 gewonnene Oozyten; 3,2 IVP-tauglich; 0,6 Blastozysten entsprechend 18,8 %).

4. Nach Einsatz einer einmaligen Kombination aus FSH und GnRH 48 Stunden vor der ersten Follikelpunktion (10) konnten pro stimuliertem Tier 6,9 Oozyten gewonnen werden. Hiervon wurden als 4,5 Oozyten entwicklungsfähig (67,4 %) angesehen, es entwickelten sich 0,9 zu Blastozysten (20,0 %). Die Ergebnisse waren im Vergleich zu genannten Kontrollen signifikant erhöht ($P \leq 0,05$).

5. Der einmalige Einsatz von GnRH (14 Tiere) führte nicht zu einer Verbesserung in der Oozytengewinnung (5,6 Oozyten/Tier) oder in der Summe der IVP-tauglichen Oozyten (3,8 Oozyten/Tier). Lediglich die Blastozystenrate lag mit 0,9 pro Tier (23,7%) signifikant höher als vergleichbare Kontrollen.

6. Mit Abstand zur Kalbung wurden bei den Punktionsergebnissen und deren Weiterentwicklung erhebliche Unterschiede festgestellt: In der ersten Woche p.p. war der Oozytengewinn signifikant niedriger als in der 5. und 6. Woche nach Abkalbung. In den Furchungs- und Blastozystenraten wurden analoge Unterschiede ermittelt. In der 3. und 4. Woche p.p. lagen die Embryonenzahlen signifikant niedriger als in der 5. Woche post partum. Diese Resultate waren unabhängig von Art der hormonellen Stimulation.

7. Färsen hatten gegenüber Kühen mit 2 oder mehreren Laktationen erheblich weniger punktierbare Follikel (6,9 vs. 9,9) und Oozyten (4,7 vs. 6,6). Die Blastozysten-Ausbeute wies keine signifikanten Unterschiede auf (0,8 vs. 0,8).

Zusammenfassung

8. Die Milchleistung der Spenderkühe und jahreszeitlich bedingte Unterschiede beeinflussten die Follikelpunktionsergebnisse nicht.
9. Die Reifungsrate (Erreichen der Metaphase II) war mit 84,6 % (44/52) im Mittel vergleichbar mit den Raten aus IVP-Oozyten, die aus der Literatur bekannt sind.
10. In der Befruchtungsrate konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu publizierten Resultaten aus IVP-Oozyten festgestellt werden. 65,1 % (28/43) waren monosperm befruchtet, 7,0 % (3/43) polysperm und 27,9 % (12/43) blieben unbefruchtet.
11. Die Zellzahlen in vitro erzeugter Embryonen aus OPU am Tag 7 und 8 unterschieden sich nicht signifikant von den in vitro produzierten aus Schlachthofovarien (95,7 vs. 104,7 Gesamtzellzahl; 23,0 vs. 26,1 ICM-Zellen; 72,6 vs. 78,6 Trophektodermzellen). Im Vergleich zu in vivo Embryonen aus Literaturangaben zeigten die in vitro Embryonen eine geringere Zellzahl.
12. Die Schlupfraten zwischen in vitro Embryonen aus OPU (84,9 %; 321/378) und aus Schlachthofovarien (89,3%; 25 /28) unterschieden sich nicht. Im Gegensatz zu den im Schrifttum angegebenen Schlupfraten von in vivo Blastozysten von über 90 % lagen sie niedriger. Die Embryonen schlüpfen im vergleichsweise spät (9,2 Tage vs. 7,4 Tage nach IVF).
13. Aus 15 unblutigen Embryotransfers auf überwiegend asynchrone Empfängertiere resultierten 8 Trächtigkeiten (53 %). Bistang sind 5 Kälber lebend mit einem Geburtsgewicht von 53,6 kg im Mittel geboren. Die durchschnittliche Trächtigkeitsdauer betrug 281 Tage. Geburtsverlauf war bei 83 % (5/6) unkompliziert. Im siebten Graviditätsmonat wurde ein Abort beobachtet. Die übrigen 2 Kalbungen werden im Dezember 2001 erwartet.

