

3 Schrifttum

3.1 Follikulogenese

Der Follikel ist die funktionelle Einheit des Ovars und hat zwei Aufgaben: er beherbergt die Oozyte und schafft für diese so die Möglichkeit zum Wachstum und zur Reifung. Bei der Follikulogenese werden grundsätzlich mehrere Typen von Follikeln unterschieden.

Die Einteilung erfolgt in:

1. Primordialfollikel
2. Primärfollikel
3. Sekundärfollikel
4. Tertiärfollikel (Graaf'scher Follikel)

Nach ERICKSON (1966) werden der Sekundärfollikel als wachsender Follikel und der Tertiärfollikel als vesikulärer Follikel bezeichnet.

Primordialfollikel liegen peripher im Ovargewebe. Kontinuierlich gehen aus diesem Pool Follikel in die Wachstumsphase über. Im Zentrum der Primordialfollikel liegt eine Eizelle, die von einer Granulosazellschicht umgeben ist.

Nach VAN DEN HURK et al. (1992) unterscheidet sich der Primärfollikel von dem Primordialfollikel dadurch, daß die Granulosazellen, welche die Eizelle umgeben, nicht flach sondern isoprismatisch sind. In diesem Stadium tritt die Zona pellucida zum ersten mal in Erscheinung. Im weiteren Wachstum nimmt sie an Dicke zu. Durch die Zona pellucida hindurch steht die Eizelle mit den Granulosazellen über Mikrovilli in Verbindung.

Der Sekundärfollikel unterscheidet sich von dem Primärfollikel durch mehrere Schichten von kubischen Granulosazellen und einer größeren Oozyte (VAN DEN HURK et al., 1992).

Der Tertiärfollikel ist durch einen flüssigkeitsgefüllten Innenraum gekennzeichnet. Nach MONNIAUX et al. (1983) tritt ein Hohlraum erstmals bei einem

Folikeldurchmesser von 0,115 bis 0,280 mm auf. Der vesikuläre Follikel besteht aus der Oozyte mit einem großen Zellkern, welche von der Zona pellucida umschlossen wird. Es schließen sich mehrere Granulosazellschichten und eine Thekaschicht an, die mit Blutgefäßen in Verbindung steht. Außerdem ist ein großer flüssigkeitsgefüllter Hohlraum vorhanden. Durch die Wachstumsvorgänge, besonders durch die Hohlraumbildung wird die Eizelle immer mehr an den Rand des Follikels gedrängt. Dort entsteht als Folge ein hügelartiges Gebilde, der sogenannte Cumulus oophorus (RÜSSE u. SINOWATZ, 1991).

Vesikuläre Follikel sind bereits beim Kalb während der Fötalentwicklung vorhanden; dies eröffnet die Möglichkeit, Eizellen schon hier zu entnehmen, zu reifen und zu fertilisieren, um das Generationsintervall zu verringern.

Als Graaf'schen Follikel bezeichnet man einen Follikel, der einen sich stetig vergrößernden Hohlraum besitzt und aus dem Pool von Follikeln dieses Stadiums selektiert wurde und für die Ovulation bestimmt ist.

3.2 Präovulatorische Follikelreifung

Zu Beginn des Oestrus hat der zur Ovulation bestimmte Follikel einen Durchmesser von etwa 10 mm. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die Dicke des Cumulus oophorus acht bis zehn Schichten. Innerhalb von 24 Stunden erreicht der Follikel mit einem Durchmesser von 16 bis 18 mm seine Ovulationsgröße. Während dieser Phase starker präovulatorischer Expansion wird die Mitoserate der Granulosa- und Theka Interna-Zellen nicht gesteigert, so daß ihre Schichtdicken sich verringern (MARION et al., 1968). Die präovulatorische Welle von Gonadotropin in den der Ovulation vorausgehenden Stunden stimuliert die Kumuluszellen zur Expansion.

Dabei kann eine Follikelatresie zu jedem Stadium der Follikulogenese beginnen.

Der Tertiärfollikel benötigt zwei ovarielle Zyklen, um sich von der Vesikulation bis zum präovulatorischen Stadium zu entwickeln.

Vesikuläre Follikel müssen einen bestimmten Durchmesser erreichen, um reife Oozyten enthalten zu können. MOTLIK und FULKA (1986) beobachteten, daß Follikel unter ein bis zwei Millimetern Durchmesser kaum reife Oozyten enthalten. Diese Ergebnisse wurden mehrfach bestätigt (KAUFFOLD et al. 1999; LONERGAN, 1990).

3.3 Ovulation

Nachdem die Follikelwand aufgrund von komplexen hormonellen, enzymatischen und mechanischen Prozessen ihre Integrität verloren hat, wird die Eizelle aus dem Graaf'schen Follikel bei der Ovulation freigesetzt. Dies geschieht zu einer bestimmten Zeit nach dem LH-Peak. Zu den wichtigsten hormonellen Mechanismen zählt der positive Östrogen-Feedback, der durch die präovulatorisch stark ansteigende Östrogenproduktion des reifenden Follikels ausgelöst wird (DÖCKE, 1994).

Der Feedback wirkt auf das ZNS und bewirkt einen starken Anstieg der LH-Freisetzung aus der Hypophyse (LH-Peak). Weiterhin wird das Auftreten der Brunstsymptome bewirkt. Etwa zwei Stunden vor der Ovulation wird ein kleiner Wandbereich des Graaf'schen Follikels und die darüberliegende Ovarrinde dünn und bildet das Stigma (DIELEMANN u. BEVERS, 1987). Die Veränderungen in der Follikelwand sind kontrovers diskutiert worden. Von ASDELL (1962) wurde angenommen, daß die Ovulation eine Folge der Druckzunahme im Follikel wäre. Wie manometrische Messungen ergeben haben, ist die Ovulation jedoch kein explosiver Vorgang. Der intrafollikuläre Druck schwankt viel mehr um einen Wert, der dem Kapillardruck entspricht (BAKER, 1972). Es wird angenommen, daß das blasenartige Stigma durch Ischämie der Kapillaren zustande komme (BAKER, 1972). Nekrosen der Granulosazellmembran, die das Durchscheinen der Stigmaregion bewirken, werden wahrscheinlich von Enzymen ausgelöst. Weiterhin gibt es die Vermutung, bei der Ovulation könne es sich um einen entzündlichen Prozess handeln (ESPEY, 1994). In diesem Fall würde das Bindegewebe der Tunica albuginea/ Theka externa aufgrund eines entzündlichen Prozesses erweichen, was LH-induziert sein könnte. Weiterhin würde ein Anstieg des intrafollikulären Druckes, welcher von den Gefäßen der Theka interna beeinflusst wird, zur Follikelruptur und dem Freisetzen der Eizelle führen. Nach der Ovulation fließt die Follikelflüssigkeit langsam ab. Selten verläuft dieser Vorgang explosiv; das Abfließen der viskösen Flüssigkeit dauert einige Zeit. Die frei in der Follikelflüssigkeit flotierende Eizelle gelangt passiv mit abgelösten Kumuluszellen aus dem Follikel heraus und wird durch einen Zilienstrom zum Eileiter geleitet.

Von der Norm abweichende LH-Konzentrationen treten häufig zusammen mit einer Störung der Ovulation des Graaf'schen Follikels auf (CALLESEN et al., 1988).

Niedrige P₄-Konzentrationen im Blut fördern das Wachstum des Follikels und verhindern eine rechtzeitige Ovulation (FORTUNE et al., 1991). Der LH-Peak und die anschließende Ovulation können auch durch Streß behindert werden, wie er durch hohe Milchleistung, subklinische Erkrankungen, Störungen bei der Fütterung, falsches Klima oder Transport ausgelöst werden kann (GLATZEL, 1999).

In der unten aufgeführten Tabelle (Tab. 1) sind Literaturangaben zum Zeitpunkt des LH-Peak in Bezug auf Ovulation und/oder PGF₂₇-Applikation. Ähnliche Untersuchungen wurden auch mit stimulierten Tieren durchgeführt. Bei der induzierten Luteolyse steigt der LH-Spiegel bei Färsen schneller an als bei Kühen (NKUUHE u. MANNS, 1985). Der LH-Peak tritt bis zwölf Stunden nach Brunstbeginn ein (WALTON et al., 1987) und hält sein Niveau für fünf bis elf Stunden (MÜLLER et al., 1982; BERNARD et al., 1984).

