

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM
Wissenschaftlicher Film C 1084/1971

**Befruchtung und Frühentwicklung des Säugetiereies
(Kaninchen)**

Begleitveröffentlichung von

Prof. Dr. J. H. HAHN, Hannover

GÖTTINGEN 1972

Film C 1084

Befruchtung und Frühentwicklung des Säugetiereies (Kaninchen)

J. H. HAHN, Hannover

Allgemeine Vorbemerkungen¹

Fast die gesamte Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Fortpflanzungsphysiologie und -pathologie wird an kleinen Versuchstieren betrieben. Die Kenntnisse über den Befruchtungsvorgang bei Säugetieren und über die Frühentwicklung des Eies leiten sich fast ausschließlich von experimentellen Arbeiten an kleinen Versuchstieren ab. Daraus ergibt sich die besondere Bedeutung dieser experimentellen Arbeit für das Gebiet der Fortpflanzungsbiologie.

In den folgenden Abschnitten werden Einzelheiten des Befruchtungsvorganges und der Gewinnung und Konservierung von Eizellen beschrieben. Diese Beschreibung stellt somit eine weiterführende Ergänzung des Filmtextes dar.

Akrosomreaktion und Kapazitation

Das Akrosom bedeckt den vorderen Teil des Kopfes einer Samenzelle und besteht aus einer inneren und äußeren Membran. Zwischen beiden liegt ein Hohlraum, in dem das akrosomale Material enthalten ist. Dieses Material besteht im wesentlichen aus einem Polysaccharid-Proteinkomplex und mehreren Enzymen. Bei der Akrosomreaktion wird der Inhalt des Akrosoms freigesetzt. Dadurch werden Samenzellen in die Lage versetzt, die Eihüllen zu durchdringen. In engem Zusammenhang mit der Akrosomreaktion steht das Phänomen der Kapazitation; nur bei kapazitierten Samenzellen tritt eine Akrosomreaktion auf. Der genaue Vorgang an den Spermienköpfen während der Kapazitation ist

¹ Angaben zum Film und kurzgefaßter Filminhält (deutsch, englisch, französisch) s. S. 16 u. 17.

noch nicht bekannt. Die Kapazitation ist bis zu einem gewissen Grade ein reversibler Prozeß. Durch Hinzufügen von Samenplasma zu kapazitierten Samenzellen wird die Kapazitation aufgehoben. Die Samenzellen werden dekapazitiert. Der sog. Dekapazitationsfaktor der Samenzelle stellt anscheinend eine Schutzvorrichtung für die Samenzelle dar. Er schützt sie u. a. vor zu schneller Phagozytose im Uterus. Es gilt heute als sicher, daß die Akrosomreaktion erst beginnt, wenn kapazitierte Samenzellen Kontakt mit der Eizelle gewonnen haben. Die Akrosomreaktion beginnt mit der Öffnung des Akrosoms durch Verklebung und Vesikulation der Plasmamembran und der äußeren Akrosommembran. Erst nach Durchdringung der Zona pellucida sind der vordere Teil der Plasmamembran und die äußere Akrosommembran vom Spermienkopf abgelöst. Im Gegensatz zu dieser spezifischen Akrosomreaktion gibt es auch unspezifische Akrosomveränderungen und -ablösungen im Verlauf von Samenzellschädigungen. Das Phänomen der Kapazitation wurde erstmals von AUSTIN [1] und CHANG [7] unabhängig voneinander beschrieben. Später haben AUSTIN [2], [3] und BEDFORT [4] u. a. darüber publiziert.

Akrosomreaktion und Durchdringung der Eihüllen

Kapazitierte Samenzellen haben nacheinander die Kumulusmasse, die Corona radiata und die Zona pellucida der Eizelle zu durchdringen. Für die Durchdringung der Kumulusmasse ist akrosomale Hyaluronidase erforderlich. Hyaluronidase löst die Kittsubstanz der Kumuluszellen durch Depolymerisation und Hydrolyse. Da Hyaluronidase als erstes Enzym in Aktion tritt, nimmt man an, daß der breitere apikale Teil des Akrosoms vorwiegend die mukolytische Hyaluronidase enthält, während das proteolytische Enzym für die Durchdringung der Zona pellucida mehr im dünneren lateralen Teil des Akrosoms bzw. an der Oberfläche der inneren Akrosommembran lokalisiert ist. Neuerdings wird vermutet, daß ein weiteres akrosomales Enzym (Corona penetrating enzyme) für die Durchdringung der Corona radiata notwendig ist. Erste Versuchsergebnisse sprechen dafür, daß dieses Enzym die interzelluläre Substanz der Koronazellen angreift und sich die Spermatozoen zwischen den Koronazellen hindurchbewegen. Die radiäre Anordnung der Koronazellen hat möglicherweise eine richtungweisende Funktion für die Samenzellen. Der genaue Mechanismus des für die Durchdringung der Zona pellucida notwendigen Enzyms ist noch nicht bekannt. Es hat trypsinähnlichen Charakter und wird als Zona-Lysin bezeichnet. Wenn die Samenzellen die Zona pellucida passiert haben, hinterlassen sie einen feinen Kanal, der als Beweis für die lytische Fermentwirkung gilt. Über den Wirkungsmechanismus der akrosomalen Enzyme ist u. a. von MANN [11] und neuerdings von ZANEFELD und WILLIAMS [14] berichtet worden.

