

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Untersuchungen zu nukleären Veränderungen in bovinen Oozyten während der IVM

Das Ziel dieses Versuchsabschnittes war die Erfassung der Chromatinkonfiguration in den Oozyten der verschiedenen COK-Klassen im Verlauf der In-vitro Maturation.

Im Anschluss an die Charakterisierung der gewonnenen COK und nach Ablauf der entsprechenden Reifungszeit erfolgten die Anfärbung des Chromatins und die zytologische Untersuchung (Abb. 5). Dabei wurde der Meiosezustand des Chromatins beurteilt und mit Hilfe der folgenden zytologischen Einteilungskriterien beschrieben: Diplotän (Dipl.), Diakinese (Diak.), Metaphase I (MI), Anaphase I (AI), Telophase I (TI), Metaphase II (MII), aktiviertes Chromatin (akt.C.) sowie degeneriertes Chromatin (deg.C.).

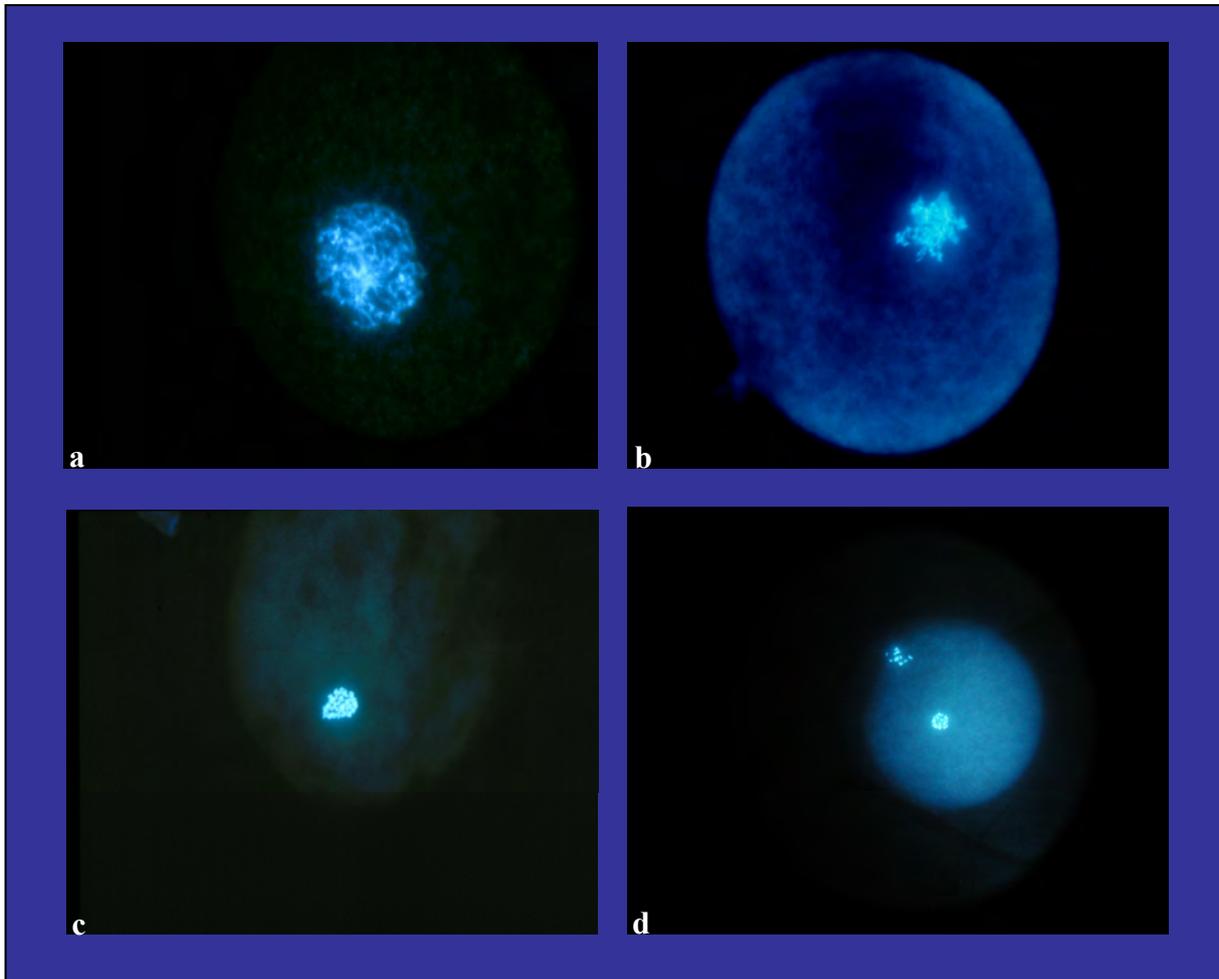
#### 4.1.1. Chromatinkonfiguration in Abhängigkeit von der Maturationszeit

Die Oozyten wurden zu sieben verschiedenen Maturationszeiten (0, 4, 8, 12, 16, 20 und 24 h) zytologisch untersucht.

Zunächst erfolgt die Darstellung der Anteile definierter Kernstadien während der In-vitro Maturation (IVM) bei allen Oozyten unabhängig von der COK-Klasse (Tab. 11).

Im Anschluss an die Gewinnung (0 h) befand sich die Mehrzahl der Oozyten im Stadium des Diplotän (44,3%) bzw. der Diakinese (48,1%). Die Verteilung dieser beiden Stadien weist keine signifikanten Unterschiede auf. Nach 4 h Maturation befanden sich bereits signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr Oozyten in der Diakinese (55,2%) als im Stadium des Diplotän (37,5%). Nach 8 h IVM stieg der Anteil der Oozyten mit Metaphase I (37,1%) an. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Häufigkeit der Diakinese und der Metaphase I. Die Mehrzahl der Oozyten befand sich nach 12 h IVM in der Metaphase I (70,2%). Der Unterschied zum Vorkommen der anderen Kernstadien ist signifikant ( $p < 0,05$ ).

In der zweiten Phase der IVM konnten Oozyten in der Anaphase I, der Telophase I sowie der Metaphase II nachgewiesen werden. Nach 24 h IVM befand sich die Mehrzahl der Oozyten in der Metaphase II (56,6%).



**Abb. 5** Chromatinkonfigurationen  
a: Diplotän, b: frühe Diakinese, c: Metaphase I d: Metaphase II  
(HOECHST 33258, 460x)

Tab.11. Häufigkeit der verschiedenen Kernstadien im Verlauf der IVM

Reifungszeit	Oozyten n	Diplotän n (%)	Diakinese n (%)	MI n (%)	AI n (%)	TI n (%)	M II n (%)	akt. C. n (%)	deg. C. n (%)
0 h	210	93 (44,3) <sup>a</sup>	101 (48,1) <sup>a</sup>	8 (3,8) <sup>b</sup>	0	0	0	0	8 (3,8) <sup>b</sup>
4 h	232	87 (37,5) <sup>b</sup>	128 (55,2) <sup>a</sup>	1 (0,4)	0	1 (0,4)	1 (0,4)	0	10 (4,3) <sup>c</sup>
8 h	205	36 (17,6) <sup>b</sup>	89 (43,4) <sup>a</sup>	76 (37,1) <sup>a</sup>	0	0	0	0	4 (1,9)
12 h	201	23 (11,4) <sup>b</sup>	23 (11,4) <sup>b</sup>	141 (70,2) <sup>a</sup>	0	0	6 (3) <sup>c</sup>	5 (2,5) <sup>c</sup>	3 (1,5) <sup>c</sup>
16 h	219	16 (7,3) <sup>b</sup>	9 (4,1) <sup>b</sup>	136 (62,1) <sup>a</sup>	18 (8,2) <sup>b</sup>	28 (12,8) <sup>b</sup>	3 (1,4)	0	9 (4,1)
20 h	164	5 (3,1)	1 (0,6)	55 (33,5) <sup>a</sup>	20 (12,2) <sup>b</sup>	21 (12,8) <sup>b</sup>	52 (31,7) <sup>a</sup>	2 (1,2)	8 (4,9)
24 h	219	10 (4,6)	3 (1,4)	32 (14,6) <sup>b</sup>	19 (8,7)	19 (8,7) <sup>c</sup>	124 (56,6) <sup>a</sup>	4 (1,8)	8 (3,6)

a,b; a,c: b,c p&lt;0,05 in den Zeilen

#### 4.1.2. Chromatinkonfiguration in Abhängigkeit von der Maturationszeit und der Cumulismorphologie

In der folgenden Auswertung soll die Verteilung der Chromatinkonfiguration von Oozyten in Abhängigkeit von der Maturationszeit und von der Morphologie des umgebenden Cumulus oophorus betrachtet werden. Die Tabellen 12-15 zeigen die Häufigkeiten der einzelnen Kernstadien in den Oozyten der verschiedenen COK-Klassen zu den untersuchten Maturationszeiten.

##### *Chromatinkonfiguration im Verlauf der IVM bei Oozyten der COK-Klasse I*

Die Oozyten der Klasse I (Tab.12) befanden sich in der frühen Reifungsphase überwiegend im Diplotän (45,2%) bzw. in der Diakinese (50,7%). Zwischen diesen beiden Kernstadien lagen bis zu einer Reifungszeit von 8 h keine signifikanten Unterschiede vor. Oozyten in den Meiosestadien Diakinese und Metaphase I traten bei dieser Klasse vermehrt nach einer Reifungszeit von 8 h auf und nach 12 bzw. 16 h IVM befanden sich die meisten Oozyten der Klasse I in der Metaphase I (79,4% bzw. 69,4%). Erste Anzeichen der Anaphase I und der Telophase I traten nach 16 h IVM auf. Nach 24 h Reifung befand sich die Mehrzahl der Oozyten in der Metaphase II. Abb. 6 zeigt eine denudierte Oozyte der COK-Klasse I mit Polkörper nach 24 h IVM. Die Denudierung erfolgte zur besseren Darstellung des Polkörpers.

**Abb. 6**

Denudierte Oozyte der COK-Klasse I mit Polkörper (Pfeil) nach 24 h IVM



**Tab. 12** Häufigkeit der verschiedenen Kernstadien in Oozyten der **COK-Klasse I** im Verlauf der **IVM**

Reifungs- dauer	N	Diplotän n (%)	Diakinese n (%)	M I n (%)	A I n (%)	T I n (%)	M II n (%)	akt. Chr. n (%)	deg. Chr. n (%)
<b>0 h</b>	73	33 (45,2) <sup>a</sup>	37 (50,7) <sup>a</sup>	2 (2,7) <sup>b</sup>	0	0	0	0	1 (1,4) <sup>b</sup>
<b>4 h</b>	71	29 (40,9) <sup>a</sup>	38 (53,5) <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	4 (5,6) <sup>b</sup>
<b>8 h</b>	68	12 (17,7) <sup>a</sup>	30 (44,1) <sup>b</sup>	26 (38,2) <sup>b</sup>	0	0	0	0	0
<b>12 h</b>	63	2 (3,2) <sup>a</sup>	11 (17,5) <sup>b</sup>	50 (79,4) <sup>c</sup>	0	0	0	0	0
<b>16 h</b>	72	2 (2,8) <sup>a</sup>	2 (2,8) <sup>a</sup>	50 (69,4) <sup>b</sup>	7 (9,7) <sup>c</sup>	10 (13,9) <sup>d</sup>	0	0	1 (1,4) <sup>e</sup>
<b>20 h</b>	62	1 (1,6) <sup>a</sup>	0	30 (48,4) <sup>b</sup>	10 (16,2) <sup>c</sup>	9 (14,5) <sup>c</sup>	10 (16,2) <sup>c</sup>	0	2 (3,2) <sup>d</sup>
<b>24 h</b>	87	0	1 (1,2) <sup>a</sup>	13 (14,9) <sup>b</sup>	12 (13,8) <sup>b</sup>	9 (10,3) <sup>b</sup>	50 (57,5) <sup>c</sup>	0	2 (2,3) <sup>d</sup>

a:b, a:c, b:c, b:d, b:e, c:d, d:e p&lt;0,05 in Zeilen

### *Chromatinkonfiguration im Verlauf der IVM bei Oozyten der COK-Klasse II*

Die Oozyten mit aufgelockertem Cumulus oophorus zum Zeitpunkt der Gewinnung (Klasse II, Tab. 13) zeigen eine ähnliche Dynamik im Auftreten der Chromatinkonfiguration wie die Oozyten der Klasse I. Als Unterschied lässt sich hier jedoch feststellen, dass sich bei Oozyten der Klasse II bereits nach 4 h Reifungszeit signifikant mehr Oozyten in der Diakinese als im Diplotän befanden. Der Anteil an Chromosomen in der Metaphase II war bei den Oozyten der Klasse II nach einer Reifungszeit von 20 h höher (43,5 %) als bei den Oozyten der Klasse I (16,1 %).