Tab. 1: LH-Peak in Bezug auf Ovulation und/oder PGF₂₇-Applikation

Autor	Tiere	Zeitintervall (Stunden)	
		PGF ₂₇ -Applikation bis LH-Peak	LH-Peak bis Ovulation
MÜLLER et al., 1982	Kühe	48-76	
JACKSON u. FURR, 1983	Färsen	57,5	27,5
NKUUHE u. MANNS, 1985	Färsen Kühe	62 71	22 28
WALTON et a., 1987	Kühe	84	
HYTTEL et al., 1989	Färsen und Kühe		24
SAVIO et al., 1990	Färsen	55-60	
MILDNER u. FREYMAN, 1992	Färsen	57-76	17-23

3.4 Corpus luteum

Schon vor der Ovulation induziert der LH-Peak im Graaf'schen Follikel eine Reihe von morphologischen und biochemischen Veränderungen an den Follikelzellen, welche den Follikel in ein CL umwandeln (NISWENDER et al., 1994). Innerhalb der Ovarrinde bildet sich so eine endokrine Drüse heran. Nachdem der ovulierte Follikel kollabiert ist, legt sich die Membrana granulosa in Falten, und der zurückgebliebene Hohlraum des Follikels wird schnell durch Proliferation von Granulosazellen verschlossen, die zu Luteinzellen moduliert werden (O'SCHE et al., 1980). Von der Theka interna ausgehend beginnen Kapillaren, in den Hohlraum einzuwachsen. Mit den Kapillaren wachsen einige Thekazellen mit ein und bilden zusammen Wände, die sogenannten Trabekel. So sind im entstehenden CL zwei Zelltypen zu unterscheiden. Aus den Granulosazellen gehen große und aus den Thekazellen kleine Luteinzellen hervor (ALILA u. HANSEL, 1984). Der größte Anteil der entstehenden endokrinen Drüse hat seinen Ursprung in der Granulosazellschicht (BAKER, 1972).

Die Sekretion des Steroidhormons Progesteron ist eine bedeutende Funktion des CL. Durch Progesteron wird die Länge des Brunstzyklus kontrolliert und die Aufrechterhaltung der Trächtigkeit gewährleistet. Die Synthese des Progesterons wird im CL durch LH induziert (NISWENDER u. NETT, 1988). Im Zyklus erreicht die Dichte an LH-Rezeptoren am CL in der Mitte der Lutealphase einen Höhepunkt (DIEKMAN et al., 1978). Im Verlauf des Brunstzyklus beginnt das CL zwischen dem zweiten und vierten Tag mit der Progesteronsynthese (MÜLLER et al., 1982; TABAN u. HANN, 1984; DIAZ et al., 1986) und hält diese bis zum sechzehnten oder siebzehnten ZT aufrecht. Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Fläche an hormonproduzierendem Lutealgewebe und der P_4 -Konzentration im Plasma von zyklischen und trächtigen Rindern (KNOPF, 1990). Bei Entstehung eines Hohlraumes scheint dieser keine Beeinträchtigung darzustellen.

Eine Untersuchung von Blutplasma oder Milch auf Progesteron kann über den Funktionszustand des CL Auskunft geben (KOCH u. GLATZEL, 1990). Während Proöstrus und Östrus liegt die P_4 -Konzentration mit unter 1ng/ml in einem kaum meßbaren Bereich (MÜLLER et al., 1982; DIAZ et al., 1986). Nachdem die Synthese im frühen Diöstrus beginnt, steigen die Plasmawerte bis zum sechsten Zyklustag langsam an (TABAN u. HANN, 1984). Zwischen dem siebten und zwölften/dreizehnten Zyklustag ist ein wesentlich steilerer Anstieg zu verzeichnen

(DIAZ et al., 1986). Zwischen dem zehnten und siebzehnten ZT befindet sich die Plasma-Progesteronkonzentration auf dem Höhepunkt (STEVENSON et al., 1984; DIAZ et al., 1986), um ab dem sechzehnten bis siebzehnten Tag bis zum Brunsteintritt permanent abzunehmen (SCHALLENBERGER et al., 1985; DIAZ et al., 1986; KOCH u. GLATZEL, 1990).

Die Lebensdauer eines CL richtet sich danach, ob eine Gravidität besteht oder nicht. Das Ende der endokrinologischen Funktion eines CL zeichnet sich durch eine versiegende Progesteronsynthese aus, während die Luteinzellen degenerieren (NISWENDER et al., 1994). Prostaglandin $F_{2\gamma}$ hat beim Rind die maßgebliche Bedeutung für die Induktion der Luteolyse (GLATZEL et al., 1979).

Im CL des Rindes wird Oxytozin gebildet, was über die Sekretion von $PGF_{2\gamma}$ zur Rückbildung des CL führt (BRITT, 1992). Die Bildung von Oxytozinrezeptoren ist von den Östradiol- und Progesteron-Werten im Verlauf des Brunstzyklus abhängig. Bei Vorhandensein einer großen Anzahl von Oxytozinrezeptoren im Uterus hat die Freisetzung von $PGF_{2\gamma}$ ihren größten Wert.

Im Verlauf der Degeneration eines Gelbkörpers kommt es zum Einsprossen von Fibroblasten. Dadurch wird das endokrinologisch aktive Gewebe durch Narbengewebe ersetzt; es entsteht ein sogenanntes Corpus Albicans.

Nach der Ovulation eines Graaf'schen Follikels ist das neu entstehende Corpus Luteum sonographisch nicht darstellbar (PIERSON u. GINTHER 1984, 1988; EDMONDSON et al., 1986; KÄHN, 1986; FIGUBEIREDO et al., 1997). Nach KÄHN (1986) ist das junge CL infolge der fortschreitenden Luteinisierung ab dem zweiten Zyklustag sonographisch erkennbar. Für PIERSON und GINTHER (1984,1988) war eine Darstellung per Ultraschall ab dem dritten ZT möglich, während EDMONDSON et al. (1986) den frühest möglichen Nachweis mit dem vierten ZT angeben. Das Volumen eines CL nimmt bis zur Zyklusmitte hin stetig zu (KÄHN, 1988), während es bis zum Zyklusende sein Volumen wieder verringert. Kommt es zu einer natürlichen oder $PGF_{2\gamma}$ -induzierten Luteolyse, nimmt das Volumen des CL schnell ab (MÜLLER, 1985; QUIRK et al., 1986). Bei diesem Volumenrückgang mit gleichzeitiger Einlagerung von Bindegewebe verschwimmen die Grenzen zwischen CL und Ovargewebe im Ultraschallbild, bis ein Nachweis des CL sonographisch nicht mehr möglich ist (MÜLLER, 1985).

In der Literatur wird der Einfluß des CL auf die übrige Follikelpopulation und die Follikelaktivität widersprüchlich diskutiert. IRELAND et al. (1979), KÄHN (1988) und

KNOPF (1990) berichten, es gäbe im Zyklusverlauf keinen Einfluß des CL auf andere Follikel. Nach MATTON et al. (1981) verändert sich der Einfluß des CL auf den DF während des Zyklus. Vom achten bis zum dreizehnten ZT war der DF größer, wenn er kontralateral zum CL lag. Im Gegensatz dazu fanden STAIGMILLER und ENGLAND (1982) heraus, daß der DF bei ipsilateraler Lage zum CL größer sei. Nach PIERSON und GINTHER (1987) liegt der DF der ersten Follikelwelle häufiger auf dem rechten Ovar als auf dem linken. Für das Rind konnte während der Trächtigkeit ein Einfluß des CL auf den DF nachgewiesen werden. Der erste DF konnte meist auf dem Ovar gefunden werden, welches nicht den Trächtigkeitsgelbkörper trug (SPICER et al., 1986; NATION et al., 1999). Bei nicht trächtigen Rindern zeigt sich dieser Effekt nicht. VON FEHRN et al. (1990) berichten, daß in einem Stimulationsprogramm die Ovulationen auf den CL-tragenden Ovarien früher als auf den gegenüberliegenden Ovarien erfolgen.

3.5 Follikeldynamik

Innerhalb jeder Follikelwelle werden beim Rind und anderen monoovulatorischen Säugetieren die Phänomene der Rekrutierung, der Selektion sowie der Dominanz unterschieden. Am Ende dieser Phasen steht die Atresie oder die Ovulation. Welche Mechanismen hier regulierend bzw. selektiv Einfluß nehmen, ist noch nicht vollständig geklärt.

RAJAKOWSKI (1960) beschrieb erstmalig die Entwicklung der Follikel beim Rind als zwei wellenförmig aufeinanderfolgende Schübe. Er postulierte, daß die erste Welle am Tag 3 des Zyklus beginnt und im Mittzyklus endet, wobei er auch die Regression eines einzelnen Follikels, welcher Ovulationsgröße erreicht hatte, beobachten konnte. Die zweite Welle begann daran anschließend im Mittzyklus und fand ihren Abschluß mit der Ovulation eines Follikels.

KRUIP (1985) folgerte vor dem Hintergrund dieser und eigener Untersuchungen, daß mindestens zwei Typen großer Follikel im Rahmen eines Zyklus des Rindes auftreten. Zum einen gibt es die zur Atresie und zum anderen die zur Ovulation determinierten blasigen Funktionskörper.

