

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Entwicklungsstadien und Teilungsraten unterschiedlich gereifter und durch ICSI befruchteter porziner Oozyten zu vergleichen. Weiterhin sollten Versuche mit gesexten Spermien zeigen, daß es möglich ist, Embryonen bestimmten Geschlechts mit Hilfe der ICSI-Technik zu erstellen.

Es wurden in den einzelnen Versuchsabschnitten *in vivo* gereifte und unterschiedlich *in vitro* gereifte Oozyten (TCM199 und NCSU37) eingesetzt. An jedem Versuchstag wurden parallel zu den spermieninjizierten Gruppen auch Kontrollgruppen zur Überprüfung parthenogenetischer Vorkernbildung, bzw. Zellteilung mit durchgeführt. Bei der kontrollinjizierten Gruppe wurde die Pipette ohne Spermium in die Oocyte eingeführt, und eine weitere Gruppe von Kontrolloozyten wurde nicht injiziert.

Zur Ermittlung der Aktivierungs- und Befruchtungsrate nach ICSI wurden im ersten Versuchsabschnitt die mit ICSI befruchteten Oozyten nach 20-stündiger *In-vitro*-Kultivierung in NCSU23 fixiert und gefärbt. Als aktiviert wurden Oozyten mit mindestens einem Vorkern bewertet. Als befruchtet wurden Zygoten mit 2 Vorkernen oder Embryonen im Zwei-Zellstadium bewertet.

Im zweiten Versuchsabschnitt wurde morphologisch die Teilungsrate nach 48-stündiger *In-vitro*-Kultur der mit ICSI befruchteten *in vivo* und *in vitro* (TCM199 und NCSU37) gereiften Oozyten und der Anteil parthenogenetisch geteilter Stadien in Kontrollgruppen ohne Spermieninjektion ermittelt. Geteilte Stadien mit Zytoplasmaabschnürungen oder fragmentierte Oozyten konnten dabei nicht von Teilungsstadien unterschieden werden.

Im dritten Versuchsabschnitt wurde durch eine 5-tägige *In-vitro*-Kultur die Entwicklungskompetenz der mit ICSI befruchteten *in vivo* und *in vitro* (NCSU37 und TCM199) gereiften Oozyten geprüft. Dazu wurden die geteilten Stadien fluoreszenzmikroskopisch beurteilt und die mittlere Kernzahl ermittelt. Unterschiede zwischen geteilten mit und ohne Zytoplasmaabschnürungen wurden dabei sichtbar.

Zur Überprüfung der Vitalität der mit ICSI befruchteten *in vivo* gereiften Oozyten wurden im vierten Versuchsabschnitt nach 48-stündiger *In-vitro*-Kultur geteilte Stadien der spermieninjizierten Gruppe auf synchronisierte Empfängertiere übertragen. Eine Überprüfung

der Trächtigkeiten erfolgte am 35. Tag nach dem Transfer durch transabdominale Untersuchung mit Hilfe eines Ultraschallgerätes.

Im fünften Versuchsabschnitt wurden vergleichende Untersuchungen mit gesezten Spermien durchgeführt.

Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

1. Die spermieninjizierten Oozyten zeigten eine signifikant höhere Aktivierungsrate im Vergleich zu kontrollinjizierten und nicht injizierten Oozyten für in vivo und in vitro (NCSU37) gereifte Oozyten (in vivo: 46,4 % vs. 8,4 % und 7,1 %, $p \leq 0,05$; in vitro NCSU37: 46,9 % vs. 8,0 % und 1,2 %, $p \leq 0,001$). Somit konnte gezeigt werden, daß für diese Reifungsgruppen eine Spermien-induzierte Aktivierung nach ICSI zur Induktion der Embryonalentwicklung vorliegt.
2. Im ersten Versuchsabschnitt konnten keine signifikanten Unterschiede für die Aktivierbarkeit der unterschiedlich gereiften Oozyten nach ICSI mit Nebenhodenschwanzsperma festgestellt werden (46,6 %, 46,9 %, 35,8 %).
3. Die ermittelte Befruchtungsrate von in vivo zu in vitro (NCSU37 und TCM199) gereiften Oozyten zeigte keinen signifikanten Unterschied (33,6 % vs. 40,2 % und 12,0 %). Die in NCSU37 gereiften Oozyten zeigten im Vergleich zu TCM199 gereiften Oozyten nach ICSI eine signifikant höhere Befruchtungsrate (40,2 % vs. 12,0 %; $p \leq 0,05$).
4. Die Befruchtungsrate war für alle drei Reifungsgruppen nach Spermieninjektion signifikant höher als die Parthenogeneserate in den Kontrollgruppen (in vivo und in vitro TCM199 $p \leq 0,05$; NCSU37 $p \leq 0,001$). Aus der Differenz Befruchtungsrate der spermieninjizierten Gruppen und Parthenogeneserate der Kontrollgruppen ergibt sich die effektive Befruchtungsrate (in vivo: 26,3 %, in vitro NCSU37: 33,8 %, in vitro TCM199: 10 %).
5. Nach 48-stündiger In-vitro-Kultur konnte eine signifikant niedrigere morphologisch beurteilte Teilungsrate bei den in TCM199 gereiften Oozyten festgestellt werden als bei in vivo gereiften und in NCSU37 gereiften Oozyten (20,8 % vs. 43,1 % und 38,9 %; $p \leq 0,05$).

6. Beim Vergleich der embryonalen Entwicklung unterschiedlich gereifter Oozyten nach 5-tägiger In-vitro-Kultur nach ICSI zeigten die in vivo gereiften eine signifikant höhere Teilungsrate als die in vitro gereiften Oozyten (52,3 % vs. 29,9 % und 28,8 %; $p \leq 0,05$). Wobei die in TCM199 gereiften Oozyten einen deutlich höheren Anteil an Zytoplasmaabschnürungen als die in NCSU37 gereiften Oozyten zeigten (18,6 % vs. 2,7 %; $p \leq 0,05$).
7. Die mittleren Kernzahlen Spermieninjizierter Oozyten nach ICSI und 5-tägiger In-vitro-Kultur unterschieden sich nicht signifikant voneinander (2,4 bis 3,9 Kerne). Es konnte gezeigt werden, daß sich die unterschiedlich gereiften Oozyten nach ICSI in der überwiegenden Anzahl nicht über das Zwei- bis Vier-Zellstadium hinaus entwickeln. Ob dieser Entwicklungsblock dem Einfluß der Injektion an sich oder den In-vitro-Kulturbedingungen zuzuschreiben ist, bleibt ungeklärt. Parallel verlaufende Versuche mit IVF zu ICSI würden hierüber Aufschluß geben.
8. Der Transfer von Embryonen nach 48-stündiger In-vitro-Kultur diente der Überprüfung der Entwicklungspotenz der durch ICSI erzeugten Stadien. Nach sechs durchgeführten Embryotransfers mit je 16-23 Embryonen pro Empfängertier konnte keine Trächtigkeit erreicht werden.
9. Erste Untersuchungen zur ICSI mit gesexten Spermien zeigten, daß Embryonen eines bestimmten Geschlechts aus in vivo und in vitro (NCSU37) gereiften Oozyten erstellt werden können. Durch Modifikation der Methode mit der Benutzung von Pipetten mit weiteren Durchmesser sind bessere Befruchtungserfolge zu erwarten.

7. Summary

Susanne Klocke

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vivo and in vitro matured porcine oocytes with epididymidal spermatozoa and boar spermatozoa flowcytometrically sorted for gender

The purpose of this study was to examine the development of in vivo and in vitro matured oocytes after ICSI in the first cell cycle and the further development to later embryo stages. Additionally it should be tested whether sex selected sperm could be used to produce embryos with the ICSI technique.

The experiment was performed with in vivo and in vitro matured oocytes using TCM199 and in NCSU37 as maturation medium. Parthenogenetic development was controlled by sham injection in oocytes and control of pronucleus development and cleavage. Additionally handling control groups were tested on each experimental day. Sham injected oocytes were treated in the same way as the sperm injected group with the exception of sperm introduction. Handling controls were not injected at all.

