

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Kommissarische Leitung: Prof. Dr. U. Matis  
Unter Leitung von Prof. Dr. J. Braun

**Untersuchungen zur In vitro Maturation und  
Fertilisation im Hinblick auf die Vitrifikation von  
maturierten Katzenoozyten**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Gertrud Barbara Schmid  
aus Deggendorf

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilian-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A Stolle

Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. S. Reese

Tag der Promotion : 15. Juli 2005

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>6</b>
2.1	IVP von Katzenembryonen.....	6
2.1.1	IVM .....	7
2.1.1.1	Gewinnung von Eizellen .....	7
2.1.1.1.1	Jahreszeit .....	7
2.1.1.1.2	Zyklusstand .....	8
2.1.1.2	Morphologie und Klassifizierung der Eizellen .....	8
2.1.1.3	Reifungsbedingungen.....	9
2.1.1.3.1	Medium .....	9
2.1.1.3.2	Hormone.....	10
2.1.1.3.3	Weitere Medienzusätze .....	11
2.1.1.3.4	Anzahl der Eizellen pro Gruppe.....	11
2.1.1.3.5	Brutschrankbedingungen.....	12
2.1.1.3.6	Reifungszeit.....	12
2.1.2	IVF.....	13
2.1.2.1	Gewinnung der Spermien.....	15
2.1.2.2	Einfrier- und Auftautechnik .....	16
2.1.2.3	Swim up und Konzentrationsbestimmung .....	17
2.1.2.4	IVF-Medium.....	18
2.1.2.5	Parthenogenese und Polyspermie.....	19
2.1.3	IVC .....	20
2.1.3.1	Medium .....	21
2.1.3.2	Medienzusätze.....	22
2.1.3.3	Brutschrankbedingungen.....	23
2.1.3.4	Beurteilung der Teilungs- und Blastozystenrate .....	24
2.2	Kryokonservierung von Katzeizellen .....	25
2.2.1	Einflussfaktoren auf die Kryokonservierung.....	27
2.2.1.1	Zusammensetzung des Einfriermediums .....	27
2.2.1.2	Inkubationstemperatur.....	30
2.2.1.3	Abkühl- und Auftaurate .....	31
2.2.1.4	Lipidgehalt der Eizellen .....	32
2.2.1.5	Maturationsstadium.....	33
2.2.1.6	Denudation .....	35
2.2.2	Einfriertechniken .....	36
2.2.2.1	Slow Freezing.....	36

2.2.2.2	Vitrifikation.....	37
2.2.2.2.1	French Straw .....	38
2.2.2.2.2	OPS und GL-Tip .....	39
2.2.2.2.3	Cryoloop.....	40
2.2.2.2.4	Electron Microscope Grid .....	41
2.2.2.2.5	Cryotop.....	41
2.2.2.2.6	Vitrifikation in Tröpfchen .....	42
2.2.2.2.7	Solid Surface Vitrification .....	42
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>44</b>
3.1	Standardprotokoll zur IVP von Katzenembryonen.....	44
3.1.1	Tiermaterial .....	44
3.1.2	Gewinnung und Reifung der Eizellen .....	44
3.1.3	Spermiengewinnung und Kryokonservierung der Spermien.....	46
3.1.4	Swim up und Konzentrationsbestimmung des Samens.....	46
3.1.5	IVF.....	47
3.1.6	IVC und Beurteilung der Embryonalentwicklung.....	47
3.2	Experimente .....	48
3.2.1	Einfluss verschiedener Hormonzusätze auf die Reifung und weitere Embryonalentwicklung.....	48
3.2.2	Einfluss verschiedener Proteinzusätze auf die Reifung von Oozyten .....	49
3.2.3	Einfluss von Cumuluszellen auf die In vitro Fertilisation.....	50
3.2.4	In vitro Maturation mit denudierten Oozyten in einer Cumulus-Cokultur.....	51
3.2.5	Vitrifikation und Toxizitätstest.....	51
3.2.6	Statistikmethoden .....	53
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
4.1	Einfluss verschiedener Hormonzusätze auf die Reifung von Oozyten .....	54
4.2	Einfluss verschiedener Proteinzusätze auf die Reifung von Oozyten.....	55
4.3	Einfluss von Cumuluszellen auf die In vitro Fertilisation.....	57
4.4	In vitro Maturation mit denudierten Oozyten in einer Cumulus-Cokultur ....	57
4.5	Vitrifikation und Toxizitätstest.....	59
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>72</b>
8.1	Verwendete Medien für IVP .....	72
8.2	Medienzusätze .....	75

8.3	Vitrifikationsmedien .....	77
8.4	Fixations- und Färbelösung.....	78
8.5	Literaturverzeichnis .....	80
8.6	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen .....	92
8.7	Danksagung .....	94

# 1 Einleitung

Die Hauskatze (*Felis silvestris f. catus*) gehört zur Ordnung der Carnivora; aus der 37 Arten umfassenden Familie der Felidae ist sie die einzige Spezies, die nicht vom Aussterben bedroht oder gefährdet ist (WILDT 1991). Um die derzeit vorhandene genetische Bandbreite von Wildkatzenarten erhalten zu können, werden auch Techniken der assistierten Reproduktion eingesetzt, die am Modell der Hauskatze entwickelt wurden.

Derzeit ist es bei der Hauskatze möglich, aus immaturen Oozyten *in vitro* Embryonen mit einer Erfolgsrate von 20-30% zu produzieren; nach deren Transfer wurden auch lebende Welpen geboren. Auch *in vitro* produzierte und mit konventionellen Kryoverfahren eingefrorene Embryonen führten nach Transfer zur Geburt lebender Welpen. Über die Kryokonservierung von Eizellen existieren bisher nur zwei Berichte. In der vorliegenden Arbeit werden durchgeführte Versuche zur Optimierung der *In vitro* Maturation und zur Vitrifikation von Eizellen bei der Katze beschrieben und diskutiert.

## 2 Literatur

### 2.1 IVP von Katzenembryonen

Bei der In vitro Produktion werden drei Schritte durchlaufen, nämlich die Reifung (In vitro Maturation – IVM), die Befruchtung (In vitro Fertilization – IVF) und die Kultivierung der Zygote bis zum Stadium der transferfähigen Blastozyste (In vitro Culture – IVC).

Aus den Ovarien kastrierter Kätzinnen werden aus Tertiärfollikeln noch unreife Eizellen gewonnen und in vitro gereift. Hierbei muss die Eizelle in der Reifungskultur die gleichen Veränderungen durchlaufen, die sie ansonsten bis zu ihrer Ovulation im Ovar der Katze durchgemacht hätte. Im Einzelnen bezieht sich das auf die Reifung des Zellkerns, der die Meiose wieder aufnehmen muss, und auf das Zytoplasma, das die für die nachfolgende Befruchtung und die erste Zeit der Embryonalentwicklung nötigen Stoffe produzieren muss. Während die *Kernreifung* ohne größere Probleme von statten geht und bei Eizellen aus Graaf'schen Follikeln bei einigen Spezies wie z.B. Maus, Schaf oder Rind sogar spontan wieder aufgenommen wird (EDWARDS 1965), ist die *zytoplasmatische Reifung* nur z. T. an die Kernreifung gebunden und benötigt daher optimale Kulturbedingungen. Ohne eine abgeschlossene zytoplasmatische Reifung ist eine Embryonalentwicklung nicht möglich (EPPIG 1996; SPINDLER und WILDT 1999). Die erfolgreiche Zytoplasmareifung kann über die verstärkte Glykolyse und Oxidation von Glukose, Glutamin, Palmitat und Laktat (SPINDLER et al. 2000), oder über den nach der Maturation erniedrigten ATP-Gehalt nachgewiesen werden (SPINDLER et al. 2000; FREISTEDT et al. 2001b). Da diese Verfahren jedoch sehr aufwendig sind, ist es immer noch allgemein üblich, eine Oozyte, die sich im Stadium der Metaphase II befindet, als gereift anzusehen. Eine Beurteilung der Zytoplasmareifung ist auch über das weitere Entwicklungsvermögen der Eizelle möglich, wobei hier das Ergebnis durch weitere Faktoren bei der Befruchtung und Kultivierung der Zygoten beeinflusst werden kann.

Die sehr komplexen Vorgänge der präovulatorischen Entwicklung versucht man in der Kultur soweit wie möglich zu unterstützen, z.B. durch die Wahl der richtigen Art und Menge an Nährstoffen und Hormonen, die optimale Reifungszeit sowie die richtige Gaszusammensetzung im Brutschrank.

## 2.1.1 IVM

### 2.1.1.1 Gewinnung von Eizellen

#### 2.1.1.1.1 Jahreszeit

Eine Katze wird, sobald sie geschlechtsreif ist, etwa alle 2-3 Wochen rollig. Die Fortpflanzungsperiode dauert, abhängig von der Tageslichtlänge, von Frühjahr bis Herbst, wobei die Hauptsaison Ende Mai abgeschlossen ist (WILDT et al. 1978; WILDT et al. 1981). Eizellen, die außerhalb der Fortpflanzungsperiode gewonnen werden, zeigen in vitro nur unbefriedigende Reifungsraten von ungefähr 20%. Die Ursache liegt vermutlich darin, dass der für die Reifung wichtige FSH-Spiegel erniedrigt ist, da er photoperiodisch durch die Epiphyse über Melatonin und GnRH gesteuert wird (SPINDLER und WILDT 1999). Die Konzentration der FSH-Rezeptoren an den Cumuluszellen nimmt in der „Nebensaison“ höchstwahrscheinlich ebenfalls ab (ERICKSON und DANFORTH 1995; SPINDLER und WILDT 1999). Folglich produziert der Cumulus oophorus nicht mehr die Östrogenmengen, die für eine erfolgreiche nukleare und zytoplasmatische Reifung nötig wären. Eine weitere mögliche Ursache für eine verminderte Reifungskompetenz könnte in der herabgesetzten Produktion von Antioxidantien liegen, mit der Folge, dass die Oozyten in der anöstrischen Phase unter erhöhtem oxidativem Stress leiden (COMIZZOLI et al. 2003). So konnten durch Zugabe von Ascorbinsäure oder Cystein sowie einer verzehnfachten FSH-Konzentration zum IVM-Medium auch nach Ende der Fortpflanzungsperiode noch befriedigende Befruchtungs- und Entwicklungsraten erzielt werden (COMIZZOLI et al. 2003).

Die Anzahl qualitativ guter Cumulus Oozyten Komplexe (COCs) pro Katze ist außerhalb der Zuchtperiode sehr niedrig; sie beträgt nur durchschnittlich drei COCs (COMIZZOLI et al. 2003) im Vergleich zu sonst üblichen 18-20 COCs pro Katze (SPINDLER und WILDT 1999; FREISTEDT et al. 2001a). Dies widerspricht einer anderen Studie (FREISTEDT et al. 2001a), in welcher unabhängig von der Jahreszeit immer die gleiche Anzahl qualitativ guter Eizellen gewonnen werden konnte; in der anöstrischen Phase jedoch war eine schlechtere Teilungs- und Blastozystenrate zu beobachten. Jahreszeitlich unterschiedliche Reifungsraten (10-64%) wurden auch von anderen Forschern berichtet (SPINDLER und WILDT 1999); dies wurde mit einer im Anöstrus herabgesetzten zytoplasmatischen Reifung erklärt. In dieser Arbeitsgruppe schwankte die Anzahl der gewonnenen Eizellen abhängig von der Jahreszeit zwischen 18 und 30 COCs.



### **2.1.1.1.2 Zyklusstand**

Der ovarielle Zyklus der Katze kann auf Grund des Funktionszustandes der Ovarien in folliculär (d.h. auf einem Ovar ist mindestens ein Follikel >2mm sichtbar), luteal (d.h. mindestens ein Corpus luteum ist sichtbar), intermediär (die Follikel sind 1-2mm groß) und inaktiv (keine Funktionsgebilde erkennbar) eingeteilt werden (FREISTEDT et al. 2001a). Es gibt unterschiedliche Meinungen darüber, ob der Zyklusstand die In vitro Reifung bei Katzen beeinflusst. In einer Studie konnte man keinerlei Unterschiede in der Reifungsrate nach 24 Stunden Inkubation im IVM-Medium feststellen (KARJA et al. 2002a), jedoch war bei den frisch gewonnenen Eizellen aus folliculären Ovarien die Rate an bereits gereiften Eizellen höher (9,1% im Vergleich zu sonst 3,7%). Andere Autoren berichteten von schlechteren Ergebnissen bei Ovarien mit lutealen Strukturen (JOHNSTON et al. 1989; WILDT 1991) bzw. bei inaktiven Ovarien (FREISTEDT et al. 2001a) und bei solchen von trächtigen Katzen (WILDT 1991). Auch die Anzahl der qualitativ hochwertigen Eizellen soll unabhängig vom Zyklusstand der Katze sein (SPINDLER und WILDT 1999). Es gibt jedoch auch die Hypothese, dass bei Oozyten aus folliculären Ovarien die Anzahl der atretischen, jedoch morphologisch normal aussehenden COCs verhältnismäßig größer ist als bei Oozyten aus anderen ovariellen Zyklusständen. Dies wird dadurch erklärt, dass im physiologischen Östrus nur eine geringe Anzahl an Follikeln heranwachsen kann, während alle übrigen unterdrückt werden (KARJA et al. 2002a). In einer Studie zeigten unabhängig vom Zyklusstand 64,3% der frisch gewonnenen COCs Anzeichen einer Degeneration (WOOD et al. 1997).

### **2.1.1.2 Morphologie und Klassifizierung der Eizellen**

Die Morphologie der Oozyten hat einen großen Einfluss auf die Maturationsrate (KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al. 2003). Kultiviert man ausschließlich morphologisch gute Eizellen in einer Gruppe, wirkt sich das positiv auf die Befruchtungs- und Blastozystenrate aus (SPINDLER et al. 2000). Eizellen benötigen für die Reifung intakte Zellverbindungen zu den umgebenden Cumuluszellen (MOTLIK et al. 1986), welche sowohl für die Bildung von Progesteron und Östrogen, als auch für die metabolische Unterstützung der Oozyte während der Maturation zuständig sind (MASSIP 2003). Progesteron und Östrogen sind wahrscheinlich die Hauptregulatoren der zytoplasmatischen Reifung (LAUFER et al. 1984). Daher achtet man bei der Klassifizierung von Eizellen nicht nur auf das Zytoplasma, sondern auch darauf,

inwieweit die Oozyte von Cumulus oophorus umgeben ist. Auch die Größe der Eizellen spielt eine wichtige Rolle. So sind kleine Eizellen empfindlicher gegen längerfristige Aufbewahrung im Kühlschrank als größere (OTOI et al. 2001). Allgemein haben kleinere Eizellen eine geringe Chance, die meiotische Arretierung zu überwinden und die Maturation zu vollenden (CROZET 1989; NIEMANN und MEINECKE 1993). Die durchschnittliche Größe einer gereiften Katzeneizelle ohne Zona pellucida beträgt 127µm (GOODROWE et al. 1988).

Morphologisch werden Katzeneizellen in vier Klassen eingeteilt: Oozyten der Klassen I und II haben ein gleichmäßig granuliertes, dunkles Zytoplasma, und über (Klasse I) oder unter (Klasse II) fünf Cumuluszelllagen. Klasse III und IV Eizellen zeigen bereits deutliche Alterungserscheinungen wie Aufhellung des Zytoplasmas durch die Zusammenballung von Lipidtröpfchen, mosaikartige Fragmentierung und einen partiellen bis vollständigen Cumuluszellverlust. Eizellen der Klassen III und IV können sich nicht zu Embryonen entwickeln, Klasse I und II Oozyten erreichen eine Blastozystenrate von 25 bzw. 5% (WOOD und WILDT 1997). Durchschnittlich kann man mit annähernd 13% Klasse I und 31% Klasse II Oozyten rechnen (WOOD et al. 1997).

### **2.1.1.3 Reifungsbedingungen**

#### **2.1.1.3.1 Medium**

Es gibt nur einige wenige Arbeiten darüber, welches Kulturmedium für die In vitro Reifung von Katzenoozyten am besten geeignet ist. Die meisten Arbeitsgruppen verwendeten bisher Hepes-gepuffertes Tissue Culture Medium (TCM 199) (FREISTEDT et al. 2001a; KARJA et al. 2002a; MURAKAMI et al. 2002; GOMEZ et al. 2003; KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al. 2003); andere benutzten Hepes-gepuffertes Minimal Essential Medium (HMEM) (SPINDLER et al. 2000; COMIZZOLI et al. 2003; HERRICK und SWANSON 2003), Dulbecco's Modified Eagle Medium (KITIYANANT et al. 2003) oder Krebs' Ringer Bicarbonate (KRB) (LUVONI und PELLIZZARI 2000). Zwei Studien verglichen den Einfluss von Synthetic Oviductal Fluid (SOF) mit TCM 199 auf die Maturationsrate von Katzeneizellen; während in einer Arbeitsgruppe mit SOF eine Verbesserung erzielt werden konnte (BOGLIOLO et al. 2001), war in der anderen kein Unterschied zu beobachten (KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al. 2003).

### 2.1.1.3.2 Hormone

Während der Entwicklung zum sprungreifen Graaf'schen Follikel steht der Tertiärfollikel unter dem Einfluss der Gonadotropine FSH und LH. FSH stimuliert v.a. das Follikelwachstum und erhält die Lebensfähigkeit der Oozyte (ERICKSON und DANFORTH 1995). Außerdem spielt es eine Schlüsselrolle bei der Ausdifferenzierung der Granulosazellen und fördert über die Erniedrigung des cAMP-Spiegels (SALUSTRI et al. 1985) die Expansion der Cumuluszellen (WOOD et al. 1995) und die Überwindung der meiotischen Arretierung der Oozyte (THOMAS et al. 2004). Über die Cumuluszellen erhöht FSH indirekt auch die Progesteron- und Östrogen-Synthese, welche neben der Zytoplasmareifung auch für die Reaktionsfähigkeit der Zelle auf LH wichtig ist (LEYVA et al. 1989). Mit Hilfe von LH und den steroiden Hormonen wird wiederum über die Bildung eines Maturation-Promoting-Factors die meiotische Arretierung der Oozyte aufgehoben (DEKEL et al. 1981; NORBURY und NURSE 1992; NIEMANN und MEINECKE 1993; POPE 2000; SHIMADA et al. 2002).

In vitro wird die Reifung durch Zugabe von exogenen Gonadotropinen zur IVM-Kultur unterstützt (JOHNSTON et al. 1989; WOOD et al. 1995). So sank die Maturationsrate bei einem Versuch in einem Medium ohne FSH und LH von 54% auf 37% (JOHNSTON et al. 1989). Die Zugabe von FSH zum Reifungsmedium scheint von essentieller Bedeutung zu sein (COMIZZOLI et al. 2003); exogen zugeführtes Progesteron hingegen erniedrigt die Fertilisierungs- und Teilungsrate (WOOD et al. 1995). Die Verwendung von exogenem FSH und LH bei der In vitro Maturation hat sich allgemein durchgesetzt. Lediglich die Konzentrationen schwanken von Arbeitsgruppe zu Arbeitsgruppe z.T. beträchtlich, z.B. bei FSH zwischen 0,02 IU/ml (FREISTEDT et al. 2001a), 0,1 IU/ml (BOGLIOLO et al. 2001), 0,5 IU/ml (LUVONI und PELLIZZARI 2000) und 1,64 IU/ml (SPINDLER et al. 2000; COMIZZOLI et al. 2003) und bei LH im Bereich von 0,01 IU/ml (FREISTEDT et al. 2001a), über 0,5 IU/ml (LUVONI und PELLIZZARI 2000), 0,1 IU/ml (BOGLIOLO et al. 2001) und 1,06 IU/ml (SPINDLER et al. 2000; COMIZZOLI et al. 2003) bis 2,2 IU/ml (HERRICK und SWANSON 2003). Dies lässt sich z.T. durch unterschiedliche biologische Aktivitäten der verwendeten Hormone erklären. Schwer vergleichbar werden die unterschiedlichen Ansätze auch dadurch, dass häufig die verwendete Menge an Hormonen in µg/ml statt IU/ml angegeben wird und die Spezies, von der die Gonadotropine gewonnen wurden, ungenannt bleibt.

Statt FSH und LH ist auch der Einsatz von Human Menopausal Gonadotropin (OTOI et al. 2001; KARJA et al. 2002a; MURAKAMI et al. 2002) oder PMSG (KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al.

2003) und hCG (POPE et al. 1997; OTOI et al. 2001; KARJA et al. 2002a; MURAKAMI et al. 2002; GOMEZ et al. 2003; KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al. 2003) möglich. Auch eCG (POPE et al. 1999), Epidermal Growth Factor (EGF) (GOMEZ et al. 2003) oder IGF-I (KITIYANANT et al. 2003) scheinen die Reifungsrate zu verbessern. Letzteres scheint für die Übertragung eines positiven Signals von den Cumuluszellen an die Eizelle wichtig zu sein. Bei den meisten Studien wurde auch 1µg/ml 17β-Östradiol zum Reifungsmedium zugesetzt (WOOD et al. 1997; POPE et al. 1999; KARJA et al. 2002a; MURAKAMI et al. 2002; COMIZZOLI et al. 2003).

#### **2.1.1.3.3 Weitere Medienzusätze**

Standardgemäß werden in das Kulturmedium weitere Zusätze wie Antibiotika (gewöhnlich Gentamycin Sulfat oder Penicillin G) und Calciumlaktat, Natriumpyruvat sowie eventuell L-Glutamin als Energiesubstrate bzw. als Substrate für die Proteinsynthese gegeben. Wichtig ist auch die Zugabe von L-Cystein, welches als Zwischenprodukt der GSH-Synthese die zytoplasmatische Reifung unterstützt (YOSHIDA et al. 1993; POPE et al. 1999). GSH wirkt während der Fertilisation bei der Dekondensierung des Spermienkopfes (PERREAULT et al. 1988) und bei der Bildung des männlichen Vorkerns mit (YOSHIDA et al. 1992; YOSHIDA 1993). Als Proteinquelle wird Bovines Serumalbumin (BSA) bevorzugt. Östrisches Kuhserum (ECS) sowie Fetales Kälberserum (FCS) (LUVONI und OLIVA 1993; WOOD et al. 1995) oder Serum von Katzen im Östrus (GOODROWE et al. 1991) wirkten sich bei mehreren Versuchen negativ auf die Reifung aus, obwohl FCS eine verstärkte Cumulusexpansion bei den COCs verursachte (WOOD et al. 1995). Dies wird bei anderen Tierarten üblicherweise als morphologisches Kriterium für eine erfolgreiche Reifung bewertet. Die Zugabe von Antioxidantien kann förderlich für die Entwicklung der Eizellen sein (COMIZZOLI et al. 2003). Auch die Zugabe von Fettsäuren könnte einen Einfluss auf die Maturation haben, da die Katze als Fleischfresser physiologisch bedingt eine hohe Lipidkonzentration im Blut hat (SPINDLER et al. 2000). Bisher wurde diese These jedoch nicht näher untersucht.

#### **2.1.1.3.4 Anzahl der Eizellen pro Gruppe**

Da man davon ausgeht, dass Oozyten auto- oder parakrine Stoffe sezernieren, die für ihre Weiterentwicklung wichtig sind (LANE und GARDNER 1992), werden Katzeneizellen oft in kleine Medientropfen gesetzt, um die Konzentration dieser Stoffe im Kulturmedium zu erhöhen. Bei vielen Studien wurden 5-25 Oozyten in einem 50µl-Tropfen unter Öl kultiviert (LUVONI und OLIVA 1993; WOLFE und WILDT 1996; WOOD und WILDT 1997; SPINDLER et al.

2000; COMIZZOLI et al. 2003). Die Ölabdeckung soll dabei zum Einen Querkontaminationen zwischen den Kulturschalen verhindern und zum Anderen die Verdunstung des Wassers aus dem Kulturmedium reduzieren. Letzteres würde sonst zu einer Erhöhung der Konzentration der Zusatzstoffe führen. Paraffinöl kann der Reifung von Eizellen jedoch abträglich sein, da es die von den Cumuluszellen sezernierten Hormone Progesteron und Östrogen zu einem nicht geringen Teil absorbiert (SHIMADA et al. 2002). Außerdem werden aus dem Öl toxische Komponenten wie z.B. Zink (ERBACH et al. 1995) in das Kulturmedium abgegeben. Andere Arbeitsgruppen benutzten daher kein Paraffinöl, sondern kultivierten die COCs in 400-500µl IVM-Medium (GOMEZ et al. 2000; FREISTEDT et al. 2001a; KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al. 2003) oder sogar in 2ml Reifungsmedium (BOGLIOLO et al. 2001).

#### **2.1.1.3.5 Brutschrankbedingungen**

Der Einfluss einer auf 5% reduzierten Sauerstoffkonzentration im Brutschrank auf die Reifungsrate bei Katzeneizellen wird unterschiedlich beurteilt. In einer Studie konnte man die Maturationsrate durch Sauerstoffreduzierung verbessern (POPE et al. 1999). Es gibt aber auch Forscher, die keinen Unterschied zu Kontrollgruppen beobachten konnten, die bei einer Gaszusammensetzung von 5% CO<sub>2</sub> in Luft gereift wurden (KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al. 2003). Abgesehen von wenigen Ausnahmen (GOMEZ et al. 2003) wurden Katzeneizellen bisher bei den meisten Arbeitsgruppen bei maximaler Luftfeuchtigkeit unter 5% CO<sub>2</sub> in Luft bei 38,0 – 39,0°C kultiviert (LUVONI und PELLIZZARI 2000; MURAKAMI et al. 2002; COMIZZOLI et al. 2003; KITIYANANT et al. 2003).

#### **2.1.1.3.6 Reifungszeit**

Wird eine Kätzin gedeckt, vergehen zwischen dem LH-Peak und der Ovulation 24-48 Stunden; auch in vitro kann man nach 40-48 Stunden die höchste Anzahl von Oozyten in der Metaphase II finden (WILDT 1991). Es gibt Hinweise, dass die Kernreifung in zwei Wellen abläuft (KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al. 2003); demnach sind etwa 36% der COCs bereits nach 17-26 Stunden gereift, weitere 30% schließen die Maturation erst nach 42-45 Stunden ab. Erklärt wird dies damit, dass die Oozyten bereits bei ihrer Gewinnung in einem unterschiedlichen Entwicklungszustand sind und daher verschieden lange Reifungszeiten benötigen. Problematisch ist hierbei, dass die schneller gereiften COCs nach 42 Stunden bereits Alterungserscheinungen wie fragmentierte Polkörperchen, Zellablagerungen im perivitellinen Spalt und Zusammenballungen der Chromosomen zeigen und nicht mehr

entwicklungsfähig sind. Auch andere Autoren stellten eine tendenziell höhere Degenerationsrate bei Katzeneizellen fest, je länger sie gereift wurden (WOLFE und WILDT 1996). Die besten Blastozystenraten wurden mit einer Maturationszeit von 24-32 Stunden erzielt. In anderen Studien wiederum konnte bereits mit 24 Stunden die höchstmögliche Kernreifungsrate erreicht werden (LUVONI und OLIVA 1993); daher wurde vermutet, dass diese unterschiedlichen Ergebnisse durch unterschiedliche Reifungsbedingungen verursacht sein könnten (BOGLIOLO et al. 2001).

Als Standard hat sich inzwischen eine IVM-Zeit von 24 Stunden durchgesetzt (POPE et al. 1999; BOGLIOLO et al. 2001; OTOI et al. 2001; GOMEZ et al. 2003; KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al. 2003), einige wenige Arbeitsgruppen benutzten ein 32-stündiges IVM-Protokoll (SPINDLER et al. 2000; SPINDLER und WILDT 2002; COMIZZOLI et al. 2003; KITIYANANT et al. 2003).

### 2.1.2 IVF

Für eine erfolgreiche Fertilisierung müssen sowohl Eizelle als auch Spermium im befruchtungsfähigen Zustand sein. Bei der Eizelle wird dieser mit Abschluss der Maturation erreicht (HERRICK und SWANSON 2003). Ein Spermium muss die Kapazitation und die Akrosomenreaktion beenden, bevor es in die Eizelle eindringen kann. Durch die aktivierende Wirkung des eingedrungenen Spermiums wird die meiotische Reifeteilung der Oozyte fortgesetzt; es folgt die Bildung des männlichen und weiblichen Vorkernes (HERRICK und SWANSON 2003). Unter dem Begriff *Kapazitation* wird eine Reihe von biochemischen Veränderungen am Spermium zusammengefasst. Die Samenzelle gewinnt die Fähigkeit, sich hyperaktiv zu bewegen; dabei nehmen die Geschwindigkeit ihres Geißelschlages und die Lateralbewegung ihres Kopfes zu. Dies ist zum Einen bei der Wanderung durch Uterus und Eileiter hilfreich und erhöht zum Anderen die Wahrscheinlichkeit einer Kollision zwischen den Gameten (MAHADEVAN und TROUNSON 1984; MOORE 2001). Durch Veränderung der Membranbestandteile (NIEMANN und MEINECKE 1993; PUKAZHENTHI et al. 1998b) und Phosphorylierung der Tyrosin-Kinase (PUKAZHENTHI et al. 1998b) erlangt das Spermium im Rahmen der Kapazitation auch die Kompetenz für die nachfolgende Akrosomenreaktion. Das Kennzeichen der *Akrosomenreaktion* ist die Verschmelzung der äußeren Akrosomenmembran mit der Plasmamembran. Dabei wird der Inhalt des Akrosoms, u.a. Hyaluronidase und Akrosin, freigesetzt (NIEMANN und MEINECKE 1993; BRUCKER und LIPFORD 1995), was das

Eindringen des Spermiums durch die Zona pellucida in die Oozyte zu ermöglichen. Bei der Verschmelzung der Gameten wird mit der Samenzelle der lösliche Faktor Oszillin in die Eizelle gebracht (PARRINGTON et al. 1996), welcher über eine Erhöhung der Calcium-Konzentration in der Zelle die Fortsetzung der Meiose induziert (MOORE 2001). Außerdem werden zum Schutz vor Polyspermie kortikale Granula ausgeschüttet, welche die Zona pellucida derart modifizieren, dass keine Spermien mehr penetrieren können (MOORE 2001).

Die Kapazitation der Spermien ist in vitro bei der Katze sehr einfach und praktisch unabhängig vom verwendeten IVF-Protokoll zu erreichen (GOODROWE et al. 1988; WILDT 1991). Auch von der Jahreszeit wird die Qualität und die Konzentration der Spermien sowie ihre Penetrationsfähigkeit durch die Zona pellucida nicht beeinflusst (SPINDLER und WILDT 1999). Ob die Anwesenheit von Seminalplasma die Fertilisierung stört, ist strittig. Während von einigen Forschern bei ejakulierten Spermatozoen von einer herabgesetzten Lebensfähigkeit (GOODROWE et al. 1989; STACHECKI et al. 1993) und der Anwesenheit eines akrosomenstabilisierenden Faktors in der Samenflüssigkeit berichtet wurde, welcher sich negativ auf die Fertilisierung auswirkte (HAY und GOODROWE 1993), hatte das Seminalplasma in einer anderen Studie keinen negativen Einfluss auf die Befruchtung (HOWARD et al. 1991). Die Dauer der Kapazitation wird bei felines epididymalen Spermien auf 15-30min geschätzt (NIWA et al. 1985; WILDT 1991). Eine Vorkernbildung kann man nach etwa drei bis vier Stunden bei Befruchtung mit epididymalen Spermien, und nach 24 Stunden bei ejakulierten Spermien feststellen (GOODROWE et al. 1988).