Vor der Einführung der Ultraschalluntersuchung als diagnostisches Hilfsmittel in die Gynäkologie des Rindes wurden Befunde über die Wachstumswellen an zyklischen Rinderovarien hauptsächlich durch rektale Palpation

(GRUNERT, 1979; STOLLA u. HIMMER, 1980), durch morphologische, histologische bzw. endokrinologische Untersuchungen an geschlachteten Tieren bzw. nach operativer Entfernung der Eierstöcke (RAJAKOWSKY, 1960), thermische Verödung von Follikeln (MATTON et al., 1981), durch Markieren bestimmter Follikel mittels Tusche (DUFOUR, et al.1972) oder durch Pelviskopie (operative Untersuchung des Beckenraumes, SCHAMS et al., 1976) charakterisiert.

Mit der Etablierung und Evaluierung moderner diagnostischer Möglichkeiten der Hormon- (ELISA, RIA) sowie der molekularen Analytik, aber auch der bildgebenden Verfahren konnten in den letzten zwei Jahrzehnten die Kenntnisse über die Ovarphysiologie wesentlich erweitert werden (VON FEHRN et al., 1990).

Die Vermutung einer wellenförmigen Anbildung konnte nach Anwendung der Ultraschalldiagnostik in der Gynäkologie beim Rind durch Verlaufskontrollen bestätigt werden (SAVIO et al.1988). Durch tägliche sonographische Untersuchungen fand man Hinweise sowohl für ein zwei- als auch für ein dreigipfliges Follikelwachstum (KÄHN, 1988; ALI et al., 1998, 2000).

Ähnliche Follikelwellen können beim Rind auch während der Trächtigkeit beobachtet werden (EVANS et al., 1994). Die Wellen beginnen in einem Abstand von jeweils etwa neun Tagen (GINTHER et al., 1989; SCHNEEBELI u. EGGENBERGER, 1986).

Dabei wird die Follikeldynamik innerhalb einer Follikelwelle beim Rind in die Abschnitte Rekrutierung, Selektion und Dominanz unterteilt.

3.5.1 Endokrinologische Steuerung

Im Hypothalamus produzieren endogene Neurone nach Empfang von Reizen im ZNS das gonadotropin-freisetzende Hormon (GnRH). Über das Hypothalamus-Hypophysen-Pfortadersystem wird es zum Hypophysenvorderlappen (HVL) geleitet und bedingt hier die Bildung und Sekretion des follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des luteinisierenden Hormons (LH). GnRH, FSH und LH werden jeweils pulsatil ausgeschüttet. FSH stimuliert die Entwicklung der Follikel auf den Eierstöcken, und LH leitet durch eine pulsatile Ausschüttung die Ovulation ein (GLATZEL und SCHALLENBERGER, 1990).

Im Anschluß an die Ovulation bildet sich aus den Follikelresten unter dem Einfluß von LH ein Gelbkörper, wobei sich die Follikelhöhle durch einsprossende Blutkapillaren mit Blut füllt, und die Granulosazellen an Größe zunehmen. Der Gelbkörper ist in erster Linie ein sekretorisches Organ, welches Progesteron und

Oxytozin produziert (SCHAMS et al., 1976). Progesteron ist für den Ovarzyklus einer Kuh unverzichtbar. Es hat eine negative Rückkopplung auf den HVL und den Hypothalamus, vermindert die Freisetzung von GnRH, LH und FSH und hemmt auf diese Weise die Ovulation (GLATZEL, 1992).

Wenn die Eizelle nach der Ovulation nicht befruchtet wird, empfängt das Muttertier vom Embryo kein Signal über eine Trächtigkeit, und aus dem Endometrium des nicht-trächtigen Uterus wird nach etwa 16 Tagen Prostaglandin $F_{2?}$ ($PGF_{2?}$) freigesetzt. Dies bewirkt die Rückbildung des Gelbkörpers (Luteolyse).

Als Folge der Luteolyse nehmen die Progesteronkonzentrationen im Blut ab, und die Blockierung der GnRH-Freisetzung wird aufgehoben. Dies löst eine neue Follikelwelle und schließlich die Bildung eines präovulatorischen Follikels aus.

3.5.2 Rekrutierung der Follikel

Als Rekrutierung wird der Eintritt eines Pools von Follikeln in ihr Gonadotropin-abhängiges Entwicklungsstadium bezeichnet (DRIANCOURT, 1991).

Es ist bisher unklar, warum einige Primordialfollikel in die Wachstums- und Entwicklungsphase eintreten, während morphologisch identische Nachbarfollikel unbeeinflusst bleiben. Wahrscheinlich stammen die frühesten Wachstumssignale von der intrafollikulär gelegenen Oozyte selbst (BAKER, 1972). Verschiedene Autoren vermuten, daß das Signal für die Rekrutierung der Follikel der leichte Anstieg der FSH-Ausschüttung (Follikel-Stimulierendes-Hormon) ist. Als Hinweise dafür werden der leichte FSH-Anstieg vor jeder Follikelwelle (ADAMS et al., 1992) sowie die Verzögerung der Follikelwelle unter FSH-Hemmung genannt (TURZILLO u. FORTUNE, 1990).

3.5.3 Selektion

Insgesamt wird die Follikelselektion als ein physiologischer Vorgang definiert, währenddessen die Zahl rekrutierter Follikel auf die Zahl ovulatorischer Follikel reduziert wird (GOODMAN u. HODGEN, 1983).

Hierbei wird die Selektion mit Hilfe der reduzierten Anzahl rekrutierter Follikel über den Vorgang der Atresie gesteuert. Der die Atresie umgehende Follikel wird als dominant bezeichnet (SAVIO et al., 1988). Faktoren, welche die Selektion des DF bestimmen, sind bis heute noch nicht genau bekannt.

Jeder rekrutierte Follikel einer Welle hat prinzipiell die gleiche Chance wie alle anderen zu dominieren. Für diesen Zusammenhang liefert die Literatur folgende Hinweise:

- a) FSH-Applikationen am Anfang einer Follikelreifungswelle stimuliert mehrere Follikel, gleichzeitig die Größe eines DF zu erreichen (ADAMS et al., 1993).
- b) Eliminierung aller rekrutierten Follikel bis auf einen zufällig selektierten, läßt diesen zum DF heranwachsen (GIBBONS et al., 1995).
- c) Eliminierung des DF bewirkt, daß der größte der verbliebenen Follikel zu einem neuen DF wird (KO et al., 1991).

Welche Mechanismen bei der Selektion wirksam werden, ist Gegenstand vieler Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Biotechnologien beim Rind. Hierbei wird versucht, den Mechanismus der Selektion durch folgende Hypothesen zu verstehen:

Tab. 2: Mechanismen assoziiert mit dem Phänomen der Selektion des DF

Mechanismus	Quelle
Abfall des FSH-Peaks	GINTHER et al. (1996) MIHM et al. (1997)
Zunahme an LH-Pulsen	GINTHER et al. (1998)
Anbildung von LH-Rezeptoren an Granulosazellen	GONG et al. (1995) BAO u. GARVERICK (1998) GINTHER et al. (1998)
Veränderungen in der Vaskularisation des Ovargewebes	SPICER u. ECHTERNKAMP (1986) BROWN u. DRIANCOURT (1989)
Intrafollikuläres Steroidverhältnis	SUNDERLAND et. al. (1994) GINTHER et al.(1997)
Intrafollikuläres Proteinverhältnis	RHODES et al. (1997) EVANS et al. (1997)

3.5.4 Dominanz

Dominanz ist ein Phänomen, welches den innerhalb des schubweisen Follikelwachstums selektierten Follikel in seinem Wachstumsverhalten gegenüber den Nachbarfollikeln bevorzugt. Gleichzeitig werden die Nachbarfollikel der entsprechenden Follikelreifungswelle unterdrückt und fallen der Atresie anheim (GOODMAN u. HODGEN, 1983).

Erreicht ein Follikel die Dominanz, verändert er sich sowohl morphologisch als auch funktionell, wodurch er sich auf die Ovulation vorbereitet. Während dieser Phase sezerniert er u.a. zunehmende Mengen an Östradiol (Östrogen)

und Inhibin (Hormon, welches die FSH-Sekretion hemmt) (BADINGA et al., 1992) und bewirkt über einen negativen Feedback-Mechanismus eine Senkung des FSH-Plasmaspiegels. Dies wird als eine der Ursachen der Wachstumshemmung kleinerer Follikel gewertet.

Außerdem wird vermutet, daß durch nicht weiter definierte Sekretionsprodukte des heranreifenden DF die Empfindlichkeit kleinerer Follikel gegenüber FSH sinkt und/oder deren Wachstum durch Reduzierung der hypophysären Gonadotropinausschüttung (STAIGMILLER u. ENGLAND, 1982) behindert.

Obwohl der DF die periphere FSH-Konzentration senkt, ist er selbst in der Lage, weiter zu wachsen, weil er gegenüber den kleinen Follikeln eine höhere Sensibilität für FSH besitzen soll.