### *Chromatinkonfiguration im Verlauf der IVM bei Oozyten der COK-Klasse III*

Die Mehrzahl der Oozyten der COK-Klasse III (Tab. 14) befand sich zu Beginn der Reifung in der Diakinese bzw. dem Diplotän. Die ersten Oozyten der Klasse III in der Metaphase I wurden nach 8 h beobachtet. Dies entspricht den Ergebnissen der COK-Klassen I und II. Des Weiteren zeigten die Oozyten der Klasse III nach 20 h IVM bereits einen höheren Prozentsatz an M II als die Klassen I und II (71,4%) und es traten bei Oozyten dieser COK-Klasse nach 24 h IVM erste aktivierte Kernstadien auf.

### *Chromatinkonfiguration im Verlauf der IVM bei Oozyten der COK-Klasse IV*

In einigen denudierten Oozyten (Klasse IV, Tab. 15) konnte nach 12 h Maturationszeit bereits aktiviertes Chromatin festgestellt werden (11,6%). Nach 24 h verblieb in dieser Klasse im Vergleich zu den anderen Klassen ein hoher Prozentsatz der Oozyten im Diplotän (12,8%). Insgesamt sind die Oozyten dieser Klasse durch eine große Heterogenität im Auftreten der Meiosestadien während der IVM gekennzeichnet. Gleichzeitig besteht zu allen untersuchten Zeitpunkten der IVM ein erhöhtes Niveau an degenerierten Kernstadien.

**Tab. 13** Häufigkeit der verschiedenen Kernstadien in Oozyten der **COK-Klasse II** im Verlauf der IVM

Reifungszeit	N	Diplotän n (%)	Diakinese n (%)	M I n (%)	A I n (%)	T I n (%)	M II n (%)	akt. Chr. n (%)	deg. Chr. n (%)
0 h	60	31 (51,7) <sup>a</sup>	27 (45) <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	2 (3,3) <sup>b</sup>
4 h	64	24 (37,5) <sup>b</sup>	38 (59,3) <sup>a</sup>	1 (1,6) <sup>c</sup>	0	0	0	0	1 (1,6) <sup>c</sup>
8 h	64	10 (15,6) <sup>b</sup>	35 (54,7) <sup>a</sup>	19 (29,7) <sup>b</sup>	0	0	0	0	0
12 h	65	5 (7,7) <sup>a</sup>	5 (7,7) <sup>a</sup>	52 (80) <sup>b</sup>	0	0	3 (4,6) <sup>a</sup>	0	0
16 h	65	4 (6,2) <sup>a</sup>	2 (3,1) <sup>a</sup>	45 (69,2) <sup>b</sup>	5 (7,7) <sup>c</sup>	8 (12,3) <sup>c</sup>	0	0	1 (1,5) <sup>d</sup>
20 h	46	0	0	11 (23,9) <sup>a</sup>	7 (15,2) <sup>a</sup>	8 (17,4) <sup>a</sup>	20 (43,5) <sup>b</sup>	0	0
24 h	56	3 (5,4) <sup>a</sup>	0	9 (16,1) <sup>a</sup>	4 (7,1) <sup>a</sup>	7 (12,5) <sup>a</sup>	33 (58,9) <sup>b</sup>	0	0

a:b, b:c, c:d p&lt;0,05 in Zeilen

**Tab. 14** Häufigkeit der verschiedenen Kernstadien in Oozyten der **COK-Klasse III** im Verlauf der **IVM**

Reifungszeit	N	Diplotän n (%)	Diakinese n (%)	M I n (%)	A I n (%)	T I n (%)	M II n (%)	akt. Chr. n (%)	deg. Chr. n (%)
0 h	39	14 (35,9) <sup>a</sup>	20 (51,3) <sup>a</sup>	2 (5,1) <sup>b</sup>	0	0	0	0	3 (7,7) <sup>b</sup>
4 h	51	12 (23,5) <sup>a</sup>	36 (70,5) <sup>b</sup>	1 (2) <sup>c</sup>	0	1 (2) <sup>c</sup>	1 (2) <sup>c</sup>	0	0
8 h	38	5 (13,2) <sup>a</sup>	14 (36,8) <sup>b</sup>	19 (50) <sup>b</sup>	0	0	0	0	0
12 h	30	2 (6,7) <sup>b</sup>	0	24 (80) <sup>a</sup>	0	0	3 (10) <sup>b</sup>	0	1 (3,3) <sup>b</sup>
16 h	41	0	0	28 (68,3) <sup>b</sup>	4 (9,8) <sup>a</sup>	6 (14,6) <sup>a</sup>	2 (4,9) <sup>a</sup>	0	1 (2,4) <sup>c</sup>
20 h	21	0	0	1 (4,8) <sup>b</sup>	1 (4,8) <sup>b</sup>	2 (9,5) <sup>b</sup>	15 (71,4) <sup>a</sup>	0	2 (9,5) <sup>b</sup>
24 h	37	2 (5,4) <sup>b</sup>	0	5 (13,5) <sup>b</sup>	1 (2,7) <sup>b</sup>	3 (8,1) <sup>b</sup>	23 (62,2) <sup>a</sup>	1 (2,7) <sup>b</sup>	2 (5,4) <sup>b</sup>

a;b;a:c;b:c p&lt;0,05 in Zeilen

**Tab. 15** Häufigkeit der verschiedenen Kernstadien in COK der Klasse IV im Verlauf der IVM

Reifungszeit	N	Diplotän n (%)	Diakinese n (%)	M I n (%)	A I n (%)	T I n (%)	M II n (%)	akt. Chr. n (%)	deg. Chr. n (%)
0 h	38	15 (39,5) <sup>a</sup>	17 (44,7) <sup>a</sup>	4 (10,5) <sup>b</sup>	0	0	0	0	2 (5,3) <sup>b</sup>
4 h	46	22 (47,8) <sup>a</sup>	16 (34,8) <sup>a</sup>	3 (6,5) <sup>b</sup>	0	0	0	0	5 (10,9) <sup>b</sup>
8 h	35	9 (25,7) <sup>a</sup>	10 (28,6) <sup>a</sup>	12 (34,3) <sup>a</sup>	0	0	0	0	4 (11,4) <sup>b</sup>
12 h	43	14 (32,6) <sup>b</sup>	7 (16,3) <sup>a</sup>	15 (34,9) <sup>b</sup>	0	0	0	5 (11,6) <sup>c</sup>	2 (4,7) <sup>c</sup>
16 h	41	10 (24,4) <sup>a</sup>	5 (12,2) <sup>b</sup>	13 (31,7) <sup>a</sup>	2 (4,9) <sup>b</sup>	4 (9,8) <sup>c</sup>	1 (2,4) <sup>c,d</sup>	0	6 (14,6) <sup>e</sup>
20 h	35	4 (11,4) <sup>a</sup>	1 (2,9) <sup>a</sup>	13 (37,1) <sup>b</sup>	2 (5,7) <sup>a</sup>	2 (5,7) <sup>a</sup>	7 (20) <sup>b</sup>	2 (5,7) <sup>a</sup>	4 (11,4) <sup>a</sup>
24 h	39	5 (12,8) <sup>a</sup>	2 (5,1) <sup>a</sup>	5 (12,8) <sup>a</sup>	2 (5,1) <sup>a</sup>	0	18 (46,1) <sup>b</sup>	3 (7,7) <sup>a</sup>	4 (10,3) <sup>a</sup>

a:b, b:c, d:e p&lt;0,05 in Zeilen

*Vergleichende Betrachtung der Chromatinkonfigurationen zu charakteristischen Zeitpunkten der IVM bei Oozyten der verschiedenen COK-Klassen*

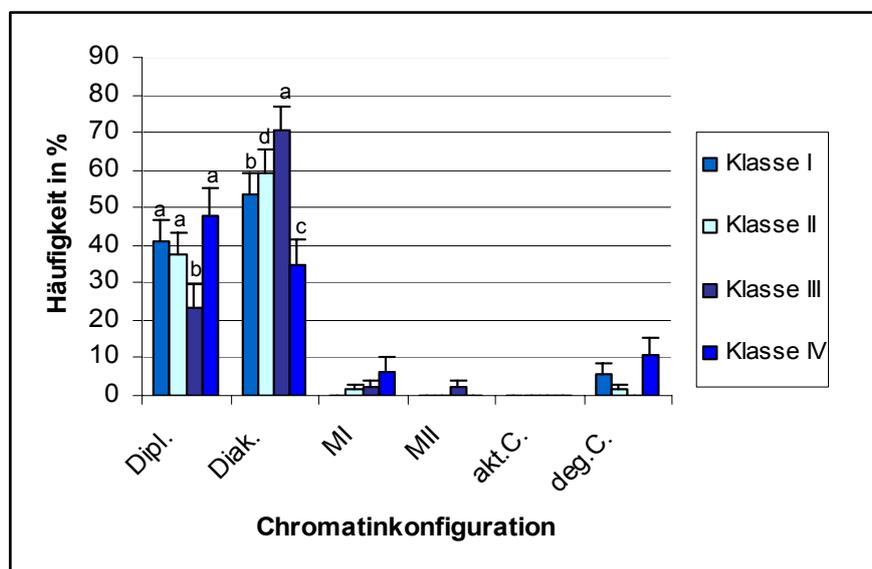
Nach Darstellung des jeweiligen Meioseverlaufes in Oozyten der verschiedenen COK-Klassen, erfolgt nun ein direkter Vergleich der Häufigkeit definierter Meiosestadien von Oozyten verschiedener COK-Gruppen zu den physiologisch bedeutsamen Zeitpunkten der IVM 4, 12, 20 und 24 h.

Die Abbildungen 6-9 zeigen die Häufigkeit des Auftretens der Chromatinkonfigurationen Diplotän, Diakinese, Metaphase I, Metaphase II, aktiviertes Chromatin und degeneriertes Chromatin in den Oozyten der verschiedenen COK-Klassen zu vier prägnanten Zeitpunkten ( $t_4$ ,  $t_{12}$ ,  $t_{20}$ ,  $t_{24}$ ) während der In-vitro-Reifung.

Bei der Betrachtung der ausgewählten Zeitpunkte waren die Oozyten der Klasse IV in Bezug auf das Auftreten der Meiosestadien durch ein heterogenes Muster charakterisiert.

Nach 4 h Reifungszeit in vitro (Abb. 7) befanden sich 53,5% der Oozyten der Klasse I bzw. 59,3 % der Oozyten der Klasse II in der Diakinese. Bei der Klasse III zeigten zu diesem Zeitpunkt bereits 70,6% der Oozyten das Stadium der Diakinese.

**Abb.7** Häufigkeit der verschiedenen Chromatinkonfigurationen bei Oozyten (n=232) der verschiedenen COK-Klassen zum Zeitpunkt  $t_4$



a:b in Chromatinkonfiguration Diplotän; a:b, a:c, b:c, d:c in Chromatinkonfiguration Diakinese  $p < 0,05$

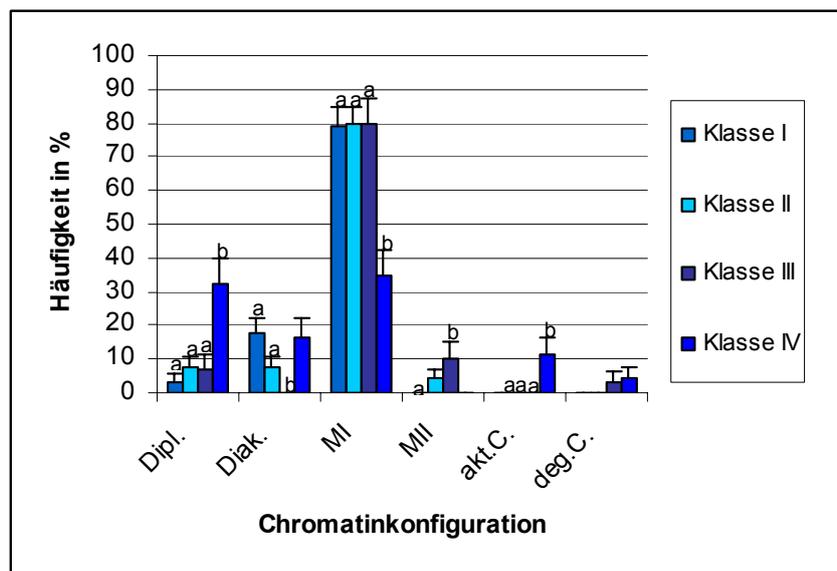
Nach 12 h Reifungszeit (Abb. 8) befand sich die Mehrzahl der Oozyten aller Klassen in der Metaphase I. Bei den Oozyten der Klasse IV konnte jedoch eine signifikant geringere Häufigkeit der Metaphase I im Vergleich zu den Klassen I, II und III nachgewiesen werden.

