

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Bedingungen für eine parthenogenetische Aktivierung von Kaninchenoozyten durch elektrische Stimulation zu ermitteln. Da die Aktivierung durch kurzzeitiges Anlegen eines elektrischen Feldes zusammen mit der Zellfusion verläuft, sollte eine Methode entwickelt werden, die im Rahmen des Kerntransfers einfach und schnell in den Fusionsvorgang integriert werden kann. Als Kontrolle der Aktivierung erfolgte nach der elektrischen Stimulation eine Kultivierung der aktivierten Oozyten bis zum Blastozystenstadium.

Zur Ermittlung der optimalen Aktivierungsrate wurden verschiedene Pulsstärken, Pulslängen, Pulsabstände und Pulszahlen in ihrer Wirksamkeit geprüft. Die Auswertung erfolgte nach den Kriterien aktiviert, nicht aktiviert und degeneriert. Es wurden nur Oozyten als aktiviert beurteilt, die einen oder mehrere Vorkerne ausgebildet hatten.

Zur Untersuchung des Entwicklungspotentials aktivierter Oozyten zu Blastozysten wurden die Oozyten dem in den ersten Versuchen ermittelten optimalen Aktivierungsvorgang unterzogen. Zum Vergleich des Entwicklungspotentials von aktivierten Oozyten mit haploiden bzw. diploiden Chromosomensatz wurde jeweils die Hälfte der Oozyten eines Aktivierungsvorganges in TCM 199 kultiviert und die andere Hälfte für fünf Stunden in TCM 199 + Cytochalasin B vorinkubiert und anschließend ebenfalls in TCM 199 kultiviert. Parallel dazu erfolgte die Kultur befruchteter Oozyten in TCM 199. Zur Beurteilung des Entwicklungspotentials wurde die Kernfiguration nach Fixation und Färbung der Oozyten, die morphologische Beurteilung der Embryonen sowie die Bestimmung der Zellkernzahlen herangezogen.

Die Oozyten wurden von superovulierten Häsinnen 16 h p.c. durch Spülung der exenterierten Eileiter gewonnen.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1. Nach Superovulationen wurden insgesamt 3286 Oozyten gewonnen, von denen 2908 als tauglich für die Versuche beurteilt wurden. Diese Oozyten sollten sich im Stadium der Metaphase der Meiose II befinden, d.h. den 1. Polkörper ausgeschleust haben und Kernchromosomen im Metaphasenzustand besitzen. Bei den Spendertieren traten Schwankungen in der Ovulationsrate zwischen 14 und 126 Oozyten pro Tier auf.

2. Bei einer Pulsstärke von 2,5 kV/cm und einer Pulsdauer von 30 μ sec wurde die höchste Aktivierungsrate von 30% erzielt. Der Anteil degenerierter Oozyten nahm mit steigender Pulsstärke von 0% bei 1,0 kV/cm bis 16,6% bei 3,0 kV/cm zu.

3. Wenn man außer der Pulsstärke und der Pulsdauer auch die Pulszahl und den Pulsabstand berücksichtigt, wurde bei zwei Pulsen mit einer Pulsstärke von 2,5 kV/cm im Abstand von 10 Minuten und einer Dauer von 30 μ sec die höchste Aktivierungsrate von 66% erzielt. Dabei bildeten 52,5% der aktivierten Oozyten zwei Pronuklei aus, 36% drei Pronuklei und 11,5% enthielten multiple Subnuklei.

4. Der Vergleich der Entwicklungskapazität aktivierter Oozyten zeigte, daß sich nach 24 Stunden Kultur prozentual mehr haploide Oozyten zu 2- bis 8-Zellern (36,4%) entwickelten als diploide Oozyten (23,8%) ($p < 0,05$). Ein Großteil der haploiden Mehrzeller blieb jedoch in diesem Stadium der Entwicklung stehen, sodaß die diploiden Embryonen eine ähnliche Blastulationsrate (7,6% , 5,5%) und Schlupfrate (5,5%, 3,6%) aufwiesen. Auch die Kompaktierungsraten waren in beiden Gruppen vergleichbar (14,1% , 14,2%).

5. Die befruchteten Oozyten entwickelten sich im Vergleich zu den aktivierten Oozyten schneller weiter. Die ersten Morulae traten bereits nach 24 Stunden Kultur auf (aktivierte Oozyten: 48 h) und innerhalb weiterer 24 Stunden entwickelten sich diese zu Blastozysten (aktivierte Oozyten: 72 h). Nach einer Kulturdauer von 120 Stunden waren alle Blastozysten geschlüpft (aktivierte Oozyten: 168 h). Die Kompaktierungs-, Blastulations- und Schlupfraten lagen jeweils bei 99,5%.

6. Die Bestimmung der Zellkernzahlen ergab für haploide Embryonen folgende Mittelwerte: Morula: 29 Zellkerne, Blastozyste: 68,6 Zellkerne, schlüpfende Blastozyste: 117,8 Zellkerne. Die Zellkernzahlen der diploiden Embryonen lagen bei 28,9 (Morula), 78,7 (Blastozyste) und 116,3 schlüpfende Blastozyste). Im Vergleich dazu wiesen die befruchteten Morulae mit durchschnittlich 39 Kernen und die schlüpfenden Blastozysten mit durchschnittlich 186,4 Kernen höhere Zellkernzahlen auf als die Embryonen aus aktivierten Oozyten. Die Zellkernzahlen der Blastozysten aus befruchteten Oozyten lagen mit 78,6 Kernen im Bereich der aktivierten Oozyten.