14. Der mögliche traumatische Einfluß der Follikelpunktion wurde untersucht: ohne Komplikationen nach Punktionsende blieben 62,7 % (37/59). Die übrigen Tiere zeigten geringgradige (22,0 %; 13/59), mittelgradige (10,2 %; 6/59) oder schwerwiegende (5,1 %; 3/59) Veränderungen. Diese heilten jedoch nach Therapie mit Ausnahme eines Tieres (Pyometra mit anschließendem Anöstrus) aus, so daß ein normales Zyklusgeschehen einsetzte.

15. Das durchschnittliche Intervall zur ersten Brunst nach Punktionsende betrug 36,2 Tage. Dies entsprach einer Rastzeit von 85,3 Tagen. Insgesamt wurden nach 2,1 Besamungen und einer Günstzeit von 116 Tagen 86,4 % der Spender (51/59) tragend. GnRH vorbehandelte Spender benötigten eine signifikant längere Günstzeit (123 Tage vs. 110 Tage) als Kontrolltiere. Tiere, denen die Kombination aus FSH und GnRH verabreicht wurde, mußten signifikant häufiger bis zum Erreichen einer Gravidität besamt werden als die Kontrolltiere (2,5 vs. 1,7). Erstkalbinnen zeigten eine auffallend längere Günstzeit als Kühe mit 2 oder mehr Kalbungen (123 vs. 111 Tage). Die Trächtigkeitsraten unterschieden sich nicht signifikant voneinander (82,6 % vs. 88,9 %).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß eine Follikelpunktion mit anschließender Weiterentwicklung der Oozyten *in vitro* bei Kühen bereits kurz nach der Kalbung erfolgreich durchführbar ist, ohne ein größeres Risiko für Gesundheit oder Fertilität darzustellen. Die Ausbeute der *in vitro* produzierten Embryonen ist vergleichbar mit der Ausbeute von präpuberalen oder tragenden Spendertieren.

Der Einsatz der ultraschallgeleiteten Follikelpunktion ist zukünftig eine geeignete Möglichkeit, züchterisches Potential besonders bei postpartalen Kühen, die bereits eine Laktation abgeschlossen haben, auszuschöpfen, ohne deren eigene weitere Reproduktion einzuschränken oder zu verzögern.

Die Rastzeit wird sich bei einmaliger Follikelpunktion - anstatt einer längeren kontinuierlichen Reihe von Follikelpunktionen wie in der vorliegenden Arbeit - vermutlich nicht verlängern.

7 SUMMARY

Gesa Kniep

Recovery of developmentally competent oocytes by ultrasound guided follicle puncture in postpartum cows and the implications for future fertility.

The goal of this work was to obtain developmentally competent oocytes by ultrasound guided follicle puncture from postpartum cows as soon as possible after calving. A hormonal treatment scheme was developed based on the application of various gonadotropins to improve the number and quality of the cumulous oocyte complexes from cows which have recently calved. For this purpose, groups of 6 - 8 animals were subjected to ultrasound guided follicle puncture twice a week for a total of 6 weeks in groups of 6 - 8 animals. A total of 65 animals were used in these experiments. The quality of the oocytes collected was visually judged by standard criteria and satisfactory oocytes were matured, fertilized and further cultured for 7 days to the morula and blastocyst stage. Representative samples of the oocytes collected from each group were taken at various periods of in vitro handling and were fixed and stained to evaluate maturation and fertilization. The developmental competence of the embryos was evaluated by transfer to recipient cows, counting the number of cells in individual embryos and by observing the hatching rate.

The following results were obtained:

1. The starting point for follicle puncture depended on involution of the genitalia which was possible at an average of 7.2 days postpartum. It was possible to puncture every cow eventually. In first heifers (28) the involution was significantly nearly finished after 5.8 days, in older cows (37) the involution took 8.4 days.

