

**Besenfelder U. - Wetscher F. - Huber T. - Havlicek V. - Mößlacher G. - Müller M. - Brem G.**

## **Vergleichsstudie zum frühzeitigen Re-Transfer In vitro-produzierter Rinderembryonen**

### **Einleitung**

*In vitro*-produzierte Embryonen unterscheiden sich deutlich von *Ex vivo*-gewonnenen Embryonen (Farin und Farin, 1995; Wright und Ellington, 1995; Thompson, 1997; Holm et al., 2002). Trotz vielfältiger Merkmalerhebung auf oozytärer und embryonaler Ebene kommt letztendlich den Ergebnissen nach Transfer von IVP-Embryonen auf synchronisierte Rezipienten mit der Erhebung von Trächtigkeitsraten sowie Kälbergeburtsdaten die größte Bedeutung zu. Diese Erhebungen sind jedoch sehr aufwendig. Aus diesem Grund wird das Augenmerk auf Parameter gerichtet, die in ihrer Gesamtheit der Embryobeurteilung vor allem für Vergleichsuntersuchungen besondere Verwendung finden. U.a. wurden *in vivo*-produzierte Embryonen nach biochemischen Maßstäben beurteilt, um für die *In vitro*-Kultur optimale Voraussetzungen zu schaffen (z.B. Energiestoffwechsel, Proteinsynthese) (Thompson, 1997).

Diese Unterschiede lassen sich anhand morphologischer, kultureller und molekulargenetischer Eigenschaften deutlicher und frühzeitiger herausstellen (Greve et al. 1984, 1987, 1993; Thompson, 1997).

Da bislang diese markanten Unterschiede auf *In vitro*-Ganzzeitkulturen (IVP) bzw. der Embryogewinnung aus dem Tier (*Ex vivo*-Entwicklung) basieren, war es das Ziel dieser Studie, *in vitro*-produzierte Embryonen unter angepassten, optimalen Bedingungen in den Eileiter Zyklus-synchronisierter Rinder zu übertragen, um effiziente Findungsraten mit optimierten Entwicklungsraten der Embryonen zu kombinieren.

### **Material und Methoden**

#### Empfängervorbereitung

100 Fleckviehkalbinnen im Alter zwischen 18 und 23 Monaten (410 bis 460 kg Körpergewicht) wurden als Zwischenempfänger vorbereitet. Die Tiere wurden im

Boxenlaufstall gehalten und erhielten neben freiem Zugang zu Wasser, Heu, Rübenschnitzel- und Grassilage, Mineralstoff- und Vitamin E/Selen- sowie  $\beta$ -Carotinzufütterung. Die Tiere wurden nach dem bekannten Ovsynch-Protokoll vorbereitet (Mialot et al., 2003). Die Vorsynchronisation erfolgte über die Verabreichung von 500  $\mu$ g Cloprostenol (Estrumate<sup>®</sup>, Mallinckrodt Veterinary, Burgwedel, Germany). Nach weiteren 48 Stunden wurden 0,02 mg GnRH (Receptal<sup>®</sup>, Intervet, Oberschleissheim, Germany) appliziert. 6 Tage später wurde mit der Ovsynch-Behandlung begonnen, indem wiederum 0,02 mg GnRH verabreicht und nach einer Woche mit Cloprostenol (500  $\mu$ g) behandelt wurde. Die Synchronisation wurde mit GnRH-Behandlung (0,02 mg) 48 Stunden später beendet. Die Ovulation wurde in den darauffolgenden 26 bis 40 Stunden erwartet. Der Synchronisationserfolg, die Ovulationsseite, das morphologische Erscheinungsbild des Gelbkörpers sowie sein Alter wurden während des endoskopischen Einsatzes bestimmt.

### Eizellgewinnung und *In vitro*-Maturation

Alle Chemikalien stammten von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), sofern deren Bezugsquelle nicht anderweitig angegeben wird.

Es wurden Eierstöcke von nahegelegenen Schlachthöfen gesammelt und ins Labor transportiert. Die Cumulus-Oozyten-Komplexe (COC) wurden durch Punktion und Aspiration von 2 bis 8 mm großen Follikeln auf den Eierstöcken gewonnen. Die in 50 ml Falconröhrchen aufgefangene Follikelflüssigkeit wurde in Petrischalen ( $\varnothing$  100 mm) überführt. COC mit kompaktem, geschlossenem Cumulus und homogen, fein granuliertem Zytoplasma der Eizelle wurden in modifiziertem Parker Medium (MPM, 10% Hitze-inaktiviertes Serum östrischer Kalbinnen - OCS, 10  $\mu$ g/ml Äquivalente pFSH) bei 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> und maximaler Luftfeuchtigkeit für 22 bis 24 Stunden maturiert.

### *In vitro*-Fertilisierung und Spermiovorbereitung für die GIFT-Gruppe

Die Vorbereitung der Spermien erfolgte über ein modifiziertes Swim up-Verfahren. In Pailletten tiefgefrorene Samenportionen wurden 10 Sekunden an der Luft (Raumtemperatur) und anschließend im 39 °C warmen Wasserbad aufgetaut. 1,7 ml Kapazitationsmedium (Serum-TALP, 6 mg/ml BSA) wurden in 15 ml Falconröhrchen mit Aliquots von je 250  $\mu$ l Samen aus dem Pailletteninhalt unterschichtet und bei 39° C, 5% CO<sub>2</sub> für 50 Minuten inkubiert. Der klare Überstand des Kapazitationsmediums wurde abpipettiert und von mehreren Ansätzen in einem 15 ml Falconröhrchen gesammelt. Nach Zentrifugation bei 200 g für 5 Minuten wurde der klare Überstand bis auf wenige Milliliter abgenommen und das

entstandene Pellet mit dem verbliebenen Überstand resuspendiert. Daraufhin wurde die Spermienkonzentration dieser Suspension und in weiterer Folge die Menge an Volumen bestimmt, die für die Einstellung einer bestimmten Samenendkonzentration in den Gruppen 2,3 und 4 notwendig war.

Die maturierten COC wurden in das Fertilisierungsmedium überführt (Fert-TALP, 6 mg/ml BSA, 0,02 mg/ml Heparin) und soviel Samensuspension aus dem Swim up-Verfahren dazugegeben, dass eine Endkonzentration von 1 Mio Spermien pro ml vorhanden war. Die Inkubation erfolgte für 18 bis 20 Stunden bei 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> und maximaler Luftfeuchtigkeit.

Für die GIFT-Gruppen wurde 2 Mio Spermien vorbereitet.

### In vitro-Kultur - IVC

Für die *In vitro*-Kultur wurde das Standardmedium „CR1aa“ verwendet, dem 10% OCS zugesetzt wurden. Nach der *In vitro*-Fertilisation wurden die Cumulus-tragenden Eizellen denudiert, in das Kulturmedium umgesetzt und bei 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 5% O<sub>2</sub> kultiviert. Nach 60 Stunden wurde die Teilungsrate bestimmt und ein Teil der Teilungsstadien für den Transfer von Embryonen im 4- bis 8- Zellstadium aus der Kultur vorbereitet.

