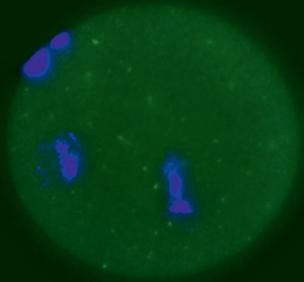


**MANUELA SCHLIPF**

---

Vergleich des Einflusses  
verschiedener Aktivierungsmethoden und  
Kultivierungsmedien auf die Vorkernausbildung  
nach intrazytoplasmatischer Injektion equiner  
Spermien in bovine Oozyten



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2019

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2019

© 2019 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere  
mit tierärztlicher Ambulanz; Professur für Molekulare Reproduktionsmedizin

Betreuerin: Prof. Dr. Christine Wrenzycki

**Vergleich des Einflusses verschiedener Aktivierungsmethoden und  
Kultivierungsmedien auf die Vorkernausbildung nach  
intrazytoplasmatischer Injektion equiner Spermien in bovine  
Oozyten**

INAUGURAL DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Manuela Schlipf**  
Tierärztin aus Backnang

Gießen 2019

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer  
Klinik für Kleintiere,  
Professur für Chirurgie  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Christine Wrenzycki  
Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und  
Andrologie der Groß- und Kleintiere mit  
tierärztlicher Ambulanz; Professur für  
Molekulare Reproduktionsmedizin  
Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachterin: Prof. Dr. Christine Wrenzycki

2. Gutachterin: PD Dr. Daniela Fietz

Prüfer: Prof. Dr. Axel Wehrend

Tag der Disputation: 03. Juli 2019

Meinen Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>2. Literatur</b>	<b>7</b>
2.1 <i>Physiologische Grundlagen</i>	7
2.1.1 Eizellentwicklung	7
2.1.2 Syngamie	8
2.2 <i>In-vitro-Produktion equiner Embryonen</i>	8
2.2.1 Eizellgewinnung	9
2.2.1.1 Eizellgewinnung von lebenden Stuten	9
2.2.1.2 Postmortale Eizellgewinnung	10
2.2.1.3 Kumulus-Oozyten-Komplexe	11
2.2.2 In-vitro-Maturation	13
2.2.3 In-vitro-Fertilisation	15
2.2.4 In-vitro-Kultivierung	17
2.3 <i>Artifizielle Aktivierung</i>	19
2.3.1 Grundlagen der Aktivierung	19
2.3.2 Parthenogenese	20
2.3.3 Nachweis der Mitochondrien im Spermienmittelstück	21
2.3.4 Unterscheidung zwischen „haploider und diploider Aktivierung“	22
2.3.5 Möglichkeiten der artifiziellen Aktivierung	25
2.3.5.1 Artifizielle Aktivierung equiner Oozyten	27
2.3.5.2 Artifizielle Aktivierung boviner Oozyten	28
2.3.6 Mikrotubuläre Veränderungen im Rahmen der artifiziellen Aktivierung	30
2.4 <i>Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)</i>	31
2.4.1 Geschichte der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion	31
2.4.2 Vor- und Nachteile der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion	32
2.4.3 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion beim Pferd	33
2.5 <i>Heterologe intrazytoplasmatische Spermieninjektion</i>	35
2.5.1 Intrazytoplasmatische Injektion von Pferdespermien in bovine Oozyten	36
2.6 <i>Glukosemetabolismus des Embryos</i>	36
2.6.1 Pferd	36
2.6.2 Rind	38
2.7 <i>Ziele des vorliegenden Projekts</i>	39
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>41</b>
3.1 <i>ICSI beim Pferd</i>	41
3.1.1 Gewinnung der Kumulus-Oozyten-Komplexe	41

## Inhaltsverzeichnis

3.1.2	Klassifizierung der Kumulus-Oozyten-Komplexe	42
3.1.3	In-vitro-Maturation	45
3.1.4	Entfernen der Kumuluszellen	45
3.1.5	ICSI-Schale	45
3.1.6	Aufbereitung der Spermien	46
3.1.7	Mikroskop und Mikromanipulatoren	47
3.1.8	Auswahl und Manipulation der Spermien	47
3.1.9	Auswahl der Eizellen für die ICSI	48
3.1.10	Ablauf der ICSI	48
3.1.11	In-vitro-Kultivierung	50
3.1.12	Morphologische Beurteilung der Embryonen	50
3.2	<i>Die heterologe intrazytoplasmatische Spermieninjektion</i>	50
3.2.1	Gewinnung der Kumulus-Oozyten-Komplexe	51
3.2.2	Beurteilung der Kumulus-Oozyten-Komplexe	51
3.2.3	In-vitro-Maturation	53
3.2.4	Entfernung der Kumuluszellen	53
3.2.5	ICSI-Schale	54
3.2.6	Vorbereitung des MitoTracker Green® FM	54
3.2.7	Aufbereitung des Spermas	54
3.2.8	Mikroskop und Mikromanipulatoren	55
3.2.9	Auswahl und Manipulation der Spermien	55
3.2.10	Auswahl der Eizellen für die ICSI	56
3.2.11	Ablauf der ICSI	56
3.2.12	Sham-Injektion und chemische Aktivierung	56
3.2.13	Aktivierung der Oozyten	57
3.2.13.1	Mechanische Aktivierung mithilfe des Piezo-Elements	57
3.2.13.2	Chemische Aktivierung	57
3.2.13.3	Mechanische Aktivierung mithilfe des Piezo-Elements und anschließend chemische Aktivierung	58
3.2.14	In-vitro-Kultivierung	58
3.2.15	Beurteilung der Teilungsraten	59
3.2.16	Färbung mit Hoechst 33342 zur Darstellung der Vorkerne und Polkörper	59
3.2.17	Auswertung der Färbungen	59
3.2.17.1	Übersicht: Auswertung der Färbungen	61
3.2.17.2	Legende der Übersicht: Auswertung der Färbungen	62
3.2.18	Bestimmung der Glukosekonzentration im Kultivierungsmedium	63
3.3	<i>Allgemeiner Versuchsaufbau</i>	64
3.3.1	ICSI beim Pferd	64
3.3.2	Heterologe Spermieninjektion	65
3.3.2.1	Übersicht der ICSI-Gruppen	65
3.3.2.2	Übersicht der Sham-Gruppen	66
3.3.2.3	Übersicht der chemisch aktivierten Gruppe	67
3.4	<i>Statistische Auswertung der Ergebnisse</i>	67

<b>4. Ergebnisse</b>	<b>68</b>
4.1 <i>Ergebnisse der ICSI beim Pferd</i>	68
4.1.1 Ermittlung der Reifungs- und Teilungsraten	68
4.2 <i>Ergebnisse der heterologen ICSI</i>	69
4.2.1 Vorkernausbildung nach heterologer ICSI	69
4.2.1.1 Auswirkung verschiedener Glukosekonzentrationen im Kultivierungsmedium auf die Vorkernausbildung	70
4.2.1.2 Auswirkung verschiedener Aktivierungsmethoden auf die Vorkernausbildung	72
4.2.2 Bestimmungen der Glukosekonzentration in den unterschiedlichen Kultivierungsmedien	74
4.2.3. Teilungsraten im Rahmen der Kultivierung	76
<b>5. Diskussion</b>	<b>77</b>
5.1 <i>Reifungs- und Teilungsraten der ICSI beim Pferd</i>	77
5.1.1 Reifungsraten nach ICSI beim Pferd	77
5.1.2 Teilungsraten nach ICSI beim Pferd	78
5.2 <i>Ergebnisse der heterologen ICSI</i>	81
5.2.1 Vorkernausbildung nach heterologer ICSI	82
5.2.1.1 Auswirkung der Glukosekonzentration im Kultivierungsmedium	82
5.2.1.2 Auswirkung verschiedener Aktivierungsmethoden auf die Vorkernausbildung	84
5.2.2 Bestimmung der Glukosekonzentration in den unterschiedlichen Kultivierungsmedien	88
5.2.3 Teilungsraten im Rahmen der Kultivierung	89
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>92</b>
<b>7. Summary</b>	<b>95</b>
<b>8. Verzeichnisse</b>	<b>97</b>
8.1 <i>Abkürzungsverzeichnis</i>	97
8.2 <i>Abbildungsverzeichnis</i>	98
8.3 <i>Tabellenverzeichnis</i>	99
8.4 <i>Verzeichnis der Diagramme</i>	99
8.5 <i>Literaturverzeichnis</i>	99
<b>9. Anhänge</b>	<b>114</b>
9.1 <i>Tabellen</i>	114
9.1.1 Ergebnisse	114
9.1.2 Statistische Auswertung: One-Way ANOVA	121
9.1.3 Statistische Auswertung: Tukey-Test	124

## Inhaltsverzeichnis

<i>9.2 Medien</i> -----	127
9.2.1 Medien für die IVP-----	127
9.2.2 Medien für die chemische Aktivierung-----	130
9.2.3 Medien für die Färbung mit Mitotracker Green® FM und Hoechst 33342 -----	131
<i>9.3 Geräte und Labormaterialien</i> -----	131
<b>10. Eidesstattliche Erklärung</b> -----	<b>133</b>
<b>11. Danksagungen</b> -----	<b>134</b>

## 1. Einleitung

Die intrazytoplasmatische Spermieninjektion, kurz ICSI, beschreibt die Methode, eine Eizelle durch direkte Injektion eines einzelnen Spermiums ins Ooplasma zu befruchten.

Es wurden schon bei verschiedenen Tierarten lebende Nachkommen aus durch ICSI befruchtete Eizellen geboren; so zum Beispiel beim Rind (Goto et al. 1990), beim Schaf (Catt et al. 1996), beim Schwein (Martin 2000) und auch beim Pferd (Cochran et al. 1998). Im humanmedizinischen Bereich wird die ICSI genutzt, um die Fortpflanzung trotz männlicher Sub-/Infertilität zu ermöglichen. Die erste erfolgreiche ICSI beim Menschen wurde 1988 durchgeführt (Lanzendorf et al. 1988). Das erste ICSI-generierte Baby wurde 1992 geboren (Palermo et al. 1992).

Gegenüber der konventionellen In-vitro-Fertilisation zeigt die ICSI verschiedene Vorteile:

So stellt sie beispielsweise eine Möglichkeit dar, auch dann erfolgreich Embryonen zu generieren, wenn beim Vater(tier) von geringer Spermienzahl und -motilität ausgegangen wird. Weiterhin kann die ICSI eingesetzt werden, wenn Eizellen und Spermien nur in begrenzter Anzahl vorhanden sind, zum Beispiel bei der Zucht sehr wertvoller Tiere.

In Fällen, in welchen nur wenige Eizellen einer Spezies zur Verfügung stehen, ermöglicht die heterologe intrazytoplasmatische Spermieninjektion die Erforschung früher Abläufe innerhalb der Befruchtung (Rodriguez et al. 2016). So untersuchten Li et al. (2003) zum Beispiel die Pronuklei-Ausbildung nach der Injektion von Pferdespermien in Rinderoozyten.

Die ICSI eröffnet außerdem die Möglichkeit, grundlegende Mechanismen der Befruchtung, die Funktion der Spermien und anschließende Abläufe innerhalb der frühen Embryonalentwicklung näher zu untersuchen.

Beim Pferd stellt die ICSI im Rahmen der In-vitro-Produktion (IVP) die einzige zufriedenstellende Methode dar, Eizellen zuverlässig in vitro zu befruchten. Tatsache ist, dass die klassische IVF beim Pferd bislang nicht erfolgreich wiederholt eingesetzt werden konnte; so wurde bisher nur von zwei Fohlen, welche nach IVF in vivo gereifter Pferdeoocyten geboren wurden, berichtet (Palmer et al. 1991; Bézard et al. 1992).

## 1. Einleitung

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die Eizellgewinnung sowie die In-vitro-Maturation und schließlich die ICSI beim Pferd zu etablieren und anschließend zu optimieren und so langfristig die Effizienz der In-vitro-Produktion beim Pferd zu steigern.

Aufgrund mangelnder Ressourcen wurde nach erfolgreicher Etablierung der IVM und erster Versuche der ICSI beim Pferd, die heterologe ICSI von Pferdespermien in Rinderoozyten als Modell genutzt, um so Erkenntnisse über die frühembryonalen Abläufe bei der Aktivierung der Eizelle und der Ausbildung der Vorkerne im Rahmen der ICSI zu gewinnen.

Dabei erfolgte zunächst der Vergleich der Auswirkung verschiedener Glukosekonzentrationen in den Kultivierungsmedien auf die Vorkernausbildung nach ICSI. Anschließend wurde der Einfluss verschiedener Aktivierungsprotokolle auf die Pronukleiausbildung nach ICSI beurteilt. Im Rahmen dieser Versuche wurde auch die Veränderung der Glukosekonzentration im Medium vor und nach ICSI bestimmt. Anschließend erfolgte die Kultivierung der injizierten Eizellen, um die Teilungsraten nach heterologer ICSI zu beurteilen.

Das Ziel der Versuche war es, eine Aussage über den Glukosebedarf des Embryos innerhalb der ersten 18 Stunden zu treffen und den Effekt verschiedener Aktivierungsmethoden zu beurteilen. Dabei sollten Ergebnisse, welche Hinweise auf die Vorkernausbildung des Spermiums und somit den männlichen Anteil der Zygote liefern, vom heterologen aufs homologe Modell (Pferd) übertragen werden.

## 2. Literatur

### 2.1 Physiologische Grundlagen

#### 2.1.1 Eizellentwicklung

Die Stammzellen der Oozyten werden auch als Primordialkeimzellen bezeichnet und befinden sich beim Säugetier zunächst extraembryonal im Dottersackepithel. Von dort wandern sie ab dem Ende des ersten Monats der Embryonalentwicklung in die Keimdrüsenanlage ein, wo sie sich in der Rindenschicht des Ovars zu Oogonien entwickeln. Im Rahmen der ersten Reifungsperiode, welche bei Pferd und Rind wie auch beim Menschen bereits vor der Geburt vollendet wird, durchlaufen die Oogonien zahlreiche mitotische Teilungen und differenzieren sich zu primären Oozyten (Monniaux et al. 2014). Diese treten in eine längere Ruhephase ein, in welcher die Eizelle zusammen mit den sie umgebenden somatischen Follikelzellen den Primordialfollikel darstellt. Mit Beginn der Geschlechtsreife erfolgt dann die Follikulogenese, in welcher ein Teil der Primordialfollikel über Primär- und Sekundärfollikel zum Tertiärfollikel heranreift. Pro Zyklus entwickelt sich beim Pferd in der Regel dann ein Tertiärfollikel zum sprungreifen Graafschen Follikel.

Die primäre Oozyte beendet kurz vor der Ovulation die erste Reifeteilung, in deren Rahmen die sekundäre Oozyte und ein ausgeschleuster Polkörper entstehen. Die Eizelle verbleibt nun solange in der sogenannten MII-Phase, auch meiotischer Arrest genannt, bis die Penetration durch das Spermium stattfindet.

Erst nach der Befruchtung erfolgt dann die Beendigung der zweiten meiotischen Teilung, bei welcher die Zygote entsteht und wiederum ein Polkörper ausgeschleust wird (siehe Abbildung 1; Übersicht bei Schnorr und Kressin 2001).

## 2. Literatur

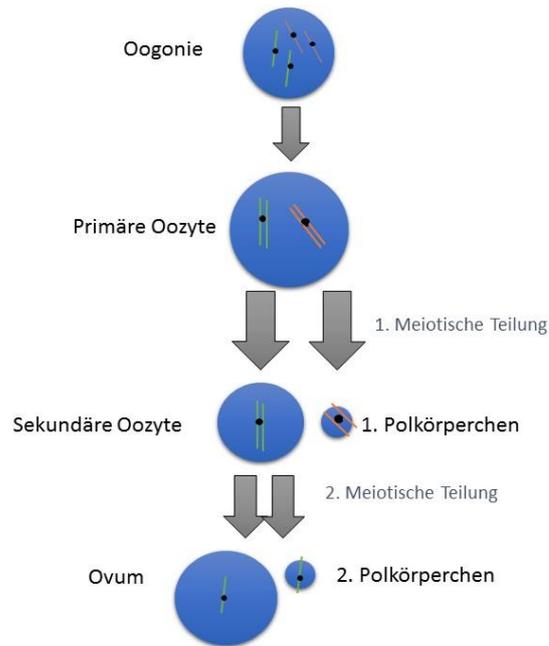


Abbildung 1: Darstellung der Oogenese

### 2.1.2 Syngamie

Während die zweite Reifeteilung vollendet wird, kommt es zur Dekondensation des Spermienkopf-Chromatins im Zytoplasma der Eizelle. Im Folgenden bilden die Chromosomen des Spermienkopfes den männlichen Vorkern (Pronucleus) und die verbliebenen Chromosomen der Eizelle den weiblichen. Die beiden Pronuclei treffen sich im Zentrum der Eizelle, wo die Vorkernverschmelzung (Syngamie) stattfindet. Weiterhin löst sich die Kernmembran auf, die Chromosomen werden sichtbar und es kommt zu deren Vermischung und Anordnung in der Teilungsebene. Damit ist die Syngamie beendet und die Zygote mit diploidem Chromosomensatz entstanden (Übersicht bei Schnorr und Kressin 2001).

Unmittelbar darauf beginnt die Zygote sich zu teilen. Dabei werden bei höheren Säugetieren für die erste Furchung 24 Stunden, für jede weitere Furchung 10-12 Stunden benötigt. Nach 5-7 Tagen entwickeln sich Blastozysten. Dabei ist es die äußere Zellschicht, die sich zum Trophoblasten (TB) entwickelt, während aus der inneren Zellmasse (ICM) der Embryoblast entsteht (Yanagimachi 1994).

### 2.2 In-vitro-Produktion equiner Embryonen

Die In-vitro-Produktion (IVP) zählt zu den assistierten Reproduktionstechniken (ART). Sie setzt sich zusammen aus der Gewinnung unreifer Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK), der

Reifung der gewonnenen Eizellen (In-vitro-Maturation - IVM), der Befruchtung der erfolgreich gereiften Oozyten (In-vitro-Fertilisation - IVF) und der In-vitro-Kultivierung (IVC) der entstandenen Zygoten bis zum Stadium der Blastozyste.

### 2.2.1 Eizellgewinnung

Im Durchschnitt finden sich auf einem Ovar circa sechs Follikel in verschiedenen Reifestadien, aus denen KOK gewonnen werden können (Hinrichs 1991; Hinrichs et al. 1995; Del Campo et al. 1995). Für die Eizellgewinnung werden Zahlen zwischen 1,3 und 4,5 Oozyten, die pro Ovar gewonnen werden können, genannt (Choi et al. 2007; Galli et al. 2007; Ambruosi et al. 2009).

#### 2.2.1.1 Eizellgewinnung von lebenden Stuten

Eizellen können von lebenden Stuten mittels dem sogenannten Ovum Pick Up (OPU) auf zwei verschiedene Methoden gewonnen werden:

- a) Die Gewinnung immaturer Oozyten, indem sämtliche, auf dem Ovar befindliche Follikel transvaginal unter Ultraschallkontrolle ausgeschabt und gespült werden.

Die Eizellgewinnungsraten immaturer Oozyten aus Follikeln mittels Spülung liegen hier, laut Galli et al. (Übersicht v. 2014), lediglich bei 25% oder weniger. Dies lässt sich durch die sehr starke Anheftung der Oozyte an die Follikelwand erklären. So weist der Kumulus eine breitere Anhaftungsfläche zur Follikelwand und weniger Schichten Granulosazellen zwischen Kumulus und Basalmembran, als beispielsweise beim Rind auf. Zusätzlich sind zur weiteren Verankerung der Oozyte Ausläufer der Kumuluszellen in die darunter liegende Theka vorhanden. Folglich gestaltet sich die Gewinnung von Eizellen beim Pferd mittels Spülung der Follikel als schwierig. Weiterhin besitzen die so gewonnenen Oozyten in der Regel nur noch teilweise oder gar keinen Kumulus (Übersicht bei Hinrichs 2012). Trotzdem ist das OPU eine etablierte Methode, um mit Sportpferden und infertilen Tieren das ganze Jahr über züchten zu können.

- b) Die Gewinnung eines bereits reifen KOK aus dem dominanten präovulatorischen Follikel

## 2. Literatur

Bei dieser Methode können nur ein, gelegentlich zwei Follikel pro Zyklus genutzt werden. Dies hat den Hintergrund, dass die sogenannte Superovulation, das Heranreifen und die Ovulation mehrerer Follikel durch Gabe von beispielsweise eCG (equines Chorion Gonadotropin) oder FSH (folikelsimulierendes Hormon), beim Pferd bis heute keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefert (Übersicht bei Hinrichs 2012).

Trotzdem wird diese Methode der Eizellgewinnung beim Pferd häufig genutzt. Dazu wird der präovulatorische Follikel mittels Gonadotropin-Analagon-Gabe stimuliert. Vierundzwanzig Stunden nach der Injektion von hCG (humanes Chorion Gonadotropin) wird der präovulatorische Follikel mit einem Durchmesser von mindestens 35 mm gespült (Übersicht bei Galli et al. 2014). Die Eizellgewinnungsraten sind dabei mit 65 bis 80% deutlich höher als bei der Gewinnung immaturer Follikel, was damit zu begründen ist, dass der KOK bereits expandiert ist und sich in Vorbereitung auf die Ovulation bereits von der Follikelwand löst (Übersicht bei Hinrichs 2012).

### *2.2.1.2 Postmortale Eizellgewinnung*

Durch Einsatz von Eizellen aus postmortal gewonnenen Ovarien mit anschließender IVP und Embryotransfer können Trächtigkeiten bei Stuten etabliert und Fohlen generiert werden (Übersicht bei Hinrichs 2012).

Bei postmortal gewonnenen Ovarien besteht die Möglichkeit, die Oozyten mittels Aspiration aus den Follikeln zu gewinnen. Wiederum führt jedoch die starke Anheftung der Eizelle an die Follikelwand zu geringen Oozytengewinnungsraten: 31-46% (Hinrichs 1991).

Diese Art der Eizellgewinnung führt zu einem hohen Anteil an Oozyten aus atretischen Follikeln, da deren Anheftung an die Follikelwand weniger stark ausgeprägt ist. Gleichzeitig ist zu beobachten, dass hier der Anteil an gewonnenen Eizellen mit nur teilweise vorhandenen Kumuluszellen mit bis zu 53% sehr hoch ist (Dell'aquila et al. 2001). Eine Darstellung zu den unterschiedlichen Typen von KOK und deren Entwicklungsfähigkeit befindet sich im folgenden Kapitel.

Eine weitere Methode Eizellen zu gewinnen, bietet das Eröffnen der vorhandenen Follikel mittels Skalpell und deren Auskratzen unter Zuhilfenahme eines scharfen Löffels. Dies führt

## 2. Literatur

zum einen zu höheren Oozytengewinnungsraten und es wird zum anderen ein größerer Anteil an Oozyten mit intaktem Kumulus beobachtet (Hinrichs et al. 1993; Dell'aquila et al. 2001). In Bezug auf die Befruchtungsraten nach ICSI unterscheiden sich die Oozyten aus beiden Eizellgewinnungstechniken jedoch nicht. So zeigen bei aspirierten Oozyten 49% das Vorhandensein von zwei Pronuklei, zwei Polkörpern und normale Teilung, während es bei durch das Auskratzen der Follikel gewonnenen Eizellen 47% sind. Gleichzeitig ist jedoch der Anteil an Eizellen, welche eine abnormale Befruchtung aufweisen, in der Gruppe der aspirierten Eizellen höher, was sich mit der Annahme erklären lässt, dass in dieser Gruppe eine höhere Menge an Eizellen aus Follikeln geringerer Qualität gewonnen wird (Dell'aquila et al. 2001).

### 2.2.1.3 Kumulus-Oozyten-Komplexe

Zusammen mit den sie umgebenden Kumuluszellen bildet die Eizelle den Kumulus-Oozyten-Komplex (KOK). Die Unterteilung der Eizellen erfolgt anhand der Morphologie der sie umgebenden Kumuluszellen in kompaktem oder expandiertem Kumulus (siehe Abbildung 2 und 3). Ein kompakter Kumulus besitzt dicht aneinander liegende Zellen, eine glatte Oberfläche im Bereich des Kumulushügels und eine gleichmäßige oder granulierte Färbung. Bei expandiertem Kumulus zeigen die Zellen Anzeichen einer Auflockerung, wobei einzelne Zellen im Bereich des Kumulushügels sichtbar sind. Weiterhin weisen sie eine deutliche Granulierung auf (Hinrichs und Schmidt 2000; Hinrichs 2010; Hinrichs 2012).

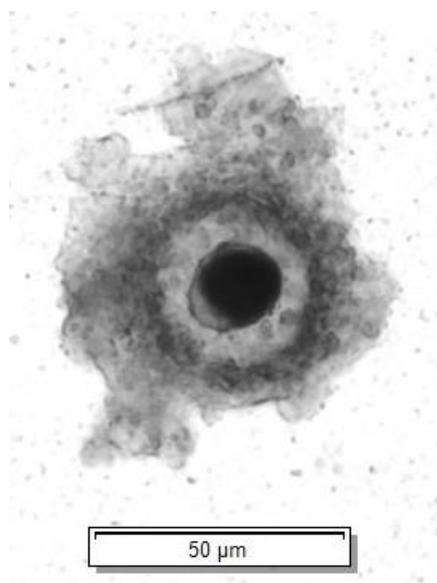
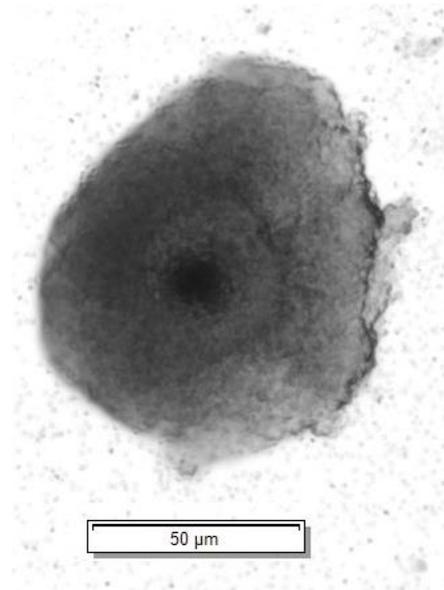


Abbildung 2: Pferdeoozyte mit expandiertem Kumulus

## 2. Literatur



*Abbildung 3: Pferdeoozyte mit kompaktem Kumulus*

Im Gegensatz zu anderen Tierarten (z.B. Rind) werden beim Pferd Eizellen mit kompaktem Kumulus mit geringer meiotischer Kompetenz, solche mit expandiertem Kumulus dahingegen mit hoher meiotischer Kompetenz assoziiert (Hinrichs und Williams 1997).

Hinrichs und Williams (1997) gehen davon aus, dass die geringere meiotische Kompetenz von Eizellen mit kompaktem Kumulus auf deren juvenilen Entwicklungszustand zurückzuführen ist. So stammen Oozyten mit kompaktem Kumulus von histologisch als lebensfähig klassifizierten Follikeln, während Eizellen mit expandiertem Kumulus größtenteils aus atretischen Follikeln gewonnen werden. Demnach besitzen Oozyten aus juvenilen, eigentlich lebensfähigen Follikeln noch nicht die Fähigkeit im In-vitro-Kultivierungssystem weiter zu reifen.

Verschiedene Studien nennen stark unterschiedliche Angaben, die Anteile der jeweiligen KOK an der Gesamtzahl an gewonnenen Eizellen betreffend. Dell'aquila et al. (2001) nennen dabei 54% mit kompaktem, 24% expandiertem und 22% mit nur teilweise vorhandenem Kumulus. Hinrichs und Williams (1997) kommen auf 45 % mit kompaktem, 52% mit expandiertem und 4% mit Teilkumulus (Hinrichs und Williams 1997). Morris beschreibt 60% mit expandiertem und 30% mit kompaktem Kumulus bei 10% degenerierten KOK (Übersicht bei Morris 2018). Weiterhin hängt der Anteil an den KOK-Gruppen stark von der Größe der Follikel ab, aus denen

## 2. Literatur

diese gewonnen werden. So steigt der Anteil an Eizellen mit kompakten Kumuluszellen mit zunehmender Follikelgröße (Hinrichs und Schmidt 2000). Auch der Zeitpunkt innerhalb der Follikelwelle, zu welchem die KOK gewonnen werden, hat einen Einfluss auf deren Morphologie und Entwicklungspotential. Oozyten vom Anfang der Follikelwelle stammen dabei zu höheren Anteilen aus lebensfähigen Follikeln (Vernunft et al. 2013).

### 2.2.2 In-vitro-Maturation

Im Rahmen der IVM wird bei den gewonnenen KOK der Abschluss der ersten meiotischen Reifeteilung, also das Ausschleusen des ersten Polkörpers, ausgelöst. Die Oozyte befindet sich nach der IVM in dem Zustand, der dem einer Eizelle kurz vor und während der Ovulation, entspricht. Dies bedeutet, dass die Eizelle befruchtungsfähig ist und das Eindringen oder Injizieren des Spermiums die zweite Reifeteilung auslösen kann.

Es werden verschiedene Medien genannt, in welchen die Maturation equiner Eizellen erfolgreich stattfinden kann. In der folgenden Tabelle sind Beispiele für verschiedene Medien genannt (Tabelle 1). Die Maturationsrate beschreibt dabei den Anteil an Eizellen, welche nach erfolgter Maturationsdauer im ausgewählten Medium erfolgreich die erste Reifeteilung abgeschlossen und den ersten Polkörper ausgeschleust haben.

## 2. Literatur

*Tabelle 1: Vergleich verschiedener Maturationsmedien beim Pferd*

Autoren	Zusammensetzung des Maturationsmediums	Maturationsraten
<b>Hinrichs et al. 2005</b> <b>Choi et al. 2007</b> <b>Ribeiro et al. 2008</b>	Tissue Culture Medium 199 (TCM199), Earles Salze, 10% fetales bovines Rinderserum (FBS), 5 mU/ml bovines follikelstimulierendes Hormon (FSH)	Bis zu 77%
<b>Altermatt et al. 2009</b>	TCM199, 10% fetales Kälberserum (FCS) 0,2 mM Pyruvat, 25 µg/ml Gentamycin	85%
<b>Lagutina et al. 2005</b>	TCM199, 10% FCS, 1 µl/ml Insulin, Transferin, Natriumselenit, 1 mM Natriumpyruvat, 50 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor, 100 ng/ml Insuline-like growth factor (IGF-1), 0,1 IU/ml FSH, 0,1 IU/ml luteinisierendes Hormon (LH)	57%
<b>Galli et al. 2007</b> <b>Leemans et al. 2015</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12), 15% Serumzusatz, Insulin, Transferin, Natriumselenit, 1 mM Natriumpyruvat, 50 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor, 100 ng/ml Insuline-like growth factor (IGF-1), 0,1 IU/ml FSH, 0,1 IU/ml luteinisierendes Hormon (LH)	51-60%
<b>Ambruosi et al. 2009</b>	TCM199, Earles Salzen, 4,43 HEPES, 0,1 g/l L-Glutamin, 33,9 mM Natriumbicarbonat, 2 mM Natriumpyruvat, 2,92 mM Calcium-L-Lactat-Pentahydrat, 50 mg/ml Gentamycin	85-90%

## 2. Literatur

Die Maturation erfolgt in der Regel in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> und bei einer Temperatur von 38,2 bis 39°C (Übersicht bei Hinrichs 2012).

Bei den Erfolgsraten der Maturation spielt die Beschaffenheit des Kumulus der KOK eine große Rolle. So zeigen beim Pferd, im Gegensatz zu anderen Spezies, Oozyten mit expandiertem Kumulus, welche zum Teil aus bereits atretischen Follikeln gewonnen werden, mit 65% deutlich höhere Maturationsraten als Eizellen mit kompaktem Kumulus, bei welchen diese nur bei 20% liegen (Hinrichs und Williams 1997; Übersicht bei Hinrichs 2010). Es gibt jedoch auch Studien, bei denen sich die Maturationsraten der beiden KOK-Gruppen nicht signifikant unterscheiden und bei 64-82% liegen (Dell'aquila et al. 2001).

Auch Oozyten mit nur partiell vorhandenem Kumulus besitzen die Fähigkeit zu reifen, jedoch sind die Maturationsraten geringer als bei Eizellen mit geschlossener Kumulusschicht. Dem zugrunde liegt die Annahme, dass diese Eizellen aus Follikeln stammen, welche sich in einem fortgeschrittenen Stadium der Atresie befinden oder aus sehr juvenilen Follikeln, was eine geringe meiotische Kompetenz zur Folge haben kann (Dell'aquila et al. 2001).

Auch die optimale Dauer der Maturation hängt vom Kumulus-Typ der Eizelle ab. Dabei liegt das Optimum für Eizellen mit expandiertem Kumulus bei 24 bis 30 Stunden und für solche mit kompaktem Kumulus bei 30 bis 36 Stunden. Es werden also in der Regel 30 Stunden als Maturationsdauer gewählt, da diese Zeitspanne für beide KOK-Gruppen im optimalen Bereich liegt (Hinrichs et al. 2005; Übersicht bei Hinrichs 2012).

Das Pferd besitzt einen saisonal polyöstrischen Zyklus, wobei die Tageslichtlänge eine wichtige Rolle bei der Regulation dieser Abläufe spielt. Die Paarungssaison findet, da es sich beim Pferd um einen sogenannten long-day-breeder handelt, auf der Nordhalbkugel von April und Oktober statt. Hinrichs und Schmidt (2000) konnten jedoch nachweisen, dass weder die Follikelzahl noch die Reifungsraten der verschiedenen KOK-Typen von der Jahreszeit abhängen.

### 2.2.3 In-vitro-Fertilisation

Unter der klassischen Methode der In-vitro-Fertilisation wird im Allgemeinen die Ko-Kultivierung von Spermien und Eizellen verstanden. Diese konnte jedoch beim Pferd bisher

## 2. Literatur

nicht wiederholt erfolgreich eingesetzt werden. So konnten bislang nur zwei Fohlen nach der IVF in vivo gereifter Eizellen generiert werden (Palmer et al. 1991; Bézard et al. 1992). Als Grund hierfür wird die Unfähigkeit der Spermien, die Eizelle in vitro zu penetrieren, vermutet (Alm et al. 2001). Physiologisch muss das Spermium im weiblichen Genitaltrakt verschiedene Veränderungen erfahren, um die Kompetenz zur Befruchtung der Oozyte zu erhalten. Dieser Vorgang wird als Kapazitation bezeichnet. Dabei wird der Glykoproteinüberzug des Spermiums verändert, so dass beim Kontakt mit der Oozyte die sogenannte Akrosomreaktion stattfinden kann, welche für die Penetration der Zona pellucida notwendig ist. Diese Vorgänge konnten beim Pferd bislang nicht effektiv in vitro ausgelöst werden (Übersicht bei Salamone et al. 2017).

Es wurden unter anderem Heparin und Calciumionophor eingesetzt, um die Kapazitation des Spermiums zu triggern, wobei die Erfolgsraten bei allen Forschergruppen, die sich mit der klassischen IVF beim Pferd beschäftigten, lediglich zwischen 0 und 30% lagen (Palmer et al. 1991; Dell'aquila et al. 1997; Alm et al. 2001; Leemans et al. 2016).

Leemans et al. (2016) waren der Meinung, dass der Einfluss des Ovidukts eine entscheidende Rolle bei der Spermienkapazitation und auch der Befruchtung spielt. Sie stützten sich dabei auf die Tatsache, dass die IVF erfolglos war, auch dann, wenn in vivo maturierte Eizellen genutzt wurden. Gleichzeitig konnte aber der Transfer in vitro gereifter Eizellen in das Ovidukt einer besamten Stute zu einer Embryonalentwicklung führen (Übersicht bei Hinrichs 2012). Dies legte den Verdacht nahe, dass im genutzten Medium bei der IVF entscheidende Ovidukt-Faktoren fehlen, die dem Spermium die Penetration der Zona pellucida und das Eindringen in die Oozyte ermöglichen. Bislang gelang es jedoch noch nicht, die Oviduktumgebung in vitro zufriedenstellend darzustellen (Suarez 2002; Leemans et al. 2016).

McPartlin et al. (2009) versuchten durch die Inkubation von Spermien und Eizelle mit Procain eine Kapazitation der Spermien zu erreichen und konnten Teilungsraten von über 60% beobachten (McPartlin et al. 2009). Es stellte sich jedoch heraus, dass Procain lediglich die parthenogenetische Aktivierung (frühembryonale Entwicklung der Eizelle ohne paternalen Beteiligung; auf die parthenogenetische Aktivierung wird in Kapitel 2.3.2 noch im Detail eingegangen) der Oozyten auslöst, jedoch keine tatsächliche Befruchtung der Eizellen

## 2. Literatur

stattgefunden hat. Eizellen, welche sich unter Einfluss von Procain geteilt hatten, wiesen keinen zweiten Polkörper auf, was ein Scheitern der physiologischen Befruchtung impliziert, da die zweite meiotische Reifeteilung nicht stattgefunden hat. Außerdem bildete sich bei diesen Oozyten kein männlicher Vorkern aus und es fand keine DNA-Replikation statt (Leemans et al. 2015).

Eine weitere Möglichkeit der In-vitro-Befruchtung von Eizellen stellt die sogenannte Partial Zona Dissection (PZD), also eine teilweise Entfernung der Zona pellucida, dar. Hier konnte zwar eine Verbesserung der Spermienpenetration beobachtet werden, die Methode führt aber zu hohen Raten an Polyspermie (Eindringen mehrerer Spermien in die Eizelle), so dass sie nicht als Alternative in Frage kommt (Choi et al. 1994; Dell'aquila et al. 1996).

Zu den Methoden der IVF gehört ebenfalls die sogenannte Sub-Zonal Insertion (SUZI), also die Injektion des Spermiums nicht direkt ins Zytoplasma der Eizelle, sondern lediglich unter die Zona pellucida. Hier konnten beim Pferd jedoch lediglich Teilungsraten von 6% beobachtet werden (Cochran et al. 2000).

Erst die Etablierung der ICSI führte zu erhöhten und wiederholbaren Befruchtungsraten bei der IVF equiner Eizellen (Dell'aquila et al. 2001).

### 2.2.4 In-vitro-Kultivierung

Es können die folgenden Kultivierungssysteme unterschieden werden, für welche anschließend Beispiele genannt werden:

Zum einen können Medien genutzt werden, bei denen unterschiedliche Proteinquellen und Hormone (z.B. FHS oder hCG) zugesetzt wurden. Weiterhin können Ko-Kultivierungssysteme verwendet werden, bei welchen somatische Zellen die Umgebung für die Entwicklung der befruchteten Oozyte bieten sollen.

Außerdem können Kultivierungssysteme unterschieden werden, bei denen die befruchtete Oozyte während der gesamten Entwicklungsphase in einem Medium verbleibt und solche, bei denen ein Wechsel des Mediums stattfindet.

Es wurden bislang viele verschiedene Kultivierungsmedien eingesetzt, mit dem Ziel, optimale Bedingungen für den Embryo in dessen früher Teilungsphase zu schaffen. Genutzt wurden

## 2. Literatur

unter anderem G1.2 (Choi et al. 2002), Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) sowie CZB (Chatot-Ziomek-Bavister-Medium; Choi et al. 2004b).

Weiterhin untersuchten verschiedene Arbeitsgruppen die Ko-Kultivierung mit somatischen Zellen, so beispielsweise mit epithelialen Zellen des Ovidukts (Battut et al. 1991), Kumuluszellen (Li et al. 2001) oder Granulosazellen (Rosati et al. 2002). Bei den meisten dieser Kultivierungssysteme konnten jedoch Blastozystenraten von lediglich 4 bis 16% verzeichnet werden.