2. Cows punctured in 12 sessions between the 3rd and the 49th day p.p. yielded an average of 8.6 aspirated follicles and 5.7 oocytes. At total of 66.7 % of the oocytes collected were of satisfactory quality for use in IVP and of those 0.8 (19.7 %) reached the blastocyst stage after 7 days in culture.
3. FSH was administered in 13 cows 48 hours prior to the first puncture session and gave 7.1 oocytes per cow. Of these oocytes, 71 % (4.4 oocytes) were of satisfactory quality for IVP and 25.0 % (1.1 embryos) developed to the blastocyst stage which was significantly higher than for 28 control animals (4.3 collected oocytes, 3.2 oocytes of satisfactory quality for IVP, 0.6 blastocysts).
4. A combination of FSH and GnRH was administered in 10 animals 48 hours prior to the first puncture session and gave 6.9 oocytes per cow. Of these oocytes, 67.4 % (4.5 oocytes) were of satisfactory quality for IVP and 20.0 % (0.9 embryos) developed to the blastocyst stage which was significantly higher ($P \leq 0.05$) than for control animals.
5. A single dose of GnRH administered in 14 cows 48 hours prior to the first puncture session gave no significantly higher number of collected oocytes (5.6) or oocytes satisfactory for IVP (3.8) than controls. However the blastocyst rate of 23.7 % (0.9 embryos) from these was significantly higher.
6. The interval from calving had a great influence on yield from puncture and on subsequent development. The number of oocytes collected, the cleavage rate and the blastocyst rate were all significantly lower in the first week p.p. than in the 5th and 6th weeks post partum. In the puncture session on the 3rd and the 4th week p.p. the number of embryos obtained from IVP was significantly less than the 5th week p.p. puncture session. These results were independent of the hormone treatment used.

Summary

7. First heifers had a greatly reduced number of follicles suitable for follicle puncture (6.9 vs. 9.9) and yielded less oocytes (4.7 vs. 6.6) than cows which had had two or more lactations. The blastocyst rate was not significantly different (0.8 vs. 0.8).
8. The results of follicle puncture were not significantly influenced by either the annual milk yield for these animals or the season of the year.
9. The maturation rate (the percentage reaching metaphase II) averaged 84.6 % (44/52) which is similar to published values for ultrasound guided ovum pick up.
10. The average fertilization rate was also essentially the same as published values: 65.1 % were monospermic (28/43), 7.0 % were polyspermic (3/43) and 20.9 % were not fertilized (12/43).
11. The cell number in day 7 and day 8 blastocysts produced from these OPU oocytes was not significantly different from the cell number observed in IVP blastocysts obtained from oocytes collected by slicing slaughter house ovaries. These OPU blastocysts had less cell number than published results for in vivo embryos.
12. The hatching rates for OPU-derived blastocysts (84.9%; 321/378) and slaughter house oocytes derived blastocysts (89.3 %; 25/28) were not significantly different. In comparison with published in vivo results of more than 90 %, the hatching rate for OPU-derived blastocysts was lower. In comparison the time of hatching was relatively late (9.2 days vs. 7.4 days after IVF).
13. Eight pregnancies resulted from 15 embryo transfers to predominantly asynchronous recipient cows (53 %). Up to now 5 calves were born with an average birth weight of 53.6 kg. The average duration of pregnancy was 281 days. The parturition was uncomplicated in 5 of 6 cases. There was one aborted fetus in the 7th month of pregnancy. The last 2 parturitions are still expected in December, 2001.

14. The trauma produced by follicle puncture was recorded. In these experiments, 62.7 % of the cows (37/59) had no complications, 22.0 % (13/59) had only minimal complications, 10.2 % (6/59) had moderate complications and only 5.1 % (3/59) had more serious complications. The cows with the more serious complications received treatment and after treatment their normal cycle started again. In one case, the cow had pyometra and in spite of medical treatment she was subsequently anoestrous.

15. The average interval between the final puncture session and the first heat was 36.2 days. This implied a resting period of 85.3 days. After a non-pregnant period of 116 days and after an average of 2.1 inseminations, 86.4% of the donors (51/59) became pregnant. GnRH treated cows required a significantly longer barren period (123 vs. 110 days) than control animals. Animals which had been treated with a combination of FSH and GnRH required significantly more inseminations before becoming pregnant than cows without any treatment (2.5 vs. 1.7). The first heifers prior to OPU required a significantly longer non-pregnant period than cows which had had two or more calves prior to being subjected to OPU (123 vs. 111 days). The pregnancy rates between these two classes of donor animals showed no significant differences (82.6 % vs. 88.9 %).

The results obtained from this experiment show that follicle puncture, for the purpose of in vitro development of oocytes, can be successfully performed shortly after calving with no greater risk to the health or future fertility of the cow. The yield of the IVP-produced embryos was comparable to that of prepubertal cattle or pregnant donor cows.

The ultrasound follicle aspiration can be used to maximize the breeding potential in post partum cows particularly that are lactating at least for the second time. This can be done without reculty or delaying future reproduction.

By puncturing the cows only once instead of repeated over a longer term, as was done in this experiment, it is expected that the resting period of the cows would not be increased.