### Eileitertransfer und Embryogewinnung

Der Eileitertransfer (Besenfelder und Brem, 1998) erfolgte, je nach Versuchsgruppe, unmittelbar nach der Ovulation oder 72 Stunden später. Die transferierten Stadien wurden am 7. Kulturtag zurückgewonnen (Besenfelder et al., 2001). Alle COC bzw. Embryonen wurden unilateral auf der Seite transferiert, an der die Ovulationsstelle zu finden war.

Die Verteilung der Eizellen bzw. Embryonen für die verschiedenen Experimente war wie folgt:

**Experiment 1:** Es wurden, unter Erwägung strukturell-funktioneller Eigenschaften, folgende Vergleichsgruppen ausgewählt:

Gruppe „Hyaluronsäure“: Dem Transfermedium wurden 6 mg/ml Hyaluronsäure zugesetzt, um einen Zusammenhalt der transferierten Komplexe im hyaluronsäurehaltigen Medium für

die unmittelbar dem Transfer folgende Zeit zu gewähren und um ein (vorzeitiges) Abfließen (z.B. Reflux) der Embryonen zu verhindern.

Gruppe „Zygoten ohne Cumulus“: Im Gegensatz zur Gruppe „Zygoten mit Cumulus“ wurden die expandierten Cumulusstrukturen im Anschluss an die Fertilisation mechanisch entfernt.

Gruppe „Zygoten mit Cumulus“: In dieser Versuchsgruppe wurde der (expandierte) Cumulus nach der Befruchtung nicht entfernt.

Gruppe „GIFT“: *In vitro*-murierte Cumulus-Oozyten-Komplexe wurde unmittelbar vor dem Transfer zusammen mit Samensuspension in die Transferkapillare aufgenommen. Pro Transfer wurden 2 Mio Spermien in die Kapillare überführt.

Gruppe „Alginat“: Die Embryonen wurden nach der Befruchtung von den Cumuluszellen befreit und in 1,5%-iges Natrium-Alginat überführt. Das Aushärten des Mikrogels erfolgte in 1,5%-igem Kalziumchlorid. Die hochviskösen Polymerformen wurden mit einer gezogenen Glaspipette aufgenommen.

Das Befüllen der gebogenen Transferkapillaren erfolgte über die vordere Öffnung.

**Experiment 2:** Ein Teil der *in vitro*-murierten COC wurde für den Transfer von COC (COC-Gruppe) und für die GIFT-Gruppe (Gamete Intra-Fallopian Transfer) bereitgestellt. Die verbleibenden COC wurden *in vitro*-fertilisiert und kurzzeitkultiviert, und entweder als 4- bis 8-Zellstadien transferiert (progressive Stadien) oder über 7 bis 8 Tage *in vitro*-kultiviert.

COC-Gruppe: *In vitro*-murierte COC wurden in MPM in die Transferkapillare überführt und auf Rezipienten übertragen, deren Ovulationsstelle nicht älter als 12 Stunden (0,5 bis max. 1 Tag) war. Die Empfängertiere wurden 12 und 6 Stunden vor den Transfers mit je zwei Pailletten (0,25 ml) von 2 Bullen (1:1 verdünnt, nativ) besamt.

GIFT-Gruppe: *In vitro*-murierte COC wurden in MPM und mit  $2 \times 10^6$  Spermien in die Transferkapillare überführt. Die Transfers wurden ebenfalls bei Empfängern durchgeführt, deren Ovulationsstelle nicht älter als 12 Stunden (0,5 bis max. 1 Tag) war.

Progressive Stadien: Nach IVM/IVF wurden die Zygoten für 60 Stunden kultiviert. Embryonen im 4- bis 8-Zellstadium wurden dann im Kulturmedium in die Eileiter von Rindern am Zyklustag 2,5 bis 3 übertragen.

IVP-Gruppe: Eine Gruppe von COC wurde zum Vergleich für alle Transfergruppen bis zur Blastozystenentwicklung an Tag 7 und 8 *in vitro*-entwickelt (IVM/IVF/IVC). 60 Stunden nach Befruchtungsbeginn wurden ebenfalls die Teilungsstadien bestimmt.

Bei allen Transfer- und Kontrollgruppen (Exp. 1 und 2) wurde die Weiterentwicklung zu Blastozysten unmittelbar nach der Gewinnung (Tag 7) sowie nach einer weiteren 24-stündigen *In vitro*-Kultur bestimmt.

### Statistische Analyse

Die Anzahl der Blastozysten, die nach *In vivo*-Kultur gewonnen wurde, wurde abzüglich der möglichen Blastozysten aus der Ovulation der Empfängertiere bei den COC- und GIFT-Gruppen berechnet. Die Gewinnungsraten wurden prozentual aus dem Quotienten von gewonnenen und übertragenen Komplexen kalkuliert. Die Anzahl der Blastozysten aus IVP wurden auf die Anzahl der für die *In vitro*-Maturation eingesetzten COC bezogen. Bei der Gruppe der transferierten 4- bis 8-Zellstadien wurde als Bezugsgröße zur Anzahl der Blastozysten jene Anzahl an COC berechnet, die sich aus der Anzahl übertragener 4- bis 8-Zellstadien, korrigiert um den Faktor der Teilungsrate, ergab.

Die Gewinnungsraten und die Anzahl der Blastozysten wurden mittels  $\chi^2$ -Test verglichen.