In the first part of the experiment oocytes fertilized by ICSI and the control groups were fixed and stained 20 hours after in vitro fertilization in NCSU23 to determine the rate of activation and fertilization. Oocytes were considered to be activated, if at least one pronucleus was present. Oocytes were determined as fertilized, if the zygotes had 2 pronuclei or embryos were in 2-cell stage.

In the second part of the experiment cleavage rates after ICSI and the percentage of parthenogenetically cleaved ova of the control groups were microscopically investigated after 48 hours of in vitro culture. Fragmentation was not distinguished from regular cleavage at this stage.

But in the third part of the experiment the development potential of ICSI fertilized in vivo and in vitro (TCM199 and NCSU37) matured oocytes as well as the control ova were examined morphologically and cytogenetically after five days of in vitro culture in NCSU23. Embryos were stained with a fluorescence dye (Hoechst 33342) and nuclei were counted. The difference between normally cleaved embryos and cleaved stages with fragmented cytoplasm was determined.

To validate the viability of ICSI-embryos in vivo matured sperm injected oocytes were cultured in NCSU23 for 48 hour period. Embryos were transferred to synchronized recipients.

The following results were obtained:

1. Using cryopreserved thawed epididymal spermatozoa for fertilization of in vivo and in NCSU37 in vitro matured oocytes, activation rates for sperm injected oocytes were significantly higher than for sham injected oocytes and non injected oocytes (in vivo: 46.4 % vs. 8.4 % and 7.1 %, $p \leq 0.05$; in vitro NCSU37: 46.9 % vs. 8.0 % and 1.2 %, $p \leq 0.001$). This confirms a sperm induced activation of oocytes.
2. There was no statistical difference in the activation competence in any of the three differently matured oocyte groups after ICSI with cryopreserved epididymal spermatozoa (46.6 %, 46.9 %, 35.8 %).
3. There was no difference between the fertilisation rate of in vivo and in vitro in NCSU37 and TCM199 matured oocytes after ICSI (33.6 % vs. 40.2 % and 12.0 %). Oocytes matured in NCSU37 showed a distinctly higher fertilisation rate as compared to oocytes matured in TCM199 (40.2 % vs. 12.0 %; $p \leq 0.05$).
4. The fertilization rate of in vivo and in vitro matured oocytes was significant higher in the sperm injected group as compared to the control groups (in vivo and in vitro TCM199 $p \leq 0.05$; NCSU37 $p \leq 0.001$). The difference between fertilization rates of the sperm injected oocytes and the parthenogenogenetic pronucleus development in the sham injected group signifies the effective fertilization rate (in vivo: 26.3 %, in vitro NCSU37: 33.8 %, in vitro TCM199: 10 %).
5. After 48 hours in vitro culture oocytes matured in TCM199 after ICSI showed significantly lower cleavage rates as compared to in vivo matured and in NCSU37 matured oocytes based on morphological observation (20.8 % vs. 43.1 % and 38.9 %; $p \leq 0.05$).
6. In vivo matured oocytes showed a significantly higher cleavage rate after 5 days of in vitro culture in comparison to oocytes matured in NCSU37 or TCM199 (52.3 % vs. 29.9 % and 28.8 %; $p \leq 0.05$). Oocytes matured in TCM199 showed after ICSI a

significantly higher rate of cytoplasmic fragmentation in cleaved embryos as compared to those matured in NCSU37 (18.6 % vs. 2.7 %; $p \leq 0.05$).

7. Five days after ICSI in vivo and in vitro matured oocytes showed no difference in the mean number of nuclei (2.4 to 3.9 nuclei). However, most of the ICSI-embryos did not develop further than to the 2- or 4-cell stage. It is not known so far, whether the insufficient development is caused by the injection process itself. Further experiments with IVF and ICSI may provide information about this effect.
8. The development capacity of in vivo matured oocytes 48 hours after ICSI was tested by subsequent transfer of embryos. In 6 transfers 16 to 23 embryos were transferred into synchronized recipients. All attempts failed so far.
9. First trials using ICSI with sorted/frozen/thawed spermatozoa were successful and embryos were obtained. However, due to the head enlargement after sorting and freezing and an increased stickiness of the sperm heads it was difficult to introduce the sperm cells into the injection pipettes.