Ein Vergleich dieser in vitro erzielten Ergebnisse mit den Blastozystenraten für Embryonen, bei denen nach der ICSI die Übertragung in das Ovidukt einer Stute erfolgte, zeigt, dass die Optimierung der Kultivierungssysteme noch weiter ausgebaut werden muss. So liegen die Blastozystenraten bei der In-vivo-Kultivierung bei bis zu 36% (Choi et al. 2004b).

Dies lässt den Schluss zu, dass geringe Raten der Embryonalentwicklung nicht auf einen Mangel an Entwicklungskompetenz der ICSI-befruchteten Eizellen, sondern vielmehr auf eine Unzulänglichkeit des Kultivierungssystems zurück zu führen sind (Dell'aquila et al. 2001).

Dafür spricht auch, dass mittels ICSI befruchtete Oozyten, welche sofort nach der Injektion in das Ovidukt eines Empfängertieres verbracht wurden, höhere Raten der Embryonalentwicklung erreichten als solche, die zuvor 26 bis 28 Stunden kultiviert wurden (McKinnon et al. 2000).

Das Kultivierungsmedium, welches bislang beim Pferd die besten Ergebnisse erzielte, ist modifiziertes DMEM/F-12. Mit diesem Medium konnten reproduzierbare Blastozystenraten von üblicherweise 25-35% bis hin zu 42% erreicht werden (Choi et al. 2004b, 2006, 2007; Hinrichs et al. 2005; Ribeiro et al. 2008).

DMEM/F-12 wurde für die Kultivierung von Hamsteroviduktzellen entwickelt und enthält viele Komponenten, von denen nachgewiesen wurde, dass sie nachteilig für die embryonale Entwicklung verschiedener Spezies sind, wie z.B. eine hohe Phosphatkonzentration (Lane und Gardner 2007). Der Hauptunterschied zwischen DMEM/F-12 und den anderen erwähnten Medien besteht in der höheren Glukosekonzentration von 17,5 mM des erstgenannten, welches für die Entwicklung equiner Embryonen förderlich zu sein scheint (Übersicht bei Hinrichs 2012; Choi et al. 2015).

## 2. Literatur

Im Gegensatz zum Pferd wirkt sich eine hohe Glukosekonzentration im Kultivierungsmedium bei anderen Spezies (z.B. Mensch und Rind) nachteilig auf die Embryonenentwicklung aus (Conaghan et al. 1993; Matsuyama et al. 1993). Bei vielen Spezies ändert sich die Art der Energiegewinnung während der Embryonalentwicklung. Während der frühen Teilungsphase werden hier hauptsächlich Laktat und Pyruvat verstoffwechselt, was durch eine hohe Glukosekonzentration (<3-5 mM) und eine dadurch ausgelöste Aktivierung der Glykolyse negativ beeinflusst werden könnte. Erst mit der Entwicklung zur Morula stellt sich der Stoffwechsel des Embryos auf die Glykolyse um (Rieger et al. 1992). Auch bei in vivo produzierten Pferdeembryonen konnte eine ähnliche Beobachtung gemacht werden: Während der Embryo im Morula-Stadium größtenteils Pyruvat und Laktat als Energiequelle nutzt, verstoffwechselt die expandierte Blastozyste hauptsächlich Glukose (Lane et al. 2001). Daher bestehen einige In-vitro-Kultivierungssysteme aus zwei verschiedenen Stufen:

1. Ein Medium mit niedriger Glukosekonzentration zur Unterstützung der frühen Teilungsphase des Embryos bis zum Morula-Stadium
2. Ein Medium mit hoher Glukosekonzentration zur Unterstützung der Blastozystenentwicklung

Dabei konnten beim Pferd bei diesem System zunächst höhere Zellzahlen des Embryos an Tag 4 der Entwicklung beobachtet werden (Choi et al. 2004a). Seit sich die Blastozystenentwicklungsraten jedoch grundsätzlich durch die Nutzung von DMEM/F-12 als alleiniges Kultivierungsmedium verbessert haben, können durch den Einsatz eines zweistufigen Kultivierungssystems keine Vorteile mehr beobachtet werden (Choi et al. 2004a).

### 2.3 Artifiziale Aktivierung

#### 2.3.1 Grundlagen der Aktivierung

Unbefruchtete Eizellen, welche sich in der Metaphase II (MII) befinden, bleiben solange in diesem sogenannten meiotischen Arrest bis ein Aktivierungsstimulus auf sie einwirkt.

Die Aktivierung der Oozyte im Rahmen der Befruchtung umfasst genau definierte, morphologische und biochemische Veränderungen, welche für eine normale Entwicklung des Embryos essenziell sind. Dabei finden bestimmte Abläufe schon Sekunden bis Minuten nach der Befruchtung statt, während andere Stunden benötigen. Im Folgenden wird auf einzelne Faktoren eingegangen, welche für die Aktivierung im Rahmen der ICSI von Bedeutung sind.

## 2. Literatur

Es wird davon ausgegangen, dass eine der wichtigsten Aufgaben des Spermiums in der Aktivierung bestimmter Mechanismen liegt, welche der Oozyte die Weiterentwicklung aus der MII-Phase ermöglichen.

So bringt das Spermium im Rahmen der Befruchtung eine spermien-spezifische Phospholipase C (PLC $\zeta$ ) in die Eizelle ein, welche intrazelluläre Kalziumoszillationen initiiert (Knott et al. 2005). Diese Oszillationen wiederum induzieren weitere Schritte im Rahmen der Eizellaktivierung, so die Exozytose von kortikalen Granula, die Verhinderung von Polyspermie, das Verlassen des MII-Arrest und schließlich die Ausbildung der Vorkerne (Schultz und Kopf 1995; Wakai und Fissore 2013).

Eine wichtige Rolle spielt hier der Metaphase Promoting Factor, kurz MPF, welcher von der Eizelle gebildet wird. Ist dieser in aktiver Form vorhanden, so verbleibt die Eizelle in der MII-Phase und somit im meiotischen Arrest. Die zweite meiotische Reifeteilung kann nicht stattfinden und der zweite Polkörper nicht ausgeschleust werden. Ein Anstieg des intrazellulären Kalziumlevels führt zu einer Down-Regulierung von MPF und somit zum Aufheben des meiotischen Arrests. Die zweite meiotische Reifeteilung kann nun stattfinden und der zweite Polkörper kann ausgeschleust werden.

### 2.3.2 Parthenogenese

Bei der Parthenogenese handelt es sich um eine Fortpflanzungsstrategie, welche von Insekten, wie Fliegen, Bienen und Ameisen, aber auch Vertebraten, beispielsweise Eidechsen, Fischen und Amphibien genutzt wird. In diesem Fall ist kein Spermium nötig, um die Embryonalentwicklung der Eizelle auszulösen und folglich kann das weibliche Tier Nachkommen ohne paternalen Anteil generieren (Crews et al. 1986; Hipp und Atala 2004).

Im Gegensatz dazu stellt die Parthenogenese beim Säugetier keine natürliche Fortpflanzungsform dar. Das Fehlen des paternalen Genoms führt zu einer abnormen Regulation der Zelldifferenzierung und -teilung (Übersicht bei Kaufman 2018).

Trotzdem ist es möglich, mithilfe einer artifiziellen Aktivierung die frühembryonale Entwicklung von Eizellen verschiedener Säugetierspezies (unter anderem Maus, Rind und Pferd) auszulösen (McGrath und Solter 1984; Hinrichs et al. 2007; Fernandes et al. 2014).

Das alleinige Vorhandensein von 2 Vorkernen oder einer Teilung der Eizelle ist folglich kein Nachweis für eine erfolgreich stattgefundenen Befruchtung, da die parthenogenetische

## 2. Literatur

Aktivierung einer unbefruchteten Eizelle in diesen Fällen nicht von einer tatsächlich befruchteten Eizelle unterschieden werden kann. Darum ist es bei der Beurteilung vermeintlicher Embryonen wichtig, Faktoren wie das Ausschleusen des zweiten Polkörpers oder das Vorhandensein des Spermienmittelstücks zu Rate zu ziehen (Leemans et al. 2016).

Die parthenogenetische Entwicklung und die verschiedenen Methoden im Rahmen der artifiziellen Aktivierung, welche diese auslösen, spielen eine große Rolle nicht nur im Bereich der ICSI, sondern auch beispielsweise bei der Bereitstellung von Material für die Grundlagenforschung der ART (assistieren Reproduktionstechniken) oder im Bereich des Klonens (Übersicht bei Kaufman 2018).

### 2.3.3 Nachweis der Mitochondrien im Spermienmittelstück

Wie bereits erwähnt, kann eine parthenogenetische Aktivierung eine frühembryonale Entwicklung der Eizelle zur Folge haben. Es ist folglich wichtig, eine Nachweismethode zu nutzen, mithilfe derer die parthenogenetische Aktivierung einer unbefruchteten Eizelle von einer tatsächlich befruchteten Eizelle unterschieden werden kann.

Eine Möglichkeit ist es, das Vorhandensein des Spermienmittelstückes nachzuweisen, um diesem den männlichen Vorkern zuordnen zu können. Die Mitochondrien, welche sich im Spermienmittelstück befinden und welche beispielsweise bei der Maus bis zum Morula-Stadium in der Eizelle nachweisbar sind, können dazu angefärbt werden (Luo und Sun 2013). Dazu wird vor Durchführung der ICSI der Lebendfarbstoff MitoTracker® Green FM eingesetzt, welcher die Mitochondrien im Spermienmittelstück anfärbt. Die Zygote kann nach der erfolgten Befruchtung zusätzlich mit Hoechst 33342 behandelt werden, welches die Polkörper und Pronuclei anfärbt. Eine Kombination beider Färbungen 18 Stunden nach ICSI ermöglicht nun das Zuordnen eines Vorkerns zum Spermienmittelstück und somit den Nachweis der paternalen Beteiligung im Embryo (Leemans et al. 2015).

Sutovsky et al. (1996) konnten beim Rind nachweisen, dass die Färbung der Spermien mit dem MitoTracker® Green FM keinen Einfluss auf die Befruchtung oder die Embryonalentwicklung hat (Befruchtungsraten von 90,7%). Auch beim Pferd konnten bislang gute

## 2. Literatur

Forschungsergebnisse mit dieser Färbung erzielt und kein negativer Einfluss beobachtet werden (87% Vorkernbildung nach der ICSI; Leemans et al. 2015)

### 2.3.4 Unterscheidung zwischen „haploider und diploider Aktivierung“

Im Rahmen der artifiziellen Aktivierung ist es wichtig, zwischen der „haploiden“ und der „diploiden“ Aktivierung der Eizelle zu unterscheiden.

Bei der „haploiden“ Aktivierung (siehe Abbildung 4) folgt dem Aktivierungsreiz das Ausschleusen des zweiten Polkörpers, so dass der haploide Chromosomensatz in der Oozyte zurückbleibt. Durch die Injektion des Spermiums bei der ICSI, welches ebenfalls einen haploiden Chromosomensatz besitzt, entsteht so eine diploide Zygote. Diese besitzt nun einen heterozygoten Chromosomensatz, welcher aus einem maternalen und einem paternalen Anteil besteht. Dies entspricht auch den physiologischen Gegebenheiten bei der Befruchtung (siehe Abbildung 5; Schnorr und Kressin 2001).

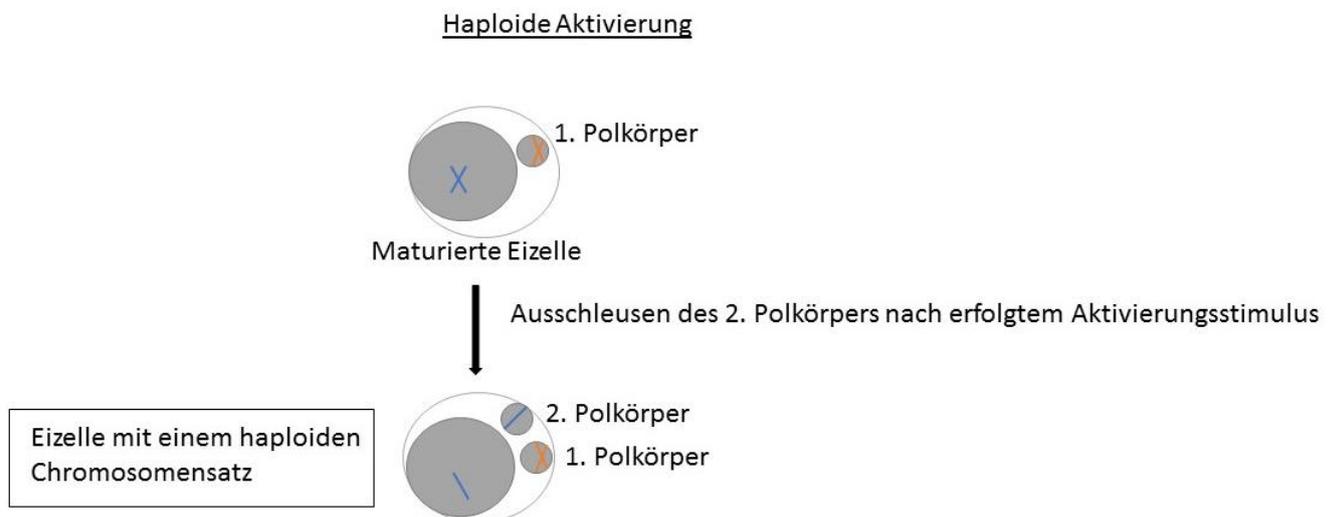
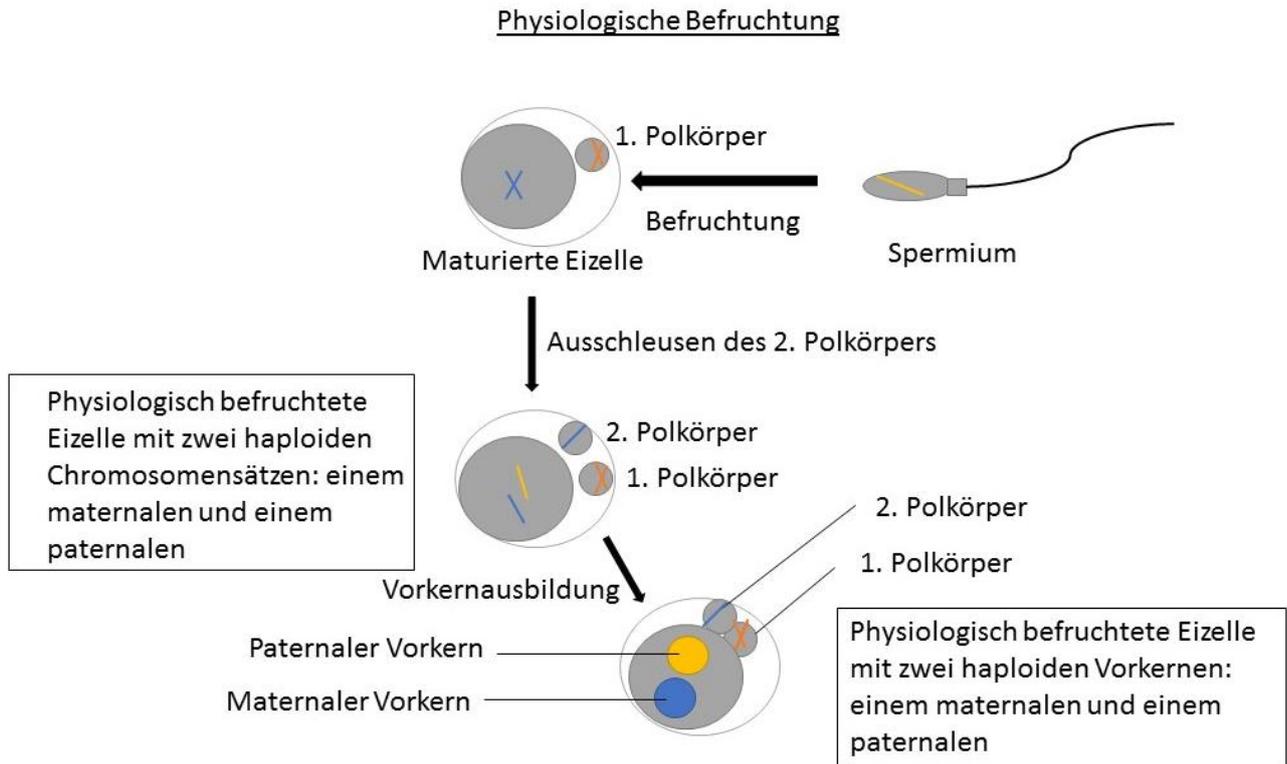


Abbildung 4: Haploide Aktivierung

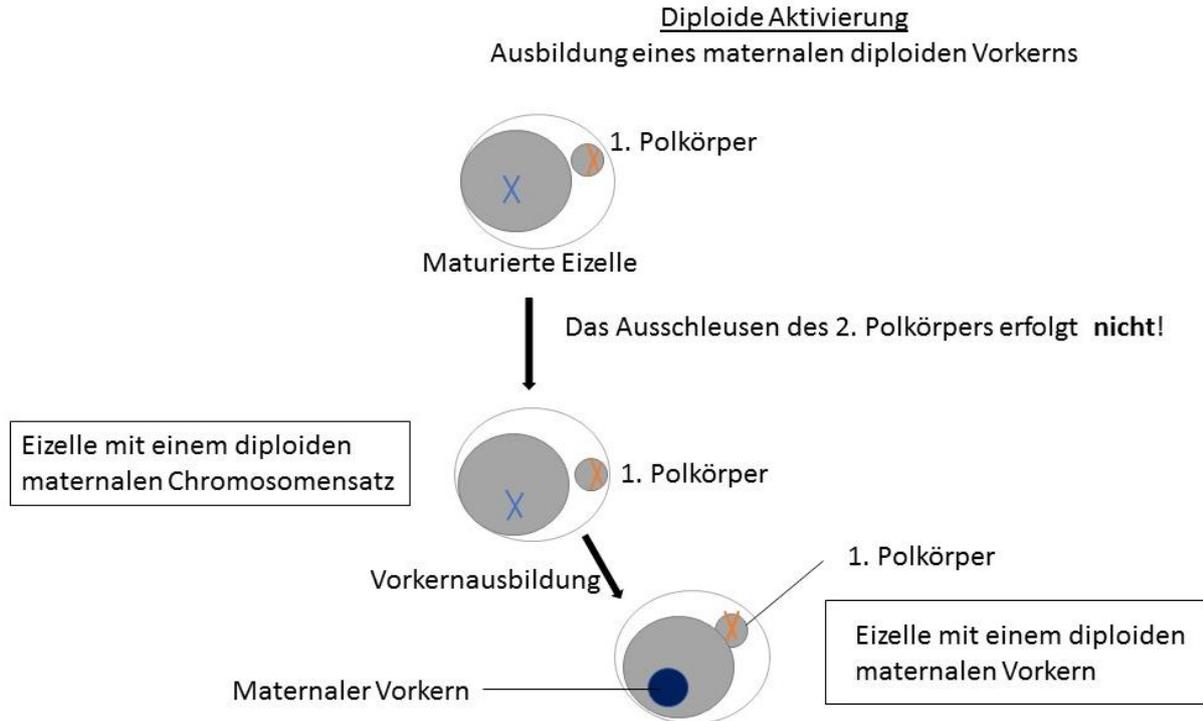


*Abbildung 5: Physiologische Befruchtung*

Im Gegensatz dazu unterbleibt bei der „diploiden“ Aktivierung das Ausschleusen des zweiten Polk6rpers. In der Eizelle verbleibt also ein diploider maternaler Chromosomensatz. Grund daf6r sind Aktivierungsmethoden, welche die Trennung der beiden Chromosomens6tze und somit das Ausschleusen des zweiten Polk6rpers verhindern. Ein Beispiel hierf6r ist 6-Dimethyaminopurin, kurz 6-DMAP, auf welches im Kapitel „Artifizielle Aktivierung boviner Oozyten“ n6her eingegangen wird (Liu et al. 1998).

Aus diesem diploiden Chromosomensatz kann sich nun ein diploider maternaler Vorkern bilden (siehe Abbildung 6).

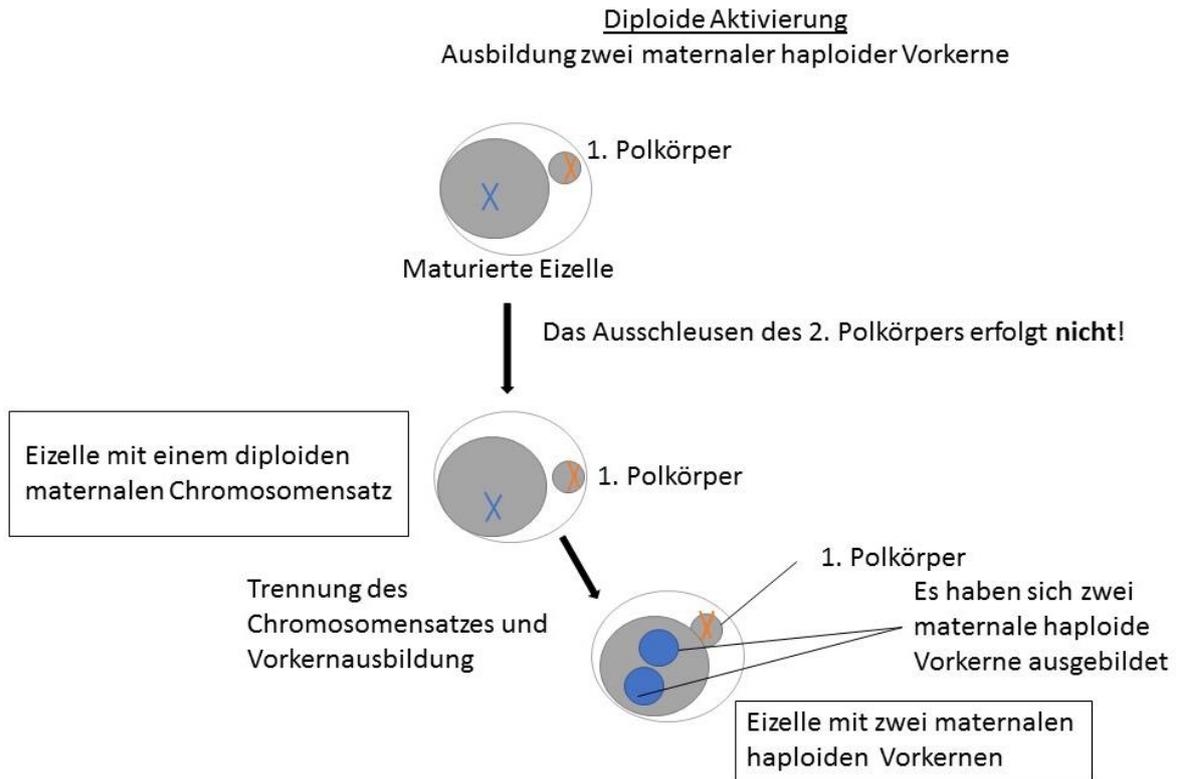
## 2. Literatur



*Abbildung 6: Diploide Aktivierung – Ausbildung eines maternalen diploiden Vorkerns*

Wenn sich die beiden Chromosomensätze der Eizelle doch noch trennen ist es möglich, dass sich zwei haploide maternale Vorkerne ausbilden, diese enthalten dann nur genetische Informationen der Oozyte (siehe Abbildung 7; Kaufman und Sachs 1976; Übersicht bei Bos-Mikich et al. 2016). Sowohl „haploid“ als auch „diploid“ aktivierte Eizellen können sich ohne paternale Beteiligung teilen und sich bis zum Blastozystenstadium weiterentwickeln (Lagutina et al. 2004).

Gewünscht für die ICSI ist die „haploide“ Aktivierung der Eizelle im Rahmen oder im Anschluss an die ICSI, so dass der zweite Polkörperchen ausgeschleust wird und die Syngamie des maternalen und paternalen haploiden Chromosomensatzes stattfinden kann.



*Abbildung 7: Diploide Aktivierung – Ausbildung zwei maternalen haploider Vorkerne*

### 2.3.5 Möglichkeiten der artifiziellen Aktivierung

Zwar gibt es Spezies (z.B. Mensch), bei denen die alleinige Penetration mit der Injektionspipette und der Injektion des Spermiums die Aktivierung der Eizelle auslöst, bei vielen anderen (so auch beim Rind) muss jedoch ein weiterer Stimulus auf die Eizelle einwirken, damit der meiotische Arrest aufgehoben werden kann (Palermo et al. 1992).

Um die Aktivierung der Reifungsprozesse der Oozyte auszulösen, können verschiedene Protokolle genutzt werden, welche sich in zwei Gruppen einteilen lassen:

1. Mechanische Stimuli
2. Chemische Stimuli

Viele der genannten Protokolle triggern dabei die Freisetzung von Kalzium in der Eizelle und führen so zu einer Down-Regulierung von MPF und folglich dem Aufheben des meiotischen Arrests (Übersicht bei Salamone et al. 2017).

## 2. Literatur

Verschiedene Spezies reagieren dabei unterschiedlich erfolgreich auf die genannten Methoden der Aktivierung. Beispielsweise werden beim Schaf chemische Aktivierungsstimuli genutzt, während beim Schwein der Einsatz sowohl chemischer als auch mechanischer Aktivierung möglich ist (Probst und Rath 2003; Katayama et al. 2007; Pereyra-Bonnet et al. 2008). Auf die artifizielle Aktivierung bei Rind und Pferd wird in den folgenden beiden Kapiteln eingegangen.

Zu den mechanischen Stimuli gehört das Piezo-Element, welches 1995 zum ersten Mal bei der ART in der Maus angewandt wurde und dort zu signifikant höheren Erfolgsraten im Vergleich zu den bislang genutzten Protokollen führte (Kuretake et al. 1996).

Das Piezo-Element gibt die Piezo-Impulse als minimale Vibrationen an die Injektionspipette weiter. Diese Impulse führen bei der Penetration des Oolemmas der Eizelle zur Freisetzung von Kalzium in der Eizelle und aktivieren diese somit (Loi et al. 1998; Fernandes et al. 2014).

Im Rahmen der chemischen Aktivierung wurden schon zahlreiche Stoffe zur Aktivierung von Eizellen genutzt. Nachfolgend werden einige Beispiele und die jeweilige Wirkung der Chemikalien aufgezeigt (siehe Tabelle 2).

*Tabelle 2: Chemikalien zur artifiziellen Aktivierung*

Autoren	Chemikalie	Wirkungsweise
<b>Cuthbertson et al. 1981</b>	Strontiumchlorid	Freisetzung von Calcium aus zytoplasmatischen Speichern
<b>Loi et al. 1998</b>	Calcium-Ionophor	Influx von Calcium aus dem Extrazellulärmedium
<b>Loi et al. 1998</b>	Äthanol	Freisetzung von Calcium aus zytoplasmatischen Speichern und Influx von Calcium aus dem Extrazellulärmedium
<b>Loi et al. 1998</b>	Ionomycin	Freisetzung von Calcium aus zytoplasmatischen Speichern und Influx von Calcium aus dem Extrazellulärmedium
<b>Liu und Yang 1999</b>	Cycloheximid	Inhibition der Proteinsynthese (von MPF)
<b>Liu und Yang 1999</b>	6-DMAP	Inhibition der Phosphorylierung (von MPF)
<b>Choi et al. 2006</b>	Roscovitin	Verhinderung der Bindung von Adenosintriphosphat (ATP) an MPF

Einige der genannten Chemikalien werden auch in Kombination zur Aktivierung der Eizelle eingesetzt. So ist es sinnvoll, zunächst eine Aktivierungsmethode einzusetzen, welche einen Anstieg von Kalzium (aus intra- und/oder extrazellulären Speichern) und folglich die Down-Regulierung von MPF zur Folge hat. Im Anschluss daran kann dann eine Chemikalie eingesetzt werden, welche den Wiederanstieg von MPF hemmt, zum Beispiel durch die Hemmung der Proteinsynthese oder der Phosphorylierung (Rho et al. 1998; Ock und Rho 2008).

### *2.3.5.1 Artifiziale Aktivierung equiner Oozyten*

Das Piezo-Element, welches zu den mechanischen Stimuli zählt, brachte in der Durchführung der ICSI beim Pferd einen großen Fortschritt mit sich. Es wurde 2002 eingeführt und zeitgleich mit seinem Einsatz konnten höhere Teilungsraten (>80%) nach der ICSI festgestellt werden (Choi et al. 2002; Galli et al. 2007). Salgado et al. (2018) konnten nachweisen, dass die Blastozystenqualität nach konventioneller ICSI niedriger ist, als nach ICSI mittels Piezo-Elements.

## 2. Literatur

Die minimalen Vibrationen durch das Piezo-Element ermöglichen das Durchdringen der beim Pferd sehr dicken Zona pellucida, welches mit herkömmlichen Injektionspipetten nur schwer möglich ist (Galli et al. 2014).

Für die ICSI mit Einsatz des Piezo-Elements kann eine stumpfe Mikrokapillare mit einem 0° Winkel genutzt werden. Dabei muss die Kapillare zur Beschwerung mit einer Flüssigkeit, so zum Beispiel Quecksilber oder Fluorinert, befüllt werden. Außerdem muss darauf geachtet werden, die Intensität, die Geschwindigkeit (Frequenz) und die Anzahl der Piezo-Impulse so zu wählen, dass die Übertragung der Impulse als minimale Vibrationen an die Mikrokapillare ohne Verluste gewährleistet ist. Es sollen außerdem laterale Vibrationen vermieden werden; erwünscht ist die axillare Oszillation der Mikrokapillare (Boiani 2012).

### *2.3.5.2 Artifizielle Aktivierung boviner Oozyten*

Eine Schwierigkeit im Rahmen der bovinen ICSI stellt die Aktivierung der Eizellen dar. Bovine Eizellen werden nicht durch die alleinige Penetration mit der Injektionspipette und der Injektion des Spermiums aktiviert. Stattdessen benötigen sie einen weiteren Aktivierungsreiz, damit die zweite meiotische Reifeteilung stattfinden kann.

Beim Rind wurden zahlreiche Aktivierungsprotokolle genutzt, um den Erfolg im Rahmen der ICSI zu maximieren. Im Folgenden findet sich eine Übersicht mit einigen Beispielen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Aktivierungsprotokolle beim Rind

Veröffentlichung	Stimulus	Zeitpunkt/Dauer	Haploid/Diploid
<b>Bhak et al. 2006</b>	Ionomycin	5 min	Haploid
	Ionomycin	5 min	Diploid
	6-DMAP	3 h	
	Ionomycin Cycloheximid	5 min 3 h	Haploid
<b>Ock und Rho 2008</b>	Ionomycin	5 min	Haploid
	Ionomycin Cycloheximid	5 min 5 h	Haploid
	Ionomycin Cycloheximid + Cytochalasin B	5 min 5h	Diploid
	Ionomycin	5 min	Haploid
<b>Rho et al. 1998</b>	Ionomycin	4 Mal je 30 min	Haploid
	Ionomycin	5 min	Diploid
	6-DMAP	3 h	
	Ionomycin	5 min	Haploid
	TALP	3 h	
6-DMAP	3 h		

Auch Wang et al. (2008) untersuchten verschiedene Aktivierungsprotokolle (einzelne Aktivierung oder Kombinationen aus Ionomycin, Calciumionophor, Ethanol, Strontium und 6-DMAP) von Rindereizellen nach der ICSI im Hinblick auf die Ploidie der entstandenen Blastozysten. Dabei zeigte sich, dass der Prozentsatz an aktivierten Eizellen, welche einen haploiden Chromosomensatz aufweisen, bei einer Aktivierung mithilfe von Ionomycin in Kombination mit 6-Dimethylaminopurin (6-DMAP) im Vergleich am höchsten ist. Außerdem stellte sich in den Ergebnissen dar, dass eine Aktivierung boviner Oozyten mit nur einer einzelnen stimulierenden Chemikalie unzureichend ist (Wang et al. 2008).

6-DMAP ist ein sogenannter Proteinsyntheseinhibitor und verhindert den erneuten Anstieg von MPF in der Eizelle (Ock und Rho 2008). Gleichzeitig sorgt 6-DMAP jedoch für eine diploide Aktivierung und verhindert somit die Trennung der beiden Chromosomensätze und das

## 2. Literatur

Ausschleusen des zweiten Polkörpers (Liu et al. 1998). Folglich sollte 6-DMAP im Rahmen der Aktivierung für die ICSI erst dann eingesetzt werden, wenn der zweite Polkörper bereits ausgeschleust und ein haploider maternaler Chromosomensatz vorhanden ist (Wang et al. 2008).

Dies bestätigen die Ergebnisse von Rho et al. (1998), welche nachweisen konnten, dass die Kombination aus Ionomycin und 6-DMAP dann erfolgreich eine haploide Aktivierung zur Folge hat, wenn zwischen den beiden Aktivierungsschritten eine Pause von 3 Stunden in einem anderen Medium liegt, welches keinerlei Einfluss auf die Entwicklung der Eizelle hat. Die Eizelle hat in diesem Zeitraum die Möglichkeit, den zweiten Polkörper auszuschleusen.

Die ICSI unter Einsatz des Piezo-Elements wurde beim Rind das erste Mal 1998 durchgeführt. Hier konnten Befruchtungsraten von 72% festgestellt werden; zudem erwies sich in diesem Versuch die Aktivierung mittels Piezo erfolgreicher als die chemische Aktivierung der Oozyte (Katayose et al. 1999).

### 2.3.6 Mikrotubuläre Veränderungen im Rahmen der artifiziellen Aktivierung

Der Spindelapparat ist für die Trennung und Verteilung der Chromatiden in der Zellteilung verantwortlich. Er setzt sich aus Spindelfasern zusammen, welche jeweils aus Bündeln von Mikrotubuli aufgebaut sind.

Der Aufbau der Spindel beginnt in der Prophase des Zellzyklus. Organisiert wird dieser Ablauf durch die Zentrosomen, welche auch als Organisationszentren der Mikrotubuli bezeichnet werden und wiederum aus jeweils zwei Zentriolen bestehen (Glover et al. 1993).

Nach der Befruchtung durch das Spermium organisiert sich der Spindelapparat der Eizelle und sorgt für das Ausschleusen des zweiten Polkörpers und die Ausbildung des maternalen Vorkerns (Avidor-Reiss und Fishman 2018). Parallel dazu bildet sich ein Mikrotubuli-Netzwerk ausgehend vom Mittelstück des Spermiums aus. Dabei füllt dieses zum Zeitpunkt des Aufeinandertreffens der beiden Vorkerne das gesamte Zytoplasma aus und bildet schließlich im Rahmen der Syngamie den Spindelapparat aus. Bei

## 2. Literatur

parthenogenetisch aktivierten Eizellen hingegen, umgibt das sich ausbildende mikrotubuläre Netzwerk den weiblichen Vorkern (Tremoleda et al. 2003b).

Diese Ergebnisse von (Tremoleda et al. 2003b) weisen nach, dass das Zentrosom beim Pferd, ebenso wie bei anderen Spezies, so zum Beispiel beim Rind, vor allem über den paternalen Anteil eingebracht wird (Navara et al. 1994). Es konnte aber gleichzeitig bewiesen werden, dass die unbefruchtete Eizelle diese Aufgabe übernimmt, wenn kein Spermium vorhanden ist, jedoch ein Aktivierungsreiz vorliegt.

### 2.4 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)

#### 2.4.1 Geschichte der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion

Die intrazytoplasmatische Spermieninjektion, kurz ICSI, beschreibt die Methode, eine Eizelle durch die direkte Injektion eines einzelnen Spermiums ins Ooplasma zu befruchten.

Dazu wird zunächst ein einzelnes Spermium immobilisiert und dessen Zellmembran aufgebrochen. Dies geschieht entweder durch einen Schlag mit der Injektionspipette auf den Spermischwanz oder mithilfe des Piezo-Elements, wobei dessen minimale Vibrationen ebenfalls an den Spermischwanz weitergeleitet werden.

Anschließend wird das Spermium in die Injektionspipette aufgenommen. Das Durchdringen der Zona pellucida und die Penetration des Oolemm erfolgen entweder durch eine spitze Injektionspipette oder aber wiederum durch die mechanischen Impulse des Piezo-Elements. Um sicherzugehen, dass das Oolemm tatsächlich penetriert wurde, wird etwas Ooplasma in die Injektionspipette aspiriert. Sobald sichergestellt ist, dass sich die Injektionspipette im Oolemm befindet, wird das Spermium injiziert.

Der erste Bericht zur der Nutzung der ICSI wurde 1914 veröffentlicht, wobei die Technik hier beim Seestern angewandt wurde (Lillie 1914). 1962 konnte die Entwicklung eines Embryos nach Injektion von Spermatozoon in die Eizellen eines Seeigels verzeichnet werden, was zu der Hoffnung führte, die Technik auch bei höher entwickelten Tieren einsetzen zu können (Hiramoto 1962). Es folgten Berichte über die erfolgreiche Durchführung der ICSI bei Amphibien (Graham 1966; Brun 1974).

Die erste erfolgreiche Befruchtung durch ICSI bei einem Säugetier konnte 1976 beim Hamster nachgewiesen werden (Uehara und Yanagimachi 1976).

## 2. Literatur

Die intrazytoplasmatische Spermieninjektion wurde im humanmedizinischen Bereich eingeführt, um die Fortpflanzung trotz männlicher Sub/Infertilität zu ermöglichen. So wird sie eingesetzt bei Amotilität der Spermien, Azoospermie (hier wird die ICSI nach testikulärer Spermienextraktion, kurs TESE, durchgeführt) und bei nicht erfolgreicher IVF, wobei die ICSI heute oft schon angewandt wird, bevor die Möglichkeiten der konventionellen IVF ausgeschöpft sind (Palermo et al. 1992). Weiterhin wird die ICSI dann genutzt, wenn das Durchdringen der Zona pellucida ein Problem darstellt (Übersicht bei Parmar et al. 2013).

Die erste erfolgreiche ICSI beim Menschen wurde 1988 durchgeführt (Lanzendorf et al. 1988). Das erste ICSI-generierte Baby wurde 1992 geboren (Palermo et al. 1992).

Die ersten Berichte der ICSI beim Rind wurden 1990 veröffentlicht (Goto et al. 1990). Beim Pferd beobachtete Squires et al. 1996 die erste Trächtigkeit nach Spermien-Injektion einer in vitro gereiften equinen Eizelle (Squires et al. 1996).

### 2.4.2 Vor- und Nachteile der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion

Im Vergleich mit der konventionellen IVF bietet die ICSI sowohl in der Humanmedizin als auch bei Pferd, Rind und anderen Spezies verschiedene Vorteile.

Sie bietet die Möglichkeit, auch bei erfolgloser konventioneller IVF Zygoten zu produzieren: So stellt sie eine mögliche Methode dar, selbst dann erfolgreich Embryonen zu generieren, wenn beim Vater(tier) von geringer Spermienmotilität und -anzahl oder schlechter Fertilität ausgegangen wird. Für die Erfolgsrate der ICSI ist es zudem unerheblich, ob kryokonserviertes/aufgetautes oder frisches Sperma verwendet wird. Dasselbe gilt für den Einsatz von Sperma, welches wiederholt eingefroren und aufgetaut wurde. Dies hat den Vorteil, wertvolle Samenportionen mehrfach zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu nutzen und so die Effektivität zu steigern (Choi et al. 2006; Übersicht bei García-Roselló et al. 2009). Weiterhin kann die ICSI zur Zucht sehr wertvoller Tiere eingesetzt werden, da hier eventuell nur eine begrenzte Anzahl an Eizellen und/oder Spermien zur Verfügung stehen (Übersicht bei García-Roselló et al. 2009). Sie stellt damit also eine Grundlage zur Erhaltung der Biodiversität dar (Übersicht bei Parmar et al. 2013).