Eintritt der Samenzelle in das Ooplasma und die Kernverschmelzung

Unmittelbar nach der Durchdringung der Zona pellucida heftet sich der Kopf der Samenzelle flach an die Oberfläche des Ooplasmas an. Durch anhaltende Aktion des Schwanzes der Samenzelle wird dieser Vorgang wahrscheinlich unterstützt. Feine Plasmaausläufer des Ooplasmas (Mikrovilli) fusionieren zunächst mit der Plasmamembran der postakrosomalen Region des Kopfes. Die Inkorporation der Samenzelle in das Ooplasma beginnt mit dem kaudalen Teil des Kopfes. Dabei lösen sich die verbliebenen perinuklealen Membranen ab. Sie enthalten möglicherweise ein enzymatisches Material, das die Aktivierung des Ooplasmas bedingt. Von der Anheftung bis zur völligen Inkorporation des Kopfes der Samenzelle vergeht etwa eine halbe Stunde. Mittelstück und Schwanz folgen zumindestens bei Nagetieren später nach. Der Kern der Samenzelle schwillt im Ooplasma etwas an und wird dann in kürzester Zeit unsichtbar. Die Disintegration des Kernes wird wahrscheinlich durch ein nukleolytisches Ferment im Zusammenhang mit der Aktivierung der Eizelle bedingt.

Um das Eindringen mehrerer Samenzellen in das Ooplasma zu verhüten, reagiert die Säugetier-Eizelle mit dem sog. Block des Vitellus. Man nimmt an, daß diese Reaktion durch die corticalen Granula ausgelöst wird, die unmittelbar unter der vitellinen Membran liegen. Beim Eintritt einer Samenzelle in das Ooplasma geben sie ihren Inhalt an die Oberfläche des Ooplasmas ab und zerfallen anschließend. Die bei Säugetiereiern verschiedener Spezies vorhandene Zona-Reaktion, ein Mechanismus, der die Durchdringung der Zona pellucida durch überzählige Samenzellen verhindert, wird ebenfalls auf die Wirkung corticaler Granula zurückgeführt.

Zona-Reaktion und Block des Vitellus können durch bestimmte Einflüsse verzögert oder aufgehoben werden, z. B. bei Überalterung des Eies. Wenn zusätzlich Spermien in das Ooplasma eindringen, spricht man von Polyspermie, und es kommt zur Ausbildung mehrerer Vorkerne. Drei Vorkerne können auch entstehen, wenn der 2. Polkörper nicht abgeschnürt wird. Bei Verschmelzung von drei Vorkernen entsteht ein triploider Embryo. Polypleide Embryonen sterben meistens schon vor der Implantation ab.

Diskutiert wird die Frage, ob Mittelstück und Schwanz der Spermien mit bei der Befruchtung in das Ooplasma der Eizelle gelangen. Es ist bisher unbekannt, ob zytoplasmatische Bestandteile der Samenzelle irgendeinen Einfluß auf den späteren Embryo haben. Ohne Zweifel gelangen Bestandteile des Spermienkopfes wie Plasmamembran, peri- und subakrosomales Material in das Ooplasma. Bei einer Reihe kleiner Versuchstiere wurden auch die Centriolen, die Mitochondrien, Matrix und Fibrillen des Schwanzes im Ooplasma nachgewiesen. Der Nachweis dieser Bestandteile im Ooplasma ist außerordentlich schwierig, da sie

ähnlich wie der Kern schnell unsichtbar werden. Neben AUSTIN [3] haben PIKO [12] und BEDFORD [4] ausführlich über die Vorgänge beim Eintritt der Samenzelle in die Eizelle berichtet.

Eigewinnung und Kultivierung

Die Gewinnung von Eizellen ist heute bei allen kleinen Versuchstieren möglich. Mit Ausnahme von Kaninchen müssen die Tiere getötet und der Geschlechtstrakt aus der Bauchhöhle entfernt werden. Je nach dem Zeitpunkt der zurückliegenden Befruchtung werden die Eizellen aus dem Eileiter bzw. Uterus ausgespült. Der Übertritt von befruchteten Eizellen in den Uterus erfolgt bei den kleinen Versuchstieren zwei bis drei Tage nach der Konzeption. Die Eigewinnung ist beim Kaninchen aufgrund der bestehenden Größenverhältnisse wesentlich einfacher als bei anderen kleinen Versuchstieren. Dazu kommt, daß die Eizellen des Kaninchens mit einem Durchmesser von 150—180 μm um etwa ein Drittel größer sind als die der anderen kleinen Versuchstiere.

Fast alle Säugetiere sind Spontanovulierer; beim Kaninchen wird die Ovulation durch die Paarung oder durch eine Hormoninjektion induziert. Dadurch ist der Zeitpunkt der Ovulation beim Kaninchen mit großer Genauigkeit vorausbestimmbar. Sie tritt bei geringer Variation zehn Stunden nach der Paarung auf. Das hat bei bestimmten Experimenten einen großen Vorteil. Eizellen kann man beim Kaninchen bis zum 5. Tag nach der Konzeption sehr leicht gewinnen. Am 6. Tag haben die Blastozysten bereits einen Durchmesser von 2—3 mm erreicht. Sie werden dann bei der Gewinnung oft beschädigt. Beim Kaninchen beginnt die Implantation am 7. Tag. Um eine möglichst große Zahl befruchteter Eier zu gewinnen, bedient man sich der Superovulation, die durch Injektionen von gonadotropen Hormonen ausgelöst wird. Beim Kaninchen hat sich im Gegensatz zu anderen Tieren die Verwendung von FSH und LH zur Erzielung einer Superovulation besonders bewährt.

Die Konservierung von befruchteten Eizellen *in vitro* ist bei der Maus und beim Kaninchen vom 2-Zellstadium bis zur expandierten Blastozyste, d. h. über einen Zeitraum von vier bis fünf Tagen möglich. Die meisten Kulturmedien sind hinsichtlich ihrer Ion-Konzentration dem Blut sehr ähnlich. Häufig wird noch inaktiviertes Blutserum zum Kultivieren von Eizellen verwendet. Da artspezifisches Blutserum nicht immer zur Verfügung steht und das Serum in seiner Zusammensetzung nicht immer konstant ist, hat man versucht, den Serumanteil in den Kulturmedien möglichst gering zu halten bzw. ganz zu ersetzen. Das führte zu der Entwicklung definierter Kulturmedien, von denen BRINSTER'S Medium am bekanntesten ist.