Die Befruchtungsrate kann in vitro durch den Nachweis von zwei Polkörperchen, zwei Vorkernen oder einem Zwei- oder Mehrzellstadium bestimmt werden (MILLER et al. 1990). Sie wird sehr unterschiedlich von ungefähr 20% (WOOD et al. 1995), bis zu 95% (KANDA et al. 1998) angegeben, die meisten Autoren beziffern sie auf 40-70% (GOODROWE et al. 1988; JOHNSTON et al. 1991a, b; DONOGHUE et al. 1993; POPE et al. 1993; FARSTAD 2000; KARJA et al. 2002a). Diese Differenzen rühren vermutlich daher, dass verschiedene IVM- und IVF-Protokolle benutzt wurden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist, dass unterschiedliche Kriterien für die Festlegung der Befruchtungsrate herangezogen wurden; da sich nicht alle erfolgreich befruchteten Zellen auch teilen, kann die Befruchtungsrate z.B. bei Wertung des Prozentsatzes an Zweizellern niedriger erscheinen als bei Wertung des Prozentsatzes an Zellen mit zwei Vorkernen. Einen großen Einfluss hat auch die Jahreszeit, in der die Versuche gemacht wurden. So schwankte die Rate der befruchteten Eizellen in einer Studie zwischen 52% im März - April und 17% im Mai - Juli bzw. 12% im November - Januar (SPINDLER und WILDT 1999). Dies wurde mit der unterschiedlichen Qualität der Oozyten erklärt.

### 2.1.2.1 Gewinnung der Spermien

Spermien können grundsätzlich durch (Elektro-)Ejakulation oder aus dem Nebenhoden von mindestens 7-12 Monate alten kastrierten Katern gewonnen werden (WILDT 1991). Die Elektroejakulation ist relativ aufwendig und wird meist nur dann angewandt, wenn es sich um wertvolle Zuchttiere handelt, die keinesfalls kastriert werden sollen. Auf die unterschiedliche Einschätzung des Einflusses von Seminalplasma auf die Befruchtung wurde hingewiesen. Bei Hauskatzen hat es sich daher in den meisten Arbeitsgruppen durchgesetzt, Spermien aus dem Nebenhoden von frisch kastrierten Katern zu spülen. Allerdings muss man hierbei in Kauf nehmen, dass diese Spermien noch nicht vollständig ausgereift sind, und dass der Anteil an missgebildeten Samenzellen erhöht ist. Nicht ausgereifte Spermien sind an dem noch vorhandenen Zytoplasmatröpfchen und einem erhöhten Kreatin-Phosphokinase-Gehalt zu erkennen. Beides reduziert sich im Laufe der Wanderung vom Nebenhodenkopf zum Nebenhodenschwanz durch die Ausschleusung des Zytoplasmatröpfchens (AXNER et al. 2002). Der Anteil der missgebildeten Spermatozoen reduziert sich *in vivo* durch Phagozytose im Nebenhoden (MURAKAMI et al. 1984). Motilität und Vorwärtsbeweglichkeit unterscheiden sich bei epididymalen Spermatozoen jedoch nicht von elektroejakuliertem Samen (HAY und GOODROWE 1993), auch ihre Befruchtungsfähigkeit ist ausreichend.

Bei der Spermagewinnung werden die Samenzellen durch Spülung des Ductus deferens freigesetzt (BOGLIOLO et al. 2001); eine andere Möglichkeit ist die Zerkleinerung des Nebenhodens und die anschließende Spülung der Gewebestücke (HAY und GOODROWE 1993; SPINDLER und WILDT 1999; FREISTEDT et al. 2001a; KARJA et al. 2002a). Als Spülflüssigkeit bieten sich modifiziertes PBS (KARJA et al. 2002a), Hepes-TALP (FREISTEDT et al. 2001a) oder Ham's F10 an (LUVONI und PELLIZZARI 2000). Einige Protokolle sehen anschließend ein Zentrifugieren bei 300-500g für 5-8min vor (SPINDLER und WILDT 1999; LUVONI und PELLIZZARI 2000; KARJA et al. 2002a), bei anderen folgt sofort nach der Gewinnung die Aufschwemmung mit einem Samenverdünner im Verhältnis 1:2 (FREISTEDT et al. 2001a). Die Spermien suspension wird möglichst bald weiterverwendet oder kryokonserviert.



### 2.1.2.2 Einfrier- und Auftautechnik

Katzenspermien eignen sich relativ gut zur längeren Aufbewahrung. Im Nebenhoden sind Spermien fast ohne negative Auswirkungen bei 4°C 24 Stunden haltbar (HAY und GOODROWE 1993; FREISTEDT et al. 1999); Spermisuspensionen mit Samenverdünner bleiben bei Kühlung auf 4°C drei bis fünf Tage lang befruchtungsfähig (FREISTEDT et al. 2001a; GOMEZ et al. 2003).

Für die In vitro Fertilisation ist auch die Verwendung von kryokonservierten Samensuspensionen möglich (COMIZZOLI et al. 2004; MURAKAMI et al. 2004), obwohl das Einfrieren zu Membranschäden bei den Samenzellen führen und so ihre Befruchtungskompetenz senken kann (HAY und GOODROWE 1993). Erkennbar wird dies u.a. durch eine erniedrigte Motilität und einen erhöhten Anteil an geschädigten Akrosomen (ZAMBELLI et al. 2002). Ausgleichen kann man die Auswirkungen der Kryokonservierung mit Hilfe von Motilitätsstimulantien wie Koffein, Pentoxifyllin oder 2'-Deoxyadenosin, welche die Spermien nach dem Auftauen über eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in einen hyperaktivierten Zustand versetzen (STACHECKI et al. 1994). Diese Methode wird jedoch kaum angewandt.

Zum Einfrieren in flüssigem Stickstoff (LN<sub>2</sub>) gibt es verschiedene Protokolle. Es empfiehlt sich, nur frische Spermaproben einzufrieren (HAY und GOODROWE 1993), die eine Motilität von mindestens 50% aufweisen (KARJA et al. 2002a). Die Spermisuspensionen werden entweder in einem Schritt (FREISTEDT et al. 2001a) oder stufenweise während einer zweistündiger Äquilibration im Kühlschrank (HAY und GOODROWE 1993; KARJA et al. 2002a) mit Samenverdünner im Verhältnis 1:2 aufgeschwemmt. Der Samenverdünner besteht zumeist aus TRIS-Puffer mit 20% Eigelb und einer Endkonzentration von 3-4% Glycerol (HAY und GOODROWE 1993). Die Suspension wird anschließend in 0,25ml Minipailletten (Straws) aufgezogen und je nach vorausgegangener Prozedur nochmals bei 4°C im Kühlschrank für insgesamt 0,5-2 Stunden äquilibriert. Abhängig vom verwendeten Protokoll folgt die Inkubation für 3min auf Trockeneis (bei ungefähr -40°C) (HOWARD 1986; SPINDLER und WILDT 1999) oder für 20min in Stickstoffdampf (4cm über dem Flüssigkeitsspiegel bei ca. -120°C) (HAY und GOODROWE 1993; KARJA et al. 2002a; ZAMBELLI et al. 2002). Zuletzt werden die Straws in LN<sub>2</sub> überführt. Friert man größere Volumina z.B. in 1,5ml-Röhrchen ein, sollte man sie direkt in Stickstoffdampf abkühlen, bevor sie in LN<sub>2</sub> eingetaucht werden (STACHECKI et al. 1994). Das Einfrieren der Spermatozoen in Pellets (kleinen Flüssigkeitstropfen) ist nicht ratsam, da dies zu stärkeren Einfrierschäden führt (ZAMBELLI et

al. 2002). Dies hängt vermutlich mit einer rascheren Abkühlung zusammen. Durch Reduzierung der Abkühlrate auf zunächst 12°C/min im Kühlschrank und anschließend 4°C/min im Stickstoffdampf konnte im Vergleich zu schnelleren Abkühlraten (43°C/min) eine Verbesserung der Befruchtungsfähigkeit der Spermien beobachtet werden (PUKAZHENTHI et al. 1999; ZAMBELLI et al. 2002); die unterschiedlichen Raten wurden dabei über verschiedene Abstände der Proben von der Oberfläche des flüssigen Stickstoffs erzielt.

Die Protokolle zur Kryokonservierung von Katzenspermien unterscheiden sich bei den verschiedenen Studien stark voneinander und lassen sich daher schwer vergleichen. Der Unterschied liegt zum Einen in der verwendeten Methode zur Abkühlung der Spermien-suspensionen, wobei die Abkühlrate nur bei wenigen Arbeitsgruppen mit einem Thermometer gemessen wurde. Zum Anderen differiert bei den Verfahren der Zeitpunkt, bei dem die Spermien mit dem glycerinhaltigen Spermaverdünner versetzt werden. Ein Zusatz bei Raumtemperatur ermöglicht ein schnelles Eindringen des Glycerols in die Samenzelle, die Zugabe bei 4°C hingegen reduziert dessen Toxizität.

Zum Auftauen werden die Straws entweder zunächst für 5-10s bei Raumtemperatur erwärmt (SPINDLER und WILDT 1999; KARJA et al. 2002a) oder sofort für 30s in ein 38°C warmen Wasserbad getaucht (HAY und GOODROWE 1993; ZAMBELLI et al. 2002). Bei größeren Volumina muß die Auftauzeit entsprechend verlängert werden (STACHECKI et al. 1994).

### **2.1.2.3 Swim up und Konzentrationsbestimmung**

Nach dem Auftauen erfolgt zunächst die Motilitätskontrolle der Spermatozoen, die bei 50-80% liegen sollte. Durch Waschen und Zentrifugieren mit IVF-Medium bei 300-500g für 5-8min wird anschließend die Verdünnerflüssigkeit entfernt (WOLFE und WILDT 1996; WOOD und WILDT 1997; SPINDLER und WILDT 1999; KARJA et al. 2002a). Für den nachfolgenden Swim up überschichtet man den zentrifugierte Samen vorsichtig mit 100µl IVF-Medium (zumeist Ham's F10) und inkubiert ihn dann für 0,5-1 Std. bei Raumtemperatur (SPINDLER und WILDT 1999; LUVONI und PELLIZZARI 2000; GOMEZ et al. 2003). Die lebenden Spermien können mit dem Überstand abgenommen und nochmals einer Motilitäts- und Konzentrationsprüfung mit dem Hämazytometer unterzogen werden (HAY und GOODROWE 1993; LUVONI und PELLIZZARI 2000). Unterschiede zwischen den Spermeproben bezüglich der Motilität und dem Prozentsatz an morphologisch veränderten Spermien können nach dem

Swim up nicht mehr festgestellt werden; dennoch sind ursprünglich schlechtere Samenproben weniger befruchtungsfähig (WILDT 1991).

Die Motilitätsprüfung und die Konzentrationsbestimmung sind die in der Praxis am häufigsten angewandten Spermauntersuchungen. Weitere Untersuchungen wie die Bestimmung der Geschwindigkeit der Vorwärtsbewegung und des Spermien-Motilitätsindex (SMI), die pH-Wert-Bestimmung, die Lebend-Tot-Färbung und die Anfärbung für die Beurteilung der Morphologie, oder direkte Untersuchungen der Interaktion zwischen Eizelle und Spermium (Zona Attachment Assay, Zona Penetration Assay und Aktivierung der Eizelle) werden routinemäßig bei der In vitro Produktion von Embryonen nicht durchgeführt.

#### **2.1.2.4 IVF-Medium**

Als Grundmedium für die In vitro Fertilisation diente den meisten Arbeitsgruppen Ham's F10 (WOLFE und WILDT 1996; WOOD und WILDT 1997; SPINDLER und WILDT 1999; LUVONI und PELLIZZARI 2000; COMIZZOLI et al. 2003; HERRICK und SWANSON 2003) oder Brackett Oliphant Medium (KARJA et al. 2002a; MURAKAMI et al. 2002). Aber auch mit Tyrode's Medium (POPE et al. 1994; GOMEZ et al. 2003) oder Tyrode Albumin Lactate Pyruvate (TALP) mit Hapes (FREISTEDT et al. 2001a), modified Earle's Balanced Salt Medium (KANDA et al. 1998) oder mKRB (GOODROWE et al. 1988; HAY und GOODROWE 1993) konnten gute Befruchtungsergebnisse erzielt werden.

Wie in das IVM-Medium werden auch in das IVF-Medium Pyruvat, Glutamat, Calciumlaktat, Antibiotika (meist Gentamycin Sulfat oder Penicillin G) und Proteine zugesetzt. Im Gegensatz zur In vitro Maturation hat die verwendete Proteinquelle in der IVF-Kultur keinen Einfluss auf die Fertilisationsrate. Daher wurde das Fertilisationsmedium in den verschiedenen Forschungsgruppen entweder mit 5% FCS (JOHNSTON et al. 1991b; POPE et al. 1994; WOOD und WILDT 1997; LUVONI und PELLIZZARI 2000; SPINDLER et al. 2000; COMIZZOLI et al. 2003; HERRICK und SWANSON 2003) oder 0,6% BSA (POPE et al. 1999; FREISTEDT et al. 2001a; KARJA et al. 2002a; MURAKAMI et al. 2002; GOMEZ et al. 2003) bzw. 10% human serum (KANDA et al. 1998) supplementiert. Zur Unterstützung der Kapazitation ist die Zugabe von 10µg/ml (FREISTEDT et al. 2001a) bis 20µg/ml Heparin üblich (KARJA et al. 2002a; MURAKAMI et al. 2002).

Für die IVF muss die Konzentration der zugesetzten Spermien im Medium idealerweise die sichere Befruchtung aller Eizellen gewährleisten, darf jedoch nicht so hoch sein, dass die Polyspermierate ansteigt. Als brauchbares Mittelmaß hat sich eine Spermienkonzentration von  $2-5 \times 10^5$  Spermatozoen /ml IVF-Medium durchgesetzt (GOODROWE et al. 1988; JOHNSTON et al. 1991b; WOLFE und WILDT 1996; WOOD und WILDT 1997; GOMEZ et al. 2000; SPINDLER et al. 2000; COMIZZOLI et al. 2003); einige wenige Forschungsgruppen verwendeten das 10fache davon (LUVONI und PELLIZZARI 2000; KARJA et al. 2002a; MURAKAMI et al. 2002). In den meisten Studien wurde dabei ähnlich wie bei der In vitro Reifung eine geringe Anzahl von COCs in einem 50-100µl großen Tropfen unter Öl fertilisiert (GOODROWE et al. 1988; JOHNSTON et al. 1991b; WOLFE und WILDT 1996; WOOD und WILDT 1997; SPINDLER und WILDT 1999; GOMEZ et al. 2000; KARJA et al. 2002a; COMIZZOLI et al. 2003).

Obwohl man feststellte, dass bei Hauskatzen 98% der COCs bereits nach drei bis vier Stunden von Spermien penetriert waren (NIWA et al. 1985; POPE et al. 1993) und die nachfolgende Bildung der männlichen und weiblichen Vorkerne nur weitere drei Stunden in Anspruch nahm (POPE et al. 1993), gibt es nur wenige Arbeitsgruppen, die die Oozyten nur drei bis fünf Stunden mit den Spermatozoen inkubierten (POPE et al. 1993; KANDA et al. 1998). Bei den übrigen Arbeitsgruppen variierte die Inkubationszeit zwischen 12-16 Stunden (JOHNSTON et al. 1991b; WOOD et al. 1995; SPINDLER et al. 2000; KARJA et al. 2002b; MURAKAMI et al. 2002), 15-20 Stunden (GOODROWE et al. 1988; WOLFE und WILDT 1996; WOOD und WILDT 1997; POPE et al. 1999; GOMEZ et al. 2003; COMIZZOLI et al. 2004) oder sogar 22-24 Stunden (FREISTEDT et al. 1999). Temperaturunterschiede von 37-39°C haben bei Katzeneizellen keinen Einfluss auf die Befruchtungsrate (JOHNSTON et al. 1991b), gewöhnlich erfolgt die Kultivierung bei 38°C und 5% CO<sub>2</sub> (WOLFE und WILDT 1996; SPINDLER und WILDT 1999; COMIZZOLI et al. 2003; GOMEZ et al. 2003).

### **2.1.2.5 Parthenogenese und Polyspermie**

Parthenogenetisch aktivierte Eizellen teilen sich trotz fehlender Befruchtung z.T. bis zum Achtzellstadium und verfälschen so die Teilungsrate. Mit Hilfe einer Chromosomenfärbung sind diese COCs bereits im ungeteilten Zustand daran erkennbar, dass sie sich in der Ana- oder Telophase II befinden und bereits ein weiteres Polkörperchen ausgeschleust haben, obwohl kein männlicher Vorkern sichtbar ist (GOMEZ et al. 2000). Die Höhe der

Parthenogeneserate kann man auch durch die Beurteilung der Teilungsrate von Eizellen, denen keine Spermien zugesetzt worden sind, abschätzen. In der Fortpflanzungssaison von November bis Juli ist der Anteil der parthenogenetisch aktivierten Eizellen bei Katzen erhöht (SPINDLER und WILDT 1999). Beeinflusst wird dieser außerdem vom verwendeten IVC-Medium. In einer Studie schwankte sie zwischen 20% (MK-1, Ham's F10 und TCM 199) und 32% (CR1aa), bei der Verwendung von Waymouth Medium war sie gleich Null (MURAKAMI et al. 2002). Eine erhöhte FSH-Konzentration oder die Anwesenheit von Antioxidantien im IVM-Medium beeinflussen die Parthenogeneserate nicht (COMIZZOLI et al. 2003). Von vielen Autoren wird die Parthenogeneserate auf 3-6% beziffert (JOHNSTON et al. 1989; WILDT 1991; LUVONI und OLIVA 1993; WOOD und WILDT 1997; SPINDLER und WILDT 1999; FREISTEDT et al. 2001a).

Ebenso unerwünscht wie die Parthenogenese ist die Polyspermie, d.h. das Eindringen von mehr als einem Spermium in die Eizelle, da sich solche Oozyten ebenfalls nicht zu Blastozysten entwickeln können. Unreife Eizellen lassen im Gegensatz zu gereiften das Eindringen von mehreren Spermien eher zu. Ob sich die Rate mit fortschreitender Dauer der Co-Inkubation mit den Spermatozoen verändert, ist umstritten (NIWA et al. 1985; POPE et al. 1993). Die Polyspermierate scheint auch nicht vom ovariellen Zyklusstand der Oozytenspender abhängig zu sein (KARJA et al. 2002a). Sie wird durchschnittlich mit 2-4% angegeben (GOODROWE et al. 1988; KARJA et al. 2002a).

### **2.1.3 IVC**

Nach erfolgter Befruchtung werden die Zygoten in ein Kulturmedium übertragen, das ihre weitere Entwicklung zur Morula und Blastozyste unterstützen soll. Die frühe Embryonalentwicklung ist sehr sensibel gegenüber Störungen, weil ihre Regulationsmechanismen noch nicht vollständig aktiviert sind. In vivo wird der Embryo in dieser Zeit durch einen intensiven Kontakt mit dem Eileiter unterstützt; in der Kultur ist er deshalb sehr stark von einem optimalen Medium abhängig (BAVISTER 2000). Ein kritischer Zeitpunkt ist in vitro die Aktivierung des embryonalen Genoms, da es hier oft zum Sistieren der Entwicklung (embryonaler Block) kommt (TELFORD et al. 1990). Die Aktivierung fällt bei den meisten Spezies zeitlich mit dem Übergang des Embryos vom Eileiter in den Uterus zusammen (BAVISTER 2000), was bei der Katze dem Übergang von der Morula zur Blastozyste entspricht (JOHNSTON et al. 1991b; BOGLIOLO et al. 2001). Laut HOFFERT et al. (1997) findet der

Übergang von der maternalen zur embryonalen genetischen Kontrolle jedoch auch bei der Katze bereits im Fünf- bis Achtzellstadium statt. Durch Optimierung des IVC-Mediums wird versucht, den embryonalen Block aufzuheben (WOLFE und WILDT 1996), dennoch muss man in vitro immer mit einer Entwicklungshemmung rechnen. Erkennbar ist diese z.B. an der weniger ausgeprägten Kompaktierung der Morulae (GOMEZ et al. 2003), sowie an der allgemein langsamer ablaufenden Entwicklung, der herabgesetzten Lebensfähigkeit und der verminderten Zellzahl der Embryonen (BAVISTER 1995).

Offenbar kann man bei der Katze keine Verbesserung der Embryonalentwicklung durch Cokultivierung mit Eileiterepithelzellen oder Cumulus- und Granulosazellen erzielen (KITIYANANT et al. 2003). Dagegen ist nachgewiesen, dass ein „Gruppeneffekt“ die Entwicklungsrate der Embryonen in einer Kultureinheit begünstigt (SPINDLER und WILDT 2002). Förderlich sind auch weiterentwickelte Embryonen in der Kultur. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass Embryonen zum Einen auto- und parakrine Faktoren sezernieren und zum Anderen schädliche Stoffe wie z.B. Sauerstoffradikale aus dem Medium entfernen. „Schlechte“ Embryonen hingegen können keine Wachstumsfaktoren produzieren, vermutlich sezernieren sie sogar Schadstoffe. Während einige Arbeitsgruppen also bis zu fünf Embryonen in 100µl Medium unter Öl kultivierten (KARJA et al. 2002a; MURAKAMI et al. 2002), setzten andere größere Embryonenzahlen in 400-500µl Medium (GOMEZ et al. 2000; FREISTEDT et al. 2001a). Das Schlüpfen der Blastozyste kann dabei durch Andauung der Zona pellucida mit 0,5% Pronase erleichtert werden (FREISTEDT et al. 2001b). Bei der IVP bei Katzen sind Blastozystenraten von 10–35% möglich (POPE et al. 1993; WOLFE und WILDT 1996; POPE et al. 1997; WOOD und WILDT 1997; POPE et al. 1999; MURAKAMI et al. 2002). Die Rate ist dabei neben der Qualität der Oozyten (WOOD und WILDT 1997) und des Zyklusstandes (FREISTEDT et al. 2001a) auch von der Jahreszeit abhängig (SPINDLER und WILDT 1999; FREISTEDT et al. 2001a).

### **2.1.3.1 Medium**

Das Kulturmedium und die Proteinquelle spielen bei der In vitro Kultur eine größere Rolle als bei der Fertilisation (JOHNSTON et al. 1991a). In zwei Forschungsgruppen wurde die Eignung verschiedener Kulturmedien zur IVC bei der Katze miteinander verglichen. In einer Studie konnten bessere Entwicklungsraten nach Kultivierung der Zygoten in TCM 199, MK-1 und CR1aa erreicht werden als nach Kultivierung in Waymouth 751/1 und Ham's F10

(MURAKAMI et al. 2002). In einer anderen Arbeit war Ham's F10 besser geeignet als modifiziertes Tyrode's Medium (TALP) und mKRB (JOHNSTON et al. 1991a). Allgemein enthalten komplexe Medien wie Ham's F10 oder MEM oft Stoffe wie z.B. Niacinamide, die der Embryonalentwicklung bei vielen Spezies abträglich sind (BAVISTER 1995). Dennoch fanden bei den verschiedenen Arbeitsgruppen bisher sowohl komplexe Medien wie Ham's F10 (JOHNSTON et al. 1991a, b; POPE et al. 1993; COMIZZOLI et al. 2003) oder TCM 199 (POPE et al. 1993; MURAKAMI et al. 2002), als auch einfache Medien (also ohne Zusatz von Vitaminen und Aminosäuren) wie SOF (BOGLIOLO et al. 2001; FREISTEDT et al. 2001a), Tyrode's Medium (POPE et al. 1993; POPE et al. 1999; GOMEZ et al. 2003) oder modifiziertes Earle's balanced salt solution Anwendung (MK-1) (KARJA et al. 2002b; MURAKAMI et al. 2002).

### 2.1.3.2 Medienzusätze

Der wachsende Embryo stellt im Laufe seiner Entwicklung unterschiedliche Ansprüche an das Kultursystem (SWANSON et al. 1996), v.a. an die Art und Menge der angebotenen Proteinquelle (JOHNSTON et al. 1991a). Aminosäuren sind nicht nur als metabolische und anabolische Substrate wichtig, sie regeln auch den osmotischen Druck und die Ionenbalance und binden Schwermetallionen und Toxine (BAVISTER 1995). Da man bei Versuchen mit Zygoten von Hamster und Maus feststellte, dass sich nicht alle Aminosäuren positiv auf die Embryonalentwicklung auswirken (CARNEY und BAVISTER 1987; TSAI und GARDNER 1994), wäre der *gezielte* Zusatz von Aminosäuren in das Kulturmedium zu bevorzugen. Vielfach wird jedoch Serum als Proteinquelle eingesetzt, welches in seiner Zusammensetzung nicht beeinflussbar ist sondern sich im Gegenteil selbst bei kommerzieller Herstellung von Charge zu Charge stark unterscheidet. Daher ist es schwierig, die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen miteinander zu vergleichen (BAVISTER 1995; KARJA et al. 2002b). Kritisch für die frühe Embryonalentwicklung scheint auch die Konzentration von Glukose zu sein. Steigt diese über 6mM, werden die ersten Teilungsschritte beeinträchtigt (BAVISTER 1995; SWANSON et al. 1996; GARDNER 1998; MURAKAMI et al. 2002), bis 5,5mM hingegen fördert Glukose die Embryonalentwicklung (JOHNSTON et al. 1991a; POPE et al. 1993; KARJA et al. 2002b). Da in Serum Glukose enthalten ist, könnte auch hierin dessen abträglicher Einfluss auf die frühe Embryonalentwicklung begründet sein (BAVISTER 1995). Serum enthält aber auch wichtige Vitamine und Wachstumsfaktoren (MAURER 1992; BAVISTER 1995; KARJA et

al. 2002b) und erleichtert das Schlüpfen des Embryos, da es die Verhärtung der Zona pellucida verhindert (KARJA et al. 2002b).

Bei der Katze wirkte sich FCS und Östrisches Katzenserum im Gegensatz zu BSA sehr positiv auf die Entwicklung von der Morula zur Blastozyste aus (JOHNSTON et al. 1991a) und erhöhte die Zellzahl der Embryonen (KARJA et al. 2002b). Dennoch verwenden einige Arbeitsgruppen ein IVC-Medium mit 0,4–0,6% BSA (BOGLIOLO et al. 2001; KARJA et al. 2002a; MURAKAMI et al. 2002). Sehr gute Ergebnisse erzielte man auch durch einen Wechsel von BSA zu 10% FCS am Tag 2 nach der Befruchtung (POPE et al. 1994; POPE et al. 1999; KARJA et al. 2002b; GOMEZ et al. 2003). Die Verwendung von 10% human serum statt BSA oder FCS führte in einer Studie zu Blastozystenraten von bis zu 65%; allerdings wurden hier *in vivo* maturierte Oozyten verwendet (KANDA et al. 1998). Auch eine geringere FCS-Konzentration von 5% (KARJA et al. 2002b; COMIZZOLI et al. 2003) oder der Zusatz von 10% ECS (Estrous Cow Serum) (FREISTEDT et al. 2001a) ist möglich, eine Supplementierung mit 2% essentiellen und 1% nicht essentiellen Aminosäuren ist ebenfalls üblich (POPE et al. 1997; BOGLIOLO et al. 2001; FREISTEDT et al. 2001a; KARJA et al. 2002b; GOMEZ et al. 2003). Außerdem werden dem IVC-Medium Pyruvat und Laktat als Energielieferanten, sowie Puffer und Antibiotika zugesetzt (POPE et al. 1993; GOMEZ et al. 2003). Durch Zugabe von schwachen Säuren wie HEPES kann man den bei *in vitro* kultivierten Embryonen oftmals erhöhten intrazellulären pH-Wert erniedrigen (WUTKE und WALZ 1990), auch Wachstumsfaktoren können das Kulturmedium verbessern (BAVISTER 1995). Optimal, aber kaum in praxi umgesetzt, wäre ein häufiger Medienwechsel bzw. ein fließendes Kultursystem. So könnte man den wechselnden Ansprüchen des Embryos gerecht werden (BAVISTER 1995; FREISTEDT et al. 2001b) und eine Anreicherung von toxischen Stoffwechselprodukten vermeiden (GARDNER und LANE 1993).

### **2.1.3.3 Brutschrankbedingungen**

Physiologisch sind Körperzellen einer Sauerstoffkonzentration von 1-5% ausgesetzt (BAVISTER 1995), weshalb es sich anbietet, auch Embryonen in einer reduzierten Sauerstoffatmosphäre zu kultivieren. Zu viel Sauerstoff fördert v.a. in Anwesenheit von Schwermetallionen die Bildung von Radikalen (NODA et al. 1991). Bei der Katze scheinen jedoch unterschiedliche Gaszusammensetzungen keinen Einfluss auf die Blastozystenrate zu haben; auch verschiedene Temperaturen haben keine Auswirkung auf die



Embryonalentwicklung (JOHNSTON et al. 1991b). Es werden daher sowohl reduzierte (FREISTEDT et al. 2001a; GOMEZ et al. 2003) als auch normale Sauerstoffkonzentrationen verwendet (POPE et al. 1997; COMIZZOLI et al. 2003), die Temperatur liegt meist zwischen 38,0 und 38,5°C (MURAKAMI et al. 2002; COMIZZOLI et al. 2003; KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al. 2003).

#### **2.1.3.4 Beurteilung der Teilungs- und Blastozystenrate**

In vitro wird die erste Zellteilung spätestens 24 Stunden nach der Befruchtung abgeschlossen. Der Embryo entwickelt sich ab Tag 5 bis 6 zu einer kompakten Morula und bis Tag 8 zu einer Blastozyste. Die Blastozyste expandiert und beginnt ab Tag 8 bis 10 zu schlüpfen (WOLFE und WILDT 1996; WOOD und WILDT 1997). Daher wird gewöhnlich die Teilungsrate bei Katzenembryonen am 1.-4. Tag nach der Befruchtung (GOODROWE et al. 1988; POPE et al. 1999; GOMEZ et al. 2000; BOGLIOLO et al. 2001; FREISTEDT et al. 2001a; KARJA et al. 2002a; GOMEZ et al. 2003) und die Blastozystenrate am 6.-9. Tag beurteilt (GOMEZ et al. 2000; FREISTEDT et al. 2001a; COMIZZOLI et al. 2003; GOMEZ et al. 2003; MURAKAMI et al. 2004). Bei diesen Gelegenheiten werden die Zellen mit frischem Kulturmedium „gefüttert“ oder in neue Kulturschälchen umgesetzt. Manche Arbeitsgruppen beurteilten die Embryonalentwicklung auch täglich, fütterten sie jedoch meist nur alle 48 Stunden (WOLFE und WILDT 1996; SPINDLER und WILDT 1999; LUVONI und PELLIZZARI 2000).

Am besten kann man die Qualität der Embryonen durch einen Transfer nachweisen (BAVISTER 1995); diese Methode steht in der Regel jedoch nicht zur Verfügung. Alternativ werden die Blastozysten morphologisch beurteilt, indem man auf eine dunkle, gleichmäßige Färbung und eine gleichmäßige Form ohne Vakuolen oder Fragmentierung achtet (ROTH et al. 1997). Eine andere Möglichkeit ist das Färben und Auszählen der Gesamtzahl der Zellen pro Embryo (Total Cell Number) (SPINDLER et al. 2000). Die Schlupfrate ist als Beurteilungskriterium weniger geeignet, da sich ein Nicht-Schlüpfen in vitro nicht unbedingt auf die schlechtere Lebensfähigkeit des Embryos zurückführen läßt (BAVISTER 1995).

## 2.2 Kryokonservierung von Katzeizellen

Die Kryokonservierung von Gameten oder Embryonen stellt eine wichtige Methode dar, um das Genmaterial von gefährdeten Wildkatzenarten zu erhalten. Bei Abkühlung einer Zelle auf Temperaturen unter Null Grad Celsius gefriert das Zellwasser, was zum Platzen der Zelle führt. Schützen kann man sie vor der intrazellulären Eisbildung, indem man dem Einfriermedium „Gefrierschutzmittel“ (Kryoprotektiva oder auch CPAs) zusetzt. Die Kryoprotektiva haben dabei doppelte Funktion: Zum Einen dehydrieren sie die Zelle, zum Anderen verdrängen und ersetzen sie das verbleibende Zellwasser (SHAW und JONES 2003). Dehydriert man die Zelle jedoch zu schnell oder zu stark (osmotischer Stress), geht die stabilisierende Wirkung des an Lipide, Proteine und DNA gebundenen Wassers verloren, die dabei auftretenden Schäden sind irreversibel. Auch bei der Rehydrierung nach dem Auftauen kann osmotischer Stress entstehen, wenn der Wassereinstrom in die hyperosmotische Zelle schneller erfolgt als der Ausstrom der CPAs; die Zelle schwillt an und kann platzen. Ein weiteres Problem ist, dass die CPAs selbst schädlich sind (toxischer Stress), wenn sie in zu hohen Konzentrationen in der Zelle vorliegen (SHAW und JONES 2003). Um diese Probleme in den Griff zu bekommen, ist eine geeignete Wahl des Einfriermediums und des Abkühlverfahrens wichtig.