## 2. Literatur

Außerdem können Nachkommen mit vorherbestimmtem Geschlecht erzeugt werden, da ICSI auch mit X- oder Y-chromosomal sortierten Spermien durchgeführt werden kann (Canel et al. 2017).

Zu guter Letzt eröffnet die ICSI interessante Möglichkeiten, grundlegende Mechanismen der Befruchtung, die Funktion der Spermien und die frühe Embryonalentwicklung näher zu untersuchen. So zum Beispiel die Faktoren, die dazu führen, dass sich das Spermienkopfchromatin zum Vorkern ausbildet. Dabei kann das Pferd auch als Modell für den Menschen herangezogen werden (Übersicht bei García-Roselló et al. 2009).

Außerdem können verschiedene Probleme, welche im Rahmen der In-vitro-Fertilisation auftreten, genauer betrachtet werden. Ein Beispiel hierfür ist die Unfähigkeit von Hengstspermien die Zona pellucida bei der konventionellen IVF zu penetrieren.

Nachteile der ICSI sind die teure Ausrüstung, welche vorhanden sein muss, um die Technik anwenden zu können. Weiterhin ist ein hoher Trainingsaufwand für das Erlernen der Methode nötig, um verlässliche Ergebnisse erzielen zu können (Übersicht bei Salamone et al. 2017).

Außer im Bereich der Humanmedizin und beim Pferd stellt die ICSI im Vergleich zur IVF die Methode mit den geringeren Erfolgsraten dar, insbesondere die Raten der Blastozystenentwicklung sowie den Anteil lebenden Nachkommen betreffend. Ein Problem stellt dabei auch die erfolgreiche Aktivierung der Eizelle dar (Übersicht bei García-Roselló et al. 2009).

### 2.4.3 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion beim Pferd

Beim Pferd stellt die ICSI bislang die einzige zufriedenstellende Methode im Rahmen der IVP dar, equine Eizellen in vitro zu befruchten. Die erste Trächtigkeit nach Spermien-Injektion einer in vitro gereiften equinen Eizelle beobachtete Squires et al. (1996). Weiterhin konnten mittels ICSI Fohlen sowohl aus in vivo als auch in vitro gereiften Eizellen generiert werden (Cochran et al. 2000; McKinnon et al. 2000).

In den letzten 20 Jahren hat sich die ICSI beim Pferd rapide weiterentwickelt und wird inzwischen immer häufiger kommerziell genutzt. Die Möglichkeit wenige vorhandene Ressourcen (z.B. Eizellen oder Spermien eines verstorbenen Tieres) möglichst effektiv

## 2. Literatur

einzusetzen, macht die ICSI zu einer attraktiven Methode innerhalb der internationalen Pferdezucht (Übersicht bei Morris 2018).

Zu Beginn der Forschung zur ICSI beim Pferd waren die Blastozystenentwicklungsraten *in vitro* so gering, dass die injizierten Eizellen operativ ins Ovidukt von Empfängerstuten eingebracht werden mussten, um eine Embryonalentwicklung zu erreichen (McKinnon et al. 2000).

Erst der Einsatz von DMEM/F-12 als Kultivierungsmedium führte zu Erfolgen bei der Embryonalentwicklung *in vitro*. Dabei konnten zunächst Blastozystenraten von 18-20% beobachtet werden (Choi et al. 2004b). Weitere Versuche zur Verbesserung der Kultivierung führten schließlich zu Entwicklungsraten von bis zu 42% (Ribeiro et al. 2008).

Nach der erfolgreichen Entwicklung der ICSI beim Pferd zu einer Standardmethode werden seitdem verschiedene Einflussfaktoren untersucht.

Wie bereits beschrieben, besitzen KOK mit expandiertem Kumulus höhere Maturationsraten als solche mit kompaktem. Hinrichs et al. (2005) konnten allerdings nachweisen, dass die Entwicklungskompetenz zur Blastozyste sich bei maturierten Eizellen der beiden KOK-Typen nicht unterscheidet (Hinrichs et al. 2005).

Da eine geringe Qualität oder eine verminderte Anzahl der Spermien ein häufiger Grund für die Anwendung der ICSI beim Pferd ist, wurden verschiedene Studien durchgeführt, um den Einfluss der Spermienparameter auf den Erfolg der ICSI zu beurteilen.

Lazzari (2002) konnte nachweisen, dass es für die Teilungs- und Blastozystenraten nach der Befruchtung durch die ICSI unerheblich ist, ob Sperma von einem Hengst mit guter, schlechter oder sogar keiner Fertilität im Feld verwendet wird, solange zur Injektion in die Eizelle ein motiles Spermium ausgewählt wird. Im Gegenzug dazu, entwickeln sich aber keinerlei Blastozysten, sobald für die Injektion Spermien ausgewählt werden, die keinerlei Motilität besitzen (Lazzari 2002).

Choi et al. (2002) konnten nachweisen, dass es keinen Unterschied macht, ob frisches oder Gefriersperma bei der ICSI eingesetzt wird.

Colleoni et al. (2009) zeigten, dass bei der ICSI mit X- oder Y-chromosomal sortierten Spermien zwar normale Embryonalentwicklung und Trächtigkeiten entstehen können, die Teilungs- und

Blastozystenentwicklungsraten jedoch deutlich geringer (bis zu 25%), als in der Kontrollgruppe mit nicht-sortierten Spermien sind.

Tremoleda et al. (2003b) konnten zeigen, dass ein Scheitern der ICSI in 65% der Fälle an einer fehlenden Aktivierung der Eizelle lag. Zudem wurde gezeigt, dass die Dekondensation des Spermienkopfchromatins ebenfalls sehr häufig fehlerhaft war.

Es ist bekannt, dass Veränderungen im Muster des Kalziumanstiegs im Rahmen der Aktivierung der Eizelle zu einer unvollständigen Inaktivierung von MPF führen kann und als Folge dessen die Eizelle die MII-Phase nicht verlässt und die Spermienkopfdekondensation nicht oder nicht vollständig stattfindet (Tesarik 1998). Die Dekondensation des Spermienkopfchromatins wird auch durch einen Mangel an Glutathion und Nukleoplasmid, den Zellproteinen, welche spezifisch für diesen Ablauf benötigt werden, negativ beeinflusst (Perreault et al. 1988; Sakkas et al. 1996).

Die Tatsache, dass eine fehlerhafte Dekondensation des Spermienkopfchromatins besonders in Eizellen beobachtet werden konnte, bei welchen die Aktivierung nicht gelang, ist ein Hinweis darauf, dass entweder das Spermium das Aktivierungssignal nicht erfolgreich an die Eizelle weitergibt oder aber, dass die Eizelle nur ungenügend auf dieses Signal reagieren kann (Tremoleda et al. 2003b).

### 2.5 Heterologe intrazytoplasmatische Spermieninjektion

Grundsätzlich sind Eizellen von Säugetieren gegen das Eindringen von Spermien einer anderen Spezies mittels einer Barriere, die sich größtenteils im Bereich der Zona pellucida befindet, geschützt (Yanagimachi et al. 1981). Mithilfe der ICSI ist es möglich, diese Barriere zu umgehen, um unter anderem die Forschung an humanen Spermien mithilfe der Injektion in Eizellen anderer Spezies z.B. Maus oder Hamster voranzutreiben (Rybouchkin et al. 1995; Goud et al. 1998).

Weiterhin ermöglicht die heterologe intrazytoplasmatische Spermieninjektion die Erforschung früher Abläufe während der Befruchtung, beispielsweise bei Spezies, von denen nur in geringem Maße Eizellen zur Verfügung stehen (Rodriguez et al. 2016).

### 2.5.1 Intrazytoplasmatische Injektion von Pferdespermien in bovine Oozyten

Die heterologe ICSI von Pferdespermien in bovine Eizellen bietet die Möglichkeit, equine Spermien im Rahmen der Befruchtung zu untersuchen, auch wenn keine equinen Eizellen zu Verfügung stehen.

Li et al. (2003) führten Versuche zur Injektion von Pferdespermien in Rinderoozyten durch, um die Ausbildung der Vorkerne beurteilen zu können. Sie nutzten in diesen Versuchen als Aktivierungsprotokoll eine Kombination von Ionomycin und 6-Dimethylaminopurin (DMAP). Die Immobilisation der Spermien erfolgte mittels eines Schlages mit der Injektionspipette auf den Spermischwanz. Li et al. (2003) konnten die Bildung des männlichen Vorkerns 12 Stunden nach der ICSI beobachten; 23% der Oozyten wiesen nach 18 Stunden einen männlichen Vorkern auf. Dahingegen konnte der weibliche Kern schon nach 6 Stunden beobachtet werden, wobei 50% der Eizellen 12 bis 18 Stunden nach der ICSI den weiblichen Vorkern aufwiesen (Li et al. 2003).

Auch Rodriguez et al. (2016) untersuchte die Pronukleusausbildung nach der ICSI von Hengstsperma in Rinder-, Schweine- und Katzeizellen. Die Immobilisation der Spermien erfolgte auch hier mit einem Schlag auf den Schwanz. Es wurden zwei Gruppen gebildet: bei der ersten Gruppe erfolgte keine Aktivierung der Eizellen; bei der zweiten Gruppe wurden die injizierten Oozyten entweder chemisch (Rind und Katze) mit einer Kombination aus Ionomycin und 6-DMAP (6-Dimethylaminopurin) oder elektrisch (Schwein) aktiviert.

Die Embryonen der aktivierten Gruppen unterschieden sich tierartlich nicht in der Rate der Pronukleusausbildung. Bei den nicht-aktivierten Oozyten konnten jedoch deutliche Unterschiede festgestellt werden. Die Rate der Pronukleusausbildung betrug hier bei den felines Oozyten 81%, bei den Schweineoozyten lag sie bei 71% und bei den bovinen injizierten Eizellen lag sie bei 43% (Rodriguez et al. 2016).

## 2.6 Glukosemetabolismus des Embryos

### 2.6.1 Pferd

Der Erfolg von DMEM/F-12 in der Kultivierung equiner Embryonen wurde dessen hoher Glukosekonzentration zugesprochen (Lane und Gardner 2007). Eine hohe Glukosekonzentration scheint also für die Embryonenentwicklung spermien-injizierter

## 2. Literatur

equiner Eizellen förderlich zu sein. Diese Vermutung bestätigen auch metabolische Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass in vivo produzierte equine Embryonen eine hohe Glukoseaufnahme aufweisen (Lane et al. 2001). Es ist jedoch wenig über die tatsächlichen Bedürfnisse des equinen Embryos für dessen Entwicklung bekannt (Choi et al. 2015).

Choi et al. (2015) konnten beweisen, dass eine erfolgreiche Blastozystenproduktion in vitro auch mit einem Medium erreicht werden kann, welches während der frühen Teilungsphase des Embryos nur eine geringe Glukosekonzentration besitzt (<1mM). Es wurde sogar ein Hinweis darauf gefunden, dass eine sehr hohe Glukosekonzentration in dieser frühen Entwicklungsphase einen negativen Effekt auf den Embryo haben kann, zumindest die Zellzuordnung bzw. -verteilung betreffend. Gleichzeitig wurde aber bewiesen, dass Pferdeembryonen eine hohe Toleranz bezüglich der Glukosekonzentration besitzen, da dieselben Blastozystenentwicklungsraten für eine große Bandbreite verschiedener Glukosekonzentrationen bestimmt werden konnten (Choi et al. 2015).

Lane et. al (2001) konnte nachweisen, dass die Glukoseaufnahme in vivo produzierter expandierter Blastozysten exponentiell in Korrelation zum Durchmesser und der Oberfläche des Embryos ansteigt. Er stellte zudem die Vermutung auf, dass die Nährstoffaufnahme als Marker für die Lebensfähigkeit eines Embryos genutzt werden kann (Lane et al. 2001). Dies konnten auch schon McKinnon und Squires (1988) nachweisen, die zeigten, dass die Nährstoffaufnahme eines Embryos mit dessen morphologischer Qualität steigt.

Der hohe Bedarf von Glukose wird dem hohen Energiebedarf des equinen Embryos zugeschrieben, da dieser im Laufe seiner Entwicklung, im Gegensatz zu anderen Spezies, rapide expandiert. Er expandiert dabei innerhalb kürzester Zeit von einem Durchmesser von 150 µm auf einen Durchmesser von 900 µm (Lane et al. 2001). An Tag 7 ihrer Entwicklung besitzt eine equine expandierte Blastozyste eine durchschnittliche Zellzahl von 1736 (Tremoleda et al. 2003a).

### 2.6.2 Rind

Auch bei anderen Spezies spielt der Glukosemetabolismus in der frühen embryonalen Phase eine Rolle: Bei Mäusen ist die Dekondensation des Spermienkopfchromatins mit einem Anstieg des Glukosemetabolismus verbunden. Dies zeigt sich besonders im Vergleich zu lediglich parthenogenetisch aktivierten Eizellen, bei welchen der Glukosemetabolismus auf einem basalen Level verbleibt (Urner und Sakkas 1999). Weiterhin wird bei der Maus auch das Vorhandensein insbesondere des männlichen Vorkerns mit einer Steigerung des Glukosemetabolismus in Verbindung gebracht (Pantaleon et al. 2001).

Auch beim Rind konnte nachgewiesen werden, dass die Spermienkopfdekondensation einen Anstieg des Glukosemetabolismus zur Folge hat. Die Ausbildung des männlichen Vorkerns ist für eine Steigerung des Glukosestoffwechsels durch den PPP (Pentose Phosphate Pathway) verantwortlich. Dieser PPP beeinflusst den Beginn der S-Phase (Synthesephase im Entwicklungszyklus der Zygote, in welcher die DNA verdoppelt wird) sowohl im männlichen als auch im weiblichen Vorkern, wobei für den erfolgreichen Start der S-Phase des weiblichen Vorkerns ein vollausgebildeter männlicher Vorkern die Voraussetzung bildet. Das Level des Glukosestoffwechsels während der Ausbildung des männlichen Vorkerns hat also einen entscheidenden Einfluss auf die erfolgreiche Entwicklung des Embryos bis hin zum Blastozystenstadium (Comizzoli et al. 2002).

Lange wurde behauptet, dass die Glukosekonzentration erst ab dem Morula-Stadium einen Einfluss auf das Zellwachstum hat (Javed und Wright, 1991). Verschiedene Studien konnten jedoch nachweisen, dass dies nicht zutrifft.

Glukose ist in vielen Kultivierungssystemen boviner Embryonen die Hauptenergiequelle: Der Stellenwert der Glukose als Energielieferant wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen (Matsumoto et al. 1999). Es wurde jedoch auch ein inhibitorischer Effekt der Glukose im frühen Entwicklungsstadium der Embryonen diskutiert (Matsuyama et al. 1993).

Sakagami et al. (2014) führten Versuche zum Einfluss verschiedener Glukosekonzentrationen in einem BSA-freien Kultivierungsmedium boviner in-vitro generierter Embryonen durch und stellten fest, dass mit einer Supplementation von 4 mM Glukose 72 Stunden nach der Befruchtung höhere Blastozystenraten als mit anderen gewählten Glukosekonzentrationen zu

## 2. Literatur

erzielen sind. Wurde die Glukose direkt nach der Befruchtung supplementiert, konnten mit einer Konzentration von 1,5 mM die höchsten Blastozystenraten erzielt werden (24%).

Die Kultivierungsbedingungen, welchen Oozyten und Embryonen ausgesetzt sind, scheinen einen entscheidenden Einfluss auf die Geschlechts-Verteilung der Embryonen zu haben. Hierbei kommt dem Einfluss der Glukosekonzentration besondere Bedeutung zu: die Supplementation von Glukose im Kultivierungsmedium steigert den Anteil männlicher Embryonen. Es konnte ein erhöhter Anteil männlicher Embryonen beobachtet werden, wenn Glukose zum Kultivierungsmedium auf eine Konzentration von 5,56 mM zugegeben wurde (Kimura et al. 2008).

Dies bestätigt ein Experiment, in welchem gezeigt wurde, dass bei Oozyten, welche aus Follikeln mit unterschiedlichen intrafollikulären Glukosekonzentrationen gewonnen wurden der Anteil männlicher Embryonen signifikant unterschiedlich ist: Lag die Glukosekonzentration über 1 mM, war dieser höher als bei der Oozytengruppe mit der Glukosekonzentration unter 1 mM (Abele et al. 2014).

### 2.7 Ziele des vorliegenden Projekts

Da die Rolle der Glukosekonzentration im Kultivierungsmedium bei der equinen ICSI kontrovers diskutiert wird (Lane et al. 2001; Choi et al. 2015) soll die vorliegende Arbeit zur Aufklärung des Einflusses der Glukosekonzentration auf die frühembryonale Entwicklung beitragen. Dazu werden Kultivierungsmedien mit verschiedenen Glukosekonzentrationen genutzt und die maternale und paternale Vorkernausbildung nach 18 Stunden beurteilt. Um die beiden Vorkerne unterscheiden zu können, erfolgt vor der ICSI die Anfärbung des Spermienmittelstückes mit MitoTracker Green® FM und 18 Stunden nach ICSI die Färbung der Polkörper und Vorkerne mit Hoechst 33342. So kann einer der vorhandenen Vorkerne dem Spermienmittelstück und somit der paternalen Seite zugeordnet werden. Außerdem soll die Glukosekonzentration im Kultivierungsmedium 18 Stunden nach ICSI gemessen werden. Dabei bietet das Modell der heterologen ICSI von equinen Spermien in bovine Oozyten eine Möglichkeit, gewonnene Erkenntnisse aufs Pferd übertragen zu können.

Da die erfolgreiche Aktivierung der Eizelle häufig ein Problem im Rahmen der ICSI darstellt (Übersicht bei García-Roselló et al. 2009) sollten weiterhin verschiedene Aktivierungsprotokolle miteinander verglichen werden: Die Aktivierung mithilfe des Piezo-

## 2. Literatur

Elements, die chemische Aktivierung mithilfe einer Kombination von Ionomycin und 6-DMAP und eine Kombination der beiden. Auch hier erfolgt die Auswertung der Vorkernausbildung wie beschrieben, zusätzlich soll noch die Teilungsrate nach ICSI beurteilt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, weiteren Einblick in das Modell der heterologen ICSI zu liefern. Weiterhin sollen Ergebnisse über den Glukosesbedarf des Embryos innerhalb der ersten 18 Stunden ermittelt und der Effekt verschiedener Aktivierungsmethoden auf die Vorkernausbildung beurteilt werden. Dadurch sollten Hinweise auf die Vorkernausbildung des Spermiums und somit des männlichen Anteils der Zygote erhoben werden, um sie vom heterologen auf das homologe Modell (Pferd) zu übertragen.

## 3. Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien stammen, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Sigma Aldrich aus München in Deutschland. Eine Zusammenfassung der verwendeten Medien und Geräte ist im Anhang zu finden.

### 3.1 ICSI beim Pferd

#### 3.1.1 Gewinnung der Kumulus-Oozyten-Komplexe

Die Ovarien wurden direkt im Rahmen der Schlachtung von augenscheinlich gesunden Tieren entnommen, in einen Thermobehälter mit phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate Buffered Saline Complete – PBS) mit der Temperatur von 37°C verbracht und in diesem ins Labor transportiert. PBS besteht aus 1000 ml destilliertem Wasser, in welchem 10 ml PBS-Stocklösung, 9,65 g Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), 11,2 mg Heparin und 1 g bovines Serumalbumin (BSA, Fraktion V) gelöst waren. Die Ovarien wurden direkt nach der Ankunft im Labor mit circa 700 ml 0,9%iger Natrium-Chlorid-Lösung, welche eine Temperatur von 37°C besaß, gewaschen. Weiterhin waren der NaCl-Lösung 0,06 g Penicillin und 0,1 g Streptomycin pro Liter beigefügt.

Die Ovarien wurden dann in einer rechteckigen Glasschale mit hohem Rand in circa 150 ml 37°C warmem PBS weiterverarbeitet. Zunächst wurden oberflächliche Follikel mit einer Kanüle angestochen und die Follikelflüssigkeit in der Glasschale aufgefangen. Danach erfolgte das Eröffnen der Follikel mit einer Skalpellklinge und deren Auskratzen mit Hilfe eines scharfen Löffels (siehe Abbildung 8). Im Anschluss wurden die so bearbeiteten Follikel nochmal mit PBS ausgespült. Nachdem mit allen oberflächlichen Follikeln so verfahren worden war, folgte das Zerschneiden des Ovars in circa 0,5 – 1 cm dicke Scheiben, wobei auf diese Art die in der Tiefe des Ovars gelegenen Follikel freigelegt wurden. Diese wurden nun ebenfalls zunächst mit einer Kanüle und dann einem Skalpell eröffnet, ausgekratzt und mit PBS ausgespült. Schließlich wurden die Scheiben des Ovars noch mittels der Slicing-Methode (Eckert und Niemann 1995) verarbeitet, um auch eventuell bisher übersehene Follikel zu eröffnen. Dazu wurde ein Vielklingenmesser genutzt.

### 3. Material und Methoden



*Abbildung 8: Auskratzen der oberflächlichen Follikel mithilfe eines scharfen Löffels.*

Um überschüssige Gewebereste zu entfernen, wurde der Inhalt der Glasschale gefiltert und die Flüssigkeit in einem Becherglas aufgefangen. Es erfolgte ein Sedimentationschritt mit einer Dauer von 10 Minuten, wobei das Becherglas auf einer Wärmeplatte mit 37°C stand, um eine Auskühlung der Flüssigkeit zu minimieren. Im Anschluss wurde der Überstand bis auf circa 100 ml mithilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt und das Sediment gleichmäßig auf 6 bis 8 Falcon-Röhrchen (15 ml) verteilt. Es folgte erneut ein Sedimentationschritt von 10 Minuten, welcher wiederum auf einer Wärmeplatte stattfand. Das Sediment aus den Falcon-Röhrchen wurde dann mithilfe einer Pipette abgesaugt und in eine Petrischale verbracht, welche mit circa 50 ml PBS aufgefüllt wurde. Das Heraussuchen und die Beurteilung der KOK erfolgte unter einem Stereomikroskop der Firma Olympus mit 45-facher Vergrößerung und auf einer Wärmeplatte bei 37°C. Sämtliche KOK wurden zunächst in 2 ml zuvor auf 37°C erwärmtem Tissue-Culture-Medium 199 (TCM 199) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) verbracht und dort klassifiziert.

#### 3.1.2 Klassifizierung der Kumulus-Oozyten-Komplexe

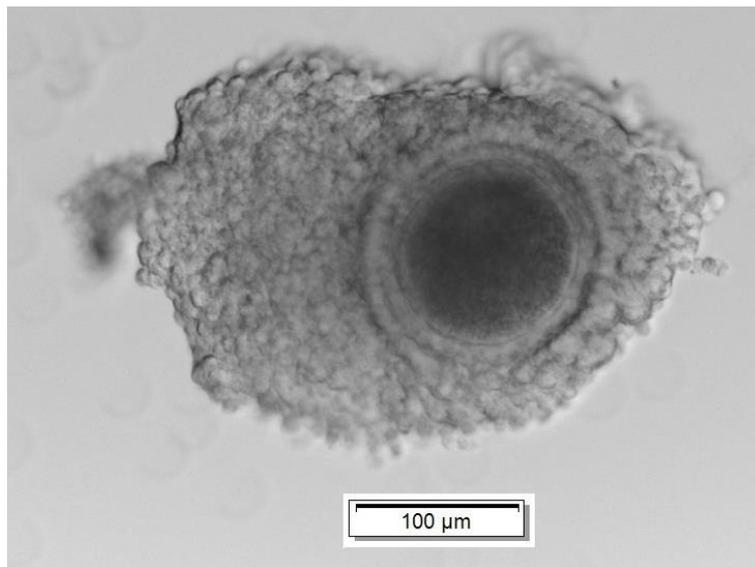
Die Einteilung der Oozyten erfolgte anhand der Morphologie der sie umgebenden Kumuluszellen. Dabei wurde zwischen expandiertem und kompaktem Kumulus unterschieden. Kompakter Kumulus besitzt dicht aneinander liegende Zellen, eine glatte Oberfläche im Bereich des Kumulushügels und eine gleichmäßige oder granulierte Färbung während bei expandiertem Kumulus die Zellen Anzeichen einer Auflockerung zeigen und eine

### 3. Material und Methoden

deutliche Granulierung aufweisen (Hinrichs und Schmidt 2000; Übersicht bei Hinrichs 2010 und Hinrichs 2012). Eizellen, die keinen Kumulus oder nur wenige Kumuluszellen, welche die Oozyte nicht vollständig umgeben, besitzen, wurden einer dritten Gruppe zugeordnet, welche als „Kein/Teilkumulus“ bezeichnet wurde. Eizellen, bei welchen das Ooplasma nicht homolog oder sogar fragmentiert war, wurden verworfen.

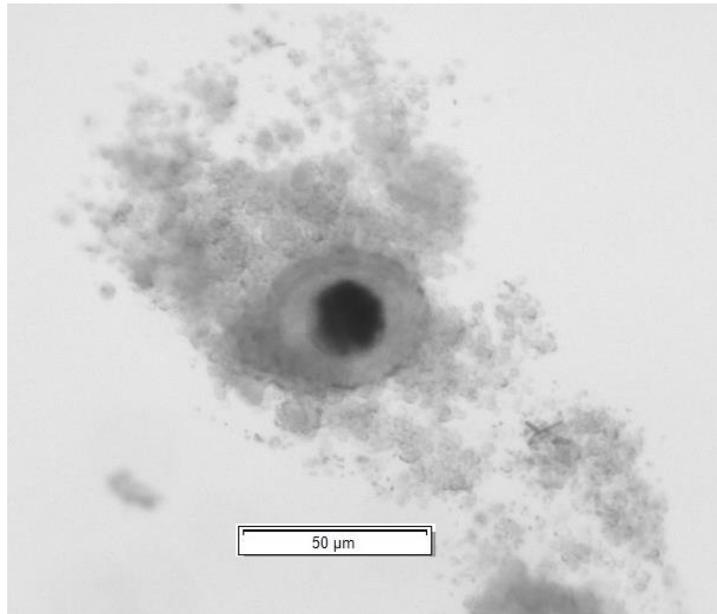
Bei der Klassifizierung der KOK, wurden die Oozyten in die folgenden drei Gruppen eingeteilt:

1. KOK mit kompaktem Kumulus (Abbildung 9)
2. KOK mit expandiertem Kumulus (Abbildung 10)
3. KOK ohne Kumulus bzw. mit Teilkumulus (Abbildung 11)

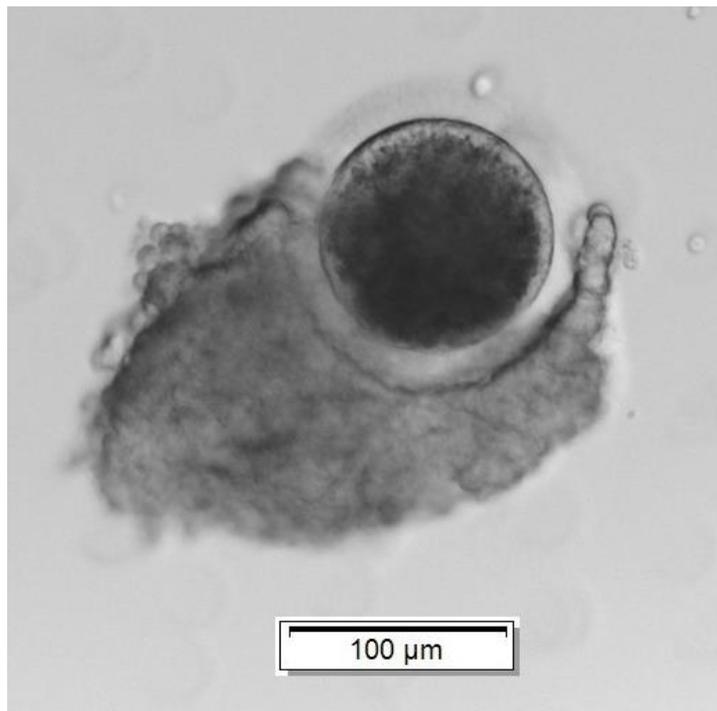


*Abbildung 9: Equiner KOK mit kompaktem Kumulus*

### 3. Material und Methoden



*Abbildung 10: Equiner KOK mit expandiertem Kumulus*



*Abbildung 11: Equiner KOK mit Teilkumulus*

Es wurde erfasst, wie viele KOK welcher Gruppe aus den Ovarien gewonnen wurden. Danach wurden die KOK der verschiedenen Klassifizierungsgruppen gemeinsam weiterkultiviert.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1.3 In-vitro-Maturation

Die ausgewählten KOK wurden in Gruppen von je 10 Oozyten zusammengefasst und zunächst „gewaschen“. Dieser Schritt erfolgte, um eventuell vorhandene Zellreste zu entfernen und das zuvor verwendete TCM 199 zu verdünnen. Die Eizellen wurden dazu drei Mal durch silikonölüberschichtete 100 µl Tropfen von Medium-199 mit Earle's Salzen, 10% fetalem bovinen Serum (FBS) und 5 µU/ml follikelstimulierndem Hormon (FSH) pipettiert. Im Anschluss wurden die KOK in Gruppen von je 10 Eizellen in silikonölüberschichtete Tropfen der Größe 100 µl desselben Mediums verbracht, in welchem die Reifung der KOK stattfand. Die Kultivierung erfolgte bei ~20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, und 38,2°C.

#### 3.1.4 Entfernen der Kumuluszellen

Im Anschluss an die 30-stündige Reifung der KOK erfolgte vor der Spermieninjektion das mechanische Entfernen der Kumuluszellen, welche die Eizelle umgaben. Dieser Vorgang erfolgte auf einer Wärmeplatte bei 37°C und unter Sichtkontrolle bei 30-facher Vergrößerung unter dem Stereomikroskop.

Dazu wurden die Eizellen zunächst in einen 0,2 ml Tropfen vorgewärmter Hyaluronidase der Konzentration 80 IU/ml verbracht und darin einige Male mittels einer Mikropipette (Stripper®) mit der dazugehörigen Spitze im Durchmesser von 135 µm mehrmals aspiriert und wieder ausgestoßen. Wenn sich ein Teil des vorhandenen Kumulus gelockert beziehungsweise von den Oozyten gelöst hatte, wurden diese in TCM 199 mit 10% FBS verbracht, wo auch die restlichen Kumuluszellen mit derselben Technik vollständig entfernt wurden.

Danach wurden die Eizellen in einen silikonölüberschichteten 100 µl Tropfen TCM 199 mit 10% FBS verbracht und im Brutschrank bei ~20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 38,2°C bis zum Beginn der ICSI gelagert.

Kurz vor Beginn der ICSI wurden die Eizellen in Gruppen von 5-7 in den Tropfen TCM 199 der ICSI-Schalen gesetzt (siehe Abbildung 12).

#### 3.1.5 ICSI-Schale

Für die Spermieninjektion wurde eine spezielle ICSI-Schale der Firma FALCON® (Wiesbaden, Deutschland) genutzt. Diese hat einen Durchmesser von 50 mm und lediglich eine Höhe von 9 mm. Der flache Rand der Schale ermöglicht die optimale Arbeit mit den Mikromanipulatoren in den Tropfen.

### 3. Material und Methoden

In diese Schale wurde mittig ein länglicher 20 µl-Tropfen 10%-iges Polyvinylpyrrolidon (PVP) aufgetragen.

Seitlich links neben diesem länglichen Tropfen befand sich ein 10 µl großer Tropfen TCM 199. In den unteren Bereich des PVP-Tropfens wurden die aufbereiteten Spermien gesetzt, im oberen Bereich des PVP-Tropfens erfolgte die Manipulation der Spermien mit dem Piezo-Element und ihre Aufnahme in die Injektionspipette. Im TCM 199-Tropfen erfolgte die Injektion des Spermiums in die Eizelle (siehe Abbildung 12).

Die Schalen wurden wie beschrieben vorbereitet und mindestens eine Stunde im Brutschrank bei ~20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, und 38,2°C vorgewärmt.

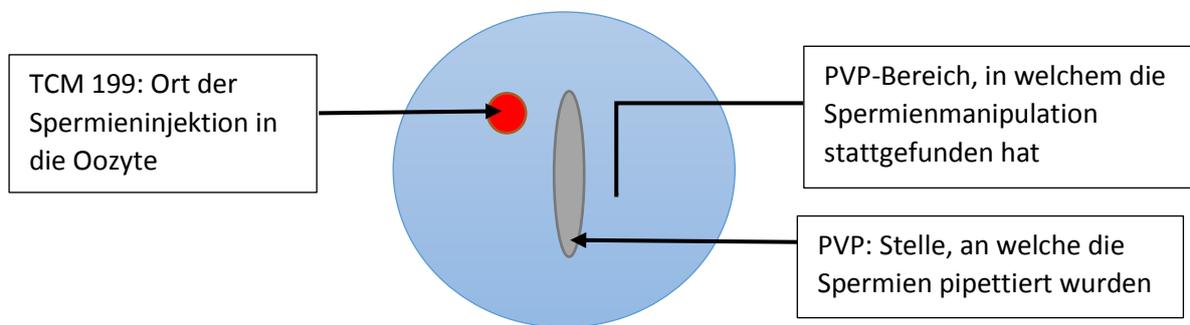


Abbildung 12: ICSI-Schälchen

#### 3.1.6 Aufbereitung der Spermien

Für die ICSI wurde tiefgefrorenes Hengstsperma genutzt, welches in einem konventionellen Stickstoffbehälter in Portionen von 500 µl in Straws aufbewahrt wurde. Es wurden unterschiedliche Hengste für die Versuche genutzt, um nachzuweisen, dass die erzielten Ergebnisse unabhängig vom ausgewählten Hengst sind.

Zunächst erfolgte das Auftauen jeweils eines tiefgefrorenen Straws aus dem Stickstoffbehälter im Wasserbad bei ca. 37°C für ca. 20 Sekunden. Anschließend wurden 250 µl Sperma in 750 µl 90% Sperm-Filter der Firma Gynotec BV aus Malden in den Niederlanden (Zusatz von 10% TCM-199), welcher zuvor im Brutschrank bei 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 38,2°C vorgewärmt worden war, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert. Dann erfolgte die Zentrifugation des Gefäßes bei 400 g für 16 min. Danach wurde der Überstand abgenommen, so dass ein Spermienpellet von ca. 100 µl am Boden des Eppendorf-Gefäßes zurückblieb und mit 750 µl im Brutschrank vorgewärmtem TCM 199 aufgefüllt. Es folgte erneut ein Zentrifugationsschritt bei 400 g für 3 Minuten, nach dem wiederum der Überstand abgenommen wurde. Auf das so entstandene,

### 3. Material und Methoden

zweimalig gewaschene Spermienpellet wurden 100 µl TCM 199 pipettiert. Die Aufbewahrung des Spermias erfolgte bis zum Beginn der ICSI im Brutschrank bei ~20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 38,2°C. Kurz vor Beginn der ICSI wurden 3 µl aus dem TCM 199 Überstand oberhalb des Spermienpellets entnommen und in den unteren Bereich des PVP-Tropfens im ICSI-Schälchen pipettiert (siehe Abbildung 12).

#### 3.1.7 Mikroskop und Mikromanipulatoren

Es wurde für die ICSI mit dem Invers-Forschungsmikroskop IX73 der Firma Olympus aus Hamburg in Deutschland gearbeitet. Die Mikromanipulatoren (TransferMan®4r), die CellTram® Air und Oil ebenso wie der PiezoXpert™ stammten von der Firma Eppendorf aus Hamburg in Deutschland.

Zur Injektion wurde die ICSI-Pipette nach Galli der Firma BioMedicalInstruments (Zöllnitz, Deutschland) genutzt. Diese ist an ihrer Spitze stumpf, gerade und besitzt einen Innendurchmesser von 5 µm. Die Haltepipette stammte von der Firma Microtech IVF aus Brno-Sever in Tschechien und besaß einen Außendurchmesser von 100 µm, eine Öffnung mit dem Durchmesser von 20 µm und einen Winkel von 30°.

Vor Beginn der ICSI wurde die Injektionspipette mithilfe des Eppendorf Mikroloaders mit Fluorinert befüllt, um die Injektionspipette zu beschweren und somit eine optimale Übertragung der minimalen Vibrationen zu gewährleisten. Die Intensität, die Geschwindigkeit (Frequenz) und die Anzahl der Piezo-Impulse wurden jeweils für die Eizelle und das Spermium separat gewählt. Es wurde für die Manipulation der Spermien und das Durchdringen der Zona pellucida eine Intensität von 15 – 25, eine Geschwindigkeit von 10 und die Anzahl 10 - ∞ gewählt. Für das Eindringen in das Oolemm der Eizelle wurden eine Intensität von 10, die Geschwindigkeit 10 und die Anzahl 5 genutzt.

#### 3.1.8 Auswahl und Manipulation der Spermien

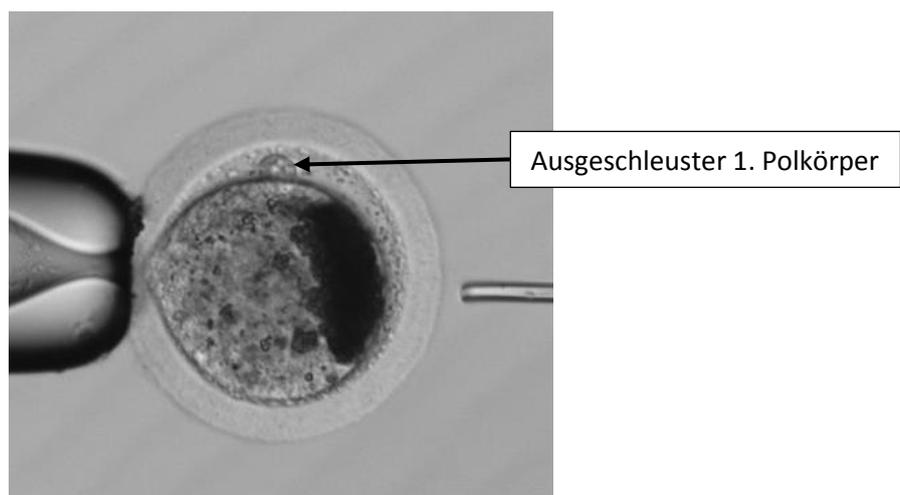
Für die ICSI wurden vorwärtsbewegliche Spermien ausgewählt, welche morphologisch keine Abweichungen von der Norm (z.B. geknickter oder doppelter Spermien Schwanz, Spermienkopfformationen) aufwiesen. Die CellTram® Oil generierte in der Injektionspipette einen geringen Unterdruck, durch welchen das Spermium eingesaugt werden konnte. Das Spermium wurde so in der Injektionspipette positioniert, dass die Spitze der Pipette direkt hinter dem Spermienkopf lag. Es wurden mehrere Piezo-Impulse appliziert, wobei zwischen

### 3. Material und Methoden

den Impulsen jeweils überprüft wurde, ob das Spermium noch Vorwärtsbeweglichkeit besaß. War dies der Fall wurden weitere Impulse abgegeben und zwar so lange, bis das Spermium unbeweglich war. Es wurde davon ausgegangen, dass dann eine Läsion in der Spermienmembran gesetzt worden war. Anschließend wurde das Spermium komplett in die Injektionspipette aufgenommen und es erfolgte die Durchführung der Injektion im TCM 199-Tropfen.