Es sind in den letzten Jahren zahlreiche Arbeiten über den Stoffwechsel der Eizellen und über ihren Energiebedarf veröffentlicht worden. Sicher

ist, daß dabei zwischen den Spezies Unterschiede bestehen. Genauere Untersuchungen liegen im übrigen bisher nur über Mäuse und Kanincheneier vor. Befruchtete Mäuseeier benötigen in den beiden ersten Tagen ihrer Entwicklung *in vitro* eine exogene Energiequelle, wobei Na-Pyrovat und Na-Laktat eine optimale Wirkung entfalten. Daneben sind eine Reihe von Aminosäuren notwendig. Ein Glukosezusatz dient als Sicherheitsfaktor. Nach dem 8-Zellstadium können die Embryonen andere von außen zugeführte Energiequellen verwerten, z.B. Glukose. Sie können sich dann sogar ohne diese Energiezufuhr bis zur Blastozyste weiterentwickeln, wenn entsprechende Aminosäuren vorhanden sind.

Nahezu umgekehrt verhalten sich die Kanincheneizellen. Sie benötigen zum Wachstum *in vitro* anfangs keine von außen zugeführten Energiequellen. Notwendig sind allerdings entsprechende Aminosäuren. Man nimmt daher an, daß die Kaninchenembryonen im Frühstadium entweder über genug endogene Energiequellen verfügen oder daß sie in der Lage sind, Aminosäuren als Energieträger zu benutzen. Wenn Kanincheneier über das Stadium der Morula hinaus kultiviert werden sollen, benötigen sie zusätzliche Energiequellen in Form von Na-Pyrovat, Na-Laktat und Glukose. Zur Kultivierung von Kanincheneiern benutzen wir TCM 199 mit 20% Kaninchenserum. Das Medium soll dabei einen pH-Wert von 7,4 und eine Osmolarität von 300—320 mOsm haben. Mit diesem Medium erzielen wir optimale Ergebnisse. Bereits die Spülung der Eileiter bzw. der Uteri zur Eigewinnung wird mit diesem Medium durchgeführt. Nach der Gewinnung der Eizellen werden diese in frisches Medium umgesetzt, um Verunreinigungen zu vermeiden.

Als Kultivierungsbehälter werden verschiedene Gefäße benutzt. Es gibt offene und geschlossene Systeme. Bei den geschlossenen Systemen der Kultivierung wird das die Eizellen enthaltende Kulturmedium mit einem neutralen Öl überschichtet. Wenn man ein offenes System ohne Ölabdeckung verwendet, muß das Kultivierungsgefäß genügend Kulturflüssigkeit enthalten, damit es im Brutschrank nicht austrocknet. Wir sind mit der Verwendung von sog. Carrol-Flaschen sehr zufrieden. Nach Übertragung der Eizellen in das Kultivierungsmedium wird das Gefäß mit den Eizellen + Medium in einen Brutschrank gebracht, der eine Temperatur von 37° C hält, 95% Luftfeuchtigkeit aufweist und in dem sich eine 5%ige CO₂-Spannung aufrechterhalten läßt. Die Kulturen werden täglich unter dem Mikroskop untersucht und dabei das Wachstum und Aussehen der Eizellen beurteilt. Umfassende Arbeiten zur Gewinnung und Konservierung von Eizellen bei Kaninchen und Maus liegen u. a. vor von GABLER [8], BRINSTER [5], [6], KANE und FOOTE [10] und WHITTINGHAM [13].

Präparation von lebenden Eizellen des Kaninchens zur kinematographischen Untersuchung des Befruchtungsvorganges

Eizellen und Spermien sind nach der Gewinnung aus dem Eileiter nur bei einer konstanten Temperatur von 37° C am Leben zu erhalten. Die Erhaltung dieser optimalen Temperatur z.B. bei kinematographischen Aufnahmen wird durch den Einbau des Mikroskopes in einen Kunststoffkasten mit automatischer Wärmeregulierung ermöglicht.

Bereits unmittelbar nach der Ovulation dringen Samenzellen in die um das Ei liegenden Follikelzellschichten ein und gelangen schließlich in das Innere der Eizelle. Der Vorgang des Eindringens einer Samenzelle in die Eizelle bis zum Auftreten von Aktivierungserscheinungen an der Eizelle als Anzeichen einer stattfindenden Befruchtung dauert zwei bis vier Stunden. Wenn man Eizellen während dieser Zeit aus dem Eileiter eines Tieres entnimmt, sind sie von einer dichten Schicht Follikelzellen umgeben, die das Innere der Eizelle und damit auch die eindringenden Samenzellen völlig verdecken. Die Darstellung von Samenzellen ist daher sehr schwierig und nur möglich, wenn vor Beginn der Aufnahmen die Follikelzellen vorsichtig auseinandergedrückt werden. Die gleiche Präparation muß angewendet werden, um die Aktivierungsvorgänge der Eizelle darzustellen, die während des Befruchtungsvorganges auftreten. Dabei darf die Eizelle nicht beschädigt werden, da sonst alle Lebensvorgänge sofort erlöschen. Zur Präparation der Eizelle bedienen wir uns einer speziellen Kunststoffkammer, die mit einem schraubbaren Deckel versehen ist. Boden und Deckel dieser Kammer sind aus dünnem Glas. Vor der Benutzung wird die Kammer mit einem Tropfen eines Nährmediums versehen und die zu untersuchende Eizelle in das Nährmedium übertragen. Nach Übertragung der Eizelle in das Nährmedium wird die Kammer verschlossen und unter dem Mikroskop der Deckel so weit in die Kammer hineingedreht, bis ein leichtes Auseinanderfallen der um das Ei herumliegenden Follikelzellen beobachtet wird. Die Eizelle darf nicht zu stark gedrückt werden, sonst zerreißt die Zona pellucida, und das Ooplasma fließt aus.