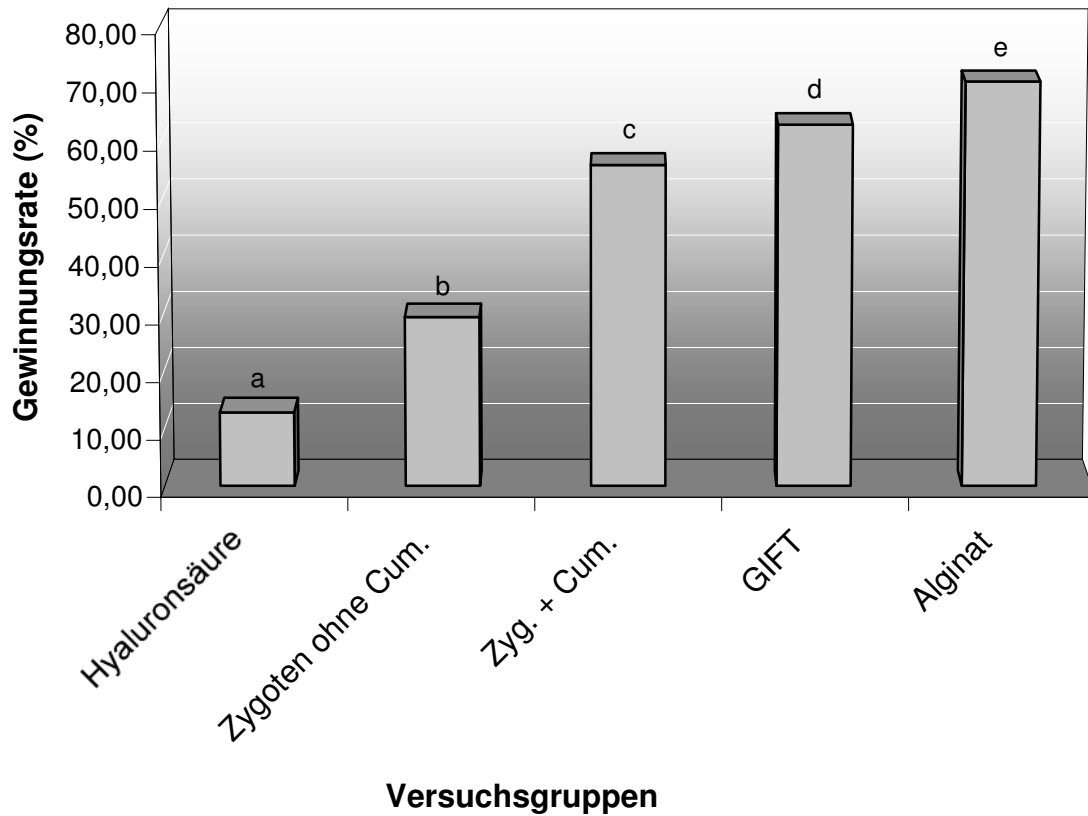
## Ergebnisse

Die vorliegende Studie umfasste den Transfer von insgesamt 4271 Eizellen/Embryonen auf 100 temporäre Empfängertiere. Die Spülung am 7. Kulturtag ergab eine Rückgewinnung von 2157 Komplexen (50,5%), von denen sich 527 Blastozysten (24,4%) entwickelt hatten.

### Experiment 1:

Es wurden 2619 frühembryonale Entwicklungsstadien bei 69 *In vivo*-Kulturterminen transferiert. Von diesen transferierten Stadien konnten 913 Objekte am Tag 7 zurückgewonnen werden (34,9%). Von den gespülten Stadien waren am Tag der Spülung 104 Blastozysten (11,4%). Im Anschluss an die 24-stündige IVK erhöhte sich die Blastozystenanzahl auf 150 (16,4%). Diese Gewinnungsraten sind jedoch sehr deutlich von den in den verschiedenen Gruppen durchgeführten Transferaktionen abhängig.

Insgesamt wurde die Findungsrate aller Versuchsgruppen durch Modifikationen der Eizell- oder Embryomorphologie bzw. der Viskosität des Transfermediums signifikant beeinflusst. In der „Alginat“-Gruppe und in der „GIFT“-Gruppe waren die Findungsraten mit 70,5% und 63,1% die höchsten aller Versuchsgruppen und unterschieden sich signifikant von den anderen Gruppen ( $p < 0,001$ ). Die Gruppen der „Zygoten mit Cumulus“ (56,1%), der „Zygoten ohne Cumulus“ (29,6%) und der „Hyaluronsäure“ (12,9%) lagen dementsprechend deutlich darunter. Der Unterschied der Gruppen mit schlechteren Findungsraten untereinander war ebenfalls signifikant ( $p < 0,001$ ). Der Transfer von maturierten Cumulus-Oozyten-Komplexen mit Spermien (GIFT) ergab zwar eine geringfügig bessere Findungsrate als der Transfer von Zygoten mit „Rest“-Cumulus nach Befruchtung bzw. resultierte in einer etwas schlechteren Findungsrate gegenüber den in Alginat eingebetteten Embryonen, statistisch betrachtet war aber dieses Ergebnis der „GIFT“-Gruppe nicht signifikant (siehe Abbildung 1).



“Hyaluronsäure”: Transfer von Zygoten im Transfermedium, das mit 6 mg/ml Hyaluronsäure angereicht wurde.

“Zygoten ohne Cum.”: Transfer von Zygoten, die zuvor von Cumuluszellen befreit wurden.

“Zygoten mit Cum.”: Transfer von Zygoten, die noch von Cumuluszellen umgeben waren.

“GIFT”: Transfer von *in vitro*-maturierten Cumulus-Oozyten-Komplexen zusammen mit kapazitierten Spermien.

“Alginat”: Transfer von Zygoten, die zuvor in Alginat eingebettet wurden.

Gewonnene Embryonen: <sup>a-e</sup> Werte der gleichen Spalte mit unterschiedlicher Kennzeichnung unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,001$ ), ausgenommen <sup>c,e</sup>:  $p = 0,067$  und <sup>d,e</sup>:  $p = 0,074$ .

Abbildung 1: **Wiederfindungsrate nach *In vivo*-Kultur in den einzelnen Vergleichsgruppen**

Die Ergebnisse der embryonalen Weiterentwicklung entsprachen nicht der Verteilung der Findungsraten in den einzelnen Versuchsgruppen, d.h. gute Findungsraten beinhalteten nicht gleichzeitig auch eine gute Weiterentwicklung: Am Tag 7 konnte ein höherer Anteil ( $p < 0,05$ ;  $\chi^2$ -Test) an weiterentwickelten Embryonen bis zur Blastozyste in der „Hyaluronsäure“-Gruppe (16,3%) und „GIFT“-Gruppe (15,9%) beobachtet werden als in der „Alginat“-Gruppe (7,7%), der Gruppe von „Zygoten mit Cumulus“ (8,1%) und von „Zygoten ohne Cumulus“ (10,6%).

Nach einem weiteren Kulturtag der gewonnenen Embryonen im Inkubator zeigte sich, dass sich in den verschiedenen Versuchsgruppen weitere Blastozysten entwickelt hatten, die tags zuvor als solches noch nicht zu erkennen waren. Dementsprechend war die Entwicklungsrate am Tag 8 in der „Alginat“-Gruppe im Vergleich zu den „GIFT“- und „Zygoten mit Cumulus“-Gruppen signifikant schlechter (11,0% vs. 20,5% vs. 18,4%;  $p < 0,05$ ;  $\chi^2$ -Test). Die Tag 8 Ergebnisse aus der „Alginat“-Gruppe unterschieden sich jedoch nicht von denen aus der „Zygoten ohne Cumulus“- (14,3%) und der „Hyaluronsäure“ (17,0%)-Gruppe.

Der größte Blastozystenzuwachs zwischen Tag 7 und Tag 8 war in der Gruppe der „Zygoten mit Cumulus“ ( $p = 0,002$ ;  $\chi^2$ -Test) zu registrieren, während die anderen Versuchsgruppen diesen Entwicklungsunterschied weniger stark ( $p > 0,05$ ;  $\chi^2$ -Test) erkennen ließen (siehe Abbildung 2).