#### 3.1.9 Auswahl der Eizellen für die ICSI

Injiziert wurden nur Eizellen, welche die erste meiotische Teilung vollendet hatten und einen ausgeschleusten ersten Polkörper aufwiesen. Die Oozyten wurden dazu bei 200-facher Vergrößerung mit der Haltepipette locker fixiert und mithilfe der Injektionspipette so gedreht, dass beurteilt werden konnte, ob ein ausgestoßener Polkörper vorhanden ist. Der Polkörper wurde dann entweder bei 12 oder bei 6 Uhr positioniert (siehe Abbildung 13).



*Abbildung 13: Gereifte equine Eizelle. Der ausgeschleuste erste Polkörper liegt bei 12 Uhr.*

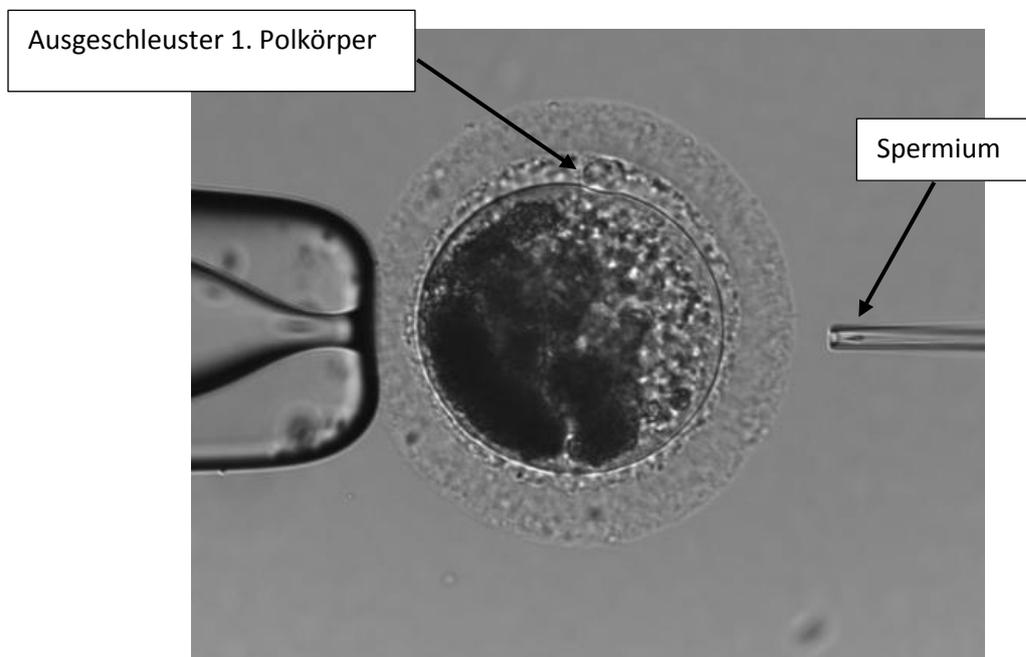
#### 3.1.10 Ablauf der ICSI

Während der ICSI wurde auf einer Wärmeplatte mit 37°C gearbeitet, um Oozyten und Spermien eine möglichst konstante Temperatur zu bieten. Das Spermium wurde in der Injektionspipette möglichst weit vorne gehalten, so dass nur eine minimale Menge an Medium mit in die Eizelle injiziert werden würde (siehe Abbildung 14). Die Spitze der Injektionspipette wurde dann bei 3 Uhr an der Eizelle positioniert und leicht gegen die Zona pellucida gedrückt. Es erfolgten dann mehrere Piezo-Impulse, um die Zona pellucida zu durchdringen (siehe

### 3. Material und Methoden

Abbildung 15). Anschließend wurde mit der Injektionspipette leicht das Oolemm angesaugt und ein Piezo-Impuls abgegeben, um auch dieses zu durchdringen. Um zu überprüfen, dass das Oolemm tatsächlich durchdrungen wurde, erfolgte die Aspiration von etwas Ooplasma mit der Injektionspipette. In der Mitte des Ooplasmas erfolgte dann die Injektion des Spermiums, wobei darauf geachtet wurde, möglichst wenig Medium aus der Injektionspipette in die Eizelle zu injizieren.

Sobald alle vollständig gereiften Eizellen einer Gruppe injiziert waren, wurden diese in einem vorgewärmten 100 µl Tropfen TCM 199 gesammelt und im Brutschrank aufbewahrt bis die ICSI bei den verbleibenden Oozyten durchgeführt war.



*Abbildung 14: Oozyte direkt vor der Injektion. Das Spermium befindet sich in der Spitze der Injektionspipette. Der 1. Polkörper liegt bei 12 Uhr.*

### 3. Material und Methoden



*Abbildung 15: Injektion des Spermiums in die Oozyte.*

#### 3.1.11 In-vitro-Kultivierung

Zur IVC diente folgendes Medium: Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (DMEM/F-12) mit 10% fetalem Rinderserum (Fetal Bovine Serum – FBS). Es wurden jeweils vier Kulturtropfen einer Größe von 30  $\mu$ l in einer Petrischale vorbereitet und mit Mineralöl überschichtet. Inkubiert wurde bei 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> und 38,2 °C.

Die Eizellen wurden zunächst drei Mal im Kultivierungsmedium gewaschen und dann in Gruppen der Größe von 2-7 Oozyten kultiviert.

An Tag 3 erfolgte die Beurteilung der Teilung der Oozyten. An dieser Stelle wurden nicht-geteilte Oozyten von geteilten getrennt und in einen separaten Tropfen des Kulturmediums gesetzt.

#### 3.1.12 Morphologische Beurteilung der Embryonen

Die morphologische Beurteilung der Embryonen erfolgt an Tag 3 und an Tag 7 nach der ICSI. Dabei wurde beurteilt, ob und bis zu welchem Zell-Stadium die Embryonen sich geteilt hatten.

### 3.2 Die heterologe intrazytoplasmatische Spermieninjektion

Bei der heterologen ICSI erfolgte die Injektion von Hengstspermien in bovine gereifte Oozyten.

### 3. Material und Methoden

#### 3.2.1. Gewinnung der Kumulus-Oozyten-Komplexe

Die KOK für die IVP wurden aus Ovarfollikeln von Schlachttieren des nahe gelegenen Schlachthofs Fleischmarkt Olpe (Olpe, Deutschland) gewonnen. Im Rahmen der Schlachtung wurden die Ovarien von augenscheinlich geschlechtsgesunden Tieren (weder tragend noch Zysten auf den Ovarien) entnommen und in einen Thermobehälter mit PBS mit der Temperatur von 37°C verbracht. Die Transportzeit zum Labor betrug in der Regel zwischen 1 und 2 Stunden.

Direkt nach der Ankunft im Labor wurden die Ovarien mit 1 l 0,9%iger Natrium-Chlorid-Lösung, welche eine Temperatur von 37°C besaß, gewaschen. Weiterhin waren der NaCl-Lösung 0,06 g Penicillin und 0,1 g Streptomycin pro Liter beigelegt.

Die weitere Verarbeitung der Ovarien erfolgte in einer Glas-Petrischale (150 mm) mit hohem Rand in circa 50 ml 37°C warmem PBS Complete mittels der Slicing-Methode nach Eckert und Niemann (Eckert und Niemann 1995). Dazu wurden die Ovarien am Mesovarium mit einer Arterienklemme fixiert und mit einem Vielklingenmesser solange angeschnitten, bis möglichst alle Follikel eröffnet waren.

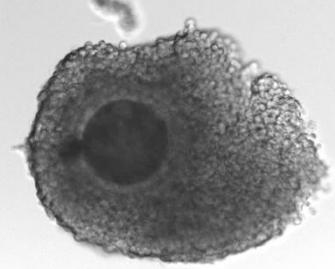
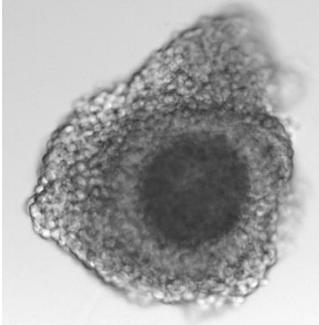
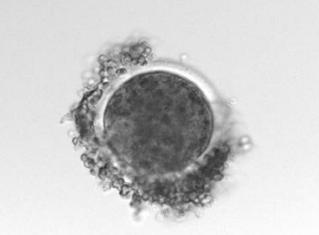
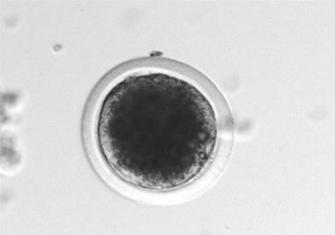
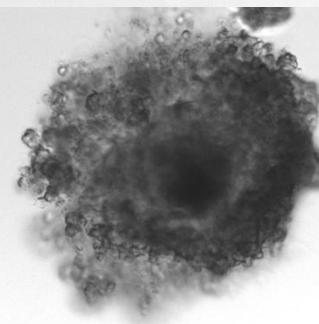
Anschließend wurde der Inhalt der Glasschale durch ein Sieb gefiltert und die Flüssigkeit in einem Becherglas aufgefangen, um Gewebereste zu entfernen. Die Temperatur wurde während der folgenden Schritte konstant mithilfe einer Wärmeplatte bei 37°C gehalten. Nach einem Sedimentationsschritt mit einer Dauer von 10 Minuten erfolgte das Absaugen des Überstandes bis auf circa 100 ml mithilfe einer Vakuumpumpe. Das Sediment wurde auf 10 bis 12 Falcon-Röhrchen (15 ml) verteilt und diese mit PBS Complete aufgefüllt. Nach weiteren 10 Minuten Sedimentation wurde das Sediment aus den Falcon-Röhrchen mithilfe einer Glaspipette abgesaugt, in eine Petrischale verbracht und mit einer kleinen Menge PBS Complete aufgefüllt. Das Heraussuchen und die Beurteilung der Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) erfolgte dann unter einem Stereomikroskop mit 45-facher Vergrößerung mithilfe einer 25 µl Glaskapillare und einem Pipettierhelfer (Brand, Wertheim). Dabei wurden sämtliche KOK zunächst in 2 ml vorgewärmtes TCM 199 Air verbracht und dort klassifiziert.

#### 3.2.2 Beurteilung der Kumulus-Oozyten-Komplexe

Die Einteilung der KOK erfolgte in die folgenden 5 Kategorien. Im Gegensatz zum Pferd werden beim Rind KOK mit expandiertem Kumulus mit geringer meiotischer Kompetenz assoziiert und folglich nicht für die IVP genutzt (Pavlok et al. 1992).

### 3. Material und Methoden

Tabelle 4: Einteilung der KOK

Kategorie	Morphologie des Ooplasmas	Morphologie des Kumulus	Beispiel
1	Homogen, dunkel	Kompakt, durchgehend drei- bis vierlagig	
2	Homogen, dunkel	Mindestens eine Lage durchgehend	
3	Homogen, dunkel, eventuell auch heterogen oder homogen hell	Einzeln anhaftende Kumuluszellen	
4	Wie in Kategorie 1-3	Keine anhaftenden Kumuluszellen, leere Zona	
5	Wie in Kategorie 1-3	Deutliche Auflockerung (Expandierung) der Kumuluszellen	

Dabei wurden KOK der Kategorie 1 und 2 als tauglich beurteilt und für die Weiterverarbeitung ausgewählt.

### 3. Material und Methoden

#### 3.2.3 In-vitro-Maturation

Die ausgewählten KOK wurden in Gruppen von 20 zusammengefasst und zunächst drei Mal in TCM 199 gewaschen, um Zellreste zu entfernen und das TCM 199 Air auszuwaschen. Dazu waren zuvor Petrischalen (60 mm Durchmesser) mit insgesamt je 12 Silikonöl überschichteten 100 µl Tropfen TCM 199 vorbereitet und im Brutschrank vorgewärmt worden.

Das Reifungsmedium bestand aus TCM 199 mit BSA (1 mg/ml) und Suigonan® (Suigonan® besteht aus Pregnant Mare Serum Gonadotropin mit 10 IE/ml und humanem Choriongonadotropin mit 5 IE/ml). Von diesem wurden je 4 Tropfen in jeweils einer Petrischale mit dem Durchmesser von 35 mm vorbereitet und mit Silikonöl überschichtet. Vor Gebrauch erfolgte die Äquilibration der Schalen für mindestens eine Stunde im Brutschrank. In Gruppen von je 20 wurden die KOK dann in die vorbereiteten Tropfen gesetzt und zur Maturation in den Brutschrank gestellt. Die Inkubation erfolgte bei 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 38,2°C. Die Maturationsdauer der Oozyten beträgt beim Rind 24 Stunden.

#### 3.2.4 Entfernung der Kumuluszellen

Nach 22 Stunden Reifungsdauer erfolgte das Entfernen der Kumuluszellen. Dazu wurden die KOK aus den Maturationstropfen entnommen und in einen circa 0,2 ml großen Tropfen Hyaluronidase der Endkonzentration 80 IU/ml gesetzt, welche zuvor im Wärmeschrank vorgewärmt worden war. Gearbeitet wurde auf einer Wärmeplatte von 37°C und bei 30-facher Vergrößerung unter dem Stereomikroskop. Mittels eine Mikropipette (Strippers®) der Firma Gynemed (RI EZ Grip) und einer Spitze (RI EZ Tip) mit einem Durchmesser von 135 µm wurden die KOK mehrmals aspiriert und wieder ausgestoßen. Dies diente dazu, den Kumulus aufzulockern und schon große Teile des Kumulus zu entfernen. Sobald sich ein Großteil des vorhandenen Kumulus gelockert oder gelöst hatte, wurden die Oozyten in TCM 199 Air-Tropfen umgesetzt. Dort wurde der verbliebene Kumulus mit derselben Technik entfernt, bis keine Kumuluszellen mehr vorhanden waren. Bis mit der ICSI begonnen wurde, wurden die Eizellen in vorinkubierten silikonölüberschichteten 100 µl Tropfen TCM 199 verbracht und im Brutschrank bei 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 38,2°C gelagert.

Mit Beginn der ICSI wurden die Eizellen in Gruppen von 5-7 in den TCM 199 Tropfen der ICSI-Schalen gesetzt.

### 3. Material und Methoden

#### 3.2.5 ICSI-Schale

Für die Spermieninjektion wurde, wie auch schon bei der ICSI beim Pferd, eine spezielle ICSI-Schale der Firma FALCON® genutzt. Diese wurden vorbereitet, wie beim Pferd bereits beschrieben (Kapitel 3.1.5).

#### 3.2.6 Vorbereitung des MitoTracker Green® FM

Verwendet wurde MitoTracker® Green FM der Firma Invitrogen (Erlangen in Deutschland). Es wurde darauf geachtet, nur im Dunkeln mit dem Farbstoff zu arbeiten.

Zunächst wurde eine Stocklösung hergestellt. Dazu wurden 50 µg MitoTracker® Green FM in 74,4 µl 100% DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Dies ergab eine 1 mM Lösung. Um die Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 400 nM herzustellen, wurde 1 µl der 1 mM Lösung in 2,5 ml TCM 199 gelöst. Davon wurde 1 ml entnommen und im Brutschrank bei 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, und 38,2°C mindestens 30 Minuten inkubiert, bevor mit der Aufbereitung der Spermien begonnen wurde.

#### 3.2.7 Aufbereitung des Spermas

Verwendet wurde tiefgefrorenes Hengstsperma, welches in einem Stickstoffbehälter in Straws der Portionsgröße 500 µl aufbewahrt wurde. Das Auftauen jeweils eines Straws erfolgte bei circa 37°C für 20 Sekunden im Wasserbad.

Es wurde zuvor 90% Sperm-Filter der Firma Gynotec BV aus Malden in den Niederlanden vorbereitet (Zusatz von 10% TCM 199) und im Brutschrank erwärmt. Es wurden 750 µl dieses Sperm-Filters in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert. Vom aufgetauten Sperma wurden 250 µl direkt auf den Sperm-Filter gegeben und das Eppendorf-Gefäß für 16 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, so dass nur ein Spermienpellet am Boden des Gefäßes zurückblieb. Dieses wurde in das zuvor vorbereitete Eppendorf-Gefäß mit 1 ml der MitoTracker® Green FM Färbelösung gegeben. Ab diesem Punkt wurde nur im Dunkeln gearbeitet.

Es erfolgte dann die Inkubation von Sperma und MitoTracker® für 30 Minuten bei 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, und 38,2°C.

Bei MitoTracker® Green FM handelte es sich um eine grün fluoreszierende mitochondriale Färbung: Der Farbstoff akkumulierte dabei in den Mitochondrien lebender Zellen. Zellen, die

### 3. Material und Methoden

gefärbt werden sollen, werden in MitoTracker® Green FM inkubiert, dieser diffundiert passiv durch die Zellmembran und sammelt sich innerhalb der Zelle in aktiven Mitochondrien. Folglich erfolgte bei den behandelten Spermien das Anfärben des Mittelstücks, in welchem sich die Mitochondrien befinden.

Anschließend wurde das Eppendorfgefäß für 3 min bei 400 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen, so dass das Spermienpellet am Boden zurückblieb. Es wurden 750 µl TCM 199 aufgefüllt und erneut bei 400 g für 3 Minuten zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand erneut abgenommen und 100 µl TCM 199 auf das Spermienpellet pipettiert. Bis zum Beginn der ICSI wurde das Sperma im Brutschrank aufbewahrt.

Kurz vor Beginn der ICSI wurden 3 µl aus dem TCM 199 Überstand entnommen und in den unteren Bereich des PVP-Tropfens im ICSI-Schälchen gegeben.

#### 3.2.8 Mikroskop und Mikromanipulatoren

Für die ICSI wurden dieselben Gerätschaften wie zuvor beim Pferd beschrieben genutzt (Kapitel 3.1.7).

Für die Injektion des Spermiums wurden zwei verschiedenen Injektionspipetten der Firma Bio Medical Instruments genutzt:

1. Wurde das Piezo-Element zur Aktivierung der Eizelle eingesetzt, so wurde die Injektionspipette nach Galli verwendet. Es wurden dabei dieselbe Intensität, Geschwindigkeit und Anzahl an Impulsen, wie zuvor beim Pferd beschrieben, eingesetzt (Kapitel 3.1.7).
2. Sollten die Eizellen nach der Injektion chemisch aktiviert werden, wurde eine Injektionspipette genutzt, welche einen Innendurchmesser von 8 µm, einen Winkel von 30° und eine scharfe Spitze für das Durchdringen der Zona pellucida besaß.

Die Haltepipette war wiederum dieselbe, wie schon beim Pferd beschrieben (Kapitel 3.1.7).

#### 3.2.9 Auswahl und Manipulation der Spermien

Die Auswahl der Spermien für die ICSI erfolgte analog zum Ablauf der ICSI beim Pferd (Kapitel 3.1.8). Zur Manipulation der Spermien wurden zwei verschiedene Techniken angewandt:

### 3. Material und Methoden

1. Für die ICSI mit der Injektionspipette nach Galli erfolgte die Manipulation der Spermien wie bereits in Kapitel 3.1.8 beschrieben.
2. Mit der scharfen Injektionspipette wurde mit der Pipettenspitze im 90° Winkel ein Schlag auf den Spermischwanz ausgeführt, so dass dieser sichtlich geknickt und das Spermium unbeweglich war. Es wurde davon ausgegangen, dass dann die Spermienmembran aufgebrochen war. Danach wurde das Spermium in die Injektionspipette aufgenommen und in den TCM 199-Tropfen gewechselt.

#### 3.2.10 Auswahl der Eizellen für die ICSI

Die Auswahl der Eizellen für die ICSI erfolgte wie bereits beim Pferd beschrieben (Kapitel 3.1.9).

#### 3.2.11 Ablauf der ICSI

Der Ablauf der ICSI erfolgte wie bereits beim Pferd beschrieben (Kapitel 3.1.10).

Bei der Injektion des Spermiums in die Eizelle wurden zwei verschiedene Techniken angewandt:

1. Bei Einsatz des Piezo-Elements erfolgte der Ablauf analog zum Vorgehen beim Pferd (Kapitel 3.1.10)
2. Bei der Injektion mit der spitzen Injektionspipette wurde diese ebenfalls bei 3 Uhr positioniert und dann vorsichtig mit der Spitze durch die Zona pellucida in die Eizelle und das Oolemm eingedrungen. Um sicherzugehen, dass das Oolemm tatsächlich penetriert wurde, erfolgte auch hier die Aspiration von etwas Ooplasma. Anschließend erfolgte die Injektion des Spermiums, wobei darauf geachtet wurde, möglichst wenig Medium aus der Injektionspipette in die Eizelle zu injizieren.

Nachdem alle vollständig gereiften Eizellen einer Gruppe injiziert waren, wurden diese im Brutschrank aufbewahrt, bis die ICSI bei den verbleibenden Oozyten durchgeführt war.

#### 3.2.12 Sham-Injektion und chemische Aktivierung

Als Kontrollgruppe wurde ein Teil der Oozyten sham-injiziert. Dabei wurde die Oozyte mit der Injektionspipette wie oben beschrieben penetriert und eine geringe Menge Medium injiziert. Die sham-injizierten Eizellen wurden vor und nach der ICSI ebenso wie die injizierten Eizellen behandelt.

Bei einer weiteren Kontrollgruppe wurden die maturierten Eizellen ausgewählt und diese direkt chemisch aktiviert.

#### 3.2.13 Aktivierung der Oozyten

Bei der Aktivierung der Eizellen während und nach der ICSI wurden drei verschiedene Aktivierungsmodelle miteinander verglichen:

1. Mechanische Aktivierung mithilfe des Piezo-Elements
2. Chemische Aktivierung mithilfe von Ionomycin und 6-DMAP
3. Mechanische Aktivierung mithilfe des Piezo-Elements und anschließend chemische Aktivierung mithilfe von Ionomycin und 6-DMAP

##### *3.2.13.1 Mechanische Aktivierung mithilfe des Piezo-Elements*

Die mechanische Aktivierung mithilfe des Piezo-Elements erfolgte direkt während der ICSI. Das Abgeben der Piezo-Impulse an die Zona pellucida und das Oolemm direkt vor der Injektion des Spermiums sollten die Oozyte aktivieren.

##### *3.2.13.2 Chemische Aktivierung*

Die chemische Aktivierung wurde direkt im Anschluss an die ICSI gestartet. Es wurde sich dabei an dem Aktivierungsregime orientiert, welches zuerst von Rho et al. (1998) beschrieben worden war.

Zunächst erfolgte ein 5-minütiger Aktivierungsschritt in 0,05 mM Ionomycin.

Dazu war zunächst eine Ionomycin-Stocklösung hergestellt worden, bei der 2,6 µl 5 µM Ionomycin in 1 ml DMSO gelöst wurden. Anschließend wurde von dieser Stocklösung 3,7 µl Aliquots hergestellt. Vor der ICSI wurde ein Ionomycin-Aliquot in 996,3 µl TCM gelöst und hieraus 100 µl Tropfen pipettiert, mit Öl überschichtet und im Brutschrank vorinkubiert.

Im Anschluss an die ICSI wurden die injizierten Eizellen zunächst drei Mal in TCM 199 gewaschen und dann für 5 Minuten in die Ionomycin-Aktivierungssubstanz gesetzt.

Nach der Aktivierung mit Ionomycin wurden die injizierten Eizellen drei Mal in Fert-Talp-Gebrauchslösung gewaschen und anschließend in vorinkubierten 100 µl Tropfen Fert-Talp-

### 3. Material und Methoden

Gebrauchslösung für 3 Stunden im Brutschrank belassen. In dieser Zeit sollte der zweite Polkörper ausgeschleust werden.

Der letzte Aktivierungsschritt erfolgte in 0,05 mM 6-DMAP (6-Dimethylaminopurin).

Es wurde zunächst 326,4 µg 2 mM 6-DMAP in 1 ml DMSO gelöst und von dieser Lösung Aliquots der Menge 16,2 µl hergestellt. Vor der ICSI wurde jeweils eines dieser Aliquots mit 983,7 µl SOF aa (mit 0,4 g/ml BSA (FAF) und 16 mM Glukose) gelöst und hieraus 100 µl Tropfen pipettiert und vorinkubiert.

Nach der Zeit in der Fert-Talp-Gebrauchslösung wurden die Oozyten zunächst in SOF aa mit 0,4 g/ml BSA (FAF) und 16 mM Glukose gewaschen und anschließend für 3 Stunden in die 6-DMAP-Aktivierungssubstant gesetzt.

Alle Aktivierungsschritte erfolgten bei 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 38,2°C.

#### *3.2.13.3 Mechanische Aktivierung mithilfe des Piezo-Elements und anschließend chemische Aktivierung*

Bei diesem Aktivierungsmodell wurde eine Kombination der beiden zuvor beschriebenen Aktivierungsmethoden gewählt.

Es erfolgte zunächst während der ICSI die Aktivierung der Oozyte mithilfe der Piezo-Impulse.

Direkt nach der ICSI schloss sich dann die chemische Aktivierung der Eizellen an.

#### 3.2.14 In-vitro-Kultivierung

Die Kultivierung der injizierten Eizellen erfolgte in Tropfen der Größe 30 µl. Von diesen wurden jeweils 4 pro Petrischale (35 mm) pipettiert, ölüberschichtet und im Brutschrank bei ~20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 38,2°C vorgewärmt. Die injizierten Oozyten wurden dann zunächst drei Mal im jeweiligen Kultivierungsmedium gewaschen und anschließend in Gruppen von 5-7 in die Kulturtropfen gesetzt und bei 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> und 38,2 °C inkubiert.

Es wurden drei verschiedene Kultivierungsmedien eingesetzt:

Medium 1: SOFaa mit 0,4 g/ml BSA (FAF) und 0 mM Glukose (SOFaa)

Medium 2: SOFaa mit 0,4 g/ml BSA (FAF) und 16 mM Glukose (SOFaa + Glukose)

Medium 3: DMEM/F-12 mit 0,4 g/ml BSA (FAF) und 17,5 mM Glukose (DMEM/F-12)

### 3. Material und Methoden

Je nachdem, um welche Versuchsgruppe es sich handelte, wurden die Oozyten entweder nach 18 Stunden aus dem Kultivierungsmedium entnommen und gefärbt oder aber für 7 Tage kultiviert, um die Teilungsraten beurteilen zu können.

#### 3.2.15 Beurteilung der Teilungsraten

Die Feststellung der Teilungsraten erfolgte jeweils an Tag 3 und Tag 7 nach der ICSI. Die Raten wurden dabei morphologisch unter dem Stereomikroskop beurteilt. Es wurde beobachtet, wieviele der Zygoten sich zu welchem Zeitpunkt geteilt hatten und in welchem Zellstadium sie sich befanden.

#### 3.2.16 Färbung mit Hoechst 33342 zur Darstellung der Vorkerne und Polkörper

Nach 18 Stunden in Kultivierung erfolgte die Färbung der spermieninjizierten und sham-injizierten Oozyten mit Hoechst 33324. Es wurde im abgedunkelten Raum gearbeitet. Die Oozyten wurden zunächst 3 Mal in 0,1% PVA (Polyvinylalkohol gelöst in PBS) gewaschen. Die Lösung, in der gefärbt wurde, bestand aus Hoechst 33342, welches 1%-ig in PVA gelöst worden war. Das Färben der Eizellen erfolgte in einem 100 µl Tropfen der Färbelösung. Dazu wurden die Eizellen für 3 Minuten in die Färbelösung gesetzt. Anschließend wurden die gefärbten Oozyten erneut 3 Mal in PVA gewaschen und schließlich auf Objektträgern fixiert, wobei auf einen Objektträger jeweils 2 Eizellen gesetzt und einzeln unter einem Deckgläschen gequetscht wurden.

#### 3.2.17 Auswertung der Färbungen

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop der Firma Olympus mithilfe der Nutzung verschiedener Fluoreszenzmodule. Die Anregung des Hoechst-Farbstoffes erfolgte mit einer Wellenlänge von 361 nm, dessen Auswertung bei 497 nm. Der MitoTracker-Farbstoff wurde mit einer Wellenlänge von 490 nm angeregt und bei einer Wellenlänge von 516 nm ausgewertet. Anschließend wurden die Bilder aus der Hoechst- und der MitoTracker-Färbung übereinandergelegt.

Mithilfe der Hoechst-Färbung konnte beurteilt werden, ob beide Polkörper erfolgreich ausgeschleust wurden. Zudem konnten ausgebildete Vorkerne beurteilt und außerdem erkannt werden, wenn eine Oozyte in der Metaphase II verblieben war oder wenn der Spermienkopf nicht dekondensiert war.

### 3. Material und Methoden

Die Anfärbung der Mitochondrien des Spermienmittelstücks vor der ICSI mithilfe des MitoTrackers ermöglichte zum einen die Beurteilung, ob die ICSI erfolgreich durchgeführt wurde, zum anderen konnte so die Zuordnung des männlichen Vorkerns (siehe Abbildung 16), ebenso wie die eindeutige Beurteilung, ob eine Dekondensation des Spermienkopfchromatins stattgefunden hatte oder nicht erfolgen (siehe Übersicht: Auswertung der Färbungen).

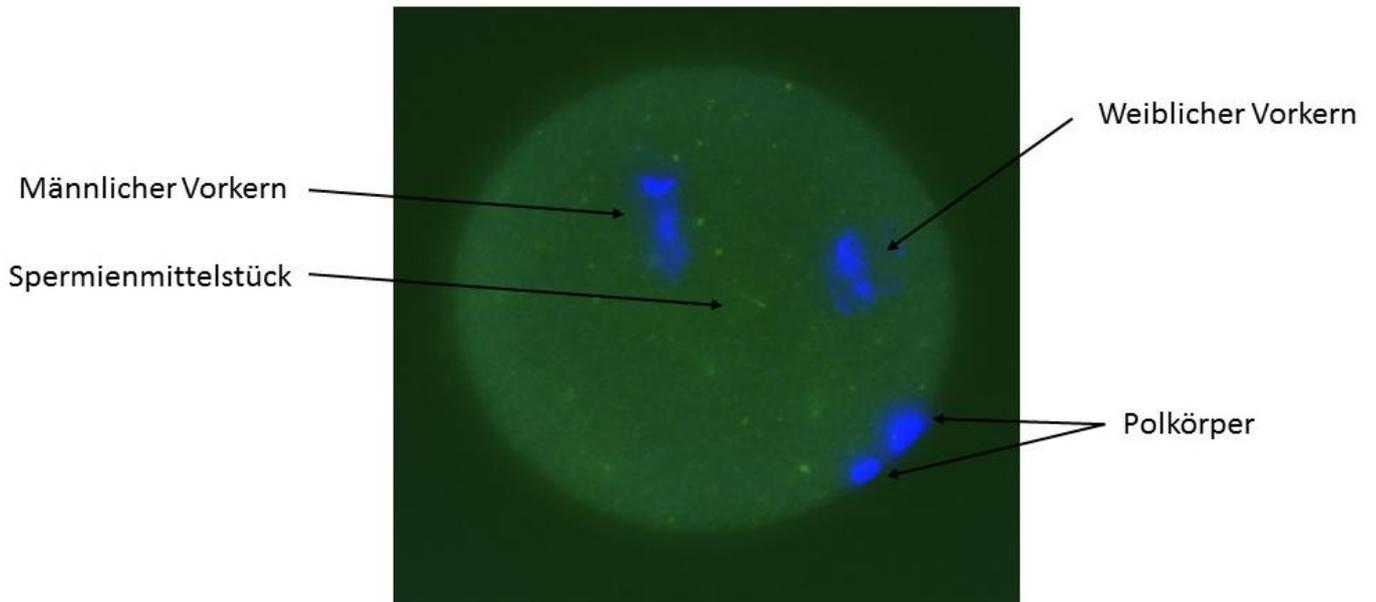
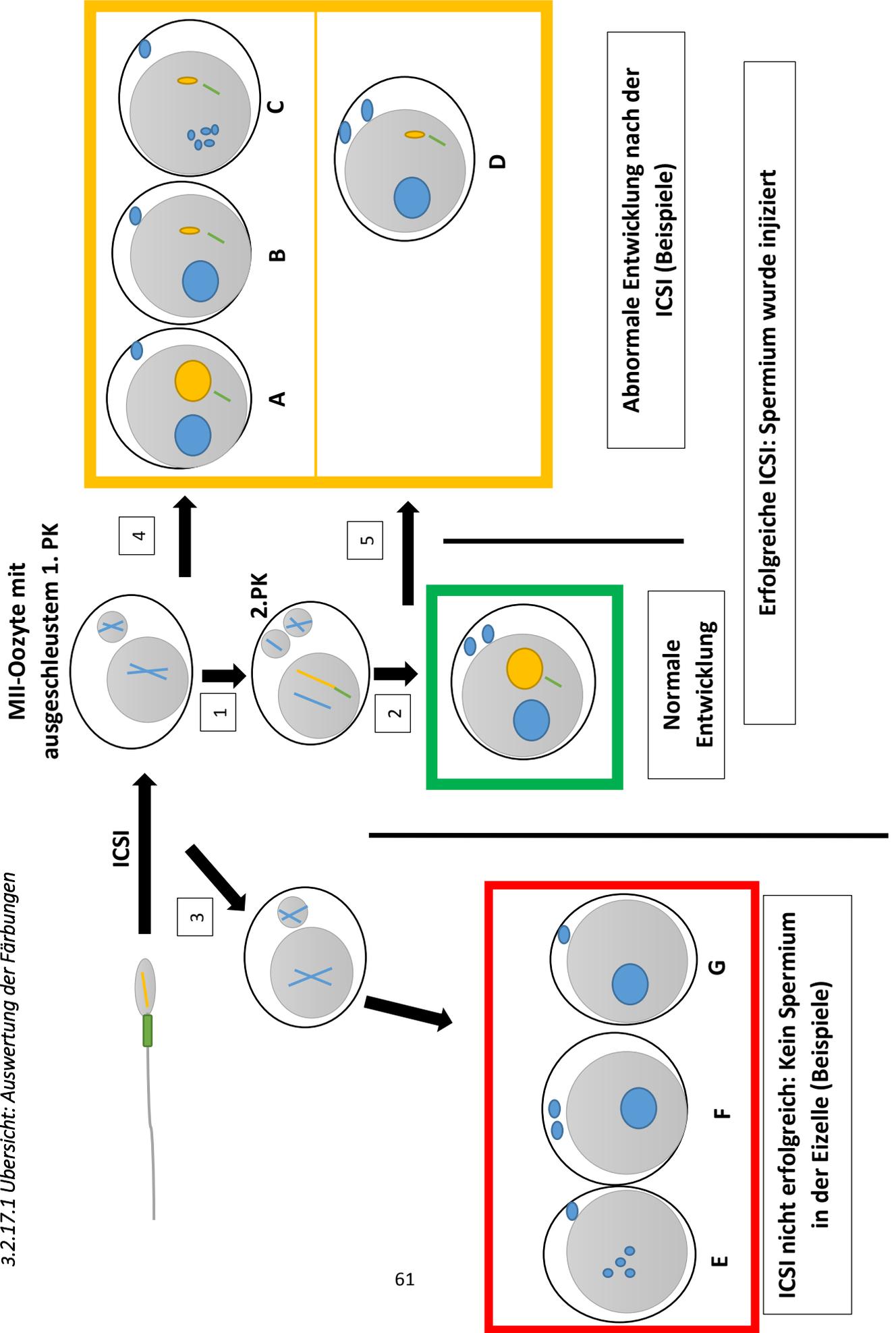


Abbildung 16: Kombination der Färbung mit MitoTracker FM und Hoechst 33342

3.2.17.1 Übersicht: Auswertung der Färbungen



### 3.2.17.2 *Legende der Übersicht: Auswertung der Färbungen*

#### **Bedeutung**

Blau: Erbgut der Eizelle

→ ausgeschleuster 1. Polkörper

→ nach erfolgreicher zweiter Reifeteilung: ausgeschleuster 2. Polkörper

→ nach erfolgreicher ICSI: potenzieller weiblicher Vorkern

Gelb: Erbgut des Spermiums → potenzieller männlicher Vorkern

Grün: Spermienmittelstück, angefärbt mit MitoTracker Green® FM

#### **Vorgänge**

1 – Das Ausschleusen des 2. Polkörpers ist erfolgt. Die zweite meiotische Reifeteilung wurde vollendet.

2 – Es entwickeln sich nach erfolgreicher Befruchtung mittels ICSI ein weiblicher und ein männlicher Vorkern.

3 – Die ICSI war nicht erfolgreich. Das Spermium wurde nicht erfolgreich injiziert.

4 – Das Ausschleusen des 2. Polkörpers ist nicht erfolgt.

5 – Der 2. Polkörper wurde zwar ausgeschleust, die weitere Entwicklung der ICSI-befruchteten Eizelle verläuft jedoch nicht physiologisch: es bildet sich ein weiblicher haploider Vorkern, während die Ausbildung des männlichen Vorkerns nicht gelingt.

#### **Erfolgreiche ICSI**

##### 1. Normale Entwicklung nach ICSI (grüner Kasten)

Beide Polkörper wurden ausgeschleust. Es haben sich zwei Vorkerne ausgebildet. Das Spermienmittelstück ist zu sehen (grün) und dem männlichen Vorkern (gelb) zuzuordnen.

##### 2. Abnormale Entwicklung nach ICSI (gelber Kasten)

Die Injektion des Spermiums ist zwar erfolgt, die Entwicklung der Eizelle entspricht aber nicht den gewünschten physiologischen Abläufen.

*A bis C: Das Ausschleusen des zweiten Polkörpers ist nicht erfolgt.*

A – Der männliche und der weibliche Vorkern haben sich ausgebildet. Der weibliche Vorkern ist in diesem Fall diploid.

B – Die Spermienkopf-DNA ist nicht dekontensiert. Der weibliche (diploide) Vorkern hat sich ausgebildet.

### 3. Material und Methoden

C – Die Spermienkopf-DNA ist nicht dekondensiert. Die Eizelle verbleibt im MII-Arrest.

*D: Der zweite Polkörper wurde ausgeschleust, die weitere Entwicklung der Eizelle verläuft nicht physiologisch.*

D – Die Spermienkopf-DNA ist nicht dekondensiert. Der weibliche (haploide) Vorkern hat sich ausgebildet.

#### **Nicht erfolgreiche ICSI (roter Kasten)**

Die Injektion des Spermiums in die Eizelle ist nicht erfolgt. Das Spermienmittelstück ist nicht zu sehen:

E – MII-Arrest der Eizelle

F – Beide Polkörper wurden ausgeschleust. Der weibliche (haploide) Vorkern hat sich ausgebildet.

G – Der zweite Polkörper wurde nicht ausgeschleust. Der weibliche (diplode) Vorkern hat sich ausgebildet.

Die Einteilung in „erfolgreich/nicht-erfolgreich“ und „normal/abnormal“ erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Lee et al. (2015).

#### **3.2.18 Bestimmung der Glukosekonzentration im Kultivierungsmedium**

Für die verschiedenen Kultivierungsmedien wurde jeweils an Tag 0 frisches Medium in 1,5 ml Eppendorfgläser bei -20 °C eingefroren. Direkt nach der Entnahme der Eizellen aus den Kultivierungstropfen für die Hoechst-Färbung, also 18 Stunden Kultivierungsdauer nach der ICSI, wurden die 30 µl-Tropfen der ICSI und sham-Gruppen ebenfalls bei -20 °C eingefroren. Zusätzlich wurde ein öl-überschichteter leerer Tropfen des jeweiligen Mediums zur Glukosebestimmung eingefroren.