Bei der Präparation von Eizellen für kinematographische Aufnahmen muß darauf geachtet werden, daß die Kammer mit der Nährflüssigkeit und dem Ei luftdicht von der Außenwelt abgeschlossen wird, da die Präparate sonst in kürzester Zeit eintrocknen.

Nach der Aktivierung der Eizelle durch eine eingedrungene Samenzelle lösen sich die Follikelzellen von der Eizelle ab und die einzelnen Bestandteile der Eizelle sind jetzt gut erkennbar. Zur Darstellung der Vorkernverschmelzung und der ersten Teilungsstadien einer befruchteten Eizelle benutzen wir eine Stahlkammer mit einem quadratischen Ausschnitt von 22 mm. Auf der einen Seite dieser Kammer wird ein Deckgläschen von 24 mm² mit verflüssigter Vaseline aufgeklebt. Dann wird die Kammer gedreht und mit Nährlösung und der zu untersuchenden Eizelle beschickt.

Anschließend wird ein genau in die Öffnung passendes Deckgläschen auf das Präparat geklebt und mit flüssiger Vaseline luftdicht an den Rändern verschlossen.

Bei der Anfertigung dieses Präparates muß darauf geachtet werden, daß die in der Kammer vorhandene Eizelle nicht gequetscht wird. Durch Einlegen feiner Glaskügelchen bzw. Glassplitter von mindestens 250 μm Durchmesser in die Nährlüssigkeit entsteht nach dem Verschuß der Kammer ein ausreichendes Lumen, und die Lebensfähigkeit der Eizelle wird nicht beeinträchtigt.

Die Lebensfähigkeit der Eizellen in diesen Kammern unter dem Mikroskop beträgt maximal zwei Tage.

Sollen befruchtete Eizellen über das Morulastadium hinaus gefilmt werden, ist daran zu denken, daß die Eizelle im Stadium der Blastozyste sich kräftig ausdehnt und das 10—20fache ihres ursprünglichen Volumens erreichen kann. Eine entsprechende Vergrößerung der Kammern zur Aufbewahrung der Eizellen ist dann notwendig. Für diese Zwecke wurde eine Kammer verwendet, deren Bodenplatte aus Glas besteht. Darauf wird ein Kunststoffring von etwa 1—2 mm Dicke geklebt. Nach Beschickung der so entstandenen Kammer mit Nährmedium und Eizelle erfolgt der Verschuß mit einem Deckgläschen, das an den Rändern mit flüssiger Vaseline abgedichtet wird.

Bei in vitro-Kultivierung von befruchteten Eizellen wird zwar das Stadium der expandierten Blastozyste erreicht, 24 Stunden nach Erreichen dieses Stadiums kommt es jedoch bei Verwendung der bisher bekannten Kultivierungsmedien zu degenerativen Erscheinungen an den Blastozysten. Präparationsmethoden für Vitalbeobachtungen an Mikroorganismen sind von HEUNERT [9] beschrieben worden.

Erläuterungen zum Film¹

Unter dem Einfluß von gonadotropen Hormonen der Hypophyse reift der Graafsche Follikel im Eierstock heran. Die Follikelwand besteht von außen nach innen aus der Theka externa, Theka interna und der Granulosa.

Das Ei liegt im Cumulus oophorus, der aus Granulosazellen gebildet wird. Der Eihügel ist wandständig und ragt in das mit Follikelflüssigkeit gefüllte Antrum des Follikels hinein.

Die Zona pellucida der Eizelle und die Zellen des Cumulus oophorus sind innig miteinander verbunden. Die der Zona pellucida unmittelbar anliegende Zellschicht wird als Corona radiata bezeichnet. Unter der Zona ist der hypolemmale Raum. Das Ooplasma wird von der vitellinen Membran umschlossen.

Der Kern der Eizelle befindet sich in der Regel von der Geburt des Tieres an in der Prophase I der Meiose. Bei der Follikelreifung wird die Reduktions-

¹ Wortlaut des im Film gesprochenen Kommentars.

teilung bis zur Telophase I fortgesetzt, die an der Abschnürung des 1. Polkörpers zu erkennen ist.

Unmittelbar vor der Ovulation löst sich die Eizelle mit den Kumuluszellen von der Follikelwand ab und wird nach dem Follikelsprung in den Eileiter befördert. Der Kern hat inzwischen die Metaphase II der Meiose erreicht. Bei der Ovulation spielt vermutlich ein kollagenolytisches Ferment eine Rolle.

Für die Befruchtung der Eizelle ist die Anwesenheit von kapazitierten Samenzellen im Anfangsteil des Eileiters erforderlich. Unter Kapazitation versteht man einen noch nicht in allen Einzelheiten bekannten Vorgang am Kopf der Samenzelle, der diese in die Lage versetzt, die Eihüllen zu durchdringen.

Für die Durchdringung der Corona radiata und der Zona pellucida sind Enzyme erforderlich, die vom sog. Akrosom des Spermienkopfes freigesetzt werden.

Bei der Mehrzahl der Säuger gelangen Kopf und Schwanz der Samenzelle in das Ooplasma. Es ist nicht sicher, ob dabei die Samenzelle einsinkt oder ein phagozytärer Prozeß stattfindet. Ein bisher nicht genau bekannter Mechanismus, der als Block des Ooplasma bezeichnet wird, verhindert das Eindringen weiterer Spermien.