### Experiment 2:

Es wurden 1652 *in vitro*-murierte bovine Oozyten bzw. frühe Teilungsstadien aus IVP ipsilateral in die Eileiter von 31 Empfängertieren für eine *In vivo*-Kultur übertragen. Am Tag 7 wurden insgesamt 1244 (75,3%) wiedergewonnen. Die Gewinnungsraten der einzelnen Gruppen unterschieden sich signifikant (76,3% COC-Gruppe; 68,3% GIFT-Gruppe; 79,9% Gruppe mit den progressiven Stadien;  $p < 0,01$ ,  $\chi^2$ -Test, Tabelle 1). In der IVP-Gruppe entwickelten sich bis zur 60. Stunde *post inseminationem* 81,1% bis zum 4- bis 8-Zellstadium. In der *In vitro*-Kulturphase der Gruppe 3 hatten sich 60 Stunden nach Fertilisierungsbeginn 77,6% bis zum 4- bis 8-Zellstadium entwickelt, die anschließend *in vivo*-weiterkultiviert wurden.

Die Anzahl der Blastozysten, die sich aus der Spülung am Tag 7 und nach weiterer 24-stündiger Kultur (Tag 8) ergab, war für die jeweiligen Gruppen signifikant unterschiedlich. So konnten am Tag 7 deutlich mehr Blastozysten nach Transfer von 4- bis 8-Zellstadien



zurückgewonnen werden als in den beiden Vergleichsgruppen der COC und GIFT ( $p < 0,001$ ,  $\chi^2$ -Test). 41,9% der gewonnenen Komplexe waren am Tag 7 im Blastozystenstadium, 10 weitere Blastozysten entwickelten sich nach einer 24-stündiger *In vitro*-Kultur (43,3%). Der Transfer von COC mit  $2 \times 10^6$  Spermien resultierte hingegen in einer Blastozystenrate von nur 15,1% am Tag 7, die am 8. Tag schließlich 19,9% erreichte. Nahezu ohne Entwicklungserfolg blieben die Transfers von IVM-COC, welche durch künstliche Besamung der temporären Empfänger begleitet wurden. Nur 0,9% der am Tag 7 und 8 gewonnenen Komplexe erwiesen sich als Blastozysten.

Im Rahmen der 24-stündigen Zwischenkultur von Entwicklungstag 7 auf Tag 8 konnten nur in bei GIFT und dem Transfer progressiver Stadien weitere Blastozysten gewonnen werden. Dieser Erfolg war jedoch nicht signifikant ( $p > 0,1$ ;  $\chi^2$ -Test).

In der reinen „*In vitro*-Kultur“ wurden am Tag 7 20,9% zu Blastozysten entwickelte Embryonen gefunden, die am Tag 8 deutlich anstiegen ( $p < 0,001$ ,  $\chi^2$ -Test) und einen Wert von insgesamt 37,7% erreichten.

Die Entwicklungsraten, die sich aus der IVP und der Kombination IVP/*In vivo*-Kultur ergaben, wichen deutlich voneinander ab. Die *In vivo*-Kultur von 4- bis 8-Zellstadien lieferte markant mehr Blastozysten als die *In vitro*-Kultur, sowohl am Tag 7 als auch am Tag 8 (Tag 7: 41,9% vs. 20,9%,  $p < 0,001$ ; Tag 8: 43,3% vs. 37,7%,  $p = 0,016$ ,  $\chi^2$ -Test). Die IVP war hingegen besser wie jene Gruppen, in denen COC übertragen wurden (IVP-Gruppe vs. COC-Gruppe: Tag 7: 20,9% vs. 0,9%, Tag 8: 37,7% vs. 0,9%,  $p < 0,001$ ; IVP-Gruppe vs. GIFT-Gruppe: Tag 7: 20,9% vs. 15,1%,  $p = 0,015$ , Tag 8: 37,7% vs. 19,9%,  $p < 0,001$ ; ,  $\chi^2$ -Test).

Tabelle 1: **Ergebnisse aus dem Transfer von Eizellen (COC, GIFT) und Embryonen zur *In vivo*-Kultur im Rindereileiter im Vergleich zur *In vitro*-Produktion.**

Parameter	E m b r y o k u l t u r						<i>In vitro</i>		
	In vivo								
	COC	GIFT	Progressive Stadien				IVP		
<b>Transfers, n</b>	10	10	11				-		
<b>Kultivierte Stadien</b>									
<i>in vitro</i> , n	-	-	879	(702)*			1325		
<b>Geteilte Stadien, n (%)</b>	-	-	682	(77,6)			1074	(81,1)	
<b>Kultivierte Stadien</b>									
<i>In vivo</i> , n	456	514	682				-		
<b>Gewonnene Embryonen, n (%)</b>	348	(76,3) <sup>a</sup>	351	(68,3) <sup>b</sup>	545	(79,9) <sup>a</sup>	-		
<b>Tag 7 Blastozysten, n (%)</b>	3	(0,9) <sup>a</sup>	53	(15,1) <sup>b</sup>	294	(41,9) <sup>c</sup>	277	(20,9) <sup>d</sup>	
<b>Tag 8 Blastozysten, n (%)</b>	3	(0,9) <sup>a</sup>	70	(19,9) <sup>b</sup>	304	(43,3) <sup>c</sup>	499	(37,7) <sup>d</sup>	

COC: Transfer von *in vitro*-maturierten COC kombiniert mit Künstlicher Besamung (AI).

GIFT: Transfer von *in vitro*-maturierten COC zusammen mit *in vitro*-kapazitierten Spermien.

Progressive Stadien: Transfer von Embryonen im 4- bis 8-Zellstadium.

\* Werte wurde unter Berücksichtigung der Teilungsrate verglichen.

Gewonnene Embryonen: <sup>a,b</sup> Werte der jeweiligen Parameter unterschieden sich signifikant ( $p < 0,01$ ).

Tag 7 Blastozysten: <sup>a-d</sup> Werte der jeweiligen Parameter unterschieden sich signifikant ( $p < 0,001$ ), ausgenommen <sup>b,d</sup>:  $p = 0,016$ .

Tag 8 Blastozysten: <sup>a-d</sup> Werte der jeweiligen Parameter unterschieden sich signifikant ( $p < 0,001$ ), ausgenommen <sup>c,d</sup>:  $p = 0,015$ .