Die Oozyten der Klasse IV zeigten nach 12 h Reifung einen signifikant höheren Anteil an Diplotänstadien im Vergleich zu den anderen Klassen.

Des Weiteren wiesen die Oozyten der Klasse IV eine signifikant höhere prozentuale Häufigkeit an aktiviertem Chromatin auf.

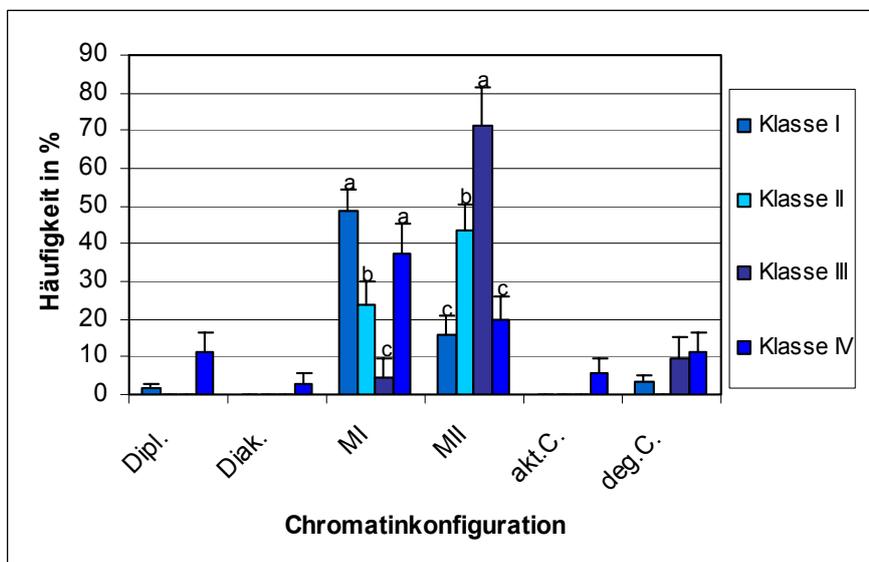
Nach 20 h IVM (Abb.9) hatten 71% der Oozyten der Klasse III, 43% der Oozyten der Klasse II und 16,1% der Oozyten der Klasse I das Stadium der Metaphase II erreicht.

**Abb. 8** Häufigkeit der verschiedenen Chromatinkonfigurationen bei Oozyten (n=201) der verschiedenen COK-Klassen zum Zeitpunkt  $t_{12}$



a:b p<0,05 (jeweils in den verschiedenen Chromatinkonfigurationen)

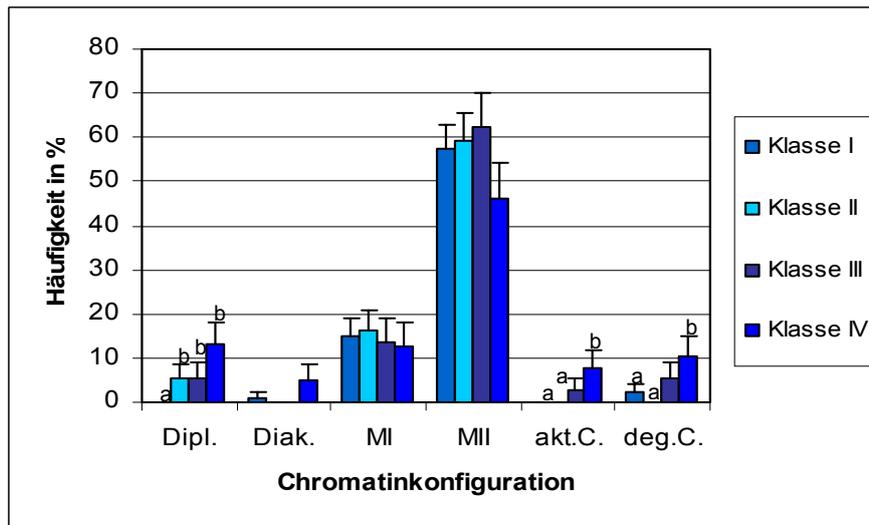
**Abb. 9** Häufigkeit der verschiedenen Chromatinkonfigurationen bei Oozyten (n=164) der verschiedenen COK-Klassen zum Zeitpunkt  $t_{20}$



a:b, a:c, b:c (jeweils in den Chromatinkonfigurationen MI, MII) p<0,05

Zum Ende der Reifung (Abb. 10) befindet sich die Mehrzahl der Oozyten in der Metaphase II. In diesem Reifungsstadium konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Klassen nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den Klassen bestehen bei den Chromatinkonfigurationen Diplotän, aktiviertes Chromatin und degeneriertes Chromatin.

**Abb. 10** Häufigkeit der verschiedenen Chromatinkonfigurationen bei Oozyten (n=219) der verschiedenen COK-Klassen zum Zeitpunkt  $t_{24}$

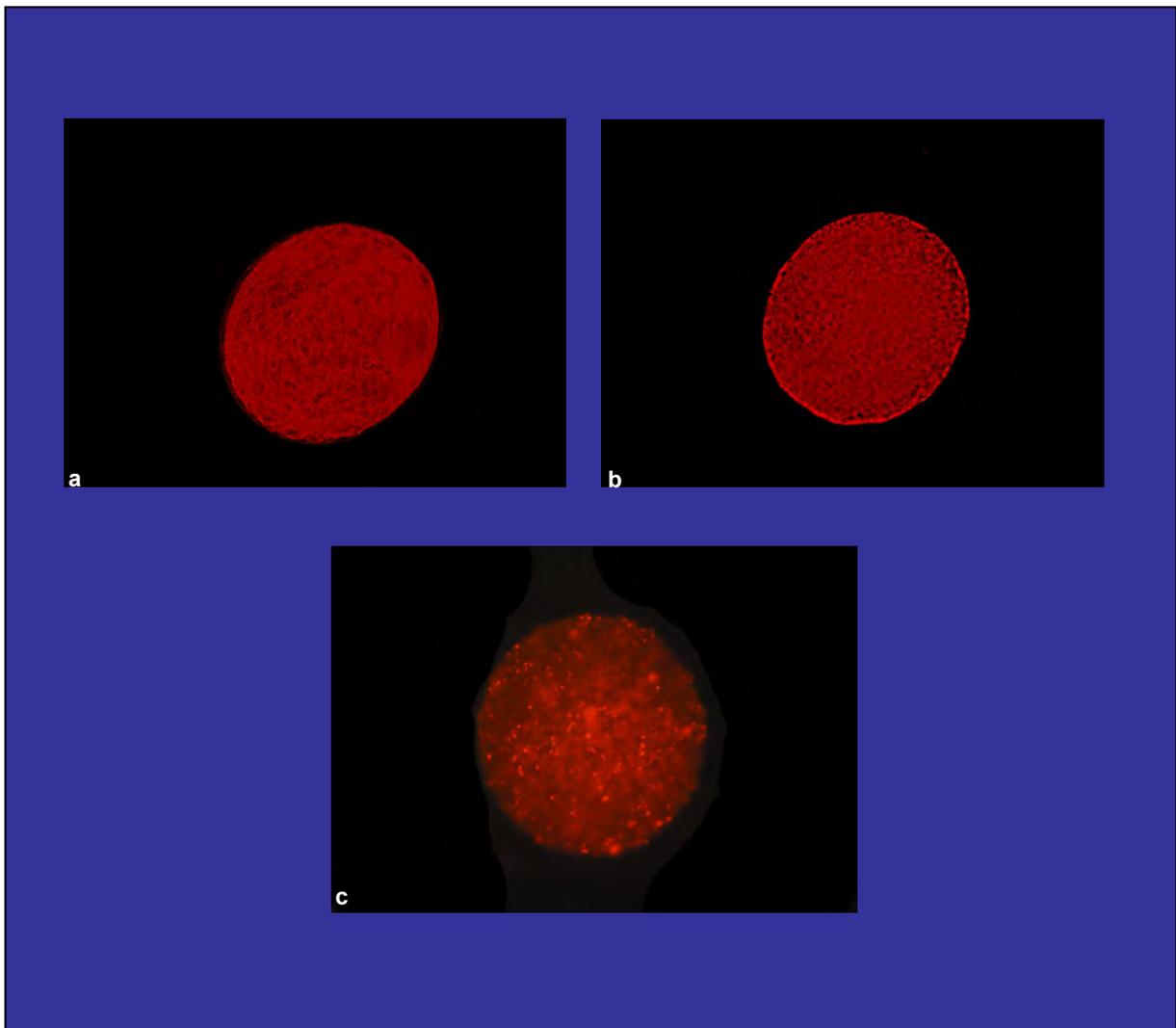


a:b (jeweils in den Chromatinkonfigurationen Dipl., akt.C., deg. C.  $p < 0,05$ )

## 4.2. Untersuchung zu den mitochondrialen Veränderungen in bovinen Oozyten während der IVM

### 4.2.1. Untersuchung zur mitochondrialen Aggregation im Ooplasma boviner Oozyten

Ziel dieses Versuchabschnittes war es, die mitochondriale Aggregation im Verlauf der IVM bei den vier definierten COK-Klassen zu ermitteln. Durch die für diese Untersuchungen gewählte Färbetechnik lässt sich die Aggregation der Mitochondrien beurteilen. Aufgrund des gewählten mikroskopischen Verfahrens (Epifluoreszenz) kann keine Aussage über die räumliche Anordnung der Mitochondrien gemacht werden. Die beobachteten Aggregationsmuster wurden gemäß ihrer Struktur wie folgt definiert: feinkörnig, grobkörnig und kristallin (Abb. 11).



**Abb. 11** Mitochondriale Aggregationsmuster

- a: Oozyte mit feinkörniger mitochondrialer Aggregationsform
- b: Oozyte mit grobkörniger mitochondrialer Aggregationsform
- c: Oozyte mit kristalliner mitochondrialer Aggregationsform

#### 4.2.1.1. Mitochondriale Aggregation im Ooplasma boviner Oozyten im Verlauf der IVM

Zunächst erfolgt die Darstellung der Häufigkeiten der 3 verschiedenen Aggregationsformen in allen untersuchten Oozyten im Verlauf der IVM.

Während des Reifungsverlaufes nahm die Häufigkeit von Oozyten mit feinkörniger mitochondrialer Aggregation signifikant ab. Parallel dazu stieg der Anteil von Oozyten mit kristallinen Aggregationsstrukturen der Mitochondrien (Tab. 16).

**Tab. 16** Aggregationsmuster der Mitochondrien in den Oozyten ( $x \pm \text{SEM}$  in %) im Verlauf der IVM (LSM-Werte)

Reifungszeit	N Oozyten	Aggregationsmuster		
		feinkörnig ( $x \pm \text{SEM}$ in %)	grobkörnig ( $x \pm \text{SEM}$ in %)	kristallin ( $x \pm \text{SEM}$ in %)
0 h	210	73,8 <sup>a</sup> $\pm$ 3,0	10 $\pm$ 2,1	16,2 <sup>e</sup> $\pm$ 2,5
4 h	232	73,7 <sup>a</sup> $\pm$ 2,9	11,6 $\pm$ 2,1	14,6 <sup>h</sup> $\pm$ 2,3
8 h	205	66,3 <sup>c</sup> $\pm$ 3,3	15,6 $\pm$ 2,5	18 <sup>e</sup> $\pm$ 2,7
12 h	201	72,1 <sup>c</sup> $\pm$ 3,2	13,9 $\pm$ 2,4	13,9 <sup>e,h</sup> $\pm$ 2,4
16 h	219	65,3 <sup>b,c</sup> $\pm$ 3,2	12,3 $\pm$ 2,2	22,4 <sup>g</sup> $\pm$ 2,8
20 h	164	65,2 <sup>c</sup> $\pm$ 3,7	7,9 $\pm$ 2,1	26,8 <sup>f</sup> $\pm$ 3,4
24 h	219	53,4 <sup>b,d</sup> $\pm$ 3,4	10,9 $\pm$ 2,1	35,6 <sup>f</sup> $\pm$ 3,2

a:b, c:d, e:f, h:g, g:f, h:f in Spalten  $p < 0,05$

#### 4.2.1.2. Mitochondriale Aggregation in bovinen Oozyten in Abhängigkeit von der COK-Klasse

Die folgende Auswertung stellt die Häufigkeiten der 3 mitochondrialen Aggregationsmuster in den Oozyten der verschiedenen COK-Klassen unabhängig vom Reifungsverlauf dar (Tab. 17).

Das feinkörnige Aggregationsmuster trat bei allen COK-Klassen am häufigsten auf. Zwischen den verschiedenen Klassen lagen keine signifikanten Unterschiede vor. Das grobkörnige Aggregationsmuster lag bei allen Klassen am geringsten vor. Die Oozyten der Klasse IV wiesen im Vergleich zu den Oozyten der anderen COK-Klassen signifikant die

geringste Häufigkeit für dieses Aggregationsmuster auf. Die Verteilung des kristallinen Aggregationsmusters wies kaum signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen COK-Klassen auf.