Unmittelbar nach Eintreten einer Samenzelle in das Ooplasma wird das Spermium dekondensiert und unsichtbar. Gleichzeitig damit beginnt die Aktivierung der Eizelle.

Dieser Prozeß wird durch das Auseinanderfallen der gelockerten Kumuluszellen und Ablösung der Corona radiata von der Zona pellucida eingeleitet. Zur gleichen Zeit zieht sich das Ooplasma zusammen, und der hypolemmale Raum vergrößert sich deutlich.

Der zweite Polkörper schnürt sich ab; damit ist die Reduktionsteilung beendet und ein haploider Chromosomensatz entstanden.

Im Verlauf der folgenden Stunden bleiben die Zellkernelemente im Ooplasma unsichtbar.

Erst dann tauchen der männliche und weibliche Vorkern wieder auf und verschmelzen miteinander. Nun wird die Prophase der ersten mitotischen Teilung eingeleitet.

Die Kernmembran löst sich auf, und der Kern wird unsichtbar.

Etwa eine Stunde nach Verschmelzung von männlichem und weiblichem Vorkern tritt die erste Furchungsteilung ein.

Damit ist der Abschluß der Befruchtung äußerlich erkennbar, und das Wachstum des Keimlings beginnt.

Nach der Ovulation sind die Eizellen beim Kaninchen mit einer dichten Schicht Kumuluszellen umgeben.

Die Zellen der Corona radiata liegen kranzförmig um die dunkel erscheinende Zona pellucida. Bei den meisten Säugern sind die der Zona anliegenden Zellen der Corona radiata innig mit dem Ei verbunden.

Feine Ausläufer der Coronazellen durchziehen die Zona pellucida und haben Kontakt mit der Oberfläche des Ooplasma.

Für die Durchdringung der Eihüllen sind neben der aktiven Eigenbewegung der Spermien akrosomale Enzyme notwendig. Die Akrosomreaktion, die zur Freigabe dieser Enzyme führt, ist Folge der Kapazitation. Nur kapazitierte

Samenzellen durchdringen beim Kaninchen *Corona radiata* und *Zona pellucida*. Durch die Eihüllen hindurch ist die Bewegung einiger Samenzellen deutlich sichtbar.

Bei größeren Säugetieren durchdringt in der Regel nur eine Samenzelle die *Zona pellucida*. Ein bisher nicht näher bekannter Mechanismus, die sog. *Zona-Reaktion*, verhindert den Durchtritt mehrerer Samenzellen. An fixierten Eizellen konnte festgestellt werden, daß nach dem Eindringen eines Spermiums sich der Kopf vom Schwanz ablöst, zu schwellen beginnt und die zytoplasmatischen Bestandteile sich vom Kern trennen.

Bei kleinen Säugern ist die *Zona-Reaktion* herabgesetzt, beim Kaninchen häufig aufgehoben. Daher können mehrere Samenzellen in den hypolemmalen Raum eindringen. Dort ist ihre lebhaftere Bewegung jetzt gut erkennbar.

Ist ein Spermium in das Ooplasma eingedrungen, setzen am Ei Aktivierungsvorgänge ein, die unter normalen Bedingungen als Zeichen einer stattfindenden Befruchtung gewertet werden können.

Deutlich ist jetzt die wellenförmige Ablösungsbewegung der Kumuluszellen zu sehen. Gleichzeitig zieht sich das Ooplasma zusammen, und der hypolemmale Raum vergrößert sich. Der Volumenverlust des Ooplasma kann dabei 2 bis 25% betragen.

Eine Folge der Eiaktivierung durch ein eingedrungenes Spermium ist die Beendigung der Meiose anzusehen. Diese Phase ist äußerlich daran zu erkennen, daß sich der zweite Polkörper abschnürt. Beide Polkörper sind dann im hypolemmalen Raum frei beweglich.

Die Aktivierungsvorgänge an der Eizelle sind nicht unbedingt spezifisch für eine stattfindende Befruchtung. Sie können auch durch unspezifische Reize ausgelöst werden.

Einige Stunden nach Auftreten der Aktivierungserscheinungen werden weiblicher und männlicher Vorkern zunächst schemenhaft im Zentrum des Eies sichtbar. Dieser Vorgang ist bei der überwiegenden Zahl der Eier wegen der dichten Struktur des Ooplasma nicht zu erkennen.

Beide Vorkerne legen sich schließlich aneinander. Der größere männliche Vorkern unterscheidet sich deutlich von dem kleineren weiblichen. Links vom Ooplasma sieht man beide Polkörper liegen.

Nun findet die Kernverschmelzung statt. Die Kernmembranen verschwinden, und die Chromosomen ordnen sich zur Prophase der ersten mitotischen Teilung. Etwa eine Stunde danach ist die erste Zellteilung sichtbar.

Jetzt treten die Zellkerne wieder hervor. Die befruchtete Eizelle teilt sich beim Kaninchen etwa 14 Stunden nach der Ovulation zum ersten Male.

Vier Stunden nach der ersten Teilung erreicht die Eizelle das 4-Zellstadium. Häufig beobachtet man dabei eine Anordnung der Blastomeren über Kreuz. Die Furchungsteilungen sind nicht immer synchron; daher gibt es auch 3-, 5- und 7-Blastomerenstadien. Die Größe der Furchungskugeln kann ebenfalls variieren.

Die Entwicklung des 8-16-Zellenstadiums beginnt 20 bis 26 Stunden, das der frühen *Morula* 26 Stunden nach der Ovulation.

Das weitere Wachstum bis zur späten *Morula* dauert etwa 24 Stunden. Somit befinden sich beim Kaninchen alle befruchteten Eizellen 2½ Tage nach der Paarung im *Morula*stadium. Zu diesem Zeitpunkt hat ein Teil der Eizellen bereits die Gebärmutter erreicht. Drei Tage nach der Paarung oder

Besamung sind kaum noch befruchtete Eizellen im Eileiter. Auch bei vielen anderen Säugern dauert die Eiwanderung etwa die gleiche Zeit.