Nach FSH-Abfall wechselt der DF von der FSH- zur LH-Abhängigkeit (Luteinisierendes-Hormon). Granulosazellen bilden LH-Rezeptoren zwischen Tag zwei und vier nach Eintritt einer Follikelwelle (GINTHER et al., 1996).

Erhöhte Progesteronspiegel (Gelbkörperhormon) während der Lutealphase (Gelbkörperphase des Zyklus) erlauben keine vollständige Reifung und Ovulation des DF der ersten Follikelwelle eines Zyklus, sondern nur das Erreichen eines Plateaus mit anschließender Atresie (FORTUNE et al., 1988). Im Gefolge der Atresie wird über die damit einhergehende abnehmende Östradiolproduktion und damit den Wegfall des negativen „Feedbacks“ auf FSH, von der Hypophyse in steigendem Maße FSH und LH sezerniert. Die Folge ist der Einstieg in die zweite Follikelwelle des Zyklus (LAHLOU-KASSAL et al., 1984).

Am Ende der zweiten Follikelwelle haben unregelmäßige LH-Freisetzungen häufig eine Ovulationsstörung des Follikels zur Folge (CALLESEN et al., 1988); durch geringe Progesteronkonzentrationen im Blut kommt es zu einem unkontrollierten Wachstum der Follikel, und eine zeitgerechte Ovulation wird verhindert (GLATZEL, 1999).

3.6 Follikelatresie

Die Atresie eines Follikels kann mikroskopisch festgestellt werden. Hinweise für einen atretischen Follikel geben eine schlechte Vaskularisierung, die weißliche Farbe der Theka interna, die Zahl der degenerierten Granulosazellen, eine in Degeneration befindliche Eizelle sowie Detritus im Antrum des Follikels (MOOR und TROUNSON, 1977; MC NATTY et al., 1984). In allen Phasen des Follikelwachstums ist eine Atresie möglich (HIRSCHFIELD, 1991). In der Gruppe der Follikel mit ein bis zwei Millimeter Durchmesser überwiegen intakte Follikel, in der Größe von zwei bis fünf Millimeter überwiegen die atretischen Follikel; in der Gruppe von Follikeln über fünf Millimetern ist der Anteil an atretischen Follikeln am höchsten (RAJAKOWSKI, 1960).

Atretische Follikel enthalten signifikant weniger Östrogen und mehr Progesteron in ihrer Flüssigkeit als nicht atretische Follikel. Die Aromataseaktivität atretischer Follikel liegt deutlich unter der von intakten Follikeln (MC NATTY et al., 1984; STAIGMILLER et al., 1982; FORTUNE und HANSEL, 1985; SPICER und ECHTERNKAMP, 1986; IRELAND und ROCHE, 1987).

Der LH-Peak beeinflusst die Hormonproduktion atretischer Follikel nicht (STAIGMILLER et al., 1982).

3.7 Dominanter Follikel

3.7.1 Endokrinologie des Dominanten Follikels

3.7.1.1 Steroidbiosynthese

Das Zusammenspiel zwischen folliculären Zellen und Gonadotropinen wird durch die Steroidbiosynthese koordiniert. Östrogene bewirken die Rezeptorenbildung. Rezeptoren für hypophysäre Hormone entstehen erst nach Antrumbildung. Die Gonadotropinrezeptoren nehmen im Laufe des Tertiärfollikel-Wachstums fortlaufend zu (CHANNIG u. KAMMERMAN, 1974). FSH-Rezeptoren sind nur an Granulosazellen zu finden, während LH-Rezeptoren an Theka- und Granulosazellen vorhanden sind. Nach der Interaktion der Gonadotropine mit ihren Rezeptoren auf der Oberfläche der Granulosa- und Thekazellen wird der cAMP-abhängige Prozeß der Steroidbiosynthese, speziell der des Östradiols gesteigert (MERZ et al., 1981; ENGLAND et al., 1981; WEBB u. ENGLAND, 1982; IRELAND u. ROCHE, 1987; DÖCKE, 1994). Grundelemente für die Biosynthese der Sexualsteroiden des DF sind

Theka- und Granulosazellen, die miteinander als funktionelle Einheit interagieren. Von den Thekazellen wird Cholesterin synthetisiert und aus der Zirkulation als Substrat für die Bildung von C₁₉-Steroiden aufgenommen (HILLIER, 1981). Das Progesteron wird in 17 β -Hydroxyprogesteron umgewandelt, woraus die Androgene Androstendion und Testosteron synthetisiert werden. Diese können die Basalmembran der Granulosazellen penetrieren und werden dort zu Östrogenen umgewandelt (HANSEL u. FORTUNE, 1978; DÖCKE, 1994). Durch LH und FSH wird auf genexpressivem Weg die Synthese der für die Steroidbiosynthese notwendigen Enzyme induziert.

Cytochrom P450 ist ein Enzym, welches Cholesterin zu Pregnenolon umwandelt. Sein Gehalt ist in präovulatorischen Follikeln größer als in kleinen antralen Follikeln. Die weitere Metabolisierung des Pregnenolons in Progesteron wird durch die 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase gesteuert, welche durch LH-Induktion in Theka- und Granulosazellen synthetisiert wird.

Die 17 β -Hydroxylase P450 ist ein Peptid, welches nur in den Thekazellen festgestellt wird. Es katalysiert die Metabolisierung von Progesteron zu Androstendion. Seine Aktivität ist von der basalen LH-Konzentration abhängig. Die Thekazellen verlieren die LH-vermittelte Aktivität mit ihrer Luteinisierung.

Cytochrom P450 katalysiert in den Granulosazellen den limitierenden Schritt der Östradiol-17 β -Synthese. Die Aromataseaktivität wird besonders durch FSH und Östradiol selbst gesteigert. Für die gesamte Steroidsynthese wirkt Östradiol somit als Regulator (FORTUNE u. HANSEL, 1985; FORTUNE, 1986; FORTUNE u. QUIRK, 1988; DÖCKE, 1994), stimuliert die Mitose der Granulosazellen und fördert gemeinsam mit FSH die Ausbildung von LH-Rezeptoren. Außerdem hemmt es dosisabhängig durch Hemmung der 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase die Progesteronsekretion.

Zwei Tage vor Beginn jeder Follikelwelle steigt der FSH-Wert an (ADAMS et al., 1992; RHODES et al., 1995) und fällt 16 bis 32 Stunden nach DF-Divergenz wieder ab (GINTHER et al., 1998). Während des DF-Wachstums ist der FSH-Gehalt im Plasma minimal (SUNDERLAND et al., 1994). Aus diesem Grund vermuteten MIHM et al. (1995), daß die Entwicklung des DF wahrscheinlich FSH-unabhängig ist.

TURZILLO und FORTUNE (1990) sprachen der minimalen FSH-Ausschüttung für die Entwicklung der DF eine essentielle Bedeutung zu. Bei der Entwicklung des DF der ersten Follikelwelle sind Pulsfrequenz und Konzentration von LH hoch. Der Anstieg

der Pulsfrequenz und die damit verbundene hohe LH-Konzentration werden durch hohe Östradiol- und niedrige Progesteron-Konzentrationen zu Beginn und Ende des Zyklus moduliert (RHODES et al., 1995; BERGFELT et al., 1996). 16 bis 32 Stunden nach der DF-Divergenz nimmt LH zu (GINTHER et al., 1998). Die LH-Pulsfrequenz bleibt bis zum vierten Tag nach der Ovulation hoch, dann nimmt sie zur Mitte der Lutealphase hin ab (RAHE et al., 1980; WALTER und SCHALLENBERGER, 1984). Eine Zunahme in der P₄-Konzentration führt zur Abnahme der LH-Pulsfrequenz bzw. LH-Konzentration (RHODES et al., 1995). Nach KASTELIC und GINTHER (1991) können zwischen den aufeinanderfolgenden DF eines Zyklus keine signifikanten Größenunterschiede beobachtet werden.

3.7.1.2 Wachstumsfaktoren

Einige Autoren haben in den letzten Jahren nachgewiesen, daß intrafollikuläre Substanzen, sogenannte Wachstumsfaktoren, die Follikulogenese beeinflussen (MONNIAUX et al., 1997). Es handelt sich dabei um spezifische Proteine, die im Zusammenhang mit Gonadotropinen eine Zellproliferation bzw. -differenzierung bewirken. Anhand von Struktur und biologischer Wirkung wurden diese Stoffe in verschiedene Familien unterteilt: Epidermal Growth Factor (EGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Insulin-Like Growth Factor (IGF), Platelete-Derived Growth Factor (PDGF) und Transformation Growth Factor- β (TGF- β), welcher Aktivin und Inhibin umfaßt.