**Tab. 17** Mitochondriale Aggregation (LSM-Werte) in Oozyten (n=1450) in verschiedenen COK-Klassen ( $x \pm \text{SEM}$  in %)

Klasse	N Oozyten	Aggregationsmuster		
		feinkörnig ( $x \pm \text{SEM}$ in %)	grobkörnig ( $x \pm \text{SEM}$ in %)	kristallin ( $x \pm \text{SEM}$ in %)
I	496	67,5 $\pm$ 2,1	12,1 <sup>a</sup> $\pm$ 1,5	20,4 $\pm$ 1,8
II	420	65 $\pm$ 2,3	12,4 <sup>a</sup> $\pm$ 1,6	22,6 $\pm$ 2,0
III	257	67,3 $\pm$ 2,9	15,9 <sup>a</sup> $\pm$ 2,3	16,7 <sup>c</sup> $\pm$ 2,3
IV	277	69,7 $\pm$ 2,8	6,9 <sup>b</sup> $\pm$ 1,5	23,5 <sup>d</sup> $\pm$ 2,5

a:b; c:d in Spalten  $p < 0,05$

#### 4.2.1.3. Mitochondriale Aggregation in Abhängigkeit von der COK-Klasse und der Maturationszeit

In diesem Abschnitt sollen die Häufigkeiten im Auftreten der verschiedenen Aggregationsmuster bei den 4 definierten COK-Klassen im Verlauf der In-vitro-Maturation dargestellt werden.

##### *Auftreten der grobkörnigen mitochondrialen Aggregation in den Oozyten der verschiedenen COK-Klassen im Verlauf der IVM*

Die grobkörnige Aggregation der Mitochondrien konnte bei den Oozyten aller COK-Klassen während der Maturation beobachtet werden. Der geringe Anteil von Oozyten der COK-Klasse IV mit grobkörniger mitochondrialer Aggregation aus Tab. 17 bestätigt sich auch in der Darstellung der Tab. 18 zu definierten Zeitpunkten der Reifung (4 h, 12 h). Während der Reifung konnte bei Oozyten der COK-Klasse II zwischen 8 und 20 h eine signifikante Abnahme in der Häufigkeit der grobkörnigen mitochondrialen Aggregation verzeichnet werden. Ebenfalls eine signifikante Abnahme in diesem Parameter ist bei Oozyten der COK-Klasse III zwischen 12 und 20 h zu erkennen.

*Auftreten der kristallinen mitochondrialen Aggregation in den Oozyten der verschiedenen COK-Klassen im Verlauf der IVM*

Die kristalline mitochondriale Aggregationsform (Tab. 19) zeigte bei den Oozyten der Klassen I und II eine stetige signifikante Zunahme während der IVM. Bei den Oozyten der Klassen III und IV war dies nicht nachweisbar. Die Oozyten der Klasse II wiesen nach 24 h Maturation den höchsten Anteil an einer kristallinen Aggregationsform auf. Bereits nach 20 h weisen die Oozyten dieser COK-Klasse erhöhte Werte im Auftreten der kristallinen Aggregationsform auf (Klasse II>Klasse I  $p<0,05$ ).

**Tab. 18** Prozentuale Häufigkeit (LSM-Werte) der **grobkörnigen** mitochondrialen Aggregation in Oozyten (n=172) der verschiedenen COK-Klassen im Verlauf der IVM

Reifungszeit	N Oozyten	COK-Klasse			
		Klasse I x±SEM in %	Klasse II x±SEM in %	Klasse III x±SEM in %	Klasse IV X±SEM in %
0 h	21	9,6±3,4	11,7±4,1	12,8±5,3	5,3±3,6
4 h	27	12,7±3,9 <sup>a</sup>	14,1±4,3 <sup>a</sup>	15,7±5,0 <sup>a</sup>	2,2±2,1 <sup>b</sup>
8 h	32	14,7±4,3	20,3±5,0 <sup>A</sup>	18,4±6,2	5,7±3,9
12 h	28	15,9±4,6 <sup>a</sup>	13,8±4,2 <sup>a</sup>	26,7±8,1 <sup>A,a</sup>	2,3±2,3 <sup>b</sup>
16 h	27	15,3±4,2	10,8±3,8	9,8±4,6	12,2±5,1
20 h	13	9,7±3,7	6,5±3,6 <sup>B</sup>	4,8±4,6 <sup>B</sup>	8,6±4,7
24 h	24	8,0±2,9 <sup>a</sup>	7,1±3,4 <sup>B,a</sup>	21,6±6,8 <sup>b</sup>	12,8±5,3

A:B  $p<0,05$  in Spalten

a:b  $p<0,05$  in Zeilen

**Tab. 19** Prozentuale Häufigkeit (LSM-Werte) der **kristallinen** mitochondrialen Aggregation in Oozyten (n=304) der verschiedenen COK-Klassen im Verlauf der IVM

Reifungszeit	N Oozyten	COK-Klasse			
		Klasse I x±SEM in %	Klasse II x±SEM in %	Klasse III x±SEM in %	Klasse IV x±SEM in %
0 h	34	12,3±3,8 <sup>A</sup>	15±4,6 <sup>A</sup>	17,9±6,1	23,7±6,9 <sup>B</sup>
4 h	34	11,3±3,7 <sup>A</sup>	14,1±4,3 <sup>A</sup>	15,7±5,1	19,6±5,8
8 h	37	19,1±4,8 <sup>A</sup>	18,8±4,9 <sup>A</sup>	15,8±5,9	17,1±6,4
12 h	28	20,6±5,1 <sup>A,a</sup>	12,3±4,1 <sup>A</sup>	13,3±6,2	7,0±3,9 <sup>A,b</sup>
16 h	49	20,8±4,8 <sup>A</sup>	21,5±5,1 <sup>A</sup>	14,6±5,5 <sup>a</sup>	34,1±7,4 <sup>b</sup>
20 h	44	17,7±4,8 <sup>A,a</sup>	39,1±7,2 <sup>B,b</sup>	19,0±8,6	31,4±7,8 <sup>B</sup>
24 h	78	36,8±5,2 <sup>B</sup>	44,6±6,7 <sup>B,a</sup>	21,6±6,8 <sup>b</sup>	33,3±7,5 <sup>B</sup>

A:B p<0,05 in Spalten

a:b p<0,05 in Zeilen

*Auftreten der feinkörnigen mitochondrialen Aggregation in den Oozyten der verschiedenen COK-Klassen im Verlauf der IVM*

Bei den Oozyten aller COK-Klassen stellte die feinkörnige mitochondriale Aggregationsform (Tab. 20) die dominante Aggregationsform mit hohen prozentualen Häufigkeiten dar. In den Oozyten der Klassen I und II konnte zum Reifungsende eine signifikante Abnahme dieser Aggregationsform beobachtet werden.

**Tab.20** Prozentuale Häufigkeit (LSM-Werte) der **feinkörnigen** mitochondrialen Aggregation in Oozyten (n=974) der verschiedenen COK-Klassen im Verlauf der IVM

Reifungszeit	N Oozyten	COK-Klasse			
		Klasse I x±SEM in %	Klasse II x±SEM in %	Klasse III x±SEM in %	Klasse IV x±SEM in %
0 h	155	78,1±4,8 <sup>A</sup>	73,3±5,7 <sup>A</sup>	69,2±7,4	71,0±7,4 <sup>A</sup>
4 h	171	76,0±5,1 <sup>A</sup>	71,9±5,6 <sup>C</sup>	68,6±6,5	78,3±6,1 <sup>C</sup>
8 h	136	66,2±5,7	60,9±6,1	65,8±7,7	77,1±7,1 <sup>C,G</sup>
12 h	145	63,5±6,1 <sup>a</sup>	73,8±5,4 <sup>E</sup>	60±8,9 <sup>a</sup>	90,7±4,4 <sup>b,B,I</sup>
16 h	143	63,9±5,7	67,7±5,8 <sup>F</sup>	75,6±6,7 <sup>a</sup>	53,7±7,8 <sup>b,D,J</sup>
20 h	107	72,6±5,7 <sup>A,a</sup>	54,3±7,3 <sup>b,B</sup>	76,2±9,2	60±8,2 <sup>K</sup>
24 h	117	55,2±5,3 <sup>B</sup>	48,2±6,7 <sup>D</sup>	56,8±8,1	53,8±8,0 <sup>H</sup>

A:B; C:D; E:B,D;F:D;G:H;I:J,K,H in Spalten p<0,05

a:b in Zeilen p<0,05

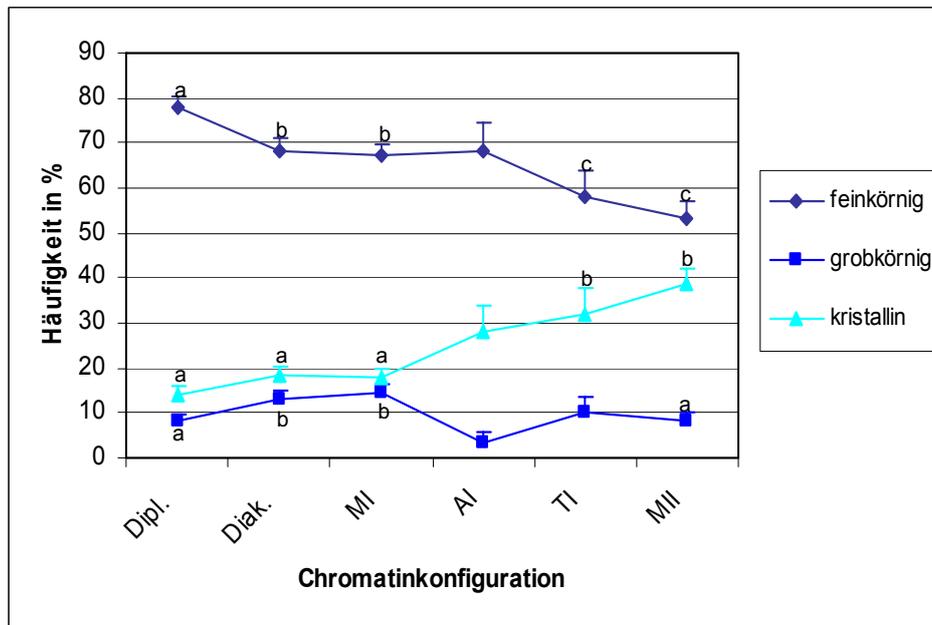
#### 4.2.1.4. Mitochondriale Aggregation in Abhängigkeit von der Chromatinkonfiguration

Um das Auftreten bestimmter mitochondrialer Aggregationsformen in Oozyten während der IVM beurteilen zu können, ist eine Betrachtung der verschiedenen Aggregationsmuster bei unterschiedlichen Chromatinkonfigurationen sinnvoll (Abb. 12). Auch bei den unterschiedlichen Chromatinkonfigurationen zeigte sich das feinkörnige Aggregationsmuster als das Muster mit den höchsten prozentualen Häufigkeiten. Bei der feinkörnigen Aggregation war von der Chromatinkonfiguration des Diplotän (unreife Oozyte) bis zum Auftreten der Metaphase II (reife Oozyte) eine Abnahme der Häufigkeit feststellbar.

Bei der grobkörnigen Aggregation ist ein heterogener Verlauf vom Diplotän bis zum Kernstadium der Metaphase II nachweisbar, bei einem leichten Anstieg in der Häufigkeit des Parameters im Diakinese- und MI-Stadium.

Vom Diplotän über die Metaphase I bis zur Metaphase II zeigt sich bei der kristallinen Aggregationsform eine Zunahme der prozentualen Häufigkeit mit starken Anstiegen bei den Übergängen zwischen MI und AI, sowie TI und MII.