Drei Tage nach der Paarung sind auch die Blastozysten im Anfangsstadium. Die Furchungszellen der Morula werden flacher, und es tritt eine exzentrisch gelegene Höhlung im Zellverband auf, deren Volumen ständig zunimmt. Bis zur Implantation vergrößert sich die Blastozyste um das 10- bis 20fache, ihre pumpenden Bewegungen entstehen möglicherweise nur in vitro. Die Zellen dieser Entwicklungsstufe lassen sich frühzeitig in zwei Kategorien einordnen:

1. In Zellen des Embryonalknotens, einer bikonvexen kompakten Masse (oben), aus der sich der zukünftige Keimkörper entwickelt, und
2. in Zellen des Trophoblasten (unten), die einschichtig Embryonalknoten und Blastozystenhöhle bedecken. Die Trophoblastzellen übernehmen frühzeitig Ernährungsfunktionen für den Keim und bilden die Voraussetzung für die stürmische Entwicklung der späten Blastozyste.

Im Verlaufe der Entwicklung zur expandierten Blastozyste plattet sich der Embryonalknoten zur Keimscheibe ab, und die Trophoblastzellen werden extrem flach.

Die Kaninchenblastozyste ist von einer deutlich sichtbaren Mukoproteidschicht umgeben.

Die Zona pellucida der Eizelle bleibt bei Säugetieren in der Regel bis zum Beginn der Implantation erhalten. Als Folge der räumlichen Ausdehnung der Blastozyste zur Zeit der Implantation sind die Mukoproteidschicht und die Zona pellucida nur noch als sehr feine Hüllen erkennbar. Bei der Kultur von Blastozysten in vitro reißt die Zona pellucida häufig auf. Die Implantation des Eies beginnt beim Kaninchen und einigen anderen Säugetieren am siebten Tag nach der Befruchtung.

English Version of the Spoken Commentary

The Graafian follicle develops in the ovary under the influence of the gonadotropic hormones secreted by the pituitary gland. From the exterior to the interior, the follicle wall consists of the theca externa, the theca interna, and the membrana granulosa.

The ovum is embedded in the cumulus oophorus, which is formed from granulosa cells. The discus proligerus is parietal and projects into the fluid-filled vesicle of the follicle.

The zona pellucida of the oocyte and the cells of the cumulus oophorus are intimately connected which one another. The layer of cells immediately adjacent to the zona pellucida is known as the corona radiata. Beneath the zona is the perivitelline space. The ooplasm is enveloped by the vitelline membrane.

The nucleus of the oocyte is generally in prophase I of meiosis from the birth of the animal onwards. As the follicle matures, reduction division continues as far as telophase I, which is indicated when the first polar body is extruded.

Immediately preceding ovulation, the oocyte with the cumulus cells is expelled from the follicle wall, later to be discharged into the oviduct. The

nucleus has meanwhile reached metaphase II of meiosis. Ovulation is probably implemented by means of a collagenolytic enzyme.

Fertilization can only be accomplished in the presence of "capacitated" sperm cells in the distal portion of the oviduct. "Capacitation" implies a not yet fully understood process at the head of the sperm which renders it capable of penetrating the egg investments.

Enzymes are necessary for penetration of the egg investments. They are secreted by the acrosome, located at the anterior end of the spermatozoon head.

In the majority of mammals both head and tail of the spermatozoon penetrate into the ooplasm. It is not certain whether the sperm merely sinks in, or whether some phagocytic process is involved. A mechanism known as the vitelline block, prevents the penetration of further spermatozoa.

Immediately after entering the ooplasm, the sperm is denuded and becomes invisible. At the same time the ovum is activated.

This process is initiated by the dissolution of the loose cumulus cells and the separation of the corona radiata from the zona pellucida. Simultaneously, the ooplasm shrinks and the perivitelline space enlarges conspicuously.

The second polar body is extruded, and with that the reduction division is complete, a set of haploid chromosomes being the result.

During the following hours, the nuclear material remains invisible within the ooplasm.

It is not until then that the male and female pronuclei reappear and fuse. Now the prophase of the first mitotic division is initiated.

The nuclear membrane dissolves, and the nucleus becomes invisible.

About an hour after fusion of the male and female pronuclei, the first cell cleavage occurs.

This is the outward sign that fertilization is complete, and the growth of the embryo begins.

After ovulation the oocytes of the rabbit are embedded in a dense layer of cumulus cells.

The cells of the corona radiata form a wreath round the zona pellucida which appears dark. In most mammals the corona cells adjacent to the zona are intimately connected to the ovum.

Fine projections of the corona cells traverse the zona pellucida and are in contact with the surface of the ooplasm.

Apart from their own active movements, the spermatozoa require acrosomal enzymes in order to penetrate the egg membranes. The acrosome reaction which releases these enzymes is a consequence of "capacitation". Only "capacitated" rabbit spermatozoa penetrate the corona radiata and zona pellucida. The movements of several spermatozoa can be observed through the egg membranes.

As a rule in larger mammals only one spermatozoon penetrates the zona pellucida. A hitherto unexplained mechanism, the so-called zona reaction, prevents the simultaneous entry of several sperms. In preparations of oocytes it is evident that after a sperm penetrates, the head is severed from the tail, begins to swell, and the cytoplasmic constituents separate from the nucleus.

In the case of smaller mammals the zona reaction is weaker, and in the rabbit often deficient altogether. Therefore several spermatozoa can penetrate into the perivitelline space. Their active motility can now be seen to good effect there.