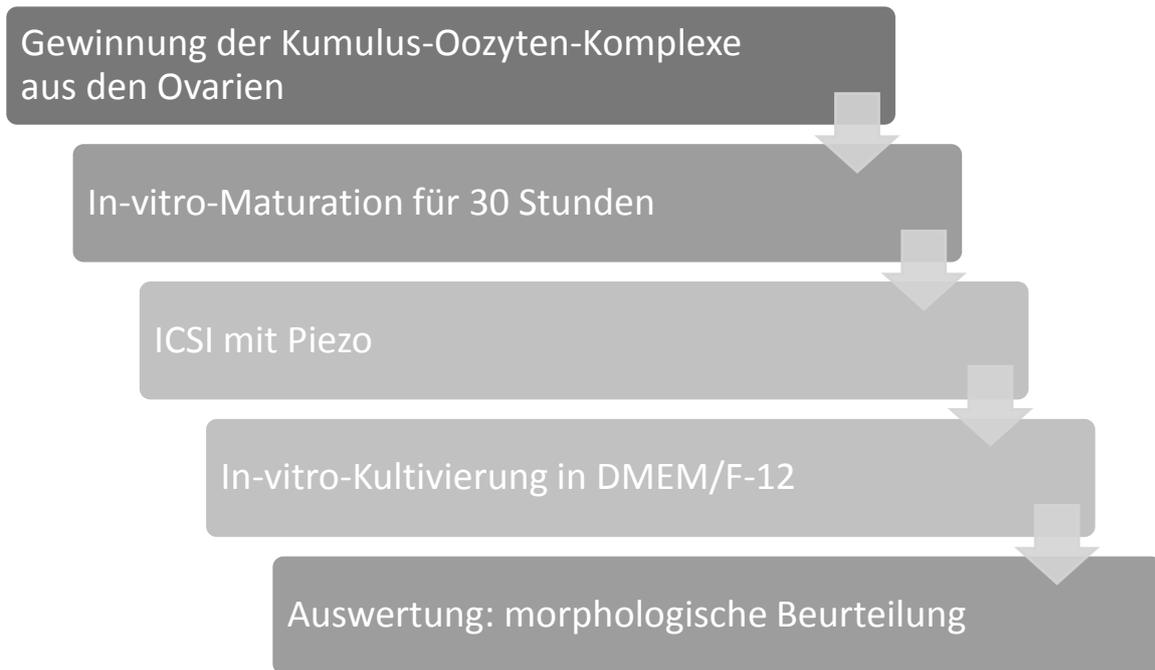
Die Bestimmung der Glukosekonzentration im jeweiligen Medium wurde mit dem Radiometer Copenhagen ABL 615 durchgeführt. Die Messung erfolgte dabei mithilfe einer amperometrischen Elektrode, welche eine Anode und eine Kathode, die von einem Elektrolyt umgeben ist, enthielt. Der Elektrode wurde nun eine Spannung von 675 mV zugeführt, so dass Strom von der Anode zur Kathode floss. Sobald die Elektrodenmembran mit dem jeweiligen Medium in Berührung kam, wurde die Glukose durch die Glukose-Oxidase metabolisiert.

### 3. Material und Methoden

Dabei entstand Wasserstoffperoxid, welches zur Anode diffundierte. Durch die angelegte Polarisationsspannung wurde das Wasserstoffperoxid an der Anode gespalten, wodurch freie Elektronen entstanden, welche wiederum zur Kathode wanderten. Folglich stellte sich die Glukosekonzentration im jeweiligen Medium als proportional zum Elektronenfluss dar.

#### 3.3 Allgemeiner Versuchsaufbau

##### 3.3.1 ICSI beim Pferd

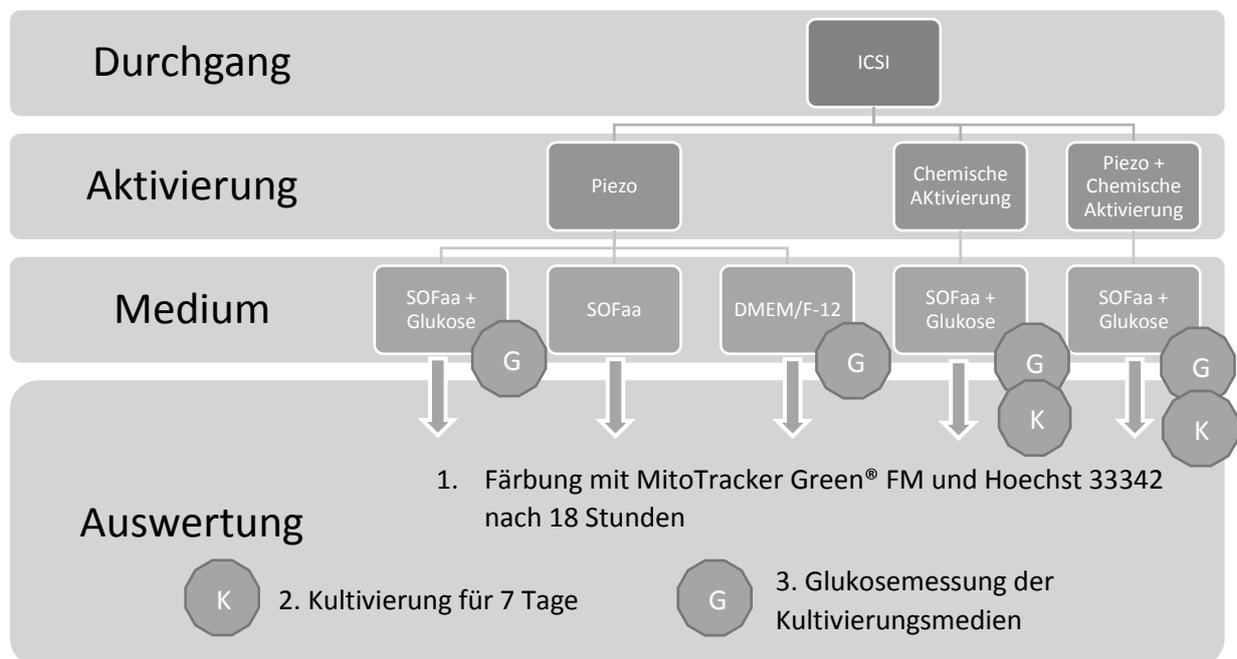


### 3. Material und Methoden

#### 3.3.2 Heterologe Spermieninjektion

Es wurden zunächst die ICSI-Durchgänge durchgeführt, bei welchen die Eizellaktivierung mithilfe des Piezo-Elements durchgeführt wurde. Im Rahmen dessen wurden die drei Medien zur Kultivierung miteinander verglichen. Da bei den Erfolgsraten der ICSI keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kultivierungsmedien festgestellt wurden (siehe Ergebnisteil), wurde bei den Untersuchungen zu den unterschiedlichen Aktivierungsmethoden SOF aa mit 16 mM Glukose als alleiniges Kultivierungsmedium genutzt.

##### 3.3.2.1 Übersicht der ICSI-Gruppen

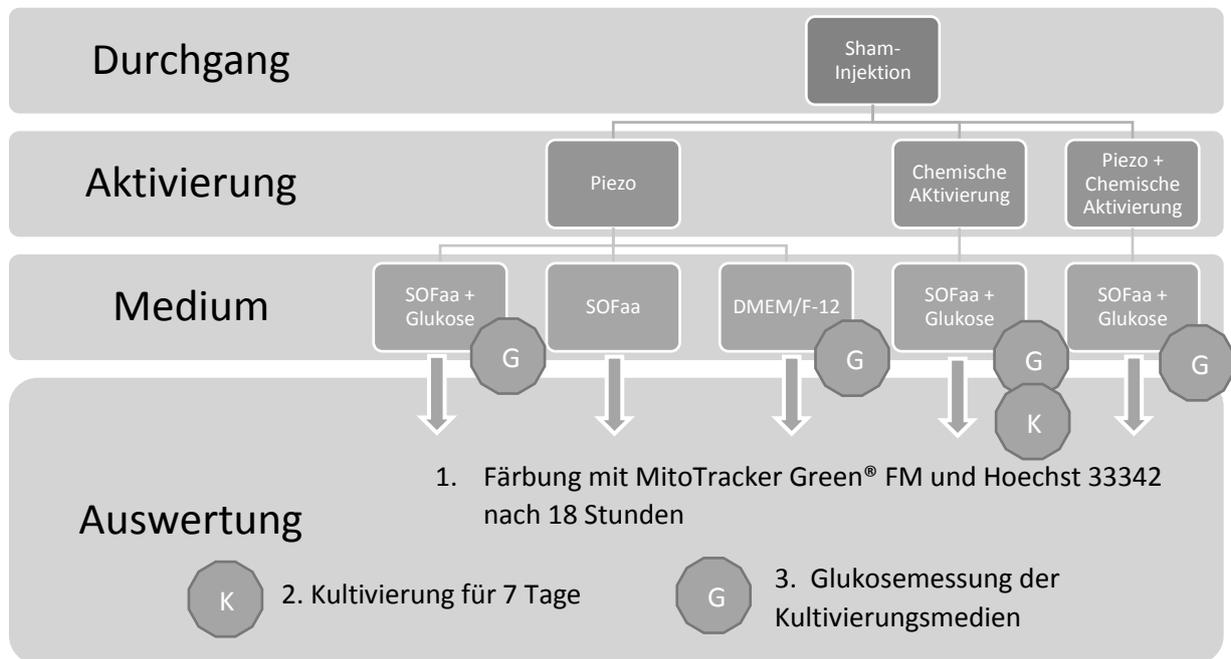


#### Erläuterung zur Auswertung:

Aus allen Gruppen wurden nach 18 Stunden Zygoten mit MitoTracker Green® FM und Hoechst 33342 gefärbt. Aus manchen Gruppen wurden weiterhin Zygoten für 7 Tage in vitro kultiviert (K), während bei 4 Gruppen auch eine Glukosemessung des Kultivierungsmediums nach 18 Stunden erfolgte (G).

### 3. Material und Methoden

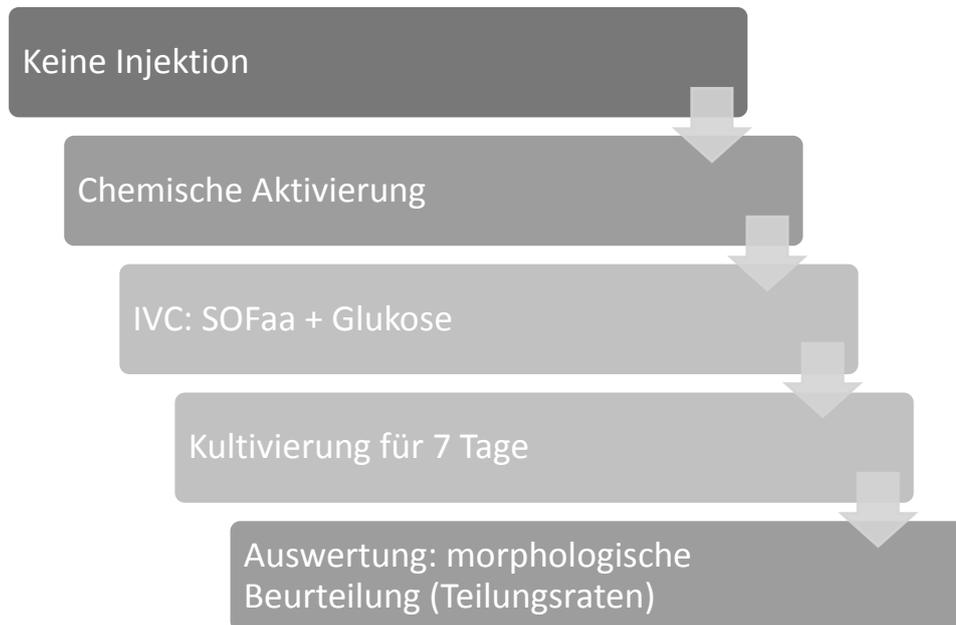
#### 3.3.2.2 Übersicht der Sham-Gruppen



#### Erläuterung zur Auswertung:

Aus allen Gruppen wurden nach 18 Stunden Zygoten mit MitoTracker Green® FM und Hoechst 33342 gefärbt. Aus manchen Gruppen wurden weiterhin Zygoten für 7 Tage in vitro kultiviert (K), während bei 4 Gruppen auch eine Glukosemessung des Kultivierungsmediums nach 18 Stunden erfolgte (G).

#### 3.3.2.3 Übersicht der chemisch aktivierten Gruppe



#### 3.4 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm der Firma Analyse-it genutzt. Alle Fragestellungen wurden wie folgt statistisch ausgewertet: Die Bestimmung der Normalverteilung innerhalb der einzelnen Ergebnis-Gruppen erfolgte mithilfe des Shapiro-Wilk Tests. Anschließend wurde eine einseitige Varianzanalyse (One-Way-Anova-Test) durchgeführt. Danach fand ein Tukey-Test statt. Bei einem p-Wert von  $< 0,05$  wurde der Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen als signifikant bezeichnet.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Hoechst- und MitoTracker-Färbung wurde im Ergebnisteil auch der Anteil der nicht auswertbaren Oozyten mitaufgeführt. Diese wurden allerdings nicht in die weitere statistische Untersuchung mit einbezogen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der ICSI beim Pferd

#### 4.1.1 Ermittlung der Reifungs- und Teilungsraten

In der Zeit von August 2015 bis November 2016 wurden insgesamt 46 Ovarien von 23 Stuten für die Versuche zur ICSI beim Pferd genutzt. Dabei konnten 143 Kumulus-Oozyten-Komplexe gewonnen werden, welche in drei Gruppen, kompakter Kumulus (88), expandierter Kumulus (30) und Teil- bzw. kein Kumulus (25) unterteilt wurden. Es lag folgendes Verhältnis der drei Gruppen vor:

1. KOK mit kompaktem Kumulus: 49,5%
2. KOK mit expandiertem Kumulus: 26,3%
3. KOK mit Teil- bzw. keinem Kumulus: 18,0%

Die drei Gruppen wurden gemeinsam maturiert und im Rahmen der Auswertung nicht mehr unterschieden. Nach 30 Stunden im Maturationsmedium konnte die Reifung von 71 Eizellen beobachtet werden. Es lag eine durchschnittliche Maturationsrate von 48,2% vor. Alle gereiften Eizellen wurden nach 30 Stunden mithilfe der ICSI befruchtet.

Nach 3 und nach 7 Tagen wurden die injizierten Oozyten mikroskopisch beurteilt und die Anzahl der geteilten Oozyten festgestellt. Dabei konnten in den insgesamt 14 Versuchsdurchgängen 6 geteilte Eizellen, in der Regel im 8-Zell-Stadium, beobachtet werden. Dies ergab eine Teilungsrate von 4,2%.

In der folgenden Tabelle sind die durchgeführten Versuche zur ICSI beim Pferd noch einmal in einer Übersicht zusammengefasst.

*Tabelle 5: Übersicht Ergebnisse der ICSI beim Pferd*

Durchgänge	Ovarien	Eizellen	Eizellen/Ovar	Maturiert	% ( $\bar{x} \pm SD$ )	Geteilt	% ( $\bar{x} \pm SD$ )
14	46	143	3,9 $\pm 2,3$	71	48,2 $\pm 22,1$	6	4,2 $\pm$ 7,2

## 4. Ergebnisse

### 4.2 Ergebnisse der heterologen ICSI

In der Zeit von Juni 2016 bis November 2017 wurden insgesamt 438 Oozyten in 33 Versuchsdurchgängen mittels heterologer ICSI befruchtet (alle Untersuchungen zur Vorkernausbildung zusammengefasst). Parallel dazu wurden 319 Eizellen in 32 Versuchsdurchgängen als Kontrollgruppe sham-injiziert. Für die Bestimmung der Teilungsraten nach ICSI bzw. Sham-Injektion und/oder chemischer Aktivierung wurden in 16 Versuchsdurchgängen 256 Eizellen genutzt.

#### 4.2.1 Vorkernausbildung nach heterologer ICSI

Um eine Beurteilung der Ausbildung des männlichen Vorkerns vornehmen zu können, wurde die ICSI mithilfe MitoTracker® Green FM gefärbter Spermien durchgeführt. Jeweils 18 Stunden nach der ICSI beziehungsweise der Sham-Injektion erfolgte die Färbung der injizierten Eizellen mithilfe von Hoechst 33342 und die Beurteilung der Vorkernausbildung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Zuordnung des angefärbten Spermienmittelstücks zu einem Vorkern ermöglichte es, festzustellen, ob es sich um eine ICSI mit normaler Entwicklung, also mit zwei ausgeschleusten Polkörpern und je einem männlichen und einem weiblichen Vorkern handelte.

Bei der Beurteilung der Vorkernausbildung nach der heterologen ICSI erfolgte die Einteilung der Ergebnisse in die folgenden Gruppen:

1. Erfolgreiche ICSI mit normaler Entwicklung: zwei ausgeschleuste Polkörper und zwei ausgebildete Vorkerne (ein männlicher und ein weiblicher Vorkern; 2 PK + 2 VK)
2. Erfolgreiche ICSI mit abnormaler Entwicklung (Abnormal)
3. Kein Spermium in der Eizelle vorhanden: die ICSI war nicht erfolgreich (Kein Spermium)
4. Nicht auswertbare Ergebnisse (NA)

Bei der Beurteilung der sham-injizierten, aktivierten Eizellen erfolgte die Einteilung in folgende Gruppen:

1. Erfolgreiche haploide Aktivierung: Zwei ausgeschleuste Polkörper und ein Vorkern (2 PK + 1 VK)
2. Diploide Aktivierung: Ein ausgeschleuster Polkörper und ein Vorkern (1 PK + 1 VK)
3. Keine Aktivierung erfolgt (Keine Aktivierung)
4. Nicht auswertbare Ergebnisse (NA)

*4.2.1.1 Auswirkung verschiedener Glukosekonzentrationen im Kultivierungsmedium auf die Vorkernausbildung*

Es wurde die Auswirkung verschiedener Glukosekonzentrationen im Kultivierungsmedium auf die Ausbildung der Vorkerne nach der heterologen ICSI und nach der Sham-Injektion beurteilt.

Es wurden folgende drei Medien verglichen:

Medium 1: SOFaa mit 0 mM Glukose (SOFaa)

Medium 2: SOFaa mit 16 mM Glukose (SOFaa + Glukose)

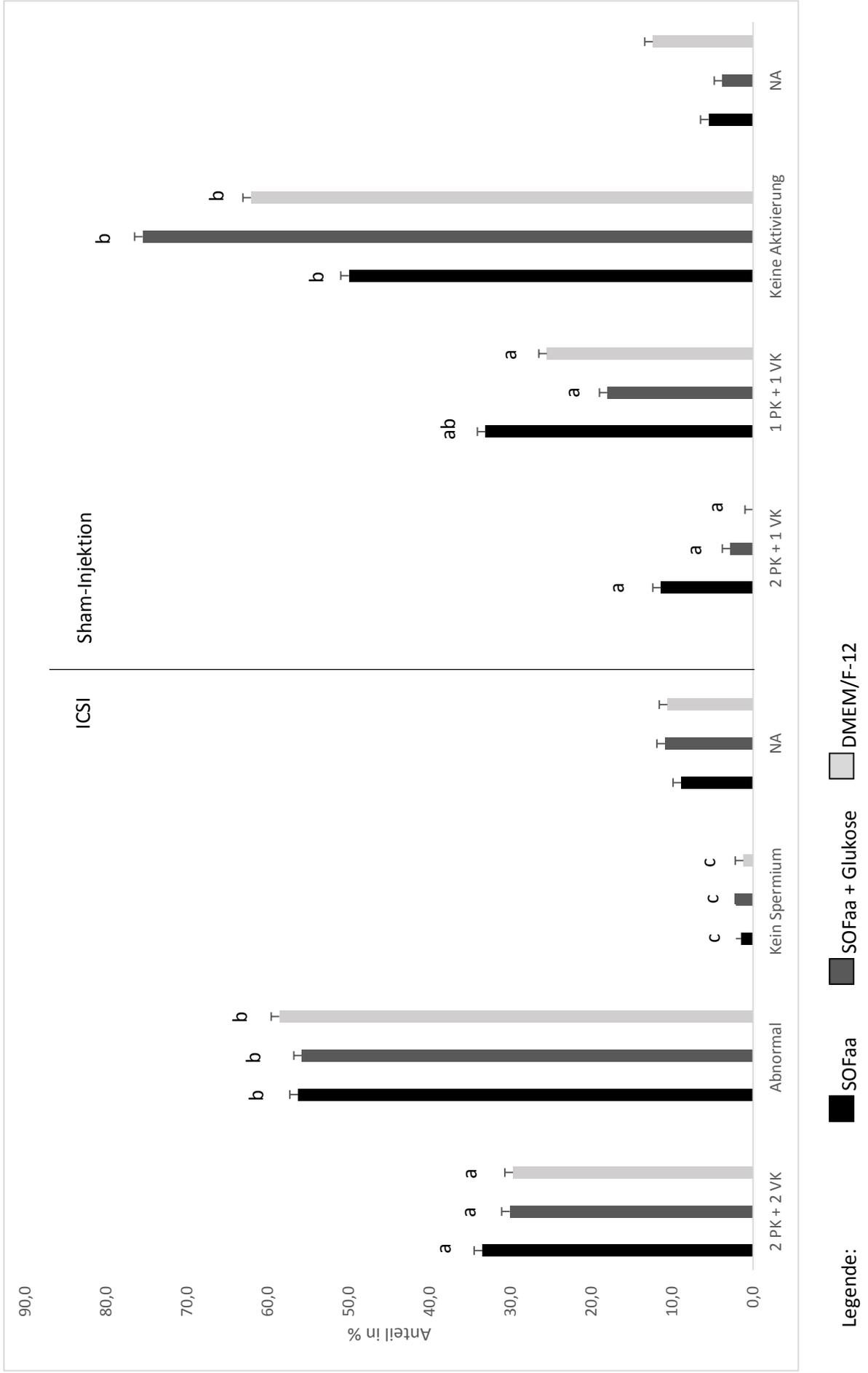
Medium 3: DMEM/F-12 mit 17,5 mM Glukose (DMEM/F-12)

In allen drei Versuchsgruppen wurde die ICSI beziehungsweise die Sham-Injektion mithilfe des Piezo-Elements durchgeführt (Übersicht zum Versuchsaufbau zu finden in Kapitel 3.3).

Im Folgenden sind die Ergebnisse der verschiedenen Gruppen im Vergleich aufgeführt (Diagramm 1).

## 4. Ergebnisse

Diagramm 1: Vergleich verschiedener Glukosekonzentrationen hinsichtlich der Auswirkung auf die Vorkernentwicklung (MW + SD)  
 Zwischen den verglichenen Medien konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.  
 Unterschiede bei den Ergebnissen innerhalb der jeweiligen Medien (2 PK + 2 VK zu Abnormal zu Kein Spermium bzw. 2 PK + 1 VK zu 1 PK + 1 VK zu Keine Aktivierung) sind dargestellt; a:b:c p<0,05



## 4. Ergebnisse

### *4.2.1.2 Auswirkung verschiedener Aktivierungsmethoden auf die Vorkernausbildung*

Es wurde die Auswirkung verschiedener Aktivierungsmethoden auf die Ausbildung der Vorkerne nach der heterologen ICSI beurteilt. Dazu wurden folgende Aktivierungsprotokolle miteinander verglichen:

1. Aktivierung mithilfe des Piezo-Elements (Piezo)
2. Chemische Aktivierung (CA)
3. Aktivierung mithilfe des Piezo-Elements und anschließende chemische Aktivierung (Piezo + CA)

Als Kontrollgruppen wurden sham-injizierte Eizellen genutzt.

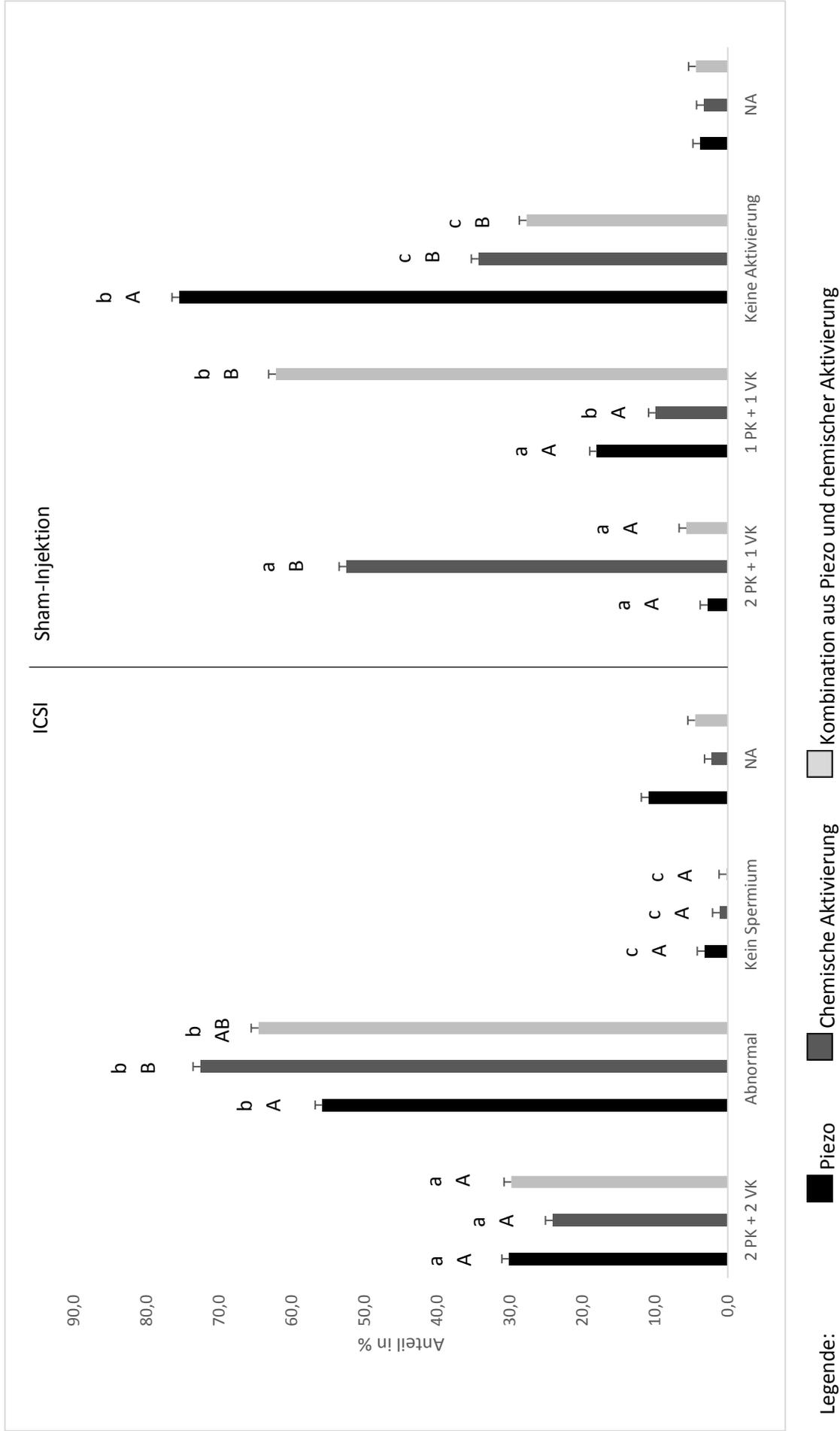
Das Kultivierungsmedium war in allen drei Vergleichsgruppen SOFaa, dem 16 mM Glukose zugefügt wurde.

Die Auswertung erfolgte nach derselben Einteilung wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben.

Im folgenden Diagramm sind die einzelnen Gruppen im Vergleich aufgeführt (Diagramm 2).

#### 4. Ergebnisse

Diagramm 2: Vergleich verschiedener Aktivierungsprotokolle hinsichtlich der Auswirkung auf die Vorkernentwicklung (MW + SD) Unterschiede zwischen den verglichenen Aktivierungen sind dargestellt; A:B:C p<0,05 Unterschiede bei den Ergebnissen innerhalb einer Aktivierungsgruppe (2 PK + 2 VK zu Abnormal zu Kein Spermium bzw. 2 PK + 1 VK zu 1 PK + 1 VK + 1 VK zu Keine Aktivierung) sind dargestellt; a:b:c p<0,05



## 4. Ergebnisse

### 4.2.2 Bestimmungen der Glukosekonzentration in den unterschiedlichen Kultivierungsmedien

Im Rahmen der Bestimmung der Glukosekonzentration der Medien jeweils vor und nach der ICSI beziehungsweise der Sham-Injektion wurden die Medien zu den folgenden Zeitpunkten eingefroren, um sie später zu untersuchen:

1. Eine Kontrolle direkt vor der Injektion (Frisch)
2. Eine Kontrolle, welche keine Eizellen enthielt, jedoch 18 Stunden parallel zu den ICSI und Sham-Injektions-Gruppen behandelt wurde (Leer)
3. Das Medium, welches die Eizellen nach der ICSI enthielt, nach 18 Stunden (ICSI)
4. Das Medium, welches die sham-injizierten Eizellen enthielt, nach 18 Stunden (Sham)

Dabei wurden folgende Medien und Aktivierungsprotokolle genutzt:

1. DMEM/F12 und Aktivierung mithilfe des Piezo-Elements
2. SOFaa mit 16 mM Glukose und Aktivierung mithilfe des Piezo-Elements
3. SOFaa mit 16 mM Glukose und chemische Aktivierung
4. SOFaa mit 16 mM Glukose und die Kombination aus Piezo-Element und chemischer Aktivierung

DMEM/F12 hatte dabei eine Soll-Glukose Konzentration von 17,5 mmol/l.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse für die Glukosebestimmung zusammengefasst (Tabelle 6).

#### 4. Ergebnisse

*Tabelle 6: Bestimmung der Glukosekonzentration in den unterschiedlichen Kultivierungsmedien.  
Es konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.*

Aktivierung	Medium	Durchgänge	Soll- Konzentration der Glukose in mmol/l	Durchschnittliche Glukosekonzentration in mmol/l ( $\bar{x} \pm SD$ )				
				Frisch	Leer	ICSI	Sham	
<b>Piezo</b>	DMEM/F12 + BSA	5	17,5	18,3 $\pm 1,2$	15,7 $\pm 2,3$	17,6 $\pm 2,4$	16,2 $\pm$ 2,0	
<b>Piezo</b>	SOFaa + Glukose	8	16,0	15,7 $\pm 0,8$	14,5 $\pm 2,5$	14,5 $\pm 1,9$	13,2 $\pm$ 3,4	
<b>CA</b>	SOFaa + Glukose	9	16,0	14,7 $\pm 1,3$	14,6 $\pm 1,0$	14,9 $\pm 1,6$	13,9 $\pm$ 0,6	
<b>Piezo + CA</b>	SOFaa + Glukose	9	16,0	14,2 $\pm 1,7$	13,7 $\pm 2,6$	14,7 $\pm 2,6$	14,1 $\pm$ 2,2	

## 4. Ergebnisse

### 4.2.3. Teilungsraten im Rahmen der Kultivierung

Im Rahmen der Bestimmung der Teilungsraten nach der ICSI wurde als Kultivierungsmedium SOFaa + 16 mM Glukose genutzt.

Verglichen wurden die Aktivierung der injizierten Eizellen mithilfe einer Kombination aus Piezo-Element und der chemischen Aktivierung und die chemische Aktivierung. Als Kontrollgruppe wurden sham-injizierte Eizellen genutzt, welche chemisch aktiviert wurden, sowie Eizellen, welche nicht injiziert und lediglich chemisch aktiviert wurden.

Im folgenden Diagramm sind die Teilungsraten der Gruppen im Vergleich aufgeführt (Diagramm 3). Die Ergebnisse zeigten, dass die Teilungsraten der beiden ICSI-Gruppen sich nicht signifikant unterschieden. Weiterhin war die Teilungsrate der ICSI-Gruppe, welche mit dem Piezo in Kombination mit chemischen Stimuli aktiviert wurde, signifikant höher, als die Teilungsraten der beiden Kontroll-Gruppen (CA ohne Injektion und Sham-Injektion mit chemischer Aktivierung).

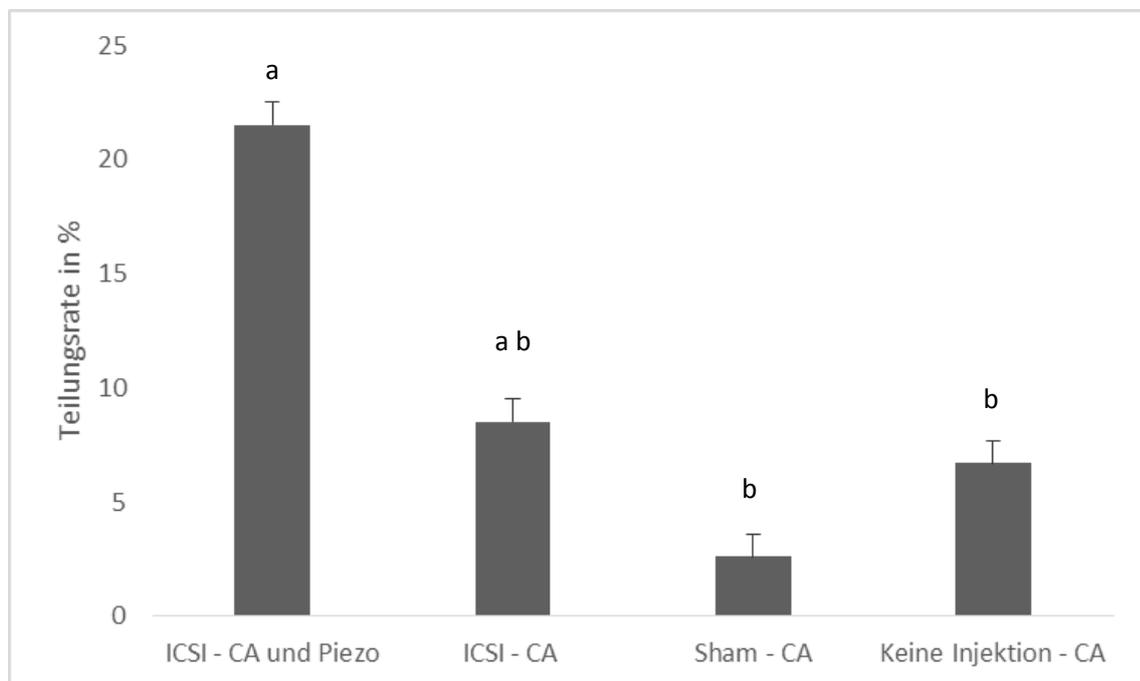


Diagramm 3: Teilungsraten im Vergleich (MW + SD); a:b  $p < 0,05$

## 5. Diskussion

### 5.1 Reifungs- und Teilungsraten der ICSI beim Pferd

#### 5.1.1 Reifungsraten nach ICSI beim Pferd

Ziel bei diesen Versuchen war es, die Gewinnung und die IVM bei Pferdeoozyten aus Schlachthofovarien zu etablieren, diese dann mittels ICSI zu befruchten und Blastozysten zu gewinnen. Dies sollte die Grundlage für weitere Versuche zu einer Optimierung bei der ICSI beim Pferd bilden. Es stand jedoch nicht genügend Material zur Verfügung, da in der Region Gießen kaum Pferde geschlachtet wurden. Daher erfolgten lediglich die Etablierung der Maturation, sowie erste Versuche zur Etablierung der ICSI.

Pro Ovar konnten 3,9 Eizellen gewonnen werden. Dies entspricht den Werten, welche in der Literatur genannt werden: zwischen 1,3 und 4,5 Oozyten können in der Regel pro Ovar gewonnen werden (Choi et al. 2007; Galli et al. 2007; Ambruosi et al. 2009).

Die Maturationsrate, welche im Durchschnitt erreicht wurde, lag bei 48,2%. Im Vergleich dazu werden für die Maturation in-vitro gewonnener Pferdeoozyten in der Literatur Erfolgsraten von 51% bis hin zu 90% genannt, was zeigt, dass die erreichte Maturationsrate noch nach oben gesteigert werden kann (Galli et al. 2007; Ambruosi et al. 2009; Leemans et al. 2015).

Die geringeren Maturationsraten können möglicherweise auf die mangelhafte Qualität der von Schlachttieren gewonnenen Oozyten zurückgeführt werden. So werden häufig alte Tiere geschlachtet, welche eventuell schon verringerte Fertilität aufweisen. Allerdings waren weder das Alter der geschlachteten Tiere noch deren Vorgeschichte und folglich auch bereits vorangegangene Erkrankungen nicht bekannt. Altermatt et al. (2009) konnten allerdings nachweisen, dass Oozyten von jungen und alten Stuten sich weder in der Teilung noch bei den Blastozystenraten unterschieden. Trotzdem kann eine sorgsame Auswahl der Tiere, von welchen Eizellen genutzt werden, möglicherweise zu einer Steigerung der Maturationsraten führen.

Weiterhin wäre eine Optimierung der Zusammensetzung des Maturationsmediums im Rahmen verschiedener Zusätze wie beispielsweise Insulin-like growth factor oder LH möglich (Lagutina et al. 2005).

## 5. Diskussion

Die Maturation erfolgte bei einer Temperatur von 38,2°C. In der Literatur sind Temperaturen von 38,2 bis 39°C für die IVM beschrieben (Comizzoli et al. 2002; Übersicht bei Hinrichs 2012;). Eine Veränderung der Temperatur, könnte eine Möglichkeit zur Steigerung der Maturationsraten darstellen.

Weiterhin wurden KOK der unterschiedlichen Gruppen (kompakter Kumulus, expandierter Kumulus, Kein bzw. Teil-Kumulus) in der IVM nicht unterschieden, sondern gemeinsam maturiert. Beim Pferd zeigen KOK mit expandiertem Kumulus eine höhere Maturationsrate als Eizellen mit kompaktem Kumulus (Hinrichs und Williams 1997; Übersicht bei Hinrichs 2010). Weiterhin hängt die optimale Dauer der Maturation vom Kumulus-Typ der Eizelle ab. Dabei liegt das Optimum für Eizellen mit expandiertem Kumulus bei 24 bis 30 Stunden und für solche mit kompaktem Kumulus bei 30 bis 36 Stunden (Hinrichs et al. 2005; Übersicht bei Hinrichs 2012). Eine Trennung der unterschiedlichen KOK-Gruppen zur Maturation und eine Nutzung der jeweils idealen Maturationszeit könnten folglich zu einer Steigerung der Erfolgsraten führen.

### 5.1.2 Teilungsraten nach ICSI beim Pferd

Die Teilungsraten nach ICSI beim Pferd blieben mit 4,2 % weit hinter den Erwartungen zurück. Es konnten zudem keinerlei Morula oder Blastozysten produziert werden.

Im Folgenden werden die angewandten Methoden hinterfragt und verschiedene Faktoren aufgeführt, welche Ursachen für den mangelnden Erfolg darstellen könnten.

In der Literatur werden üblicherweise Blastozystenraten von 25-35 % genannt (Choi et al. 2006 und 2007; Hinrichs et al. 2005; Ribeiro et al. 2008). Das Standard-Kultivierungsmedium ist hierbei modifiziertes DMEM/F-12, wobei kein anderes Kultivierungsmedium in der Literatur ähnlich verlässliche Kultivierungsraten produziert. Daher wurde auch in den durchgeführten Versuchen DMEM/F-12 mit 10% Fetal Bovine Serum genutzt.