**Abb. 12** Prozentuale Häufigkeit der mitochondrialen Aggregation in Abhängigkeit von der Chromatinkonfiguration



a:b. a:c. b:c  $p < 0.05$

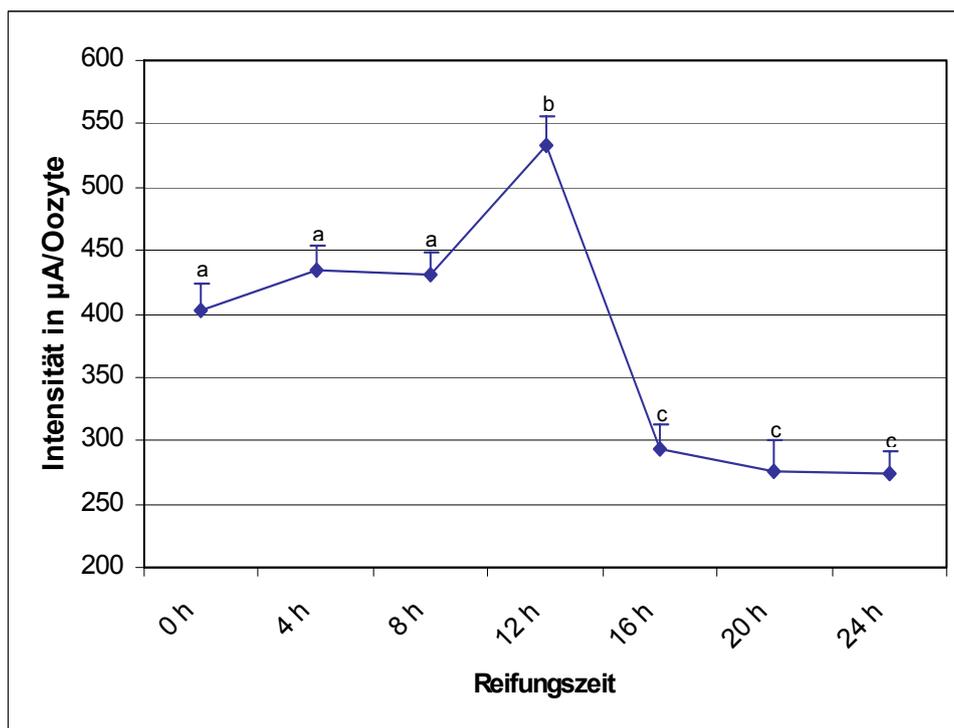
#### 4.2.2. Mitochondriale Intensität

Das Ziel dieser Untersuchung war die Analyse des Verlaufes der mitochondrialen Aktivität während der In-vitro Maturation im Ooplasma boviner Oozyten. Des Weiteren sollte die Abhängigkeit dieses mitochondrialen Parameters von der Cumulismorphologie und der Chromatinkonfiguration untersucht werden. Die Anfärbung der Mitochondrien erfolgte bei den Oozyten der verschiedenen COK-Klassen im Anschluß an die entsprechende Reifungszeit. Die mitochondriale Intensität/Oozyte wurde mit einem Photomultiplier ermittelt und wird in  $\mu\text{A}$  pro Oozyte angegeben. Zur Ermittlung der mitochondrialen Intensität wurde zunächst die Hintergrundfluoreszenz ermittelt und diese anschließend von der gemessenen Fluoreszenz der Mitochondrienfärbung in den Oozyten subtrahiert. Aufgrund der Eigenschaft des verwendeten Farbstoffes speziell an aktive, respirierende Mitochondrien zu binden, konnte indirekt aus der ermittelten Fluoreszenzintensität der Oozyten auf deren mitochondriale Aktivität geschlossen werden. Der Begriff „mitochondriale bzw. respiratorische Aktivität“ wurde daher im Verlauf der nächsten Abschnitte für den Begriff der „mitochondrialen Intensität“ verwendet.

#### 4.2.2.1. Mitochondriale Aktivität in bovinen Oozyten im Verlauf der In-vitro-Reifung

Zunächst soll der Verlauf der mitochondrialen Aktivität während der IVM ohne Berücksichtigung der COK-Klassen dargestellt werden. Nach der Gewinnung zeigten die Oozyten bezogen auf die mitochondriale Aktivität einen hohen Ausgangswert. In der ersten Reifungsphase konnte ein signifikanter Anstieg der Aktivität bis zu einem Maximalwert bei 12 h Reifungszeit dargestellt werden (494,92  $\mu\text{A}/\text{Oozyte}$ ). Zwischen 12 und 16 h nahm die Aktivität der Mitochondrien signifikant ab. Gegen Ende der IVM verblieb die mitochondriale Aktivität auf diesem niedrigen Niveau und lag damit unter dem Ausgangswert bei Reifungsbeginn. Abbildung 13 zeigt den Verlauf der mitochondrialen Aktivität während der IVM.

**Abb.13** Mitochondriale Fluoreszenzintensität in bovinen Oozyten während der IVM (Gesamtdarstellung)



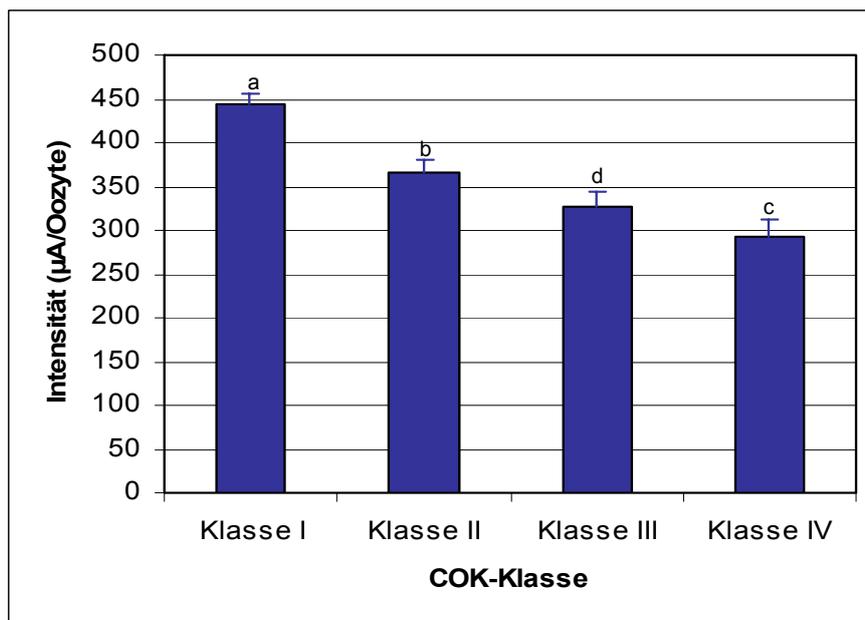
a:b,a:c,b:c  $p < 0,05$

#### 4.2.2.2. Mitochondriale Aktivität in bovinen Oozyten in Abhängigkeit von der COK-Klasse

Als nächstes soll die mitochondriale Aktivität in den Oozyten der einzelnen COK-Klassen betrachtet werden. Hierbei wurden die Mittelwerte der mitochondrialen Fluoreszenzintensität in  $\mu\text{A}$  bei den Oozyten der COK-Klassen I-IV ermittelt (Abb. 14).

Die Oozyten der Klasse I wiesen im Durchschnitt eine signifikant höhere mitochondriale Aktivität als die Oozyten der anderen Klassen auf. Die Aktivitätswerte der Oozyten der Klasse II und III unterschieden sich nicht signifikant. Bei den denudierten Oozyten (Klasse IV) lagen die signifikant niedrigsten Aktivitätswerte vor.

**Abb. 14** Mitochondriale Fluoreszenzintensität in bovinen Oozyten ( $\mu\text{A}/\text{Oozyte}$ ) in Abhängigkeit von der verwendeten COK-Klasse (LSM $\pm$ SE) (Gesamtdarstellung)

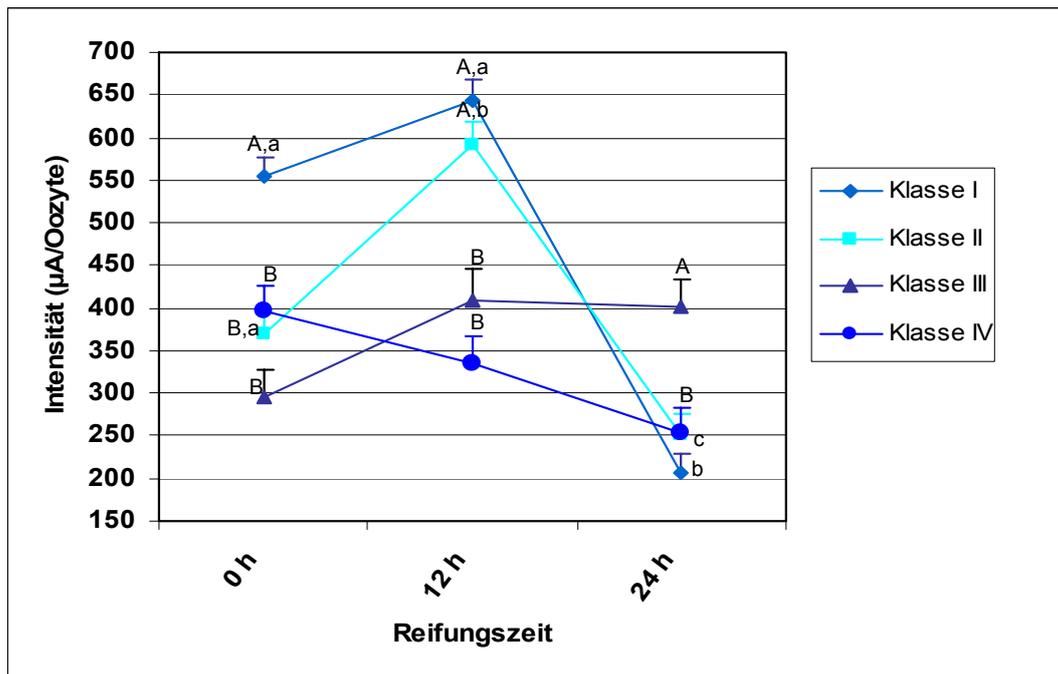


a:b; a:c; a:d, b:c  $p < 0,05$

#### 4.2.2.3. Mitochondriale Aktivität in bovinen Oozyten während der IVM in Abhängigkeit von der COK-Klasse

Abb. 15 zeigt, dass während der IVM bei den Oozyten der verschiedenen COK-Klassen ein unterschiedlicher Verlauf der mitochondrialen Aktivität vorliegt.

**Abb. 15** Mittelwerte (Least Squares Means, LSM) der mitochondrialen Aktivität (Fluoreszenzintensität in  $\mu\text{A}/\text{Oozyte}$ ) im Verlauf der IVM in Abhängigkeit von der COK-Klasse



A:B  $p < 0,05$  (innerhalb einer Reifungszeit)  
a:b, b:c  $p < 0,01$  (innerhalb einer COK-Klasse)

Die Oozyten der **Klasse I** wiesen nach der Gewinnung hohe Ausgangswerte (555  $\mu\text{A}/\text{Oozyte}$ ) auf. Dieser Wert war hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) gegenüber den Anfangswerten der Klassen II, III und IV. In der ersten Phase der IVM stieg die mitochondriale Aktivität bei Oozyten der Klasse I bis auf ein Maximum bei 12 h an. Diese Steigerung war jedoch nicht signifikant. Nach 24 h Reifungszeit wies die mitochondriale Aktivität der Oozyten der Klasse I den niedrigsten Wert aller Klassen auf. Der Aktivitätswert zum Ende der Reifung war signifikant erniedrigt gegenüber den Werten bei 0 h und 12 h.

Die Oozyten der **Klasse II** zeigten nach der Gewinnung einen deutlich niedrigeren Ausgangswert im Vergleich zu den Oozyten der Klasse I. Auch bei dieser Klasse lagen ein Anstieg der mitochondrialen Aktivität und ein Maximalwert bei 12 h vor. Dieser ist hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) zum Ausgangswert dieser Klasse. Zum Zeitpunkt  $t_{12}$  wiesen die Oozyten

der Klassen I und II signifikant höhere Aktivitätswerte auf als die Oozyten der Klassen III und IV. Der Verlauf der mitochondrialen Aktivität gegen Ende der IVM ähnelte bei den Oozyten der Klasse II dem der Klasse I.

Der Ausgangswert der mitochondrialen Aktivität bei Oozyten der **Klasse III** lag unter den Werten der Klassen I und II. Bis zum Zeitpunkt  $t_{12}$  kam es zu keinem signifikanten Anstieg der mitochondrialen Aktivität in dieser Klasse. In den Oozyten der Klasse III konnte kein Abfall der mitochondrialen Aktivität zum Ende der Reifung beobachtet werden.

Die Oozyten der **Klasse IV** weisen nur eine geringe mitochondriale Aktivität im Verlauf der IVM auf. Die Schwankungen waren in dieser Klasse nicht so deutlich wie bei den anderen Versuchsgruppen. Es lagen keine Signifikanzen zwischen den Werten der einzelnen Reifungszeitpunkte vor.

#### 4.2.2.4. Mitochondriale Aktivität in bovinen Oozyten in Abhängigkeit von ihrer mitochondrialen Aggregation

Bei der Betrachtung der Beziehung zwischen der mitochondrialen Aggregation und der mitochondrialen Aktivität (Tab. 21) ohne Berücksichtigung der COK-Klasse und der Reifungszeit konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten beobachtet werden.

