

Untersuchungen zum Einsatz von Calcium-Ionophore A23187

während der In-vitro-Befruchtung

A. Haenisch Woehl³, C. Leiding¹, W. Kanitz²

1. *Besamungsverein Neustadt an der Aisch e.V., 91413 Neustadt, Karl-Eibl-Straße 17-27*
2. *Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere, FBN Fortpflanzungsbiologie, 18196 Dummerstorf, Wilhelm-Stahl-Allee 2*
3. *Gynäkologische und Ambulatorische Tierklinik – LMU- München*

Ausgehend von der Forderung der Tierzüchter, die Anzahl transfertauglicher Embryonen von wertvollen Einzeltieren zu erhöhen, wurde in den vergangenen Jahren viel unternommen, um die Ergebnisse der In-vitro-Reifung (IVM), -Befruchtung (IVF) und -Kultur (IVC) zu verbessern. Ziel der hier dargestellten Untersuchung war es, den Einfluss einer Behandlung in vitro gereifter und in vitro befruchteter Eizellen des Rindes mit Calcium-Ionophore A23187 im Zeitraum zwischen Penetration des Spermiums und Syngamie auf die Effektivität der In- vitro-Produktion von Embryonen zu bestimmen.

Entsprechend der Zielstellung war der Versuchsaufbau zweigeteilt. Im ersten Experiment ging es um die Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der IVF, um im zweiten Teil der Arbeit gezielt eine Behandlung befruchteter Eizellen mit Calcium-Ionophore durchführen zu können. Die Gewinnung der Cumulus-Oozyten-Komplexe (COK) erfolgte aus den Ovarien geschlachteter Rinder mittels Slicing-Methode. Kompakte COK wurden 24 h oder 30 h in vitro gereift (TCM 199 + 10% ECS + 15 µl FSH). Von der Hälfte der COK einer jeden Gruppe 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 µM Calcium-Ionophore in PBS mit bzw. ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Ionen für 5 Minuten bei Raumtemperatur 6h, 8h und 12h nach Insemination. 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 Vorkernbildung sowie Befruchtungs- und Blastozystenrate bestimmt.

Beim Vergleich der Befruchtungsraten von Eizellen bzw. COK, welche 24 h bzw. 30 h gereiften und anschließend in vitro fertilisiert wurden, hat sich

gezeigt, dass 3 h nach Befruchtungsbeginn einen signifikanten Unterschied in der Befruchtungsrate zwischen COK und Eizellen bestand (21,4 % bzw. 50,7 %; $p < 0,001$). Weitere 3 Stunden später war das Verhältnis ausgeglichen. Die Befruchtungsrate von Eizellen bzw. COK lag 21 h nach Fertilisationsbeginn bei 95,0 % bzw. 88,2 % ($p < 0,001$). Die Syngamie wurde eher bei COK bzw. Eizellen, welche über 24 h gereift wurden festgestellt. Die höchste Syngamierate wurde 21 bis 24 h nach Fertilisationsbeginn beobachtet.

Eine signifikante Erhöhung der Blastozystenrate mittels Aktivierung wurde dann erreicht, wenn COK, welche 24 h gereift wurden, 8 h nach Befruchtungsbeginn mit Calcium-Ionophore in einem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltigen Medium behandelt wurden (26,8 % vs. 63,9 %; $p < 0,001$). Eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Blastozystenrate wurde auch durch eine Aktivierung 12 h nach Befruchtungsbeginn erreicht. Die Erhöhung war unabhängig von der Anwesenheit von $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Ionen im Medium (21,1 % bzw. 32,1% und 37,1 %). Nach einer IVM über 30 h wurde die Blastozystenrate durch Aktivierung im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant erhöht.

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