When a spermatozoon penetrates the ooplasm, activation processes are set in motion within the egg which under normal circumstances are a sure sign that fertilization is taking place.

The wavelike detachment of the cumulus cells can now be seen clearly. Simultaneously, the ooplasm shrinks and the perivitelline space enlarges. The volume loss of the ooplasm is between 2 and 25%.

The conclusion of meiosis can be regarded as a consequence of egg activation initiated by the penetration of the sperm. This phase is outwardly characterized by the division of the second polar body. Both polar bodies are then freely motile in the perivitelline space.

The activation processes in the oocyte are not entirely fertilization specific. They can also be induced by unspecific stimuli.

A few hours after inception of the activation phenomena, the male and female pronuclei become visible in the centre of the egg, at first only vaguely. This process is indistinguishable in the majority of ova because of the dense structure of the ooplasm.

Both pronuclei finally lie adjacent to one another. The larger male pronucleus is clearly distinguishable from the smaller female one. To the left of the ooplasm both polar bodies can be seen.

Nuclear fusion now takes place. The nuclear membranes dissolve, and the chromosomes arrange themselves for prophase of the first mitosis. About an hour later, the first cleavage can be observed.

Now the cell nuclei reappear. In the rabbit, the fertilized egg first divides about 14 hours after ovulation.

Four hours after the first cleavage, the egg has reached the four-celled stage. A cruciform arrangement of the blastomeres can frequently be observed. The cleavages are not always synchronous, so 3, 5, and 7 blastomere stages can occur. The relative magnitude of the blastomeres also varies.

The development of the 8 to 16-celled stage begins 20 to 26 hours, that of the early morula at the earliest 26 hours, after ovulation.

Subsequent growth up to the late morula stage takes a further 24 hours. All the fertilized eggs of the rabbit are at the morula stage two and a half days after mating. At this time a proportion of the eggs has already reached the uterus. Three days after mating or insemination, hardly any fertilized eggs can be found in the oviduct. In many other mammals, egg transport takes roughly the same time.

Three days after mating, the blastocysts are also undergoing their early development. The cleavage cells of the morula flatten out, and an eccentric cavity appears in the cell cluster and increases steadily in volume. Up until implantation, the blastocyst enlarges ten to twelve-fold. Its rhythmic contractions possibly only occur *in vitro*. The cells at this stage of development are soon classifiable in two groups:

First: the cells of the embryonal knot, a compact bi convex mass (above), from which the embryo later develops, and

Second: the cells of the trophoblast (below), which envelop the embryonal knot and the blastocyst cavity in a unicellular layer. The trophoblast cells soon take over nutritive functions for the embryo, and are the prerequisite for the turbulent development of the later blastocyst.

In the course of the development to an expanded blastocyst, the embryonal knot flattens out to form the blastodisc, and the trophoblast cells become extremely flat.

The rabbit blastocyst is surrounded by a very noticeable layer of mucin.

The zona pellucida of mammalian egg cells generally remains intact until the beginning of implantation. As a result of the enlargement of the blastocyst at the time of implantation, the mucin and the zona pellucida are only visible as very tenuous layers. When cultivating blastocysts in vitro the zona pellucida often ruptures. In the rabbit and a number of other mammals the implantation of the egg begins on the seventh day after fertilization.

Literatur

- [1] AUSTIN, C. R.: Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Austr. J. Scient. Res. B*, 4 (1951), 581—586.
- [2] AUSTIN, C. R.: *Fertilization*. Prentice-Hall, Inc., New Jersey 1965.
- [3] AUSTIN, C. R.: *The ultrastructure of fertilization*. Holt, Rinehart and Winston, New York 1968.
- [4] BEDFORD, J. M.: Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod. Suppl.* 2 (1970), 128—158.
- [5] BRINSTER, R. L.: Mammalian embryo culture. In: HAFEZ, E. S. E., and R. I. BLANDA: *The mammalian oviduct*. The University of Chicago Press, Chicago and London 1969.
- [6] BRINSTER, R. L.: Culture of two-cell rabbit embryos to morulae. *J. Reprod. Fert.* 21 (1970), 17—22.
- [7] CHANG, M. C.: Fertilizing capacity of sperm deposited in the Fallopian tube *Nature*, 168 (1951), 697.
- [8] GABLER, G.: Untersuchungen über die Gewinnung, Konservierung und Transplantation von Eizellen bei Kaninchen unter Berücksichtigung von in vitro-Befruchtungsversuchen. *Diss. Hannover* 1970.
- [9] HEUNERT, H.-H.: Präparationsmethoden für Vitalbeobachtungen an Mikroorganismen. *Zeiss-Informationen*, AW III/71 Nov. 1971.
- [10] KANE, M. T., and R. H. FOOTE: Culture of two- and four-cell rabbit embryos to the expanding blastocyst stage in synthetic media. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 133 (1970), 921—925.
- [11] MANN, T.: *Biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. Methuen and Co Ltd., London 1964.
- [12] PIKO, L.: Gamete structure and sperm entry in mammals. In: METZ, CH. B., and A. MONROY; *Fertilization*, Vol. II Academic Press, New York and London 1969.
- [13] WHITTINGHAM, D. G.: Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 14 (1971), 7—21.
- [14] ZANEFELD, L. J. D., and W. L. WILLIAMS: A sperm enzyme that disperses the corona radiata and its inhibition by decapacitation factor. *Biol. Reprod.* 2 (1970), 363—368.

Angaben zum Film

Der Film wurde 1971 veröffentlicht und ist für die Verwendung im Hochschulunterricht bestimmt. Tonfilm, 16 mm, schwarzweiß, 145 m, 13 ½ min (Vorführgeschw. 24 B/s).