Es wurden verschiedene Einfrierverfahren entwickelt, mit deren Hilfe in der Vergangenheit sowohl reife als auch unreife Eizellen, Zygoten im Vorkernstadium sowie vier- bis achtzellige Embryonen und schließlich Blastozysten eingefroren wurden. Der Erfolg war dabei speziesabhängig; während man bei Oozyten und Embryonen von Menschen und Mäusen wenig Probleme hat, sind z.B. die Eizellen und Embryonen von Rindern und Schweinen viel empfindlicher gegen Abkühlung (SHAW und JONES 2003). Allgemein hat sich gezeigt, dass die Kryokonservierung von Blastozysten erfolgreicher ist als die von Oozyten. Die Probleme beim Einfrieren von Oozyten ergeben sich zunächst aus ihrer Zellgröße und der im Verhältnis dazu kleinen Membranoberfläche (LE GAL und MASSIP 1999; HYTTEL et al. 2000). Durch das große Volumen sind sie anfälliger gegen osmotischen Stress (MURAKAMI et al. 2004), auch die Gefahr der intrazellulären Eisbildung ist um Einiges größer (LEDDA et al. 2001; CHEN et al. 2003). Die Plasmamembran reagiert sensibler auf Abkühlung und wird oft lysiert (ALBERTINI 1995; HYTTEL et al. 2000; LEDDA et al. 2001). Man kann versuchen, sie durch Zugabe von Antioxidantien, Zucker oder Proteinen zu der Einfrierlösung oder durch Elektrofusion der Membran mit Liposomen zu stabilisieren (LEDDA et al. 2001). Auf Grund

des großen Volumens ist auch die gleichmäßige und zeitgleiche Verteilung der in die Zelle einströmenden Kryoprotektiva schwierig. Dies kann dazu führen, dass die Eizelle an einer Stelle bereits den toxischen Einwirkungen der CPAs ausgesetzt ist, während sie an einer anderen noch nicht ausreichend vor den durch die Abkühlung entstehenden Schäden geschützt ist (HYTTEL et al. 2000). Ein weiteres Problem ist, dass die Membranpermeabilität der Oozyten im Vergleich zu der von Embryonen verringert ist. Dies rührt von einer relativ niedrigen Calcium-Konzentration (GOOK et al. 1993) und einem im Verhältnis geringeren Gehalt an membranständigen Aktinfilamenten her. Die Folge ist, dass der Austausch von CPAs verlangsamt wird, was wiederum den osmotischen Stress für die Zelle erhöht (CHEN et al. 2003).

Auch die Zona pellucida leidet unter der Kryokonservierung. Durch das Einwirken der CPAs und durch die Abkühlung werden die Glykoproteine der Zona miteinander verknüpft (SHAW und JONES 2003); außerdem werden die kortikalen Granula der Eizelle, die bei der Befruchtung eine Polyspermie verhindern sollen, vorzeitig ausgeschüttet (HOCHI 2003). Beides führt zu einer Undurchlässigkeit der Zona für Spermien, die Fertilisation wird dadurch gestört (LE GAL und MASSIP 1999; SHAW und JONES 2003). Einige Autoren berichteten auch von einer erhöhten Polyspermierate (GLENISTER et al. 1987; HYTTEL et al. 2000). Der Grund dafür könnte in der Degeneration der verbliebenen kortikalen Granula liegen, was ein unvollständiges Ablaufen der Zona-Reaktion zur Folge hat (HYTTEL et al. 2000). Man versucht, diesen Problemen durch Intrazelluläre Spermieninjektion (ICSI) zu begegnen (CHEN et al. 2003).

Da die Eizelle durch die Einwirkung der Kryoprotektiva dehydriert wird und schrumpft (LE GAL und MASSIP 1999), kommt es in der Folge zum Abriss der Gap junctions zwischen Eizelle und Cumuluszellen. Für Oozyten sind die Cumuluszellen jedoch nicht nur im Rahmen der Maturation, sondern auch bei der Fertilisation wichtig. Problematisch ist auch, dass eine Abkühlung im Zellinneren zur Depolymerisierung der Mikrotubuli des Spindelapparates führt. Dieser Vorgang ist zwar größtenteils reversibel, sofern man die Zellen vor der Fertilisation 1-3 Stunden ruhen lässt, dennoch werden nach der Fertilisation oft Aneuploidie oder Polyploidie als Folgen einer gestörten zweiten Reifeteilung beobachtet (HYTTEL et al. 2000; CHEN et al. 2003; MEN et al. 2003). Durch kurze Inkubation der Zellen mit Taxol<sup>TM</sup> oder Cytochalasin B vor der Kryokonservierung kann man den Spindelapparat gegen diese Einfrierschäden schützen (PARK et al. 2001; RHO et al. 2002). Einen weiteren negativen Effekt hat die Kryokonservierung auf die Anzahl der Mitochondrien; bei Oozyten wurde eine Abnahme um 42% beobachtet (RHO et al. 2002). Noch empfindlicher als das Zytoplasma

reagiert der Kern auf das Einfrieren, vermutlich sind intrazelluläre Eisbildung (PEGG 1987) oder osmotischer Stress die Auslöser für auftretende DNA-Schäden. Morphologisch erscheinen diese Zellen oft völlig normal (MEN et al. 2003).

Trotz aller Probleme wäre die Anlage einer Oozyten-Genbank statt einer Embryonenbank vorteilhaft, da diese in ihrer weiteren Verwendung sehr viel flexibler ist (HOCHI 2003). Man muss jedoch beachten, dass man die bei Embryonen erprobten Einfrierprotokolle auf Grund der morphologischen Unterschiede nicht 1:1 auf Oozyten übertragen kann (CHEN et al. 2003). Auch ist wichtig, dass man den Erfolg der Kryokonservierung anhand der weiteren Embryonalentwicklung beurteilt. Die Einfrierschäden sind zwar z.T. schon nach dem Auftauen anhand von Membran- und Zonarupturen, Schwellung oder einer ungleichmäßig geschrumpften Form sowie anhand von Vakuolisierung und fragmentiertem Zytoplasma erkennbar (DHALI et al. 2000; 2002). Oft wirken sich die Folgen der Kryokonservierung aber auch erst relativ spät aus (FUKU et al. 1995b; AGCA et al. 2000; MACLELLAN et al. 2002).

## **2.2.1 Einflussfaktoren auf die Kryokonservierung**

### **2.2.1.1 Zusammensetzung des Einfriermediums**

Das Einfriermedium besteht zumeist aus dem Trägermedium (z.B. PBS oder TCM 199), FCS und einer unterschiedlichen Kombination von Kryoprotektiva. Das Serum soll dabei nicht nur das Handling der Zellen erleichtern, es stabilisiert auch die Zellmembran und reduziert die Toxizität der CPAs (ANCHORDOGUY et al. 1987; CROWE et al. 1988). Möchte man jedoch chemisch definierte Medien verwenden, ist auch der Ersatz durch Polyvinylalkohol problemlos möglich (ASADA et al. 2002). Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion der Toxizität der Einfrierlösung ist der Ersatz von Natrium durch Cholin (STACHECKI et al. 1998).

Die Kryoprotektiva lassen sich in eine permeable und eine nicht-permeable Gruppe einteilen. Permeable CPAs sind hydrophil und können hydrogenne Bindungen mit Proteinen, Lipiden und DNA eingehen; sie sollen in der Zelle das gebundene Wasser ersetzen und die Zellorganellen stabilisieren. Zu ihnen zählt man Ethylendiol (Ethylenglykol; MG: 62,1 M), Propanediol (Propylenglykol; MG: 76,1 M), Dimethylsulfoxid (DMSO; MG: 78,1 M) und Glycerol (MG: 92,1 M). Die Permeabilität nimmt mit zunehmender Größe des Stoffes ab, sie ist aber auch abhängig von der Spezies und dem Entwicklungsstadium der einzufrierenden Zelle (SHAW und JONES 2003). Bei einem stark permeablen Kryoprotektivum wie

Ethylenglykol (EG) besteht die Gefahr einer zu hohen Endkonzentration in der Zelle und einer dadurch erhöhten Toxizität (SMORAG und GAJDA 1994). Andererseits kann bei weniger stark permeablen CPAs wie Glycerol osmotischer Stress entstehen, da beim Auftauen der Wassereinstrom schneller erfolgt als der Ausfluss des Kryoprotektivums (WANI et al. 2004). Auf Grund der hohen Konzentrationen, die man für den optimalen Schutz der Zelle benötigt, können die toxischen Auswirkungen von CPAs relativ groß sein (SHAW und JONES 2003). Permeable Kryoprotektiva führen zur Depolymerisierung des Spindelapparates (JOHNSON und PICKERING 1987). Desweiteren induzieren sie über die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels die Exozytose von kortikalen Granula, was zur Verhärtung der Zona pellucida führt (HOCHI 2003; TAKAHASHI et al. 2004). Über den gleichen Mechanismus werden auch abbauende Enzyme wie Proteasen und Endonukleasen aktiviert (ORRENIUS et al. 2003), welche den Zelluntergang einleiten können (TAKAHASHI et al. 2004). Die Höhe des Calcium-Spiegels ist abhängig von der Konzentration der CPAs, kann allerdings durch Erniedrigung des Calcium-Gehaltes im Medium oder durch Zusatz von Chelatbildnern (z.B. BAPTA-AM) vermindert werden (TAKAHASHI et al. 2004)

Zur Gruppe der nicht-permeablen Kryoprotektiva gehören Zucker wie Saccharose, Trehalose, Galaktose oder Raffinose, wie auch Polymere mit einem Molekulargewicht von bis zu 400.000 M wie Ficoll, Polyvinyl Pyrrolidone (PVP) oder Dextran, sowie Proteine wie BSA (KULESHOVA et al. 1999; BEGIN et al. 2003; GOMEZ et al. 2003; SHAW und JONES 2003). Auch Monosaccharide scheinen v.a. wegen ihrer geringen Toxizität gut geeignet zu sein (KULESHOVA et al. 1999), werden aber selten verwendet. Nicht-permeable CPAs dehydrieren die Zelle durch osmotische Kräfte und erniedrigen so den benötigten Anteil an permeablen CPAs (MASSIP 2001; SHAW und JONES 2003). Außerdem stabilisieren sie die Zellmembran durch Anlagerung an deren Phospholipide (MASSIP et al. 1995). Auf Grund ihrer starken osmotischen Wirksamkeit können aber auch nicht-permeable CPAs schädlich für die Zellen sein (KULESHOVA et al. 1999; LEDDA et al. 2001; MURAKAMI et al. 2004). Durch zu schnelles und starkes Schrumpfen der Zellen kann es z.B. zu Rissen in der Plasmamembran kommen (HOCHI 2003). In einer Studie wurde die Blastozystenrate bereits nach einer 10-minütigen Inkubation von Oozyten mit anisotonischen Kochsalzlösungen signifikant reduziert (AGCA et al. 2000), bei einer Lösung mit über 2400mOsm konnten keine Blastozysten mehr gewonnen werden. Insgesamt jedoch wirken die nicht-permeablen CPAs in der Einfrierlösung eher toxizitätsvermindernd. Auch innerhalb der Eizelle wären sie von Nutzen, da sie weniger toxisch als permeable CPAs sind (WRIGHT et al. 2004). Eine Methode zur Mikroinjektion von Trehalose in die Oozyte wurde bereits mit gutem Erfolg entwickelt (EROGLU et al. 2002). Die

weitere Embryonalentwicklung war dabei nicht gestört (EROGLU et al. 2003b), da der Stoff im Laufe der Zeit wieder eliminiert wurde (EROGLU et al. 2003a).

Die benötigte Konzentration der Kryoprotektiva im Einfriermedium hängt von der verwendeten Einfriermethode ab. Bei Verfahren mit langsamer Abkühlung der Zellen ist die Einwirkzeit der CPAs auf die Zellen verlängert, man benötigt daher relative geringe Konzentrationen von etwa 10% (1-2M) permeablen CPAs. Bei schnellen und ultraschnellen Einfrierverfahren strebt man über eine Erhöhung der Viskosität im Medium die Bildung eines glasartigen Zustandes an (Vitrifikation); daher muss die Konzentration der permeablen CPAs bei über 30% (4-8M) liegen (SHAW und JONES 2003; WRIGHT et al. 2004). Um den osmotischen Stress auf die Zelle zu vermindern, ist eine stufenweise Äquilibration ratsam (AGCA et al. 2000); dabei sind 1-4 Schritte üblich. Erst in der letzten Lösung wird der nicht-permeable Faktor hinzugegeben (LUVONI et al. 1997; PAPIS et al. 2000), wobei der Anteil meist 0,1-1M beträgt (SHAW und JONES 2003; WRIGHT et al. 2004). Einige Autoren machten auch sehr gute Erfahrungen mit 10-16 Äquilibrationsschritten (KUWAYAMA et al. 1994; AONO et al. 2003). Auch nach dem Auftauen ist eine abgestufte Rehydrierung vorteilhaft. Zunächst werden die permeablen CPAs mit Hilfe eines hypertonen Dilutionsmediums entfernt, das 0,5-1M nicht-permeable Kryoprotektiva beinhaltet (WRIGHT et al. 2004). Danach werden die Zellen in isotonischen Medien rehydriert (DATTENA et al. 2004; MURAKAMI et al. 2004; WANI et al. 2004; ISACHENKO et al. 2005).

Verschiedene Arbeitsgruppen testeten an Oozyten die toxischen Eigenschaften einzelner Kryoprotektiva. Dabei waren oft auch schon ohne Abkühlung der Zellen sehr deutliche negative Auswirkungen auf die Blastozystenrate feststellbar (RHO et al. 2002). Glycerol scheint als permeables Kryoprotektivum für Eizellen am wenigsten geeignet zu sein (WANI et al. 2004). Bei Oozyten von Mäusen, Menschen und Rindern haben sich EG, DMSO und Propylenglykol (PrOH) dagegen als relativ wenig toxisch und damit gut verwendbar herausgestellt (GOOK et al. 1993; PAPIS et al. 2000; FABBRI et al. 2001; MASSIP 2003; WANI et al. 2004). Bei einem Toxizitätstest an feline Ovargewebe konnte man ebenfalls die negativen Auswirkungen von Glycerol im Vergleich zu DMSO, EG und PrOH feststellen (JEWGENOW et al. 1998), für die Kryokonservierung wurde in dieser Studie PrOH benutzt. Auch für das Einfrieren von Katzenembryonen wurden bisher v.a. Propylenglykol (POPE et al. 1993; POPE et al. 1994; SWANSON et al. 1999) und Ethylenglykol verwendet, wobei letzteres besser geeignet war (SWANSON et al. 1999). Toxizitätstests und Einfrierversuche an feline Oozyten lieferten etwas unterschiedliche Ergebnisse; während bei einem Toxizitätstest die Verwendung von PrOH im Vergleich zu EG die besseren Ergebnisse lieferte (COMIZZOLI et

al. 2004), überlebten bei der Kryokonservierung im Gegensatz zur PrOH-Gruppe nur die mit EG oder DMSO eingefrorenen Eizellen (LUVONI et al. 1997). Die embryonale Weiterentwicklung war dabei in der EG-Gruppe am besten (LUVONI und PELLIZZARI 2000). Bei Toxizitätsversuchen mit nicht-permeablen Kryoprotektiva konnte eine starke Sensibilität von Katzenoozyten bei Inkubation in 0,5M Saccharose-Lösungen festgestellt werden (MURAKAMI et al. 2004), mit einer möglichst niedrigen Inkubationszeit hatte diese Arbeitsgruppe daher die besten Erfahrungen.

Das Ziel bei der Auswahl eines geeigneten Einfriermediums sollte die Reduktion der Konzentration der Kryoprotektiva durch Kombination von geringgradig toxischen CPAs sein (KULESHOVA et al. 1999). Ebenso ist es vorteilhaft, die Expositionszeit zu reduzieren (KULESHOVA et al. 1999), bzw. die CPA-Konzentration schrittweise zu erhöhen (AGCA et al. 2000), da sich die Zellen so nach dem Auftauen und der Ausverdünnung leichter erholen (SHAW und JONES 2003). Die benötigte Anzahl an Äquilibrierungsschritten ist dabei von der Permeabilität des Kryoprotektivums und der Permeabilität der verwendeten Zellen abhängig. So sind beispielsweise gereifte Eizellen durchlässiger als unreife (AGCA et al. 2000). Nur wenige Einfrier- und Auftauprotokolle erlauben eine sofortige Inkubation mit der hochkonzentrierten Einfrierlösung und ein sofortiges Auftauen in physiologischen Medien ohne negative Auswirkungen (SHAW und JONES 2003).

### **2.2.1.2 Inkubationstemperatur**

Die Inkubationstemperatur beeinflusst die Geschwindigkeit der CPA-Aufnahme in die Zelle. Je toxischer die Einfrierlösung ist, desto niedriger muss die Inkubationstemperatur gewählt werden (MASSIP 2001; KULESHOVA und LOPATA 2002). Dies ist jedoch sorgfältig gegen den durch die Abkühlung entstehenden Schaden abzuwägen (LEDDA et al. 2001). Bereits eine kurze Abkühlung auf Raumtemperatur bewirkt bei Oozyten von Mensch und Katze Veränderungen am Spindelapparat der Eizelle (PICKERING et al. 1990; PUKAZHENTHI et al. 1998a). So war in einer Studie auch die Inkubation von Katzeizellen mit der Einfrierlösung bei 0°C weniger gut zur Reduzierung der Toxizität geeignet, als die Inkubation bei Raumtemperatur (COMIZZOLI et al. 2004). Die meisten Forschungsgruppen arbeiten bei der Kryokonservierung daher bei Raumtemperatur (DHALI et al. 2000; LUVONI und PELLIZZARI 2000; CHEN et al. 2001; MATSUMOTO et al. 2001; 2002; CRICHTON et al. 2003; GOMEZ et al. 2003; DATTENA et al. 2004; NEDAMBALE et al. 2004), oder auf einer auf 34-40°C erhitzten

Wärmeplatte (HYTTEL et al. 2000; PAPIS et al. 2000; ISACHENKO et al. 2001a; PARK et al. 2001; MACLELLAN et al. 2002; MEN et al. 2002; VIEIRA et al. 2002; AONO et al. 2003; BEGIN et al. 2003; ISACHENKO et al. 2005).

### 2.2.1.3 Abkühl- und Auftaurate

Da man davon ausgeht, dass viele Einfrierschäden durch intrazelluläre Eisbildung entstehen, ist es für die Zellen vorteilhaft, den kritischen Temperaturbereich von +15°C bis -15°C schnell zu überwinden (MASSIP 2003); durch die Lagerung in LN<sub>2</sub> entstehen keine weiteren Schäden. Vor allem für die lipidreichen Oozyten und Embryonen von Rind und Schwein hat sich ein rascheres Abkühlen und Auftauen als vorteilhaft erwiesen (MARTINO et al. 1996a; MARTINO et al. 1996b). Dabei muss man jedoch darauf achten, dass man die Abkühlrate nicht auf Kosten anderer Stressfaktoren für die Zelle erhöht (KASAI et al. 1996), sie muss der Größe und der Permeabilität der Zelle angepasst sein (SHAW und JONES 2003). Auch ist sie abhängig von dem einzufrierenden Volumen, der Menge der eingefrorenen Zellen und des Containertypes (HOCHI et al. 2001; SHAW und JONES 2003). Entscheidend ist auch eine dem Abkühlprotokoll angemessene Auftaurate, da sonst beim Erwärmen die gleichen Schäden (Eisbildung, verlängerte Inkubation mit toxischen CPAs) entstehen können wie beim Einfrieren (HOCHI et al. 2001; WRIGHT et al. 2004). Mit einem für das Kryoverfahren und die verwendeten CPAs inadäquaten Auftauprotokoll kann man bis zu 100% der Zellen abtöten (SHAW und JONES 2003). Es gibt sogar Autoren, die eine schnelle Auftaurate für weit wichtiger halten als eine schnelle Abkühlrate (ISACHENKO et al. 2005). Dies widerspricht allerdings einer Studie, bei der keine Vorteile durch die Erhöhung der Auftaurate festgestellt werden konnten (HOCHI et al. 2001). Die besten Erfahrungen machte man mit einem Verhältnis von Abkühl- zu Auftaurate von 1: 1,3 (ISACHENKO et al. 1998; ISACHENKO et al. 1999).

Bei langsamen Einfrierverfahren sollte die Abkühlrate ein Gleichgewicht zwischen dem Wasserverlust aus der Zelle und dem Einbau von Wasser in die extrazellulär wachsenden Eiskristalle fördern (SHAW und JONES 2003). Langsames Abkühlen von 0,3°C/min auf -30°C hat sich dabei als verträglicher für die Zellen erwiesen als eine Rate von 0,6°C (HOCHI 2003). Üblicherweise benutzt man zum Einfrieren ein Alkoholbad mit einem programmierbaren Regulationselement. Aufgetaut werden die Straws meist wenige Sekunden bei



Raumtemperatur und dann in einem 20-30°C warmen Wasserbad (MURAKAMI et al. 2004; WANI et al. 2004), danach werden die Zellen in einem Dilutionsmedium rehydriert.

Bei schnellen Einfrierverfahren (Vitrifikation) soll hingegen die Abkühlungsrate so hoch sein, dass das Medium keine Eiskristalle bildet, sondern in einem glasartigen Zustand gefriert. Dabei gibt es keine optimale Abkühlungsrate, sie ist im Gegenteil vom Einfrierverfahren und der Spezies der eingefrorenen Zellen abhängig. So wirkten sich in einem Versuch Abkühlraten über 3.000°C/min negativ auf die Fertilisierungsrate von Rinderoozyten aus (HOCHI et al. 2001). In einer anderen Studie hatte man bei Schaf-Oozyten die besten Ergebnisse bei Einfrier- und Erwärmungsraten von 20.000 und 16.000°C/min (ISACHENKO et al. 2001a); bei der Kryokonservierung von humanen Zygoten schließlich konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen einer Abkühlung mit 200°C/min oder 20.000°C/min festgestellt werden (ISACHENKO et al. 2005). Bei der Vitrifikation erfolgt die Abkühlung direkt in Stickstoffdampf (200-400°C/min) oder in flüssigem Stickstoff (1.000-20.000°C/min). Noch höhere Abkühlraten erreicht man, wenn man Stickstoff-Slush (halb verfestigten Stickstoff) benutzt, der eine Temperatur von -210°C hat (SHAW und JONES 2003), bzw. indem man das Volumen der einzufrierenden Probe verringert. Zum Auftauen werden die Zellen direkt in entweder 22°C oder 37°C warmes Verdünnungsmedium übertragen.

### **2.2.1.4 Lipidgehalt der Eizellen**

Bei Eizellen mit hohem Lipidgehalt, wie sie bei Rind, Schwein und auch Katze vorkommen, sind Einfrierschäden wahrscheinlicher als bei anderen Spezies. Es wird vermutet, dass durch das Aushärten der Lipide beim Abkühlen das damit verbundene Zytoskelett ebenfalls steifer wird und deshalb leichter zu Schaden kommt (ISACHENKO et al. 2001b). So wurde in einem Experiment festgestellt, dass sich die Form der Lipidtropfen bei gekühlten Schweine-Oozyten verändert, was wahrscheinlich ein Indiz für eine spätere Beeinträchtigung der Embryonalentwicklung ist (ISACHENKO et al. 2001b). Umgehen könnte man dieses Problem durch Entfernung der Lipidtropfen vor dem Einfrieren (NAGASHIMA et al. 1996), was jedoch vermutlich die spätere Embryonalentwicklung beeinträchtigen würde, da die Lipide als Energiequelle und Baumaterial benötigt werden (ISACHENKO et al. 2001b). Eine andere Möglichkeit zur Verbesserung des Einfrierverhaltens ist das Zentrifugieren der Zellen (MASSIP 2003). Die Lipidtropfen werden dadurch auf einer Seite der Zelle konzentriert und behindern so nicht mehr andere Zellorganellen (OVERSTROM et al. 1990). Auch durch

Modifizierung des Kultursystems könnte man den Lipidgehalt der Zellen eventuell ändern (MASSIP 2001). Sicher ist, dass schnelle Abkühlraten bei Zellen mit hohem Lipidgehalt einen positiven Effekt auf ihr Überleben und die weitere Entwicklung haben (LEDDA et al. 2001).

Bei Katzen scheint dieses Problem jedoch wenig ausgeprägt zu sein, denn obwohl man bereits nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur Schäden am Spindelapparat feststellen konnte (PUKAZHENTHI et al. 1998a), war ein Abkühlen auf Kühlschranktemperaturen ohne negative Folgen für die weitere Entwicklung möglich (WOLFE und WILDT 1996).

### **2.2.1.5 Maturationsstadium**

Oozyten kann man prinzipiell als immature Zelle oder nach einer Reifungszeit von sechs, zwölf oder 24 Stunden einfrieren. Über die Frage, welches Reifungsstadium bei Eizellen besser für die Kryokonservierung geeignet ist, herrscht Uneinigkeit zwischen den Autoren. Eine immature Zelle ist an ihrem Germinalvesikel (GV) zu erkennen. Dabei sind die Chromosomen nicht im kälteempfindlichen Spindelapparat organisiert, sondern befinden sich dekondensiert im Zellkern; daher ist zu vermuten, dass sich die Einfrierschäden bei unreifen Eizellen im Vergleich zu 24 Stunden lang gereiften Zellen in Grenzen halten (LEDDA et al. 2001; AONO et al. 2003; MASSIP 2003). Auch schützen die Cumuluszellen die Oozyte vor zu schnellem Ein- und Ausfluss der CPAs (DHALI et al. 2000; FABBRI et al. 2001). Die Erfolge beim Einfrieren von GV-Zellen waren jedoch bei den verschiedenen Arbeitsgruppen sehr unterschiedlich (SCHROEDER et al. 1990; SUZUKI et al. 1996; EROGLU et al. 1998a; HYTTEL et al. 2000). Im Allgemeinen wurden eher schlechte Resultate erzielt. Mögliche Gründe sind zum Einen, dass unreife Oozyten weniger permeabel sind als gereifte, was sie anfälliger für osmotischen Stress macht (KULESHOVA et al. 1999; AGCA et al. 2000). Die dabei auftretenden Membranschäden sind irreversibel (ARAV et al. 1996). Zum Anderen benötigt die unreife Eizelle für die Maturation den Kontakt zu ihren Cumuluszellen. Normalerweise sind diese mit der Oozyte durch die Zona pellucida hindurch über lange Fortsätze verbunden (MASSIP 2003), auf Grund der Schrumpfung der Eizelle beim Einfrieren reißen diese Gap junctions jedoch ab (LE GAL und MASSIP 1999; HURTT et al. 2000; HYTTEL et al. 2000; LUVONI und PELLIZZARI 2000; CECCONI et al. 2004). Verhindern kann man dies nur durch Vermeidung von extremen osmotischen Schwankungen (AONO et al. 2003). Eine weitere Ursache könnte sein, dass das Zytoskelett bei der unreifen Eizelle verhältnismäßig starr und damit anfälliger für Einfrierschäden ist (ALLWORTH und ALBERTINI 1993). Und schließlich kann es bei

eingefrorenen GV-Zellen zu Problemen bei der Ausschleusung des ersten Polkörperchens kommen, die Gefahr von Triploidie nach der Fertilisation erhöht sich (LUNA et al. 2001).

Bei 24 Stunden lang gereiften Eizellen sind die Chromosomen in der Äquatorialplatte der Metaphase der zweiten Reifeteilung (MII) angeordnet. Bei der Kryokonservierung dieser Zellen liegt das Problem in der Sensibilität des Spindelapparates. Setzt man die Oozyten einer Einfrierlösung aus, so kommt es bei 40% der Zellen zur Depolymerisierung des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulins, bei kryokonservierten Zellen kletterte diese Zahl in einer Studie sogar auf 70% im Vergleich zu 10% in der Kontrollgruppe (RHO et al. 2002). Der Spindelapparat ist für die Fortführung der Meiose, die Ausschleusung des zweiten Polkörperchens, die Bewegung der Vorkerne sowie die Formung des ersten mitotischen Spindelapparates sehr wichtig (EROGLU et al. 1998b). Die auftretenden Veränderungen sind zwar nach einer Inkubation von 1-3 Stunden (abhängig von der verwendeten Abkühlrate) im Brutschrank reversibel (AIGNER et al. 1992; CHEN et al. 2001), ein negativer Nebeneffekt ist jedoch die dadurch fortschreitende Alterung der Zellen (GOOK et al. 1994). Auch ist die fehlerfreie Regeneration nicht gesichert, so dass man immer wieder Aneuploidie und Polyploidie in den aufgetauten und fertilisierten Oozyten beobachten kann (EROGLU et al. 1998b). Ein weiteres nicht zu unterschätzendes Problem ist, dass die DNA in der gereiften Oozyte nur noch haploid vorliegt. Entstandene Schäden können daher nicht mehr anhand einer Matrize repariert werden, was zur Apoptose der Zellen führt (MEN et al. 2003). Dennoch hatten viele Arbeitsgruppen Erfolg beim Einfrieren von maturierten Oozyten (FUKU et al. 1995a; PAPIS et al. 2000; CHEN et al. 2001; LUNA et al. 2001; ASADA et al. 2002; MACLELLAN et al. 2002; MAVRIDES und MORROLL 2002; MEN et al. 2002; INABA et al. 2004).

Eizellen, die 6-12 Stunden lang gereift wurden, befinden sich im Stadium des Germinal Vesicle Breakdowns (GVBD) oder in der Metaphase der ersten Reifeteilung (MI). Mit der Kryokonservierung von GVBD- und MI-Oozyten wurden z.T. sehr gute Resultate erzielt, da hier die Einfrierprobleme bei unreifen und gereiften Eizellen umgangen werden konnten (BARNES et al. 1997; HOCHI et al. 1997; HOCHI et al. 1998; HOCHI 2003). In anderen Studien konnte man jedoch keine Verbesserungen in der Überlebens- und Blastozystenrate feststellen (KUBOTA et al. 1998; LE GAL und MASSIP 1999; HURTT et al. 2000), sondern musste z.T. sogar schlechtere Ergebnisse hinnehmen (MEN et al. 2002).

Bei der Katze scheint der Spindelapparat noch weit sensibler zu sein als bei anderen Tierarten. Bereits bei Abkühlung auf 0°C im Rahmen eines Toxizitätstests sank die Maturationsrate auf weniger als die Hälfte (COMIZZOLI et al. 2004); daher kann man davon

ausgehen, dass bei Kryokonservierung von GV-Oozyten die weitere Embryonalentwicklung ernsthaft gestört wäre (COMIZZOLI et al. 2004). Auch in einer anderen Studie erzielte man bessere Ergebnisse mit dem Einfrieren von gereiften als unreifen Katzeneizellen, auch wenn die embryonale Entwicklung im Vergleich zur Kontrollgruppe in beiden Gruppen verschlechtert war (LUVONI und PELLIZZARI 2000).