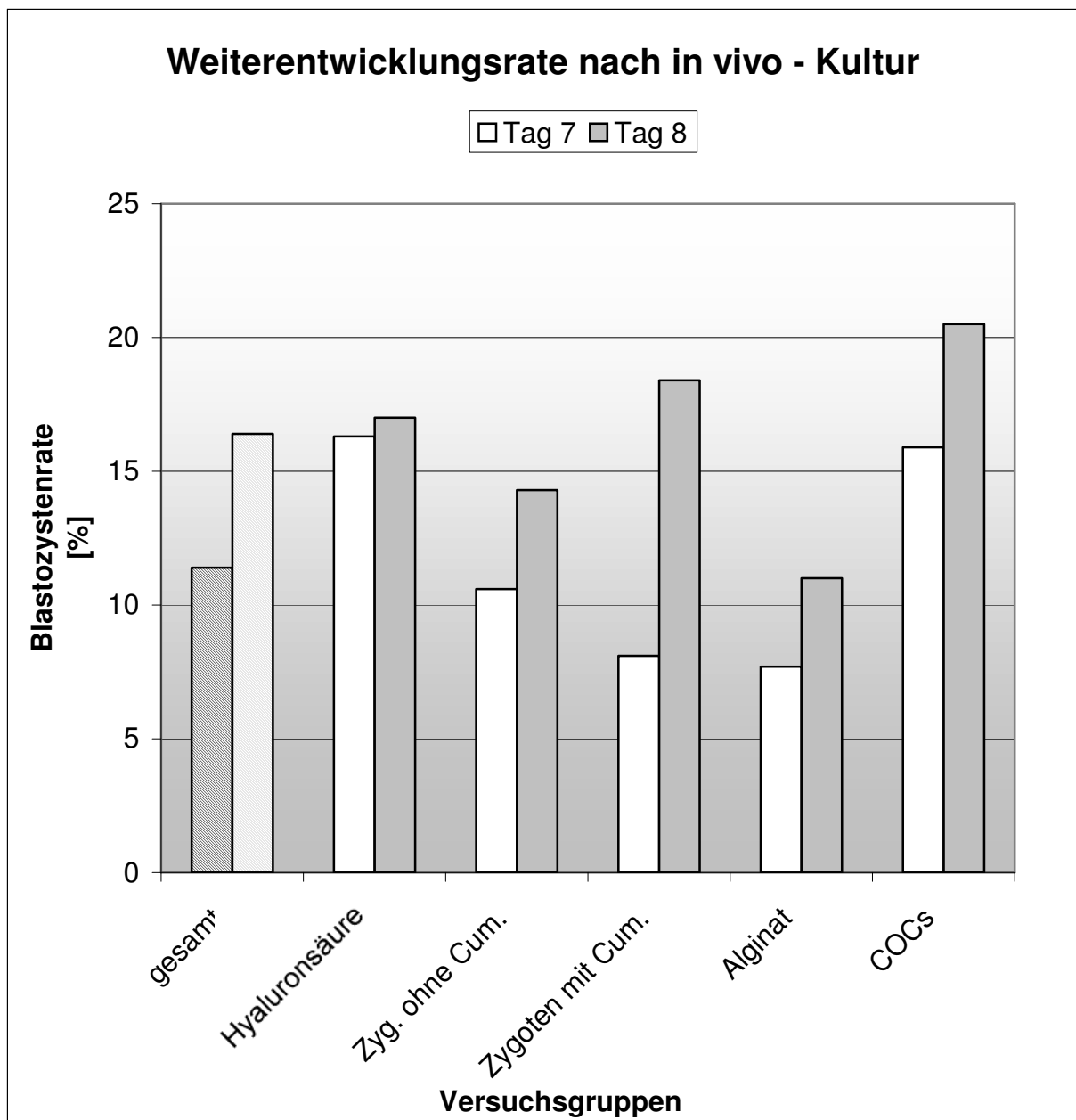


Abbildung 2: Weiterentwicklungsrate am Tag 7 bzw. Tag 8 in den jeweiligen Vergleichsgruppen

Tag 7 Blastozysten: <sup>a,b</sup> Werte der gleichen Spalte mit unterschiedlicher Kennzeichnung unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ).

Tag 8 Blastozysten: <sup>a,b</sup> Werte der gleichen Spalte mit unterschiedlicher Kennzeichnung unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ).

## Diskussion

Ziel dieser Studie war es, eine systematische Weiterentwicklung des Verfahrens der *In vivo*-Kultur in Richtung einer Steigerung der Findungs- und Entwicklungsraten zu etablieren. Wie aus den Ergebnissen eindeutig hervorgeht, ist abseits der reinen Embryostruktur eine Morphologie Voraussetzung, die dem Cumulus-Oozyten-Komplex während der Ovulation entspricht. Im weiteren zeigen die Ergebnisse die Entwicklungskompetenz des Eileiters zur Gewinnung von Blastozysten.

Der Transfer von in Alginate eingebetteten Embryonen resultierte in der höchsten Findungsrate (70,5%). Mit dieser morphologischen Veränderung sollte in diesem Versuch der expandierten Form einer Cumulusmaturation Rechnung getragen werden, um in der Ampulle die Größenordnungen zu bewahren und den Anschluss an physiologische Migrationsprozesse herzustellen. Alginate ist ein natürlich vorkommendes Polysaccharid aus Seealgen, welches sich unter Besein von Kalziumchlorid zu einer Embryokapsel verfestigen lässt, die sich aber wieder innerhalb von 48 Stunden im Eileiter auflöst (Eaton et al., 1990; Adaniya et al., 1993). Die vorliegenden Ergebnisse geben jedoch keine weiteren Hinweise im Bezug auf Migration der Embryonen im Eileiter. Eine Wanderphase wäre jedoch in dem Zusammenhang denkbar insofern, als auch nach dem Transfer von 500 µm großen Mikrokügelchen ein Transport dieser Gebilde im Kanincheneileiter beobachtet wurde (Bourdage und Halbert, 1988). Der wichtigste Grund der Alginateinbettung in diesem Versuch lag primär darin, den Verlust der Embryonen nach Transfer in einem sehr aktiven und dynamischen Eileiter zu verhindern. Die Gegenüberstellung der Gruppen „COC mit Samen - GIFT“, „Zygoten mit Cumulus“ und „Zygoten ohne Cumulus“ lässt die Bedeutung der Cumulusstruktur für den physiologischen Eizelltransport im Eileiter vermuten. Die höheren Findungsraten der „Alginate“-Gruppe und der „GIFT“-Gruppe gegenüber der Gruppe „Zygoten mit Cumulus“ sind damit in Richtung struktureller Beeinträchtigung der Embryohülle zu interpretieren. Diese Information ist von essentieller Bedeutung beim Transfer von IVP-Embryonen in den nicht ligierten synchronisierten Rindereileiter und stellt somit auch methodische Voraussetzungen zur Verbesserung von *In vivo*-Kulturbedingungen dar. Die Cumulusmatrix stellt in der ersten Zeit nach der Ovulation bekannter Weise die Verbindung zum Eileiterepithel her und trägt eine wesentliche Funktion im Rahmen von Aufnahme und Transport der Eizelle/des Embryos in den Eileiter (Lam et al., 2000). Zygoten, die transferiert werden, aber sich nicht mehr im Cumulus befinden, haben nicht den initialen Adhäsionskontakt zum Eileiterepithel und sind vermehrt dem Flüssigkeitsstrom ausgesetzt, der retrograd in Richtung Bauchhöhle gerichtet ist (Stone und Hamner, 1975).

Die Einbettung der Embryonen in Alginate hat, gegenüber den hohen Findungsraten, deren Weiterentwicklung allerdings negativ beeinflusst. Andere Arbeiten zeigten, dass während der *In vitro*-Kultur die Embryoentwicklung nicht beeinträchtigt war (Elsheikh et al., 1997; Yaniz et al., 2002; Cosby und Dukelow, 1990). Gegenüber der Einbettung der Embryonen in Agarchips kann bei der Verwendung von Alginate die negative Beeinflussung der sensitiven Zygoten durch zu hohe Temperaturen ausgeschlossen werden.