Granulosazellen synthetisieren FGF (NEUFELD et al., 1987), IGF (HERNANDEZ et al., 1989; OLIVER et al., 1989), Aktivin (NEUFELD et al., 1987) und Inhibin (FINDLAY et al., 1990). Die Follikelthekazellen produzieren EGF (SKINNER et al., 1987a); TGF- β wird sowohl in den Granulosazellen als auch in den Thekazellen erzeugt (SKINNER et al., 1987b).

Die Bioaktivität der Wachstumsfaktoren wird intrafollikulär von Bildungsproteinen modifiziert (MONNIAUX et al., 1997).

In den Granulosazellen wird durch FSH die Aromatisierung induziert (MCNATTY et al., 1985). Die FSH-Wirkung bei der Aromatisierung wird durch IGF1 (ADASHI et al., 1985c), TGF- β (ADASHI und RESNIK, 1986) und Aktivin unterstützt. Dagegen hemmen EGF (HUEH et al., 1981) und IGF-Bindungsproteine (BICASAK et al., 1990) die aromatisierende Wirkung des FSH.

Auch die Wirkung des LH wird durch die Wachstumsfaktoren gesteuert. Während IGF1 unterstützend wirkt, hemmt EGF die Wirkung des LH bei gleichzeitiger Produktion von Androgenen in den Thekazellen (CAUBO et al., 1989). Durch Inhibin wird die LH-Wirkung erhöht, durch Aktivin wird sie gesenkt (FINDLAY et al., 1990). Das Wachstum kleiner antraler Follikel wird durch EGF, IGF und TGF- β aufgrund der dadurch bedingten Steigerung der Proliferation von Granulosazellen unterstützt (MONNIAUX et al., 1997). Der Insulin Like Growth Factor-1 (IGF-1) moduliert sowohl die Proliferations- als auch die Differenzierungsprozesse der Granulosazellen und kooperiert mit FSH und LH bei der Regulation der Steroidsynthese (ADASHI et al., 1985b; SCHAMS et al., 1988). In den Follikelzellen erfolgt die Synthese von IGF-I und IGF-II auf genexpressivem Weg (SPICER und APLIZOR, 1993). Für den Transport erfolgt eine Bindung an IGF-Bindungsproteine mit gleichzeitiger Verlängerung der Halbwertszeit des IGF. Die Bindungsproteine werden in verschiedene Klassen eingeteilt; sie haben entweder inhibierende oder stimulierende Wirkung. 1992 konnten ERICKSON et al. nachweisen, daß IGFBP-4 nur in atretischen Granulosazellen Graaf'scher Follikel vorkommt und zyklusabhängigen Schwankungen unterliegt. Laut ADASHI et al. (1985a) hemmt FSH die Produktion von IGFBP in Granulosazellen.

Bei Inhibin handelt es sich um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 58 Kilo-Dalton (FINDLAY, 1986). Gemeinsam mit Aktivin gehört es als Heterodimer zur TGF-Superfamilie. Inhibin besteht aus α - und β -Untereinheiten, während Aktivin nur aus β -Untereinheiten zusammengesetzt ist.

In der Follikelflüssigkeit landwirtschaftlicher Nutztiere kommt Inhibin in großer Konzentration vor (MARTIN et al., 1991; SUNDERLAND et al., 1996).

Bei Schafen (FINDLAY et al., 1986) und Rindern (BEARCH et al., 1989) senkt die Applikation von Inhibin die mRNA-Syntheserate der α -Untereinheit des FSH in der Hypophyse und die Konzentration von FSH im Blutkreislauf. FINDLAY et al. (1986) konnten eine dosisabhängige Unterdrückung von FSH durch rekombinantes humanes Inhibin in ovariektomierten Schafen nachweisen. Ob zusätzlich eine Beeinflussung von LH bestand, wurde nicht nachgewiesen (FINDLAY, 1986; YING et al., 1988).

Östradiol und Inhibin wirken beim Schaf synergetisch hemmend (MARTIN et al., 1988). Nach MANN et al. (1989) ist Östradiol der Hauptregulator der FSH-Ausschüttung während der Follikelwachstumsphase. Zwischen der Östradiol-

Sekretion und der FSH-Konzentration besteht während des gesamten Zyklus eine negative Korrelation. In der frühen Zyklusphase verhalten sich Inhibin und FSH ähnlich, um in im späteren Verlauf parallel zu verlaufen (BAIRD et al., 1991). Die Autoren schlußfolgern daraus, daß Inhibin mit einer wesentlich längeren Halbwertszeit als Östradiol für den allgemein negativen Feedback-Mechanismus ab einem bestimmten Schwellenwert verantwortlich ist.

3.7.2 Hormongehalt des Dominanten Follikels in Abhängigkeit von

3.7.2.1 Follikelgröße

Die Östradiol-Konzentration ist im großen Follikel größer als im kleinen (IRELAND et al., 1979; SILVAN et al., 1993; BADINGA et al., 1992). KRUIP und DIELEMANN (1985) fanden heraus, daß der nicht atretische Follikel mit einem Durchmesser von über acht Millimetern immer Östradiol-dominiert war. Von den großen Follikeln zeigte nur ein Follikel eine hohe Östradiolkonzentration von über 500ng/ml (STAIGMILLER et al., 1982). Daß die Aromataseaktivität in großen Follikeln acht bis zehnfach gegenüber kleinen Follikeln erhöht ist, fanden TSONIS et al. (1984) heraus. Am zwölften Zyklustag soll laut SUNDERLAND et al. (1994) die Östradiolkonzentration in kleinen Follikeln höher als in großen Follikeln sein. GLATZEL (1992) berichtet von positiven Zusammenhängen zwischen der Follikelgröße und dem E_2/P_4 -Verhältnis in der Follikelflüssigkeit.

Die Progesteronkonzentration war in untergeordneten Follikeln höher als im DF (IRELAND et al., 1979; SUNDERLAND et al., 1994). Zwischen dem fünften und dem zwölften Zyklustag ist für den P_4 -Gehalt in untergeordneten Follikeln ein linearer Anstieg zu verzeichnen. HENDERSON et al. (1982) und HUSS (1991) konnten dagegen keine Korrelation zwischen Größe/Volumen und dem P_4 -Gehalt von Follikeln feststellen. Progesteron- und Östradiolgehalt verhalten sich in der Follikelflüssigkeit immer entgegengesetzt zueinander (GLATZEL u. HUSS, 1989; HUSS, 1991).

Follikel, die einen Durchmesser von weniger als acht Millimeter haben und nicht atretiert sind, weisen in der Regel eine Androgendominanz auf (KRUIP u. DIELEMANN, 1985).

3.7.2.2 Entwicklungsstatus des Dominanten Follikels

Dominante Follikel der ersten und zweiten Welle besitzen einen hohen Östradiolgehalt (HENDERSON et al., 1982; MARTIN et al., 1991; BECKER, 1994). Nach Erreichen der Maximalgröße des DF nahm der E₂-Gehalt in der Follikelflüssigkeit ab. Die E₂-Konzentration in der FF nahm vom Beginn des Wachstums bis zur späteren Plateauphase ab (PRICE et al., 1995; SINGH et al., 1998). Während der Atresie fiel der Gehalt im DF fortschreitend ab (GINTHER et al., 1997). Dominante Follikel, die sich in Regression befanden, wiesen histologisch Anzeichen der Atresie aber keine Östradioldominanz auf (GUILBAULT et al., 1993; PRICE et al., 1995).

Wenn die Wachstumsrate von dem späteren DF und den untergeordneten Follikeln beginnt auseinanderzudriften, ist eine Abweichung im E₂-Gehalt der beiden Follikelgruppen zu erkennen (SUNDERLAND et al., 1994). In untergeordneten Follikeln ist ab dem zweiten Zyklustag keine Erhöhung des E₂-Gehaltes zu verzeichnen (GINTHER et al., 1997).

Der P₄-Gehalt in der FF des DF steigt während seiner Entwicklung (MARTIN et al., 1991). Dagegen berichteten SINGH et al. (1998) von einem konstanten P₄-Gehalt in der FF des DF während seiner Entwicklung. Während der Atresie eines DF nimmt sein Progesterongehalt stufenweise zu (GINTHER et al., 1997; SINGH et al., 1998). Ein hoher P₄-Gehalt ist ein Zeichen für einen degenerierten Follikel. In dem Stadium vor der Ovulation ist der Progesterongehalt allerdings auch sehr hoch und ist hier ein Zeichen für einen reifen Follikel (KRUIP u. DIELEMANN, 1985).

Während des Wachstums sinkt der Gehalt an Androgenen und Testosteronen (HENDERSON et al., 1982). In nicht atretischen DF ist der Androgengehalt immer gering (FORTUNE, 1994).

Der Inhibingehalt nimmt beim nicht-ovulatorischen DF während seiner Entwicklung zu (MARTIN et al., 1991). Während des Wachstums eines ovulatorischen DF nimmt der Inhibingehalt jedoch ab. Die Atresie eines DF führt zum Abfall seines Inhibingehaltes (SUNDERLAND et al., 1996).

