

Untersuchungen zum Einsatz von Calcium-Ionophore A23187 während der In-vitro-Befruchtung

A. Haenisch Woehl¹, T. Greising², W. Kanitz², K.-P. Nohner¹, C. Leiding¹

¹Besamungsverein Neustadt an der Aisch e.V., 91413 Neustadt, Karl-Eibl-Straße 17-27

²Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere, FB Fortpflanzungsbiologie, 018196 Dummerstorf, Wilhelm-Stahl-Allee 2

Ausgehend von der Forderung der Tierzüchter die Anzahl transfertauglicher Nachkommen von wertvollen Einzeltieren auch unter Nutzung der Techniken der assistierten Reproduktion zu erhöhen, wurden in den vergangenen Jahren auf dem Gebiet der Reproduktionsforschung zahlreiche Arbeiten durchgeführt, um die Ergebnisse der In-vitro-Reifung, -Befruchtung und -Embryokultur zu effektivieren.

Ziel der hier dargestellten Untersuchung war es, den Einfluss einer Behandlung in vitro gereifter, in vitro befruchteter Eizellen des Rindes mit Calcium-Ionophore A23187 während der In-vitro-Befruchtung auf die Effektivität der In-vitro-Produktion von Embryonen beim Rind zu bestimmen.

Ausgangspunkt für diese Untersuchung war die Hypothese, dass sich eine unzureichende Aktivierung der Eizelle negativ auf die anschließende Embryonalentwicklung auswirkt. Die Aktivierung kann beschrieben werden als ein Komplex morphologischer bzw. biochemischer Prozesse als Antwort von Eizellen auf die Fusion mit dem Spermium bzw. auf die Behandlung mit einem speziellen Stimulus. Sie ist ein zentraler Punkt bei der Induktion der Embryonalentwicklung nicht nur nach der Befruchtung in vivo, sondern auch im Rahmen von Biotechniken zur Embryoproduktion. Ohne Aktivierung findet keine Embryonalentwicklung statt.

Die Fusion des Spermiums mit der Oozytenmembran bei der Befruchtung beendet das Ruhestadium der Eizelle. Als erstes Zeichen der Aktivierung kommt es zu einem intrazellulären Anstieg der Calcium-Ionenkonzentration. Experimentell kann dieser Anstieg durch eine Behandlung der Eizellen mit Calcium-Ionophore erreicht werden. Calcium-Ionophore wirkt in der Zellmembran als mobiler Carrier und führt zu einem intrazellulären Anstieg von Calcium.

Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass eine Behandlung in vitro gereifter Rindereizellen mit Calcium-Ionophore nach der Reifung und vor der In-vitro-Befruchtung zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl transfertauglicher Embryonen führt. In den hier dargestellten Experimenten sollte untersucht werden, ob eine Behandlung während der In-vitro-Befruchtung, d.h. eine Aktivierung der Zellkerne von Ei- und Samenzelle einen positiven Effekt auf die anschließende präimplantative Embryonalentwicklung bis hin zur Blastozyste hat.

Entsprechend der eingangs genannten Zielstellung war der Versuchsaufbau zweigeteilt. Im ersten experimentellen Ansatz ging es um die Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der In-vitro-Befruchtung, um im zweiten Teil der Arbeiten gezielt eine Behandlung

befruchteter Eizellen mit Calcium-Ionophore im Zeitraum zwischen Penetration des Spermiums und Syngamie durchführen zu können.

Die Gewinnung der Cumulus-Oozyten-Komplexe (COK) erfolgte aus den Ovarien geschlachteter Rinder mittels Slicing-Methode. Kompakte COK wurden je nach Versuchsansatz 24 h bzw. 30 h *in vitro* gereift (TCM 199 + 10% ECS + 15 μ l FSH). Von der Hälfte der COK eines jeden Ansatzes wurden nach der Reifung die Cumuluszellen entfernt. Die Befruchtung von Eizellen/COK erfolgte mit tiefgefrierkonserviertem Bullensperma nach Swim-up-Präparation in einer Endkonzentration von 1×10^6 Spermien/ml. Die Aktivierung befruchteter Eizellen/COK erfolgte mit 20 μ M Calcium-Ionophore in PBS mit bzw. ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Ionen für 5 Minuten bei Raumtemperatur 3h, 6h, 9h und 12h nach Befruchtungsbeginn. Die Bestimmung der Blastozystenrate erfolgte nach Kultur der befruchteten, aktivierten Eizellen in TCM 199 + 10% ECS am Tag 8 nach Befruchtung. Nach Fixation und Färbung der befruchteten Eizellen wurde die Befruchtungs- und Blastozystenrate bestimmt.

Beim Vergleich der Befruchtungsraten 24 h gereifter und *in vitro* fertilisierter Eizellen bzw. COK hat sich gezeigt, dass ohne Behandlung 3 h nach Befruchtungsbeginn mehr als doppelt soviel COK wie Eizellen befruchtet gewesen sind (20,8 % bzw. 56,9 %). Weitere 3 Stunden später hatte sich das Verhältnis ausgeglichen und die Befruchtungsrate von Eizellen bzw. COK lag bei 63,9 % bzw. 69,3 %.

Nach einer *In-vitro*-Reifung über 30 h und *In-vitro*-Befruchtung waren die Ergebnisse ähnlich denen nach 24 h Reifung. 3 h nach Beginn der *In-vitro*-Befruchtung war die Befruchtungsrate der COK etwa dreimal so hoch, wie die befruchteter Eizellen (43,8 % bzw. 13,8 %). Mit zunehmender Zeit nach Beginn der IVF stieg die Befruchtungsrate und war nach 12 h für COK und Eizellen etwa gleich (77,9 % bzw. 73,6 %).

Wurden nach einer *In-vitro*-Reifung über 24 h Eizellen bzw. COK *in vitro* befruchtet und 3 h, 6 h, 9 h bzw. 12 h nach Befruchtungsbeginn aktiviert, konnte im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle eine Erhöhung der Blastozystenrate erreicht werden wenn COK 9 h nach Befruchtungsbeginn mit Calcium-Ionophore in einem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltigen Medium behandelt wurden (26,7 % bzw. 38,3 %). Eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Blastozystenrate wurde 12 h nach Befruchtungsbeginn erreicht, unabhängig davon ob das Aktivierungsmedium $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Ionen enthielt oder nicht (13,9 % bzw. 29,3% und 35,3 %).

Nach einer *In-vitro*-Reifung über 30 h wurde die Blastozystenrate durch Behandlung im Vergleich zur Kontrolle nur dann erhöht, wenn COK 9 h nach Befruchtungsbeginn aktiviert wurden und das Aktivierungsmedium $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Ionen enthielt (22,1% bzw. 13,8 %)

Zusammenfassend kann in Auswertung der beiden experimentellen Versuchsansätze festgestellt werden, dass durch eine Behandlung von *in vitro* befruchteten COK mit Calcium-Ionophore 9 h bzw. 12 h nach Befruchtungsbeginn im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Erhöhung der Entwicklungsrate zur Blastozyste erreicht werden kann, wenn die Reifungszeit *in vitro* und der Gehalt des Mediums an $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Ionen berücksichtigt werden.