Die weitere Entwicklung der Embryonen war relativ unabhängig von der Cumulusbeschichtung, wohingegen andere Untersuchungen auch einen Vorteil darin sahen, wenn zumindest *in vitro* die Cumuluszellen über den Befruchtungsvorgang hinaus um den Embryo erhalten bleiben (Khurana und Niemann, 2000; Zhang et al., 1995). Nach der Ovulation werden beim Rind die Cumuluszellen innerhalb weniger Stunden von der Zygote abgelöst (Greve und Callesen, 2001). Die Fragmente, die für eine bestimmte Zeit in der Eileiterflüssigkeit bestehen bleiben, werden als nützliche parakrine Zellverbände diskutiert, die das frühe embryonale Wachstum des Embryos beeinflussen können (Hunter, 2003).

Die geringste Rückgewinnungsrate an Embryonen war in der Gruppe zu verzeichnen, die mit 6 mg/ml Hyaluronsäure im Transfermedium zur Steigerung der Viskosität supplementiert war. Es wurde ein unphysiologisch hoher Gehalt an Hyaluronsäure zugesetzt, um eine „Fixation“ der transferierten Embryonen im Eileiter und damit ein Schutz vor Verlust zu erreichen. Hyaluronsäure wurde z.B. im expandierten Cumuluszellapparat nachgewiesen, jedoch nur in Größenordnungen von 0,5 bis 1 mg/ml (Zhuo und Kimata, 2001). Darüber hinaus haben weitere Untersuchungen gezeigt, dass die *In vitro*-Kultur mit 6 mg/ml Hyaluronsäure deutlich die Viskosität des Mediums steigerte und die Embryoentwicklung verbesserte (Stojkovic et al., 2002). Die deutlich erhöhte Konzentration an Hyaluronsäure verhindert jedoch auch die koordinierte und frequente Bewegung des Zilienbesatzes auf den Eileiterepithelzellen (Huang et al., 1997), was ein wichtiger Grund für die verminderte Findungsrate in der Hyaluronsäuregruppe im vorliegenden Versuch sein könnte.

Um graduelle Unterschiede in der Cumulusbeschichtung bzw. Interaktionen von Eizellen/Spermien und Eileiterepithel zu untersuchen, wurden in diesem Versuch COC mit Samenzellen und Zygoten mit Rest-Cumuluszellen übertragen. Die Findungsrate war für die „GIFT“-Gruppe tendenziell höher als für die übertragenen Zygoten mit Cumulus (63,1% vs. 56,1%,  $p = 0,067$ ). Ursachen für diesen Unterschied könnten auch im Bereich der Cumulusbeschichtung gefunden werden, die bei der „GIFT“-Gruppe unmittelbar nach Zugabe von kapazitierten Samenzellen noch während der Befüllung der Transferkapillare

deutlich reduziert wurden. Diese Phänomene sind ebenfalls in der *In vitro*-Kultur zu beobachten (Van Soom et al., 2002).

Die im 2. Experiment erreichte Gesamtfindungsrate von 75% spiegelt entscheidende Erkenntnisse zu physiologischen Mechanismen tubaler Migration von transferierten Komplexen in verschiedenen Stadien wieder.

Dieses Problem wurde bereits von der Arbeitsgruppe von Ellington (Ellington, 1991) beschrieben, die die physiologischen Eigenheiten des Eileiters mit all seinen komplexen Interaktionen während des Gametentransports, den muskulären, Zilien-abhängigen und sekretorischen Aktivitäten sowie den Faktoren, die das Anheften an das Eileiterepithel für den Weitertransport bewirken, herausgestellt haben. Die Ergebnisse dieses „offenen“ Systems der *In vivo*-Kultur lassen sich mit den in der Literatur dokumentierten Arbeiten am ligierten Schafeileiter vergleichen, die durch mehrfach chirurgisches Vorgehen einem Verlust vorgebeugt haben und Wiedergewinnungsraten zwischen 64% und 74% erreicht haben (Rizos et al., 2002; Sreenan und Scanlon, 1968; Boland, 1984; Enright et al., 2000).

Die Gewinnungsraten der übertragenen COC-Stadien und der von Cumulus befreiten 4- bis 8-Zellstadien unterschieden sich nicht. In diesem Zusammenhang ist seit längerem bekannt, dass der Eizelltransport entgegen dem Eileiterflüssigkeitsstrom erfolgt, der retrograd zur Bauchhöhle hin gerichtet ist (Stone und Hamner, 1975). Die größten Mengen an Eileiterflüssigkeit werden zum Zeitpunkt der Östrogendominanz sezerniert, während vom 2. bis 5. Zyklustag deutlich weniger Flüssigkeit im Eileiter zu finden ist (Killian et al., 1989). Die Cumulus-Oozyten-Komplexe wurden unmittelbar nach der Ovulation bis maximal Tag 1 des Zyklus transferiert, während die Embryonen im 4- bis 8-Zellstadium am Zyklustag 2,5 bis 3 in den Eileiter übertragen wurden. Daher ist es offensichtlich, dass zu einem Zeitpunkt, indem eine geringere Flüssigkeitsmenge im Eileiter nur kleinste Strömungen verursacht, auch von Cumulus-befreite Embryonalstadien trotz ihrer mangelnden Haftfähigkeit am Epithel nicht verloren gehen.

Eine Erklärung der Unterschiede zwischen den Gewinnungsraten der COC-Gruppe (COC + Künstliche Besamung) und der GIFT-Gruppe ( $p > 0,01$ ) ist möglicherweise auf Seite der Spermien zu suchen, die den COC der GIFT-Gruppe vor dem Transfer beigemischt wurden. So konnte beobachtet werden, dass unmittelbar nach Zugabe der Spermien zu den COC in der Transferkapillare die äußersten Cumuluschichten von der Eizelle abgelöst wurden. Da in hoher Konzentration eine große Zahl an Spermien in direkten Kontakt mit dem COC treten, sind beginnende Reaktionen freiwerdender Spermienenzyme, v.a. der akrosomalen

Hyaluronidase, für eine sehr schnelle Auflockerung der äußeren Cumuluszelllagen verantwortlich zu machen (Hunter, 2003). Da die Verweildauer von COC und Spermien in der Transferkapillare auf einige Minuten beschränkt war, sind die Faktoren „Zeit“ und „Spermienkonzentration“ als Hauptgrund für eine mögliche, negative Beeinflussung von Eizelladaptation und Migration im Eileiter in Betracht zu ziehen. Wie über eine videoaufgezeichnete Mikroskopiestudie an Hamstereizellen gezeigt wurde, ist die Aufnahme von COC an die epitheliale Anhaftung gebunden (Talbot et al., 2003).

Lam et al. (2000) konnten nachweisen, dass die extrazelluläre Matrix an die Zilienspitze bindet. In den maturierten, d.h. expandierten Cumuluszellen ist granulär und filamentär gebundene Hyaluronsäure die entscheidende Komponente (Zhuo und Kimata, 2001). Dabei treten die Granula und Filamente in Kontakt mit den Zilienkronen, deren Interaktion dann wichtig für Anhaftung und Weitertransport im Eileiter sind (Lam et al., 2000). Bei Verlust der Cumuluszelllage zu Beginn der Eileitermigration ist eine veränderte Anheftungseigenschaft für die schlechtere Findungsrate denkbar, wie es bei der GIFT-Gruppe zu beobachten war.