**Tab. 21** Mittelwerte der mitochondrialen Fluoreszenzintensität bei bovinen Oozyten mit verschiedenen mitochondrialen Aggregationsformen (Gesamtdarstellung)

Aggregationsmuster	Intensität (LSM-Werte) ±SEM in $\mu\text{A}/\text{Oozyte}$
feinkörnig	366,8±7,8
grobkörnig	368,1±19,6
kristallin	336,0±14,1

#### 4.2.2.5. Mitochondriale Aktivität in bovinen Oozyten in Abhängigkeit von der mitochondrialen Aggregation und der verwendeten COK-Klasse

Bei der Betrachtung der mitochondrialen Aktivität in Abhängigkeit von der mitochondrialen Aggregation bei den verschiedenen COK-Klassen lassen sich signifikante Unterschiede feststellen (Tab. 22). Bei der feinkörnigen Aggregation wiesen die Oozyten der Klasse I die

signifikant höchsten mitochondrialen Aktivitätswerte im Vergleich zu allen anderen Klassen auf. Zwischen den Werten der Klassen II und III lagen bei dem Auftreten einer feinkörnigen mitochondrialen Aggregation keine signifikanten Unterschiede vor. Die Werte der Oozyten der Klasse II und III waren zu den Werten der Klasse IV erhöht.

Oozyten mit grobkörniger mitochondrialer Verteilung zeigten zwischen den einzelnen COK-Klassen keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf ihre mitochondriale Aktivität.

Bei Oozyten der Klasse I mit kristalliner Aggregationsform konnten hohe mitochondriale Aktivitätswerte festgestellt werden. Diese sind zu den Werten der anderen Klassen signifikant.

**Tab. 22** Mitochondriale Fluoreszenzintensität (LSM-Werte) bei Oozyten verschiedener COK-Klassen in Abhängigkeit vom mitochondrialen Aggregationsmuster

COK-Klasse	Mitochondriales Aggregationsmuster		
	feinkörnig LSM±SEM in µA	grobkörnig LSM±SEM in µA	kristallin LSM±SEM in µA
<b>Klasse I</b>	444,2±12,6 <sup>a</sup>	437,6±30,2	449,4±23,3 <sup>a</sup>
<b>Klasse II</b>	377,2±14,1 <sup>b</sup>	411,8±32,6	306,2±23,5 <sup>b</sup>
<b>Klasse III</b>	363,4±18,4 <sup>b</sup>	316,8±37,5	300±35,6 <sup>b</sup>
<b>Klasse IV</b>	282,3±16,6 <sup>c</sup>	306±52,4	288,4±28,3 <sup>b</sup>

a:b,c;b:c in Spalten

#### 4.2.2.6. Mitochondriale Aktivität im Verlauf der IVM in Abhängigkeit vom Aggregationsmuster

Abbildung 16 zeigt die Verläufe der mitochondrialen Aktivität während der IVM bei Oozyten in Abhängigkeit von den verschiedenen mitochondrialen Aggregationsformen. Unabhängig von der Aggregationsform der Mitochondrien zeigten alle Oozyten den signifikant höchsten Aktivitätswert nach 12 h Reifungszeit. Bei Oozyten mit grobkörniger Aggregationsform war der Anstieg der Aktivität bis zum Erreichen des Maximalwertes durch einen starken Abfall der Aktivität nach 8 h Maturationszeit unterbrochen. Bemerkenswert war der frühere Anstieg der mitochondrialen Aktivität bei Oozyten mit kristalliner Aggregationsstruktur schon zum Zeitpunkt  $t_8$ . Nach dem Erreichen des Maximalwertes wiesen alle Oozyten unabhängig von der vorhandenen Aggregationsform zwischen 12 h und 16 h Reifungszeit einen signifikanten

Abfall der mitochondrialen Aktivität auf. Die Aktivitätswerte gegen Ende der IVM waren bei allen Aggregationsformen signifikant niedriger als die Werte zu Beginn der Reifung.

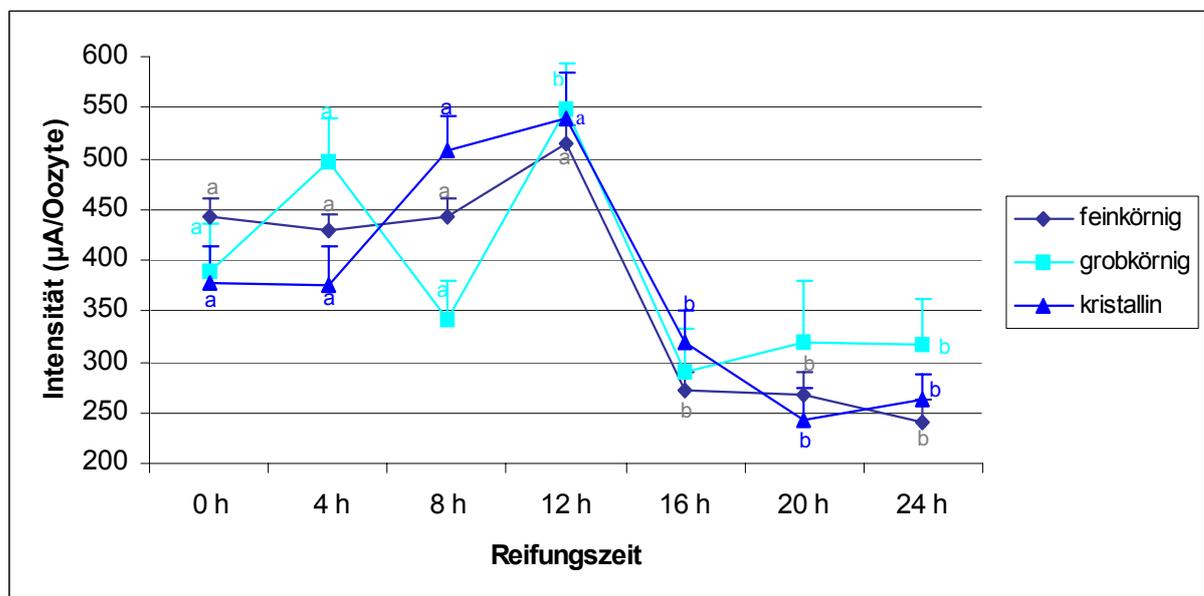
#### 4.2.2.7. Mitochondriale Aktivität in bovinen Oozyten in Abhängigkeit von ihrer Chromatinkonfiguration

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde die mitochondriale Aktivität von Oozyten, die sich in einem bestimmten Kernstadium befinden, unabhängig von der Klassenzugehörigkeit und des Zeitpunktes der Reifung analysiert.

Abbildung 17 stellt die ermittelten Werte graphisch dar.

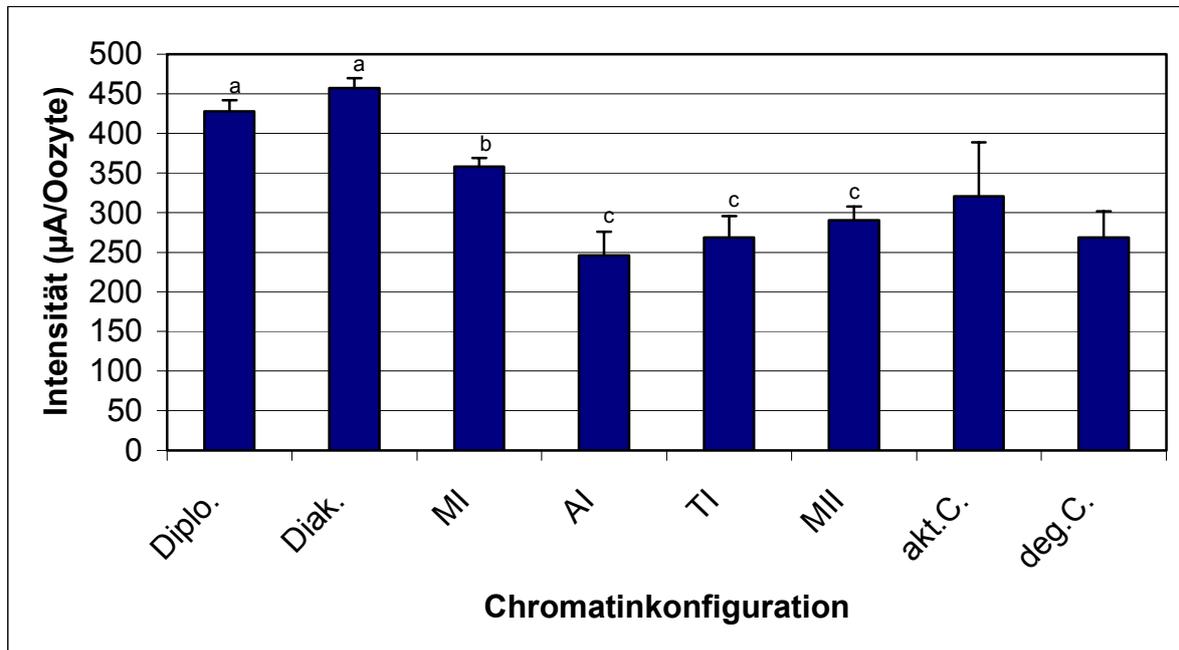
Die Oozyten, die sich im Stadium des Diplotän bzw. der Diakinese befanden, zeigten die signifikant höchste mitochondriale Aktivität. Anschließend fielen die Aktivitätswerte ab und der signifikant niedrigste Wert konnte bei den Oozyten in der Anaphase I gemessen werden. Die Oozyten in der Metaphase II zeigten wieder einen Anstieg der mitochondrialen Aktivität. Dieser beobachtete Anstieg ist jedoch nicht signifikant.

**Abb. 16** Mitochondriale Fluoreszenzintensität ( $\mu\text{A}/\text{Oozyte}$ ) im Verlauf der IVM in Abhängigkeit von dem mitochondrialen Aggregationsmuster



a:b innerhalb eines Verteilungsmusters  $p < 0,05$   
keine Signifikanzen innerhalb einer Reifungszeit

**Abb. 17** Mitochondriale Fluoreszenzintensität (Intensität in  $\mu\text{A}/\text{Oozyte}$ ) in Abhängigkeit von der Chromatinkonfiguration



a:b,a:c,b:c  $p < 0,05$

### 4.3. Untersuchungen zu apoptotischen Veränderungen

Die Bestimmung der Apoptose in Zellen ermöglicht eine Erfassung von beginnenden Entdifferenzierungsvorgängen im Zellkern und damit eine Erfassung des beginnenden Zelltodes. Differenzierungsvorgänge spielen besonders in den Cumuluszellen eine wichtige Rolle und daher ist der Parameter „Apoptose“ geeignet, um die Qualität des Cumulus oophorus einer Oozyte zu beurteilen. Die Caspasen, und vor allem die Caspase-3, spielen eine zentrale Rolle im apoptotischen Geschehen. Neben der immunhistochemischen Untersuchung der Apoptose in den Cumuluszellkernen soll daher die Caspase-3-Aktivität in Oozyten und Cumuluszellen mit molekularbiologischen Methoden analysiert werden.

#### *Apoptose in Cumuluszellkernen*

Ziel dieser Untersuchung war es, die Apoptoserate der Cumuluszellen der verschiedenen COK-Klassen zu verschiedenen Reifungszeiten zu untersuchen. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Apoptoserate zu bestimmten

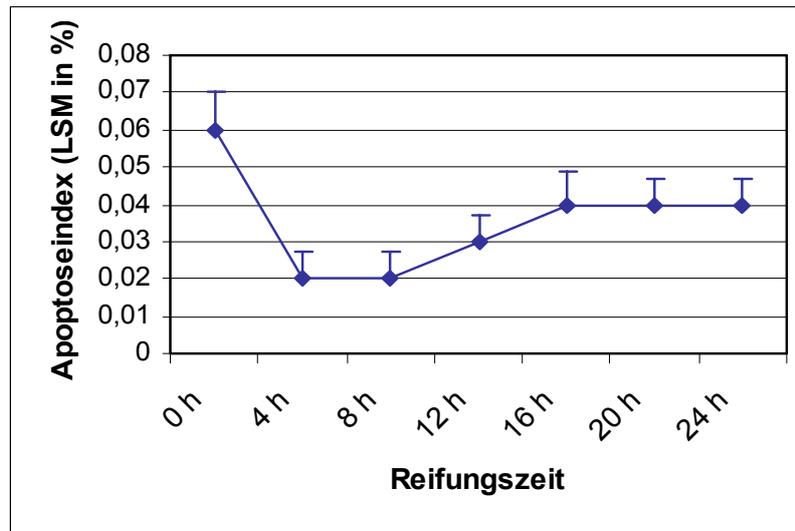
Zeitpunkten und den bereits beschriebenen mitochondrialen Parametern besteht. Insgesamt wurden 70839 Cumuluszellen ausgewertet.

Zunächst soll die Apoptoserate in den Cumuluszellkernen in Abhängigkeit von der Reifungszeit betrachtet werden (Tab. 23 und Abb. 18).