### **2.2.1.6 Denudation**

Ob die Eizellen vor dem Einfrieren denudiert werden oder nicht, hängt von mehreren Faktoren ab. Unreife Eizellen sollten nicht denudiert werden, da sie den Cumuluskomplex für die folgende Maturation benötigen. Auch für die Fertilisation sind Cumuluszellen wichtig (ZHANG et al. 1995; BING et al. 2002; FATEHI et al. 2002; TANGHE et al. 2003), da sie die Kapazitation und Penetration der Spermien fördern (CHIAN et al. 1995). Bei kryokonservierten gereiften Mäuse-Oozyten ist ihr positiver Effekt auch für die weitere Embryonalentwicklung nachgewiesen (PARK et al. 2001). Man vermutet, dass die Cumuluszellen auch morphologische Einfrierschäden verhindern, da sie die Strukturen der Eizelle schützen (ASHWOOD-SMITH et al. 1988). Jedoch haben die Cumuluszellen den Effekt, dass sie die Penetration der permeablen CPAs und den Wasserstrom verlangsamen (DHALI et al. 2000; HYTTEL et al. 2000). Dies kann vorteilhaft sein, da es die Zelle vor zu extremen intrazellulären CPA-Konzentrationen schützt (MIYAKE et al. 1993). Der Nachteil ist, dass die Dehydratation zu stark behindert werden kann (GOOK et al. 1993). So hatte CHIAN et al. (2004) größere Erfolge bei der Kryokonservierung von denudierten Eizellen als von intakten COCs. Auch eine partielle Denudation kann die Penetration der CPAs verbessern (MASSIP 2003). Da jedoch ein gleichmäßiges Entfernen der Cumuluszellen schwierig zu bewerkstelligen ist, entsteht die Gefahr eines ungleichmäßigen CPA-Einstroms in die Zelle. So kann die Oozyte bereits partiell unter den toxischen Auswirkungen leiden, während in einem anderen Teil die benötigte CPA-Konzentration noch gar nicht erreicht ist (HYTTEL et al. 2000).

Deshalb wurden bei den verschiedenen Arbeitsgruppen alle Varianten von Eizellen eingefroren, von vollständig intakten COCs (LUNA et al. 2001; MATSUMOTO et al. 2001; MEN et al. 2002; AONO et al. 2003; BEGIN et al. 2003; WANI et al. 2004) über partiell denudierte Oozyten (HYTTEL et al. 2000; HOCHI et al. 2001; ASADA et al. 2002; MACLELLAN et al. 2002;

RHO et al. 2002) bis hin zu vollständig denudierten Eizellen (LUVONI und PELLIZZARI 2000; PAPIS et al. 2000; CHEN et al. 2001; ISACHENKO et al. 2001a; TAKAHASHI et al. 2004).

Abschließend bleibt zu sagen, dass der Erfolg der Kryokonservierung v.a. bei den schnellen Einfrierverfahren auch sehr stark von der Geschicklichkeit des Experimentators abhängt. Außerdem darf man die positiven Auswirkungen von optimierten Maturations-, Fertilisations- und Kulturmedien auf den Erfolg der Kryokonservierung nicht unterschätzen (LUVONI und PELLIZZARI 2000; MEN et al. 2002; NEDAMBALE et al. 2004). In jedem Fall sollte man sich bemühen, nur entwicklungsfähige Oozyten einzufrieren (MASSIP 2003), z.B. indem man bei maturierten Eizellen darauf achtet, dass das erste Polkörperchen ausgeschleust ist (LUVONI und PELLIZZARI 2000).

## 2.2.2 Einfriertechniken

### 2.2.2.1 Slow Freezing

Das Wesen dieser Methode wird sehr gut durch die in der Literatur häufig gebrauchten Synonyme *Two Step Freezing* und *Controlled Freezing* ausgedrückt. Während der relativ langen Inkubationszeit von 15-30min in der Einfrierlösung werden die Zellen in einen 0,25ml-Plastikstraw aufgezogen (POPE et al. 1993; LUVONI und PELLIZZARI 2000; CRICHTON et al. 2003). Dabei wird der Straw im ersten Drittel mit Dilutionsmedium (DM), im zweiten Drittel mit dem Einfriermedium und den Zellen und im letzten Drittel wieder mit DM befüllt. Die einzelnen Kompartimente werden dabei durch Luftbläschen voneinander getrennt (LEIBO 1984). Anschließend kühlt man die Zellen im ersten Schritt in einem Einfrierautomaten mit einer Rate von 0,3°C/min auf eine Temperatur von -30°C ab, und friert sie im zweiten Schritt schlagartig in flüssigem Stickstoff bei -196°C ein (HOCHI 2003). Als Variante kann man die Straws vor dem Transfer in LN<sub>2</sub> mit einer Rate von 10-30°C/min weiter auf -150°C abkühlen, wodurch Schäden an der Zona pellucida reduziert werden sollen (POPE et al. 1997; 2002; CECCONI et al. 2004). Bei ca. -6 bis -8°C werden die Straws geseedet (POPE et al. 1993; LUVONI und PELLIZZARI 2000; GOMEZ et al. 2003), die dafür optimale Temperatur ist vom gewählten Einfriermedium abhängig. Beim *Seeding* wird im Straw mittels einer gekühlten Pinzette ein Kristallisationspunkt gesetzt, von dem aus das Medium entlang des Straws gefriert. Durch die Eisbildung erhöht sich der Gehalt der CPAs in der noch flüssigen Phase,

wodurch die Zellen so stark dehydriert werden, dass sich intrazellulär nur noch winzige, unschädliche Eiskristalle bilden können (SHAW und JONES 2003; WRIGHT et al. 2004). Man geht davon aus, dass das extrazellulär gebildete Eis die Zelle nicht penetriert, weil sie vermutlich durch das an die Zellmembran gebundene Wasser geschützt ist (SHAW und JONES 2003).

Aufgetaut werden die Straws zunächst für wenige Sekunden in Luft, dann in einem 30-37°C warmen Wasserbad (POPE et al. 1993; LUVONI und PELLIZZARI 2000; CRICHTON et al. 2003). Durch Schwenken der Straws verdünnt man das Einfriermedium mit dem Dilutionsmedium und verhindert die Bildung von hypotonen Schmelzwasserinseln (SHAW und JONES 2003). Nach weiterer Rehydrierung in der Dilutionslösung werden die Zellen in Kulturmedium gewaschen und inkubiert.

Bei der Katze wurden mit dem kontrollierten Einfrierverfahren bisher mit gutem Erfolg zwei- bis vierzellige Embryonen kryokonserviert. Man konnte gleich große Blastozystenraten wie bei den Kontrollgruppen erreichen, nach dem Transfer der Blastozysten wurden auch Welpen geboren (POPE et al. 1993; POPE et al. 1994; GOMEZ et al. 2003). Bei Kryokonservierung von Wildkatzen-Embryonen erwies sich die langsame Einfriermethode jedoch als weniger geeignet (CRICHTON et al. 2003). Ebenso benutzte man die Two-step-Methode zur Kryokonservierung von ovariellem Gewebe; die Überlebensrate nach einer Woche war hier, wie auch in der Kontrollgruppe, bei etwa 16% (JEWGENOW et al. 1998). Für immature und maturierte Katzen-Oozyten wurde das langsame Einfrierverfahren bisher nur in zwei Studien getestet (LUVONI et al. 1997; LUVONI und PELLIZZARI 2000). Nach deren Erfahrung waren maturierte Oozyten besser geeignet als immature. Die Eizellen in der EG-Gruppe entwickelten sich im Gegensatz zu den mit DMSO eingefrorenen Zellen über das Achtzellstadium hinaus, Blastozysten konnten aber mit dieser Methode nicht gewonnen werden.

### **2.2.2.2 Vitrifikation**

Mit der Vitrifikation konnte man v.a. bei Spezies, die sehr sensibel auf Abkühlung reagieren, ebenso gute - wenn nicht sogar bessere - Ergebnisse erzielen wie mit der kontrollierten Einfriermethode (MASSIP 2003; SHAW und JONES 2003). Das Ziel dieser schnellen Einfrierverfahren ist, die Eisbildung auch extrazellulär zu verhindern (SHAW und JONES 2003). Es soll sich ein glasartiger (engl.: vitreous) Zustand bilden. Man spricht daher von

Vitrifikation. Um diesen Effekt zu erzielen, muss zum Einen die Konzentration der Kryoprotektiva in der Einfrierlösung sehr hoch sein, zum Anderen ist eine extrem schnelle Abkühlung nötig (MASSIP 2001). Da derart hohe CPA-Konzentrationen tödlich für die Zelle sind, wählt man die Inkubationszeit so kurz, dass zwar die Zelle vollständig dehydriert wird, aber kein vollständiger Ausgleich der CPA-Konzentrationen zwischen Medium und Zytoplasma stattfinden kann (Non Equilibrium-Verfahren). Meist werden die Zellen in mindestens zwei Schritten inkubiert. In der endgültigen Einfrierlösung bleiben sie abhängig vom Verfahren 20-60s, bevor sie direkt in LN<sub>2</sub> getaucht werden. Zur Ausverdünnung und Rehydrierung verwendet man eine Trägerlösung mit einem nicht-permeablen Kryoprotektivum, um osmotischen Stress zu vermeiden (SHAW und JONES 2003).

Um möglichst hohe Abkühlraten zu erzielen, muss man das einzufrierende Volumen möglichst klein halten (SHAW und JONES 2003). Zu diesem Zweck hat man verschiedene Einfrierverfahren entwickelt, die im Folgenden beschrieben werden sollen.

#### **2.2.2.2.1 French Straw**

Es ist nahe liegend, dass bei den ersten Vitrifikationsversuchen 0,25ml-Plastikstraws (French Straws) benutzt wurden, wie man sie auch schon von langsamen Einfrierverfahren her kannte. Üblicherweise werden sie genauso wie bei langsamen Einfrierverfahren zu zwei Dritteln mit Dilutionsmedium und zu einem Drittel mit dem Vitrifikationsmedium und den Zellen befüllt (DHALI et al. 2000; MURAKAMI et al. 2004). Direkt in LN<sub>2</sub> eingetaucht kann man damit eine Abkühlrate von 2.500°C/min erreichen (DATTENA et al. 2004). Ihre Eignung für die Vitrifikation ist jedoch umstritten. Ein Problem ist, dass der Straw beim schnellen Eintauchen in LN<sub>2</sub> leicht zerbricht; man kann dies jedoch verhindern, indem man zunächst nur die Hälfte des Straws (mit den Zellen) eintaucht und dann die andere Hälfte langsam in LN<sub>2</sub> gleiten lässt (MEN et al. 2003). Ein weiteres Problem ist, dass die Temperaturabnahme in dem verhältnismäßig dicken Straw am Rand am höchsten ist (SHAW und JONES 2003), so dass die Zellen je nach Lage im Straw unterschiedlich schnell abgekühlt werden. Andererseits scheinen Schäden an der DNA bei diesem Vitrifikationsverfahren weniger ausgeprägt zu sein als z.B. beim OPS-Verfahren (s.u.) (MEN et al. 2003). So gibt es Arbeitsgruppen, die gleich gute Ergebnisse bei der Vitrifikation im French Straw und im OPS hatten (CHEN et al. 2001; MEN et al. 2003; DATTENA et al. 2004). Bei anderen hingegen waren die Erfolge sehr gering (LE GAL und MASSIP 1999), was allerdings auch durch Unterschiede in der Zusammensetzung des Einfriermediums erklärt werden könnte.

In einer Arbeitsgruppe wurde eine Variante des French Straws getestet (AONO et al. 2003): der Straw wurde schräg abgeschnitten, so dass man auf seine innere Oberfläche einen kleinen Tropfen ( $<1\mu\text{l}$ ) setzen konnte. Mit einem Vitrifikationsmedium bestehend aus 15% Ethylenglykol (EG), 15% DMSO und 0,5M Saccharose konnte nach schrittweiser Äquilibration und Rehydrierung mit immaturren Mäuse-Oozyten eine Blastozystenrate von bis zu 23% erreicht werden; im Vergleich zur Kontrolle (51,5%) war diese aber dennoch erniedrigt.

Bei der Vitrifikation von Katzen-Oozyten wurden bisher nur Straws benutzt; die Erfolge waren dabei unterschiedlich. Während nach Kryokonservierung von immaturren Zellen keine Maturation mehr möglich war (LUVONI et al. 1997), konnten nach dem Einfrieren von maturierten Oozyten 2% Blastozysten gewonnen werden (MURAKAMI et al. 2004), was bisher bei Katzen mit keiner anderen Einfrieremethode erreicht wurde. Auch diese beiden Arbeiten unterscheiden sich v.a. in dem verwendeten Einfriermedium: Während LUVONI et al. (1997) ein Medium mit 3,0M (etwa 22%) Propylenglykol (PrOH) bzw. 3,0M DMSO (ca. 21%) mit 0,2M Saccharose verwendete, war die Konzentration der CPAs im Vitrifikationsmedium von MURAKAMI et al. (2004) mit 40% EG und 0,3M Saccharose fast doppelt so hoch.

#### **2.2.2.2.2 OPS und GL-Tip**

Der Open Pulled Straw (OPS) ist eine Variante des French Straws. Um den Durchmesser zu verringern, wird der Straw erhitzt, auseinander gezogen und dann in der Mitte geteilt. Durch kapillare Kräfte werden die Zellen in den OPS gesogen und anschließend in  $\text{LN}_2$  getaucht, die Abkühlrate beträgt dabei schätzungsweise  $20.000^\circ\text{C}/\text{min}$ . Da das Handling der Zellen einfach, die Materialkosten gering und die Erfolge sehr gut sind (VAJTA et al. 1998), ist es inzwischen eines der am häufigsten benutzten Vitrifikationsverfahren. Nach dem Originalprotokoll (VAJTA et al. 1998) werden die Zellen zunächst 30s in einem Medium mit 10% EG und 10% DMSO äquilibriert und dann in das Vitrifikationsmedium (20% EG, 20% DMSO und 0,5M Saccharose) übertragen. Zum Auftauen wird der OPS zunächst 4s in Luft gehalten, sodann schrittweise in einer 0,25M und 0,15M Saccharose-Lösung rehydriert und schließlich in einem Haltemedium (Trägermedium mit FCS) gewaschen. Bei Kryokonservierung von Rinderoozyten waren mit diesem Verfahren die erreichbaren Blastozystenraten mit 25% ebenso hoch wie in der Kontrollgruppe (VAJTA et al. 1998). Man konnte auch hohe Trächtigkeits- und Kalbungsraten erzielen (VAJTA 2000). Bei einem Versuch schnitt die OPS-Methode besser ab als der French Straw und die Solid Surface Vitrification (s.u.) (LE GAL und



MASSIP 1999). Auch für die Kryokonservierung von Tigerembryonen war sie besser geeignet als z.B. ein langsames Einfrierverfahren (CRICHTON et al. 2003). Eine andere Arbeitsgruppe konnte mit einem etwas veränderten Einfriermedium (3,2M EG (ungefähr 18%), 3,6M DMSO (ca. 25%) und 0,6M Saccharose) jedoch eine nicht ganz so hohe Blastozystenrate erzielen; sie verringerte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe auf mehr als die Hälfte (RHO et al. 2002).

Eine Variante des OPS ist der Closed Pulled Straw (CPS). Damit die Zellen nicht direkt in LN<sub>2</sub>-Kontakt kommen, wird der CPS ähnlich wie der 0,25ml-Straw zunächst mit Vitrifikationsmedium (VM), dann, durch Luft getrennt, mit den Zellen und schließlich nach einem Luftbläschen nochmals mit VM gefüllt (CHEN et al. 2001). Die Überlebensrate war hier noch höher als bei OPS (79% statt 63%), was der Autor auf den fehlenden direkten Kontakt der Zellen mit LN<sub>2</sub> zurückführte. Wurden die Zellen vor der Fertilisation drei Stunden lang im Brutschrank inkubiert, konnten auch mit dem CPS Blastozystenraten erreicht werden, die mit der Kontrollgruppe vergleichbar waren. Als Äquilibrationsmedium wurde hier eine 1,5M EG-Lösung (etwa 8,4%) verwendet, das Vitrifikationsmedium enthielt 5,5M (annähernd 31%) EG und 1,0M Saccharose.

Das Gel Loading Tip (GL-Tip) ist die kommerzielle Weiterentwicklung des Open Pulled Straws (HOCHI 2003); das Volumen der angesaugten Einfrierlösung variiert von 0,7-3 $\mu$ l (ASADA et al. 2002; HOCHI et al. 2004). Mit einem Äquilibrationsmedium mit 10% EG und 10% DMSO und einem Vitrifikationsmedium mit 20% EG, 20% DMSO und 0,6M Saccharose war es bei HOCHI et al. (2004) nicht möglich, aus kryokonservierten Kaninchen-Zygoten Blastozysten zu gewinnen. Auch bei ASADA et al. (2002) war der Erfolg nach Kryokonservierung von bovinen Rinderoozyten mit einer Blastozystenrate von 2-5% nicht sehr hoch. Als Einfriermedium benutzte diese Gruppe eine 40%ige EG-Lösung mit 0,6M Saccharose.

### **2.2.2.2.3 Cryoloop**

Der Cryoloop oder auch Nylonloop ist eine kleine Nylonschlinge mit einem Durchmesser von 0,5-1mm, die in das Einfriermedium getaucht wird. Es bildet sich ein Film aus Medium, auf den man die Oozyten legen kann, bevor der Cryoloop in LN<sub>2</sub> getaucht wird. Die Aufbewahrung in LN<sub>2</sub> erfolgt meist in einem Röhrchen. Die Gefahr, die eingefrorenen Zellen in dem Röhrchen zu verlieren, indem man mit dem Cryoloop an die Wand stößt (BEGIN et al. 2003), ist zwar vorhanden, aber gering (HOCHI et al. 2004). Die Erfolge waren bei diesem Verfahren bei vielen Arbeitsgruppen sehr gut. So konnten nach Übertragung von

kryokonservierten Pferde-Oozyten zwei Fohlen geboren werden (MACLELLAN et al. 2002), und bei Rinderoozyten war in einer Studie die Teilungsrate nach ICSI ebenso hoch wie bei der Kontrollgruppe (MAVRIDES und MORROLL 2002). Auch für die Vitrifikation von Schweine-Oozyten war der Cryoloop geeignet, es ergaben sich keine Unterschiede zum OPS-System (AHN et al. 2004). Bei Ziegen-Oozyten (BEGIN et al. 2003) und Kaninchen-Zygoten (HOCHI et al. 2004) war die Verwendung des Cryoloops allerdings nicht erfolgreich.

#### **2.2.2.2.4 Electron Microscope Grid**

Ein anderes Trägersystem ist das Electron Microscope Grid (EMG), ein dünnes Gold- oder Kupfernetz, auf dem die Zellen gelagert werden. Die damit erreichbaren Abkühlraten in LN<sub>2</sub> betragen 11-14.000°C/min, in Stickstoff-Slush bis 24.000°C/min (VAJTA 2000). Die Vitrifikationsergebnisse scheinen mit denen beim OPS-Verfahren vergleichbar zu sein (CHEN et al. 2001; RHO et al. 2002). Auch für die Kryokonservierung von Mäuse-Oozyten scheint es bei Verwendung des Zytoskelettstabilisators Taxol<sup>TM</sup> gut geeignet zu sein (PARK et al. 2001). Beim Einfrieren von Schweine-Oozyten schnitt das EMG-Verfahren jedoch im Vergleich zum OPS und Cryoloop-System schlechter ab (AHN et al. 2004). Für Rinderoozyten eignet sich ein Äquilibrationsmedium mit 1,6M EG (ungefähr 9%) und 1,18M DMSO (ca. 8,4%) und eine Vitrifikationslösung mit 3,2M EG (etwa 18%) und 2,36M DMSO (annähernd 17%) (RHO et al. 2002). Als vergrößerte Variante des EMG wurde ein Nylon-Netz entwickelt (MATSUMOTO et al. 2001), mit dem bis zu 65 Zellen auf einmal eingefroren werden können. In dieser Studie konnten nach dem Kryokonservieren von immaturren Rinder-Oozyten jedoch weder mit dem Nylon-Netz, noch mit dem EMG Blastozysten gewonnen werden.

#### **2.2.2.2.5 Cryotop**

Das Cryotop ist eine dünne Plastikfolie, auf der die Zellen platziert werden. Die Abkühlrate beträgt 23.000°C/min. Man kann damit sehr gute Erfolge erzielen; der Nachteil dabei ist jedoch, dass die Kosten für das Cryotop hoch sind (HOCHI et al. 2004). Als Äquilibrationsmedium eignet sich eine Lösung mit 7,5% EG und 7,5% DMSO, als Vitrifikationsmedium wird eine 15%ige Lösung beider permeabler CPAs mit einem Zusatz von 0,5M Saccharose benutzt, in der die Zellen eine Minute lang bleiben. Mit weniger als 1µl Medium werden die Zellen auf das Cryotop transferiert und vitrifiziert. Zur Rehydrierung verwendet man ein Haltemedium mit einem Zusatz von 0,5M Saccharose (HOCHI et al. 2004). Bei Kaninchen-Zygoten konnte man mit dieser Methode eine Blastozystenrate von 57%

erhalten, das Cryotop war damit dem GL-Tip und dem Cryoloop (Blastozystenraten von 0%) deutlich überlegen (HOCHI et al. 2004). Auch bei Vitrifikation von Rinderoozyten konnten Blastozystenraten von 7,4% erreicht werden (CHIAN et al. 2004).

#### **2.2.2.2.6 Vitrifikation in Tröpfchen**

Will man Materialaufwand und Kosten bei der Vitrifikation minimieren, bietet es sich an, die Eizellen direkt in LN<sub>2</sub> zu tropfen. Die Oozyten werden zunächst für 12-15 min in einer 3%igen EG-Lösung äquilibriert und dann für maximal 45s in ein Vitrifikationsmedium, das 5,5M (ca. 30%) EG und 1,0M Saccharose enthält, transferiert. Mit Hilfe von Pasteurpipetten tropft man die Zellen direkt in LN<sub>2</sub> und sammelt sie dann mit gekühlten Pinzetten in einem Röhrchen. Zum Auftauen werden die Tropfen in das Haltemedium überführt (PAPIS et al. 2000). Mit diesem System entwickelten sich in einem Versuch ebenso viele Blastozysten wie in der Kontrollgruppe, nach deren Transfer wurde ein Kalb geboren (PAPIS et al. 2000). Die Problematik ist jedoch, dass das Volumen der Tröpfchen mit 5-6µl relativ groß ist, so dass sie auf der Oberfläche des LN<sub>2</sub> schwimmen können, bevor sie untertauchen. Relativ geringe Abkühlraten sind die Folge. Die Nutzung eines Carriers für den Transfer in LN<sub>2</sub> sollte daher bevorzugt werden (VAJTA 2000).

#### **2.2.2.2.7 Solid Surface Vitrification**

Bei der Solid Surface Vitrification (SSV) werden die Zellen auf eine mit LN<sub>2</sub> auf -150 bis -196°C gekühlte Metallplatte getropft und danach in Röhrchen gesammelt; sie ist also eine Variante der oben genannten Vitrifikationsmethode. Auch hier hält sich der Materialaufwand sehr in Grenzen (BEGIN et al. 2003). In einer Arbeitsgruppe wurde für die SSV ein Äquilibriationsmedium mit 4% EG und ein Vitrifikationsmedium mit 35% EG, 5% PVP und 0,4M Trehalose benutzt (DINNYES et al. 2000). Während bei Rinderoozyten eine zwar im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigte Blastozystenrate von immerhin 15% erreicht werden konnte, sank diese bei Verwendung des identischen Einfrierprotokolls für Ziegen-Oozyten auf 0% (BEGIN et al. 2003). Auch mit einem etwas anderen Einfriermedium (25% Glycerin und 25% EG, kein Zusatz von nicht-permeablen CPAs) konnten sich keine Blastozysten bei dieser Methode entwickeln (LE GAL und MASSIP 1999). Das Hauptproblem liegt darin, dass die Größe des Tropfens schwer zu kontrollieren ist und somit die Abkühlrate variiert (BEGIN et al. 2003). Auch ist die Gefahr, die auf der Metallplatte umherspringenden Zellen zu verlieren, relativ groß.

Zusammenfassend kann man sagen, dass viele Vitrifikationstechniken sehr sensibel auf Veränderungen reagieren. Eine beliebige Kombination unterschiedlicher Inkubationszeiten, Medien und Techniken ist nicht möglich, wenn man ein eisfreies Einfrieren und v.a. Auftauen gewährleisten will (SHAW und JONES 2003). Ein weiteres Problem ist, dass die toxischen und osmotischen Auswirkungen auf die Zelle im Vergleich zur langsamen Einfriermethode sehr ausgeprägt sind (HYTTEL et al. 2000; WRIGHT et al. 2004), wodurch sich die Wahrscheinlichkeit einer Zellschädigung stark erhöht. Obwohl die morphologisch feststellbare Überlebensrate im Vergleich zu der von langsam eingefrorenen Zellen im Allgemeinen sehr hoch ist (DHALI et al. 2000; MAVRIDES und MORROLL 2002; BEGIN et al. 2003), kann man elektronenmikroskopisch starke Schäden an Mitochondrien, Mikrotubuli (RHO et al. 2002) und kortikalen Granula erkennen (HYTTEL et al. 2000). Deren Folgen werden frühestens bei der ersten embryonalen Teilung sichtbar (LE GAL und MASSIP 1999). Ein anderer negativer Punkt ist die Gefahr einer Querkontamination. Da die Zellen direkt mit dem LN<sub>2</sub> in Berührung kommen, können pathogene Mikroorganismen in den Stickstoff gelangen und spätere Einfrierproben ebenfalls infizieren (SHAW und JONES 2003; DATTENA et al. 2004; HOCHI et al. 2004). Dass dieses Risiko nicht nur theoretisch besteht, wurde nachgewiesen (FOUNTAIN et al. 1997; BIELANSKI et al. 2000). Vermeiden lässt sich dieses Problem dadurch, dass man die eingefrorenen Proben versiegelt oder in versiegelte Behälter überführt (VAJTA 2000; HOCHI et al. 2004). Eine andere, jedoch nicht absolut sichere und sehr aufwendige Möglichkeit ist, den Stickstoff zu filtern oder mit UV-Strahlung zu behandeln (BIELANSKI et al. 2000). Aus diesen Gründen sollte man die Vitrifikation v.a. als Alternative für die Fälle, in denen konventionelle Einfrierverfahren versagen, verstehen (VAJTA 2000).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Standardprotokoll zur IVP von Katzenembryonen

#### 3.1.1 Tiermaterial

Für die Versuche wurden Eierstöcke und Hoden von Katzen verwendet, die bei lokalen TierärztInnen kastriert wurden. Das Material wurde bei Raumtemperatur in einer Pufferlösung (Aufbewahrungslösung siehe Anhang S. 72) in sterilen 50ml-Röhrchen (Fa. VWR, Darmstadt) aufbewahrt und innerhalb von vier Stunden zum Labor transportiert. Die TierärztInnen lieferten Informationen bezüglich Alter und Trächtigkeits- bzw. Rolligkeitsstatus der Kätzin. Im Labor wurden die Ovarien innerhalb von 0,5-4 Stunden verarbeitet. Die Hoden wurden, sofern sie nicht am gleichen Tag verwertet werden konnten, bis zu 24 Stunden bei 4°C in ihrer Pufferlösung gelagert (HAY und GOODROWE 1993).



Abb. 1: Ovarien in Pufferlösung

#### 3.1.2 Gewinnung und Reifung der Eizellen

Nach FREISTEDT et al. (2001a) erfolgte die Einteilung des Funktionszustands der Ovarien in

Folikulär:	Follikelgröße auf mindestens einem Ovar über 2mm,
Frisch ovuliert:	Corpus hämorrhagicum auf mindestens einem Ovar,
Luteal:	Corpus luteum auf mindestens einem Ovar,
Intermediär:	Follikelgröße 1 bis 2mm und
Inaktiv:	keine Funktionsgebilde erkennbar.

Ovarien mit Zysten wurden nicht verwendet.

Die Cumulus Oozyten Komplexe (COCs) wurden durch *Slicing* gewonnen. Darunter versteht man das oberflächliche Einschneiden der Eierstöcke mit einem Skalpell. Die COCs wurden mit Slicingmedium (siehe Anhang S. 72) in eine von Hand graduierte, mittelgroße sterile Petrischale (Ø 60mm, Fa. VWR, Darmstadt) gespült. Alle folgenden Arbeitsschritte bis zur Kultivierung der Zellen wurden bei 10-40facher Vergrößerung unter einer Stereolupe mit

einem auf 33°C beheizten Objektisch (Fa. Wild, Heerbrugg) durchgeführt. Das Pipettieren der Zellen erfolgte mit einem Pipettierhelfer mit sterilisierten 20µl-Glaskapillaren (Fa. Brand, Wertheim), die zwischen den einzelnen Schritten gewechselt wurden. Die COCs wurden vom Slicingmedium in eine sterile kleine Petrischale (Ø 40mm, Fa. VWR, Darmstadt) mit Reifungsmedium (siehe Anhang S. 72) übertragen. Danach folgte ein dreimaliges Waschen der COCs in frischem Reifungsmedium, dabei wurden sie nach WOOD und WILDT (1997) klassifiziert:

- Klasse I: gleichmäßig granuliertes, dunkles Zytoplasma, über fünf Cumuluszelllagen
- Klasse II: gleichmäßig granuliertes, dunkles Zytoplasma, weniger als fünf Cumuluszelllagen
- Klasse III: aufgehelltes mosaikartiges Zytoplasma, nur z.T mit Cumuluszellen umgeben
- Klasse IV: aufgehelltes mosaikartiges Zytoplasma, vollständiger Verlust der Cumuluszellen

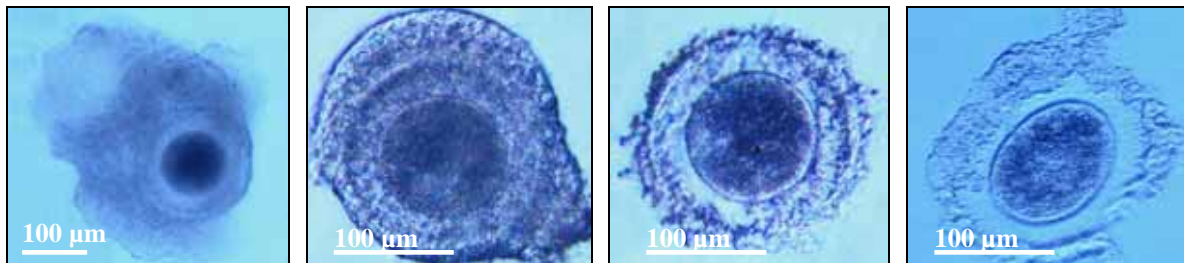


Abb. 2: Klasse I COC

Abb. 3: Klasse II

Abb. 4: Klasse III

Abb. 5: Klasse IV

Für die Versuche wurden nur COCs der Klassen I und II verwendet. Sie wurden ein letztes Mal in einem mit FSH und LH (siehe Anhang S. 75) angereicherten Reifungsmedium in einer sterilen 4-Well-Schale (Nunc-Multischale, Fa. VWR, Darmstadt) gewaschen und in die Versuchsgruppen aufgeteilt. Durch das Poolen der COCs von mehreren Katzen konnte die Gruppengröße konstant bei 10-15 Eizellen pro Well gehalten werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass von jeder Katze in jede Versuchsgruppe gleich viele COCs kamen, um das Versuchsergebnis nicht durch individuelle Einflüsse zu verfälschen.

Von Beginn des Slicings bis zum Einsetzen in den Brutschrank vergingen durchschnittlich 15-30min, die 24-stündige Maturation erfolgte bei 38,5°C unter 5% CO<sub>2</sub> in Luft bei 100% Luftfeuchtigkeit.

### 3.1.3 Spermengewinnung und Kryokonservierung der Spermien

Für die Fertilisierung fand sowohl Frischsperma, soweit verfügbar (FREISTEDT et al. 2001a), als auch kryokonserviertes Sperma Anwendung. Für die Gewinnung wurden Nebenhoden und Ductus deferens von beiden Hoden getrennt und zusammen in einer sterilen mittelgroßen Petrischale mit 500µl TL-Stammlösung (siehe Anhang S. 73) mit einem Skalpell zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebestücke mit weiteren 500µl TL-Stammlösung gespült und entfernt. Es wurde darauf geachtet, dass die Spülflüssigkeit die gleiche Temperatur wie die Hoden hatte, also entweder 22°C oder 4°C je nach dem, ob die Hoden am Tag der Kastration oder nach Aufbewahrung im Kühlschrank verarbeitet wurden. Auf einem erwärmten Objektträger und Deckgläschen wurden 10µl der Spermien suspension bei 400facher Vergrößerung unter Phasenkontrast (Inverses Mikroskop Axiovert, Fa. Zeiss, Jena) bezüglich ihrer Motilität und Dichte beurteilt. Bei einer Motilität von > 70% wurde die Spermien suspension mit einem Samenverdünner (Gent-Verdünner für Hengstsamen, Fa. Minitüb, Tiefenbach) im Verhältnis 1:1 aufgeschwemmt. Andernfalls wurde der Samen verworfen.