3.7.2.3 Zyklusstadium

BADINGA et al. (1992) berichten, daß Aromataseaktivität und Östradiolgehalt am fünften Zyklustag höher waren als am achten und zwölften ZT. Der Verlauf der E₂-Konzentration läßt sich als Kurve darstellen, in der zwischen dem zweiten und dritten

Zyklustag ein langsamer und zwischen Tag drei und vier ein schneller Anstieg sichtbar ist (GINTHER et al., 1997). Follikel während der folliculären Phase hatten einen ähnlichen Östradiolgehalt wie der größte Follikel während der frühen Lutealphase (KRUIP u. DIELEMANN, 1985). In Untersuchungen von SUNDERLAND et al. (1994) wurde der DF als östrogen-aktiv am ersten, dritten und sechsten ZT, und als östrogen-inaktiv am zwölften ZT bezeichnet. Vom fünften bis zum achten ZT sank der E₂-Gehalt des DF auf ein Drittel seines Wertes und fiel bis zum elften ZT weiter ab. Die Follikelgröße allein vermag keine Auskunft über einen potentiellen dominanten oder atretischen Follikel zu geben. Mit Hilfe des E₂/P₄-Verhältnisses ist eine Aussage zu dieser Charakterisierung möglich (IRELAND et al., 1994; IRELAND u. ROCHE, 1982, 1983a,b, 1987; SUNDERLAND et al., 1994).

3.8 Ovogenese

Die Bildung, Entwicklung und Reifung der weiblichen Gameten bezeichnet man als Ovogenese. Vermehrung und Entwicklung beginnen bereits in der Embryonalphase; die Entwicklung und Reifung der Eizellen dauern bis zur Ovulation an.

Gegen Ende der Geschlechtsdifferenzierung bedingen mitotische Teilungen eine starke Zunahme der Anzahl an primordialen Keimzellen. Während das Ovar die Form der adulten Drüse annimmt, werden die Keimzellen zu Ovogonien umgebildet. Diese nehmen zahlenmäßig stark zu. Zwischen dem 60. und 100. Trächtigkeitstag beobachteten BAKER und HUNTER (1978) beim Rind ein Maximum von 1-3 Millionen Ovogonien. Nach einer scheinbar begrenzten Anzahl an mitotischen Teilungen ist mit der Differenzierung der Ovogonien zu Oozyten erster Ordnung (primäre Oozyten), welche in die Prophase der ersten von zwei meiotischen Teilungen eingehen, in der nachfolgenden ersten Wachstumsperiode die Gesamtpopulation an Keimzellen festgelegt. Bereits vor der Geburt kann sich ihre Anzahl von nun an nur noch durch Ovulationen und Atresie verringern.

Letztlich kommen weniger als 0,1% der bei der Geburt vorhandenen Follikel zur Ovulation (ERICKSON, 1966a; ERICKSON et al., 1976).

Bis zur Geschlechtsreife verharren die Oozyten in einem Ruhestadium, dem Dictyotän.

3.9 Präovulatorische Reifung

In der präovulatorischen Reifung beendet die Oozyte ihre erste meiotische Teilung, bei der ihr Chromosomensatz halbiert und ein erstes Polkörperchen abgeschieden wird. Nach der Bildung des Polkörperchens folgt die zweite Reifeteilung, die allerdings erst nach Eindringen des Spermiums in die Eizelle zu Ende geführt wird. Es entstehen zwei weitere Polkörperchen.

Kernreifung:

Während der aus zwei Zellteilungen bestehenden Meiose wird die Chromosomenzahl in der ersten Teilung halbiert. Die zweite Teilung ähnelt einer Mitose, allerdings ist nur ein haploider Chromosomensatz beteiligt (BAKER, 1972).

Beim Ablauf der Meiose werden immer folgende Stadien durchlaufen: a) Diffuse Germinal Vesicle, b) Fibrous Germinal Vesicle, c) Degenerate Germinal Vesicle, d) Very Early Diakinesis, e) Diakinesis, f) Late Diakinesis To Metaphase I, g) Metaphase I, h) Early Anaphase I, i) Midanaphase I, j) Late Anaphase I, k) Early Telophase I, l) Midtelophase I, m) Metaphase II, n) Diploid Metaphase II (HOMA, 1988).

Während das Corpus luteum sich zurückbildet, ist der DF in der Lage, genügend Östradiol zu produzieren, um den LH/FSH-Anstieg und die Ovulation auszulösen (HYTTEL et al. 1997).

3.10 Eizellreifung

Die primäre Oozyte hat am Ende der Wachstumsphase große RNA- und Proteinreserven angelegt, um die spätere Entwicklung vom Dictyotän- zum Metaphase-II-Stadium fortzuführen. Zu einer physiologischen Fertilisierung und präimplantativen Embryonalentwicklung ist sie allerdings noch nicht in der Lage (HYTTEL et al., 1997), bis der Kern und das Zytoplasma weiter differenziert sind. Diese Differenzierung wird in vivo durch die LH-Ausschüttung eingeleitet (TSAFRIRI et al., 1976).

Die Eizellreifung führt in einem Zusammenspiel von reifungsfördernden und -hemmenden Prozessen zu erheblichen morphologischen und biochemischen Veränderungen (SMITH und TENNY, 1980; HYTTEL et al., 1987, 1997).

3.10.1 Meiotische Kompetenz

Mit meiotischer Kompetenz bezeichnet man die Fähigkeit von Eizellen, nach Trennung vom Follikel die Meiose erfolgreich fortzusetzen (WICKRAMASINGHE et al., 1991). Die Entwicklungskompetenz läßt sich in zwei Schwerpunkte einteilen:

1. Kernreifung: -Überwindung des meiotischen Blockes und Reifung bis Metaphase I
-weitere Reifung bis Metaphase II
2. Zytoplasmatische Reifung: -befähigt die Eizelle zur Aktivierung und präimplantativen Entwicklung

Die Kernreifung und die zytoplasmatische Reifung laufen nicht synchron, so kann eine Eizelle, deren Kern sich in der Metaphase II befindet, Defizite bei der Befruchtung aufweisen (EPPIG et al., 1994). Die Kompetenz zur Kernreifung erfolgt vor der zytoplasmatischen Reifung (PAVLOK et al., 1992; DOWNS, 1993).

3.10.2 Induktion der Eizellreifung

Kompetente Eizellen können nach Isolation aus dem Follikel gonadotropinunabhängig die meiotische Arretierung überwinden (PINCUS und ENZMANN, 1935; EDWARDS, 1965). Aus diesem Grunde wird vermutet, daß die somatischen Zellen des Follikels die frühzeitige Aufnahme der Eizellreifung verhindern. Der inhibitorische Effekt der somatischen Follikelzellen scheint spezieübergreifend zu wirken. So verhindern porcine murale Granulosazellverbände die Aufnahme der Meiose von Rindereizellen (KALOUS et al., 1993).

Nach RICHARD und SIRARD (1996a, b) produzieren die Thekazellen beim Rind einen Faktor, der für die meiotische Arretierung der Eizellen verantwortlich ist. Die Meiose kann bei Rindereizellen in vitro durch Zugabe von Follikelflüssigkeit gehemmt werden (AKUFO et al., 1988). Man geht jedoch davon aus, daß von den Granulosazellen eine Beeinflussung ausgeht (HINRICHS, 1996).

Die molekulare Grundlage und der exakte Wirkungsmechanismus des Wechselspiels zwischen Keimzelle und somatischen Zellen sind noch nicht geklärt (NIEMANN und MEINECKE, 1993). Es wird vermutet, daß die Eizellreifung von einer koordinierten Interaktion zwischen Keimzelle und somatischen Zellen abhängig ist (EPPIG, 1993). Am Ende der Wachstumsphase steht die meiotische Arretierung unter dem Einfluß somatischer Follikelzellen. KUMAR und GILULA (1996) schreiben dem Transport

kleinerer Moleküle durch die Gap Junctions zwischen Eizelle und Kumuluszellen einen steuernden Einfluß zu.

Der präovulatorische LH-Peak hebt die inhibitorische Wirkung der Granulosazellen auf (HYTTEL et al., 1989; TSAFRIRI und DEKEL, 1994).

3.10.3 Kernreifung

Der Durchmesser des Zellkernes nimmt bei wachsenden Oozyten zu und die Chromosomen liegen in diffuser Form vor.

Nach vollständiger Differenzierung des Hohlraumes der Oozyte erscheint der Kern nach MOTLIK und FULKA (1986) heterogen und vakuolisiert.

Zu Beginn der ovulatorischen Reifung ist die Eizelle noch eine primäre Oozyte, deren Entwicklung nach dem Diplotän unterbrochen wurde (BAKER, 1972; HYTTEL et al. 1986). Am Ende der Maturation steht eine Eizelle mit haploidem Chromosomensatz.