Ein zweistufiges Kultivierungssystem stellt eine Alternative dar, welche diskutiert werden kann: Da der Embryo im Morula-Stadium größtenteils Pyruvat und Laktat als Energiequelle nutzt, könnte die hohe Glukosekonzentration von DMEM/F-12 die Aktivierung der Glykolyse auslösen, was den Embryo eventuell negativ beeinflusst. Erst die expandierte Blastozyste verstoffwechselt hauptsächlich Glukose (Lane et al. 2001). In der frühen Teilungsphase wäre also ein Medium mit geringer Glukosekonzentration von Vorteil, ab der Entwicklung der

## 5. Diskussion

Blastozyste sollte ein Medium mit hoher Glukosekonzentration genutzt werden. Andererseits konnten, seit sich die Blastozystenentwicklungsraten grundsätzlich durch den Einsatz von DMEM/F-12 verbessert haben, durch den Einsatz eines zweistufigen Kultivierungssystems keine Vorteile mehr beobachtet werden. So wird der Erfolg von DMEM/F-12 als Kultivierungsmedium gerade seiner hohen Glukosekonzentration zugesprochen (Lane und Gardner 2007). Gleichzeitig wurde aber auch bewiesen, dass Pferdeembryonen eine hohe Toleranz bezüglich der Glukosekonzentration besitzen, da dieselben Blastozystenentwicklungsraten für eine große Bandbreite verschiedener Glukosekonzentrationen (von 1 mM bis 20 mM) bestimmt werden konnten (Choi et al. 2015). Abschließend bleibt es also fraglich, ob ein Wechsel des Kultivierungsmediums zum Erfolg führen würde.

Die genutzte Methode zur Aufbereitung und Auswahl der Spermien kann ebenfalls diskutiert werden.

Es wurde tiefgefrorenes Hengstsperma genutzt, wobei Choi et al. (2002) nachweisen konnten, dass es keinen Unterschied macht, ob frisches oder Gefriersperma bei der ICSI eingesetzt wird. Daraus folgt, dass von einer Umstellung auf frisches Hengstsperma keine Erfolgssteigerung zu erwarten ist.

Choi et al. (2016) konnten nachweisen, dass ein hoher pH-Wert während der Sperma-Aufbereitung bei einigen Hengsten zu höheren Kultivierungsraten führt. Canel et al. (2017) konnten beim Rind bei der Behandlung der Spermien vor der ICSI mit Heparin eine Steigerung der Kultivierungsraten und der Blastozystenqualität beobachten. Eine Vorbehandlung der Spermien angelehnt an die beschriebenen Methoden, stellt eine Möglichkeit dar, die Erfolgsraten der ICSI zu steigern.

Die Größe der Tropfen, in welchen die Kultivierung erfolgte, betrug 30 µl. Choi et al. (2007) untersuchten die Auswirkung der Größe der IVC-Tropfen auf die Blastozystenrate bei der ICSI von Pferdeoozyten mit geringer meiotischer Kompetenz. Sie konnten nachweisen, dass die höchsten Blastozystenraten von 39% bei einer Kultivierungstropfengröße von 5 µl für 2-7 Zygoten erreicht wurden. Eine Anpassung des genutzten IVC-Protokolls auf die Nutzung von Kultivierungstropfen dieser Größe, könnte also zu einer Steigerung der Teilungsraten führen.

## 5. Diskussion

Die Aktivierung der equinen Eizellen im Rahmen der ICSI erfolgte bei den durchgeführten Versuchen mithilfe des Piezo-Elements. Dieses wurde 2002 beim Pferd das erste Mal eingesetzt und führte zu höheren Teilungsraten (>80%) (Choi et al. 2002; Galli et al. 2007).

Auch die chemische Aktivierung stellt beim Pferd eine Alternative dar. Dabei wurde jeweils eine Kombination aus Ionomycin und 6-DMAP oder Roscovitin eingesetzt. Die Erfolgsraten der Aktivierung lagen hierbei bei bis zu 59,5% (Fernandes et al. 2014). Eine weitere Option die Teilungs- und Entwicklungsraten zu steigern, bildet also die Umstellung auf die chemische Aktivierung oder aber eine Kombination aus elektrischer Aktivierung mithilfe des Piezo-Elements und der chemischen Aktivierung.

Choi et al. (2015) empfehlen, der Oozyte nach der ICSI die Möglichkeit zu geben, die Zellmembran zu reparieren, indem die injizierte Eizelle für 1-2 Stunden in ein neutrales „Haltemedium“ gesetzt werden, bevor die IVC beginnt. Die Einführung dieses zusätzlichen Schritts könnte eine Steigerung der Erfolgsraten mit sich bringen.

Abschließend bleibt zu sagen, dass ein großes Problem bei der Etablierung der Pferde-ICSI die gering vorhandenen Ressourcen bildeten. Zudem konnte über die Schlachttiere selbst nur wenig in Erfahrung gebracht werden, z.B. ob schon zuvor Infertilität bekannt war oder nicht augenscheinlich erkennbare Erkrankungen bestanden. Auch das Alter der Tiere, welches ebenfalls einen Einfluss auf die Fruchtbarkeit hat, war nicht bekannt, die Equidenpässe konnten nicht überprüft werden.

Da jedoch die IVM equiner Oozyten etabliert werden konnte, besteht die Wahrscheinlichkeit, dass mit zuverlässigeren Ressourcen auch die ICSI beim Pferd erfolgreich etabliert und letztendlich optimiert werden könnte.

### 5.2 Ergebnisse der heterologen ICSI

Die heterologe ICSI ermöglicht die Beobachtung früher Abläufe innerhalb der Befruchtung, z.B. der Vorkernausbildung, bei Spezies, von welchen nur bedingt Eizellen zur Verfügung stehen.

In den vorliegenden Versuchen wurden Rindereizellen als Modell genutzt, um die Ergebnisse der Vorkernausbildung, insbesondere auf der männlichen Seite, sowie die Auswirkung der Glukosekonzentration des IVC-Mediums und die Wahl der Aktivierungsmethode auf den equinen Embryo übertragen zu können. In der Vergangenheit wurden Rindereizellen bereits in verschiedenen Versuchen als heterologes Modell fürs Pferd eingesetzt (Li et al. 2003; Rodriguez et al. 2016). Jedoch schnitt im direkten tierartlichen Vergleich zwischen Rind, Schwein und Katze in der Gruppe der nicht aktivierten Eizellen das Rind am schlechtesten ab. Die Rate der Pronukleusausbildung betrug bei felines Oozyten 81%, bei Schweineoozyten lag sie bei 71% und bei bovinen injizierten Eizellen lag sie bei 43% (Rodriguez et al. 2016).

Aus den folgenden Gründen wurde entschieden, trotz dieser Studie, die Rinderoozyte zur heterologen ICSI einzusetzen.

Rinderoozyten wurden bereits als Modell für andere Spezies genutzt: Slavík et al. (1990) beschrieben, dass Schaf-Sperma in vitro gereifte Rinderoozyten penetrieren kann, und eine Entwicklung bishin zur Ausbildung von 2 Vorkernen stattfindet. Von Roth et al. (1999) wurden Rinderoozyten als Modell für eine bedrohte Art, die Säbelantilope, genutzt. Auch im humanmedizinischen Bereich werden bovine Oozyten als Modell genutzt: Terada et al. (2004) untersuchten die Spermienkopfdekondensation, die Aktivierung und die Mikrotubuli-Ausbildung nach der Injektion von humanen Spermien in bovine Oozyten. Die Rindereizelle ist folglich als heterologes Modell bereits erprobt und stellt eine zuverlässige Methode zur Beobachtung frühembryonaler Entwicklungen dar.

Weiterhin stellt die ICSI beim Rind eine etablierte Methode dar, mit welcher bereits lebende Nachkommen generiert werden konnten (Goto et al. 1990). Auch die Aktivierung boviner Eizellen mithilfe des Piezo-Elements wurde bereits erfolgreich durchgeführt (Katayose et al. 1999).

Die Nutzung von anderen Spezies, z.B. Schwein, als Modell fürs Pferd, kann aber durchaus in Betracht gezogen werden.

### 5.2.1 Vorkernausbildung nach heterologer ICSI

#### 5.2.1.1 Auswirkung der Glukosekonzentration im Kultivierungsmedium

Ziel der Versuchsreihe war es, die Vorkernausbildung nach heterologer ICSI in Kultivierungsmedien mit verschiedenen Glukosekonzentrationen zu vergleichen. Die Auswirkung einer hohen Glukosekonzentration auf die frühe Embryonalentwicklung wird in der Literatur viel diskutiert.

Wie bereits erwähnt, scheint beim Pferd eine hohe Glukosekonzentration nach der ICSI förderlich zu sein und der Erfolg von DMEM/F-12 als Kultivierungsmedium wird seiner hohen Glukosekonzentration zugesprochen (Lane und Gardner 2007). Gleichzeitig besitzen Pferdeembryonen eine hohe Toleranz bezüglich der Glukosekonzentration, da die Blastozystenentwicklungsraten für eine große Bandbreite verschiedener Glukosekonzentrationen (von 1 mM bis 20 mM) gleich waren (Choi et al. 2015). Da DMEM/F-12 als das Kultivierungsmedium mit den besten Ergebnissen angesehen wird und dieses eine Glukosekonzentration von 17,5 mM hat, wird aktuell von diesem Wert als Optimum ausgegangen (Hinrichs et al. 2005; Choi et al. 2006 und 2007; Ribeiro et al. 2008).

Auch beim Rind wurde der Stellenwert der Glukose als Energielieferant in der IVC nachgewiesen (Matsumoto et al. 1999). Es wurde jedoch auch ein inhibitorischer Effekt der Glukose im frühen Entwicklungsstadium der Embryonen diskutiert (Matsuyama et al. 1993). Physiologisch liegt die Glukosekonzentration in der Follikelflüssigkeit beim Rind zwischen 0,05 und 4,5 mM (Uhde et al. 2018). Alves et al. (2018) konnten nachweisen, dass in der Follikelflüssigkeit von KOK, welche ein geringeres Entwicklungspotential zur Blastozyste besaßen, eine höhere Glukosekonzentration zu finden war, als in den Follikeln von KOK mit hoher Blastozystenentwicklung.

Uhde et al. (2018) untersuchten den Einfluss von verschiedenen Glukosekonzentrationen (0 mM, 0,5 mM, 2 mM, 3 mM und 5 mM) während der IVF und der IVC auf bovine Embryonen. Sie konnten nachweisen, dass die Blastozystenentwicklung bei den Gruppen mit höheren Glukosekonzentrationen niedriger war. So zeigten sich folgende Blastozystenraten bei den einzelnen Gruppen: 0 mM: 31%, 0,5 mM und 2 mM: 23%, 3 mM: 20% und 5 mM: 10%. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich das metabolische Profil der Zygoten in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration verändert. So war z.B. die Energiegewinnung aus Pyruvat bei den Gruppen mit hoher Glukosekonzentration nicht effektiv (Uhde et al. 2018).

## 5. Diskussion

In den durchgeführten Versuchen wurden als Vergleichsmedien DMEM/F-12 als Standardmedium und SOFaa, welches beim Rind routinemäßig zur IVC eingesetzt wird, in zwei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (0 mM und 16 mM), gewählt (siehe Diagramm 1, S. 71).

Bezüglich des Anteils an Zygoten nach der ICSI mit zwei Polkörpern und zwei Vorkernen (je ein männlicher und ein weiblicher) bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei verglichenen Gruppen. Dies bedeutet, dass eine höhere Glukosekonzentration von 16 mM beziehungsweise 17,5 mM keinen positiven oder negativen Einfluss auf die Vorkernausbildung im Rahmen der ersten 18 Stunden nach der heterologen ICSI hatte.

Auch die Anteile der Eizellen, welche eine abnormale Vorkernausbildung aufwiesen, differierten zwischen den drei Gruppen nicht signifikant. Es fiel lediglich auf, dass generell ein großer Teil der Eizellen eine abnormale Vorkernentwicklung nach der ICSI aufwies. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Aktivierung im Rahmen der ICSI noch verbessert werden könnte. Generell zeigten alle drei Gruppen nur einen sehr geringen Anteil an Eizellen, bei welchen das Spermium nicht erfolgreich injiziert werden konnte. Dies zeigt, dass die einzelnen Abläufe und die Durchführung der ICSI erfolgreich waren.

Bei den Kontrollgruppen fiel auf, dass der Anteil der erfolgreich haploid aktivierten Eizellen, also solchen, welche zwei ausgeschleuste Polkörper und einen Vorkern aufwiesen, gering war. Die Raten der erfolgten „diploiden“ Aktivierung (nur der 1. Polkörper wurde ausgeschleust, in der Eizelle hat sich ein diploider Vorkern ausgebildet) nach der Sham-Injektion unterschieden sich in allen drei Gruppen nicht signifikant von den Raten der haploiden Aktivierung.

Gleichzeitig wurde ein großer Anteil der Eizellen gar nicht aktiviert. Dieser Anteil der nicht-aktivierten Eizellen war bei allen 3 Gruppen signifikant höher als der Anteil der haploid aktivierten Oozyten.

Wie bereits beschrieben, wies ein großer Teil der Kontrolle in allen drei Gruppen kein Anzeichen einer Aktivierung auf. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Aktivierung mit dem Piezo-Element, welche hier bei allen drei Gruppen angewandt wurde, nicht die ideale Methode für die heterologe ICSI darstellt. Diese wurde gewählt, da sie beim Pferd als eine

zuverlässige Aktivierungsmethode gilt und der Fokus bei diesen Versuchen auf der Spermien-Seite und dem männlichen Anteil der Eizelle liegen sollte. Auch beim Rind wurde das Piezo-Element bereits eingesetzt und es konnten Befruchtungsraten von 72% festgestellt werden (Katayose et al. 1999).

Die Ergebnisse führen weiterhin zu der Vermutung, dass bei der gewählten Aktivierung das Ausschleusen des zweiten Polkörpers nicht zuverlässig erfolgt. Es bleibt zu hinterfragen, ob dies an der Wahl der Aktivierungsmethode oder am Fehlen des Spermiums bei den Sham-injizierten Eizellen liegt.

Das Spermium spielt eine wichtige Rolle bei der Vorkernausbildung. Unter anderem bringt das Spermium bei der Befruchtung eine spezifische Phospholipase C (PLC  $\zeta$ ) in die Eizelle ein, welche für den intrazellulären Anstieg von Kalzium sorgt, welcher wiederum die Weiterentwicklung der Eizelle aus der MII-Phase und somit die Ausbildung des weiblichen Vorkerns unterstützt (Naish et al. 1987; Knott et al. 2005). Vermutlich kann die Aktivierung mit dem Piezo diese Vorgänge nur unzulänglich simulieren.

### *5.2.1.2 Auswirkung verschiedener Aktivierungsmethoden auf die Vorkernausbildung*

Wie schon zuvor erwähnt, ist bei der ICSI eine „haploide“ Aktivierung während oder im Anschluss an die Injektion gewünscht. So kann der zweite Polkörper ausgeschleust werden, und die Syngamie des maternalen und paternalen haploiden Chromosomensatzes kann stattfinden. Im Gegensatz dazu unterbleibt bei der „diploiden“ Aktivierung das Ausschleusen des zweiten Polkörpers und es verbleibt folglich ein diploider Chromosomensatz in der Eizelle. Gründe hierfür sind zum Beispiel Aktivierungsmethoden, welche das Ausschleusen des zweiten Polkörpers verhindern.

Grundsätzlich können elektrische und chemische Stimuli eingesetzt werden, um die Eizelle zu aktivieren.

Die elektrische Aktivierung mithilfe des Piezos gilt beim Pferd als erfolgreichste Aktivierungsmethode (Choi et al. 2002; Galli et al. 2007). Beim Rind dahingegen stellt die chemische Aktivierung mithilfe einer Kombination aus Ionomycin und 6-DMAP eine zuverlässige Methode dar (Rho et al. 1998). Auch Li et al. (2003), welche die Pronukleus-ausbildung nach der Injektion von Pferdespermien in Rinderoozyten untersuchten, nutzen in

diesen Versuchen als Aktivierungsprotokoll eine Kombination von Ionomycin und 6-DMAP. Die Immobilisation der Spermien erfolgte mittels eines Schlages mit der Injektionspipette auf den Spermienschwanz.

Auch Rodriguez et al. (2016) untersuchten die Vorkernausbildung nach der heterologen ICSI von Pferdespermien in Rindereizellen und nutze ebenfalls das Aktivierungsprotokoll aus Ionomycin und 6-DMAP. Dabei konnte eine Vorkernausbildung von 43% beobachtet werden (Rodriguez et al. 2016).

Ziel der Versuche war es, die Auswirkung verschiedener Aktivierungsmethoden auf die Vorkernausbildung zu beobachten. Verglichen wurden dabei die mechanische Aktivierung mittels Piezo, als Standardmethode beim Pferd, die chemische Aktivierung mithilfe der Kombination aus Ionomycin und 6-DMAP, als Standardmethode beim Rind, und die Kombination aus beiden Aktivierungsprotokollen miteinander (siehe Diagramm 2, S. 73).

Die Erfolgsraten der ICSI (2 Polkörper und 2 Vorkerne) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Aktivierungsprotokollen.

Die Raten der abnormalen Entwicklung nach der ICSI waren bei allen drei Gruppen signifikant höher, als die Erfolgsraten. Gleichzeitig waren die Raten der ICSI, welche nicht erfolgreich durchgeführt wurde, bei allen Gruppen nur sehr gering. Folglich war die Durchführung der ICSI erfolgreich und auch die untersuchten Aktivierungsmethoden zeigten zuverlässig signifikant ähnliche Erfolgsraten. Es stellt sich also die Frage, was im bestehenden System verändert werden muss, um diese Erfolgsraten zu steigern und den Anteil der abnormalen Entwicklung nach der ICSI zu senken und welche Faktoren die genannten Ergebnisse beeinflussen.

Da während der ICSI mit der Injektionspipette stark das Ooplasma der Eizelle aspiriert wird, um zu gewährleisten, dass das Oolemm tatsächlich durchbrochen ist, wurde vermutet, dass die Belastung für die Eizelle bei diesem Ablauf zu hoch sein könnte. Es wurden folglich einige Eizellen injiziert, bei denen die Aspiration minimal gehalten wurde und die folglich mit verschiedenen Aktivierungsmethoden behandelt wurden. Da die Erfolgsrate der ICSI hier jedoch im Durchschnitt lediglich bei 4,2% (SD  $\pm$ 5,9) lag, wurde diese Methode wieder verworfen.

## 5. Diskussion

Bei den Kontrollgruppen fiel auf, dass die Raten der erfolgreichen haploiden Aktivierung (2 Polkörper und 1 Vorkern) bei den Gruppen, welche mit dem Piezo und der Kombination aus Piezo und chemischen Stimuli aktiviert wurden, signifikant geringer waren, als in der Gruppe, die lediglich chemisch aktiviert wurde.

Bei der diploiden Aktivierung zeigte die Gruppe, welche mit der Kombination aus Piezo und chemischer Aktivierung behandelt wurde, eine signifikant höhere Rate als die Gruppe, welche lediglich mittels Piezo aktiviert wurde. Weiterhin wies bei der Aktivierung mittels des Piezos, der Großteil der Eizellen keine Anzeichen einer Aktivierung auf.

Die Ergebnisse zeigen zunächst, dass die chemische Aktivierung nötig ist, um überhaupt eine Aktivierung - diploid oder haploid - der Eizelle zu erreichen. Dies erklärt, wieso der signifikant größte Anteil der Eizellen, welche lediglich mit dem Piezo aktiviert wurden, keine Anzeichen einer Aktivierung aufwies. Die Rate der nicht-aktivierten Eizellen war bei den Gruppen, welche chemisch beziehungsweise mit dem Kombinationsprotokoll aktiviert wurden, signifikant niedriger, als bei der Piezo-Gruppe.

Was jedoch auffällt, ist dass die Gruppe, welche zusätzlich zur chemischen Aktivierung noch mit dem Piezo aktiviert wurde, einen signifikant höheren Anteil der diploiden Aktivierung als die lediglich chemisch aktivierte Gruppe zeigte. Gleichzeitig war die Rate der haploiden Aktivierung in der Gruppe, welche lediglich chemisch aktiviert wurde, signifikant höher.

Dies lässt den Verdacht aufkommen, dass der Piezo einen Einfluss auf die Eizelle hat, welcher das Ausschleusen des zweiten Polkörpers verhindert.

Die Aktivierung mithilfe des Piezos erfolgt über minimale Vibrationen, welche an die Oozyte weitergegeben werden. Dabei wurden die Intensität, die Geschwindigkeit (Frequenz) und die Anzahl der Piezo-Impulse so gewählt, dass diese so hoch wie nötig und so niedrig wie möglich waren, um die Eizelle nicht mehr als nötig zu belasten. Die Ergebnisse suggerieren, dass der Piezo trotzdem einen eher negativen Einfluss auf die zweite Reifeteilung der Eizelle hat, welcher das Ausschleusen des zweiten Polkörpers unterbindet.

Eine mögliche Erklärung wäre hier, dass der Piezo den Spindelapparat beeinflusst, welcher für die Trennung und Verteilung des Erbguts in der Zellteilung verantwortlich ist. Der Spindelapparat bildet im Rahmen der Zellteilung ein mikrotubuläres Netzwerk aus.

## 5. Diskussion

Für die vorliegenden Ergebnisse kann dies bedeuten, dass die Aktivierung mithilfe des Piezos einen Einfluss auf die Eizelle hat, welcher das mikrotubuläre Netzwerk am Ausschleusen des zweiten Polkörpers hindert. Wird die Eizelle nach der Aktivierung mit dem Piezo jedoch zusätzlich chemisch aktiviert, so bildet sich trotzdem ein Vorkern aus. Dies impliziert, dass sich das mikrotubuläre Netzwerk zu diesem Zeitpunkt wieder „erholt“ hat und dass die chemische Aktivierung einen positiven Einfluss auf die Vorkernausbildung hat.

Im Vergleich der Kontrollgruppen mit den ICSI-Gruppen, fiel auf, dass bei der Gruppe der lediglich chemisch aktivierten Eizellen die Rate der haploiden Aktivierung in der Kontrolle signifikant höher war als die Erfolgsrate der ICSI. Dies lässt sich dadurch erklären, dass in der ICSI-Gruppe nicht alle Eizellen, welche erfolgreich aktiviert wurden und somit einen weiblichen Vorkern ausbildeten, auch erfolgreich einen männlichen Vorkern ausbilden konnten. Somit lag die Erfolgsrate der ICSI unter der Aktivierungsrate der Kontrolle.

Bei der Betrachtung der beiden anderen Gruppen, welche mit dem Piezo und der Kombination aus Piezo und chemischen Stimuli aktiviert wurden, zeigte sich, dass bei beiden ein signifikanter Unterschied zwischen der erfolgreichen haploiden Aktivierung und der Erfolgsrate der ICSI bestand. Die Erfolgsrate der ICSI lag bei beiden Gruppen signifikant höher als die Erfolgsrate der haploiden Aktivierung in der Kontrollgruppe.

Tremoleda et al. (2003b) konnten nachweisen, dass sich nach der Injektion eines Spermiums bei der equinen ICSI das Mikrotubuli-Netzwerk vom Mittelstück des Spermiums ausbildet. Bei Eizellen welche, im Gegensatz dazu parthenogenetisch aktiviert wurden, umgab das mikrotubuläre Netzwerk den weiblichen Vorkern.

Diese Ergebnisse weisen nach, dass das Zentrosom beim Pferd, ebenso wie bei anderen Spezies, so zum Beispiel beim Rind, vor allem über die paternale Seite vererbt wird. Es konnte aber gleichzeitig bewiesen werden, dass die unbefruchtete Eizelle diese Aufgabe übernimmt, wenn kein Spermium vorhanden ist, jedoch ein Aktivierungsreiz zugefügt wird (Navara et al. 1994).

Eine mögliche Erklärung dafür, dass bei der Piezo- und der Piezo + CA-Gruppe die ICSI erfolgreicher, als die „haploide“ Aktivierung war, stellt sich in folgender Weise dar: der

Piezo beeinflusst zwar auch bei den ICSI Gruppen das mikrotubuläre Netzwerk der Eizelle negativ, das injizierte Spermium kann dies aber mit den Mikrotubuli, welches es in die Eizelle einbringt, „ausgleichen“. Dies würde erklären, wieso die ICSI bei diesen Gruppen ähnliche Ergebnisse wie die der chemisch aktivierten Eizellen zeigte, die Kontrollgruppen sich jedoch so stark von den ICSI-Gruppen unterschieden und ohne Spermieninjektion die Aktivierung mithilfe des Piezos nicht erreicht werden konnte.

### 5.2.2 Bestimmung der Glukosekonzentration in den unterschiedlichen Kultivierungsmedien

Die Bestimmung der Glukosekonzentrationen vor und nach der ICSI beziehungsweise der Sham-Injektion im Kultivierungsmedium sollte eine Aussage über den Glukosestoffwechsel der Zygote innerhalb der ersten 18 Stunden nach der Befruchtung ermöglichen.

Beim Rind konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass die Spermienkopfdedensation einen Anstieg des Glukosemetabolismus zur Folge hat. Dies läuft über den PPP (Pentose Phosphat Pathway), welcher den Beginn der S-Phase (Synthesephase im Entwicklungszyklus der Zygote, in welcher die DNA verdoppelt wird) der Vorkerne beeinflusst. Dabei ist für den erfolgreichen Start der S-Phase des weiblichen Vorkerns ein vollausgebildeter männlicher Vorkern die Voraussetzung (Comizzoli et al. 2002).

Es sollte untersucht werden, ob verschiedene Aktivierungsmethoden und Medien einen messbaren Einfluss auf den Glukosestoffwechsel und somit die Glukosekonzentration 18 Stunden nach der ICSI im Medium haben. Mithilfe der Kontrollgruppe konnte zudem beurteilt werden, ob das Fehlen des männlichen Vorkerns eine Auswirkung auf den frühen Glukosemetabolismus der Zygote hat (siehe Tabelle 6, S. 75).

Die Ergebnisse zeigten, dass sich in keiner der 4 untersuchten Gruppen die Glukosekonzentrationen in den Kultivierungsmedien zu den unterschiedlichen Zeitpunkten sowie im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen signifikant voneinander unterschieden.

Dies legt die Vermutung nahe, dass weder die beiden gewählten Medien noch die drei verglichenen Aktivierungsmethoden einen messbaren Einfluss auf die Glukosekonzentration im Medium haben. Zudem unterscheiden sich die Glukosekonzentrationen auch nicht zwischen den jeweiligen ICSI- und Sham-Gruppen und diese unterscheiden sich wiederum nicht von der ursprünglichen Glukosekonzentration vor der Injektion der Eizellen.

Dies kann zu der Annahme führen, dass auch der Glukosemetabolismus des Embryos in dieser frühen Entwicklungsphase nicht von den genannten Faktoren beeinflusst wird.

Zudem scheint es so, dass in dieser Phase der Embryonalentwicklung nicht genug Glukose verstoffwechselt wird, um die Glukosekonzentration im Medium messbar zu verändern.

Es besteht zudem die Möglichkeit, dass sich die Glukosekonzentration erst zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung, zum Beispiel im Rahmen der Syngamie, messbar verändert.

Auch bei Mäusen ist die Dekondensation des Spermienkopfchromatins mit einem Anstieg des Glukosemetabolismus verbunden. Dies zeigt sich besonders im Vergleich zu lediglich parthenogenetisch aktivierten Eizellen, bei welchen der Glukosemetabolismus auf einem basalen Level verbleibt (Urner und Sakkas 1999). Lane et al. (2001) konnte nachweisen, dass die Glukoseaufnahme in-vivo produzierter expandierter Blastozysten exponentiell in Korrelation zum Durchmesser und der Oberfläche des Embryos ansteigt. Eine Veränderung der Glukosekonzentration in den jeweiligen Kultivierungsmedien wäre also zu erwarten gewesen, konnte aber nicht beobachtet werden.

### 5.2.3 Teilungsraten im Rahmen der Kultivierung

Im Rahmen der Beurteilung der Teilungsraten wurden die Aktivierung mittels chemischer Stimuli und die Aktivierung mithilfe der Kombination aus Piezo und chemischer Stimuli miteinander verglichen. Als Kontrolle diente hier zum einen eine Gruppe, welche sham-injiziert und im Anschluss chemisch aktiviert wurde und eine Gruppe, welche nicht injiziert, sondern nur chemisch aktiviert wurde. Es sollte mithilfe der Kontrollen überprüft werden, ob die Manipulation der Eizelle durch die Sham-Injektion zusätzlich zur chemischen Aktivierung einen Einfluss auf die Teilungsrate der Oozyten hat. Als Medium wurde bei allen Gruppen SOFaa mit 16 mM Glukose genutzt.

## 5. Diskussion

Das Ziel dieser Versuche war eine mikroskopische Beurteilung der Fähigkeit der injizierten Eizellen zur Weiterentwicklung anhand der Teilungsraten (siehe Diagramm 3, S.76).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Teilungsraten der beiden ICSI-Gruppen sich nicht signifikant unterschieden. Weiterhin war die Teilungsrate der ICSI-Gruppe, welche mit dem Piezo in Kombination mit chemischen Stimuli aktiviert wurde, signifikant höher, als die Teilungsraten der beiden Kontroll-Gruppen (CA ohne Injektion und Sham-Injektion mit chemischer Aktivierung). Dies bestätigt die zuvor geäußerte Vermutung, dass das Spermium eine wichtige Rolle in der Vorkernausbildung spielt und die genutzten Aktivierungsmethoden die Vorgänge nach Spermieninjektion nur unzulänglich simulieren können.

Es fiel auf, dass beide Kontrollgruppen nur sehr geringe Teilungsraten aufwiesen, die ebenfalls signifikant niedriger als die der ICSI Piezo + CA Gruppe waren. Im Vergleich dazu wurden Versuche durchgeführt, bei welchen die nicht-injizierten, lediglich chemisch aktivierten, Eizellen in SOFaa ohne zugefügte Glukose kultiviert wurden. Hier konnten im Durchschnitt signifikant höhere Teilungsraten von 41,2% (SD  $\pm$ 15,1) an Tag 3 und Entwicklungsraten (Entwicklung bis zur Blastozyste) von 7,0% (SD  $\pm$ 4,9) an Tag 7 und 8 beobachtet werden. Dies legt den Verdacht nahe, dass eine hohe Glukosekonzentration einen negativen Einfluss auf die Teilung der Zygoten hat. Da dies jedoch im Widerspruch zu den Teilungsraten der Piezo + CA Gruppe steht, lässt sich auch diese These nicht halten.

Bei der Beurteilung der Teilungsraten fiel auf, dass sich die Zygoten in der Regel ein bis zwei Mal, nur selten drei Mal teilten. Es konnte also lediglich Zygoten mit 2 oder 4 Zellen, nur selten mit 8 Zellen beobachtet werden. In der frühembryonalen Entwicklungsphase des Embryos finden verschiedenen anspruchsvolle Abläufe statt, so wie die Zellteilung, epigenetische Veränderungen und die Aktivierung des embryonalen Genoms (Zheng und Liu 2012; Cantone und Fisher 2013). Während der Aktivierung des embryonalen Genoms, welche beim Rind primär im 8- zum 16-Zellstadium stattfindet, müssen neue Transkripte vom Zellkern produziert werden, damit eine Weiterentwicklung der Zygote stattfinden kann. Embryos, bei denen dieser Schritt nicht gelingt, verbleiben im 8-Zellstadium (Walser und Lipshitz 2011). Dieses Phänomen wird als 8-Zell-Block bezeichnet (Garcia et al. 2015). Die vorliegenden

## 5. Diskussion

Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass dieser Entwicklungsblock bei den Versuchen stattgefunden hat.

Dies legt die Vermutung nahe, dass das System der heterologen ICSI im Fall der Teilungsraten nicht das ideale Modell zur Beurteilung bildet.

## 6. Zusammenfassung

Die ICSI stellt inzwischen im Bereich der IVP beim Pferd eine fest etablierte und viel genutzte Methode der Befruchtung dar, nicht zuletzt, weil die konventionelle IVF hier nach wie vor versagt.

Zunächst wurde die IVM beim Pferd mit Maturationsraten von 48,2% etabliert. Erste Versuche zur ICSI beim Pferd wurden durchgeführt, jedoch mit bislang sehr geringen Teilungsraten (4,2%).

Die heterologe ICSI bietet die Möglichkeit, eine bovine Oozyte als Modell zu nutzen und ein equines Spermium in diese zu injizieren, um so im Rahmen der Entwicklung der Zygote eine Aussage über die untersuchten Faktoren und gewonnenen Erkenntnisse auch aufs Pferd übertragen zu können.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein besseres Verständnis für die Abläufe innerhalb der Vorkernausbildung der Zygote zu gewinnen. Dazu wurden die Eizellen 18 Stunden nach der Injektion mit Hoechst 33342 gefärbt und beurteilt. Die der ICSI vorangegangene Behandlung der Spermien mit MitoTracker Green<sup>®</sup> FM ermöglichte dabei die Zuordnung einer der vorhandenen Vorkerne zum Spermienmittelstück und somit zur paternalen Seite. Das Vorhandensein von zwei ausgeschleusten Polkörpern bestätigte die erfolgreiche haploide Aktivierung der Eizelle im Rahmen der ICSI. Diese Methode ermöglichte eine genaue Aussage über die Erfolgsrate der ICSI.

Im Rahmen dieser Versuche wurde zunächst der Einfluss der Glukosekonzentration im Kultivierungsmedium auf die Erfolgsrate der ICSI untersucht. Dazu wurden als Medien DMEM/F-12, SOFaa und SOFaa mit 16 mM Glukose eingesetzt und die Vorkernausbildung nach ICSI miteinander verglichen. Die ICSI und die Aktivierung der Eizelle erfolgte bei allen Gruppen mithilfe des Piezo-Elements. Die Ergebnisse zeigten, dass die Erfolgsraten der ICSI bei allen drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Um den Glukosestoffwechsel während der Vorkernausbildung genauer zu untersuchen wurde die Glukosekonzentration im Medium vor und nach der ICSI beziehungsweise der Sham-Injektion durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Eizellen keinen

## 6. Zusammenfassung

Einfluss auf die Glukosekonzentration hat und, dass sich die Konzentrationen vor und nach der ICSI/Sham-Injektion in keiner der untersuchten Gruppen voneinander unterscheiden. Der Glukosestoffwechsel scheint also bei der Vorkernausbildung keine große Rolle zu spielen.

Als weiterer Einflussfaktor auf die Erfolgsrate der ICSI wurden verschiedene Aktivierungsprotokolle miteinander verglichen: Die Aktivierung mithilfe des Piezo-Elements, die chemische Aktivierung und eine Kombination aus beiden Methoden. Auch hier zeigten die Ergebnisse, dass die Wahl des Aktivierungsstimulus bei den gewählten drei Protokollen keinen signifikanten Einfluss auf die Erfolgsrate der ICSI hat. Bei den sham-injizierten Kontrollgruppen fiel jedoch auf, dass hier lediglich die chemisch aktivierte Gruppe hohe Raten einer erfolgreichen „haploiden“ Aktivierung zeigte. Bei der Gruppe, welche dahingegen mit der Kombination aus Piezo und chemischen Stimuli aktiviert wurde, waren die Raten der „diploiden“ Aktivierung signifikant höher. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass der Piezo die Verhinderung des Ausschleusens des zweiten Polkörpers zur Folge hat, wobei der Verdacht aufkam, dass ein negativer Einfluss auf das mikrotubuläre Netzwerk als Folge der minimalen Vibrationen ausgeübt wurde. Hierzu sind jedoch weitere Untersuchungen speziell zum Einfluss des Piezos und seiner Auswirkungen auf die Struktur innerhalb der Eizelle, insbesondere auf das mikrotubuläre Netzwerk, im Rahmen der ICSI von Interesse.

Um die weitere Entwicklung der Zygoten nach der ICSI beurteilen zu können, wurden die Teilungsraten der ICSI nach chemischer Aktivierung, nach Aktivierung mit der Kombination aus dem Piezo und chemischen Stimuli, nach Sham-Injektion und chemischer Aktivierung sowie lediglich chemisch aktivierter Eizellen bestimmt. Hier zeigte die Gruppe Piezo + CA deutlich höhere Teilungsraten (21,5%). Es bleibt jedoch zu vermerken, dass auch die Teilungsraten der Kontrollgruppen (1. Sham-injiziert und chemisch aktiviert 2. Chemische aktiviert) sehr gering waren und daher vermutet wird, dass das genutzte Medium SOFaa + 16 mM Glukose einen negativen Einfluss auf die Entwicklung der behandelten Eizellen hatte.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass die durchgeführten Versuche einen neuen Einblick in das Modell der heterologen ICSI geben. So muss beispielsweise der Einsatz des Piezo-Elements hinsichtlich seines Einflusses auf das Ausschleusen des zweiten Polkörpers weiter untersucht werden. Zudem können gewonnene Erkenntnisse bezüglich der Auswirkung der

## 6. Zusammenfassung

Glukosekonzentrastion im Kultivierungsmedium und der verschiedenen Aktivierungsmethoden auf die paternalen Vorkernausbildung auch aufs Pferd übertragen und dort angewandt werden.

## 7. Summary

In the last 20 years ICSI has become a well-established and often used technique in equine IVP whereas conventional IVF with horse gametes is still not reliably successful.

At first the IVM of horse oocytes was resulting in maturation rates of 48,2%. First attempts of ICSI were performed but showed only little success, with cleavage rates of 4,2%.

Interspecies fertilization gave us the opportunity to use bovine oocytes as a model and inject equine sperm. This approach can be transferred and used in equine ART.

It was the goal of this work to obtain a better understanding of the pronuclear development in injected oocytes. Therefore the used sperm was stained with MitoTracker Green<sup>®</sup> FM directly before ICSI. Eighteen hours after ICSI the oocytes were stained with Hoechst 33342 to identify the paternal pronucleus by the sperm midpiece lying next to it. The presence of two polar bodies proofed the haploid status of the oocyte after activation during or after ICSI. This method allowed an exact evaluation of the success of ICSI.

The first part of the study examined the influence of glucose in the culture medium on the success rate of ICSI. Therefore DMEM/F12, SOFaa and SOFaa with 16mM glucose were used for culture and the pronuclear development after ICSI was evaluated. The piezo-element was used for injection and activation of the oocyte. Results showed that there was no significant difference in the pronuclear development after ICSI between the 3 groups.

To investigate the glucose metabolism during pronuclear development the concentration of glucose in the culture medium before and after ICSI and Sham-Injection was measured. The results showed that the activation of the oocyte did not affect the glucose concentration in the culture medium. The glucose concentration of the culture medium before and after ICSI showed no significant differences between the observed groups. Glucose metabolism does not seem to play an important role in pronuclear development.

In order to better understand the influence of the activation stimulus on pronuclear development after ICSI three activation methods were compared: the piezo element, chemical activation and a combination of this two.

## 7. Summary

Results showed that there was no significant difference in the success of ICSI between the compared groups. In the sham-injected groups only the oocytes chemically activated showed high rates of second polar body extrusion after activation. In the group activated both with piezo and chemically the rates of oocytes that did not extrude the second polar body and therefore had a diploid chromatin status were high. This could mean that the piezo somehow prevents the extrusion of the second polar body. It is assumed that the vibrations of the piezo might have a negative influence on the microtubular network of the oocyte. To confirm this further investigations of the piezo and its influence on the structures of the oocyte, especially the microtubular network, are needed.

To evaluate further development of the oocytes after ICSI cleavage rates of the different groups were compared: ICSI – chemically activated, ICSI – activated with a combination of piezo and chemical activation, sham-injected oocytes – chemically activated, oocytes that were not injected but chemically activated.

The group that was activated with piezo and chemical activation showed significantly higher cleavage rates of 21,5 %. Cleavage rates of the control groups remained low, therefore it is suggested that the used culture medium (SOFaa + 16mM glucose) might have a negative influence on the development of the treated oocytes.

In summary the results give new insight into the model of interspecies ICSI. Thus the use of the piezo needs to be further investigated, especially considering its influence on second polar body extrusion. The findings of this study can be used to optimize ICSI in the horse.