Die Spermien suspension wurde entweder bis zu fünf Tage lang in Eppendorf-Cups (Fa. VWR, Darmstadt) bei 4°C als Frischsperma aufbewahrt, oder eingefroren. Die Kryokonservierung erfolgte nach einer modifizierten Methode von HAY und GOODROWE (1993). Die Suspension wurde in desinfizierte 0,25ml-Straws (Fa. Minitüb, Tiefenbach) aufgezogen, mit einem Stick verschlossen und eine Stunde im Kühlschrank bei 4°C abgekühlt. Danach wurden sie für 20 min in LN<sub>2</sub>-Dampf bei etwa -130°C inkubiert und dann in LN<sub>2</sub> transferiert. Aufgetaut wurden die Straws 10s in einem 37°C warmen Wasserbad, anschließend wurden sie einem Swim up unterzogen.

### 3.1.4 Swim up und Konzentrationsbestimmung des Samens

Für den Swim up wurde je 1ml äquilibriertes Swim up-Medium (siehe Anhang S. 74) in zwei sterile 5ml-Röhrchen (Fa. VWR, Darmstadt) mit einem Rotrandfilter (Porengröße 0,2µm, Fa. VWR, Darmstadt) sterilfiltriert. Durch Lagerung der Röhrchen im 45°-Winkel ergab sich eine Vergrößerung der Oberfläche. Jeweils 125µl Spermien suspension wurde vorsichtig unter das Swim up-Medium geschichtet, ohne die Suspension mit dem Medium zu vermischen. Bei

Verwendung von kryokonserviertem Sperma wurde hierzu der aufgetaute Straw desinfiziert und sein Inhalt mit einem Pipettierhelfer jeweils zur Hälfte in ein Swim up-Röhrchen gegeben; bei Verwendung von Frischsperma wurde die Suspension durch kurzes Vortexen durchmischt und mit einer Eppendorfpipette transferiert. Nach einer einstündigen Inkubation im Brutschrank bei 38,5°C und 5% CO<sub>2</sub> in Luft wurde der klare Überstand mit den nach oben geschwommenen Spermien vorsichtig mit einer Eppendorfpipette abgenommen und in ein im Brutschrank erwärmtes, steriles 15ml-Spitzröhrchen (Fa. VWR, Darmstadt) übertragen. Nach einem 10-minütigen Zentrifugieren mit 430g bei Raumtemperatur wurde der Überstand bis auf 400µl verworfen. Zum Auswaschen des Swim up-Mediums wurde 400µl äquilibriertes und sterilfiltriertes Befruchtungsmedium (siehe Anhang S. 74) hinzugegeben, die Suspension wurde nochmals 10min mit 430g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 200µl verworfen, der verbliebene Rest gut durchmischt. Zur Bestimmung der Spermienkonzentration wurde 10µl Spermiesuspension mit 90µl Aqua dest. verdünnt und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. War die Konzentration unter  $2 \times 10^3$  Spermien /µl, wurden die Samenproben dieses Katers nicht verwendet.

### 3.1.5 IVF

Für die Fertilisierung wurden die gereiften Eizellen im Befruchtungsmedium (siehe Anhang S. 74) gewaschen und dann in ein IVF-Well mit Befruchtungsmedium übertragen. Der Waschschrift erfolgte dabei für jede Versuchsgruppe in einem eigenen Well, um Querkontamination zu vermeiden. Anschließend wurden die Oozyten mit  $2 \times 10^5$  Spermatozoen /ml fertilisiert, wozu je nach Konzentration der gewaschenen Spermiesuspension 25-50µl in die IVF-Wells pipettiert wurde. Nach einer letzten Kontrolle der Spermienkonzentration in den IVF-Wells bei maximaler Vergrößerung im Dunkelfeld der Stereolupe (Fa. Wild, Heerbrugg) wurden die Zellen 22 Stunden im Brutschrank inkubiert. Um den Anteil an parthenogenetisch aktivierten Oozyten zu bestimmen (Parthenogenese-Kontrolle), wurde ein Teil der Oozyten in IVF-Medium übertragen, aber nicht befruchtet.

### 3.1.6 IVC und Beurteilung der Embryonalentwicklung

Die befruchteten Eizellen wurden durch Auf- und Abpipettieren mit einer Eppendorfpipette denudiert und zweimal in Kulturmedium (siehe Anhang S. 75) in einer 4-Well-Schale



gewaschen. Kultiviert wurden die Zygoten in 400µl Medium bei 38,5°C, die Gaszusammensetzung betrug 5%CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> und 90% N<sub>2</sub> bei 100% Luftfeuchte. Am dritten Tag nach der Befruchtung wurde bei den Versuchsgruppen und der Parthenogenese-Kontrolle die Teilungsrate, am siebten und achten Tag die Blastozystenrate beurteilt. Bei diesen Gelegenheiten wurden die Embryonen gefüttert, indem zunächst aus den Wells 100µl Medium verworfen und dann 200µl frisches Kulturmedium hinzugegeben wurde. Als geteilt wurden Embryonen beurteilt, die sich im Zwei- oder Mehrzellstadium befanden; in die Blastozystenrate wurden beginnende Blastozysten, Blastozysten, expandierte und schlüpfende sowie geschlüpfte Blastozysten eingerechnet. Meist waren am Tag 7 expandierte oder schlüpfende Blastozysten vorzufinden.

## 3.2 Experimente

Die Experimente wurden von Mai bis September 2004 und von Januar bis März 2005 durchgeführt.

### 3.2.1 Einfluss verschiedener Hormonzusätze auf die Reifung und weitere Embryonalentwicklung

Da die Reifung bei Katzeizellen ein limitierender Faktor für die Embryonengewinnung ist, wurde versucht, das Maturationsmedium durch Veränderung der Hormonzusätze zu optimieren. Dabei wurde zum Einen die FSH-Konzentration verzehnfacht und zum Anderen 17β-Östradiol in das Medium hinzugegeben. Vor der Reifung erfolgte die Einteilung der Zellen in folgende Gruppen:

- Gruppe 1: Reifungsmedium mit 1µg/ml 17β-Östradiol und 1,3 IU/ml bFSH (Ö+/1,3)
- Gruppe 2: Reifungsmedium mit 1µg/ml 17β-Östradiol und 13,0 IU/ml bFSH (Ö+/13,0)
- Gruppe 3: Reifungsmedium mit 1,3 IU/ml bFSH ohne Östradiol-Zusatz (Ö-/1,3)
- Gruppe 4: Reifungsmedium mit 13,0 IU/ml bFSH ohne Östradiol-Zusatz (Ö-/13,0)

Um die hohe FSH-Konzentration in den Gruppen 2 und 4 zu erreichen, ohne dass sich das Volumen der zugegebenen FSH-Menge verzehnfacht, wurde eine höher konzentrierte FSH-

Stammlösung verwendet. Hierzu wurde bovines FSH (650 IU; Sioux Biochemical Inc., USA, Ch.B. 3619) mit 5 ml sterilfiltriertem Reifungsmedium aufgelöst und in Eppendorf-Cups á 80µl eingefroren. Die Konzentration der Stammlösung war 130 IU/ml. Beim Befüllen der Wells wurde für die Gruppen 2 und 4 je 40µl dieser hochkonzentrierten FSH-Lösung in 360µl Reifungsmedium gegeben, die Endkonzentration war somit 13,0 IU/ml. In den Gruppen 1 und 3 wurde in die 400µl Reifungsmedium standardgemäß 8µl FSH-Stammlösung (siehe Anhang S. 76) pipettiert. Die Gruppen 1 und 2 wurden zusätzlich mit 10µl Östradiol-Stammlösung (siehe Anhang S. 76) supplementiert. Außerdem enthielt das Reifungsmedium bei allen Gruppen 1µl LH-Stammlösung (siehe Anhang S. 75). Die Maturation, Fertilisierung, Kultivierung sowie die Beurteilung der Teilungs- und Blastozystenrate erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll.

### **3.2.2 Einfluss verschiedener Proteinzusätze auf die Reifung von Oozyten**

Im nächsten Versuch wurde die Auswirkung verschiedener Proteinquellen im Reifungsmedium auf die Maturationsrate untersucht. Hierzu wurden die Zellen vor der Reifung in zwei Gruppen geteilt. Eine Gruppe wurde mit dem Standard-Reifungsmedium (siehe Anhang S. 72) maturiert, bei der anderen Gruppe wurde das BSA durch 10% FCS ersetzt. Die Hormonzugaben entsprachen dem Standardprotokoll (siehe Anhang S. 72). Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit Aceto-Orcein gefärbt (KARJA et al. 2002a).

Dabei wurde ein gereinigter Objektträger an vier Ecken eingeritzt. Darauf wurden zur späteren Fixierung des Deckgläschens Silikonfüßchen (Baysilone Paste, Fa. Bayer, Leverkusen) gesetzt. Die gereiften Eizellen wurden mit einer Eppendorfpipette vollständig denudiert und einmal gewaschen. Bis zu 20 Zellen wurden mit möglichst wenig Medium mittels einer feinumigen Glaskapillare (über dem Bunsenbrenner erhitzte und ausgezogene Pasteurpipette) auf dem Objektträger zwischen die Silikonfüßchen platziert. Anschließend wurde das Deckgläschen auf die Silikonfüßchen gelegt und unter Lupenkontrolle (50fache Vergrößerung) vorsichtig festgedrückt. Sobald die Eizellen zwischen Deckglas und Objektträger fixiert waren (d.h. es war kein perivitelliner Spalt mehr sichtbar), wurde ein Tropfen Fixationslösung (siehe Anhang S. 78) an den Rand des Deckgläschens gesetzt, so dass es auf Grund von Kapillarkräften unter das Deckgläschen floss. Wenn dabei festgestellt

wurde, dass die Zellen mit der Fixationslösung mitgetragen wurden, wurde das Deckglas nochmals vorsichtig festgedrückt. Zur vollständigen Auflösung der Lipidtröpfchen in den Oozyten wurde der Objektträger mindestens zwölf Stunden lang unter Luftabschluss in Fixationslösung eingelegt.

Nach der Fixation wurde der Objektträger vorsichtig mit Zellstoff trockengetupft. Anschließend wurde ein Tropfen der Aceto Orcein-Lösung (siehe Anhang S. 79) am Rand des Deckgläschens abgesetzt und unter Lupenkontrolle mit Filterpapier unter das Deckgläschen gesaugt. Wenn die Zellen mit der Färbelösung mitschwammen, wurden sie mit Hilfe des Filterpapiers wieder „zurückgesaugt“. Nach einer 5-minütigen Inkubation mit dem Farbstoff wurde der Objektträger auf die gleiche Art so lange entfärbt (Entfärbelösung siehe Anhang S. 79), bis die Aceto Orcein-Lösung vollständig entfernt war. Schließlich wurde das Deckglas mit Nagellack versiegelt und so vor Austrocknung geschützt. Die Auswertung erfolgte bei 400facher Vergrößerung unter Phasenkontrast (Mikroskop Olympus, Fa. Minitüb, Tiefenbach). Es wurden die Kernreifungsstadien GVBD und MII unterschieden, degenerierte und geplatze Zellen wurden als nicht auswertbar eingestuft.

### 3.2.3 Einfluss von Cumuluszellen auf die In vitro Fertilisation

Da bekannt ist, dass die Zellverbindungen zwischen Cumulus- und Eizelle bei der Vitrifikation leiden, wurde in diesem Versuch getestet, inwieweit der Cumulus oophorus für die Fertilisation bei Katzen nötig ist. Die Reifung der in drei Gruppen aufgeteilten Zellen erfolgte gemäß dem Standardprotokoll. Vor der Fertilisation wurden die Zellen wie folgt behandelt:

- Gruppe 1: Fertilisation der vollständigen COCs (*intakt*)
- Gruppe 2: Vor der Fertilisation Reduktion der Cumuluszellen auf 3-5 Lagen durch 10s Vortexen (*partiell denudiert*)
- Gruppe 3: Vor der Fertilisation vollständige Entfernung der Cumuluszellen durch 2 min Vortexen (*komplett denudiert*)

Danach folgte die Fertilisation, Kultivierung und Beurteilung der Teilungs- und Blastozystenrate gemäß dem Standardprotokoll.

### 3.2.4 In vitro Maturation mit denudierten Oozyten in einer Cumulus-Cokultur

In vierten Versuch wurde getestet, inwieweit eine intakte interzelluläre Verbindung zwischen Ei- und Cumuluszellen für die Maturation bei Katzen nötig ist. Hierzu wurden die Oozyten in folgende Gruppen aufgeteilt:

- Gruppe 1: Maturation der vollständigen COCs (*intakt*)
- Gruppe 2: Vor der Reifung Reduktion der Cumuluszellen auf 3-5 Lagen mit Hilfe von feinumigen Glaskapillaren (*partiell denudiert*)
- Gruppe 3: Vor der Reifung vollständige Entfernung der Cumuluszellen mit Hilfe von feinumigen Glaskapillaren; Zusatz der Cumuluszellen zum IVM-Medium als Cokultur (*Cumulus-Cokultur*)

Danach folgte die In vitro Reifung gemäß dem Standardprotokoll. Im ersten Schritt wurde die Maturationsrate durch Färbung der Eizellen mit Aceto Orcein bestimmt. Im zweiten Schritt wurden die Eizellen nach der Maturation in den drei beschriebenen Gruppen vollständig denudiert, danach wie üblich fertilisiert und kultiviert. Als Parameter wurden die Teilungs- und Blastozystenrate beurteilt.

### 3.2.5 Vitrifikation und Toxizitätstest

Zuletzt sollte versucht werden, Katzeizellen zu vitrifizieren und daraus Blastozysten zu gewinnen. Hierzu wurde ein modifiziertes Vitrifikationsprotokoll von HOCHI et al. (2004) verwendet. Die COCs wurden in *Kontrollgruppe*, *Toxizitätskontrolle* und *Vitrifikationsgruppe* eingeteilt und zunächst nach dem Standardprotokoll gereift. Nach 22,5 Std. wurden alle Oozyten durch Auf- und Abpipettieren mit der Eppendorfpipette denudiert. Während die Zellen der Kontrollgruppe im IVM-Medium im Brutschrank blieben, wurden die COCs der Toxizitätskontrolle und der Vitrifikationsgruppe jeweils in eine kleine Petrischale mit einem auf 37°C erwärmten Waschmedium (siehe Anhang S. 78) übertragen. Das weitere Handling der Oozyten erfolgte bei Raumtemperatur (ca. 22°C) unter der Stereolupe, dessen Objektisch nicht beheizt war. Auch die Medien hatten mit Ausnahme des Mediums für die letzten beiden Waschschriffe Raumtemperatur. Um möglichst wenig Medium von einer Petrischale in die nächste zu übertragen, wurden für alle Schritte sterilisierte, feinumige Glaskapillaren

verwendet, deren Innendurchmesser der Größe der denudierten Oozyten entsprach. Die Medien wurden jeweils für zwei Durchgänge á 5 Zellen verwendet und danach verworfen.

Bei der Vitrifikation wurden je fünf Oozyten für 3 min in einer kleinen Petrischale mit Äquilibriumslösung (siehe Anhang S. 77) inkubiert. Das Waschen erfolgte durch dreimaliges Absetzen der Zellen an der Oberfläche und Absinkenlassen in frisches Medium. Mit einer neuen Glaskapillare wurden sie anschließend auf den Boden einer kleinen Petrischale mit Vitrifikationsmedium (siehe Anhang S. 78) transferiert. Die auf Grund der hohen Viskosität des Vitrifikationsmediums nach oben flotierenden Zellen wurden eingefangen und durch dreimaliges Umsetzen gewaschen. Innerhalb von 60s wurden die



**Abb. 6: Cryotop (Fa. Kitazato, Japan)**

Oozyten mit maximal 1µl Vitrifikationsmedium auf ein Cryotop übertragen, und sofort in LN<sub>2</sub> getaucht. Hierbei wurde zum Einen darauf geachtet, dass die Zellen vor dem Einfrieren maximal 10s auf dem Cryotop „warten“ mussten, damit sie nicht austrocknen konnten. Zum Anderen wurde das Cryotop zur Vermeidung einer erniedrigten Abkühlrate durch Dampfbildung in einem möglichst flachen Winkel in den flüssigen Stickstoff getaucht.

Um den Zeitunterschied bei der Reifung zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe möglichst gering zu halten, wurden die vitrifizierten Zellen nach einer 5-minütigen Inkubationszeit im LN<sub>2</sub> wieder aufgetaut. Hierzu wurden die Zellen mit dem Cryotop vom Stickstoff sofort in das Dilutionsmedium (siehe Anhang S. 78) übertragen; sie waren dabei <1s an der Luft. In dieser Lösung wurden sie zweimal gewaschen und nach 30s für 5min in eine auf 22°C temperierte Waschlösung (siehe Anhang S. 78) transferiert. Anschließend wurden die Oozyten noch zweimal auf einer Wärmeplatte (33°C) in einer auf 37°C erwärmten Waschlösung für je 5min inkubiert und ihr morphologisches Aussehen beurteilt. Zellen mit einem dunklen Zytoplasma und intakter Zellmembran, die die Zona pellucida vollständig ausfüllten, wurden in ihrem IVM-Well in den Brutschrank zurückgesetzt.

Der Toxizitätstest wurde im Wesentlichen wie die Vitrifikation durchgeführt. Im Unterschied zu dieser wurden die Zellen jedoch nicht eingefroren, sondern nach der Inkubation im Vitrifikationsmedium sofort in das Dilutionsmedium übertragen. Das weitere Protokoll folgte wie oben beschrieben. Nach einer Ruhezeit von einer Stunde wurden die Oozyten aller Gruppen standardgemäß fertilisiert und kultiviert. Degenerierte Zellen wurden beim Umsetzen entfernt. Als Beurteilungsparameter dienten die Teilungs- und Blastozystenrate.

### 3.2.6 Statistikmethoden

Alle Versuchsergebnisse wurden mit einem Chi-Quadrat-Test ausgewertet, das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$ .

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss verschiedener Hormonzusätze auf die Reifung von Oozyten

Der erste Versuch zielte darauf ab, den Einfluss von 1µg/ml 17β-Östradiol und der Erhöhung der FSH-Konzentration auf die Maturationsrate und die weitere Embryonalentwicklung zu testen. Als Beurteilungsparameter wurden die Teilungs- und Blastozystenrate gewählt (11 Wiederholungen). Insgesamt 404 COCs waren in vier Gruppen mit oder ohne Östradiolzusatz in Kombination mit hoher oder normaler FSH-Konzentration aufgeteilt. Die Teilungsrate betrug bei den Gruppen mit Östradiol 23,8% und 28,6%, in den Gruppen ohne Östradiol 31,3% und 23,2%. Die Blastozystenraten waren bei den mit Östradiol gereiften Oozyten 14,9% und 13,3%, in den beiden anderen Gruppen 13,1% und 12,1%. Die Unterschiede bei den Teilungs- und Blastozystenraten waren dabei nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

Bei der Kontrolle der Parthenogenererate entwickelten sich 11 von 123 COCs bis maximal zum 16-Zellstadium (8,9%). Die Reifung der Zellen erfolgte dabei gemäß dem Standardprotokoll mit 1,3 IU/ml bFSH aber ohne Östradiolzusatz.

**Tab. 1: Einfluss von Östradiolzusatz und verschiedenen FSH-Konzentrationen auf die Teilungs- und Blastozystenrate bei Katzenoozyten**

	N	Teilungsrate n (%)	Blastozystenrate n (%)
Ö+/1,3	101	24 (23,8) <sup>a</sup>	15 (14,9) <sup>a</sup>
Ö+/13,0	105	30 (28,6) <sup>a</sup>	14 (13,3) <sup>a</sup>
Ö-/1,3	99	31 (31,3) <sup>a</sup>	13 (13,1) <sup>a</sup>
Ö-/13,0	99	23 (23,2) <sup>a</sup>	12 (12,1) <sup>a</sup>

a: Werte unterscheiden sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ , Chiquadrat)

N: Gesamtzahl der Eizellen pro Versuchsgruppe

n: Anzahl der geteilten Eizellen bzw. Blastozysten pro Gruppe

Ö+: Zusatz von 1µg/ml 17β-Östradiol

Ö-: kein Zusatz von 17β-Östradiol

1,3: Zusatz von 1,3 IU/ml bFSH

13,0: Zusatz von 13,0 IU/ml bFSH

## 4.2 Einfluss verschiedener Proteinzusätze auf die Reifung von Oozyten

In diesem Versuch sollte in zwei Gruppen mit insgesamt 110 COCs der Einfluss eines FCS- statt BSA-Zusatzes im Maturationsmedium geprüft werden. Als Beurteilungsparameter diente die Kernreifungsrate (9 Wiederholungen). Beim Handling der Oozyten fiel auf, dass die mit FCS gereiften COCs eine sehr ausgeprägte, jedoch etwas ungleichmäßige Cumulusexpansion aufwiesen. Diese bewirkte, dass die Zellen am Boden der Wells und an den Glaskapillaren festklebten, was das Pipettieren stark erschwerte. Bei den mit BSA gereiften COCs war eine Cumulusexpansion kaum feststellbar; sie klebten auch nicht fest und ließen sich im Gegensatz zu den mit Serum gereiften Zellen wesentlich leichter denudieren.

Die Beurteilung der Maturationsrate erfolgte unter der Annahme, dass Zellen, deren Kern sich in der Metaphase der zweiten Reifeteilung (MII) befand, gereift, und Zellen im Stadium des Germinal Vesicle Breakdowns (GVBD) nicht maturiert waren. Nicht auswertbare Zellen waren entweder degeneriert oder zerfielen bei der Fixation. Die beiden Gruppen unterschieden sich in der Reifungsrate signifikant voneinander ( $p \leq 0,001$ ). Auch bei der Anzahl der nicht-auswertbaren Oozyten konnte in der FCS-Gruppe eine signifikante Erhöhung festgestellt werden ( $p \leq 0,001$ ). Bei den mit FCS gereiften Oozyten waren 19,5% der Oozyten gereift, 32,9% befanden sich im Stadium des GVBD und 47,6% waren nicht auswertbar. Die BSA-Gruppe enthielt 64,3% gereifte und 25,0% unreife Oozyten, der Anteil der nicht auswertbaren Zellen lag bei 10,7%.

**Tab. 2: Auswirkung verschiedener Proteinzusätze im Maturationsmedium auf die Kernreifung von Katzenoozyten**

	N	GVBD n (%)	MII n (%)	Nicht auswertbar n (%)
FCS	82	27 (32,9) <sup>a</sup>	16 (19,5) <sup>a</sup>	39 (47,6) <sup>a</sup>
BSA	28	7 (25,0) <sup>a</sup>	18 (64,3) <sup>b</sup>	3 (10,7) <sup>b</sup>

a, b: Werte mit verschiedenen Indices innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant ( $p \leq 0,001$ , Chiquadrat)

N: Gesamtzahl der Eizellen pro Versuchsgruppe

n: Anzahl der unreifen, gereiften bzw. nicht auswertbaren Eizellen pro Gruppe

GVBD: Germinal Vesicle Breakdown: unreife Oozyten

MII: Metaphase der zweiten Reifeteilung: gereifte Oozyten

Nicht auswertbar: Degenerierte oder bei der Fixation zerstörte Zellen



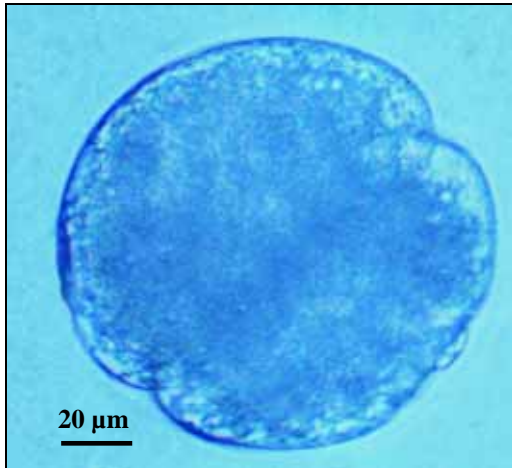


Abb. 7: Katzenembryo im Zweizellstadium

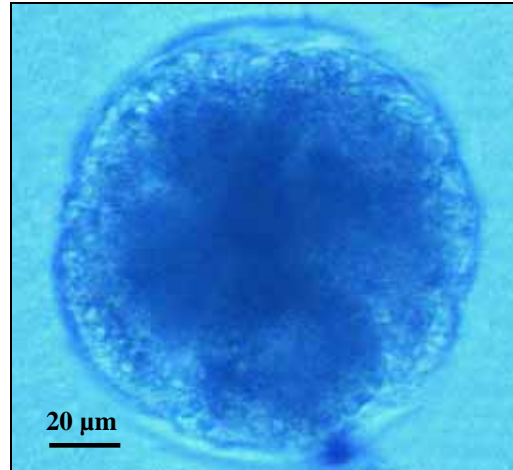


Abb. 8: Katzenembryo im 16-Zellstadium

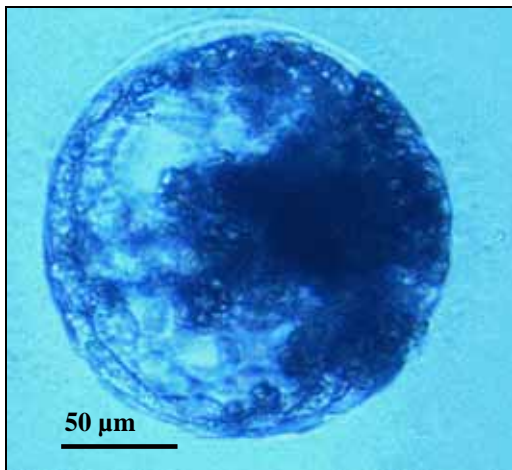


Abb. 9: Expandierte Blastozyste am Tag 7

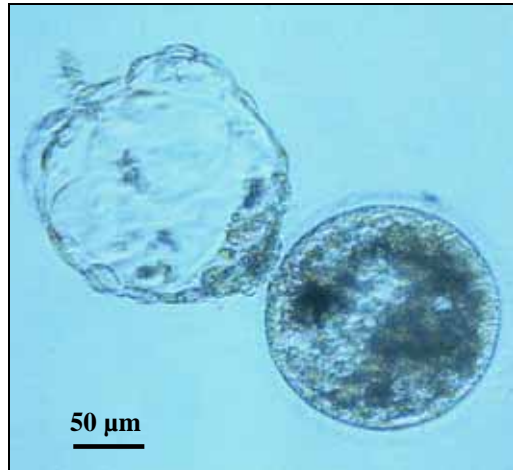


Abb. 10: Schlüpfende Blastozyste am Tag 8

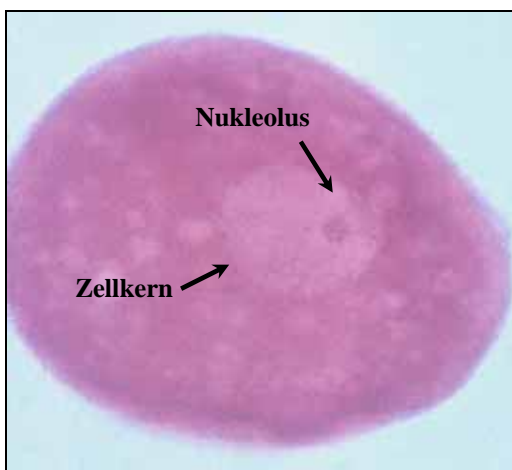


Abb. 11: Unreife Oozyte im Germinalvesikelstadium

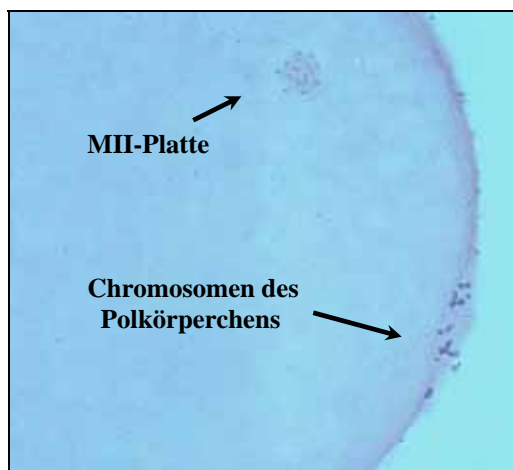


Abb. 12: Reife Oozyte im Stadium der Metaphase II

### 4.3 Einfluss von Cumuluszellen auf die In vitro Fertilisation

Als Vorversuch zur folgenden Vitrifikation wurde getestet, inwieweit der Cumulus oophorus bei Katzen für die Fertilisierung essentiell ist. Als Parameter wurden die Teilungs- und Blastozystenrate gewählt (8 Wiederholungen). Eine Gesamtzahl von 275 COCs wurde vor der Fertilisation in eine intakte Kontrollgruppe, eine partiell denudierte und eine vollständig denudierte Gruppe aufgeteilt. Die Teilungs- und Blastozystenraten in den einzelnen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p > 0,05$ ). Die Teilungsrate der Kontrollgruppe betrug 36,4%, die der Gruppe mit den partiell denudierten Oozyten 32,0%; bei den vollständig denudierten Eizellen hatten sich 34,7% der Oozyten geteilt. Die Anzahl der Blastozysten war in der Kontrollgruppe 20,8%, in den beiden Versuchsgruppen 14,6% (partiell denudiert) und 22,1% (vollständig denudiert).

**Tab. 3: Einfluss einer partiellen oder kompletten Entfernung der Cumuluszellen vor der IVF auf die Teilungs- und Blastozystenrate**

	N	Teilungsrate n (%)	Blastozystenrate n (%)
Intakt	77	28 (36,4) <sup>a</sup>	16 (20,8) <sup>a</sup>
Partiell denudiert	103	33 (32,0) <sup>a</sup>	15 (14,6) <sup>a</sup>
Komplett denudiert	95	33 (34,7) <sup>a</sup>	21 (22,1) <sup>a</sup>

a: Werte unterscheiden sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ , Chiquadrat)

N: Gesamtzahl der Eizellen pro Versuchsgruppe

n: Anzahl der geteilten Eizellen bzw. Blastozysten pro Gruppe

Intakt: IVF mit unbehandelten COCs (Kontrollgruppe)

Partiell denudiert: Reduktion des Cumulus oophorus auf 3-5 Zelllagen vor IVF

Komplett denudiert: Vollständige Entfernung des Cumulus oophorus vor IVF

### 4.4 In vitro Maturation mit denudierten Oozyten in einer Cumulus-Cokultur

Auch bei der Vitrifikation von unreifen Eizellen leiden die Zellverbindungen zwischen Cumulus oophorus und Eizelle. Daher sollte in diesem Experiment die Möglichkeit einer Reifung von denudierten Katzeizellen in einer Cumulus-Cokultur erprobt werden. Als Beurteilungsparameter diente die Entwicklung zur Metaphase II der Meiose (vier Wiederholungen). Je 32-35 Oozyten wurden als intakte COCs (Kontrollgruppe), als partiell denudierte oder als vollständig denudierte Oozyten kultiviert, wobei der letzten Gruppe

Cumuluszellen als Cokultur zugesetzt wurden. Die Ergebnisse in den drei Gruppen unterschieden sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ ), auch wenn bei den vollständig denudierten Oozyten mit der Cumulus-Cokultur eine tendenziell niedrigere Reifungsrate erkennbar war. Dazu passend konnte auch eine leichte Erhöhung des Anteils an unreifen Eizellen in dieser Gruppe festgestellt werden. Bei den intakten COCs betrug die Kernreifungsrate 65,6%, die Rate der unreifen Oozyten 9,4% und die der nicht auswertbaren Zellen 25,0%. In der partiell denudierten Gruppe waren 65,7% der Oozyten im Stadium der Metaphase II, 5,7% waren nicht gereift und 28,6% nicht auswertbar. Bei den mit Cumulus-Cokultur gereiften Eizellen war die Maturationsrate 53,1%, die Rate der Zellen im GVBD 15,6% und die der nicht auswertbaren Oozyten 31,3%.

