

Spermienvorbehandlung und Aktivierungsmethoden im Rahmen

der in vitro Produktion von Rinderembryonen nach ICSI

Matos, L.M.¹⁺²; Fontes, R.S.¹; Weppert, M.²; Reichenbach, H.-D.²

- 1. Lab. de Melhoramento Genético Animal, CCTA-UENF, Campos / RJ, Brasilien*
- 2. Bayer. Landesanstalt für Tierzucht BLT, D-85586 Poing/ Grub*

Eine Alternative zur konventionellen Technik der in vitro Befruchtung von Rinderembryonen kann die sogenannte Intrazytoplasmatische Spermieninjektionstechnik (ICSI) darstellen. Die Technik besteht aus der Injektion eines Spermiums in das Zytoplasma einer Eizelle mit Hilfe einer Mikromanipulationsanlage. Im Gegensatz zum Menschen oder zu verschiedenen Tierarten kommt es beim Rind zu einer unzureichenden Aktivierung beim Injektionsvorgang und wegen der hohen Kondensierung der Chromosomen bildet sich der männliche Vorkern öfters nicht aus. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedenen Spermienvorbehandlungs- und Aktivierungsmethoden in Kombination mit der ICSI zu beurteilen. Das Sperma wurde bei 37°C/30s aufgetaut und nach Swim-up zwei Mal mit Fert-Talp (Resuspension und Zentrifugation) gewaschen. Um die Effekte verschiedener Behandlungen auf die Membranintegrität und auf die DNA-Dekondensierung zu beurteilen wurden die Spermien drei (5 mM Dithiothreitol (DTT), 2 mM DTT + 0,1% Triton X-100 oder 2 mM DTT + 0,1% ATAB) Behandlungen bei 1h/25°C ausgesetzt. Eizellen aus Ovarien geschlachteter Rinder wurden gereift und denudiert (Fontes et al., *Theriogenology* 2001; 57: 665 abstr.). Gruppen von 14-16 Eizellen wurden entweder mit unbehandelten oder mit vorbehandelten Spermien injiziert. Die ICSI wurde nach Suttner et al. (*Theriogenology* 2000; 54: 935-948) durchgeführt. Um den Aktivierungseffekt zu beurteilen, wurden drei Gruppen mit unbehandelten Spermien injiziert. Die Eizellen wurden folgenden Aktivierungsmethoden zugeordnet: Ethanol 7%, Calcium Ionophore A23187 (CaI) + Cycloheximide (CHX) oder Ionomycin (Ion) + 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP). Konventionelle in vitro Befruchtung (IVF-K) oder in vitro Befruchtung mit denudierten und selektierten Eizellen (IVF-D) dienten als Kontrolle (2x10⁶ Spermien/mL). Die Kultivierung der Embryonen erfolgte in 4-Vertiefungsschälchen (400µl SOF). Die Teilungsraten wurden 72 Stunden nach der Befruchtung ermittelt und die Entwicklung der Embryonen zwischen Tag 7-9 (Tag 0 = Befruchtung) beurteilt.

**Tabelle 1. Teilungs- und Blastozystenraten je nach der angewandten Spermienbehandlung und Aktivierungsmethode
(Werte als Durchschnitt % \pm SEM)**

Gruppe	Spermien- behandlung	Befruchtung	Aktivierung	COC (n)	Wieder- holungen	Teilungsrate (%) (Tag 3)	Blastozystenrate (%) (Tag 7-9)
1	Kontrolle	ICSI	-	101	7	6,2 \pm 5,7 ^a	1,2 \pm 3,9 ^a
2	DTT	ICSI	-	75	5	7,5 \pm 5,7 ^a	1,2 \pm 3,9 ^a
3	DTT + ATAB	ICSI	-	75	5	7,4 \pm 5,7 ^a	1,2 \pm 3,9 ^a
4	DTT+ Triton	ICSI	-	75	5	10,1 \pm 5,7 ^a	2,5 \pm 3,9 ^a
5	Kontrolle	ICSI	Cal + CHX	104	7	32,4 \pm 4,6 ^b	3,1 \pm 3,2 ^a
6	Kontrolle	ICSI	Ethanol 7%	98	7	27,9 \pm 4,6 ^b	2,2 \pm 3,2 ^a
7	Kontrolle	ICSI	Ion+ 6- Dmap	105	7	54,6 \pm 4,6 ^c	12,5 \pm 3,2 ^b
8	Kontrolle	IVF-D	-	165	11	70,2 \pm 3,4 ^d	30,5 \pm 2,3 ^c
9	Kontrolle	IVF	-	167	11	58,4 \pm 3,4 ^c	19,6 \pm 2,3 ^b

Signifikante Unterschiede innerhalb einer Spalte sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet (^{a-d}P<0,05) (ANOVA).

In der vorliegenden Arbeit wurde allein durch eine Spermieninjektion keine ausreichende Aktivierung der Eizellen erzielt. Trotz der Vorbehandlung der Spermien waren die Teilungs- und Blastozystenraten in den ersten vier Gruppen (ohne Aktivierung) gering. Höhere Teilungsraten wurden in den aktivierten Gruppen erreicht. Die Aktivierungsmethode Ionomycin + 6-DMAP führte zu den besten Ergebnissen.