

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Untersuchung hatte zum Ziel, die Eignung des Mariensee Computerized Time-Lapse-System (MCTLS) für die Beobachtung embryonaler Entwicklungsvorgänge zu prüfen. Das System besteht aus einem Invertmikroskop, dessen Kreuztisch pixelgenau computergesteuert wird. Die Bildaufzeichnung erfolgt über eine an dem Invertmikroskop installierte Videokamera, die die Bilder einem Time-lapse-Videorekorder zuleitet.

Das MCTLS konnte mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Optimas 5.0[®] durch die Programmierung spezieller Makros zur Systemsteuerung und Bildbearbeitung an die Erfordernisse angepaßt werden, die zur Beobachtung und Dokumentation embryonaler Entwicklungsvorgänge nötig sind.

1. Die Inkubationsbedingungen des MCTLS sind denjenigen eines herkömmlichen Brutschranks mindestens gleichwertig. Von in vivo erstellten 2- und 4-Zellstadien schlüpften nach Kultivierung in NCSU-23 12% der im MCTLS und 10% der im Brutschrank inkubierten Blastozysten aus der Zona pellucida. Nach Kultivierung in KRB schlüpften 52% der im MCTLS aber keiner der im Brutschrank inkubierten Embryonen.
2. Die Ergebnisse der In-vitro-Kultur in NCSU-23 und KRB in vivo und in vitro erzeugter Schweineembryonen bestätigten die aus der Fachliteratur bekannten Wachstumsnachteile nach der In-vitro-Erstellung von Schweineembryonen auch unter den Kulturbedingungen des MCTLS. Der Stadienbeginn trat bei in vitro erzeugten Embryonen - vor allem in den frühen Stadien - gegenüber den in vivo erstellten Embryonen verzögert ein; beispielsweise dauerte das Morulastadium in vitro erstellter Embryonen $19,3 \pm 14,5$ h, während es bei in vivo erstellten nur $6,9 \pm 6,7$ h waren. Auch wiesen in vitro erzeugte Schweineembryonen verringerte Durchmesser und kleinere Flächen auf.

während sowohl die Messungen der Zonadicke als auch die Bestimmung der Zellkernzahlen keine deutlichen Unterschiede zur In-vivo-Kultivierung erbrachten.

3. Unabhängig von der Art der Embryonengewinnung konnten mit Hilfe des MCTLS in den frühen Entwicklungsstadien Rotationen des Blastomerenverbandes innerhalb der Zona pellucida beobachtet werden. Weder aus der Richtung der Rotationen noch aus deren Beginn, Dauer und Anzahl konnten charakteristische Unterschiede in Bezug auf die Art der Embryonengewinnung oder das verwendete Medium abgeleitet werden. Sowohl bei in vivo als auch bei in vitro erzeugten Embryonen war im 8-Zellstadium eine höhere Anzahl an Rotationen ($6,0 \pm 5,8$ Rotationen) bei denjenigen Embryonen nachzuweisen, die später degenerierten, als bei solchen, die sich weiterentwickelten ($2,0 \pm 3,2$).
4. Zur Beobachtung von Kollabierungs- und Reexpansionsvorgängen wurde die Entwicklung von in vivo erstellten späten Embryonalstadien unter den Kulturbedingungen des MCTLS in drei verschiedenen Medien analysiert. Die ersten Kollabierungen, wie auch die darauf folgende Reexpansion, traten nach Kultivierung in mWM signifikant eher auf als bei den beiden übrigen Medien (mWM: $175,6 \pm 11,7$, KRB: $213,9 \pm 53,8$, NCSU-23: $227,1 \pm 68,8$ h nach hCG-Applikation). Die Dicke der Zona pellucida unterschied sich nicht bei den verwendeten Medien. Auch bestand kein Zusammenhang zwischen dem Grad der Kollabierung und der Reexpansion aus unterschiedlichen Kollabierungsgraden und der ursprünglichen Fläche des Blastomerenverbandes und Fläche und Durchmesser des Embryo.

