

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Überblick über die Entwicklung und den Stand der In-vitro-Fertilisation (IVF) beim Pferd gegeben.

Zu diesem Zweck wurden die geschichtliche Entwicklung und das Wesen der IVF tierartübergreifend anhand von IVF-Studien beim Rind, Schaf, Schwein und Nagetier erläutert.

Die Teilgebiete der IVF des Pferdes wurden detailliert beschrieben und die Ergebnisse analysiert. Sie können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

Oozytengewinnung

Am lebenden Tier können Oozyten nichtoperativ durch Follikelaspiration nach Punktion durch die Flanke und operativ nach Laparotomie oder Kolpotomie gewonnen werden. Die Punktion, Massage und einmalige Spülung der Follikel durch direkte manuelle Fixierung des Ovars nach Kolpotomie führte zu den höchsten Oozytengewinnungsraten (71%).

Ist eine hormonelle Follikelstimulation mit HCG oder CEG zur Gewinnung reifer Oozyten erfolgt, sollte die Gewinnung 34 Stunden nach der Hormongabe durchgeführt werden.

Unreife Oozyten können aus Schlachtovarien durch Punktion oder nach Freipräparation und anschließender Ruptur bzw. Inzision der Follikel gewonnen werden.

Die Oozytengewinnungsrate durch Follikelpunktion mit anschließender Spülung betrug 43% bzw. 70% nach Follikelruptur. Die Follikelruptur führte zu einem höheren Prozentsatz an Oozyten mit morphologisch als intakt angesehenen Cumuluszellen (60-90%) als die Punktion (30%).

Oozytenreifung

Die Beurteilung der Eizellen vor der Reifung erfolgte anhand morphologischer Kriterien von Cumulus und Ooplasma. Für die IVR wurden Oozyten mit mehrlagigem, kompaktem Cumuluszellsaum und granuliertem Ooplasma ausgewählt.

Unreife equine Oozyten benötigten eine relativ lange Maturationsdauer in vitro, die mindestens 30 Stunden dauern sollte. Der Reifungszustand wurde anhand des Expansionsgrades der Cumuluszellen bestimmt.

Für die IVR wurden hauptsächlich die Medien TCM 199, DM und B2 verwendet; die Art des Mediums führte nicht zu signifikanten Unterschieden in den Reifungsraten.

Serumzugaben (FCS, MS) zu den Medien erhöhten die Reifungsraten signifikant. Hormonzugaben von b-LH, b-FSH, e-LH und e-FSH hatten, im Gegensatz zu PMSG, keinen Einfluß auf die Kernreifungsraten, jedoch bewirkten PMSG oder FSH in Kombination mit FCS 90-100%ige Cumuluszellexpansion.

Die beste Medium-Serum-Kombination für die IVM unreifer Oozyten war TCM 199 + 15% MS (vom ersten Tag des Östrus) und erreichte 94%ige Kernreifung und 80%ige Cumuluszellexpansion.

Die Oozyte, aus der das erste Fohlen aus einer IVF resultierte, war 34-35 Stunden nach hormoneller Follikelstimulation gewonnen und für sechs Stunden bei 38,5° C in B2 + 15% FCS in-vitro gereift worden.

Spermienbearbeitung

Für die Bearbeitung der Spermien waren TALP und HHBSA die gebräuchlichsten Medien, die dann häufig individuellen Modifizierungen unterzogen wurden.

Präinkubationszeiten waren von der Temperatur, dem pH-Wert und der Osmolalität des Mediums abhängig und beeinflussten die Motilität und Penetrationsraten der Spermien.

Die Kapazitation und/oder Akrosomreaktion von Hengstspermien konnte in vitro durch verschiedene chemische Stoffe (PC12, LPS, A 23187) und Stoffkombinationen (LPS + Heparin, A 23187 + Coffein, LPS + Coffein) ausgelöst werden, jedoch wurde das Calcium-Ionophor A 23187 am häufigsten zur Induktion der Kapazitation und Akrosomreaktion von Pferdespermien verwendet. Eine 30-minütige Behandlung der Spermien mit A 23187 führte zu raschen Motilitätsverlusten, während die Motilität nach fünfminütiger Behandlung bis zu zwei Stunden erhalten blieb.

Spermien für die IVF aus der das erste Fohlen stammte, waren nach 30-minütiger Äquilibrierung in HHBSA für fünf Minuten mit A 23187 (6 μ M Endkonzentration) bei 37°C behandelt worden.

In-vitro-Befruchtung

Optimale Bedingungen für die gemeinsame Inkubation von Oozyten und Spermien waren bei einer Temperatur von 38-38,5°C und einem Gasgemisch aus 5% CO₂ und befeuchteter Luft gegeben.

Nach der Insemination wurden die Oozyten alle acht bis 18 Stunden in frisches Medium überführt. Durchschnittlich alle 24 Stunden wurden die Oozyten mikroskopisch auf Teilungsstadien hin untersucht.

Die erste erfolgreiche IVF, aus der ein Fohlen stammte, war in B2-Medium mit 15% FCS bei 38,5°C und einem Gasgemisch aus 5% CO₂ und Luft durchgeführt worden. Der Transfer des Embryos war 60 Stunden nach der In-vitro-Insemination erfolgt.

Dieses erste und bislang einzige Fohlen wurde am 14. Juni 1990 von einer Ponystute geboren und wog 26 kg.