Zu Beginn der Reifung wurde der höchste Apoptoseindex nachgewiesen. Der geringste Anteil apoptotischer Zellen wurde bei 4 und 8 h Reifungsdauer beobachtet. Eine geringfügige Erhöhung des Apoptoseindex war mit Zunahme der Reifungszeit zu beobachten. Die vorliegenden Veränderungen des Apoptoseindex wiesen keinerlei Signifikanzen auf.

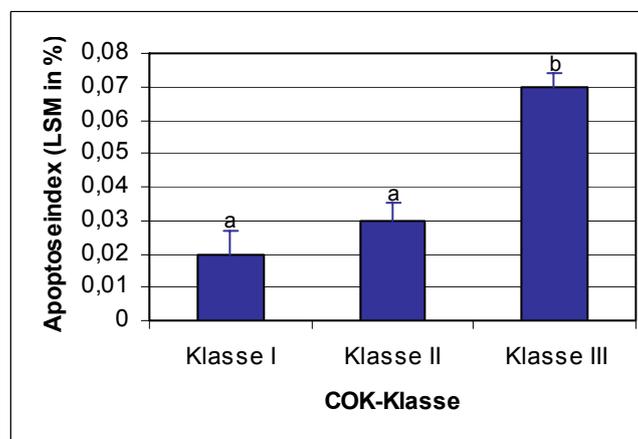
**Tab. 23** Anteil apoptotischer Cumuluszellen bei bovinen COK (LSM-Werte) während der IVM

Reifungszeit	Anzahl Cumuluszellen	Anzahl Apopt. Zellen	rel. Apoptoseindex (LSM±SEM in %)
0 h	6605	634	0,06±1,4
4 h	11717	251	0,02±0,7
8 h	10889	181	0,02±0,7
12 h	11228	362	0,03±0,7
16 h	7640	341	0,04±0,9
20 h	10760	454	0,04±0,7
24 h	12000	528	0,04±0,7

**Abb. 18** Apoptoseverlauf bei Cumuluszellen boviner COK während der IVM

In der vorliegenden Arbeit richtet sich die Einteilung der Cumulus-Oozyten-Komplexe nach der Morphologie des Cumulus oophorus zum Zeitpunkt der Gewinnung. Bei der Untersuchung der Apoptoserate in Cumuluszellkernen ist daher eine Betrachtung der Verhältnisse bei den unterschiedlichen COK-Klassen von Bedeutung (Abb. 19).

Bei Cumuluszellkernen aus einem bereits expandiertem Cumulus oophorus (Klasse III) war ein signifikant höherer Apoptoseindex nachweisbar als bei den noch nicht entdifferenzierten Cumuluszellen der Klassen I und II. Zwischen den Klassen I und II waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

**Abb. 19** Anteil apoptotischer Cumuluszellen (Least Square Means, LSM) in drei verschiedenen COK-Klassen

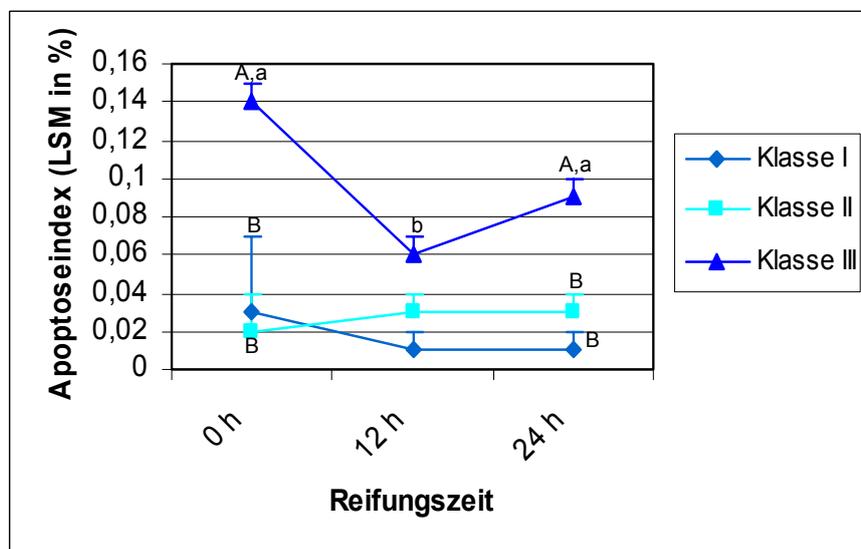
a:b p<0,05

Die Unterschiede in der Apoptoserate bei Cumuluszellkernen von COK verschiedener Klassen sollen nun in Abhängigkeit von der Reifungszeit betrachtet werden.

Während der IVM wiesen die Cumuluszellkerne des expandierten COK-Typs (Klasse III) die höchste Apoptoserate auf (Abb. 20). Im Anschluss an die Gewinnung lag ein signifikanter Unterschied zwischen der Apoptoserate der Klasse III und den Klassen I und II vor.

Nach 12 h IVM waren die Unterschiede zwischen den Klassen nicht signifikant. Am Ende der Reifung besaßen die Cumuluszellen der Klasse III erneut einen signifikant höheren Apoptoseindex als die anderen Klassen.

**Abb. 20** Apoptoseindex (LSM-Werte in %) in Cumuluszellkernen der verschiedenen COK- Klassen zu den Zeitpunkten  $t_0$ ,  $t_{12}$  und  $t_{24}$  der IVM

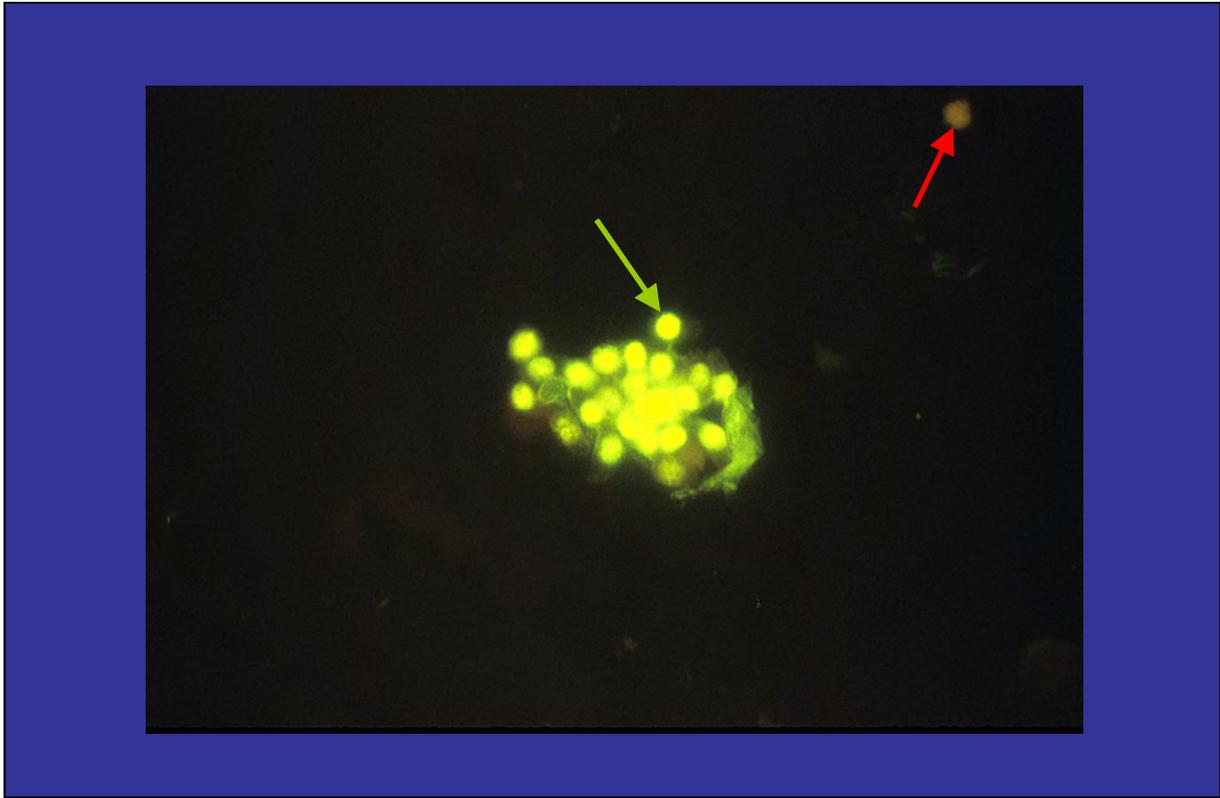


A:b  $p < 0,01$  innerhalb einer Klasse

A:B  $p < 0,05$  innerhalb einer Reifungszeit

Die Verläufe der Apoptoserate in den Cumuluszellen der Klasse I und II zeigten während der IVM keine signifikanten Unterschiede. Bei den Cumulus-Oozyten-Komplexen aller Gruppen kommt es im Reifungsverlauf zu einer Lockerung und Expansion des Cumuluszellverbandes. Da die COK der Klasse III bereits bei Reifungsbeginn expandiert sind, führte eine weitere Lockerung des Cumulus zum Ablösen der äußeren Cumuluszellschichten bei dieser Gruppe. Eine Beobachtung der gesamten Cumuluszellpopulation ist bei dieser Gruppe daher nur am Anfang der Reifung möglich.

Von 12 h IVM bis zum Reifungsende bei 24 h IVM war in den Cumuluszellkernen der Klasse III wieder ein Anstieg der Apoptose in den Kernen der Cumuluszellen nachweisbar. Die Veränderungen während der IVM waren bei der Klasse III signifikant.



**Abb. 21** Apoptose in Cumuluszellen der COK-Klasse III nach 12 h IVM, apoptotische Zellkerne grün gefärbt (grüner Pfeil), Zellkerne ohne apoptotische Veränderungen rot gefärbt (roter Pfeil) (TUNEL, 460x)

---

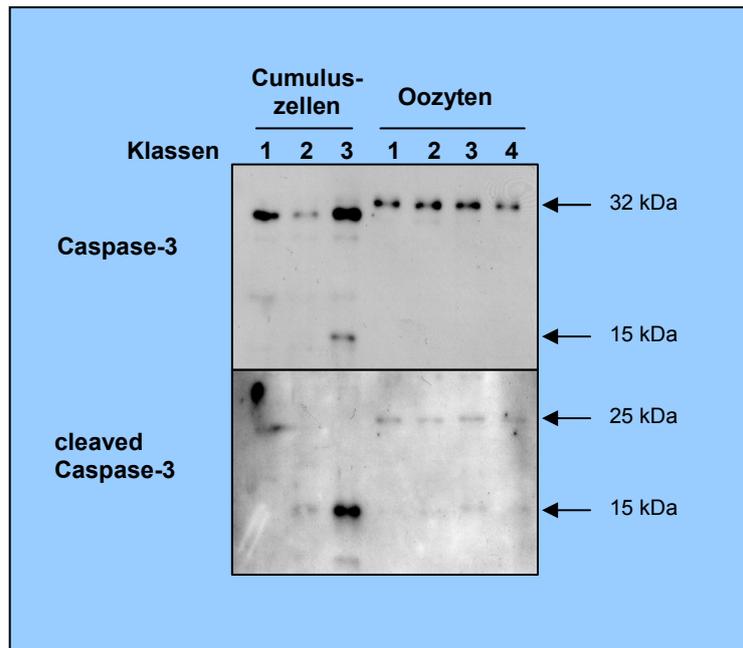
*Bestimmung von Caspase-3 im Ooplasma und in den umgebenden Cumuluszellen*

Vor Beginn des Versuches wurde der ausgesuchte Apoptose Sampler Kit auf die Eignung für bovine Zellen überprüft. Hierzu wurde der postmitochondriale Überstand von bovinen Hepatozyten verwendet. Als Positiv-Kontrolle diente ein Zellextrakt der Maus-Zelllinie NIH/3T3 und als Negativ-Kontrolle diente dieser Zellextrakt mit Zugabe des Akt-Inhibitors LY 294002. Im Vorversuch konnte gezeigt werden, dass bovine Hepatozyten auf den verwendeten Caspase-3-Antikörper reagieren. Der Antikörper gegen Caspase-7 und -9 zeigte in den Vorversuchen nur eine schwache Reaktion. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher ausschließlich der Caspase-3-Antikörper verwendet.

Die Abbildung 22 macht deutlich, dass nach 12 h Reifungszeit cleaved-Caspase-3 ausschließlich in den Cumuluszellen der Klasse III nachweisbar war. Cleaved-Caspase-3 konnte in den Oozyten aller COK-Klassen nicht nachgewiesen werden. Aus der Abbildung 22 geht ebenfalls hervor, dass in den Oozyten aller Klassen nach 12 h Reifungszeit ein Molekül vorhanden war, das auf den Antikörper für Caspase-3 reagierte. Dieses Molekül besaß in den Oozyten jedoch ein höheres Molekulargewicht im Vergleich zu dem spezifischen Molekül in den Cumuluszellen.