## 8. Verzeichnisse

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
6-DMAP	6-Dimethylaminopurin
ATP	Adenosintriphosphat
ART	Artifizielle Reproduktionstechniken
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CZB	Chatot-Ziomek-Bavister-Medium
DMEM/F12	Dulbeccos Modified Eagles Medium Hams Nutrient Mixture F12
DMSO	Dimethylsulfoxid
eCG	equines Choriongonadotropin
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
h	Stunden
hCG	humanes Choriongonadotropin
ICM	Inner Cell Mass
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IVC	In-vitro-Kultivierung
IVF	In-vitro-Fertilisation
IVM	In-vitro-Maturation
IVP	In-vitro-Produktion
kDa	Kilodalton
KOK	Kumulus-Oozyten-Komplex
MII	Metaphase II

## 8. Verzeichnisse

mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol/l	Millimol pro Liter
mM	Millimolar
M	Mol
MPF	Metaphase Promotion Faktor
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
N <sub>2</sub>	Stickstoff
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OPU	Ovum Pick Up
PBS	Phosphate Buffered Saline
PPP	Pentose Phosphate Patwhay
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PZD	Partial Zona Dissection
SD	Standardabweichung
SOF	Synthetic Oviduct Medium
SUZI	Sub-Zonal Insertion
TALP	Tyrode's Albumin-Lactat-Pyruvat
TB	Trophoblasten
TCM	Tissue Culture Medium
μl	Mikroliter

### 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Oogenese	8
Abbildung 2: Pferdeoozyte mit expandiertem Kumulus	11
Abbildung 3: Pferdeoozyte mit kompaktem Kumulus	12
Abbildung 4: Haploide Aktivierung	22
Abbildung 5: Physiologische Befruchtung	23
Abbildung 6: Diploide Aktivierung – Ausbildung eines maternalen diploiden Vorkerns	24

## 8. Verzeichnisse

Abbildung 7: Diploide Aktivierung – Ausbildung zwei maternaler haploider Vorkerne	25
Abbildung 8: Auskratzen der oberflächlichen Follikel mithilfe eines scharfen Löffels.	42
Abbildung 9: Equiner KOK mit kompaktem Kumulus	43
Abbildung 10: Equiner KOK mit expandiertem Kumulus	44
Abbildung 11: Equiner KOK mit Teilkumulus	44
Abbildung 12: ICSI-Schälchen	46
Abbildung 13: Gereifte equine Eizelle. Der ausgeschleuste erste Polkörper liegt bei 12 Uhr.	48
Abbildung 14: Oozyte direkt vor der Injektion. Das Spermium befindet sich in der Spitze der Injektionspipette. Der 1. Polkörper liegt bei 12 Uhr.	49
Abbildung 15: Injektion des Spermiums in die Oozyte.	50
Abbildung 16: Kombination der Färbung mit MitoTracker FM und Hoechst 33342	60

### 8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich verschiedener Maturationsmedien beim Pferd	14
Tabelle 2: Chemikalien zur artifiziellen Aktivierung	27
Tabelle 3: Aktivierungsprotokolle beim Rind	29
Tabelle 4: Einteilung der KOK	52
Tabelle 5: Übersicht Ergebnisse der ICSI beim Pferd	68
Tabelle 6: Bestimmung der Glukosekonzentration in den unterschiedlichen Kultivierungsmedien. Es konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.	75

### 8.4 Verzeichnis der Diagramme

Diagramm 1: Vergleich verschiedener Glukosekonzentrationen (MW + SD)	71
Diagramm 2: Vergleich verschiedener Aktivierungsprotokolle (MW + SD)	73
Diagramm 3: Teilungsraten im Vergleich (MW + SD)	76

### 8.5 Literaturverzeichnis

Abele, E.; Stinshoff, H.; Hanstedt, A.; Wilkening, S.; Meinecke-Tillmann, S.; Wrenzycki, C. (2014): Influence of selected (pre-)maturational parameters on in vitro development and sex distribution of bovine embryos. In: *Zygote* 22 (1), S. 41–49.

Alm, H.; Torner, H.; Blottner, S.; Nürnberg, G.; Kanitz, W. (2001): Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes. In: *Theriogenology* 56 (5), S. 817–829.

## 8. Verzeichnisse

Altermatt, J. L.; Suh, T. K.; Stokes, J. E.; Carnevale, E. M. (2009): Effects of age and equine follicle-stimulating hormone (eFSH) on collection and viability of equine oocytes assessed by morphology and developmental competency after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). In: *Reproduction, fertility and development* 21 (4), S. 615.

Alves, G. P.; Cordeiro, F. B.; Bruna de Lima, C.; Annes, K.; Cristina Dos Santos, E.; Ispada, J.; Fontes, P. K.; Noqueira, M. F. G.; Nichi, M.; Milazzotto, M. P. (2018): Follicular environment as a predictive tool for embryo development and kinetics in cattle. In: *Reproduction, fertility and development*. 31 (3), S. 451–461.

Ambrosi, B.; Lacalandra, G. M.; Iorga, A. I.; Santis, T. de; Mugnier, S.; Matarrese, R.; Goudet, G.; Dell'aquila, M. E. (2009): Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. In: *Theriogenology* 71 (7), S. 1093–1104.

Avidor-Reiss, T.; Fishman, E. L. (2018): It Takes Two (Centrioles) to Tango. In: *Reproduction* 157 (2), S. 33–51.

Battut, I.; Bézard, J.; Palmer, E. (1991): Establishment of equine oviduct cell monolayers for co-culture with early equine embryos. In: *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 44, S. 393–403.

Bézard, J.; Magistrini, M.; Battut, I.; Duchamp, G.; Palmer, E. (1992): In vitro Fertilization in the Mare. In: *Recueil De Medecine Veterinaire* (168), S. 993–1003.

Bhak, J. S.; Lee, S. L.; Ock, S. A.; Mohana Kumar, B.; Choe, S. Y.; Rho, G. J. (2006): Developmental rate and ploidy of embryos produced by nuclear transfer with different activation treatments in cattle. In: *Animal reproduction science* 92 (1-2), S. 37–49.

Boiani, M. (2012): Intracytoplasmic sperm injection with the Eppendorf PiezoXpert® - a reliable partner for the research mouse facility. Online verfügbar unter Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Münster, Germany.

Bos-Mikich, A.; Bressan, F. F.; Ruggeri, R. R.; Watanabe, Y.; Meirelles, F. V. (2016): Parthenogenesis and Human Assisted Reproduction. In: *Stem cells international* 2016, S. 1970843.

Brun, R. B. (1974): Studies on fertilization in *Xenopus laevis*. In: *Biology of reproduction* 11 (5), S. 513–518.

## 8. Verzeichnisse

Canel, N. G.; Bevacqua, R. J.; Hiriart, M. I.; Rabelo, N. C.; de Almeida Camargo, L. S.; Romanato, M.; de Calvo, L. P.; Salamone, D. F. (2017): Sperm pretreatment with heparin and l-glutathione, sex-sorting, and double cryopreservation to improve intracytoplasmic sperm injection in bovine. In: *Theriogenology* 93, S. 62–70.

Cantone, I.; Fisher, A. G. (2013): Epigenetic programming and reprogramming during development. In: *Nature structural & molecular biology* 20 (3), S. 282–289.

Catt, S. L.; Catt, J. W.; Gomez, M. C.; Maxwell, W. M.; Evans, G. (1996): Birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilised by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. In: *The Veterinary record* 139 (20), S. 494–495.

Choi, Y. H.; Okada, Y.; Hochi, S.; Braun, J.; Sato, K.; Oguri, N. (1994): In vitro fertilization rate of horse oocytes with partially removed zonae. In: *Theriogenology* 42 (5), S. 795–802.

Choi, Y. H.; Love, C. C.; Love, L. B.; Varner, D. D.; Brinsko, S.; Hinrichs, K. (2002): Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. In: *Reproduction* 123 (3), S. 455–465.

Choi, Y. H.; Love, L. B.; Varner, D. D.; Hinrichs, K. (2004a): Factors affecting developmental competence of equine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. In: *Reproduction* 127 (2), S. 187–194.

Choi, Y. H.; Roasa, L. M.; Love, C. C.; Varner, D. D.; Brinsko, S. P.; Hinrichs, K. (2004b): Blastocyst formation rates in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. In: *Biology of reproduction* 70 (5), S. 1231–1238.

Choi, Y. H.; Love, L. B.; Varner, D. D.; Hinrichs, K. (2006): Holding immature equine oocytes in the absence of meiotic inhibitors: effect on germinal vesicle chromatin and blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection. In: *Theriogenology* 66 (4), S. 955–963.

Choi, Y. H.; Love, L. B.; Varner, D. D.; Hinrichs, K. (2007): Effect of holding technique and culture drop size in individual or group culture on blastocyst development after ICSI of

equine oocytes with low meiotic competence. In: *Animal reproduction science* 102 (1-2), S. 38–47.

Choi, Y. H.; Ross, P.; Velez, I. C.; Macias-Garcia, B.; Riera, F. L.; Hinrichs, K. (2015): Cell lineage allocation in equine blastocysts produced in vitro under varying glucose concentrations. In: *Reproduction* 150 (1), S. 31–41.

Choi, Y. H.; Gibbons, J. R.; Canesin, H. S.; Hinrichs, K. (2016): Effect of medium variations (zinc supplementation during oocyte maturation, perfertilization pH, and embryo culture protein source) on equine embryo development after intracytoplasmic sperm injection. In: *Theriogenology* 86 (7), S. 1782–1788.

Cochran, R.; Meintjes, M.; Reggio, B.; Hylan, D.; Carter, J.; Pinto, C.; Paccamonti, D.; Graff, K. J.; Godke, R. A. (2000): Production of live foals from sperm-injected oocytes harvested from pregnant mares. In: *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 2000 (56), S. 503–512.

Colleoni, S.; Spinaci, M.; Duchi, R.; Merlo, B.; Tamanini, C.; Lazzari, G.; Mari, G.; Galli, C. (2009): ICSI of equine oocytes with sex-sorted frozen-thawed semen results in low cleavage rate but normal embryo development and pregnancies. In: *Reproduction, fertility and development* 21 (1), S. 228.

Comizzoli, P.; Urner, F.; Sakkas, D.; Renard, J. P. (2002): Up-Regulation of Glucose Metabolism During Male Pronucleus Formation Determines the Early Onset of the S Phase in Bovine Zygotes. In: *Biology of reproduction* 68 (5), S. 1934–1940.

Conaghan, J.; Handyside, A. H.; Winston, R. M.; Leese, H. J. (1993): Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. In: *Journal of reproduction and fertility* 99 (1), S. 87–95.

Crews, D.; Grassman, M.; Lindzey, J. (1986): Behavioral facilitation of reproduction in sexual and unisexual whiptail lizards. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (24), S. 9547–9550.

Cuthbertson, K. S.; Whittingham, D. G.; Cobbold, P. H. (1981): Free Ca<sup>2+</sup> increases in exponential phases during mouse oocyte activation. In: *Nature* 294 (5843), S. 754–757.

## 8. Verzeichnisse

Del Campo, M. R.; Donoso, X.; Parrish, J. J.; Ginther, O. J. (1995): Selection of follicles, preculture oocyte evaluation, and duration of culture for in vitro maturation of equine oocytes. In: *Theriogenology* 43 (7), S. 1141–1153.

Dell'aquila, M. E.; Fusco, S.; Lacalandra, G. M.; Maritato, F. (1996): In vitro maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. In: *Theriogenology* 45 (3), S. 547–560.

Dell'aquila, M. E.; Cho, Y. S.; Minoia, P.; Traina, V.; Fusco, S.; Lacalandra, G. M.; Maritato, F. (1997): Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and in vitro-matured equine oocytes. In: *Theriogenology* 47 (6), S. 1139–1156.

Dell'aquila, M. E.; Masterson, M.; Maritato, F.; Hinrichs, K. (2001): Influence of oocyte collection technique on initial chromatin configuration, meiotic competence, and male pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of equine oocytes. In: *Molecular reproduction and development* 60 (1), S. 79–88.

Eckert, J.; Niemann, H. (1995): In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. In: *Theriogenology* 43 (7), S. 1211–1225.

Fernandes, C. B.; Devito, L. G.; Martins, L. R.; Blanco, I. D.; de Lima Neto, J. F.; Tsuribe, P. M.; Goncales, C. G.; da Cruz Landim-Alvarenga, F. (2014): Artificial activation of bovine and equine oocytes with cycloheximide, roscovitine, strontium, or 6-dimethylaminopurine in low or high calcium concentrations. In: *Zygote* 22 (3), S. 387–394.

Galli, C.; Colleoni, S.; Duchi, R.; Lagutina, I.; Lazzari, G. (2007): Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. In: *Animal reproduction science* 98 (1-2), S. 39–55.

Galli, C.; Duchi, R.; Colleoni, S.; Lagutina, I.; Lazzari, G. (2014): Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. In: *Theriogenology* 81 (1), S. 138–151.

## 8. Verzeichnisse

Garcia, S. M.; Marinho, L. S.; Lunardelli, P. A.; Seneda, M. M.; Meirelles, F. V. (2015): Developmental block and programmed cell death in *Bos indicus* embryos. Effects of protein supplementation source and developmental kinetics. In: *PloS one* 10 (3), e0119463.

García-Roselló, E.; García-Mengual, E.; Coy, P.; Alfonso, J.; Silvestre, M. A. (2009): Intracytoplasmic sperm injection in livestock species: an update. In: *Reproduction in domestic animals* 44 (1), S. 143–151.

Glover, D. M.; Gonzalez, C.; Raff, J. W. (1993): The centrosome. In: *Scientific American* 268 (6), S. 62–68.

Goto, K.; Kinoshita, A.; Takuma, Y.; Ogawa, K. (1990): Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. In: *The Veterinary record* 127 (21), S. 517–520.

Goud, P. T.; Goud, A. P.; Rybouchkin, A. V.; Sutter, P. de; Dhont, M. (1998): Chromatin decondensation, pronucleus formation, metaphase entry and chromosome complements of human spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection into hamster oocytes. In: *Human reproduction* 13 (5), S. 1336–1345.

Graham, C. F. (1966): The regulation of DNA synthesis and mitosis in multinucleate frog eggs. In: *Journal of cell science* 1 (3), S. 363–374.

Hinrichs, K. (1991): The relationship of follicle atresia to follicle size, oocyte recovery rate on aspiration, and oocyte morphology in the mare. In: *Theriogenology* 36 (2), S. 157–168.

Hinrichs, K.; Schmidt, A. L.; Friedman, P. P.; Selgrath, J. P.; Martin, M. G. (1993): In vitro maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. In: *Biology of reproduction* 48 (2), S. 363–370.

Hinrichs, K.; Martin, M. G.; Schmidt, A. L.; Friedman, P. P. (1995): Effect of follicular components on meiotic arrest and resumption in horse oocytes. In: *Journal of reproduction and fertility* 104 (1), S. 149–156.

Hinrichs, K.; Williams, K. A. (1997): Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. In: *Biology of reproduction* 57 (2), S. 377–384.

## 8. Verzeichnisse

- Hinrichs, K.; Schmidt, A. L. (2000): Meiotic competence in horse oocytes: interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology, and season. In: *Biology of reproduction* 62 (5), S. 1402–1408.
- Hinrichs, K.; Choi, Y. H.; Love, L. B.; Varner, D. D.; Love, C. C.; Walckenaer, B. E. (2005): Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. In: *Biology of reproduction* 72 (5), S. 1142–1150.
- Hinrichs, K.; Choi, Y. H.; Walckenaer, B. E.; Varner, D. D.; Hartman, D. L. (2007): In vitro-produced equine embryos: production of foals after transfer, assessment by differential staining and effect of medium calcium concentrations during culture. In: *Theriogenology* 68 (4), S. 521–529.
- Hinrichs, K. (2010): In vitro production of equine embryos: state of the art. In: *Reproduction in domestic animals* 45 Suppl 2, S. 3–8.
- Hinrichs, Katrin (2012): Assisted reproduction techniques in the horse. In: *Reproduction, fertility, and development* 25 (1), S. 80–93.
- Hipp, J.; Atala, A. (2004): Tissue engineering, stem cells, cloning, and parthenogenesis. New paradigms for therapy. In: *Journal of experimental & clinical assisted reproduction* 1 (1), S. 3.
- Hiramoto, Y. (1962): Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs. In: *Experimental cell research* 27 (3), S. 416–426.
- Javed, M. H.; Wright, R. W. (1991): Determination of pentose phosphate and Embden-Meyerhof pathway activities in bovine embryos. In: *Theriogenology* 35 (5), S. 1029–1037.
- Katayama, M.; Rieke, A.; Cantley, T.; Murphy, C.; Dowell, L.; Sutovsky, P.; Day, B. N. (2007): Improved fertilization and embryo development resulting in birth of live piglets after intracytoplasmic sperm injection and in vitro culture in a cysteine-supplemented medium. In: *Theriogenology* 67 (4), S. 835–847.
- Katayose, H.; Yanagida, K.; Shinoki, T.; Kawahara, T.; Horiuchi, T.; Sato, A. (1999): Efficient injection of bull spermatozoa into oocytes using a Piezo-driven pipette. In: *Theriogenology* 52 (7), S. 1215–1224.

## 8. Verzeichnisse

Kaufman, M. H.; Sachs, L. (1976): Complete preimplantation development in culture of parthenogenetic mouse embryos. In: *Journal of embryology and experimental morphology* 35 (1), S. 179–190.

Kaufman, M. H. (2018): Parthenogenetic Activation of Oocytes. In: *Cold Spring Harbor protocols* 2018 (1)

Kimura, K.; Iwata, H.; Thompson, J. G. (2008): The effect of glucosamine concentration on the development and sex ratio of bovine embryos. In: *Animal reproduction science* 103 (3-4), S. 228–238.

Knott, J. G.; Kurokawa, M.; Fissore, R. A.; Schultz, R. M.; Williams, C. J. (2005): Transgenic RNA interference reveals role for mouse sperm phospholipase C $\zeta$  in triggering Ca<sup>2+</sup> oscillations during fertilization. In: *Biology of reproduction* 72 (4), S. 992–996.

Kuretake, S.; Kimura, Y.; Hoshi, K.; Yanagimachi, R. (1996): Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. In: *Biology of reproduction* 55 (4), S. 789–795.

Lagutina, I.; Lazzari, G.; Duchi, R.; Galli, C. (2004): Developmental potential of bovine androgenetic and parthenogenetic embryos. A comparative study. In: *Biology of reproduction* 70 (2), S. 400–405.

Lagutina, I.; Lazzari, G.; Duchi, R.; Colleoni, S.; Ponderato, N.; Turini, P.; Crotti, G.; Galli, C. (2005): Somatic cell nuclear transfer in horses. Effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. In: *Reproduction* 130 (4), S. 559–567.

Lane, M.; O'Donovan, M. K.; Squires, E. L.; Seidel, G. E.; Gardner, D. K. (2001): Assessment of metabolism of equine morulae and blastocysts. In: *Molecular reproduction and development* 59 (1), S. 33–37.

Lane, M.; Gardner, D. K. (2007): Embryo culture medium. Which is the best? In: *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 21 (1), S. 83–100.

Lanzendorf, S. E.; Maloney, M. K.; Veeck, L. L.; Slusser, J.; Hodgen, G. D.; Rosenwaks, Z. (1988): A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. In: *Fertility and sterility* 49 (5), S. 835–842.

## 8. Verzeichnisse

Lazzari, G.; Crotti, G.; Turini, P.; Duchi, R.; Mari, G.; Zavaglia, G.; Barbacini, S.; Galli, C. (2002): Equine embryos at the compacted morula and blastocyst stage can be obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured oocytes with frozen–thawed spermatozoa from semen of different fertilities. In: *Theriogenology* 58 (2-4), S. 709–712.

Lee, J. W.; Chang, H. C.; Wu, H. Y.; Liu, S. S.; Wang, C. H.; Chu, C. Y.; Shen, P. C. (2015): Effects of sperm pretreatment and embryo activation methods on the development of bovine embryos produced by intracytoplasmic sperm injection. In: *Reproductive biology* 15 (3), S. 154–162.

Leemans, B.; Gadella, B. M.; Stout, T. A.; Heras, S.; Smits, K.; Ferrer-Buitrago, M.; Claes, E.; Heindryckx, B.; De Vos, W. H.; Nelis, H.; Hoogewijs, M.; Van Soom, A. (2015): Procaine Induces Cytokinesis in Horse Oocytes via a pH-Dependent Mechanism. In: *Biology of reproduction* 93 (1), S. 23.

Leemans, B.; Gadella, B. M.; Stout, T. A.; de Schauwer, C.; Nelis, H.; Hoogewijs, M.; van Soom, A. (2016): Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. In: *Reproduction* 152 (6), R233–R245.

Li, G. P.; Seidel, G. E.; Squires, E. L. (2003): Intracytoplasmic sperm injection of bovine oocytes with stallion spermatozoa. In: *Theriogenology* 59 (5-6), S. 1143–1155.

Li, X.; Morris, L. H.; Allen, W. R. (2001): Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). In: *Reproduction* 121 (6), S. 925–932.

Lillie, F. R. (1914): Studies of fertilization. VI. The mechanism of fertilization in arbacia. In: *Journal of Experimental Zoology* 16 (4), S. 523–590.

Liu, L.; Ju, J. C.; Yang, X. (1998): Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. In: *Molecular reproduction and development* 49 (3), S. 298–307.

Liu, L.; Yang, X. (1999): Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. In: *Biology of reproduction* 61 (1), S. 1–7.

## 8. Verzeichnisse

Loi, P.; Ledda, S.; Fulka, J.; Cappai, P.; Moor, R. M. (1998): Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos. Effect of activation protocols. In: *Biology of reproduction* 58 (5), S. 1177–1187.

Luo, S. M.; Sun, Q. Y. (2013): Autophagy is not involved in the degradation of sperm mitochondria after fertilization in mice. In: *Autophagy* 9 (12), S. 2156–2157.

Martin, M. J. (2000): Development of in vivo-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. In: *Biology of reproduction* 63 (1), S. 109–112.

Matsumoto, M.; Otoi, T.; Suzuki, T. (1999): Effect of Glucose and Lactate on Development of In Vitro Produced Bovine Embryos in a Modified Synthetic Oviduct Fluid Medium. In: *Journal of Mammalian Ova Research* 16 (2), S. 73–76.

Matsuyama, K.; Miyakoshi, H.; Fukui, Y. (1993): Effect of glucose levels during the in vitro culture in synthetic oviduct fluid medium on in vitro development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. In: *Theriogenology* 40 (3), S. 595–605.

McGrath, J.; Solter, D. (1984): Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. In: *Cell* 37 (1), S. 179–183.

McKinnon, A. O.; Squires, E. L. (1988): Morphologic assessment of the equine embryo. In: *Journal of the American Veterinary Medical Association* 192 (3), S. 401–406.

McKinnon, A. O.; Lacham-Kaplan, O.; Trounson, A. O. (2000): Pregnancies produced from fertile and infertile stallions by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of single frozen-thawed spermatozoa into in vivo matured mare oocytes. In: *Journal of reproduction and fertility. Supplement* (56), S. 513–517.

McPartlin, L. A.; Suarez, S. S.; Czaya, C. A.; Hinrichs, K.; Bedford-Guaus, S. J. (2009): Hyperactivation of stallion sperm is required for successful in vitro fertilization of equine oocytes. In: *Biology of reproduction* 81 (1), S. 199–206.

Monniaux, D.; Clément, F.; Dalbiès-Tran, R.; Estienne, A.; Fabre, S.; Mansanet, C.; Monget, P. (2014): The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? In: *Biology of reproduction* 90 (4), S. 85.

Morris, L. H. A. (2018): The development of in vitro embryo production in the horse. In: *Equine veterinary journal* 50 (6), S. 712–720.

## 8. Verzeichnisse

- Naish, S. J.; Perreault, S. D.; Zirkin, B. R. (1987): DNA synthesis following microinjection of heterologous sperm and somatic cell nuclei into hamster oocytes. In: *Gamete research* 18 (2), S. 109–120.
- Navara, C. S.; First, N. L.; Schatten, G. (1994): Microtubule organization in the cow during fertilization, polyspermy, parthenogenesis, and nuclear transfer. The role of the sperm aster. In: *Developmental biology* 162 (1), S. 29–40.
- Ock, S. A.; Rho, G. J. (2008): Parthenogenetic development and ploidy following various chemical activation regimens of bovine oocytes. In: *The Journal of veterinary medical science* 70 (11), S. 1165–1172.
- Palermo, G.; Joris, H.; Devroey, P.; van Steirteghem, A. C. (1992): Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. In: *Lancet* 340 (8810), S. 17–18.
- Palmer, E.; Bézard, J.; Magistrini, M.; Duchamp, G. (1991): In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. In: *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 44, S. 375–384.
- Pantaleon, M.; Ryan, J. P.; Gil, M.; Kaye, P. L. (2001): An unusual subcellular localization of GLUT1 and link with metabolism in oocytes and preimplantation mouse embryos. In: *Biology of reproduction* 64 (4), S. 1247–1254.
- Parmar, M. S.; Pant, C.; Karuppanas, K.; Mili, B.; Upadhyay, D.; Kant, V. (2013): Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) and its Applications in Veterinary Sciences. An Overview. In: *Science International* 1 (8), S. 266–270.
- Pavlok, A.; Lucas-Hahn, A.; Niemann, H. (1992): Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. In: *Molecular reproduction and development* 31 (1), S. 63–67.
- Pereyra-Bonnet, F.; Fernández-Martín, R.; Olivera, R.; Jarazo, J.; Vichera, G.; Gibbons, A.; Salamone, D. (2008): A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species. In: *Reproduction, fertility and development* 20 (7), S. 741–749.

## 8. Verzeichnisse

- Perreault, S. D.; Barbee, R. R.; Slott, V. L. (1988): Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. In: *Developmental biology* 125 (1), S. 181–186.
- Probst, S.; Rath, D. (2003): Production of piglets using intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with flowcytometrically sorted boar semen and artificially activated oocytes. In: *Theriogenology* 59 (3-4), S. 961–973.
- Rho, G. J.; Wu, B.; Kawarsky, S.; Leibo, S. P.; Betteridge, K. J. (1998): Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection. In: *Molecular reproduction and development* 50 (4), S. 485–492.
- Ribeiro, B. I.; Love, L. B.; Choi, Y. H.; Hinrichs, K. (2008): Transport of equine ovaries for assisted reproduction. In: *Animal reproduction science* 108 (1-2), S. 171–179.
- Rieger, D.; Loskutoff, N. M.; Betteridge, K. J. (1992): Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured in vitro. In: *Journal of reproduction and fertility* 95 (2), S. 585–595.
- Rodriguez, M. B.; Gambini, A.; Bevacqua, R. J.; Salamone, D. F. (2016): Equine sperm induces pronuclear formation by intracytoplasmic sperm injection in bovine, swine and feline oocytes independently of chemical activation assistance. In: *Reproduction, fertility, and development* 27 (1) S. 95.
- Rosati, I.; Berlingeur, F.; Bogliolo, L.; Leoni, G.; Ledda, S.; Naitana, S. (2002): The effect of co-culture on the development of in vitro matured equine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. In: *Equine veterinary journal* 34 (7), S. 673–678.
- Roth, T. L.; Bush, L. M.; Wildt, D. E.; Weiss, R. B. (1999): Scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*) spermatozoa are functionally competent in a heterologous bovine in vitro fertilization system after cryopreservation on dry ice, in a dry shipper, or over liquid nitrogen vapor. In: *Biology of reproduction* 60 (2), S. 493–498.
- Rybouchkin, A.; Dozortsev, D.; de Sutter, P.; Qian, C.; Dhont, M. (1995): Intracytoplasmic injection of human spermatozoa into mouse oocytes: a useful model to investigate the oocyte-activating capacity and the karyotype of human spermatozoa. In: *Human reproduction* 10 (5), S. 1130–1135.

## 8. Verzeichnisse

- Sakagami, N.; Nishino, O.; Adachi, S.; Umeki, H.; Uchiyama, H.; Ichikawa, K.; Takeshita, K.; Kaneko, E.; Akiyama, K.; Kobayashi, S.; Tamada, H. (2014): Improvement of preimplantation development of in vitro-fertilized bovine zygotes by glucose supplementation to a chemically defined medium. In: *The Journal of veterinary medical science* 76 (10), S. 1403–1405.
- Sakkas, D.; Urner, F.; Bianchi, P. G.; Bizzaro, D.; Wagner, I.; Jaquenoud, N.; Manicardi, G.; Campana, A. (1996): Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. In: *Human reproduction* 11 (4), S. 837–843.
- Salamone, D. F.; Canel, N. G.; Rodriguez, M. B. (2017): Intracytoplasmic sperm injection in domestic and wild mammals. In: *Reproduction* 154 (6), F111-F124.
- Salgado, R. M.; Brom-de-Luna, J. G.; Resende, H. L.; Canesin, H. S.; Hinrichs, K. (2018): Lower blastocyst quality after conventional vs. Piezo ICSI in the horse reflects delayed sperm component remodeling and oocyte activation. In: *Journal of assisted reproduction and genetics* 35 (5), S. 825–840.
- Schnorr, B; Kressin, M. (2001): Embryologie der Haustiere. Kapitel 6 Befruchtung, Fertilisation. *Enke-Verlag* 4. Auflage, S. 33–36
- Schultz, R. M.; Kopf, G. S. (1995): Molecular basis of mammalian egg activation. In: *Current topics in developmental biology* 30, S. 21–62.
- Slavik, T.; Pavlok, A.; Fulka, J. (1990): Penetration of intact bovine ova with ram sperm in vitro. In: *Molecular reproduction and development* 25 (4), S. 345–347.
- Squires, E. L.; Wilson, J. M.; Kato, H.; Blaszczyk, A. (1996): A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection in equine oocytes matured in vitro. In: *Theriogenology* 1996 (306).
- Suarez, S. S. (2002): Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. In: *Reproduction in domestic animals* 37 (3), S. 140–143.
- Sutovsky, P.; Navara, C. S.; Schatten, G. (1996): Fate of the sperm mitochondria, and the incorporation, conversion, and disassembly of the sperm tail structures during bovine fertilization. In: *Biology of reproduction* 55 (6), S. 1195–1205.

## 8. Verzeichnisse

Terada, Y.; Nakamura, S.; Morita, J.; Tachibana, M.; Morito, Y.; Ito, K.; Murakami, T.; Yaegashi, N.; Okamura, K. (2004): Use of Mammalian eggs for assessment of human sperm function. Molecular and cellular analyses of fertilization by intracytoplasmic sperm injection. In: *American journal of reproductive immunology* 51 (4), S. 290–293.

Tesarik, J. (1998): Oocyte activation after intracytoplasmic injection of mature and immature sperm cells. In: *Human reproduction* 13 Suppl 1, S. 117–127.

Tremoleda, J. L.; Stout, T. A.; Lagutina, I.; Lazzari, G.; Bevers, M. M.; Colenbrander, B.; Galli, C. (2003a): Effects of in vitro production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation. In: *Biology of reproduction* 69 (6), S. 1895–1906.

Tremoleda, J. L.; van Haeften, T.; Stout, T. A.; Colenbrander, B.; Bevers, M. M. (2003b): Cytoskeleton and chromatin reorganization in horse oocytes following intracytoplasmic sperm injection. Patterns associated with normal and defective fertilization. In: *Biology of reproduction* 69 (1), S. 186–194.

Uehara, T.; Yanagimachi, R. (1976): Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. In: *Biology of reproduction* 15 (4), S. 467–470.

Uhde, K.; van Tol, H. T.; Stout, T. A.; Roelen, B. A. (2018): Exposure to elevated glucose concentrations alters the metabolomic profile of bovine blastocysts. In: *PloS one* 13 (6), e0199310.

Urner, F.; Sakkas, D. (1999): Characterization of glycolysis and pentose phosphate pathway activity during sperm entry into the mouse oocyte. In: *Biology of reproduction* 60 (4), S. 973–978.

Vernunft, A.; Alm, H.; Tuchscherer, A.; Kanitz, W.; Hinrichs, K.; Torner, H. (2013): Chromatin and cytoplasmic characteristics of equine oocytes recovered by transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration are influenced by the developmental stage of their follicle of origin. In: *Theriogenology* 80 (1), S. 1–9.

Wakai, T.; Fissore, R. A. (2013): Ca(2+) homeostasis and regulation of ER Ca(2+) in mammalian oocytes/eggs. In: *Cell calcium* 53 (1), S. 63–67.

## 8. Verzeichnisse

Walser, C. B.; Lipshitz, H. D. (2011): Transcript clearance during the maternal-to-zygotic transition. In: *Current opinion in genetics & development* 21 (4), S. 431–443.

Wang, Z. G.; Wang, W.; Yu, S. D.; Xu, Z. R. (2008): Effects of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos. In: *Animal reproduction science* 105 (3-4), S. 292–301.

Yanagimachi, R.; Okada, A.; Tung, K. S. (1981): Sperm autoantigens and fertilization: II. Effects of anti-guinea pig sperm autoantibodies on sperm-ovum interactions. In: *Biology of reproduction* 24 (3), S. 512–518.

Yanagimachi, R. (1994): Fertility of mammalian spermatozoa. Its development and relativity. In: *Zygote* 2 (4), S. 371–372.

Zheng, W.; Liu, K. (2012): Maternal control of mouse preimplantation development. In: *Results and problems in cell differentiation* 55, S. 115–139.

## 9. Anhänge

### 9.1 Tabellen

#### 9.1.1 Ergebnisse

Tabelle 1: Übersicht der Verteilung der gewonnenen Kumulus-Oozyten-Komplexe beim Pferd

KOK	Kompakter Kumulus	% ( $\bar{x}\pm SD$ )	Expandierter Kumulus	% ( $\bar{x}\pm SD$ )	Kein/Teilkumulus	% ( $\bar{x}\pm SD$ )
<b>143</b>	88	61,5±27,0	30	21,0±15,5	25	17,5±25,1

Tabelle 2: Maturations- und Teilungsraten beim Pferd

KOK	Maturierte Eizellen	% ( $\bar{x}\pm SD$ )	Geteilte Eizellen	% ( $\bar{x}\pm SD$ )
<b>143</b>	71	49,7±22,1	6	4,2±7,2

Tabelle 3: ICSI; DMEM/F-12; Piezo

	Erfolgreiche ICSI				ICSI nicht erfolgreich		Nicht auswertbar		
	Gesetzt	Normal	[%]	Abnormal	[%]	Kein Spermium	[%]		[%]
	12,0	3,0	25,0	8,0	66,7	0,0	0,0	1,0	8,3
	17,0	6,0	35,3	6,0	35,3	1,0	5,9	4,0	23,5
	13,0	3,0	23,1	9,0	69,2	0,0	0,0	1,0	7,7
	12,0	3,0	25,0	9,0	75,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	15,0	6,0	40,0	7,0	46,7	0,0	0,0	2,0	13,3
<b>Summe</b>	69,0	21,0		39,0		1,0		8,0	
<b>Mittelwert</b>			29,7		58,6		1,2		10,6
<b>Standardabweichung</b>			6,7		15,1		2,4		7,8

Tabelle 4: ICSI; SOFaa; Piezo

	Erfolgreiche ICSI				ICSI nicht erfolgreich		Nicht auswertbar		
	Gesetzt	Normal	[%]	Abnormal	[%]	Kein Spermium	[%]		[%]
	9,0	3,0	33,3	5,0	55,6	0,0	0,0	1,0	11,1
	14,0	3,0	21,4	9,0	64,3	0,0	0,0	2,0	14,3
	10,0	4,0	40,0	5,0	50,0	0,0	0,0	1,0	10,0
	10,0	2,0	20,0	7,0	70,0	0,0	0,0	1,0	10,0
	10,0	4,0	40,0	6,0	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	15,0	6,0	40,0	6,0	40,0	0,0	0,0	3,0	20,0
	14,0	4,0	28,6	7,0	50,0	1,0	6,7	2,0	14,3
	22,0	5,0	22,7	16,0	72,7	1,0	7,1	0,0	0,0
	9,0	5,0	55,6	4,0	44,4	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Summe</b>	113,0	36,0		65,0		2,0		10,0	
<b>Mittelwert</b>			33,5		56,3		1,5		8,9
<b>Standardabweichung</b>			11,0		10,7		2,9		6,9

## 9. Anhänge

Tabelle 5: ICSI; SOFaa + Glukose; Piezo

	Erfolgreiche ICSI				ICSI nicht erfolgreich		Nicht auswertbar		
	Gesetzt	Normal	[%]	Abnormal	[%]	Kein Spermium	[%]		[%]
	15,0	4,0	26,7	10,0	66,7	0,0	0,0	1,0	6,7
	15,0	5,0	33,3	8,0	53,3	1,0	6,7	1,0	6,7
	12,0	3,0	25,0	6,0	50,0	1,0	8,3	2,0	16,7
	14,0	4,0	28,6	8,0	57,1	1,0	7,1	1,0	7,1
	16,0	5,0	31,3	9,0	56,3	0,0	0,0	2,0	12,5
	8,0	3,0	37,5	4,0	50,0	0,0	0,0	1,0	12,5
	7,0	2,0	28,6	4,0	57,1	0,0	0,0	1,0	14,3
<b>Summe</b>	87,0	26,0		49,0		3,0		9,0	
<b>Mittelwert</b>			30,1		55,8		3,2		10,9
<b>Standardabweichung</b>			3,9		5,3		3,7		3,8

Tabelle 6: ICSI; SOFaa + Glukose; Piezo + Chemische Aktivierung

	Erfolgreiche ICSI				ICSI nicht erfolgreich		Nicht auswertbar		
	Gesetzt	Normal	[%]	Abnormal	[%]	Kein Spermium	[%]		[%]
	15,0	5,0	33,3	9,0	60,0	0,0	0,0	1,0	6,7
	10,0	3,0	30,0	6,0	60,0	0,0	0,0	1,0	10,0
	14,0	4,0	28,6	9,0	64,3	0,0	0,0	1,0	7,1
	10,0	2,0	20,0	8,0	80,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	10,0	4,0	40,0	6,0	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	13,0	3,0	23,1	8,0	61,5	1,0	1,6	1,0	7,7
	9,0	3,0	33,3	6,0	66,7	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Summe</b>	81,0	24,0		52,0		1,0		4,0	
<b>Mittelwert</b>			29,8		64,6		0,2		4,5
<b>Standardabweichung</b>			6,2		6,7		0,6		4,0

## 9. Anhänge

Tabelle 7: ICSI; SOFaa + Glukose; Chemische Aktivierung

	Erfolgreiche ICSI					ICSI nicht erfolgreich		Nicht auswertbar	
	Gesetzt	Normal	[%]	Abnormal	[%]	Kein Spermium	[%]		[%]
	19,0	5,0	26,3	12,0	63,2	1,0	5,3	1,0	5,3
	19,0	4,0	21,1	15,0	78,9	0,0	0,0	0,0	0,0
	17,0	4,0	23,5	12,0	70,6	0,0	0,0	1,0	5,9
	14,0	4,0	28,6	10,0	71,4	0,0	0,0	0,0	0,0
	19,0	4,0	21,1	15,0	78,9	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Summe</b>	88,0	21,0		64,0		1,0		2,0	
<b>Mittelwert</b>			24,1		72,6		1,1		2,2
<b>Standardabweichung</b>			3,0		5,9		2,1		2,7