**Tab. 4: Kernreifungsraten bei Maturation von intakten COCs, partiell denudierten Oozyten und vollständig denudierten Eizellen in einer Cumulus-Cokultur**

	N	GVBD n (%)	MII n (%)	Nicht auswertbar n (%)
Intakt	32	3 (9,4) <sup>a</sup>	21 (65,6) <sup>a</sup>	8 (25,0) <sup>a</sup>
Partiell denudiert	35	2 (5,7) <sup>a</sup>	23 (65,7) <sup>a</sup>	10 (28,6) <sup>a</sup>
Cumulus-Cokultur	32	5 (15,6) <sup>a</sup>	17 (53,1) <sup>a</sup>	10 (31,3) <sup>a</sup>

a: Werte unterscheiden sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ , Chiquadrat)

N: Gesamtzahl der Eizellen pro Versuchsgruppe

n: Anzahl der unreifen, gereiften bzw. nicht auswertbaren Eizellen pro Gruppe

Intakt: IVM mit unbehandelten COCs (Kontrollgruppe)

Partiell denudiert: Reduktion des Cumulus oophorus auf 3-5 Zelllagen vor IVM

Cumulus-Cokultur: Vollständige Denudation der Oozyten, Verbleib der Cumuluszellen im IVM-Medium als Cokultur

GVBD: Germinal Vesicle Breakdown: unreife Oozyten

MII: Metaphase der zweiten Reifeteilung: gereifte Oozyten

Nicht auswertbar: Degenerierte oder bei der Fixation zerstörte Zellen

Nachfolgend wurden die Auswirkungen dieser modifizierten Reifungsmethode auf die Teilungs- und die Blastozystenrate untersucht. Die Durchführung erfolgte in sechs Wiederholungen mit einer Gesamtzahl von 162 Oozyten. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Blastozystenraten zwischen den Gruppen ( $p > 0,05$ ), jedoch war die Teilungsrate in der Gruppe der in Cumulus-Cokultur gereiften Eizellen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt ( $p \leq 0,001$ ). Die Teilungsrate der Kontrollgruppe bezifferte sich auf 40,4%, die der Gruppe mit den partiell denudierten Oozyten auf 24,1%, und bei den mit Cumuluszellen cokultivierten Eizellen war sie 12,5%. Die Anzahl der Blastozysten belief sich in der Kontrollgruppe auf 15,4%, in den beiden Versuchsgruppen auf 5,6% (partiell denudiert) und 7,1% (Cumulus-Cokultur).

**Tab. 5: Embryonalentwicklung nach Reifung von intakten COCs, partiell denudierten Oozyten und vollständig denudierten Eizellen mit Cumulus-Cokultur**

	N	Teilungsrate n (%)	Blastozystenrate n (%)
Intakt	52	21 (40,4) <sup>a</sup>	8 (15,4) <sup>a</sup>
Partiell denudiert	54	13 (24,1) <sup>a, b</sup>	3 (5,6) <sup>a</sup>
Cumulus-Cokultur	56	7 (12,5) <sup>b</sup>	4 (7,1) <sup>a</sup>

a, b: Werte mit verschiedenen Indices innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant ( $p \leq 0,001$ , Chiquadrat)

N: Gesamtzahl der Eizellen pro Versuchsgruppe

n: Anzahl der geteilten Eizellen bzw. Blastozysten pro Gruppe

Intakt: IVM mit unbehandelten COCs (Kontrollgruppe)

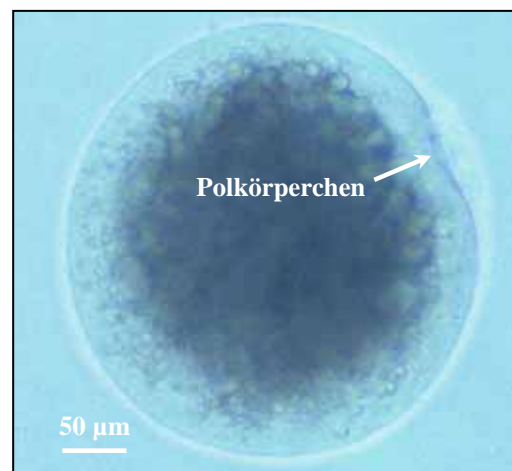
Partiell denudiert: Reduktion des Cumulus oophorus auf 3-5 Zellschichten vor IVM

Cumulus-Cokultur: Vollständige Denudation der Oozyten, Verbleib der Cumuluszellen im Maturationsmedium als Cokultur

## 4.5 Vitrifikation und Toxizitätstest

In diesem Versuch wurden in neun Wiederholungen im Ganzen 94 maturierte Katzen-Oozyten denudiert und vitrifiziert. Insgesamt 116 Oozyten standen für die Toxizitätskontrolle zur Verfügung, bei der der Einfluss der Einfriermedien auf das Resultat des Vitrifikationsversuches getestet wurde. In keiner der beiden Gruppen konnten Blastozysten gewonnen werden; sie unterschieden sich damit signifikant von der unbehandelten Kontrollgruppe ( $p \leq 0,001$ ). Bei der Kontrollgruppe war die Teilungsrate 35,5%, bei der Toxizitätskontrolle 1,7% und bei den vitrifizierten Zellen 8,5%. In der Kontrollgruppe konnten 20,8% Blastozysten gewonnen werden, in den anderen beiden Gruppen betrug die Blastozystenrate 0%.

Bei den behandelten Oozyten fiel auf, dass die Überlebensrate, d.h. der Anteil an morphologisch normal aussehenden Oozyten (DHALLI et al. 2000; 2002), nach der einstündigen Inkubationszeit im Brutschrank bei knapp 100% lag. Nach erfolgter Befruchtung, also 22 Stunden später, konnte jedoch bei vielen Zellen Vakuolisierung und der Verlust der intakten Zellmembran beobachtet werden. Mit fortschreitender Kultivierung erhöhte sich der Anteil der degenerierten Oozyten, bis schließlich



**Abb. 13: Vitrifizierte gereifte Oozyte eine Stunde nach dem Auftauen**

bei der Beurteilung der Blastozystenrate am Tag 8 keine lebenden Zellen mehr vorgefunden werden konnten.

**Tab. 6: Embryonalentwicklung nach Vitrifikation bzw. Inkubation von gereiften Oozyten mit Kryoprotektiva (Toxizitätskontrolle)**

	N	Teilungsrate n (%)	Blastozystenrate n (%)
Kontrolle	159	56 (35,2) <sup>a</sup>	33 (20,8) <sup>a</sup>
Toxizitätskontrolle	116	2 (1,7) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>b</sup>
Vitrifikation	94	8 (8,5) <sup>c</sup>	0 (0) <sup>b</sup>

a, b, c: Werte mit verschiedenen Indices innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant (Chiquadrat); a:b und a:c ( $p \leq 0,001$ ); b:c ( $p \leq 0,025$ )

N: Gesamtzahl der Eizellen pro Versuchsgruppe

n: Anzahl der geteilten Eizellen bzw. Blastozysten pro Gruppe

## 5 Diskussion

Mit Hilfe der Kryokonservierung von Oozyten und der Produktion von Embryonen versucht man Systeme zu entwickeln, mit denen das Genmaterial von gefährdeten Großkatzenarten bewahrt werden kann. Man hofft, auf diese Art und Weise männliche und weibliche Gameten von Tieren, die verenden oder aus medizinischen Gründen kastriert werden müssen, für Nachzuchten erhalten zu können. Die Hauskatze eignet sich gut als Modelltier für die Entwicklung von assistierten Reproduktionstechniken, da die Beschaffung von Gonaden kastrierter Katzen problemlos im ausreichenden Umfang möglich ist. Sind bei der Hauskatze Grundkenntnisse bei der IVP und Kryokonservierung aufgebaut, können diese Systeme mit den nötigen Modifizierungen auf Wildkatzenarten übertragen werden.

Im Gegensatz zu Pferde- oder Hunde-Oozyten zum Beispiel eignen sich die Eizellen von Katzen relativ gut für die In vitro Reifung, -Fertilisation und -Kultivierung. Die Medien und Labortechniken werden dabei meist in Anlehnung an das IVP-System beim Rind gewählt (FREISTEDT et al. 1999). Zu Beginn beschränkte man sich auf die künstliche Befruchtung und anschließende Übertragung von in vivo gereiften Katzenoozyten (GOODROWE et al. 1988), sowie auf die Kryokonservierung und den Embryotransfer von zwei- bis vierzelligen Embryonen (POPE et al. 1993; POPE et al. 1994). Vor knapp zehn Jahren konnten zum ersten Mal aus in vitro gereiften und fertilisierten Oozyten Blastozysten gewonnen werden (WOLFE und WILDT 1996). Die IVP bei der Katze ist jedoch weniger erfolgreich als beim Rind, was sich sowohl in einer geringeren Maturationsrate als auch in einer geringeren Blastozystenrate bemerkbar macht. Das Ziel vieler Studien war es daher, durch Modifikation der Medien, Medienzusätze, aber auch der Kulturbedingungen im Brutschrank die Reifung und Kultivierung der Embryonen zu verbessern (JOHNSTON et al. 1989; LUVONI und OLIVA 1993; WOOD et al. 1995; BOGLIOLO et al. 2001; KARJA et al. 2002b; MURAKAMI et al. 2002; KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al. 2003).

Auch die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Optimierung des Reifungsmediums. Schon sehr früh wurde festgestellt, dass der Zusatz von LH und FSH zum Reifungsmedium die Maturation und damit die weitere Embryonalentwicklung positiv beeinflusst (JOHNSTON et al. 1989; SCHRAMM und BAVISTER 1995; WOOD et al. 1995). Dabei stimuliert FSH das Follikelwachstum und erhält die Lebensfähigkeit der Oozyten (ERICKSON und DANFORTH 1995). Außerdem spielt es eine Schlüsselrolle bei der Ausdifferenzierung der Granulosazellen

und fördert über die Erniedrigung des cAMP-Spiegels (SALUSTRI et al. 1985) die Expansion der Cumuluszellen (WOOD et al. 1995) und die Überwindung der meiotischen Arretierung der Oozyte (THOMAS et al. 2004). Über die Cumuluszellen erhöht FSH indirekt auch die Progesteron- und Östrogen-Synthese (MEINECKE 2000).

In der verwendeten FSH-Konzentration unterscheiden sich die verschiedenen Studien beträchtlich, sie schwanken zwischen 0,02 IU/ml und 1,64 IU/ml (SPINDLER und WILDT 1999; FREISTEDT et al. 2001a). Eine Arbeitsgruppe verglich die Auswirkung verschiedener FSH-Konzentrationen auf die Maturation und weitere Embryonalentwicklung außerhalb der Fortpflanzungssaison (COMIZZOLI et al. 2003). Dabei konnte durch Zusatz von 16,4 IU/ml FSH in das Reifungsmedium eine akzeptable Blastozystenrate (17,0%) erreicht werden. In Anlehnung an diese Arbeit wurden im ersten Versuch die Blastozystenraten nach Reifung mit verschiedenen FSH-Konzentrationen während der Fortpflanzungssaison verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Während der „Nebensaison“ ist eine ausreichende Stimulation der zu dieser Zeit vermutlich zahlenmäßig reduzierten Gonadotropinrezeptoren (SPINDLER und WILDT 1999) mit einer normalen FSH-Konzentration nicht möglich (COMIZZOLI et al. 2003). Innerhalb der Fortpflanzungsperiode jedoch wurde im vorliegenden Versuch keine bessere Entwicklungsrate durch das höhere Hormonangebot erreicht.

Von vielen Forschungsgruppen wird das Reifungsmedium mit 1 µg/ml 17β-Östradiol supplementiert (WOOD et al. 1997; POPE et al. 1999; KARJA et al. 2002a; MURAKAMI et al. 2002; COMIZZOLI et al. 2003). Es ist bekannt, dass die Östradiolkonzentration in der Follikelflüssigkeit während der Follikelreifung sehr hoch ist (ca. 1 µg/ml), bevor sie wenige Stunden nach dem LH-Peak abfällt (DIELEMAN et al. 1983; FORTUNE und HANSEL 1985). Östrogen regt die Mitose der Cumuluszellen an und induziert die Ausbildung von LH-Rezeptoren (MEINECKE 2000). Seine Wirkung auf die Wiederaufnahme der Meiose der Oozyte ist jedoch umstritten. Beim Rind konnte z.T. durch Östradiol-Zugabe in das Reifungsmedium eine Erhöhung der Maturationsrate erreicht werden (FUKUI et al. 1982). Andere Arbeitsgruppen beobachteten bei Versuchen mit humanen und bovinen Oozyten zwar keinen positiven Effekt auf die Kernreifung, jedoch auf die weitere Embryonalentwicklung bis hin zur Blastozyste (SIROTKIN 1992; TESARIK und MENDOZA 1995). Dies spricht dafür, dass Östradiol zwar nicht die Kernreifung, aber die zytoplasmatische Reifung unterstützt. Beim Schwein hingegen hatte die Östradiolzugabe in einer Dosis von bis zu 3 µg/ml keinerlei Auswirkung auf die Kern- und Zytoplasmareifung oder auf die Fertilisation (DODE und GRAVES 2002). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass v.a. die Cumuluszellen, aber

auch die Oozyte selbst Östrogen produzieren, so dass vermutet wurde, dass die sezernierte Hormonmenge für die Reifung ausreicht und ein Zusatz von Östradiol daher nicht weiter stimulierend wirkt. Bei Mäuse-Oozyten schließlich fand man auch Hinweise, dass eine zu hohe Östradiolkonzentration von 10µg/ml im Maturationsmedium die Reifung inhibieren kann (EPPIG und KOIDE 1978; SMITH und TENNEY 1980). In einer Studie mit Rinderoozyten wirkte sich bereits die Zugabe einer geringen Östradiolkonzentration (1µg/ml) negativ auf die Kernreifungsrate aus, wobei hier auch die Anzahl an Chromosomenaberrationen signifikant erhöht war (BEKER et al. 2002); eine Stimulation der zytoplasmatischen Reifung (gemessen an der Blastozystenrate bezogen auf die gereiften Eizellen) konnte dabei ebenfalls nicht beobachtet werden. Da der negative Effekt von Östradiol bei denudierten Oozyten verstärkt war, vermuteten die Autoren, dass der Einfluss des Steroids auf die Oozyte durch die Cumuluszellen abgeschwächt wird. Durch Zugabe von FSH in das Medium konnte die negative Wirkung von Östradiol bezüglich der Reifungsrate aufgefangen werden, die chromosomalen Veränderungen waren aber weiterhin vorhanden. Da auch in Serum FSH enthalten ist, wurde vermutet, dass der Einfluss von Östradiol beim Vergleich verschiedener Hormonzusätze in einem serumhaltigen Medium verschleiert wird (BEKER et al. 2002). Bei der Katze konnte durch Supplementierung des Reifungsmediums mit 1µg/ml 17β-Östradiol lediglich eine tendenzielle Erhöhung der Maturations-, Fertilisierungs- und Teilungsrate erreicht werden (WOOD et al. 1995). In der vorliegenden Arbeit förderte der Zusatz von 1µg/ml 17β-Östradiol die weitere Embryonalentwicklung jedoch nicht. Negative Auswirkungen wurden ebenfalls nicht beobachtet. Diese wären jedoch, falls vorhanden, vermutlich durch das ebenfalls vorhandene FSH aufgefangen worden (BEKER et al. 2002).

Im Laufe der Maturation expandiert der Cumulus oophorus, und die Gap junctions zur Eizelle reißen ab (DEKEL et al. 1981; MOTLIK et al. 1986). Bei Menschen- und Mäuse-COCs konnte eine positive Korrelation zwischen Cumulusexpansion und Fertilisierungsrate nachgewiesen werden (TESTART et al. 1983; CHEN et al. 1993). Dabei lässt sich von einer erfolgreichen Befruchtung auf eine abgeschlossene zytoplasmatische Reifung rückschließen (BING et al. 2002). Außerdem kann man folgern, dass Stoffe, die die Cumulusexpansion fördern, auch die zytoplasmatische Reifung unterstützen. Da bekannt ist, dass der Zusatz von BSA im Reifungsmedium im Gegensatz zu FCS die Cumulusexpansion bei Rinder- und Hamster-COCs nicht fördert (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al. 1986), verwundert es nicht, dass FCS bei vielen Tierarten erfolgreich als Proteinquelle im IVM-Medium verwendet wird (AONO et al. 2003; DATTENA et al. 2004; NEDAMBALE et al. 2004; WANI et al. 2004). Auch bei der Katze sollte der Effekt von verschiedenen Proteinzusätzen im Reifungsmedium auf die Maturation



getestet werden. Obwohl FCS im Gegensatz zu BSA auch bei Katzenoozyten zu einer verstärkten Cumulusexpansion führte, war die Kernreifungsrate in der FCS-Gruppe signifikant erniedrigt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Studien (GOODROWE et al. 1991; LUVONI und OLIVA 1993; WOOD et al. 1995). Auch die verstärkte Cumulusexpansion ist bei anderen Versuchen als typisch festgestellt worden (WOOD et al. 1995). Auffällig war, dass sich im vorliegenden Versuch der Anteil der unreifen Eizellen in den Versuchsgruppen nicht signifikant voneinander unterschied, während der Anteil an nicht-auswertbaren Zellen in der FCS-Gruppe signifikant erhöht war. Da davon auszugehen ist, dass die Anzahl der bei der Fixation zerstörten Zellen in beiden Versuchsgruppen etwa gleich hoch ist, lässt sich folgern, dass viele Zellen der FCS-Gruppe bereits vor der Färbung degeneriert waren. Dies könnte entweder eine direkte Folge des inadäquaten Kulturzusatzes, oder indirekt eine Folge der Alterung und Apoptose der nicht-gereiften Oozyten sein.

Die Ergebnisse der ersten Versuche deuten also darauf hin, dass bei der IVM von Katzenoozyten auf die Verwendung von Östradiol verzichtet werden kann und dass eine relativ geringe FSH-Dosis für die Maturation ausreichend ist. Auch der Ersatz von BSA durch FCS führte nicht zur Erhöhung der Reifungsrate. Um das Maturationsmedium zu optimieren, müssen somit andere Wege gegangen werden. Eine zu testende Möglichkeit wäre z.B. die Verwendung von FF-MAS, einem Meiose-Aktivierenden Sterol, das v.a. die zytoplasmatische Reifung anregen soll. Bisher wurde dieses Sterol erfolgreich bei der Reifung von Mäuse- und Rinderoozyten eingesetzt (DONNAY et al. 2004; MARIN BIVENS et al. 2004a; MARIN BIVENS et al. 2004b); die positiven Auswirkungen auf die weitere Embryonalentwicklung blieben allerdings beim Rind aus.

Der Erfolg einer Vitrifikation von immaturren oder maturierten Oozyten kann durch die Anwesenheit von Cumuluszellen stark beeinflusst werden, da diese die Penetrationsgeschwindigkeit der Kryoprotektiva in die Eizelle herabsetzen (DHALI et al. 2000; HYTTEL et al. 2000). Das Ausmaß hängt dabei von der Anzahl der Cumuluszelllagen um die Eizelle ab (MASSIP 2003). Da der Cumulus oophorus die Eizelle selten an allen Seiten gleichmäßig umgibt und so die Penetration der CPAs innerhalb der Zelle, aber auch von Zelle zu Zelle, ungleichmäßig stattfindet (HYTTEL et al. 2000), wäre für die Vitrifikation die Denudation der Zellen, unabhängig von ihrem Maturationsstatus, von Vorteil. Dafür spricht auch, dass bei Non Equilibrium Verfahren die Zellverbindungen zwischen Eizelle und Cumuluszelle auf Grund der starken osmotisch bedingten Volumenänderung der Eizelle

ohnehin großteils zugrunde gehen (LE GAL und MASSIP 1999; HURTT et al. 2000; HYTTEL et al. 2000; LUVONI und PELLIZZARI 2000; CECCONI et al. 2004). Das Problem ist dabei allerdings, dass der Cumulus oophorus für das Wachstum der Oozyte und für die Reifung von Kern und v.a. Zytoplasma notwendig ist (SIMON et al. 1997; THOMAS et al. 2004). Bei der Maturation von denudierten Oozyten konnten zwar manche Arbeitsgruppen gleich hohe Kernreifungsraten wie bei COCs erreichen (GESHI et al. 2000; BING et al. 2002), die zytoplasmatische Reifung war jedoch gestört. Dies wirkte sich negativ auf die Fertilisation und weitere Embryonalentwicklung aus (VANDERHYDEN und ARMSTRONG 1989; ZHANG et al. 1995; CECCONI et al. 1996; DE MATOS et al. 1996; GOUD et al. 1998; GESHI et al. 2000; BING et al. 2002). Auch eine Cokultivierung mit Cumuluszellen konnte die Reifungs- und Fertilisierungsraten nicht oder nur zum Teil verbessern (ZHANG et al. 1995; CECCONI et al. 1996; RUPPERT-LINGHAM et al. 2003). Eine der Aufgaben der Cumuluszellen bei der zytoplasmatischen Reifung ist die Erhöhung des GSH-Gehaltes in der Eizelle (GESHI et al. 2000; BING et al. 2002). Hierfür stellt sie der Oozyte zum Einen den aus Cystin reduzierten Ausgangsstoff Cystein zur Verfügung (DE MATOS et al. 1997) und beteiligt sich zum Anderen auch selbst an der Synthese von GSH, welches sodann über Gap junctions in die Eizelle transferiert wird. GSH wirkt während der Fertilisation bei der Dekondensierung des Spermienkopfes (PERREAULT et al. 1988) und der Bildung des männlichen Vorkernes mit (YOSHIDA et al. 1992; YOSHIDA 1993); außerdem schützt es als potentes Antioxidans vor Sauerstoffradikalen (TATEMOTO et al. 2000).

Bei Versuchen mit Schweine- und Rinderoozyten stellte man fest, dass auch die Fertilisation und frühe Embryonalentwicklung durch bestehende Zellverbindungen zwischen Cumulus oophorus und Oozyte unterstützt wird (ZHANG et al. 1995; BING et al. 2002; FATEHI et al. 2002; TANGHE et al. 2003). Die genaue Rolle der Cumuluszellen ist dabei unbekannt (ZHANG et al. 1995). Durch Cokultivierung von nach der Maturation denudierten Oozyten mit Cumuluszellen konnte die Fertilisierungsrate geringgradig gesteigert werden, sie war aber dennoch nicht mit der Fertilisation von intakten COCs vergleichbar (ZHANG et al. 1995; FATEHI et al. 2002; TANGHE et al. 2003). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Cumuluszellen fertilisationsfördernde Stoffe wie z.B. Progesteron produzieren (FATEHI et al. 2002), die sie vermutlich z.T. in das Medium sezernieren, z.T. aber auch direkt über die Gap junctions in die Eizelle transferieren (TANGHE et al. 2003). Die Hypothese des direkten Stofftransfers durch Gap junctions steht allerdings im Widerspruch zu Untersuchungen, nach denen spätestens mit Abschluss der Maturation alle Verbindungen zwischen Cumuluszellen und Eizelle gekappt sind (DEKEL et al. 1981; MOTLIK et al. 1986; THOMAS et al. 2004). Eine andere Hypothese ist,

dass die Cumuluszellen beim „Einfangen“ der Spermien helfen (TANGHE et al. 2003) und die Kapazitation und Akrosomenreaktion der Spermien fördern (CHIAN et al. 1995). Aus Fertilisationsversuchen beim Schwein wurde geschlossen, dass die Penetrationsrate der Spermien nicht vom Reifungsstatus der Oozyte, sondern allein von der Anwesenheit der Cumuluszellen um die Zelle abhängig ist (CAMPOS et al. 2001). Schließlich gibt es Hinweise darauf, dass die Cumuluszellen das Kulturmilieu verbessern, indem sie vermutlich mit Hilfe von GSH Sauerstoffradikale binden (TATEMOTO et al. 2000).

Im vorliegenden Versuch wurde daher im Hinblick auf eine spätere Vitrifikation zunächst der Einfluss der Cumuluszellen auf die Fertilisation bei Katzen-Oozyten getestet. Im nächsten Schritt wurde die Effizienz der Maturation von denudierten Oozyten in einer Cumulus-Cokultur untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Abwesenheit von Cumuluszellen bei der Befruchtung die embryonale Entwicklung bis zur Blastozyste nicht beeinträchtigt. Somit scheint bei der Katze ein positiver Einfluss der Cumuluszellen auf das Milieu des Fertilisierungsmediums gering oder nicht vorhanden zu sein. Auch die Kapazitation und Akrosomenreaktion der Spermien war in Abwesenheit von Cumuluszellen nicht gestört. Dies deckt sich auch mit anderen Versuchen, nach denen die IVF bei der Katze ebenfalls wenig sensibel gegenüber äußeren Veränderungen war (JOHNSTON et al. 1991a, b). Auch beim Reifungsversuch mit denudierten Oozyten waren keine signifikanten Unterschiede bei der Maturations-, und Blastozystenrate erkennbar. Lediglich die Teilungsrate war in der Gruppe der in Cokultur gereiften denudierten Oozyten signifikant niedriger als in den anderen Gruppen. Obwohl insgesamt eine starke Tendenz zur Verschlechterung der Reifung und Embryonalentwicklung bei den denudierten Oozyten festzustellen war, konnten sich auch aus diesen Eizellen Blastozysten entwickeln. Da jedoch die Anzahl der Oozyten pro Gruppe in diesem Versuch relativ klein war, kann der Rückschluss, dass die Reifung von denudierten Katzenoozyten in einer Cumulus-Cokultur ohne negative Auswirkungen auf die Embryonalentwicklung möglich ist, nicht ohne weiteres gezogen werden.

Für die Vitrifikation von Katzenoozyten bedeuten diese Ergebnisse, dass gereifte Eizellen vor dem Einfrieren vollständig denudiert werden können, ohne dass dies negative Auswirkungen auf die spätere Embryonalentwicklung hat. Auch unreife Oozyten können vor der Vitrifikation denudiert und nach dem Auftauen mit frischen Cumuluszellen kokultiviert werden. Sofern sie durch die Vitrifikation nicht zu Schaden kommen, besteht auch hier die Chance, Blastozysten zu gewinnen. Die routinemäßige Denudation vor der Vitrifikation hat den Vorteil, dass ein standardisiertes Vitrifikationsprotokoll, das dem Vergleich in verschiedenen Versuchen und Arbeitsgruppen standhält, leichter entwickelt werden kann.

Mit der Kryokonservierung von Katzenoozyten hat man bisher wenig Erfahrung. Aus Toxizitätsversuchen weiß man, dass Propylenglykol (PrOH), Ethylenglykol (EG) und DMSO die am besten geeigneten permeablen Kryoprotektiva sind (LUVONI et al. 1997; COMIZZOLI et al. 2004). Dabei wurde festgestellt, dass bereits eine Inkubation von immaturren Oozyten mit CPA-Konzentrationen von 2-3 mol/l (ungefähr 10-15 %) ihre Reifung stark beeinträchtigt (LUVONI und PELLIZZARI 2000; COMIZZOLI et al. 2004). Auch auf eine längere Inkubation mit Saccharose reagieren Katzenoozyten sehr empfindlich (MURAKAMI et al. 2004). Außerdem ist bekannt, dass es schon bei kurzer Abkühlung auf Raumtemperatur zur Depolymerisierung des Spindelapparates kommt (PUKAZHENTHI et al. 1998a). Dennoch war eine 24-stündige Aufbewahrung von Katzenovarien bei 4°C für die weitere Embryonalentwicklung ohne Probleme möglich (WOLFE und WILDT 1996). Bisher wurden unreife und gereifte Eizellen sowohl mit der Slow Freezing-Methode kryokonserviert als auch vitrifiziert (LUVONI et al. 1997; LUVONI und PELLIZZARI 2000; MURAKAMI et al. 2004). Dabei wurde festgestellt, dass eine Reifung der Eizellen nur nach dem langsamen Einfrieren möglich war (LUVONI et al. 1997), bei der Kryokonservierung von gereiften Eizellen hingegen konnten sich nur vitrifizierte Zellen zu Blastozysten weiterentwickeln (LUVONI und PELLIZZARI 2000; MURAKAMI et al. 2004). Der Erfolg war allerdings mit einer Blastozystenrate von 2% relativ gering.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Katzenoozyten vitrifiziert. Dabei fiel die Wahl des Maturationsstadiums auf die gereifte Eizelle, da sich diese bei der Katze als geeigneter für die Kryokonservierung erwiesen hatte (LUVONI und PELLIZZARI 2000). In Vitrifikationsversuchen mit Kaninchenzygoten konnten bei der Verwendung von Cryotop wesentlich bessere Ergebnisse erzielt werden als bei der Verwendung von GL-Tip oder Cryoloop (HOCHI et al. 2004); daher wurde diese Methode auch im vorliegenden Versuch verwendet. Dennoch konnten keine Blastozysten gewonnen werden. Da auch in der Toxizitätskontrolle keine embryonale Weiterentwicklung zu beobachten war, ist davon auszugehen, dass die Zellen bereits durch die verwendeten Medien, die Inkubationszeit oder die Inkubationstemperatur geschädigt wurden.

Die hier angewandte Methode erwies sich somit derjenigen von MURAKAMI et al. (2004) unterlegen, welcher nach Vitrifikation von 120 Oozyten immerhin zwei Blastozysten gewinnen konnte. Im vorliegenden Versuch wurde eine Kombination von EG und DMSO verwendet, im Versuch von MURAKAMI et al. (2004) wurde dagegen nur EG als Kryoprotektivum benutzt. Da sich auch in einer anderen Studie DMSO als weniger geeignet für Katzenoozyten erwiesen hatte (LUVONI und PELLIZZARI 2000), könnte hier einer der

Gründe für den geringen Erfolg liegen. Ein weiterer Unterschied besteht in der um 0,2M höheren Saccharose-Konzentration im Vitrifikationsmedium der vorliegenden Studie. Da die Expositionszeit der gegen Saccharose relativ empfindlichen Oozyten (MURAKAMI et al. 2004) im Vitrifikationsmedium relativ lange dauert (60s), könnte dies der wichtigste Unterschied zwischen den beiden Versuchen sein. Eine mögliche Schlussfolgerung daraus wäre, dass für Katzenoozyten die toxischen Auswirkungen von permeablen CPAs weniger schädlich sind als die osmotischen Auswirkungen von nicht-permeablen CPAs. Es ist aber auch möglich, dass die negativen Auswirkungen spezifisch für Saccharose sind; dies müsste durch Ersatz von Saccharose mit einem anderen nicht-permeablen Kryoprotektivum getestet werden. Ein weiterer Faktor könnte die Verwendung von FCS statt BSA in den Einfriermedien sein (MURAKAMI et al. 2004). In mehreren Studien wurde die negative Auswirkung von FCS auf die Reifung von Katzenoozyten nachgewiesen (GOODROWE et al. 1991; LUVONI und OLIVA 1993; WOOD et al. 1995). Dennoch ist es relativ unwahrscheinlich, dass die Verwendung von FCS einen großen Einfluss auf den Versuchsausgang hatte, da die Expositionszeit 60 min nicht überschritt. Wichtiger in diesem Zusammenhang ist, dass die Reifung im vorliegenden Versuch in den Versuchsgruppen bereits nach 22,5 Std. durch die Vitrifikation bzw. den Toxizitätstest unterbrochen wurde, während die Zellen der Kontrollgruppe zwar denudiert wurden, aber dennoch in der Reifungskultur blieben. Dieses Zeitschema wurde gewählt, um eine Überalterung der Zellen in der Kontrollgruppe zu verhindern. In den Versuchsgruppen reichte aber möglicherweise dadurch die Zeit für eine vollständige Reifung nicht aus. Unwahrscheinlich ist hingegen, dass die in diesem Versuch um eine Minute längere Inkubationszeit der Oozyten mit der Äquilibrationslösung eine Rolle spielte, da die Gesamtkonzentration der CPAs in Äquilibrations- und Einfriermedium im vorliegenden Versuch geringer war als bei MURAKAMI et al. (2004). Dennoch darf man nicht außer Acht lassen, dass in Toxizitätsversuchen bereits eine CPA-Konzentration von 10-20 % toxisch auf Katzenoozyten wirkte (LUVONI und PELLIZZARI 2000; COMIZZOLI et al. 2004).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass während der Fortpflanzungssaison gewonnene Katzenoozyten nur mit Zusatz von FSH und LH eine volle Reifungs- und Entwicklungskompetenz erlangen. Als Proteinquelle erwies sich Bovines Serumalbumin während der In vitro Maturation dem Zusatz von Fetalem Kälberserum deutlich überlegen, obwohl letzteres eine wesentlich bessere Cumulusexpansion bewirkte. Bei der Katze sind für die In vitro Befruchtung Cumuluszellen nicht notwendig. Auch während der In vitro Reifung waren intakte Zellverbindungen zwischen Cumulus oophorus und Oocyte nicht zwingend notwendig. Die Entwicklungskompetenz bis zur Blastozyste war sowohl bei partiell

denudierten Eizellen als auch bei komplett denudierten Eizellen mit einer Cumulus-Cokultur prinzipiell gegeben, sollte jedoch mit größeren Versuchszahlen verifiziert werden. Bei der Kryokonservierung mittels Vitrifizierung erwiesen sich die verwendeten Kryoprotektiva als zu toxisch für Katzenoozyten. Zukünftige Untersuchungen sollten sich deshalb auf die Zusammensetzung der Einfriermedien konzentrieren, da Katzenoozyten offensichtlich sehr empfindlich auf permeable und nicht-permeable CPAs in höheren Konzentrationen reagieren.