Die Aufbereitung der Cumuluszellen im Rahmen der biochemischen Untersuchungen gestaltete sich als schwierig, da es nach der Zentrifugation der Zellen zu Zellverlusten kam. Um die Ergebnisse abzusichern wurden im Anschluss an die erste Versuchsreihe weiterführende Untersuchungen an vollständigen Cumulus-Oozyten-Komplexen durchgeführt. Die Präparation von COK für die Elektrophorese war einfacher und beinhaltet geringere Zellverluste als bei einer separaten Behandlung der Cumuluszellen. Die Abbildung 23 gibt die Ergebnisse dieses Versuchsabschnittes wieder. Als Positivkontrolle wurde Aktin verwendet.

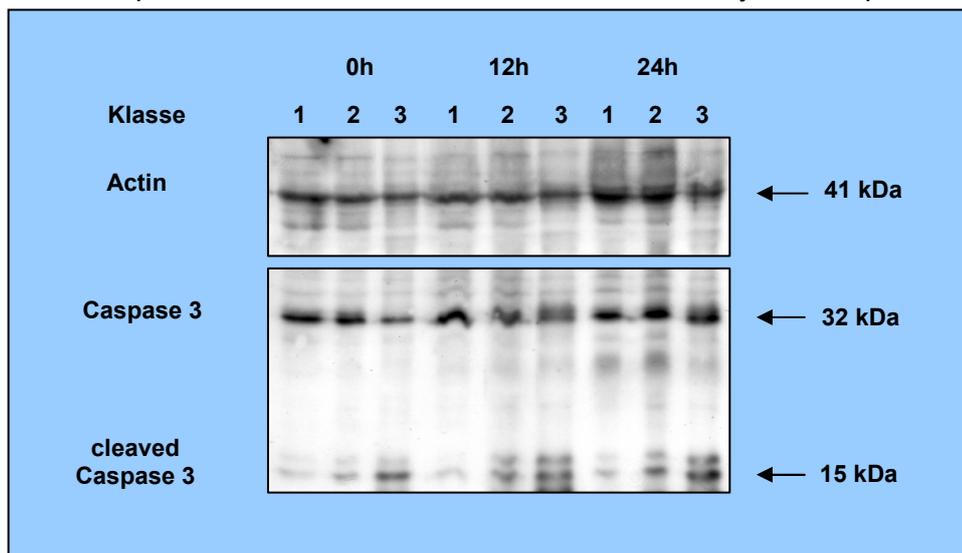
**Abb. 22** Ergebnisse des Nachweises der Caspase-3 und cleaved-Caspase-3 zum Zeitpunkt  $t_{12}$  der IVM in Oozyten und Cumuluszellen



Bei der cleaved-Caspase war im Verlauf der IVM ein Anstieg zu beobachten. Die COK der Klassen II und III wiesen größere Mengen von cleaved-Caspase-3 auf.

Die Ergebnisse bezüglich der cleaved-Caspase-3 der COK konnten auf die Cumuluszellen zurückgeführt werden. Diese Schlussfolgerung war möglich, da bei den vorherigen Untersuchungen in den Oozyten keine cleaved-Caspase-3 festgestellt werden konnte.

**Abb. 23** Ergebnisse zum Nachweis von Aktin, Caspase-3 und cleaved-Caspase-3 zu den Zeitpunkten  $t_0$ ,  $t_{12}$  und  $t_{24}$  in intakten Cumulus-Oozyten-Komplexen



#### 4.4. Untersuchung zur Entwicklungskompetenz von Oozyten unterschiedlicher COK-Klassen

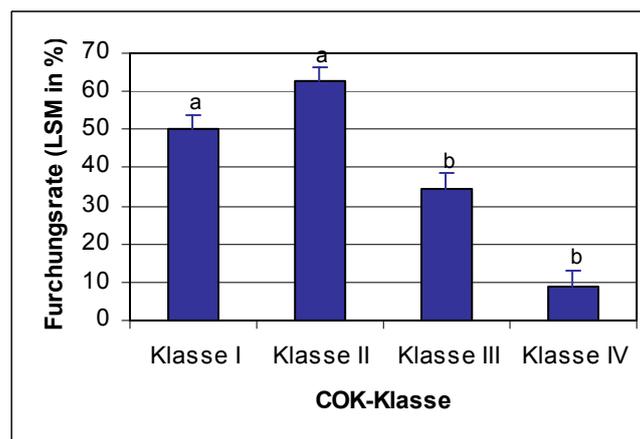
Ziel dieser Untersuchung war die Beurteilung der Entwicklungskompetenz von Oozyten der verschiedenen COK-Klassen unter den gegebenen Laborbedingungen. Als Maß für die Entwicklungskompetenz diente die Teilungsrates am Tag 3 post fertilisationem sowie die Blastozystenrate am Tag 7, 8 und 9 p. fert..

##### *Furchungsrate*

Die Furchungsrate wurde am 3. Tag nach der Zugabe der Spermisuspension durch die Bestimmung der absoluten Zahl an Embryonen, die mind. zwei Blastomeren aufwiesen, ermittelt.

Die Oozyten der Klasse I und II zeigten eine signifikant höhere Furchungsrate als Oozyten der Klassen III und IV ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,001$ ). Bezogen auf die absoluten Zahlen konnte bei den Oozyten der Klasse II eine höhere Furchungsrate ermittelt werden als bei den Oozyten der Klasse I. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p = 0,1271$ ). Die Oozyten der Klasse IV zeigten die niedrigste Furchungsrate aller Klassen (Abb. 24).

**Abb. 24** Furchungsrate (LSM in %) am Tag 3 p.fert. in Abhängigkeit von der verwendeten COK-Klasse



a:b  $p < 0,05$

*Blastozystenrate*

Die sich entwickelnden Embryonen wurden am Tag 7, 8 und 9 unter dem Stereomikroskop beurteilt. Als „Blastozyste“ wurden hierbei Embryonen definiert, die eine deutliche Differenzierung von Embryoblast und Trophoblast zeigten und der Qualitätsklasse 1 und 2 der International Embryo Transfer Society (IETS) zuzuordnen waren.

Am Tag 9 wurde aus den absoluten Werten der Blastozystenanzahl die Blastozystenrate in % ermittelt. Die Angabe der Blastozystenrate erfolgt zum einen bezogen auf die Anzahl der für die IVM eingesetzten COK (Tab. 24) und zum anderen bezogen auf die Anzahl der gefurchten Embryonen am Tag 3 (Tab. 25).

**Tab. 24** Blastozystenrate (LSM-Werte in %) bezogen auf die Anzahl an verwendeten COK

COK-Klasse	Anzahl COK N	Blastozystenrate n (LSM in %)	Standardfehler (SE in %)
I	288	38 (13,2) <sup>a</sup>	3,00
II	286	68 (23,8) <sup>a</sup>	3,01
III	269	13 (4,8) <sup>b</sup>	3,10
IV	261	0 <sup>b</sup>	3,15

a:b p<0,05

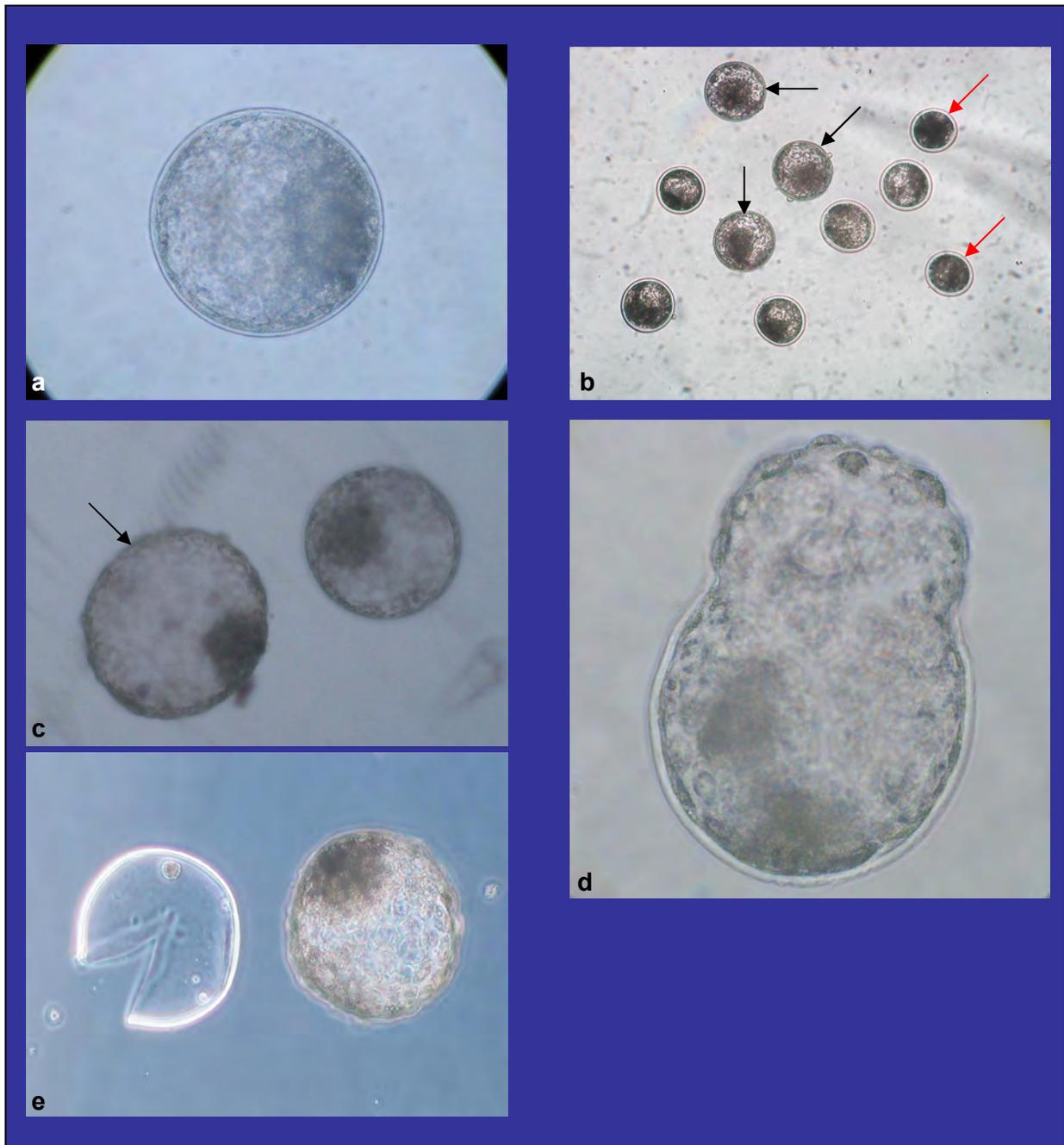
Bezogen auf die Gesamtanzahl der verwendeten COK wiesen die Oozyten der Klasse II im Vergleich zu den Ergebnissen der Klassen III und IV eine signifikant höhere Blastozystenrate auf. Bei der Betrachtung der absoluten Zahlen fiel eine höhere Blastozystenrate der Oozyten der Klasse II im Vergleich zu den Oozyten der Klasse I auf. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Die Blastozystenrate bezogen auf die Anzahl der gefurchten Embryonen (Tab. 25) verhielt sich ähnlich wie die Blastozystenrate bezogen auf die Anzahl der gereiften COK. Aus den Oozyten der Klasse II konnten die meisten Blastozysten gewonnen werden. Der Unterschied zu den Ergebnissen der Klassen III und IV war signifikant (p<0,05).

**Tab. 25** Blastozystenrate (LSM-Werte in %) bezogen auf die Gesamtzahl der gefurchten Embryonen

<b>COK-Klasse</b>	<b>Anzahl befr. COK N</b>	<b>Blastozystenrate n (LSM in %)</b>	<b>Standardfehler (SE in %)</b>
<b>I</b>	144	38 (26,4) <sup>a</sup>	4,94
<b>II</b>	179	68 (37,9) <sup>a</sup>	4,43
<b>III</b>	93	13 (13,9) <sup>b</sup>	6,15
<b>IV</b>	23	0 <sup>b</sup>	12,37

a:b p<0,05



**Abb. 25** Verschiedene Stadien boviner Blastozysten

**a:** Blastozyste Tag 8 (Phasenkontrastmikroskop x10), **b:** beginnende Blastozysten (rote Pfeile) und expandierte Blastozysten (schwarze Pfeile) aus Oozyten der Klasse I am Tag 8 p.fert. (Phasenkontrastmikroskop x10), **c:** geschlüpfte Blastozyste (Pfeil) und expandierte Blastozyste Tag 8 (Phasenkontrastmikroskop x10), **d:** schlüpfende Blastozyste Tag 8 (Phasenkontrastmikroskop x10), **e:** expandierte Blastozyste nach dem Schlüpfen mit zugehöriger Zona pellucida (Phasenkontrastmikroskop x10)