Die höchsten Entwicklungsraten mit 41,9% (Tag 7) und 43,3% (Tag 8) nach *In vivo*-Kultur wurde in der Gruppe erreicht, in der progressive Stadien übertragen wurden. In diesem Zusammenhang muss jedoch erwähnt werden, dass die tatsächliche Kulturphase eine kombinierte Anwendung der *In vitro*-Kultur und der *In vivo*-Kultur war. Umso mehr ist bemerkenswert, dass die Blastozystenrate in dieser Gruppe deutlich höher war ( $p < 0,05$ ) als die Blastozystenrate aus der reinen *In vitro*-Kulturphase (IVP). Im Vergleich erscheint die *In vivo*-Kultur gegenüber der IVP als die bessere Entwicklungsmethode, obwohl es sich nur um die Kulturphase im zweiten Entwicklungsabschnitt handelt. Arbeiten, die sich mit der *In vivo*-Kultur am ligierten Schafeileiter befassten, stellten den qualitativen Entwicklungsgewinn in den Vordergrund, ein quantitativer Vorteil wurde jedoch verneint (Rizos et al., 2002; Enright et al., 2000). Lonergan et al. (2003) kultivierten Embryonen zuerst im sog. SOF-Medium (Synthetic oviduct fluid) für 2 bis 4 Tage, um sie anschließend für weitere 2 bis 4 Tage im Schafeileiter zu belassen. Sie beobachteten eine signifikant niedrigere Blastozystenrate (0 bis 8,2%). Dieses Phänomen wurde durch die hohe Empfindlichkeit der Embryonen in Zusammenhang mit dem Wechsel von der *In vitro*-Kultur in SOF-Medium in eine andere Umwelt, den Eileiter, erklärt. Die in diesem Versuch durchgeführte Kombination der *In vitro*-Kultur im CR1-Medium mit der *In vivo*-Kultur im Rindereileiter ließ diesen Schluss jedoch nicht zu.

Die Anwendung des sog. GIFT resultierte in der Gewinnung von nahezu 20% Blastozysten am Tag 8. Nach unserem Wissen gibt es bislang keine vergleichbare Beschreibung, die über die Durchführbarkeit des GIFT im Zusammenhang mit der Realisierung der erfolgreichen Gewinnung von Blastozysten beim Rind berichtet. Diese Techniken des GIFT wurden schon

beim Menschen (Asch et al., 1984), Schwein (Rath et al., 1994) und Pferd (Carnevale et al., 1999) eingesetzt. Versuche beim Rind scheiterten jedoch am geringen Erfolg (Trounson et al., 1977; Newcomb et al., 1978; Fayrer-Hosken et al., 1989). Neuere Untersuchungen im Rahmen des GIFT berichten über eine sehr geringen Fertilisierungsrate, wobei die Entwicklung zu Blastozysten gänzlich ausblieb (Rizos et al., 2002). Unter anderem wurden technische Gründe für den ausgebliebenen Erfolg angegeben.

Der Transfer von IVM-COC in den Rindereileiter von zuvor mehrfach mit Nativsamen (von mehreren Bullen mit bekannt guter Befruchtungsrate) besamten Trägartieren führte zu einer sehr geringen Blastozystenanzahl. Diese Beobachtungen decken sich jedoch mit denen anderer Autoren (Rizos et al., 2002; Newcomb et al., 1978). Cox und Mitarbeiter (Cox et al., 2002) transferierten partiell denudierte, maturierte Rinderoozyten in die Eileiter von zuvor besamten Ziegen und erreichten eine Fertilisationsrate von 42,5%. In dem vorliegenden Experiment war es jedoch nicht möglich, die Fertilisationsrate zu bestimmen, da über die Dauer der *In vivo*-Kultur unbefruchtete und befruchtete, aber nicht weiterentwickelte Eizellen in unterschiedlichem Maß degeneriert waren.

Während in der IVF Spermien in der Konzentration von  $0,5 \times 10^6/\text{ml}$  bis  $2 \times 10^6/\text{ml}$  routinemäßig eingesetzt werden, wird das Verhältnis von Eizelle zu Spermien im Eileiter als nahezu 1:1 beschrieben (Hunter, 1996). Eine Eizell/Spermienrelation von 1:100 wirkt sich offensichtlich bereits schon negativ (- 6%) auf die Blastozystenrate aus, die sich weiter (25%) reduziert, wenn das Verhältnis auf 1:10000 angehoben wird (Ward et al., 2002).

Aufgrund dieser Ergebnisse liegt der Schluss nahe, dass das *In vitro*-Maturationsystem mit der *In vivo*-Befruchtung nicht kompatibel ist.

### **Schlussfolgerung:**

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben verdeutlicht, dass obligate Strukturen am adäquaten Eizell/Embryotransport im Eileiter beteiligt sind. Es ist anzunehmen, dass die Weiterentwicklungsrate primär unabhängig von der Findungsrate, aber maßgeblich von den initialen Voraussetzungen zur Eizellgewinnung und der IVP abhängig ist. Es konnte weiter gezeigt werden, dass die transvaginale Endoskopie zur effizienten Gewinnung und Nutzung von Embryonen eingesetzt werden kann. Mit dem Transfer von bereits geteilten IVP-Embryonen zur *In vivo*-Kultur konnte sogar die Anzahl der Blastozysten gegenüber der IVP-Kontrolle gesteigert werden. Zum ersten Mal wurde mit dieser Studie ein Beitrag geleistet, der eine beachtliche Entwicklung von Embryonen zu Blastozysten durch GIFT im Rindereileiter beschreibt. Die Gegenüberstellung der *In vitro*-Entwicklung von Embryonen mit



physiologischen Voraussetzungen im Rindereileiter lässt die in diesem Versuch beschriebene Vorgehensweise als optimal erscheinen, um zukünftig weitere Entwicklungsanalogien in diesen Bereichen zu untersuchen.