Die erste meiotische Reifeteilung beginnt mit der Prophase, die den längsten und kompliziertesten Abschnitt der Meiose darstellt. Die Prophase ist in fünf Stadien unterteilbar, wobei mit dem Dictyotän eine jahrelange Entwicklungspause zwischen dem Diplotän und der Diakinese entsteht. Im Leptotän erscheinen die Chromosomen als dünne Fäden im Kern. Im anschließenden Zygotän beginnen sich die äquivalenten Chromosomen zusammenzulegen. Nachdem sich die Chromosomen auf der ganzen Länge aneinander gelegt und sich durch Spiralisierung verkürzt und verdickt haben, ist das Pachytänstadium erreicht. Im Diplotän stoßen sich die paarweise liegenden Chromosomen voneinander ab; nach einer verlängerten Ruhephase folgt die Diakinese. In der Metaphase I verschwindet die Kernmembran, die Spindel bildet sich aus, und die Chromosomen ordnen sich in der Äquatorialebene an. Während der Anaphase I ziehen sich die homologen Chromosomen zu den Polen. Mit der rasch folgenden Zytoplasmateilung ist die erste Reifeteilung in der Telophase I beendet (MOTLIK u. KUBELKA, 1990).

Da eine Trennung der homologen Chromosomen stattgefunden hat, besitzen die Tochterzellen nur den haploiden Chromosomensatz. Die erste meiotische Teilung ist folglich eine Reduktionsteilung.

Die zweite meiotische Teilung ist eine Äquationsteilung. Hier werden ohne vorhergehende Duplikation der DNA und ohne Prophase die Stadien der Metaphase II, Anaphase II und Telophase II durchlaufen.

3.10.4 Zytoplasmatische Reifung

Als zytoplasmatische Reifung werden alle während der Maturation im Ooplasma ablaufenden Prozesse bezeichnet. Sie ist von der Kernreifung abzugrenzen, welche die nukleären Veränderungen im Verlaufe der meiotischen Teilung umfaßt. Diese Prozesse treten miteinander in Wechselwirkung (EPPIG, 1996). Eine erfolgreich abgeschlossene Kernreifung muß nicht mit einer ausreichenden Befruchtungs- und embryonalen Entwicklungskompetenz verbunden sein (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987).

Es wird vermutet, daß zytoplasmatische Veränderungen vor der Reifung einen positiven Einfluß auf die Entwicklungskompetenz ausüben. In Versuchen entwickelten sich Rindereizellen, die vier Stunden post mortem aus Ovarien gewonnen wurden, besser zu intakten Embryonen als Eizellen, die zwei Stunden post mortem aus Follikeln aspiriert wurden (BLONDIN et al., 1997). Sowohl die Ultrastruktur als auch die biochemischen Funktionen des Ooplasmas der Oozyten sind von den Veränderungen betroffen (THIBAUT, 1977, 1987; EPPIG, 1993; HYTTEL et al., 1987, 1997).

Die Entkopplung von Oozyten und umgebenden Granulosazellen ist ein gravierendes Ereignis der Membranreifung, die bis zu diesem Zeitpunkt eine enge kommunikative Verbindung aufwies. An der Vitellusmembran nimmt die Zahl der Mikrovilli zu. Es wird angenommen, daß die langwährenden Beziehungen zwischen Eizelle und Follikelzellen für das Erlangen der Entwicklungskompetenz von großer Bedeutung sind (MOTLIK et al., 1986). Nachdem das Zytoplasma der Eizelle von den Granulosazellfortsätzen entkoppelt ist, werden leere Kanäle in der Zona pellucida nachweisbar (ZAMBONI, 1976). Ein ausreichender Stoffaustausch zwischen Follikelzellen und Eizelle bleibt trotz fehlender Zellkontakte erhalten. Veränderungen des Membranpotentials und der Transportmechanismen an der Eizellmembran bedingen ein verstärktes Aufnahmevermögen für Aminosäuren (MOOR u. GANDOLFI, 1987). Die Proteinsynthese wird während des GVBD verstärkt (KASTROP et al., 1990, 1991; ALBERTINI, 1992); dieser Vorgang verbraucht einen wesentlichen Teil der für die Reifung erforderlichen Energie. Außerdem verändert sich das hergestellte Proteinmuster (MOTLIK u. FULKA, 1986;

EROGLU u. MEINECKE, 1990; SCHRÖTER u. MEINECKE, 1995). Vor allem von Steroiden geht eine Beeinflussung der Proteinsynthese aus; außerdem bewirken sie die Bildung zytoplasmatischer Polypeptid-Faktoren (SIRARD et al., 1998; LONERGAN et al., 1998). Diese Veränderungen stellen offensichtlich die Grundlage der Zytoplasmareifung dar.

HYTTEL et al. (1987, 1997) haben die zytoplasmatischen Veränderungen von Oozyten vor, während und nach LH-Peak untersucht. Ein perivitelliner Raum war vor dem LH-Peak noch nicht feststellbar, entwickelte sich aber bald nach dem LH-Peak.

In der unreifen Eizelle liegt das Zytoplasma in Klumpen kortikaler Granula vor. Es ist durch gut entwickelte peripher liegende Golgikomplexe, ein ausgedehntes glattes endoplasmatisches Retikulum und Ansammlungen peripherer Mitochondrien gekennzeichnet. Außerdem sind eine große Anzahl membrangebundener Vesikel erkennbar (KRUIP et al., 1983; HYTTEL et al., 1986b).

Bei Eizellen, die bereits maturiert sind, liegt das glatte endoplasmatische Retikulum in verklumpter Form vor, und der Golgi-Apparat ist deutlich geringer entwickelt (HYTTEL, 1986b). Die Mitochondrien liegen nicht mehr peripher, sondern verteilen sich über das gesamte Ooplasma. Zuletzt verteilen sich die kortikalen Granula gleichmäßig in der Peripherie des Zytoplasmas. Direkt an der Plasmamembran haben die kortikalen Granula eine wichtige Funktion für die Ausbildung eines Blocks gegen Polyspermie (RAZ, et al., 1998). Ihr Auftreten wird etwa 22 Stunden nach dem LH-Peak sichtbar und kann als wichtiges Beurteilungskriterium für die Zytoplasmareife angesehen werden (KRUIP et al., 1983; CRAN, 1989; HYTTEL et al., 1989). Durch die Ovulation wird die nun hinsichtlich Kern, Zytoplasma und Membran als reif zu bezeichnende Eizelle in den Eileiter freigesetzt. In der Umgebung der Eizellen kommt es vorher noch zu einer Reihe von Veränderungen. Die folliculäre Steroidsynthese wird umgestellt, und es treten morphologische Veränderungen an den Follikelzellen auf (HYTTEL et al., 1989).

3.10.5 Kumulusexpansion und Muzifikation

Die Kumuluszellen einer Eizelle sind untereinander und mit angrenzenden Granulosazellen über sogenannte Gap Junctions verbunden, die die Übertragung von Signalmolekülen über diese metabolische Kopplung gewährleisten. Somit ist ein Austausch zwischen Follikelperipherie und Eizelle möglich (BUCCIONE et al., 1990).

Aus diesem Grunde werden Follikel auch als funktionelles Synzytium bezeichnet (DOWNS, 1993). Parallel zu den Veränderungen in Kern und Zytoplasma kommt es bei der Maturation zur Kumuluszellreifung. Dieser Prozeß wird als Kumulusexpansion (MOOR et al., 1980, 1989; ZHANG et al., 1995) oder als Muzifikation (EPPIG, 1982) bezeichnet. Kumuluszellen driften auseinander, indem sie den engen Kontakt untereinander (EPPIG, 1991; BALL et al., 1983) und zur Eizelle (HYTTEL et al., 1986; SÜSS et al., 1988) verlieren. Die Synthese von Glukosaminoglykanen wird gesteigert (DEKEL et al., 1979; EPPIG, 1979). Außerdem erfährt das Zytoskelett der Kumuluszellen eine drastische Veränderung (SUTOVSKY et al., 1993). Von den gereiften Eizellen werden Faktoren sezerniert, welche den Kumuluszellen die Befähigung geben, auf Gonadotropinstimulation hin, mit der Sekretion von Hyaluronsäure zu antworten. Es wird vermutet, daß die stimulierende Wirkung auf die Kumulusexpansion von cAMP vermittelt wird (EPPIG, 1991; EPPIG et al., 1998). Die interzellulären Verbindungen zwischen den Zellen der Corona radiata und der Eizelle sind nach neun bis zwölf Stunden weitestgehend unterbrochen. Die Kumulusexpansion ist erst nach fünfzehn Stunden vollständig abgeschlossen (HYTTEL, 1989). Es wird angenommen, daß für die Kumulusexpansion ein Plasminogenfaktor verantwortlich ist, welcher von Kumuluszellen und Eizellen synthetisiert wird (CHOI et al., 1998). Der Aktivator wandelt das Plasminogen, welches von der Membrana granulosa produziert wird und sich in der FF befindet, in eine Plasminprotease um, welche die Desintegration im Kumulus-Oozyten-Komplex bewirkt. DE LOOS et al. (1991) konnten eine enge Beziehung zwischen Kernreifung und Kumulusexpansion erkennen. Eizellen im M II-Stadium wiesen immer einen expandierten Kumulus auf. Eizellen mit kompaktem Kumulus verharrten im GVS.