7. Innerhalb einer bestimmten Kulturdauer (48 h, 72 h, 96 h, 120 h) wiesen die verschiedenen Entwicklungsstadien diploider Embryonen, die aus aktivierten Oozyten hervorgegangen sind, im Vergleich zu den haploiden Embryonen mehr Zellkerne auf. Die Zellkernzahlen der verschiedenen Entwicklungsstadien der befruchteten Oozyten waren innerhalb einer bestimmten Kulturdauer wiederum höher als die der aktivierten Embryonen.

8. Insgesamt zeigen die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit, daß zur - Optimierung des Aktivierungsprozesses weitere Untersuchungen notwendig sind.

7 SUMMARY

Claudia Schlich

Experimental investigations to induce parthenogenetic development of rabbit oocytes by electric stimulation.

The present work aims at determining the conditions for parthenogenetic activation of rabbit oocytes by electric stimulation. As activation by applying an electrical field for a short period of time occurs simultaneously with cell fusion, a method was to be developed that can easily and quickly be integrated into the fusion process while the transfer of the nucleus takes place. To see whether activation had actually occurred after electric stimulation the activated oocytes were cultured *in vitro*.

To determine the optimum rate of activation, pulses of different intensity and duration, at different intervals and frequencies were applied and checked for their effectiveness to induce activation. Oocytes were evaluated according to the following criteria: "activated", "non activated", "degenerated". Only oocytes that had formed one or several pronuclei were judged as being activated.

To determine the developmental potential of activated oocytes into blastocysts the oocytes were subjected to the optimized process of activation established in the first series of experiments and were cultured for 92 h up to the blastocyst stage. To compare the development capacity of activated oocytes with a haploid set of chromosomes with those containing a diploid set, half of the oocytes of each activation process was cultivated in TCM 199 alone whereas the other half was incubated for five hours with TCM 199 supplemented with Cytochalasin B before cultivated in TCM 199 alone. Additionally, fertilized oocytes were grown in culture in TCM 199. To evaluate the developmental potential, the nuclear configuration after fixation and staining of the embryos were used. The morphology of the embryos as well as the number of cell nuclei served as parameters to classify development.

The oocytes were obtained from superovulated female rabbits 16 h p.c. by flushing the fallopian tubes upon slaughter of the animal.

The following results were obtained:

1. After superovulation a total of 3286 oocytes were obtained, of which 2908 were evaluated as suitable for the experiments. These oocytes were had to be in metaphase of meiosis II, e.g. had extruded the first polar body and the nuclear chromosomes were metaphase. The donor animals' ovulation rate varied from 14 to 126 ovulations per animal.

2. Single pulses with an intensity of 2.5 kV/cm and a duration of 30 μ sec per pulse resulted in the highest rate of activation (30%). The proportion of degenerated oocytes increased with increasing pulse intensity ranging from 0% at 1.0 kV/cm up to 16.6% at 3.0 kV/cm.

3. When frequency and interval of the pulses were considered, the highest activation rate (66%) was obtained with two pulses at an intensity of 2.5 kV/cm, at an interval of 10 minutes and 30 μ sec duration. Under these conditions 52.5% of the activated oocytes formed two, 36% three and 11.5% multiple pronuclei.

4. A comparison of the developmental potential of the activated oocytes showed that after 24 hours a higher proportion of haploid oocytes (36.4%) as compared to diploid oocytes (23.8%) ($p < 0.05$) had developed into 2-8 cell stage. A large number of haploid multicellular organisms, however, terminated development at the 2-8 cell stage. Diploid embryos showed similar rates of compaction (14.1% vs. 14.2%), blastulation (7.6% vs. 5.5%) and hatching (5.5% vs. 3.6%).

5. In comparison to activated oocytes fertilized oocytes developed more quickly. The first morulae occurred as soon as after 24 hours after the onset of cultivation (activated oocytes: 48 h). Within an additional 24 hours these oocytes went on to blastocysts (activated oocytes: 72 h). After 120 hours of culture all blastocysts were hatched (activated oocytes: 168 h). In total 99.5% of fertilized oocytes showed compaction, blastocyst formation and hatching.

6. Determination of the numbers of nuclei of haploid embryos yielded the following means: morula -29 nuclei, blastocyst - 68.6 nuclei, hatching blastocyst - 117.8 nuclei. The numbers of nuclei in diploid embryos were 28.9 (morula), 78.7 (blastocyst) and 116.3 (hatching blastocyst). In comparison the morulae derived from fertilized oocytes (39 nuclei on average) and hatching blastocysts (186.4 nuclei on average) possessed higher numbers of nuclei than the embryos from activated oocytes. The number of nuclei of blastocysts from fertilized oocytes, 78.6, was within the range of those from the activated oocytes.

7. Within a certain period of cultivation (48 h, 72 h, 96 h, 120 h) the various stages of development of diploid embryos derived from activated oocytes had more nuclei when compared to the respective stages of haploid embryos. The number of nuclei found at different developmental stages of fertilized oocytes, however, was greater than that of the activated embryos.

8. In summary, the results obtained from this study show that in to achieve an optimum in the process of activation further study is necessary.