## Literatur:

- Adaniya GK, Rawlins RG, Quigg JM, Roblero L, Miller IF, Zaneveld LJD (1993): First pregnancies and livebirths from transfer of sodium alginate encapsulated embryos in a rodent model. *Fertility and Sterility* 59,652-656.
- Asch RN, Ellsworth LR, Balmaceda JP, Wong PC (1984): Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer. *Lancet* 2,1034-1035.
- Besenfelder U, Brem G (1998): Tubal transfer of bovine embryos: a simple endoscopic method reducing long term exposure of in vitro produced embryos. *Theriogenology* 50,739-745.
- Besenfelder U, Havlicek V, Mösslacher G, Brem G (2001): Collection of tubal stage bovine embryos by means of endoscopy. A technique report. *Theriogenology* 55,837-845.
- Boland MP (1984): Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology* 21,126-137.
- Bourdage RJ, Halbert SA (1988) Distribution of embryos and 500-microM microspheres in the rabbit oviduct: controls for acute motion analysis during transport. *Biol Reprod* 38,282-291
- Carnevale EM, Alvarenga MA, Squires EL, Choi YH (1999): Use of noncycling mares as recipients for oocyte transfer and GIFT. In: Proc. Ann. Conf. Soc. of Theriogenology Nashville, TN. p 44 (Abstr.).
- Cosby NC, Dukelow WR (1990): Microencapsulation of single multiple and zona pellucida-free mouse preimplantation embryos in sodium alginate and their development *in vitro*. *J Reprod Fert* 90,19-24.
- Cox JF, Zavala A, Saravia F, Rivas C, Alfaro V (2002): Fertilization efficiency of in vitro matured oocytes transferred to oviducts of inseminated goats: a model to assess *in vivo* fertilization performance of goat spermatozoa. *Theriogenology* 58,1-8.
- Eaton NL, Niemeyer GP, Doody MC (1990): The use of an alginic acid matrix to support in vitro development of isolated murine blastomeres. *J In Vitro Fert Embryo Transf*;7,28-32.
- Ellington JE (1991): The bovine oviduct and its role in reproduction: A review of the literature. *Cornell Vet* 81,313-328.
- Elsheikh AS, Takahashi Y, Hishinuma M, Nour MS, Kanagawa H (1997): Effect of encapsulation on development of mouse pronuclear stage embryos in vitro. *Anim Reprod Sci* 48,317-324.
- Enright BP, Lonergan P, Dinneyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP (2000): Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs. in vivo: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology* 54,659-673.
- Farin PW, Farin CE (1995): Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biol Reprod* 52,676-682.
- Fayrer-Hosken RA, Younis AI, Brackett BG, Mc Bride CE, Harper KM, Keefer CL, Cabaniss DC (1989): Laparoscopic oviductal transfer of in vitro matured and in vitro fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 32,413-420.
- Greve T, Xu KP, Callesen H, Hyttel P (1987): *In vivo* development of *in vitro* fertilized bovine oocytes matured *in vivo* versus *in vitro*. *Journal of in vitro Fertilization and Embryo Transfer* 4,281-285.
- Greve T, Avery B, Callesen H (1993): Viability of *in vivo* and *in vitro*-produced bovine embryos. *Reprod Dom Anim* 28,164-169.

- Greve T, Bousquet D, King WA, Betteridge KJ (1984): In vitro fertilization and cleavage of in vivo matured bovine oocytes. *Theriogenology* 22,151-165.
- Greve T., Callesen H (2001): Rendez-vous in the oviduct: Implications for superovulation and embryo transfer. *Reprod Nutr Dev* 41,451-459.
- Holm P, Booth PJ, Callesen H (2002): Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction* 123,553-565.
- Huang S, Driessen N, Knoll M, Talbot P (1997): In vitro analysis of oocyte cumulus complex pickup rate in the hamster *Mesocricetus auratus*. *Mol Reprod Dev* 47,312-322.
- Hunter RHF (1996): Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilisation to avoid polyspermy. *Mol Reprod Dev* 44,417-422.
- Hunter RHF (2003): Post-ovulatory fate of follicle and oocyte: contributions of somatic cells and follicular fluid. *Physiology of the Graafian follicle and ovulation*. In Hunter RHF. (ed.): *Physiology of the Graafian follicle and ovulation*. Cambridge, University Press, United Kingdom 295-324.
- Khurana NK, Niemann H (2000): Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* 54,741-756.
- Killian GJ, Chapman DA, Kavanaugh J, Deaver DR, Wiggin HB (1989): Changes in phospholipids cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrous cycle. *J Reprod Fert* 86,419-426.
- Lam X, Gieseke C, Knoll M, Talbot P (2000): Assay and importance of adhesive interaction between hamster (*Mesocricetus auratus*) oocyte-cumulus complexes and the oviductal epithelium. *Biol of Reprod* 62,579-588.
- Lonergan P, Rizos D, Kanka J, Nemcova L, Mbaye AM, Kingston M, Wade M, Duffy P, Boland MP (2003). Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction* 126,337-46.
- Newcomb R, Christie WB, Rowson LE (1978): Birth of calves after in vivo fertilisation of oocytes removed from follicles and matured in vitro. *Vet Rec* 102,461-462.
- Rath D, Johnson LA, Welch GR, Niemann H (1994): Successful gamete intrafallopian transfer (GIFT) in the porcine. *Theriogenology* 41,1173-1179.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P (2002): Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61,234-248.
- Sreenan J, Scanlon P (1968): Continued cleavage of fertilized bovine ova in the rabbit. *Nature* 217,867.
- Stojkovic M, Kölle S, Peinl S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Thompson JG, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Sinowatz F, Wolf E (2002): Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen-thawed bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction* 124,141-153.
- Stone SL, Hamner CD (1975): Biochemistry and physiology of oviductal secretions. *Gynecol Invest* 6,234-252.
- Talbot P, Shur BD, Myles DG (2003). Cell adhesion and fertilization: Steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol Reprod* 68,1-9.
- Thompson JG (1997): Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod Fertil Dev* 9,341-354.
- Trounson AO, Willadsen SM, Rowson LE (1977): Fertilization and development capability of bovine follicular oocytes matured in vitro and in vivo and transferred to the oviducts of rabbits and cows. *J Reprod Fertil* 51,321-327.
- Van Soom A, Tanghe S, De Pauw I, Maes D, de Kruif A (2002): Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod Dom Anim* 37,144-151.
- Ward F, Enright BP, Rizos D, Boland M, Lonergan P (2002): Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57,2105-2117.

- Wright RW, Ellington J (1995): Morphological and physiological differences between in vivo and in vitro produced preimplantation embryos from livestock species. *Theriogenology* 44,1167-1189.
- Yaniz JL, Santolaria P, Lopez-Gatius F (2002): *In vitro* development of bovine embryos encapsulated in sodium alginate. *J Vet Med A* 49,393-395.
- Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA (1995): Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. *Mol Reprod Dev* 40,338-344.
- Zhuo L, Kimata K (2001): Cumulus Oophorus extracellular: Its construction and regulation. *Cell Structure and Function* 26,189-196.

### **Autoren:**

**Besenfelder U.** <sup>1)2)</sup>, **Wetscher F.** <sup>1)2)</sup>, **Huber T.** <sup>1)2)</sup>, **Havlicek V.** <sup>1)2)</sup>,  
**Möblacher G.** <sup>1)2)</sup>, **Müller M.** <sup>1)2)</sup>, **Brem G.** <sup>1)3)</sup>

<sup>1)</sup> Institut für Tierzucht und Genetik, Veterinärmedizinische Universität Wien,  
Veterinärplatz 1,  
1210 Wien

<sup>2)</sup> Universität für Bodenkultur Wien,  
Department Interuniversitäres Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie Tulln,  
Abteilung Biotechnologie in der Tierproduktion, Konrad Lorenz Straße 20, 3430 Tulln

<sup>3)</sup> Agrobiogen GmbH, Biotechnologie, Thalmannsdorf 25, Larezhäusen, D-86567 Hilgertshausen