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung verschiedener Bedingungen für die In vitro Reifung und -Befruchtung bei der Hauskatze im Hinblick auf die Eignung zur Vitrifikation gereifter Eizellen. Die Cumulus Oozyten Komplexe wurden aus Ovarien von Katzen, die zur Kastration vorgesehen waren, durch oberflächliches Einschneiden der Ovarien gewonnen. Als Grundmedium für die Reifung wurde mTCM 199 mit 0,3% BSA benutzt. Die Befruchtung mit epididymalen Spermien erfolgte in TALP; für die Kultur von Zygoten bis zur Blastozyste wurde SOF mit 10% ECS verwendet. Der Zusatz von 1µg/ml Östradiol in Kombination mit einer erhöhten (13,0 IU/ml) oder normalen bFSH-Konzentration (1,3 IU/ml) hatte keinen Effekt auf die Reifungs- und Entwicklungsrate. Die Teilungsrate betrug unabhängig von den verschiedenen Hormonsupplementierungen 23,2-31,3% ( $p>0,05$ ), die Blastozystenrate 12,1-14,9% ( $p>0,05$ ). Der Ersatz von 0,3% BSA durch 10% FCS im Maturationsmedium führte zu einer signifikant erniedrigten Kernreifungsrate (19,5% gegenüber 64,3%  $p\leq 0,001$ ). Die Teilungs- und Blastozystenrate unterschied sich nach In vitro Befruchtung von Cumulus-intakten, partiell oder komplett denudierten Oozyten nicht signifikant in den einzelnen Gruppen (Teilungsrate 32,0-36,4%,  $p>0,05$ ; Blastozystenrate 14,6-22,1%,  $p>0,05$ ). Nach der In vitro Reifung von partiell oder vollständig denudierten Oozyten in Cumulus-Cokultur konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede in der Reifungsrate (53,1-65,7%,  $p>0,05$ ) und Blastozystenrate (5,6-15,4%,  $p>0,05$ ) festgestellt werden; allerdings war die Teilungsrate bei den vollständig denudierten Oozyten signifikant erniedrigt (12,5% gegenüber 40,4% in der Kontrollgruppe,  $p\leq 0,001$ ). Nach der Vitrifikation von denudierten MII-Oozyten mit Hilfe des Cryotop-Verfahrens teilten sich nur wenige Oozyten; eine Entwicklung zur Blastozyste wurde nicht beobachtet. Alleine das Einbringen von gereiften und denudierten Oozyten in die Vitrifikationslösung führte zu einem vollständigen Verlust der Entwicklungsfähigkeit.

Die Ergebnisse zeigen, dass Östradiol oder eine erhöhte FSH-Konzentration für die In vitro Maturation bei Katzenoozyten nicht notwendig sind. Die In vitro Fertilisation ist ohne Cumuluszellen möglich, auch eine Reifung von denudierten Oozyten kann in Cumulus-Cokultur erreicht werden. Um die Entwicklungsfähigkeit vitrifizierter Katzenoozyten erhalten zu können, ist die Entwicklung von weniger toxischen Vitrifikationsmedien notwendig.

## 7 Summary

### **Conditions of in vitro maturation and fertilization for vitrification of matured cat oocytes**

The aim of this study was to investigate some aspects of in vitro maturation and fertilization in domestic cats with regard to vitrification of matured oocytes. Cumulus oocyte complexes were recovered by slicing of ovaries obtained after elective castration. Maturation was performed in mTCM 199 supplemented with 0.3% BSA. Oocytes were fertilized with epididymal sperm in TALP, and presumptive zygotes were cultured in SOF with 10% estrous cow serum. The addition of 1 µg/ml estradiol in combination with high (13.0 IU/ml) or normal bFSH-concentrations (1.3 IU/ml) had no effect on maturation and further embryonal development. The cleavage rate was 23.2% to 31.3% ( $p > 0.05$ ), independent of hormonal supplementations. The blastocyst rate ranged from 12.1% to 14.9% ( $p > 0.05$ ). The replacement of 0.3% BSA with 10% FCS in maturation medium led to significantly lower rates of nuclear maturation (19.5% versus 64.3%  $p \leq 0.001$ ). Cleavage and blastocyst rates did not differ significantly when cumulus-intact, partially or completely denuded metaphase two oocytes were fertilized in vitro (cleavage rate: 32.0-36.4%,  $p > 0.05$ ; blastocyst rate: 14.6-22.1%,  $p > 0.05$ ). After the in vitro maturation of partially or completely denuded immature oocytes in cumulus-co-culture, the maturation rate (53.1-65.7%,  $p > 0.05$ ) and blastocyst rate (5.6-15.4%,  $p > 0.05$ ) did not differ significantly from intact control oocytes. However the cleavage rate was significantly lower in completely denuded oocytes (12.5% versus 40.4% in control oocytes,  $p \leq 0.001$ ). After vitrification of denuded MII-oocytes with a Cryotop device only a few oocytes cleaved and no development to the blastocyst stage occurred. However a complete loss of developmental competence could be observed as well when oocytes were exposed to the vitrification solution with permeable and non-permeable cryoprotectants for four minutes.

The results suggest that estradiol and high concentrations of FSH are not necessary for in vitro maturation of cat oocytes. In vitro fertilization is possible without cumulus cells and maturation of denuded oocytes can be achieved by cumulus-coculture. Less toxic vitrification solutions have to be developed in order to preserve the developmental competence of vitrified cat oocytes.



## 8 Anhang

### 8.1 Verwendete Medien für IVP

Die Medien für die IVP wurden nach einem modifizierten Protokoll von FREISTEDT et al. (2001a) hergestellt, die Medien für die Vitrifikation nach dem Protokoll von HOCHI et al. (2004).

#### Aufbewahrungslösung

1 l	D-PBS (D 5652, Fa. Sigma, Taufkirchen)
100 mg	Penicillin G (P 3032, Fa. Sigma, Taufkirchen)
100 mg	Streptomycin Sulfat (S 6501, Fa. Sigma, Taufkirchen)

Die Lösung wurde für maximal 4 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt und bei Bedarf in sterile 50ml-Röhrchen (Fa. VWR, Darmstadt) abgefüllt.

#### TCM - Stammlösung

100 ml	Embryowasser (W 1503, Fa. Sigma, Taufkirchen)
1500 mg	Medium 199 Hepes Modification (M 2520, Fa. Sigma, Taufkirchen)
300 mg	NaHCO <sub>3</sub> (S 5761, Fa. Sigma, Taufkirchen)
5 mg	Gentamicin Sulfat (G 3632, Fa. Sigma, Taufkirchen)
2,5 mg	Natriumpyruvat (P 4562, Fa. Sigma, Taufkirchen)

Das Medium wurde auf einen pH-Wert von 7,2–7,3 eingestellt und mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße: 0,22 µm, Fa. VWR, Darmstadt) sterilfiltriert. Im Kühlschrank wurde die Stammlösung maximal 4 Wochen lang aufbewahrt.

#### Slicing- und Reifungsmedium

20 ml	TCM - Stammlösung
12 mg	Calciumlaktat (C 8356, Fa. Sigma, Taufkirchen)
5 mg	Natriumpyruvat (P 4562, Fa. Sigma, Taufkirchen)

2 mg	L-Cystein (Fa. Merck, Darmstadt)
60 mg	BSA (A 9647, Fa. Sigma, Taufkirchen)

Das Medium wurde am Tag der Verwendung hergestellt und vor der Verwendung mindestens drei Stunden im Brutschrank äquilibriert. Pro Katze wurden für das Slicen 10ml Medium verwendet. Die übrigen 10ml wurden mit einem Rotrandfilter (Porengröße 0,2µm, Fa. VWR, Darmstadt) in drei kleine Petrischalen (Ø 40mm, Fa. VWR, Darmstadt) sterilfiltriert. In 4-Well-Schalen (Nunc-Multischalen, Fa. VWR, Darmstadt) wurden je 400µl sterilfiltriertes Medium mit den unten genannten Hormonen supplementiert und danach mindestens eine Stunde lang äquilibriert.

8 µl	FHS – Stammlösung (siehe S. 76)
1 µl	LH - Stammlösung (siehe S. 75)

### **TL - Stammlösung**

250 ml	Embryowasser (W 1503, Fa. Sigma, Taufkirchen)
595 mg	Medium 199 Hepes Modification (M 2520, Fa. Sigma, Taufkirchen)
1450 mg	NaCl (S 5886, Fa. Sigma, Taufkirchen)
57,5 mg	KCl (Fa. Merck, Darmstadt)
522,5 mg	NaHCO <sub>3</sub> (S 5761, Fa. Sigma, Taufkirchen)
9 mg	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fa. Merck, Darmstadt)
920 µl	Natriumlaktat-Sirup (L 1375, Fa. Sigma, Taufkirchen)
25 mg	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (M 0250, Fa. Sigma, Taufkirchen)
75 mg	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (C 3881, Fa. Sigma, Taufkirchen)
62 mg	Calciumlaktat (C 8356, Fa. Sigma, Taufkirchen)
2,5 mg	Phenolrot (P 5530, Fa. Sigma, Taufkirchen)

Das Medium wurde auf einen pH-Wert von 7,2–7,3 eingestellt und mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,22µm, Fa. VWR, Darmstadt) sterilfiltriert. Im Kühlschrank wurde die Stammlösung maximal 4 Wochen lang aufbewahrt.

**Swim up - Medium (TALP)**

10 ml	TL - Stammlösung
60 mg	BSA (A 9647, Fa. Sigma, Taufkirchen)
2,2 mg	Natriumpyruvat (P 4562, Fa. Sigma, Taufkirchen)

Das Medium wurde am Tag der Verwendung hergestellt und vor der Verwendung mindestens drei Stunden im Brutschrank äquilibriert. Danach wurde je 1 ml mit einem Rotrandfilter (Porengröße 0,2µm, Fa. VWR, Darmstadt) steril in sterile 5ml-Röhrchen (Fa. VWR, Darmstadt) filtriert.

**Befruchtungsmedium**

10 ml	TL - Stammlösung
60 mg	BSA (A 9647, Fa. Sigma, Taufkirchen)
2,2 mg	Natriumpyruvat (P 4562, Fa. Sigma, Taufkirchen)
100µl	Heparin – Stammlösung (siehe S. 76)

Das Medium wurde am Tag der Verwendung hergestellt und vor der Verwendung mindestens drei Stunden im Brutschrank äquilibriert. Danach wurde es mit einem Rotrandfilter (Porengröße 0,2µm, Fa. VWR, Darmstadt) sterilfiltriert, und je 400µl in eine 4-Well-Schale (Nunc-Multischalen, Fa. VWR, Darmstadt) pipettiert.

**SOF – Stammlösung**

100 ml	Embryowasser (W 1503, Fa. Sigma, Taufkirchen)
629,2 mg	NaCl (S 5886, Fa. Sigma, Taufkirchen)
53,4 mg	KCl (Fa. Merck, Darmstadt)
16,2 mg	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fa. Merck, Darmstadt)
210,6 mg	NaHCO <sub>3</sub> (S 5761, Fa. Sigma, Taufkirchen)
50 µl	Phenolrot-Lösung (Fa. Gibco, Schottland)
500 µl	L-Glutamin (G 6392, Fa. Sigma, Taufkirchen)
47,06 µl	Natriumlaktat-Sirup (L 1375, Fa. Sigma, Taufkirchen)

24,8 mg CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (C 3881, Fa. Sigma, Taufkirchen)

9,6 mg MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O (M 0250, Fa. Sigma, Taufkirchen)

Das Medium wurde auf einen pH-Wert von 7,2–7,3 eingestellt und mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,22µm, Fa. VWR, Darmstadt) sterilfiltriert. Im Kühlschrank wurde die Stammlösung maximal 4 Wochen lang aufbewahrt.

### **Kulturmedium**

10 ml SOF - Stammlösung

2,2 mg Natriumpyruvat (P 4562, Fa. Sigma, Taufkirchen)

100 µl BME (essentielle Aminosäuren, B 6766, Fa. Sigma, Taufkirchen)

50 µl MEM (nicht- essentielle Aminosäuren, M 7145, Fa. Sigma, Taufkirchen)

1 ml ECS (siehe S. 76)

Das Medium wurde am Tag der Verwendung hergestellt und vor der Verwendung mindestens drei Stunden im Brutschrank äquilibriert. Danach wurde es mit einem Rotrandfilter (Porengröße 0,2µm, Fa. VWR, Darmstadt) sterilfiltriert, und je 400µl in eine 4-Well-Schale (Nunc-Multischalen, Fa. VWR, Darmstadt) pipettiert.

## **8.2 Medienzusätze**

### **LH – Stammlösung**

1 Flasche (50.000 IU) bovines LH (Sioux Biochemical Inc., USA, Ch.B. 3527)

10ml 0,9%ige NaCl-Lösung

Das Protein wurde in NaCl-Lösung aufgelöst und in Eppendorf-Cups á 40µl bei -20°C aufbewahrt. Vor der Verwendung wurde es maximal 3 Tage im Kühlschrank gelagert.

Die Konzentration der Stammlösung beträgt 5000 IU/ml, bei Zusatz von 1µl LH-Stammlösung in 400µl Reifungsmedium beträgt die Endkonzentration 12,5 IU/ml.

### **FSH – Stammlösung**

1 Flasche (650 IU) bovines FSH (Sioux Biochemical Inc., USA, Ch.B. 3619)

10ml 0,9%ige NaCl-Lösung

Das Protein wurde in NaCl-Lösung aufgelöst und in Eppendorf-Cups á 40µl bei -20°C aufbewahrt. Vor der Verwendung wurde es maximal 3 Tage im Kühlschrank gelagert.

Die Konzentration der Stammlösung beträgt 65 IU/ml, bei Zusatz von 8µl FSH-Stammlösung in 400µl Reifungsmedium beträgt die Endkonzentration 1,3 IU/ml.

### **Östradiol – Stammlösung**

1mg 17β-Östradiol (E 2257, Fa. Sigma, Taufkirchen)

1 ml Ethanol 96%ig

24 ml Reifungsmedium (siehe Anhang S. 72)

Das Östradiol wurde in Ethanol aufgelöst und mit sterilfiltriertem Reifungsmedium gemischt. Anschließend wurde es in Eppendorf-Cups á 40 µl bei -20°C eingefroren. Vor der Verwendung wurde es maximal 3 Tage im Kühlschrank gelagert.

Die Konzentration der Stammlösung beträgt 40µg/ml, bei Zusatz von 10µl Östradiol-Stammlösung in 400µl Reifungsmedium beträgt die Endkonzentration 1 µg/ml.

### **Heparin – Stammlösung**

5 mg Heparin (H 3149, Fa. Sigma, Taufkirchen)

5 ml Embryowasser (W 1503, Fa. Sigma, Taufkirchen)

Das aufgelöste Heparin wurde in Eppendorf-Cups á 100µl bei -20°C eingefroren. Bei Zusatz von 100µl Heparin-Stammlösung in 10ml Befruchtungsmedium beträgt die Endkonzentration 10µg/ml.

### **Östrisches Kuhserum (ECS)**

Zur Gewinnung von ECS wurde von zwei brünstigen Kühen je 1l Blut in sterile 50ml-Röhrchen (Fa. VWR, Darmstadt) ohne Zusatz von Gerinnungshemmern abgefüllt und bis zur Gerinnung eine Stunde lang stehen gelassen. Anschließend wurde das Blut 20min bei 2.500g zentrifugiert und das Serum in sterile 50ml-Röhrchen abpipettiert. Nach einer zweiten

Zentrifugation (10min, 2.500g) wurde das Serum in einem Becherglas gepoolt, und zur Inaktivierung des Komplementsystems 30min in einem auf 56°C erwärmten Wasserbad inkubiert. Danach wurde es in Eppendorf-Cups á 1 ml bei -20°C eingefroren.

## 8.3 Vitrifikationsmedien

### Medium 199 - Stammlösung

4500 mg      Medium 199 Hepes Modification (M 2520, Fa. Sigma, Taufkirchen)

660 mg      NaHCO<sub>3</sub> (S 5761, Fa. Sigma, Taufkirchen)

*ad* 300 ml    Embryowasser (W 1503, Fa. Sigma, Taufkirchen)

Das Medium wurde auf einen pH-Wert von 7,2–7,3 eingestellt und mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,22µm, Fa. VWR, Darmstadt) sterilfiltriert. Im Kühlschrank wurde die Stammlösung maximal 1 Woche lang aufbewahrt.

### 1M Saccharose - Stammlösung

20,538 g      Saccharose (S 7903, Fa. Sigma, Taufkirchen)

*ad* 60 ml      Medium 199 - Stammlösung

Das Medium wurde auf einen pH-Wert von 7,2–7,3 eingestellt und mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,22µm, Fa. VWR, Darmstadt) sterilfiltriert. Im Kühlschrank wurde die Stammlösung maximal 1 Woche lang aufbewahrt.

### Äquilibrationsmedium

6,5 ml      Medium 199 - Stammlösung

750 µl      Ethylenglykol (E 9129, Fa. Sigma, Taufkirchen)

750 µl      DMSO (D 5879, Fa. Sigma, Taufkirchen)

2 ml      FCS (Ch.B. 224B, Fa. Biochrom, Berlin)

Das Medium wurde am Tag der Verwendung hergestellt und je 3ml in kleine Petrischalen (Ø 40mm, Fa. VWR, Darmstadt) gefüllt. Die Molarität des Mediums beträgt etwa 2000mOsm.

### **Vitrifikationsmedium**

5 ml	1M Saccharose - Stammlösung
1,5 ml	Ethylenglykol (E 9129, Fa. Sigma, Taufkirchen)
1,5 ml	DMSO (D 5879, Fa. Sigma, Taufkirchen)
2 ml	FCS (Ch.B. 224B, Fa. Biochrom, Berlin)

Das Medium wurde am Tag der Verwendung hergestellt und je 3ml in kleine Petrischalen (Ø 40mm, Fa. VWR, Darmstadt) gefüllt. Die Molarität des Mediums beträgt ca. 4-5000 mOsm.

### **Dilutionsmedium**

5 ml	1M Saccharose - Stammlösung
3 ml	Medium 199 - Stammlösung
2 ml	FCS (Ch.B. 224B, Fa. Biochrom, Berlin)

Das Medium wurde am Tag der Verwendung hergestellt und je 3ml in kleine Petrischalen (Ø 40mm, Fa. VWR, Darmstadt) gefüllt. Die Molarität des Mediums beträgt ca. 1000mOsm.

### **Waschmedium**

24 ml	Medium 199 - Stammlösung
6 ml	FCS (Ch.B. 224B, Fa. Biochrom, Berlin)

Das Medium wurde am Tag der Verwendung hergestellt und je 3ml in kleine Petrischalen (Ø 40mm, Fa. VWR, Darmstadt) gefüllt. Die Molarität des Mediums beträgt etwa 300mOsm. Für das Waschen der Zellen wurde eine Petrischale bei Raumtemperatur belassen, zwei weitere wurden im Brutschrank mindestens 30min äquilibriert.

## **8.4 Fixations- und Färbelösung**

### **Fixationslösung**

25 ml	Eisessig 100%ig (A 6283, Fa. Sigma, Taufkirchen)
75 ml	Ethanol 96%ig

**Aceto-Orcein-Färbelösung**

1 g	Orcein (07380, Fa. Sigma, Taufkirchen)
45 ml	Eisessig 100%ig (A 6283, Fa. Sigma, Taufkirchen)
55 ml	Aqua dest.

Zur besseren Auflösung wurde das Orcein in einem Teil des Eisessig-Wasser-Gemisches über dem Bunsenbrenner bis fast zum Siedepunkt erhitzt, danach wurde die restliche Eisessig-Lösung hinzugegeben. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit Filterpapier filtriert.

**Entfärbelösung**

20 ml	Eisessig 100%ig (A 6283, Fa. Sigma, Taufkirchen)
20 ml	Glycerol (G 2025, Fa. Sigma, Taufkirchen)
60 ml	Aqua dest.



## 8.5 Literaturverzeichnis

- Agca Y., Liu J., Ruutledge J.J., Critser E.S. und Critser J.K. (2000). Effect of osmotic stress on the developmental competence of germinal vesicle and metaphase II stage bovine cumulus oocyte complexes and its relevance to cryopreservation. *Mol Reprod Dev* **55**(2): 212-9.
- Ahn M.H., Seok H.B., Kim I.D. und Son D.S. (2004). Comparison of the survival of in vitro-derived porcine oocytes and embryos vitrified by open pulled straw, electron microscope grid, and nylon loop system. *Reprod Fertil Dev* **16**(1,2): 162 (abstr).
- Aigner S., Van Der Elst J., Siebzehnruhl E., Wildt L., Lang N. und Van Steirteghem A.C. (1992). *The influence of slow and ultra-rapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte*. *Hum Reprod* **7**(6): 857-64.
- Albertini D.F. (1995). The cytoskeleton as a target for chilling injury in mammalian cumulus oocyte complexes. *Cryobiology* **32**: 551-2.
- Allworth A.E. und Albertini D.F. (1993). Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev Biol* **158**(1): 101-12.
- Anchordoguy T.J., Rudolph A.S., Carpenter J.F. und Crowe J.H. (1987). *Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing*. *Cryobiology* **24**(4): 324-31.
- Aono N., Naganuma T., Abe Y., Hara K., Sasada H., Sato E. und Yoshida H. (2003). Successful production of blastocysts following ultrarapid vitrification with step-wise equilibration of germinal vesicle-stage mouse oocytes. *J Reprod Dev* **49**(6): 501-6.
- Arav A., Zeron Y., Leslie S.B., Behboodi E., Anderson G.B. und Crowe J.H. (1996). *Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes*. *Cryobiology* **33**(6): 589-99.
- Asada M., Ishibashi S., Ikumi S. und Fukui Y. (2002). Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology* **58**(6): 1199-208.
- Ashwood-Smith M.J., Morris G.W., Fowler R., Appleton T.C. und Ashorn R. (1988). Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* **3**(6): 795-802.
- Axner E., Pukazhenti B.S., Wildt D.E., Linde-Forsberg C. und Spindler R.E. (2002). *Creatine phosphokinase in domestic cat epididymal spermatozoa*. *Mol Reprod Dev* **62**(2): 265-70.
- Barnes F., Damiani P., Looney C.R. und Duby R.T.A. (1997). *The meiotic stage affects subsequent development of cooled bovine oocytes*. *Theriogenology* **47**: 183 (abstr).
- Bavister B.D. (1995). Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* **1**: 91-148.
- Bavister B.D. (2000). *Interactions between embryos and the culture milieu*. *Theriogenology* **53**(2): 619-26.
- Begin I., Bhatia B., Baldassarre H., Dinnyes A. und Keefer C.L. (2003). Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology* **59**(8): 1839-50.
- Beker A.R., Colenbrander B. und Bevers M.M. (2002). *Effect of 17beta-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes*. *Theriogenology* **58**(9): 1663-73.
- Bielanski A., Nadin-Davis S., Sapp T. und Lutze-Wallace C. (2000). *Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen*. *Cryobiology* **40**(2): 110-6.
- Bing Y.Z., Hirao Y., Iga K., Che L.M., Takenouchi N., Kuwayama M., Fuchimoto D., Rodriguez-Martinez H. und Nagai T. (2002). In vitro maturation and glutathione

- synthesis of porcine oocytes in the presence or absence of cysteamine under different oxygen tensions: role of cumulus cells. Reprod Fertil Dev **14**(3-4): 125-31.
- Bogliolo L., Leoni G., Ledda S., Naitana S., Zedda M., Carluccio A. und Pau S. (2001). Intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. Theriogenology **56**(5): 955-67.
- Brucker C. und Lipford G.B. (1995). The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. Hum Reprod Update **1**(1): 51-62.
- Campos I., Coy P., Romar R., Ruiz S. und Gadea J. (2001). Effects of maturational stage, cumulus cells and coincubation of mature and immature cumulus-oocyte complexes on in vitro penetrability of porcine oocytes. Theriogenology **55**(7): 1489-500.
- Carney E.W. und Bavister B.D. (1987). Stimulatory and inhibitory effects of amino acids on the development of hamster eight-cell embryos in vitro. J In Vitro Fert Embryo Transf **4**(3): 162-7.
- Cecconi S., Capacchietti G., Russo V., Berardinelli P., Mattioli M. und Barboni B. (2004). *In vitro growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue.* Biol Reprod **70**(1): 12-7.
- Cecconi S., D'aurizio R. und Colonna R. (1996). Role of antral follicle development and cumulus cells on in vitro fertilization of mouse oocytes. J Reprod Fertil **107**(2): 207-14.
- Chen L., Russell P.T. und Larsen W.J. (1993). Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. Mol Reprod Dev **34**(1): 87-93.
- Chen S.U., Lien Y.R., Chao K.H., Ho H.N., Yang Y.S. und Lee T.Y. (2003). Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing--a review article. Mol Cell Endocrinol **202**(1-2): 101-7.
- Chen S.U., Lien Y.R., Cheng Y.Y., Chen H.F., Ho H.N. und Yang Y.S. (2001). Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. Hum Reprod **16**(11): 2350-6.
- Chian R.C., Kuwayama M., Tan L., Tan J., Kato O. und Nagai T. (2004). *High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification.* J Reprod Dev **50**(6): 685-96.
- Chian R.C., Okuda K. und Niwa K. (1995). Influence of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine oocytes derived from in vitro maturation. Anim Reprod Sci **38**: 37-48.
- Comizzoli P., Wildt D.E. und Pukazhenthil B.S. (2003). Overcoming poor in vitro nuclear maturation and developmental competence of domestic cat oocytes during the non-breeding season. Reproduction **126**(6): 809-16.
- Comizzoli P., Wildt D.E. und Pukazhenthil B.S. (2004). Effect of 1,2-propanediol versus 1,2-ethanediol on subsequent oocyte maturation, spindle integrity, fertilization, and embryo development in vitro in the domestic cat. Biol Reprod **71**(2): 598-604.
- Crichton E.G., Bedows E., Miller-Lindholm A.K., Baldwin D.M., Armstrong D.L., Graham L.H., Ford J.J., Gjørret J.O., Hyttel P., Pope C.E., Vajta G. und Loskutoff N.M. (2003). *Efficacy of porcine gonadotropins for repeated stimulation of ovarian activity for oocyte retrieval and in vitro embryo production and cryopreservation in Siberian tigers (Panthera tigris altaica).* Biol Reprod **68**(1): 105-13.
- Crowe J.H., Crowe L.M., Carpenter J.F., Rudolph A.S., Wistrom C.A., Spargo B.J. und Anchoroguy T.J. (1988). *Interactions of sugars with membranes.* Biochim Biophys Acta **947**(2): 367-84.
- Crozet N. (1989). Nucleolar structure and RNA synthesis in mammalian oocytes. J Reprod Fertil Suppl **38**: 9-16.

- Dattena M., Accardo C., Pilichi S., Isachenko V., Mara L., Chessa B. und Cappai P. (2004). Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. *Theriogenology* **62**(3-4): 481-93.
- De Matos D.G., Furnus C.C. und Moses D.F. (1997). Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod* **57**(6): 1420-5.
- De Matos D.G., Furnus C.C., Moses D.F., Martinez A.G. und Matkovic M. (1996). Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev* **45**(4): 451-7.
- Dekel N., Lawrence T.S., Gilula N.B. und Beers W.H. (1981). Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Dev Biol* **86**(2): 356-62.
- Dhali A., Manik R.S., Das S.K., Singla S.K. und Palta P. (2000). *Vitrification of buffalo (Bubalus bubalis) oocytes*. *Theriogenology* **53**(6): 1295-303.
- Dieleman S.J., Kruij T.A., Fontijne P., De Jong W.H. und Van Der Weyden G.C. (1983). Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. *J Endocrinol* **97**(1): 31-42.
- Dinnyes A., Dai Y., Jiang S. und Yang X. (2000). High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* **63**(2): 513-8.
- Dode M.A. und Graves C. (2002). Involvement of steroid hormones on in vitro maturation of pig oocytes. *Theriogenology* **57**(2): 811-21.
- Donnay I., Faerge I., Grondahl C., Verhaeghe B., Sayoud H., Ponderato N., Galli C. und Lazzari G. (2004). Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes. *Theriogenology* **62**(6): 1093-107.
- Donoghue A.M., Johnston L.A., Goodrowe K.L., O'Brien S.J. und Wildt D.E. (1993). Influence of day of oestrus on egg viability and comparative efficiency of in vitro fertilization in domestic cats in natural or gonadotrophin-induced oestrus. *J Reprod Fertil* **98**(1): 85-90.
- Edwards R.G. (1965). Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* **208**(8): 349-51.
- Eppig J.J. (1996). Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* **8**(4): 485-9.
- Eppig J.J. und Koide S.L. (1978). Effects of progesterone and oestradiol-17beta on the spontaneous meiotic maturation of mouse oocytes. *J Reprod Fertil* **53**(1): 99-101.
- Erbach G.T., Bhatnagar P., Baltz J.M. und Biggers J.D. (1995). Zinc is a possible toxic contaminant of silicone oil in microdrop cultures of preimplantation mouse embryos. *Hum Reprod* **10**(12): 3248-54.
- Erickson G.F. und Danforth D.R. (1995). *Ovarian control of follicle development*. *Am J Obstet Gynecol* **172**(2 Pt 2): 736-47.
- Eroglu A., Elliott G. und Bhowmick P. (2003a). *Developing mouse embryos progressively eliminate microinjected trehalose*. *Fertil Steril* **80**: 64 (abstr).
- Eroglu A., Lawitts J.A., Toner M. und Toth T.L. (2003b). Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. *Cryobiology* **46**(2): 121-34.
- Eroglu A., Toner M., Leykin L. und Toth T.L. (1998a). Cytoskeleton and polyploidy after maturation and fertilization of cryopreserved germinal vesicle-stage mouse oocytes. *J Assist Reprod Genet* **15**(7): 447-54.
- Eroglu A., Toner M. und Toth T.L. (2002). Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertil Steril* **77**(1): 152-8.