3.11 In-vitro-Maturation von Eizellen

3.11.1 Eizellgewinnung

Für die In-vitro-Maturation von Rindereizellen werden vorwiegend Ovarien gesunder Kühe vom Schlachthof gewonnen (HAHN, 1993).

Für die weitere Manipulation an den Ovarien sind besondere Laboreinrichtungen notwendig; aus diesem Grund werden die Ovarien sofort ins Labor verbracht.

Für den Transport werden die Ovarien meist in PBS-Lösung (MADISON et al., 1992; CAROLAN et al., 1994; LAZZARI und GALLI, 1993) oder isotonischer Natriumchlorid-Lösung (ROSE und BAVISTER, 1992; SEKINE et al., 1993; MINAMI et al., 1994) transportiert. In neuerer Zeit wurde auch der Transport der Ovarien in thermoisolierten Gefäßen ohne ein Zusatzmedium beschrieben (SMITH et al., 1996). Von der Entnahme der Ovarien bis zur Weiterverarbeitung im Labor vergeht je nach Wegstrecke unterschiedlich viel Zeit. Um zu überprüfen, inwieweit sich diese Zeitverzögerung auf die Entwicklungsfähigkeit der Eizellen auswirkt, haben YANG et al., (1990) herausgefunden, daß bei einer Lagerungstemperatur von 24-25°C die Befruchtungsfähigkeit nach etwa elf Stunden nachläßt.

Um die Eizellen aus den Follikeln zu gewinnen, gibt es am isolierten Ovar drei gängige Methoden. Häufig werden die Follikel unter Sichtkontrolle mit einer 18-20G-Kanüle punktiert und aspiriert (OCANA-QUERO et al., 1994). Bei Versuchen mit dieser Methode wurde deutlich, daß Follikel mit einem Durchmesser von zwei bis acht Millimeter Eizellen mit einer besseren Qualität aufwiesen als kleinere (PAVLOK et al., 1992).

Weiterhin ist die Gewinnung der Eizellen mit Hilfe von dem sogenannten „Slicing“ möglich, bei dem die Ovaroberfläche mit parallel zueinander angeordneten Rasierklingen zerschnitten wird. Danach werden die Schnittflächen abgespült und die Flüssigkeit auf Eizellen untersucht. Die Follikelgröße kann in diesem Fall nicht in die Arbeit eingehen.

Bei dieser Methode ist die Gefahr der mikrobiellen Kontamination sehr viel größer als bei der Aspirationsmethode. Es wird berichtet, daß bei dieser Methode die Anzahl der gewonnenen intakten COC (REINTJES, 1991) deutlich und die Gesamtzahl der gewonnenen Eizellen (HAMANO und KUWAYAMA, 1993; CAROLAN et al., 1994) um das dreifache höher liegt als bei der Aspiration.

Eine dritte Möglichkeit der Eizellgewinnung ist die Gewinnung der Eizellen mit Hilfe der Follikelisolierung. In diesem Fall werden die Follikel aus dem Ovar herausgeschält und anschließend geöffnet. Diese sehr arbeitsaufwendige Methode ermöglicht eine genaue Klassifizierung des Eizell-tragenden Follikels (PAVLOK et al., 1992; LAZZARI und GALLI, 1993).

Für die Gewinnung von Eizellen am lebenden Tier steht die Punktion nach Laparatomie oder die mittlerweile praxisreife Methode des „Ovum-pick-up“. Beim

„Ovum-pick-up“ wird die Punktion transvaginal unter Ultraschallkontrolle durchgeführt (KRUIP et al., 1991).

Das mikroskopische Erscheinungsbild der Eizellen ermöglicht eine Einteilung nach Qualität. Das Zytoplasma einer qualitativ hochwertigen Eizelle erscheint dunkel und gleichmäßig granuliert; die Kumuluszellen liegen vielschichtig, geschlossen und nicht expandiert um die Eizelle herum. Minderwertige Eizellen zeigen ein helles oder scholliges Zytoplasma, und ihre Kumuluszellen sind nur in geringer Zahl vorhanden und eventuell expandiert (SHAMSUDDIN et al., 1993).

YANG und LU (1990) berichten, daß die beste Qualität bei vier bis acht Kumuluszellschichten vorliege.

3.11.2 In-vitro-Maturation

Für die weitere Entwicklung und eine eventuelle Fertilisierung ist die Maturation von großer Bedeutung.

Für eine erfolgreiche Maturation ist das Klima, in dem die Eizellen gehalten werden, wichtig. Es wird häufig eine Inkubationstemperatur von 39°C (LENZ et al., 1983) und eine CO₂-Konzentration von fünf Prozent gewählt.

Außerdem ist für die Maturation die Wahl des Maturationsmediums entscheidend (CRITSER et al., 1986; BAVISTER et al., 1992). Heutzutage werden bevorzugt Komplexmedien verwendet, denen Zusätze hinzugefügt werden. Die gängigsten Medien sind TCM 199 und Ham's F 10 (NIEMANN und MEINECKE, 1993). International scheint TCM 199 mit Zusätzen von Seren und Gonadotropinen, eventuell auch noch Steroidhormonen am häufigsten Verwendung in der IVM beim Rind zu finden (BRACKETT und ZUELKE, 1993). Als Proteinzusatz ist Serum von Kühen im Östrus (ECS) oder fetales Kälberserum (FCS) in zehn bis zwanzigprozentiger Konzentration am gebräuchlichsten (SCHELLANDER et al., 1990; SAEKI et al., 1990). Es besteht auch die Möglichkeit, Serum von Bullen oder Ochsen zu verwenden (CAROLAN et al., 1994). Die Verwendung von ECS, welches in der stehenden Brunst und damit etwa 24 Stunden vor der Ovulation gewonnen wird, scheint den anderen Möglichkeiten überlegen zu sein (SCHELLANDER et al., 1990; GREVE et al., 1993).

Welche Menge an Serum dem Maturationsmedium zugesetzt wird, ist in der Literatur nicht einheitlich beschrieben. Die Werte reichen von zwei Prozent (NAKAO und NAKATSUJI, 1990) über zehn Prozent (KIM et al., 1990) bis hin zu zwanzig Prozent (KEEFER et al., 1991).

Als Zugabe zu den komplexen Maturationsmedien finden Gonadotropine (FSH, LH), Steroidhormone (Östradiol-17 β) und Wachstumsfaktoren (EGF, IGF-1, TGF- β 1, TGF- β 2) Verwendung (TROUNSON et al., 1994).

Inwieweit die Reifung der Eizellen von den Zusätzen beeinflusst wird, kann man an dem Maturationserfolg, der Kumulusexpansion und bei der IVP an der Befruchtungsrates und der Weiterentwicklung untersuchen (SÜSS et al., 1990).

Durch die Zugabe von FSH wird die Kumulusexpansion positiv beeinflusst (HENSLEIGH und HUNTER, 1983), die Kernreifung wird durch den vorübergehend angehobenen cAMP-Spiegel verzögert (SÜSS et al., 1988). Die Zugabe von LH hat ebenfalls positiven Einfluß auf die Kumulusexpansion (SÜSS et al., 1990). Die Reifung erfährt mit dem Zusatz von mehreren Hormonen wahrscheinlich durch Veränderung des Energiehaushaltes der Eizellen einen positiven Einfluß (SAEKI et al., 1990). Ein nach Zugabe von Granulosazellen entstehender Granulosazellrasen im Maturationsmedium soll einen positiven Einfluß auf die Maturationsfähigkeit und die weitere Entwicklung von Rindereizellen ausüben (CRITSER et al., 1986; SIRARD und BILODEAU, 1990).

TAKAGI et al. (1998) haben herausgefunden, daß weder die Morphologie noch die Maturationsfähigkeit der Oozyten vom Vorhandensein eines zystischen Follikels beeinflusst werden. Auch die Zusammensetzung an Steroidhormonen in der Follikelflüssigkeit hat keinen Einfluß auf die Morphologie der gewonnenen Oozyten.

Die Präsenz eines Dominanten Follikels und das endokrine Milieu eines Follikels bestimmen nicht die Entwicklungsfähigkeit der darin enthaltenen Eizelle (SMITH et al., 1996).

SALAMONE et al. (1999) haben den Einfluß unterschiedlicher Phasen einer Follikelwelle auf die Morphologie und Entwicklungsfähigkeit von COC untersucht und herausgefunden, daß die Reifung von Eizellen in der Rückbildungsphase am erfolgreichsten ist.