Tabelle 8: Sham-Injektion; DMEM/F-12; Piezo

	Gesetzt	2PK+1VK	[%]	1PK+1VK	[%]	Keine Aktivierung	[%]	Nicht auswertbar	[%]
	9,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,0	88,9	1,0	11,1
	9,0	0,0	0,0	1,0	11,1	8,0	88,9	0,0	0,0
	10,0	0,0	0,0	4,0	40,0	4,0	40,0	2,0	20,0
	7,0	0,0	0,0	3,0	42,9	3,0	42,9	1,0	14,3
	12,0	0,0	0,0	4,0	33,3	6,0	50,0	2,0	16,7
<b>Summe</b>	47,0	0,0		12,0		29,0		6,0	
<b>Mittelwert</b>			0,0		25,5		62,1		12,4
<b>Standardabweichung</b>			0,0		16,9		22,1		6,9

Tabelle 9: Sham-Injektion; SOFaa; Piezo

	Gesetzt	2PK+1VK	[%]	1PK+1VK	[%]	Keine Aktivierung	[%]	Nicht auswertbar	[%]
	7,0	1,0	14,3	4,0	57,1	2,0	28,6	0,0	0,0
	13,0	2,0	15,4	5,0	38,5	3,0	23,1	3,0	23,1
	13,0	1,0	7,7	6,0	46,2	5,0	38,5	1,0	7,7
	13,0	0,0	0,0	5,0	38,5	7,0	53,8	1,0	7,7
	6,0	2,0	33,3	0,0	0,0	4,0	66,7	0,0	0,0
	11,0	1,0	9,1	5,0	45,5	5,0	45,5	0,0	0,0
	16,0	0,0	0,0	1,0	6,3	15,0	93,8	0,0	0,0
<b>Summe</b>	79,0	7,0		26,0		41,0		5,0	
<b>Mittelwert</b>			11,4		33,1		50,0		5,5
<b>Standardabweichung</b>			10,6		19,9		22,5		7,9

## 9. Anhänge

Tabelle 10: Sham-Injektion; SOFaa + Glukose; Piezo

	Gesetzt	2PK+1VK	[%]	1PK+1VK	[%]	Keine Aktivierung	[%]	Nicht auswertbar	[%]
	10,0	0,0	0,0	2,0	20,0	8,0	80,0	0,0	0,0
	9,0	0,0	0,0	1,0	11,1	8,0	88,9	0,0	0,0
	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	100,0	0,0	0,0
	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,0	87,5	1,0	12,5
	10,0	1,0	10,0	5,0	50,0	3,0	30,0	1,0	10,0
	15,0	1,0	6,7	4,0	26,7	10,0	66,7	0,0	0,0
<b>Summe</b>	57,0	2,0		12,0		41,0		2,0	
<b>Mittelwert</b>			2,8		18,0		75,5		3,8
<b>Standardabweichung</b>			4,0		17,3		22,7		5,4

Tabelle 11: Sham-Injektion; SOFaa + Glukose; Chemische Aktivierung

	Gesetzt	2PK+1VK	[%]	1PK+1VK	[%]	Keine Aktivierung	[%]	Nicht auswertbar	[%]
	10,0	6,0	60,0	2,0	20,0	2,0	20,0	0,0	0,0
	10,0	5,0	50,0	0,0	0,0	3,0	30,0	2,0	20,0
	13,0	6,0	46,2	1,0	7,7	6,0	46,2	0,0	0,0
	15,0	9,0	60,0	1,0	6,7	5,0	33,3	0,0	0,0
	11,0	5,0	45,5	2,0	18,2	4,0	36,4	0,0	0,0
	15,0	8,0	53,3	1,0	6,7	6,0	40,0	0,0	0,0
<b>Summe</b>	74,0	39,0		7,0		26,0		2,0	
<b>Mittelwert</b>			52,5		9,9		34,3		3,3
<b>Standardabweichung</b>			5,9		7,0		8,2		7,5

Tabelle 12: Sham-Injektion; SOFaa + Glukose; Piezo + Chemische Aktivierung

	Gesetzt	2PK+1VK	[%]	1PK+1VK	[%]	Keine Aktivierung	[%]	Nicht auswertbar	[%]
	5,0	0,0	0,0	2,0	40,0	3,0	60,0	0,0	0,0
	9,0	2,0	22,2	5,0	55,6	1,0	11,1	1,0	11,1
	6,0	0,0	0,0	5,0	83,3	1,0	16,7	0,0	0,0
	7,0	1,0	14,3	4,0	57,1	2,0	28,6	0,0	0,0
	11,0	1,0	9,1	8,0	72,7	2,0	18,2	0,0	0,0
	7,0	0,0	0,0	5,0	71,4	2,0	28,6	0,0	0,0
	7,0	0,0	0,0	4,0	57,1	2,0	28,6	1,0	14,3
	10,0	0,0	0,0	6,0	60,0	3,0	30,0	1,0	10,0
<b>Summe</b>	62,0	4,0		39,0		16,0		3,0	
<b>Mittelwert</b>			5,7		62,2		27,7		4,4
<b>Standardabweichung</b>			8,1		12,4		13,9		5,8

## 9. Anhänge

Tabelle 13: Teilungsraten; ICSI; SOFaa + Glukose; Chemische Aktivierung

	<b>Gesetzt</b>	<b>Geteilt</b>	<b>[%]</b>
	18	3	16,7
	27	1	3,7
	20	1	5,0
<b>Summe</b>	65	5	
<b>Mittelwert</b>			8,5
<b>Standardabweichung</b>			5,8

Tabelle 14: Teilungsraten; ICSI; SOFaa + Glukose; Piezo + Chemische Aktivierung

	<b>Gesetzt</b>	<b>Geteilt</b>	<b>[%]</b>
	19	3	15,8
	11	3	27,3
	8	1	12,5
	10	2	20,0
	9	3	33,3
	10	2	20,0
<b>Summe</b>	67	14	
<b>Mittelwert</b>			21,5
<b>Standardabweichung</b>			7,0

Tabelle 15: Teilungsraten; Sham-Injektion; SOFaa + Glukose, Chemische Aktivierung

	<b>Gesetzt</b>	<b>Geteilt</b>	<b>[%]</b>
	17	0	0,0
	18	0	0,0
	26	2	7,7
<b>Summe</b>	61	2	
<b>Mittelwert</b>			2,6
<b>Standardabweichung</b>			3,6

Tabelle 16: Teilungsraten; Keine Injektion; SOFaa + Glukose; Chemische Aktivierung

	<b>Gesetzt</b>	<b>Geteilt</b>	<b>[%]</b>
	13	2	15,4
	15	0	0,0
	18	1	5,6
	17	1	5,9
<b>Summe</b>	63	4	
<b>Mittelwert</b>			6,7
<b>Standardabweichung</b>			5,5

## 9. Anhänge

Tabelle 17: Glukose-Messung; DMEM/F-12; Piezo

	<b>Frisch</b>	<b>Leer</b>	<b>ICSI</b>	<b>Sham</b>
	17,0	16,9	16,5	17,5
	19,9	12,7	19,0	19,4
	16,9	18,9	15,3	14,5
	18,7	13,4	16,8	15,2
	19,2	16,7	16,7	17,3
			13,0	15,4
			18,0	17,7
			16,5	12,6
			22,0	
			20,7	
			19,0	
<b>Mittelwert</b>	<b>18,3</b>	<b>15,7</b>	<b>17,6</b>	<b>16,2</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>1,2</b>	<b>2,3</b>	<b>2,4</b>	<b>2,0</b>

Tabelle 18: Glukosemessung; SOFaa + Glukose; Piezo

	<b>Frisch</b>	<b>Leer</b>	<b>ICSI</b>	<b>Sham</b>
	16,7	16,3	15,0	14,9
	16,7	9,1	16,1	16,5
	15,4	13,5	15,1	7,0
	14,7	15,4	13,5	13,2
	15,0	14,1	14,1	18,2
	15,0	12,4	15,4	14,5
	16,4	16,4	18,7	14,3
		15,6	14,9	13,7
		17,9	15,2	12,3
			10,2	7,4
			12,9	
			14,4	
			15,6	
			12,5	
<b>Mittelwert</b>	<b>15,7</b>	<b>14,5</b>	<b>14,5</b>	<b>13,2</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,8</b>	<b>2,5</b>	<b>1,9</b>	<b>3,4</b>

## 9. Anhänge

Tabelle 19: Glukosemessung; SOFaa + Glukose; Piezo + Chemische Aktivierung

	<b>Frisch</b>	<b>Leer</b>	<b>ICSI</b>	<b>Sham</b>
	14,7	14,2	15,7	15,5
	16,1	16,2	19,7	15,8
	12,7	12,8	16,9	11,7
	13,3	10,2	10,1	12,8
	15,0	15,1	13,4	11,6
	11,4	11,4	11,3	17,2
	16,0	18,4	10,8	
	12,4	11,7	12,4	
	15,9		13,0	
			13,6	
			19,6	
			16,1	
			16,3	
			15,8	
			16,9	
			14,6	
			14,1	
			15,3	
<b>Mittelwert</b>	<b>14,2</b>	<b>13,7</b>	<b>14,7</b>	<b>14,1</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>1,7</b>	<b>2,6</b>	<b>2,6</b>	<b>2,2</b>

Tabelle 20: Glukosemessung; SOFaa + Glukose; Chemische Aktivierung

	<b>Frisch</b>	<b>Leer</b>	<b>ICSI</b>	<b>Sham</b>
	14,7	14,2	12,6	14,5
	13,6	14,6	18,2	13,6
	16,0	15,1	17,6	13,6
	16,9	13,5	14,4	14,3
	12,9	12,8	15,4	13,4
	15,0	16,2	13,7	12,9
	13,3	14,9	15,7	14,6
	14,9	15,4	15,1	13,7
			14,6	14,7
			14,2	14,0
			13,3	13,2
			13,5	
			13,9	
			16,2	
<b>Mittelwert</b>	<b>14,7</b>	<b>14,6</b>	<b>14,9</b>	<b>13,9</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>1,3</b>	<b>1,0</b>	<b>1,6</b>	<b>0,6</b>

9.1.2 Statistische Auswertung: One-Way ANOVA

Tabelle 20: Vergleich zwischen verschiedenen Glukosekonzentrationen im Medium (Piezo)

Ergebnis	SOFaa		SOFaa + Glukose		DMEM/F-12		p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD			
ICSI	2 PK + 2 VK	33,5	11,0	30,1	3,9	29,7	6,7	0,66	Nein
	Abnormal	56,3	10,7	55,8	5,3	58,6	15,1	0,91	Nein
	Kein Spermium	1,5	2,9	3,2	3,7	1,2	2,4	0,59	Nein
Sham-Injektion	2 PK + 1 VK	11,4	10,6	2,8	4,0	0,0	0,0	0,11	Nein
	1 PK + 1 VK	33,1	19,9	18,0	17,3	25,5	16,9	0,41	Nein
	Keine Aktivierung	50,0	22,5	75,5	22,7	62,1	22,1	0,21	Nein

Tabelle 21: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (ICSI)

Gruppe	2 PK + 2 VK		Abnormal		Kein Spermium		p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)
	MW	SD	MW	SD	MW	SD		
SOFaa	33,5	11,0	56,3	10,7	1,5	2,9	<0,001	Ja
SoFaa + Glukose	30,1	3,9	55,8	5,3	3,2	3,7	<0,001	Ja
DMEM/F12	29,7	6,7	58,6	15,1	1,2	2,4	0,0002	Ja

Tabelle 22: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (Sham-Injektion)

Gruppe	2 PK + 1 VK		1 PK + 1 VK		p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)
	MW	SD	MW	SD		
SOFaa	11,4	10,6	33,1	19,9	0,0069	Ja
SOFaa + Glukose	2,8	4,0	18,0	17,3	0,0007	Ja

Fortsetzung Tabelle 22: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (Sham-Injektion)

<b>DMEM/F-12</b>	0,0	0,0	25,5	16,9	62,1	22,1	0,03	Ja
------------------	-----	-----	------	------	------	------	------	----

Tabelle 23: Vergleich verschiedener Aktivierungsmethoden

	Piezo			Piezo + CA			CA			Unterschied signifikant (p<0,05)
	Ergebnis	MW	SD	MW	SD	MW	MW	SD	p-Wert	
<b>ICSI</b>	2 PK + 2 VK	30,1	3,9	29,8	6,2	24,1	3,0	0,12	Nein	
	Abnormal	55,8	5,3	64,6	6,7	72,6	5,9	0,0039	Ja	
	Kein Spermium	3,2	3,7	0,2	0,6	1,1	2,1	0,22	Nein	
<b>Sham-Injektion</b>	2 PK + 1 VK	2,8	4,0	5,7	8,1	52,5	5,9	<0,001	Ja	
	1 PK + 1 VK	18,0	17,3	62,2	12,4	9,9	7,0	<0,001	Ja	
	Keine Aktivierung	75,5	22,7	27,7	13,9	34,3	8,2	0,0002	Ja	

Tabelle 24: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (ICSI)

Gruppe	2 PK + 2 VK			Abnormal			Kein Spermium			Unterschied signifikant (p<0,05)
	MW	SD	MW	MW	SD	MW	MW	SD	p-Wert	
<b>Piezo</b>	30,1	3,9	55,8	5,3	3,2	3,7	<0,001	Ja		
<b>Piezo + CA</b>	29,8	6,2	64,6	6,7	0,2	0,6	<0,001	Ja		
<b>CA</b>	24,1	3,0	72,6	5,9	1,1	2,1	<0,001	Ja		

Tabelle 25: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (Sham-Injektion)

Gruppe	2 PK + 1 VK			1 PK + 1 VK			Unterschied signifikant (p<0,05)	
	MW	SD	MW	MW	SD	MW		p-Wert
<b>Piezo</b>	2,8	4,0	18,0	17,3	75,5	22,7	0,0007	Ja
<b>Piezo + CA</b>	5,7	8,1	62,2	12,4	27,7	13,9	<0,001	Ja

Fortsetzung Tabelle 25: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (Sham-Injektion)

<b>CA</b>	52,5	5,9	9,9	7,0	34,3	8,2	<0,001	Ja
-----------	------	-----	-----	-----	------	-----	--------	----

Tabelle 26: Teilungsraten

Teilungsraten	ICSI; Piezo + CA		ICSI; CA		Sham; CA		Keine Injektion; CA		p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD		
	21,5	7,0	8,5	5,8	2,6	3,6	6,7	5,5	0,0311	Ja

Tabelle 27: Vergleich der Glukosekonzentration innerhalb der jeweiligen Gruppen

Medium und Aktivierung	Frisch		Öl		ICSI		Sham		p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD		
<b>DMEM/F-12; Piezo</b>	18,3	1,2	15,7	2,3	17,6	2,4	16,2	2,0	0,20	Nein
<b>SOFaa + Glukose; Piezo</b>	15,7	0,8	14,5	2,5	14,5	1,9	13,2	3,4	0,25	Nein
<b>SOFaa + Glukose; Piezo + CA</b>	14,2	1,7	13,7	2,6	14,7	2,6	14,1	2,2	0,79	Nein
<b>SOFaa + Glukose; CA</b>	14,7	1,3	14,6	1	14,9	1,6	13,9	0,6	0,25	Nein

Tabelle 28: Vergleich der Glukosekonzentration zwischen den Gruppen

	SOFaa + Glukose; Piezo		SOFaa + Glukose; Piezo + CA		SOFaa + Glukose; CA		p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)
	MW	SD	MW	SD	MW	SD		
<b>Frisch</b>	15,7	0,8	14,2	1,7	14,7	1,3	0,11	Nein
<b>Leer</b>	14,5	2,5	13,7	2,6	14,6	1	0,69	Nein
<b>ICSI</b>	14,5	1,9	14,7	2,6	14,9	1,6	0,91	Nein
<b>Sham</b>	13,2	3,4	14,1	2,2	13,9	0,6	0,73	Nein

9.1.3 Statistische Auswertung: Tukey-Test

Tabelle 29: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (ICSI): DMEM/F12 (Piezo)

Verglichene Gruppen	p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)	
Abnormal	Kein Spermium	<0,001	Ja
Abnormal	2 Polkörper + 2 Vorkerne	0,0030	Ja
2 Polkörper + 2 Vorkerne	Kein Spermium	0,0033	Ja

Tabelle 30: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (Sham): DMEM/F12 (Piezo)

Verglichene Gruppen	p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)	
Nicht Aktiviert	2 Polkörper + 1 Vorkern	0,0004	Ja
Nicht Aktiviert	1 Polkörper + 1 Vorkern	0,0148	Ja
2 Polkörper + 1 Vorkerne	1 Polkörper + 1 Vorkern	0,1042	Nein

Tabelle 31: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (ICSI): SOFaa + Glukose (Piezo)

Verglichene Gruppen	p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)	
Abnormal	Kein Spermium	<0,001	Ja
Abnormal	2 Polkörper + 2 Vorkerne	<0,001	Ja
2 Polkörper + 2 Vorkerne	Kein Spermium	<0,001	Ja

Tabelle 32: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (Sham): SOFaa + Glukose (Piezo)

Verglichene Gruppen	p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)	
Nicht Aktiviert	2 Polkörper + 1 Vorkern	<0,001	Ja
Nicht Aktiviert	1 Polkörper + 1 Vorkern	0,0002	Ja
2 Polkörper + 1 Vorkerne	1 Polkörper + 1 Vorkern	0,3456	Nein

Tabelle 33: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (ICSI): SOFaa (Piezo)

Verglichene Gruppen	p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)	
Abnormal	Kein Spermium	<0,001	Ja
Abnormal	2 Polkörper + 2 Vorkerne	<0,001	Ja

Fortsetzung Tabelle 33: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (ICSI): SOFaa (Piezo)

2 Polkörper + 2 Vorkerne	Kein Spermium	<0,001	Ja
--------------------------	---------------	--------	----

Tabelle 34: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (Sham): SOFaa (Piezo)

Verglichene Gruppen		p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)
Nicht Aktiviert	2 Polkörper + 1 Vorkern	0,0051	Ja
Nicht Aktiviert	1 Polkörper + 1 Vorkern	0,1292	Nein
2 Polkörper + 1 Vorkerne	1 Polkörper + 1 Vorkern	0,2768	Nein

Tabelle 35: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (ICSI): SOFaa + Glukose (CA)

Verglichene Gruppen		p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)
Abnormal	Kein Spermium	<0,001	Ja
Abnormal	2 Polkörper + 2 Vorkerne	<0,001	Ja
2 Polkörper + 2 Vorkerne	Kein Spermium	<0,001	Ja

Tabelle 36: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (Sham): SOFaa + Glukose (CA)

Verglichene Gruppen		p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)
Nicht Aktiviert	2 Polkörper + 1 Vorkern	<0,001	Ja
Nicht Aktiviert	1 Polkörper + 1 Vorkern	0,0002	Ja
2 Polkörper + 1 Vorkerne	1 Polkörper + 1 Vorkern	0,0028	Ja

Tabelle 37: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (ICSI): SOFaa + Glukose (CA+Piezo)

Verglichene Gruppen		p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)
Abnormal	Kein Spermium	<0,001	Ja
Abnormal	2 Polkörper + 2 Vorkerne	<0,001	Ja
2 Polkörper + 2 Vorkerne	Kein Spermium	<0,001	Ja

Tabelle 38: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (Sham): SOFaa + Glukose (CA+Piezo)

Verglichene Gruppen		p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)
Nicht Aktiviert	2 Polkörper + 1 Vorkern	0,0055	Ja
Nicht Aktiviert	1 Polkörper + 1 Vorkern	<0,001	Ja

Fortsetzung Tabelle 38: Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen (Sham): SOFaa + Glukose (CA+Piezo)

2 Polkörper + 1 Vorkerne	1 Polkörper + 1 Vorkern	<0,001	Ja
--------------------------	-------------------------	--------	----

Tabelle 39: Vergleich zwischen den Gruppen: ICSI (SOFaa + Glukose)

Verglichene Gruppen		Untersuchter Wert	p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)
Piezo	Chemische Aktivierung	Abnormal	0,0012	Ja
Piezo + Chemische Aktivierung	Piezo	Abnormal	0,0546	Nein
Piezo + Chemische Aktivierung	Chemische Aktivierung	Abnormal	0,1260	Nein

Tabelle 40: Vergleich zwischen den Gruppen: Sham (SOFaa + Glukose)

Verglichene Gruppen		Untersuchter Wert	p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)
Piezo	Chemische Aktivierung	2 Polkörper + 1 Vorkern	<0,001	Ja
Piezo + Chemische Aktivierung	Piezo	2 Polkörper + 1 Vorkern	0,7233	Nein
Piezo + Chemische Aktivierung	Chemische Aktivierung	2 Polkörper + 1 Vorkern	<0,001	Ja
Piezo	Chemische Aktivierung	1 Polkörper + 1 Vorkern	0,2477	Nein
Piezo + Chemische Aktivierung	Piezo	1 Polkörper + 1 Vorkern	<0,001	Ja
Piezo + Chemische Aktivierung	Chemische Aktivierung	1 Polkörper + 1 Vorkern	<0,001	Ja
Piezo + Chemische Aktivierung	Chemische Aktivierung	Keine Aktivierung	0,0018	Ja
Piezo + Chemische Aktivierung	Piezo	Keine Aktivierung	0,0002	Ja
Piezo + Chemische Aktivierung	Chemische Aktivierung	Keine Aktivierung	0,7613	Nein

Tabelle 41: Vergleich Teilungsraten

Verglichene Gruppen		p-Wert	Unterschied signifikant (p<0,05)
ICSI (Chemische Aktivierung + Piezo)	Sham-Injektion (Chemische Aktivierung)	0,0082	Ja
ICSI (Chemische Aktivierung + Piezo)	Chemisch Aktiviert (keine Injektion)	0,0244	Ja
ICSI (Chemische Aktivierung + Piezo)	ICSI (Chemische Aktivierung)	0,0762	Nein
ICSI (Chemische Aktivierung)	Sham-Injektion (Chemische Aktivierung)	0,6899	Nein
Chemisch Aktiviert (keine Injektion)	Sham-Injektion (Chemische Aktivierung)	0,8295	Nein
ICSI (Chemische Aktivierung)	Chemisch Aktiviert (keine Injektion)	0,9861	Nein

## 9.2 Medien

## 9.2.1 Medien für die IVP

Tabelle 42: PBS Gebrauchslösung

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>Dulbecco's phosphate buffered saline</b>	g/l	9,65	Sigma-Aldrich	D5773-50L
<b>Penicillin G potassium</b>	IE/ml	50,0	Sigma-Aldrich	PENK-100MU
<b>Streptomycinsulfate</b>	µg/ml	50	Sigma-Aldrich	S6501-25G
<b>Sodium-pyruvate</b>	µg/ml	36,0	Sigma-Aldrich	P3662-25G
<b>D-Glucose monohydrat</b>	mg/ml	1,0	Sigma-Aldrich	16301-1KG
<b>Calciumchlorid-dihydrate</b>	µg/ml	133,0	Sigma-Aldrich	C7902-500G

Tabelle 43: PBS Complete

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>Heparin</b>	g/l	0,0112	Sigma-Aldrich	H3149-100KU
<b>BSA (Fraktion V)</b>	g/l	1,0	Sigma-Aldrich	A9647-100G

Tabelle 44: TCM Air

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>TCM199</b>	g/100 ml	1,5	Sigma-Aldrich	M2520-1L
<b>Gentamycinsulfate</b>	mg/100 ml	5,0	Sigma-Aldrich	G3632-5G
<b>Sodium-pyruvate</b>	mg/100ml	2,2	Sigma-Aldrich	P3662-25G
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	mg/100 ml	35,0	Sigma-Aldrich	S4019-500G
<b>ad. X ml H<sub>2</sub>O</b>	ml	100,0	Fresenius	Ampuwa
<b>BSA (FAF)*</b>	mg/100ml	100,0	Sigma-Aldrich	A7030-100G

pH durch Zugabe von 1M NaOH auf 7,2 einstellen.

\*Zugabe nach Einstellung des pH.

Tabelle 45: TCM-Gebrauchslösung

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>TCM199</b>	g/ml	1,5	Sigma-Aldrich	M2520-1L
<b>Gentamycinsulfate</b>	mg/100 ml	5,0	Sigma-Aldrich	G3632-5G
<b>Sodium-pyruvate</b>	mg/100 ml	2,2	Sigma-Aldrich	P3662-25G
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	mg/100 ml	220,0	Sigma-Aldrich	S4019-500G
<b>ad. X ml H<sub>2</sub>O</b>	ml	100,0	Fresenius	Ampuwa
<b>BSA (FAF)*</b>	mg/100 ml	100,0	Sigma-Aldrich	A7030-100G
<b>FSH</b>	µU/ml	5,0	Sigma-Aldrich	MFCD00131099

pH durch Rühren auf 7,4 einstellen.

\*Zugabe nach Einstellung des pH.

## 9. Anhänge

Tabelle 46: Reifungsmedium

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>TCM199-Gebrauchslösung</b>	ml	100		
<b>Suigonan</b>	IE/ml	10,0	MSD Intervet	Suigonan
- PMSG	IE/ml	5,0		

Tabelle 47: Fert-TALP Stocklösung

Substrat	Einheit	Menge	Konzentration (mM)	Hersteller	Produktnr.
<b>NaCl</b>	mg/100 ml	665,8	114,0	Sigma-Aldrich	S5886-1KG
<b>KCl</b>	mg/100ml	23,9	3,2	Sigma-Aldrich	P5405-250G
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	mg/100ml	210,0	25,0	Sigma-Aldrich	S4019-500G
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	mg/100ml	4,1	0,3	Merck	A0483046305
<b>CaCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O</b>	mg/100ml	29,4	2,0	Sigma-Aldrich	C7902-500G
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	mg/100ml	4,8	0,5	Sigma-Aldrich	M8266-100G
<b>Phenolred</b>	mg/100ml	1,0	0,01 µg/ml	Sigma-Aldrich	N4638-1G
<b>D-Penicillinamine</b>	mg/100ml	0,3	20	Sigma-Aldrich	P4875-1G
<b>Natriumlactate</b>	mg/100ml	186,0	10	Sigma-Aldrich	L4263-100ML
<b>ad. 100 ml H<sub>2</sub>O</b>	ml			Fresenius	Ampuwa

Tabelle 48: Fert-TALP Gebrauchslösung

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>Fert-TALP Stocklösung</b>	ml	10,14		
<b>Gentamycinsulfate</b>	µg	50,0	Sigma-Aldrich	G3632-5G
<b>BSA (Fraktion V)</b>	mg	60,0	Sigma-Aldrich	A9647-100G
<b>Sodium-pyruvate</b>	µg	280,0	Sigma-Aldrich	P3662-25G

Tabelle 49: Epinephrin-Lösung

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>Hypotaurine</b>	mg	1,83	Sigma-Aldrich	H1384-100NG
<b>Na-Metabisulfit</b>	mg	40,0	Sigma-Aldrich	71932-1KG
<b>Natriumlactate</b>	mg	132,0	Sigma-Aldrich	L4263-100ML
<b>H<sub>2</sub>O</b>	ml	10,0	Fresenius	Ampuwa

Tabelle 50: Hypotaurin-Lösung

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>Hypotaurine</b>	mg	1,09	Sigma-Aldrich	H1384-100NG
<b>H<sub>2</sub>O</b>	ml	10,0	Fresenius	Ampuwa

Tabelle 51: Heparin-Lösung

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>Heparin</b>	mg	2,82	Sigma-Aldrich	H3149-100KU
<b>H<sub>2</sub>O</b>	ml	10,0	Fresenius	Ampuwa

## 9. Anhänge

Tabelle 52: HHE-Stocklösung

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>Epinephrin-Lösung</b>	M	4,0		
<b>Hypotaurin.Lösung</b>	ml	10,0		
<b>H<sub>2</sub>O</b>	ml	26,0	Fresenius	Ampuwa

Tabelle 53: HHE-Gebrauchslösung

Substrat	Einheit	Menge
<b>HHE-Stocklösung</b>	µl	80,0
<b>Heparin-Lösung</b>	µl	40,0

Tabelle 54: Fertilisationsmedium

Substrat	Einheit	Menge
<b>Fert-TALP-Gebrauchslösung</b>	ml	2,0
<b>HHE-Gebrauchslösung</b>	µl	120,0

Tabelle 55: Spermfilter-Gebrauchslösung

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>Spermfilter</b>	µl	900,0	Cryos	SPF100-032
<b>TCM-Gebrauchslösung</b>	µl	100,0		

Tabelle 56: SOF-Stocklösung A

Substrat	Einheit	Menge	Konzentration (mM)	Hersteller	Produktnr.
<b>NaCl</b>	g/100 ml	6,3	108	Sigma-Aldrich	S5886-1KG
<b>KCl</b>	g/100 ml	0,5	7,2	Sigma-Aldrich	P5405-250G
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	g/100 ml	0,2	1,2	Sigma-Aldrich	P5655-100G
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	g/100 ml	0,2	1,5	Sigma-Aldrich	M2643-500G
<b>H<sub>2</sub>O</b>	ml	98,4		Fresenius	Ampuwa
<b>Natriumlactate*</b>	mg	0,6	4,2	Sigma-Aldrich	L4263-100ML

\*als letzte Reagenz hinzufügen

Tabelle 57: SOF-Stocklösung B

Substrat	Einheit	Menge	Konzentration (mM)	Hesteller	Produktnr.
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	mg/100ml	2,1	25,0	Sigma-Aldrich	S4019-500G
<b>Phenolred</b>	mg/100ml	0,01	1 mg/100 ml	Sigma-Aldrich	N4638-1G
<b>H<sub>2</sub>O</b>	ml	100,0		Fresenius	Ampuwa

Tabelle 58: SOF-Stocklösung C

Substrat	Einheit	Menge	Konzentration (mM)	Hersteller	Produktnr.
<b>Sodium-pyruvate</b>	mg	80,0	0,73	Sigma-Aldrich	P3662-25G
<b>H<sub>2</sub>O</b>	ml	10,0		Fresenius	Ampuwa

## 9. Anhänge

Tabelle 59: SOF-Stocklösung D

Substrat	Einheit	Menge	Konzentration (mM)	Hersteller	Produktnr.
<b>CaCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O</b>	mg	262,0	1,78	Sigma-Aldrich	C7902-500G
<b>H<sub>2</sub>O</b>	ml	10,0		Fresenius	Ampuwa

Tabelle 60: Glutamin-Stocklösung

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>Glutamine</b>	mg	292,0	Sigma-Aldrich	G6392-1VL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	ml	10,0	Fresenius	Ampuwa

Tabelle 61: SOFaa

Substrat	Einheit	Menge	Konzentration (mM)	Hesteller	Produktnr.
<b>Myo-Inositole</b>	mg	50,0	2,77	Sigma-Aldrich	I7508-50G
<b>Tri-Na-Citrate</b>	mg	10,0	0,34	Sigma-Aldrich	S4641-25G
<b>Gentamycinsulfate</b>	mg	5,0	50µg/ml	Sigma-Aldrich	G3632-5G
<b>H<sub>2</sub>O</b>	ml	78,0		Fresenius	Ampuwa
<b>Glutamin-Stocklösung</b>	µl	100,0	0,2		
<b>Stocklösung A</b>	ml	10,0			
<b>Stocklösung B</b>	ml	10,0			
<b>Stocklösung C</b>	ml	1,0			
<b>Stocklösung D</b>	ml	1,0			
<b>BME 50x</b>	ml	3,0	30µl/ml	Sigma-Aldrich	B6766
<b>MME 100x</b>	ml	1,0	10µl/ml	Sigma-Aldrich	M7145

Tabelle 62: SOFaa-Kultivierungsmedium

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>SOFFaa</b>	ml	10,0		
<b>BSA (FAF)</b>	mg	40	Sigma-Aldrich	A7030-100G

Tabelle 63: SOFaa-Kultivierungsmedium mit 16 mM Glukose

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>SOFFaa-Kultivierungsmedium</b>	ml	10,0		
<b>Glukose</b>	mg	28,8	Sigma-Aldrich	16301-1KG

Tabelle 64: DMEM/F12-Kultivierungsmedium

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>DMEM/F12</b>	ml	10,0	Sigma-Aldrich	51448C-1000ML
<b>BSA (FAF)</b>	mg	40	Sigma-Aldrich	A7030-100G

### 9.2.2 Medien für die chemische Aktivierung

Tabelle 65: Ionomycin-Stocklösung

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>Ionomycin</b>	µl	2,6	Sigma-Aldrich	I3909
<b>DMSO</b>	ml	1,0	Sigma-Aldrich	D587

## 9. Anhänge

Tabelle 66: Ionomycin-Gebrauchslösung

Substrat	Einheit	Menge
<b>Ionomycin-Stocklösung</b>	µl	3,7
<b>TCM-Gebrauchslösung</b>	µl	996,3

Tabelle 67: 6-DMAP-Stocklösung

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>6-DMAP</b>	µg	326,4	Sigma-Aldrich	MFCD00005573
<b>DMSO</b>	ml	1,0	Sigma-Aldrich	D587

Tabelle 68: 6-DMAP-Gebrauchslösung

Substrat	Einheit	Menge
<b>6-DMAP-Stocklösung</b>	µl	16,3
<b>SOF aa (16 mM Glukose)</b>	µl	983,7

### 9.2.3 Medien für die Färbung mit Mitotracker Green® FM und Hoechst 33342

Tabelle 69: PVA/PBS-Lösung

Substrat	Menge	Konzentration	Hersteller	Produktnr.
<b>Polyvinylalkohol</b>	10 mg	0,1%	Sigma-Aldrich	P8136-250G
<b>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</b>	100 ml		Sigma-Aldrich	D5773-50L

Tabelle 70: Hoechst 33342-Stocklösung

Substrat	Menge	Konzentration	Hersteller	Produktnr.
<b>Hoechst 33342</b>	2 mg	2 mg/ml	Sigma-Aldrich	B2261
<b>ad. H<sub>2</sub>O</b>	1 ml		Fresenius	Ampuwa

Tabelle 71: Hoechst 33342-Gebrauchslösung

Substrat	Einheit	Menge
<b>Hoechst-Stocklösung</b>	µl	2,0
<b>PVA/PBS-Lösung</b>	µl	198,0

Tabelle 72: MitoTracker® Green FM-Stocklösung

Substrat	Einheit	Menge	Hersteller	Produktnr.
<b>MitoTracker® Green</b>	µg	50	Invitrogen	M7514
<b>DMSO</b>	µl	74,4	Sigma-Aldrich	D587

Tabelle 73: Mito-Tracker® Green FM-Gebrauchslösung

Substrat	Einheit	Menge
<b>MitoTracker® Green-Gebrauchslösung</b>	µl	1
<b>TCM Gebrauchslösung</b>	ml	2,5

## 9.3 Geräte und Labormaterialien

## 9. Anhänge

Tabelle 74: Auflistung aller verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller	Sitz	Bestellnummer
<b>Fluoreszenzmikroskop</b>	Olympus	Hamburg	IX73
<b>TransferMan®4r (Mikromanipulatoren)</b>	Eppendorf	Hamburg	
<b>PiezoXpert™</b>	Eppendorf	Hamburg	
<b>CellTram Air/Oil</b>	Eppendorf	Hamburg	5176000017
<b>UV-Filter für Hoechst 33342</b>	Olympus	Hamburg	U-FUW
<b>Blau-Filter für Hoechst 33342</b>	Olympus	Hamburg	U-FBWA
<b>Grün-Filter für den MitoTracker® Green FM</b>	Olympus	Hamburg	U-FGW
<b>Vakuumpumpe</b>	KNF Laboport	Freiburg	Z288284
<b>Stereomikroskop</b>	Olympus	Hamburg	SZX7
<b>Heracell 150i CO<sub>2</sub>-Inkubator</b>	Thermo Fischer	Braunschweig	51026281
<b>Wärmeplatte</b>	Minitüb	Tiefenbach	HT200 W
<b>Wasserbad</b>	Memmert	Schwabach	ONE 10
<b>Vortexer</b>	Peqlab	Erlangen	90-V-1
<b>Mini-spin Plus Zentrifuge</b>	Eppendorf	Hamburg	5453000011

Tabelle 75: Auflistung aller verwendeten Labormaterialien

Labormaterial	Hersteller	Sitz	Bestellnummer
<b>Injektionspipetten</b>	BioMedical Instruments	Zöllnitz	
<b>Haltepipetten</b>	Gynemed	Lensahn	
<b>Pasteurpipetten (Glas)</b>	Carl Roth	Karlsruhe	4522.1
<b>Deckgläschen</b>	Carl Roth	Karlsruhe	NK75.1
<b>Eppendorfgefäße (1,5 ml)</b>	Eppendorf	Hamburg	30120086
<b>Kanüle 20 G</b>	B. Braun	Melsungen	4657500
<b>Micro-classic Pipettierhelfer</b>	Brand	Wertheim	25900
<b>Mikropipette The Stripper</b>	Gynemed	Lensahn	MXL3-STR
<b>Objektträger</b>	Carl Roth	Karlsruhe	NK72.1
<b>Petrischalen groß (60 mm)</b>	Greiner Bio one	Kremsmünster Österreich	628160
<b>Petrischalen klein (35 mm)</b>	Greiner Bio one	Kremsmünster Österreich	627160
<b>Thermobehälter</b>	KGW Isotherm	Karlsruhe	
<b>Zentrifugenröhrchen</b>	Greiner Bio one	Kremsmünster Österreich	188161
<b>Spritzen (5 ml)</b>	Greiner Bio one	Kremsmünster Österreich	309050
<b>ICSI Schalen</b>	Falcon	Hague Niederlande	500001582

## 10. Eidesstattliche Erklärung

Die beifolgende Dissertation mit dem Titel „Vergleich des Einflusses verschiedener Aktivierungsmethoden und Kultivierungsmedien auf die Vorkernausbildung nach intrazytoplasmatischen Spermieninjektion equiner Spermien in bovine Oozyten“ habe ich selbst angefertigt.

Zu dieser Arbeit hat mit Frau Prof. Dr. Christine Wrenzycki in Gießen angeregt.

Bei der Anfertigung wurden die folgenden Hilfen Dritter in Anspruch genommen:

Franziska Kotarski und Larissa Maurer (IVP und ICSI)

Julia Blad-Stahl (Messung der Glukose-Konzentration)

Die beifolgende Dissertation wurde bisher noch nicht für eine Prüfung oder zur Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere an Eidesstatt, dass ich vorstehende Angaben über die bei der Abfassung meiner Dissertation benutzten Hilfsmittel, über erhaltene Beihilfen sowie über frühere Begutachtungen meiner Dissertation, über frühere Meldung zur Promotion und über die Einreichung der Dissertation zu anderen Prüfungen oder als Preisarbeit nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröfnetlichen oder nicht veröfnetlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Manuela Schlipf, 04. Juli 2019

## 11. Danksagungen

Mein erster Dank geht an Prof. Dr. Christine Wrenzycki für die Bereitstellung des Themas, für ihre Bereitschaft zur Flexibilität im Rahmen der Abänderung der Versuchsinhalte und natürlich für die Korrekturen bei der Anfertigung der Arbeit.

Ein dickes Danke an das IVP-Team in Gießen, allen voran Franziska Kotarski, der guten Fee aller Doktoranden im Labor, welcher inzwischen ein Ehrendokortitel gebührt.

Ein riesengroßes Dankeschön an Lari und Alex, ohne euch beide hätte ich das nicht geschafft. Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei Anne und Katha, dafür dass ihr immer ein offenes Ohr, viel Geduld und Zimtschnecken zur rechten Zeit für mich hattet.

Auch Leo muss ich für so vieles danken. Deine unerschöpfliche Geduld und Ausgeglichenheit sind für mich durch nichts zu ersetzen. Danke, dass du immer für mich da warst.

Der letzte und größte Dank geht an meine Familie, insbesondere an meine Eltern. Danke, dass ihr mich schon mein ganzes Leben in allem was ich tue unterstützt. Diese Arbeit ist euch gewidmet und soll eine kleine Anerkennung für all das sein, was ihr für mich getan habt.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6805-9



9 783835 196805 9