- Eroglu A., Toth T.L. und Toner M. (1998b). Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. Fertil Steril **69**(5): 944-57.
- Fabbri R., Porcu E., Marsella T., Rocchetta G., Venturoli S. und Flamigni C. (2001). *Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival*. Hum Reprod **16**(3): 411-6.
- Farstad W. (2000). Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. Anim Reprod Sci **60-61**: 375-87.
- Fatehi A.N., Zeinstra E.C., Kooij R.V., Colenbrander B. und Bevers M.M. (2002). Effect of cumulus cell removal of in vitro matured bovine oocytes prior to in vitro fertilization on subsequent cleavage rate. Theriogenology **57**(4): 1347-55.
- Fortune J.E. und Hansel W. (1985). Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. Biol Reprod **32**(5): 1069-79.
- Fountain D., Ralston M., Higgins N., Gorlin J.B., Uhl L., Wheeler C., Antin J.H., Churchill W.H. und Benjamin R.J. (1997). *Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components*. Transfusion **37**(6): 585-91.
- Freistedt P., Stojkovic M. und Wolf E. (2001a). Efficient in vitro production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid medium: effects of season and ovarian status. Biol Reprod **65**(1): 9-13.
- Freistedt P., Stojkovic M.B., Bonhoeffer T., Braun J. und Wolf E. (1999). *In vitro production (IVP) of domestic cat embryos using a modified IVP bovine system*. Theriogenology **51**(1): 285 (abstr).
- Freistedt P., Stojkovic P., Wolf E. und Stojkovic M. (2001b). Energy status of nonmatured and in vitro-matured domestic cat oocytes and of different stages of in vitro-produced embryos: enzymatic removal of the zona pellucida increases adenosine triphosphate content and total cell number of blastocysts. Biol Reprod **65**(3): 793-8.
- Fuku E., Xia L. und Downey B.R. (1995a). Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. Cryobiology **32**(2): 139-56.
- Fuku E.J., Liu J. und Downey B.R. (1995b). In vitro viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. Mol Reprod Dev **40**(2): 177-85.
- Fukui Y., Fukushima Y., Terawaki Y. und Ono H. (1982). Effect of gonadotropins, steroids and culture media on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. Theriogenology **18**: 161-75.
- Gardner D.K. (1998). Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. Theriogenology **49**(1): 83-102.
- Gardner D.K. und Lane M. (1993). Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. Biol Reprod **48**(2): 377-85.
- Geshi M., Takenouchi N., Yamauchi N. und Nagai T. (2000). Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. Biol Reprod **63**(6): 1730-4.
- Glenister P.H., Wood M.J., Kirby C. und Whittingham D.G. (1987). Incidence of chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized in vitro. Gamete Res **16**(3): 205-16.
- Gomez M.C., Pope C.E., Harris R., Davis A., Mikota S. und Dresser B.L. (2000). *Births of kittens produced by intracytoplasmic sperm injection of domestic cat oocytes matured in vitro*. Reprod Fertil Dev **12**(7-8): 423-33.

- Gomez M.C., Pope E., Harris R., Mikota S. und Dresser B.L. (2003). Development of in vitro matured, in vitro fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. *Theriogenology* **60**(2): 239-51.
- Goodrowe K.L., Hay M. und King W.A. (1991). Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes in vitro. *Biol Reprod* **45**(3): 466-70.
- Goodrowe K.L., Howard J.G., Schmidt P.M. und Wildt D.E. (1989). Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in-vitro fertilization. *J Reprod Fertil Suppl* **39**: 73-90.
- Goodrowe K.L., Wall R.J., O'brien S.J., Schmidt P.M. und Wildt D.E. (1988). Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro. *Biol Reprod* **39**(2): 355-72.
- Gook D.A., Osborn S.M., Bourne H. und Johnston W.I. (1994). Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal karyotypes and absence of stray chromosomes. *Hum Reprod* **9**(4): 684-91.
- Gook D.A., Osborn S.M. und Johnston W.I. (1993). Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum Reprod* **8**(7): 1101-9.
- Goud P.T., Goud A.P., Qian C., Laverge H., Van Der Elst J., De Sutter P. und Dhont M. (1998). In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Hum Reprod* **13**(6): 1638-44.
- Hay M.A. und Goodrowe K.L. (1993). Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. *J Reprod Fertil Suppl* **47**: 297-305.
- Herrick J.R. und Swanson W.F. (2003). Gonadotropin exposure, salt storage and storage duration affect penetration of domestic cat oocytes by homologous spermatozoa. *Theriogenology* **59**(7): 1503-13.
- Hochi S. (2003). Japanese Society for Animal Reproduction: award for outstanding research 2002. Cryopreservation of follicular oocytes and preimplantation embryos in cattle and horses. *J Reprod Dev* **49**(1): 13-21.
- Hochi S., Akiyama M., Minagawa G., Kimura K. und Hanada A. (2001). Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of in vitro-matured bovine oocytes. *Cryobiology* **42**(1): 69-73.
- Hochi S., Ito K., Hirabayashi M., Ueda M., Kimura K. und Hanada A. (1998). Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. *Theriogenology* **49**(4): 787-96.
- Hochi S., Kanamori A., Kimura K. und Hanada A. (1997). In vitro fertilizing ability of bovine oocytes frozen-thawed at immature, maturing, and mature stages. *J Mamm Ova Res* **14**: 61-5.
- Hochi S., Terao T., Kamei M., Kato M., Hirabayashi M. und Hirao M. (2004). Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. *Theriogenology* **61**(2-3): 267-75.
- Hoffert K.A., Anderson G.B., Wildt D.E. und Roth T.L. (1997). Transition from maternal to embryonic control of development in IVM/IVF domestic cat embryos. *Mol Reprod Dev* **48**(2): 208-15.
- Howard J. (1986). Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In: *Current Therapy in Theriogenology*. Da M. (Eds). Philadelphia, Saunders: 1047-53.
- Howard J., Bush M. und Wildt D.E. (1991). Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona-free hamster ova and cat zonae pellucidae. *J Androl* **12**(1): 36-45.

- Hurtt A.E., Landim-Alvarenga F., Seidel G.E., Jr. und Squires E.L. (2000). Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology* **54**(1): 119-28.
- Hyttel P., Vajta G. und Callesen H. (2000). Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: ultrastructural consequences. *Mol Reprod Dev* **56**(1): 80-8.
- Inaba Y., Dochi O. und Koyama H. (2004). Effects of using micro-pipette tips of different diameters and volume of vitrification solution on the viability of IVM bovine oocytes after vitrification. *Reprod Fertil Dev* **16**(1,2): 171-2.
- Isachenko V., Alabart J.L., Nawroth F., Isachenko E., Vajta G. und Folch J. (2001a). The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? *Cryo Letters* **22**(3): 157-62.
- Isachenko V., Gorbunov L., E I., Ostashko F. und Bezugly N. (1999). *Some physical and technological aspects of GV porcine oocytes vitrification*. *Cryobiology* **39**: 35 (abstr).
- Isachenko V., Isachenko E., Michelmann H.W., Alabart J.L., Vazquez I., Bezugly N. und Nawroth F. (2001b). *Lipolysis and ultrastructural changes of intracellular lipid vesicles after cooling of bovine and porcine GV-oocytes*. *Anat Histol Embryol* **30**(6): 333-8.
- Isachenko V., Montag M., Isachenko E., Zaeva V., Krivokharchenko I., Shafei R. und Van Der Ven H. (2005). *Aseptic technology of vitrification of human pronuclear oocytes using open-pulled straws*. *Hum Reprod* **20**(2): 492-96.
- Isachenko V., Soler C., Isachenko E., Perez-Sanchez F. und Grishchenko V. (1998). Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* **36**(3): 250-3.
- Jewgenow K., Penfold L.M., Meyer H.H. und Wildt D.E. (1998). Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *J Reprod Fertil* **112**(1): 39-47.
- Johnson M.H. und Pickering S.J. (1987). The effect of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development* **100**(2): 313-24.
- Johnston L.A., Donoghue A.M., O'brien S.J. und Wildt D.E. (1991a). Culture medium and protein supplementation influence in vitro fertilization and embryo development in the domestic cat. *J Exp Zool* **257**(3): 350-9.
- Johnston L.A., Donoghue A.M., O'brien S.J. und Wildt D.E. (1991b). Influence of temperature and gas atmosphere on in-vitro fertilization and embryo development in domestic cats. *J Reprod Fertil* **92**(2): 377-82.
- Johnston L.A., O' Brien S.J. und Wildt D.E. (1989). *In vitro maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes*. *Gamete Res* **24**(3): 343-56.
- Kanda M., Miyazaki T., Nakao H. und Tsutsui T. (1998). Development of in vitro fertilized feline embryos in a modified Earle's balanced salt solution: influence of protein supplements and culture dishes on fertilization success and blastocyst formation. *J Vet Med Sci* **60**(4): 423-31.
- Karja N.W., Otoi T., Murakami M., Fahrudin M. und Suzuki T. (2002a). In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. *Theriogenology* **57**(9): 2289-98.
- Karja N.W., Otoi T., Murakami M., Yuge M., Fahrudin M. und Suzuki T. (2002b). *Effect of protein supplementation on development to the hatching and hatched blastocyst stages of cat IVF embryos*. *Reprod Fertil Dev* **14**(5-6): 291-6.
- Kasai M., Zhu S.E., Pedro P.B., Nakamura K., Sakurai T. und Edashige K. (1996). *Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming*. *Cryobiology* **33**(4): 459-64.

- Katska-Ksiazkiewicz L., Rynska B., Kania G., Smorag Z., Gajda B. und Pienkowski M. (2003). *Timing of nuclear maturation of nonstored and stored domestic cat oocytes*. Theriogenology **59**(7): 1567-74.
- Kitiyant Y., Saikhun J. und Pavasuthipaisit K. (2003). Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for in vitro maturation. Theriogenology **59**(8): 1775-86.
- Kubota C., Yang X., Dinnyes A., Todoroki J., Yamakuchi H., Mizoshita K., Inohae S. und Tabara N. (1998). *In vitro and in vivo survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation*. Mol Reprod Dev **51**(3): 281-6.
- Kuleshova L.L. und Lopata A. (2002). *Vitrification can be more favorable than slow cooling*. Fertil Steril **78**(3): 449-54.
- Kuleshova L.L., Macfarlane D.R., Trounson A.O. und Shaw J.M. (1999). Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. Cryobiology **38**(2): 119-30.
- Kuwayama M., Fujikawa S. und Nagai T. (1994). Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in glycerol 1,2-propanediol using 2-step and 16-step procedures. Cryobiology **31**(5): 415-22.
- Lane M. und Gardner D.K. (1992). Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos in vitro. Hum Reprod **7**(4): 558-62.
- Laufer N., Decherney A.H., Haseltine F.P. und Behrman H.R. (1984). *Steroid secretion by the human egg-corona-cumulus complex in culture*. J Clin Endocrinol Metab **58**(6): 1153-7.
- Le Gal F. und Massip A. (1999). Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. Cryobiology **38**(4): 290-300.
- Ledda S., Leoni G., Bogliolo L. und Naitana S. (2001). *Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking*. Theriogenology **55**(6): 1359-71.
- Leibfried-Rutledge M.L., Critser E.S. und First N.L. (1986). Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. Biol Reprod **35**(4): 850-7.
- Leibo S.P. (1984). A one step method for direct non surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology **21**(767-90).
- Leyva H., Madley T. und Stabenfeldt G.H. (1989). Effect of melatonin on photoperiod responses, ovarian secretion of oestrogen, and coital responses in the domestic cat. J Reprod Fertil Suppl **39**: 135-42.
- Luna H.S., Ferrari I. und Rumpf R. (2001). Influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. Anim Reprod Sci **68**(1-2): 23-8.
- Luvoni G.C. und Oliva O. (1993). Effect of medium-199 and fetal calf serum on in vitro maturation of domestic cat oocytes. J Reprod Fertil Suppl **47**: 203-7.
- Luvoni G.C. und Pellizzari P. (2000). Embryo development in vitro of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. Theriogenology **53**(8): 1529-40.
- Luvoni G.C., Pellizzari P. und Battocchio M. (1997). Effects of slow and ultrarapid freezing on morphology and resumption of meiosis in immature cat oocytes. J Reprod Fertil Suppl **51**: 93-8.
- Maclellan L.J., Carnevale E.M., Coutinho Da Silva M.A., Scoggin C.F., Bruemmer J.E. und Squires E.L. (2002). *Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares*. Theriogenology **58**(5): 911-9.
- Mahadevan M.M. und Trounson A.O. (1984). The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization. Fertil Steril **42**(3): 400-5.
- Marin Bivens C.L., Grondahl C., Murray A., Blume T., Su Y.Q. und Eppig J.J. (2004a). Meiosis-activating sterol promotes the metaphase I to metaphase II transition and

- preimplantation developmental competence of mouse oocytes maturing in vitro. Biol Reprod **70**(5): 1458-64.
- Marin Bivens C.L., Lindenthal B., O'brien M.J., Wigglesworth K., Blume T., Grondahl C. und Eppig J.J. (2004b). A synthetic analogue of meiosis-activating sterol (FF-MAS) is a potent agonist promoting meiotic maturation and preimplantation development of mouse oocytes maturing in vitro. Hum Reprod **19**(10): 2340-4.
- Martino A., Pollard J.W. und Leibo S.P. (1996a). *Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence*. Mol Reprod Dev **45**(4): 503-12.
- Martino A., Songsasen N. und Leibo S.P. (1996b). Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. Biol Reprod **54**(5): 1059-69.
- Massip A. (2001). *Cryopreservation of embryos of farm animals*. Reprod Domest Anim **36**(2): 49-55.
- Massip A. (2003). Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments. Reprod Nutr Dev **43**(4): 325-30.
- Massip A., Mermillod P. und Dinnyes A. (1995). Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. Hum Reprod **10**(11): 3004-11.
- Matsumoto H., Jiang J.Y., Tanaka T., Sasada H. und Sato E. (2001). *Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh*. Cryobiology **42**(2): 139-44.
- Maurer H.R. (1992). *Towards serum-free, chemically defined media for mammalian cell culture*. In: Animal cell culture: A practical approach. Freshney R. (Eds). Oxford, Oxford University Press: 15-46.
- Mavrides A. und Morroll D. (2002). Cryopreservation of bovine oocytes: is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete? Reprod Nutr Dev **42**(1): 73-80.
- Meinecke B. (2000). *Reproduktion beim weiblichen Tier*. In: Physiologie der Haustiere. Breves G. (Eds). Stuttgart, Enke-Verlag: 514-37.
- Men H., Monson R.L., Parrish J.J. und Rutledge J.J. (2003). *Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes resulting from cryopreservation*. Mol Reprod Dev **64**(2): 245-50.
- Men H., Monson R.L. und Rutledge J.J. (2002). Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. Theriogenology **57**(3): 1095-103.
- Miller A.M., Roelke M.E., Goodrowe K.L., Howard J.G. und Wildt D.E. (1990). *Oocyte recovery, maturation and fertilization in vitro in the puma (Felis concolor)*. J Reprod Fertil **88**(1): 249-58.
- Miyake T., Kasai M., Zhu S.F., Sakurai T. und Machida T. (1993). Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an Ethylene Glycol -based solution by a simple method. Theriogenology **40**: 121-34.
- Moore H.D. (2001). *Molecular biology of fertilization*. J Reprod Fertil Suppl **57**: 105-10.
- Motlik J., Fulka J. und Flechon J.E. (1986). Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation in vivo and in vitro. J Reprod Fertil **76**(1): 31-7.
- Murakami M., Nishida T., Iwanaga S. und Shiromoto M. (1984). Scanning and transmission electron microscopic evidence of epithelial phagocytosis of spermatozoa in the terminal region of the vas deferens of the cat. Experientia **40**(9): 958-60.
- Murakami M., Otoi T., Karja N.W., Ooka A. und Suzuki T. (2002). Effects of serum-free culture media on in vitro development of domestic cat embryos following in vitro maturation and fertilization. Reprod Domest Anim **37**(6): 352-6.



- Murakami M., Otoi T., Karja N.W., Wongsrikeao P., Agung B. und Suzuki T. (2004). *Blastocysts derived from in vitro-fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose*. Cryobiology **48**(3): 341-8.
- Nagashima H., Kuwayama M., Grupen C.G., Ashman R.J. und Nottle M.B. (1996). *Vitrification of porcine early stage embryos and oocytes after removal of cytoplasmic lipid droplets*. Theriogenology **45**: 180 (abstr).
- Nedambale T.L., Dinnyes A., Yang X. und Tian X.C. (2004). Bovine blastocyst development in vitro: timing, sex, and viability following vitrification. Biol Reprod **71**(5): 1671-6.
- Niemann H. und Meinecke B. (1993). *In-vitro-Produktion von Embryonen*. In: Embryotransfer und assoziierte Biotechniken bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Meinecke B. (Eds), Enke-Verlag: 85-92.
- Niwa K., Ohara K., Hosoi Y. und Iritani A. (1985). *Early events of in-vitro fertilization of cat eggs by epididymal spermatozoa*. J Reprod Fertil **74**(2): 657-60.
- Noda Y., Matsumoto H., Umaoka Y., Tatsumi K., Kishi J. und Mori T. (1991). *Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block*. Mol Reprod Dev **28**(4): 356-60.
- Norbury C. und Nurse P. (1992). *Animal cell cycles and their control*. Annu Rev Biochem **61**: 441-70.
- Orrenius S., Zhivotovsky B. und Nicotera P. (2003). *Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link*. Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 552-65.
- Otoi T., Murakami M., Ooka A., Karja N.W. und Suzuki T. (2001). *Effects of size and storage temperature on meiotic competence of domestic cat oocytes*. Vet Rec **148**(4): 116-8.
- Overstrom E.W., Paqui-Platis D., Toner M. und Cravacho E.G. (1990). *Cryoprotectant and thermal effects on cytoskeletal organization and IVF rate of mouse oocytes*. Biol Reprod **42**(Suppl 1): 175 (abstr).
- Papis K., Shimizu M. und Izaïke Y. (2000). Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. Theriogenology **54**(5): 651-8.
- Park S.E., Chung H.M., Cha K.Y., Hwang W.S., Lee E.S. und Lim J.M. (2001). *Cryopreservation of ICR mouse oocytes: improved post-thawed preimplantation development after vitrification using Taxol, a cytoskeleton stabilizer*. Fertil Steril **75**(6): 1177-84.
- Parrington J., Swann K., Shevchenko V.I., Sesay A.K. und Lai F.A. (1996). *Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein*. Nature **379**(6563): 364-8.
- Pegg D.E. (1987). *Mechanisms of freezing damage*. Symp Soc Exp Biol **41**: 363-78.
- Perreault S.D., Barbee R.R. und Slott V.L. (1988). Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. Dev Biol **125**(1): 181-6.
- Pickering S.J., Braude P.R., Johnson M.H., Cant A. und Currie J. (1990). Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. Fertil Steril **54**(1): 102-8.
- Pope C.E. (2000). Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. Theriogenology **53**(1): 163-74.
- Pope C.E., Keller G.L. und Dresser B.L. (1993). In vitro fertilization in domestic and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, development in vitro, cryopreservation and successful intra- and interspecies embryo transfer. J Reprod Fertil Suppl **47**: 189-201.
- Pope C.E., Mc Rae M.A., Plair B.L., Keller G.L. und Dresser B.L. (1994). Successful in vitro and in vivo development of in vitro fertilized two- to four-cell cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. Theriogenology **42**: 513-25.

- Pope C.E., Mc Rae M.A., Plair B.L., Keller G.L. und Dresser B.L. (1997). In vitro and in vivo development of embryos produced by in vitro maturation and in vitro fertilization of cat oocytes. J Reprod Fertil Suppl **51**: 69-82.
- Pope C.E., Schmid R. und Dresser B.L. (1999). In vitro development of cat embryos produced by in vitro fertilization is enhanced by addition of cysteine to the maturation medium and a reduced O<sub>2</sub> atmosphere. Theriogenology **51**(1): 291.
- Pukazhenthil B., Pelican K., Wildt D. und Howard J. (1999). Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. Biol Reprod **61**(1): 135-41.
- Pukazhenthil B.S., Spindler R. und Wildt D.E. (1998a). Short term exposure to room temperature disrupts the meiotic spindle of in vitro matured domestic cat oocytes. Biol Reprod **58**(Suppl 1): 201 (abstr).
- Pukazhenthil B.S., Wildt D.E., Ottinger M.A. und Howard J. (1998b). Inhibition of domestic cat spermatozoa acrosome reaction and zona pellucida penetration by tyrosine kinase inhibitors. Mol Reprod Dev **49**(1): 48-57.
- Rho G.J., Kim S., Yoo J.G., Balasubramanian S., Lee H.J. und Choe S.Y. (2002). *Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes*. Mol Reprod Dev **63**(4): 464-70.
- Roth T.L., Wolfe B.A., Long J.A., Howard J.G. und Wildt D.E. (1997). Effects of equine chorionic gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and laparoscopic artificial insemination on embryo, endocrine, and luteal characteristics in the domestic cat. Biol Reprod **57**(1): 165-71.
- Ruppert-Lingham C.J., Paynter S.J., Godfrey J., Fuller B.J. und Shaw R.W. (2003). Developmental potential of murine germinal vesicle stage cumulus-oocyte complexes following exposure to dimethylsulphoxide or cryopreservation: loss of membrane integrity of cumulus cells after thawing. Hum Reprod **18**(2): 392-8.
- Salustri A., Petrungraro S., De Felici M., Conti M. und Siracusa G. (1985). Effect of follicle-stimulating hormone on cyclic adenosine monophosphate level and on meiotic maturation in mouse cumulus cell-enclosed oocytes cultured in vitro. Biol Reprod **33**(4): 797-802.
- Schramm R.D. und Bavister B.D. (1995). Effects of gonadotrophins, growth hormone and prolactin on developmental competence of domestic cat oocytes matured in vitro. Reprod Fertil Dev **7**(5): 1061-6.
- Schroeder A.C., Champlin A.K., Mobraaten L.E. und Eppig J.J. (1990). *Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation in vitro*. J Reprod Fertil **89**(1): 43-50.
- Shaw J.M. und Jones G.M. (2003). Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. Hum Reprod Update **9**(6): 583-605.
- Shimada M., Kawano N. und Terada T. (2002). Delay of nuclear maturation and reduction in developmental competence of pig oocytes after mineral oil overlay of in vitro maturation media. Reproduction **124**(4): 557-64.
- Simon A.M., Goodenough D.A., Li E. und Paul D.L. (1997). *Female infertility in mice lacking connexin 37*. Nature **385**(6616): 525-9.
- Sirotkin A.V. (1992). Involvement of steroid hormones in bovine oocytes maturation in vitro. J Steroid Biochem Mol Biol **41**(3-8): 855-8.
- Smith D.M. und Tenney D.Y. (1980). *Effects of steroids on mouse oocyte maturation in vitro*. J Reprod Fertil **60**(2): 331-8.
- Smorag Z. und Gajda B. (1994). *Cryopreservation of mammalian ova and embryos by vitrification*. Biotechnol Adv **12**(2): 449-65.

- Spindler R.E., Pukazhenthil B.S. und Wildt D.E. (2000). *Oocyte metabolism predicts the development of cat embryos to blastocyst in vitro*. Mol Reprod Dev **56**(2): 163-71.
- Spindler R.E. und Wildt D.E. (1999). Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic Cat. Biol Reprod **61**(1): 188-94.
- Spindler R.E. und Wildt D.E. (2002). Quality and age of companion felid embryos modulate enhanced development by group culture. Biol Reprod **66**(1): 167-73.
- Stachecki J.J., Cohen J. und Willadsen S.M. (1998). Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium. Cryobiology **37**(4): 346-54.
- Stachecki J.J., Ginsburg K.A. und Armant D.R. (1994). Stimulation of cryopreserved epididymal spermatozoa of the domestic cat using the motility stimulants caffeine, pentoxifylline, and 2'-deoxyadenosine. J Androl **15**(2): 157-64.
- Stachecki J.J., Ginsburg K.A., Leach R.E. und Armant D.R. (1993). *Computer-assisted semen analysis (CASA) of epididymal sperm from the domestic cat*. J Androl **14**(1): 60-5.
- Suzuki T., Boediono A., Takagi M., Saha S. und Sumantri C. (1996). Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution method in vitro. Cryobiology **33**(5): 515-24.
- Swanson W.F., Mcrae M.A., Wildt D.E. und Rall W.F. (1999). Cryoprotectant toxicity and cryopreservation success in IVF-derived domestic cat embryos after embryo transfer. Theriogenology **51**: 174 (abstr).
- Swanson W.F., Roth T.L. und Godke R.A. (1996). Persistence of the developmental block of in vitro fertilized domestic cat embryos to temporal variations in culture conditions. Mol Reprod Dev **43**(3): 298-305.
- Takahashi T., Igarashi H., Doshida M., Takahashi K., Nakahara K., Tezuka N. und Kurachi H. (2004). Lowering intracellular and extracellular calcium contents prevents cytotoxic effects of ethylene glycol-based vitrification solution in unfertilized mouse oocytes. Mol Reprod Dev **68**(2): 250-8.
- Tanghe S., Van Soom A., Mehrzad J., Maes D., Duchateau L. und De Kruif A. (2003). *Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro*. Theriogenology **60**(1): 135-49.
- Tatemoto H., Sakurai N. und Muto N. (2000). Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. Biol Reprod **63**(3): 805-10.
- Telford N.A., Watson A.J. und Schultz G.A. (1990). Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. Mol Reprod Dev **26**(1): 90-100.
- Tesarik J. und Mendoza C. (1995). Nongenomic effects of 17 beta-estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. J Clin Endocrinol Metab **80**(4): 1438-43.
- Testart J., Lassalle B., Frydman R. und Belaisch J.C. (1983). A study of factors affecting the success of human fertilization in vitro. II. Influence of semen quality and oocyte maturity on fertilization and cleavage. Biol Reprod **28**(2): 425-31.
- Thomas R.E., Armstrong D.T. und Gilchrist R.B. (2004). Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. Biol Reprod **70**(3): 548-56.
- Tsai F.C. und Gardner D.K. (1994). Nicotinamide, a component of complex culture media, inhibits mouse embryo development in vitro and reduces subsequent developmental potential after transfer. Fertil Steril **61**(2): 376-82.
- Vajta G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. Anim Reprod Sci **60-61**: 357-64.

- Vajta G., Holm P., Kuwayama M., Booth P.J., Jacobsen H., Greve T. und Callesen H. (1998). *Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos*. Mol Reprod Dev **51**(1): 53-8.
- Vanderhyden B.C. und Armstrong D.T. (1989). Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. Biol Reprod **40**(4): 720-8.
- Vieira A.D., Mezzalana A., Barbieri D.P., Lehmkuhl R.C., Rubin M.I. und Vajta G. (2002). *Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes*. Cryobiology **45**(1): 91-4.
- Wani N.A., Misra A.K. und Maurya S.N. (2004). Maturation rates of vitrified-thawed immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of different types of cryoprotectants. Anim Reprod Sci **84**(3-4): 327-35.
- Wildt D.E. (1991). *Fertilization in Cats*. In: A comparative Overview of mammalian fertilization. O'Rand M. (Eds). New York, Plenum Press: 299-328.
- Wildt D.E., Chan S.Y., Seager S.W. und Chakraborty P.K. (1981). Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. Biol Reprod **25**(1): 15-28.
- Wildt D.E., Guthrie S.C. und Seager S.W. (1978). *Ovarian and behavioral cyclicity of the laboratory maintained cat*. Horm Behav **10**(3): 251-7.
- Wolfe B.A. und Wildt D.E. (1996). Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized in vitro after prolonged cold storage. J Reprod Fertil **106**(1): 135-41.
- Wood T.C., Byers A.P., Jennette B.E. und Wildt D.E. (1995). Influence of protein and hormone supplementation on in vitro maturation and fertilization of domestic cat eggs. J Reprod Fertil **104**(2): 315-23.
- Wood T.C., Montali R.J. und Wildt D.E. (1997). Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. Mol Reprod Dev **46**(2): 190-200.
- Wood T.C. und Wildt D.E. (1997). Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts in vitro. J Reprod Fertil **110**(2): 355-60.
- Wright D.L., Eroglu A., Toner M. und Toth T.L. (2004). *Use of sugars in cryopreserving human oocytes*. Reprod Biomed Online **9**(2): 179-86.
- Wuttke W.A. und Walz W. (1990). Sodium- and bicarbonate-independent regulation of intracellular pH in culture mouse astrocytes. Neurosci Lett **117**(1-2): 105-10.
- Yoshida M. (1993). Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. Mol Reprod Dev **35**(1): 76-81.
- Yoshida M., Ishigaki K., Nagai T., Chikyu M. und Pursel V.G. (1993). Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. Biol Reprod **49**(1): 89-94.
- Yoshida M., Ishigaki K. und Pursel V.G. (1992). Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro. Mol Reprod Dev **31**(1): 68-71.
- Zambelli D., Caneppele B., Castagnetti C. und Belluzzi S. (2002). *Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates*. Reprod Domest Anim **37**(5): 310-3.
- Zhang L., Jiang S., Wozniak P.J., Yang X. und Godke R.A. (1995). Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. Mol Reprod Dev **40**(3): 338-44.

## 8.6 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abstr	Abstract (dt.: Zusammenfassung)
BAPTA-AM	1,2-bis(o-aminopheoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetraacetoxymethylester
bFSH	Bovine Follicle Stimulating Hormon
bLH	Bovine Luteinizing Hormon
BME	Basal Medium Eagle's Amino Acids
BSA	Bovine Serum Albumine
cAMP	Cyclo- Adenosinmonophosphate
COC	Cumulus Oocyte Complex
CPA	Cryoprotective additive
CPS	Closed Pulled Straw
DM	Dilution Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
eCG	Equine Chorionic Gonadotropine
EG	Ethylene Glycol (Ethanediol)
EMG	Electron Micoscope Grid
FCS	Fetal Calf Serum
FF-MAS	Follicular Fluid Meiosis-Activating Sterol
GL-Tip	Gel Loading Tip
GnRH	Gonadotropine Releasing Hormone
GSH	Glutathionsulphydryl
GV	Germinal Vesicle
GVBD	Germinal Vesicle Breakdown
hCG	Human Chorionic Gonadotropine
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid
ICSI	Intracellular Sperm Injection
IGF	Insulin Like Growth Factor
IU	International Unit
IVC	In vitro Culture
IVF	In vitro Fertilization
IVM	In vitro Maturation
IVP	In vitro Production
KRB	Kreb's Ringer Bicarbonate Medium

---

LN <sub>2</sub>	Liquid Nitrogen
MEM	Minimal Essential Medium Nonessential Amino Acids
MG	Molekulargewicht
MI	Metaphase der 1. Reifeteilung
MII	Metaphase der 2. Reifeteilung
MK-1	Modified Earle's Balanced Salt Solution
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumbikarbonat
ECS	Estrous cow serum
OPS	Open Pulled Straw
PMSG	Pregnant Mare Serumgonadotropine
PrOH	1, 2 Propanediol (Propylene Glycol)
PVP	Polyvinyl Pyrrolidone
SOF	Synthetic Oviductal Fluid
SSV	Solid Surface Vitrification
TALP	Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate
TCM 199	Tissue Culture Medium
TL	Tyrode's Lactate
TRIS-Puffer	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan-Puffer
VM	Vitrification Medium

## 8.7 Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Braun für die Überlassung des Themas und v.a. für die großartige Unterstützung bedanken. Ohne Sie hätte ich die Dissertation niemals in der Kürze der Zeit abschließen können! Ebenso herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Hochi aus Japan bedanken, der mich persönlich und sehr geduldig in die Vitrifikationstechnik eingearbeitet und die Versuchsplanung mit seinen Vorschlägen maßgeblich beeinflusst hat.

Nicht möglich wäre die Dissertation ohne die Hilfe von zahlreichen Tierarztpraxen gewesen, die mich mit frischem „Material“ versorgten. Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich sehr herzlich beim Tierheim München, den Praxen Arneth und Hoffmann, Dr. Aumüller, Dr. Böck, Ellinger und Thumm, Dr. Krolopp und Dr. Ballauf, Dr. Siems, Steger, von Eckardstein und Dr. Weber aus München, sowie der Tierklinik Oberhaching und nicht zuletzt der Kleintierabteilung der Gynäkologischen Tierklinik der LMU bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Woehl-Wenigerkind und ihrem Mann, die mir immer wieder bei Notfällen halfen. Desweiteren bedanke ich mich beim gesamten Team des IVF-Labors, das mir mit Rat und Tat zur Seite stand, und wenn nötig für Kekse und Aufmunterung sorgte.

Für inhaltliche Anregungen und Rechtschreibkorrekturen möchte ich mich bei Alexandra Mettig, Anton Schmid, Ellen Schöner und Sandra Wallner bedanken.

Und schließlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern, meinem Freund und meinen Freunden bedanken, zu denen ich immer mit Problemen und Problemchen aller Art kommen konnte, die aber auch zwischendurch für die nötige Ablenkung und Abwechslung sorgten.