Kultivierung in-vivo entstandener Embryonen

Im Vergleich zur In-vitro-Kultivierung in Medium allein, führte die Ko-Kultivierung in-vivo entstandener, equiner Embryonen mit anderem Zellmaterial zu qualitativ besseren Entwicklungsstadien und einer Abnahme der Degenerationsrate.

Auf equinen Eileiterepithelzellen lag die Entwicklungsrate zu Blastozysten von ein- bis zweizelligen Embryonen bei 35% bzw. von vier- bis achtzelligen Embryonen bei 89%.

Die 72-stündige Ko-Kultivierung auf bovinen fetalen Uterusfibroblastenzellen erhielt die Lebensfähigkeit in vitro zu 53%, führte zu einer Größenzunahme um 115% und zu einer Entwicklungsrate zu Morulae und Blastozysten von 57% und erzielte somit signifikant höhere Entwicklungsergebnisse als mit equinen Uterusfibroblastenzellen.

In-vitro kultivierte Embryonen waren lebensfähig, was durch Trächtigkeiten nach Embryotransfer bewiesen wurde.

Constanze Carstens:

Development and current status of equine in vitro fertilization. A literature study.

SUMMARY

The present study was designed to give an overview on the development and the current status of equine in vitro fertilization (IVF).

For this purpose the historical development and nature of IVF are described by comparing IVF-studies in cattle, sheep, pigs, and rodents.

Different fields of research in equine IVF are described in detail and the results are analysed. They can be summed as follows:

Recovery of oocytes

In the mare oocytes can be obtained non-surgically by follicular aspiration after puncture through the flank or surgically by laparotomy or colpotomy. The highest oocyte recovery rates were obtained using the colpotomy procedure (71%) with manual fixation of the ovary in the abdomen when the follicle was aspirated, massaged, and flushed once.

To obtain mature oocytes, oocyte recovery should be performed 34 hours after follicular stimulation by HCG or CEG.

To obtain immature oocytes from ovaries following slaughtering, follicles were punctured, ruptured, or opened by incision after dissection from the ovary.

By puncturing and subsequent rinsing of the follicle, an oocyte recovery rate of 43% was achieved. A rate of 70% was obtained by rupturing the follicle. Rupturing and scraping the

inner follicular wall with a scapel resulted in a higher percentage of oocytes with a morphologically normal cumulus (60-90%) than did follicular aspiration (30%).

Maturation of oocytes

Before in vitro maturation oocytes were classified according to the morphology of their cumulus and ooplasm. Oocytes with a dense layer of compact cumulus cells and granular ooplasm were chosen for in vitro maturation (IVM).

Immature equine oocytes should have a minimum maturation period of 30 hours for achieving good results in IVF. The state of maturation was judged by the degree of cumulus cell expansion.

Media such as TCM 199, DM and B2 were used mainly for IVM, but the choice of medium did not lead to significant differences in oocyte maturation rates.

Addition of serum (FCS, MS) increased nuclear maturation rates significantly. Addition of hormones such as b-LH, b-FSH, e-LH, and e-FSH did not influence nuclear maturation, in contrast to addition of PMSG. The combination of FCS with PMSG or FSH, however, resulted in 90-100% cumulus cell expansion.

The most effective medium-serum-combination for in vitro maturation of immature oocytes was TCM 199 + 15% MS (mare serum from the first day of estrous), which led to 94% nuclear maturation rate with 80% cumulus cell expansion.

Sperm preparation

The media most commonly used for preparation of semen were TALP and HHBSA, which were often individually modified.

The time of pre-incubation depended on temperature, pH, and osmolality of the media used, and eventually influenced the motility and penetration rates of spermatozoa.

In vitro capacitation and/or the acrosome reaction of stallion spermatozoa was induced by several chemical substances (PC12, LPS, A 23187) or combinations of them (LPS +heparin, A 23187 + caffein, LPS + caffein). The calcium Ionophore A 23187, however, was used most frequently for inducing capacitation and the acrosome reaction in vitro.

A 30-min Ionophore A 23187 treatment of spermatozoa resulted in a rapid decrease of sperm motility, whereas motility was maintained for up to two hours after treatment lasting only five minutes.

Semen for the first successful IVF with birth of a foal was treated for five minutes with A 23187 at 37°C after having had a 30-min equilibration period in HHBSA.

In vitro fertilization

Optimal conditions for co-incubation of oocytes and sperm were given at 38-38.5°C under a continuous flow of humidified air with 5% CO₂.

After insemination the oocytes were transferred into fresh medium every eight to 18 hours. The division of oocytes was assessed every 24 hours on average by microscopy.

The first successful IVF resulting in birth of a foal was performed in B2-medium with 15% FCS at 38.5°C under 5% CO₂ in humidified air. The embryo was transferred to the original donor 60 hours after insemination in vitro.

This first and thus far unique foal was born by a pony mare on June 14th, 1990; the foal weighed 26 kg at birth.

Culture of in vivo produced embryos

In comparison to culture in medium alone, co-culture of equine embryos in vitro with other cell material increased the quality of developmental stages and led to a decrease of degeneration rates.

A total of 35% of the one- and two-celled embryos and 89% of the four- to eight-celled embryos cultured on equine oviduct epithelial cells developed to the blastocyst stage.

Co-culturing the embryos for 72 hours with bovine fetal uterine fibroblast cells maintained the viability in 53% of the cases, led to a 115% increase in diameter, and to a development in 57% of the cases to morulae and blastocysts. Therefore, significantly higher results were achieved than in co-culture with equine fetal uterine fibroblast cells.

Viability of the embryos cultivated in vitro was proven by the pregnancies resulting from embryo transfer.