Auch wenn sich noch keine eindeutigen Merkmale zur Einschätzung des Entwicklungspotentials von Schweineembryonen definieren ließen, zeigte die

Auswertung des vorliegenden Datenmaterials, daß eine weitergehende Analyse der embryonalen Entwicklung mit dem MCTLS im Hinblick auf eine Prognose der Entwicklungsfähigkeit erforderlich und sinnvoll ist. Als Parameter bieten sich hierfür die Untersuchung der Zykluslängen, der Rotationsvorgänge während der ersten Zellteilungen bis zum Morulastadium sowie der Kollabierungen und Reexpansionen im Blastozystenstadium an.

Das MCTLS ermöglicht die parallele In-vitro-Kultivierung einer großen Anzahl von Embryonen sowie eine permanente Beobachtung und Dokumentation ihrer Entwicklung ohne eine negative Beeinflussung durch das System. Es zeigten sich Schwierigkeiten, die entstandene Datenfülle auszuwerten. Hier sind in Zukunft weitere Verbesserungen erforderlich, wie beispielsweise eine weitergehende Automatisierung von bestimmten Untersuchungsschritten.

7 Summary

Kerstin Freitag

Permanent monitoring of the development of *in vivo* and *in vitro* developed pig embryos by the „Mariensee Computerized Time-Lapse-System“ (MCTLS)

In the present study the feasibility of the Mariensee Computerized Time-Lapse-System (MCTLS) consisting of a computer guided invert microscope for the monitoring of embryonal development was examined. The images were recorded on a time-lapse-VCR and processed with the macro-programmable Optimas 5.2* system.

1. The incubation conditions of the MCTLS are at least equivalent to those of conventional incubators. After cultivation of *in vitro* developed 2- and 4-cell stages in NCSU-23 and incubation in the MCTLS the hatching rate was 12% compared to 10% after conventional incubation. After cultivation in KRB the hatching rates were 52% (MCTLS) and 0% (conventional incubation), respectively.
2. The *in vitro* culture of *in vivo* and *in vitro* produced pig embryos in NCSU-23 and KRB confirmed the published results of development retardation after *in vitro* production for the MCTLS. The onset of the early stages in particular occurred delayed after *in vitro* production; for instance the morula stage lasted 19.3 ± 14.5 hrs as compared to 6.9 ± 6.7 hrs after *in vitro* production. Furthermore *in vitro* produced pig embryos were smaller in diameter and

area whereas comparisons of Zona pellucida thickness and number of nuclei revealed no difference between *in vivo* and *in vitro* production.

3. Regardless of the production method the MCTLS allowed the observation of rotational movements of the blastomeres inside the Zona pellucida during early development stages. However, neither of the rotation criteria (direction, onset, duration, number) was correlated with the kind of embryo collection or the used medium. Both *in vivo* and *in vitro* produced 8-cell stages showed a significantly higher rotation number if they later degenerated (6.0 ± 5.8 rotations) as compared to further growing ones (2.0 ± 3.2 rotations).
4. For the MCTLS monitoring of collapse and reexpansion the development of *in vivo* produced embryos was studied in three different media. The first collapses as well as the consecutive reexpansions occurred significantly earlier after cultivation in mWM than with other media (mWM: 175.6 ± 11.7 , KRB: 213.9 ± 53.8 , NCSU-23: 227.1 ± 68.8 h after hCG application). Zona pellucida thickness, degree of collapse and reexpansion and embryo size parameters did not correlate with each other or the incubation media, respectively.

Despite the lack of tangible results concerning the viability of pig embryos MCTLS monitoring of embryonal development is necessary and should provide valuable results in the future. Promising parameters are the cycle lengths, the rotations during the premorula stages and dimensional changes (collapse and reexpansion) in the blastocyst stage.

The MCTLS facilitates the *in vitro* cultivation of many embryos at the same time as well as the permanent monitoring of their development without disturbing interference. Presently the main problem is a meaningful evaluation of the vast resulting data; improvement might be achieved by means of procedure automatization.