Die Aufnahmen entstanden in den Jahren 1970/71. Veröffentlichung aus der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie des Rindes, Tierärztliche Hochschule Hannover, Prof. Dr. J. H. HAHN, Dr. GERTRUD GABLER, und dem Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen, Dr. K.-H. HÖFLING, C. LUDWIG.

Inhalt des Films

Nach der Ovulation sind die meisten Säugetiereizellen zunächst von Follikelzellen des Cumulus ophorus umgeben, so daß die Samenzellen bei der Durchdringung der Eihüllen nur schwer erkennbar sind. Erst nach Ablösung der Follikelzellen von der Zona pellucida wird das Innere der Eizelle sichtbar, und Samenzellen können im hypolemmalen Raum beobachtet werden. Unter normalen Bedingungen gelangt nur eine Samenzelle in das Ooplasma. Unmittelbar nach ihrem Eintritt zeigt die Eizelle deutliche Aktivierungserscheinungen. Besonders auffällig sind dabei die Schrumpfung des Ooplasmas, die Ablösungsbewegung der Kumuluszellen und die Abschnürung des 2. Polkörpers als äußeres Zeichen der beendeten Reduktionsteilung in der Eizelle. Anschließend treten männlicher und weiblicher Vorkern hervor, verschmelzen miteinander und werden unsichtbar. Darauf wird die Prophase der 1. mitotischen Teilung eingeleitet und die erste Furchungsteilung wird etwa 24 Stunden nach der Paarung erkennbar. 4 Stunden nach der ersten Teilung erreicht die Eizelle das 4-Zellstadium. Nach weiteren 6—12 Stunden entwickelt sich das 8-16-Zellstadium. 2—2 ½ Tage nach der Paarung erreichen befruchtete Eizellen des Kaninchens das Morulastadium und treten vom Eileiter in den Uterus über. Einen Tag später sind bereits frühe Blastozysten im Uterus zu finden. Blastozysten vergrößern sich bis zur Implantation um das 10—20fache. Schon frühzeitig kann man bei der Blastozyste die Zellen des Embryonalknotens von den Zellen des Trophoblasten unterscheiden. Aus dem Embryonalknoten entwickeln sich die Keimscheibe und der spätere Keim. Die Zellen des Trophoblasten übernehmen Ernährungsfunktionen. Die Zona pellucida der Eizelle bleibt bei den meisten Säugetieren bis zur Implantation erhalten, die beim Kaninchen am 7. Tag nach der Paarung beginnt.

Summary of the Film

After ovulation most mammalian ova are surrounded first by follicle cells of the Cumulus ophorus so that the spermatozoon can only be recognized with difficulty while penetrating the fetal membrane. Only after the follicle cells have separated from the zona pellucida does the interior of the ovum become visible and spermatozoon can be observed in the perivitelline space.

Under normal conditions only one spermatozoon reaches the ooplasm. Immediately after its entry the ovum shows clear activation phenomena. Especially noticeable are the shrinking of the ooplasm, the separating movement of the cumulus cells and the extrusion of the 2nd polar body as an external sign of the finished reduction division in the ovum. Then male and female pronuclei appear, merge with each other and become invisible. This introduces the prophase of the 1st mitotic division and the first segmentation division can be recognized approximately 24 hours after copulation. 4 hours after the first division the ovum reaches the 4-cell stage. After a further 6—12 hours the 8-16-cell stage develops. 2—2½ days after copulation the fertilized ova of the rabbit reach the morula stage and pass from the oviduct to the uterus. One day later early blastocysts can already be found in the uterus. Blastocysts expand 10—20 times up to the implantation. From an early stage the cells of the embryonic node can be distinguished from the cells of the trophoblast. The germinal disc and the later embryo develop from the embryonic nodes. The cells of the trophoblast take over the function of nourishment. In most mammals the zona pellucida of the ovum is kept up to the implantation, which with rabbits begins on the 7th day after fertilization.

Résumé du Film

Après l'ovulation, la plupart des ovules des mammifères sont tout d'abord entourés de cellules folliculeuses du cumulus oophorus (disque prolifère), si bien que les spermés ne peuvent être que difficilement décelés lorsqu'ils traversent la membrane des œufs. Ce n'est qu'une fois que les cellules folliculeuses se sont détachées de la zona pellucida que l'intérieur de l'œuf devient visible et que les spermés peuvent être observés dans la zone hypolemmale. Dans des conditions normales, seul un sperme réussit à pénétrer dans l'ooplasm. Dès que le sperme est entré, l'ovule présente des symptômes d'activation. Ce qui est surtout remarquable, c'est le rétrécissement de l'ooplasm, le mouvement de détachement des cellules du disque prolifère et la ligaturation du 2^e globule polaire, signe extérieur que la méiose est achevée dans l'ovule. Les pronucléaux mâle et femelle s'avancent ensuite pour fusionner et devenir invisibles. La prophase de la 1^{ère} division mitotique se met alors en route et on peut reconnaître la première division par segmentation environ 24 heures après l'accouplement. 4 heures après la première division, l'ovule atteint le stade à 4 cellules. Le stade à 8-16 cellules est atteint au bout de 6—12 nouvelles heures. 2 jours à 2 jours ½ après l'accouplement, les ovules fécondés du lapin atteignent le stade de la morula et passent des trompes dans l'utérus. Un jour plus tard, on trouve déjà deux blastokystes précoces dans l'utérus. Jusqu'à l'implantation, les blastokystes grossissent jusqu'à 10 à 20 fois leur taille initiale. On peut distinguer assez tôt dans le kyste les cellules du nœud embryonnaire de celles du trophoblaste. Le disque germinatif et le futur germe se développent à partir du nœud embryonnaire. Les cellules du trophoblaste assument des fonctions nutritives. La zona pellucida de l'ovule demeure chez la plupart des mammifères jusqu'à l'implantation, qui commence chez le lapin le 7^e jour après l'accouplement.